

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Κωνσταντόπουλος
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ
ΚΕΝΤΡΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτρης Λουκόπουλος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη των μοριακών διαταραχών του επιγενετικού μηχανισμού ρύθμισης των κυττάρων στην παθογένεια των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών»

ΑΝΔΡΕΑΣ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ
Βιολόγος

Πραγματοποιήθηκε στο:
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΑΘΗΝΑ, ΦΛΕΒΑΡΗΣ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΠΟΛΙΤΟΥ (Επιβλέπουσα)
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ
Καθηγητής

ΜΑΡΙΝΑ ΜΑΝΤΖΟΥΡΑΝΗ
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΛΟΥΚΟΠΟΥΛΟΣ
Ομότιμος Καθηγητής

ΓΙΩΡΓΟΣ ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ
Καθηγητής

ΜΑΡΙΑ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής

Αφιερωμένο στους δικούς μου ανθρώπους, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν,
και σε έναν άνθρωπο που δεν είναι ακόμη εδώ, αλλά μου έδωσε το κουράγιο να συνεχίσω...

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὄρκιζομαι ἐπὶ τὸν ἀπολλῶνα τὸν ἰατρό καὶ ἐπὶ τὸν ἄσκληπιό καὶ ἐπὶ τὴν υἱεῖα καὶ ἐπὶ τὴν πανακεία καὶ ἐ' ὄλουσ τοὺς θεοὺς ἐπικαλούμενός τὴν μαρτυρία τοῦε, νὰ τηρήσω πιστὰ κατὰ τὴ δύναμὴ καὶ τὴν κρῆν μου αὐτὸ τὸν ὄρκον καὶ τὸ εὐμβολαῖο μου αὐτό. νὰ θεώρω αὐτὸν ποὺ μου διδάξῃ αὐτὴ τὴν τέχνη ἴσο με τοὺς γονεῖς μου καὶ νὰ μοιραῶμαι μὲ τὸν τα υπάρχοντα μου καὶ τὰ χήματα μου ἂν ἔχει ἀνάγκη φροντίζε. νὰ θεώρω τοὺς ἀπογονοὺς τοῦε ἴσο με τ' ἀδελφία μου καὶ νὰ τοὺς διδάσω τὴν τέχνη αὐτὴ ἂν θέλωμαι νὰ τὴ μάθωμαι, χωρὶς ἀμοιβῆ καὶ εὐμβολαῖο καὶ νὰ μεταδώσω με γάρβι γέλιος, ὄδηγῆ καὶ συμβούλες ὅλε τὴν ὑπόλοιπὴ γνῶση μου καὶ ἐπὶ τὰ παῖδια μου καὶ ἐπὶ τὰ παῖδια ἐκείνου ποὺ με διδάξῃ καὶ ἐπὶ τοὺς ἄλλους μαθητῆς ποὺ ἔχωμαι κανεὶ γράβιτὴ συμφωνία μὲ μου καὶ ἐ' αὐτοὺς ποὺ ἔχουμαι ὀρκισθεὶ ἐπὶ τὸν ἰατρικὸ νόμον καὶ ἐε κανέναν ἄλλο καὶ νὰ θεράπευω τοὺς πασχόντες κατὰ τὴ δύναμὴ μου καὶ τὴν κρῆν μου χωρὶς γότῃ, ἐκούσιος, νὰ τοὺς βλάσω ἢ νὰ τοὺς ἀδικῆσω. καὶ νὰ μὴ δώσω ποτῃ ἐε κανένα, ἐστὶ κὶ ἂν μου τὸ ζητήε, θανάτηφορο φάρμακο, οὔτῃ νὰ δώσω ποτῃ τέτοια εὐμβολαῖ. ὁμοίως, νὰ μὴ δώσω ποτῃ ἐε γυναικὴ φάρμακο γὰ ν' ἀποβάλλῃ. νὰ διατηρήσω δὲ τὴ ζωὴ μου καὶ τὴν τέχνη μου καθαρὴ καὶ ἀτμῆ. καὶ νὰ μὴ χειροῦρηθω πασχόντες ἀπὸ νόθους ἀλλὰ ν' ἀφήσω τὴν πρᾶξὴ αὐτὴ γὰ τοὺς ἐδικοὺς. καὶ ἐ' ὅποια ἐπιτὰ κὶ ἂν μῆσω, νὰ μῆσω γὰ τὴν ὠφέλεια τῶν πασχόντων ἀποφεύγοντας καθῃ ἐκούσιος ἀδικία καὶ βλάβη καὶ καθῃ γενέθησι πρᾶξὴ καὶ με γυναικῆ καὶ με ἀνδρες, ἐλευθεροὺς καὶ δούλους. καὶ ὅτὶ δὴ ἢ ἀκούσω κατὰ τὴν δεκτικὴν τοῦ ἐπαγγέλματος μου, ἢ κὶ ἐκτός, γὰ τὴ ζωὴ τῶν ἀνθρώπων, ποὺ δὲν πρέπει ποτῃ νὰ κοινοποιηθεῖ, νὰ εἰσπῆσω καὶ νὰ τὸ τηρήσω μυστικὸ. ἂν τὸν ὄρκον μου αὐτὸ τηρήσω πιστὰ καὶ δὲν τὸν ἀθέσω, εἴθε ν' ἀπολαύσω γὰ πάντα τὴν ἐκτίμησὴ ὅλων τῶν ἀνθρώπων γὰ τὴ ζωὴ μου καὶ γὰ τὴν τέχνη μου, ἂν ὁμῶς παραβῶ καὶ ἀθέσω τὸν ὄρκον μου νὰ ὑπὸς τὰ ἀντιθέτα ἀπὸ αὐτὰ.

Περιεχόμενα

A/A	Κεφάλαιο	Τίτλος Κεφαλαίου	Αρχική Σελίδα	Τελική Σελίδα
1	1	Εισαγωγή	1	1
2	1.1	Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες	1	1
3	1.1.1	Ορισμός	1	1
4	1.1.2	Ταξινόμηση των Μυελοϋπερπλαστικών Νεοπλασιών	1	1
5	1.1.2.1	Ταξινόμηση κατά Dameshek	1	1
6	1.1.2.2	Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) το 2001 και η αναθεώρηση του 2008	1	2
7	1.1.2.3	Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Αναθεώρηση του 2016	2	3
8	1.2	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και υποκείμενες γενετικές βλάβες	3	3
9	1.2.1	Κλασικά Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (MYN)	3	3
10	1.2.1.1	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ)	3	4
11	1.2.1.2	Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)	4	5
12	1.2.1.3	Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)	5	6
13	1.2.1.4	Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ)	6	8
14	1.2.2	Μη Κλασικά Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα	8	8
15	1.2.2.1	Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ)	8	9
16	1.2.2.2	Μαστοκυττάρωση	9	10
17	1.2.3	Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα / Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ)	10	10
18	1.2.3.1	Άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΟΛ)	10	10
19	1.2.3.2	Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ)	10	12
20	1.2.3.3	ΜΔΣ/ΜΥΝ με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ)	12	13
21	1.3	Μοριακές βλάβες στα ΜΥΝ	13	14
22	1.3.1	Μεταλλάξεις μεγάλης κλίμακας - Χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις	15	15
23	1.3.1.1	Το χιμαιρικό γονίδιο BCR-ABL	15	15
24	1.3.2	Μεταλλάξεις μικρής κλίμακας - Σημιακές αντικαταστάσεις βάσεων και μεταλλάξεις προσθήκης/διαγραφής νουκλεοτιδίων	15	15
25	1.3.2.1	Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμβάλλουν στη μεταγωγή σήματος	15	15
26	1.3.2.1.1	Το γονίδιο JAK2	15	18
27	1.3.2.1.2	Το γονίδιο MPL	18	19
28	1.3.2.1.3	Το γονίδιο CSF3R	19	21
29	1.3.2.1.4	Το γονίδιο KIT	21	24
30	1.3.2.1.5	Τα γονίδια RAS	25	26
31	1.3.2.2	Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών	26	26
32	1.3.2.2.1	Το γονίδιο CALR	26	28
33	1.3.2.2.2	Το γονίδιο SETBP1	28	31
34	1.3.2.3	Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιγενετική τροποποίηση του DNA	31	31
35	1.3.2.3.1	Το γονίδιο DNMT3A	31	33
36	1.3.2.3.2	Το γονίδιο TET2	33	35
37	1.3.2.3.3	Τα γονίδια IDH1 και IDH2	35	36
38	1.3.2.3.4	Σύνοψη κεφαλαίου	36	37
39	1.3.2.4	Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στην τροποποίηση των ιστονών πρωτεϊνών	37	40
40	1.3.2.4.1	Το γονίδιο ASXL1	40	43
41	1.3.2.4.2	Το γονίδιο EZH2	43	44
42	1.3.2.5	Μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων	44	44
43	1.3.2.5.1	Το γονίδιο RUNX1	44	45
44	1.3.2.6	Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στην ωρίμανση (μάτισμα) του RNA	45	47
45	1.3.2.6.1	Το γονίδιο SF3B1	48	49
46	1.3.2.6.2	Το γονίδιο U2AF1	49	51
47	1.3.2.6.3	Το γονίδιο SRSF2	51	53
48	1.3.2.6.4	Το γονίδιο ZRSR2	53	53
49	1.3.3	Συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων μικρής κλίμακας σε ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΥΝ/ΜΔΣ	54	54

50	2	Βασικές Αρχές Μοριακών Τεχνικών που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία	55	55
51	2.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού σημείου (endpoint Polymerase Chain Reaction, PCR) και ανάδειξη των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)	56	57
52	2.2	Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR)	57	58
53	2.3	Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR)	58	59
54	2.4	Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	59	59
55	2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	60	60
56	2.5.1	Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο υπόστρωμα	60	61
57	2.5.2	Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται ειδικά επί συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του υποστρώματος	61	62
58	2.6	Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (Post Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)	63	64
59	2.6.1	Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική HRMA (Methylation specific HRMA, MS-HRMA)	64	65
60	2.7	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων κατά τη μέθοδο Sanger (Sanger Sequencing)	66	66
61	2.7.1	Αυτοματοποιημένη μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger	66	68
62	2.7.2	Ανάλυση δεδομένων	68	68
63	2.8	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)	68	68
64	2.8.1	Αρχή λειτουργίας της μεθόδου	68	68
65	2.8.2	Πειραματική και αναλυτική διαδικασία	69	69
66	2.8.2.1	Προετοιμασία της αντίδρασης	69	69
67	2.8.2.2	Κυρίως αντίδραση	69	70
68	2.8.2.3	Ανάγνωση του αποτελέσματος	70	70
69	2.8.3	Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική πυροαλληλούχιση (Methylation specific pyrosequencing, MSP)	71	71
70	2.8.4	Συγκριτική ανάλυση της πυροαλληλούχισης με τον προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger	71	71
71	2.9	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία επόμενης (δεύτερης) γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)	72	72
72	2.9.1	Ορισμοί	72	72
73	2.9.2	Εισαγωγή	72	74
74	2.9.3	Αρχή λειτουργίας της μεθόδου	74	74
75	2.9.4	Πειραματική και αναλυτική διαδικασία	74	74
76	2.9.4.1	Προετοιμασία της αντίδρασης	74	75
77	2.9.4.2	Κυρίως αντίδραση	75	77
78	2.9.4.3	Ανάγνωση του αποτελέσματος	77	80
79	2.9.5	Παραλλαγές της μεθόδου και διαφορετικές χρήσεις της τεχνολογίας NGS	80	80
80	2.9.5.1	DNA Sequencing (DNA-Seq)	81	81
81	2.9.5.2	RNA Sequencing (RNA-Seq)	81	82
82	2.9.6	Συγκριτική ανάλυση διαφορετικών τεχνολογιών προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων	82	82
83	2.9.6.1	Thermo Ion Torrent	82	84
84	2.9.6.2	Pacific Biosciences (PacBio)	84	84
85	2.9.6.3	Oxford Nanopore	84	85
86	2.9.6.4	Σύνοψη	85	86
87	2.9.7	Εφαρμογές στην κλινική πράξη	86	87
88	3	Αντικείμενο της Μελέτης	88	88
89	4	Υλικά και Μεθοδολογία	89	89
90	4.1	Αντιδραστήρια	89	89
91	4.1.1	Χημικά αντιδραστήρια, βιολογικά αντιδραστήρια και ολοκληρωμένα συστήματα αντιδραστηρίων	89	90
92	4.1.2	Εργαστηριακός αναλυτικός εξοπλισμός	90	90

93	4.2	Κλινικό Υλικό	91	92
94	4.2.1	Φυσιολογικά Δείγματα Αναφοράς (normal control samples)	92	92
95	4.2.2	Παθολογικά Δείγματα Αναφοράς (mutated control samples)	92	92
96	4.2.3	Επιπρόσθετα Δείγματα Αναφοράς	92	93
97	4.2.4	Προέλευση Δειγμάτων Ασθενών	93	93
98	4.3	Τεχνικές Επεξεργασίας Νουκλεϊκών Οξέων	93	93
99	4.3.1	Απομόνωση γενωμικού DNA	93	93
100	4.3.2	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA σε φασματοφωτόμετρο μάζας	93	94
101	4.3.3	Απομόνωση RNA	94	94
102	4.3.3.1	Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών	94	94
103	4.3.3.2	Απομόνωση ολικού κλάσματος RNA	95	95
104	4.3.4	Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA σε συσκευή NanoDrop	95	96
105	4.3.5	Αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA - Σύνθεση cDNA	96	97
106	4.4	Τελικού σημείου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (endpoint PCR), ακολουθούμενες από ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτική αгарόζης, για ανίχνευση μεταλλάξεων	97	97
107	4.4.1	Ημιοσοτικός προσδιορισμός της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F, μέσω του Συστήματος Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System PCR, ARMS-PCR)	97	97
108	4.4.1.1	Η τεχνική	97	99
109	4.4.1.2	Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης	99	99
110	4.4.2	Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2 με Αλληλοειδική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Allele Specific PCR, AS-PCR)	100	100
111	4.4.2.1	Η τεχνική	100	101
112	4.4.2.2	Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης	101	101
113	4.4.3	Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου c-MPL με Αλληλοειδική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Allele Specific PCR, AS-PCR)	101	101
114	4.4.3.1	Η τεχνική	101	102
115	4.4.3.2	Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης	102	103
116	4.4.4	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης για ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR τελικού σημείου	103	103
117	4.4.4.1	Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων	103	104
118	4.4.4.2	Ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων ARMS-PCR και AS-PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3.0%	104	104
119	4.5	Πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (Real Time PCR), ακολουθούμενες από προσδιορισμό της Πρωτοδιάταξης του DNA (Sanger Sequencing), για ανίχνευση και προσδιορισμό μεταλλάξεων	105	105
120	4.5.1	Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας Ανάλυση της Καμπύλης Τήξης προϊόντων PCR Πραγματικού Χρόνου (post Real Time PCR HRMA)	105	106
121	4.5.1.1	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR	107	108
122	4.5.1.2	Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR, με ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	108	108
123	4.5.1.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων με post Real Time PCR HRMA	109	110
124	4.5.1.4	Ανάλυση των δεδομένων της post Real Time PCR HRMA	111	111
125	4.5.1.5	Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της post Real Time PCR HRMA (PCR controls)	111	111
126	4.5.2	Επιβεβαίωση και χαρακτηρισμός μεταλλάξεων με προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (Sanger Sequencing)	111	112
127	4.5.2.1	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR	113	114
128	4.5.2.2	Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	114	114
129	4.5.2.3	PCR για ενίσχυση της υπό διερεύνηση περιοχής πριν από τον προσδιορισμό αλληλουχίας	115	116
130	4.5.2.4	Ανάδειξη των προϊόντων της PCR πριν από Sanger sequencing με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	116	116

131	4.5.2.5	Απομάκρυνση προσμειξεων και συμπύκνωση των προϊόντων της PCR	116	116
132	4.5.4.5.1	Απομάκρυνση προσμειξεων μέσω Qiaquick Gel extraction kit	116	117
133	4.5.4.5.2	Απομάκρυνση προσμειξεων με πρωτόκολλο φαινόλης - χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης	117	118
134	4.5.4.5.3	Απομάκρυνση προσμειξεων με μαγνητικά σφαιρίδια και διπλή επιλογή μεγέθους	118	119
135	4.5.4.6	Προσδιορισμός της αυγέντρωσης των συμπυκνωμένων και χωρίς προσμειξεις προϊόντων της PCR με χρήση φθοριοχρωμάτων	119	120
136	4.5.4.7	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Sanger Sequencing)	120	122
137	4.6	Στοχευμένος Προσδιορισμός Αλληλουχίας με Τεχνολογία Δεύτερης Γενιάς (targeted Next Generation Sequencing, targeted NGS)	122	122
138	4.6.1	Παρασκευή διαλύματος 0.5M EDTA.	123	123
139	4.6.2	Ενζυμικός κατακερματισμός DNA	123	123
140	4.6.3	Απομάκρυνση προσμειξεων της αντίδρασης πέψης και διπλή επιλογή μεγέθους τμημάτων DNA	123	125
141	4.6.4	Ποσοτικός προσδιορισμός	125	125
142	4.6.5	Ποιοτική ανάλυση	125	125
143	4.6.6	Προετοιμασία βιβλιοθήκης δειγμάτων	125	125
144	4.6.7	Προσδιορισμός αλληλουχίας	125	125
145	4.6.8	Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS (NGS Bioinformatics analyses)	125	125
146	4.7	Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 με πυροαλληλούχιση (Pyrosequencing)	125	125
147	4.7.1	Επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου	125	126
148	4.7.2	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR	126	128
149	4.7.3	Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	128	128
150	4.7.4	PCR για ενίσχυση της υπό διερεύνηση περιοχής πριν από πυροαλληλούχιση	128	130
151	4.7.4.1	MS-HRMA	130	130
152	4.7.4.2	MSP	131	131
153	4.8	Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με MI και ατόμων του γενικού πληθυσμού με τεχνολογία NGS (RNA-Seq)	131	131
154	4.8.1	Απομόνωση RNA	131	131
155	4.8.2	Απομάκρυνση προσμειξεων DNA, μέσω πέψης με ένζυμο (DNA-se treatment)	131	131
156	4.8.3	Ποσοτικός προσδιορισμός	131	131
157	4.8.4	Ποιοτική ανάλυση	131	131
158	4.8.5	Προετοιμασία βιβλιοθήκης δειγμάτων	132	132
159	4.8.6	Προσδιορισμός αλληλουχίας	132	132
160	4.8.7	Βιοπληροφορική ανάλυση NGS δεδομένων (NGS Bioinformatics analyses)	132	132
161	5	Αποτελέσματα	133	133
162	5.1	Τελικού σημείου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (endpoint PCR), ακολουθούμενες από ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, για ανίχνευση μεταλλάξεων	133	133
163	5.1.1	ARMS-PCR για ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F	133	134
164	5.1.2	Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2 με την τεχνική AS-PCR	134	135
165	5.1.3	Ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων W515L/K στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL με την τεχνική AS-PCR	135	136
166	5.2	Αναλύσεις καμπύλης τήξης έπειτα από πραγματικού χρόνου αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (Real Time PCR HRMA), ακολουθούμενες από προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του DNA (Sanger Sequencing)	136	136
167	5.2.1	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 (GRCh37/hg19) του γονιδίου CALR	136	136
168	5.2.1.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	136	137
169	5.2.1.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	137	137
170	5.2.1.3	Επιβεβαίωση μεταλλάξεων μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης	137	138
171	5.2.1.4	Έλεγχος της ευαισθησίας του πρωτοκόλλου HRMA	138	138
172	5.2.1.5	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	139	139
173	5.2.1.6	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	139	141
174	5.2.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 23 (GRCh37/hg19) του γονιδίου DNMT3A	141	141

175	5.2.2.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	141	142
176	5.2.2.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	142	142
177	5.2.2.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	142	143
178	5.2.2.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	143	144
179	5.2.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 (GRCh37/hg19) των γονιδίων <i>IDH1</i> και <i>IDH2</i>	144	144
180	5.2.3.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	144	145
181	5.2.3.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	145	146
182	5.2.3.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	146	145
183	5.2.3.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	146	147
184	5.2.4	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>ASXL1</i>	147	147
185	5.2.4.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	147	148
186	5.2.4.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	148	149
187	5.2.4.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	149	149
188	5.2.4.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	149	150
189	5.2.5	Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 14 και 15 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>SF3B1</i>	150	150
190	5.2.5.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	150	151
191	5.2.5.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	151	152
192	5.2.5.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	152	152
193	5.2.5.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	152	153
194	5.2.6	Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 2 και 6 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>U2AF1</i>	153	153
195	5.2.6.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	153	154
196	5.2.6.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	155	155
197	5.2.6.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	155	156
198	5.2.6.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	156	156
199	5.2.7	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 1 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>SRSF2</i>	156	156
200	5.2.7.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	156	157
201	5.2.7.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	157	158
202	5.2.7.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	158	158
203	5.2.7.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	159	159
204	5.2.8	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>SETBP1</i>	159	159
205	5.2.8.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	159	160
206	5.2.8.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	160	161
207	5.2.8.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	161	162
208	5.2.8.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	162	162
209	5.2.9	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 14 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>CSF3R</i>	162	162
210	5.2.9.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	162	163
211	5.2.9.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	163	164
212	5.2.9.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	164	164
213	5.2.9.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	164	165
214	5.2.10	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 17 (GRCh37/hg19) του γονιδίου <i>KIT</i>	165	165
215	5.2.10.1	Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα	165	166
216	5.2.10.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	166	167
217	5.2.10.3	Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing	167	167
218	5.2.10.4	Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων	167	168
219	5.3	Στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)	168	168
220	5.3.1	Προσδιορισμός της ποιότητας των διαβασμάτων (quality control)	169	169
221	5.3.2	Επεξεργασία των διαβασμάτων	170	170
222	5.3.2.1	Απομάκρυνση adapters (adapters clipping)	170	171
223	5.3.2.2	Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας (trimming of low quality nucleotides)	171	173
224	5.3.2.3	Προσαρμογή μήκους διαβασμάτων (read length adjustment)	173	173
225	5.3.2.4	Αντιπαραβολή ορθών (forward read) και αντίστροφων διαβασμάτων (reverse read)	173	173
226	5.3.3	Αντιπαραβολή των επεξεργασμένων διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος (alignment to reference)	174	174
227	5.3.4	Προετοιμασία του αρχείου αντιπαραβεβλημένων διαβασμάτων (alignment file) για ανίχνευση μεταλλάξεων	174	174

228	5.3.4.1	Προσθήκη κεφαλίδας δείγματος (read group), ανάλυση βάρους διαβάσματος (coverage) και επισήμανση διπλών διαβασμάτων (flag duplicate reads)	174	176
229	5.3.4.2	Ανάλυση ποσοστού διπλών διαβασμάτων (duplication percentage)	176	176
230	5.3.4.3	Αναβαθμονόμηση των δεδομένων ποιότητας των νουκλεοτιδίων (Base Quality Score Recalibration, BQSR)	176	177
231	5.3.5	Ανάδειξη μεταλλάξεων	177	177
232	5.3.6	Ενημέρωση των αρχείων μεταλλάξεων με βιολογικά και κλινικά δεδομένα	178	184
233	5.4	Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)	184	184
234	5.4.1	Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA)	184	184
235	5.4.1.1	Κλινικό υλικό	184	184
236	5.4.1.2	Σχεδιασμός εκκινητών για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας	185	185
237	5.4.1.3	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς	185	186
238	5.4.1.4	Αποτελέσματα MS-HRMA	186	186
239	5.4.1.5	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	187	188
240	5.4.2	Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP)	188	188
241	5.4.2.1	Κλινικό υλικό	188	188
242	5.4.2.2	Σχεδιασμός εκκινητών για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας	188	189
243	5.4.2.3	Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP	190	190
244	5.4.2.4	Αποτελέσματα MSP	190	191
245	5.4.2.5	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	191	193
246	5.5	Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με MI και φυσιολογικού πληθυσμού μέσω RNA-Seq	193	193
247	5.5.1	Κλινικό Υλικό	193	193
248	5.5.2	Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης	193	197
249	6	Συζήτηση	198	198
250	6.1	Γενικά στοιχεία και παρατηρήσεις στα MYN και ΜΔΣ/MYN	198	198
251	6.2	Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική HRMA και χαρακτηρισμός τους, μέσω προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger	199	199
252	6.2.1	Γονίδια που αναλύθηκαν μέσω HRMA και η συχνότητα με την οποία αυτά εμφανίζουν μεταλλάξεις	199	204
253	6.2.2	Η διαγνωστική αξία των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στα υπό μελέτη γονίδια	205	209
254	6.2.3	Η τεχνική HRMA ως ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο	210	210
255	6.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (NGS)	210	212
256	6.3.1	Ασθενείς χωρίς εκ των προτέρων ανιχνευθείσες μεταλλάξεις	212	213
257	6.3.2	Ασθενείς με εκ των προτέρων γνωστές μεταλλάξεις	213	214
258	6.5	Μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1	214	215
259	6.6	Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με MI και φυσιολογικού πληθυσμού μέσω RNA-Seq	215	215
260	6.6.1	Βιολογική και κλινική σημασία των γονιδίων με διαφορεική έκφραση (Gene ontology (GO) and pathway analysis)	215	220
261	Παράρτημα I	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA	221	221
262	Παράρτημα II	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing	222	222
263	Παράρτημα III	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing	223	223
264	Παράρτημα IV	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για MS-HRMA	224	224
265	Παράρτημα V	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από πυροαλληλούχιση	224	224
266	Παράρτημα VI	Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση	224	224
267	Παράρτημα VII	Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS Targeted-Seq	224	235
268	Παράρτημα VIII	Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS RNA-Seq	236	238
269	7	Βιβλιογραφία	239	257
270		Summary	258	259

Εικόνες

A/A	Εικόνα	Τίτλος Εικόνας	Αρχική Σελίδα	Τελική Σελίδα
1	Εικόνα 1	Χαρακτηριστικά των ΧΟΛ και ΜΔΣ/ΜΥΝ	12	12
2	Εικόνα 2	Οι κυτταρικές λειτουργίες σημαντικών γονιδίων της αιμοποίησης	14	14
3	Εικόνα 3	Υποδοχείς χωρίς εγγενή δράση κινάσης	16	16
4	Εικόνα 4	Οι επιμέρους περιοχές της πρωτεΐνης JAK2	17	17
5	Εικόνα 5	Η σηματοδότηση JAK2V617F	17	17
6	Εικόνα 6	Φυσιολογική και μη φυσιολογική ενδοκυτταρική σηματοδότηση	19	19
7	Εικόνα 7	Ο υποδοχέας CSF3R	20	20
8	Εικόνα 8	Η δομή του υποδοχέα KIT	22	22
9	Εικόνα 9	Η δράση του ενεργοποιημένου φυσιολογικού υποδοχέα KIT	23	23
10	Εικόνα 10	Η δράση του διαρκώς ενεργοποιημένου μεταλλαγμένου υποδοχέα KIT	24	24
11	Εικόνα 11	Μοντέλο δράσης των πρωτεϊνών RAS	26	26
12	Εικόνα 12	Η δράση της CALR	28	28
13	Εικόνα 13	Μεταλλάξεις SETBP1	30	30
14	Εικόνα 14	Μηχανισμός δράσης των μεταλλάξεων SETBP1	30	30
15	Εικόνα 15	Η διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA	32	32
16	Εικόνα 16	Η διαδικασία της απομεθυλίωσης του DNA	34	34
17	Εικόνα 17	Η δράση των ενζύμων IDH	36	36
18	Εικόνα 18	Ο μηχανισμός μεταβολής της επιγενετικής κατάστασης του DNA, συνολικά	37	37
19	Εικόνα 19	Ιεράρχια της χρωματινικής δομής	39	39
20	Εικόνα 20	Επιγενετική αλληλεπίδραση	40	40
21	Εικόνα 21	Επιγενετική ρύθμιση γονιδίων από στοιχεία Polycomb	41	41
22	Εικόνα 22	Αλληλεπίδραση της μεταλλαγμένης ASXL1 με τον BRD4	42	42
23	Εικόνα 23	Δράση των ισομορφών RUNX1	44	44
24	Εικόνα 24	Η διαδικασία της ωρίμανσης του RNA	47	47
25	Εικόνα 25	Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων SF3B1	49	49
26	Εικόνα 26	Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων U2AF1	51	51
27	Εικόνα 27	Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων SRSF2	52	52
28	Εικόνα 28	Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων ZRSR2	53	53
29	Εικόνα 29	Η αντίδραση πολυμεράσης	56	56
30	Εικόνα 30	Σχηματική αναπαράσταση ARMS-PCR	58	58
31	Εικόνα 31	Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR	58	59
32	Εικόνα 32	Διαγραμματική απεικόνιση της αντίστροφης μεταγραφής	59	59
33	Εικόνα 33	PCR πραγματικού χρόνου με μη-ειδικά φθοριοχρώματα	61	61
34	Εικόνα 34	PCR πραγματικού χρόνου με ειδικά φθοριοχρώματα	62	62
35	Εικόνα 35	Η καμπύλη τήξης	63	63
36	Εικόνα 36	Η ανάλυση της καμπύλης τήξης	64	64
37	Εικόνα 37	Η επίδραση του δισουλφιδίου του νατρίου στις κυτοσίνες	65	65
38	Εικόνα 38	Αρχή λειτουργίας του προσδιορισμού πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger	67	68
39	Εικόνα 39	Αναλυση δεδομένων προσδιορισμού πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger	68	68
40	Εικόνα 40	Προετοιμασία αντίδρασης πυροαλληλούχισης	69	69
41	Εικόνα 41	Χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις κατά την πυροαλληλούχιση	70	70
42	Εικόνα 42	Οικονομικοτεχνική ανάλυση της τεχνολογίας NGS	73	73
43	Εικόνα 43	Προετοιμασία βιβλιοθήκης DNA/cDNA	75	75
44	Εικόνα 44	Κλωνική επέκταση του συνόλου των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	76	76
45	Εικόνα 45	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων	77	77
46	Εικόνα 46	Αρχεία μεταλλάξεων (fastq)	77	77
47	Εικόνα 47	Ποιοτική ανάλυση δεδομένων διαβασμάτων	78	78
48	Εικόνα 48	Αντιπαραβολή των διαβασμάτων επί πρότυπου γονιδιώματος	79	79
49	Εικόνα 49	Απεικόνιση διαβασμάτων και μεταλλάξεων σε γονιδιωματοικούς χάρτες	79	80
50	Εικόνα 50	Αρχή λειτουργίας των συσκευών Ion Torrent	83	83
51	Εικόνα 51	Αρχή λειτουργίας των συσκευών PacBio	84	84
52	Εικόνα 52	Αρχή λειτουργίας των συσκευών Oxford Nanopore	85	85

53	Εικόνα 53	Ανίχνευσης της σημειακής μετάλλαξης V617F του γονιδίου JAK2	133	133
54	Εικόνα 54	Ενδεικτικά αποτελέσματα της AS-PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων JAK2	134	134
55	Εικόνα 55	Ενδεικτικά αποτελέσματα της AS-PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων MPL	135	135
56	Εικόνα 56	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου CALR	136	137
57	Εικόνα 57	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR μέσω HRMA	137	137
58	Εικόνα 58	Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων με μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR	138	138
59	Εικόνα 59	Όριο ανίχνευσης μεταλλάξεων CALR	138	138
60	Εικόνα 60	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου CALR	139	139
61	Εικόνα 61	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου DNMT3A	141	142
62	Εικόνα 62	Ανάδειξη μεταλλάξεων στο εξόνιο 23 του γονιδίου DNMT3A με HRMA	142	142
63	Εικόνα 63	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου DNMT3A	143	143
64	Εικόνα 64	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση των γονιδίων IDH1/2	144	145
65	Εικόνα 65	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 των γονιδίων IDH1/2 μέσω HRMA	145	146
66	Εικόνα 66	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας των γονιδίων IDH1/2	146	146
67	Εικόνα 67	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου ASXL1	148	148
68	Εικόνα 68	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου ASXL1 μέσω HRMA	148	149
69	Εικόνα 69	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου ASXL1	149	149
70	Εικόνα 70	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου SF3B1	150	151
71	Εικόνα 71	Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 14 και 15 του γονιδίου SF3B1 μέσω HRMA	152	152
72	Εικόνα 72	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου SF3B1	152	152
73	Εικόνα 73	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου U2AF1	154	154
74	Εικόνα 74	Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 2 και 6 του γονιδίου U2AF1 μέσω HRMA	155	155
75	Εικόνα 75	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου U2AF1	155	156
76	Εικόνα 76	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου SRSF2	157	157
77	Εικόνα 77	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 1 του γονιδίου SRSF2 μέσω HRMA	158	158
78	Εικόνα 78	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου SRSF2	158	158
79	Εικόνα 79	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου SETBP1	160	160
80	Εικόνα 80	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 του γονιδίου SETBP1 μέσω HRMA	161	161
81	Εικόνα 81	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου SETBP1	161	162
82	Εικόνα 82	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου CSF3R	163	163
83	Εικόνα 83	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 14 του γονιδίου CSF3R μέσω HRMA	164	164
84	Εικόνα 84	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου CSF3R	164	164
85	Εικόνα 85	Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου KIT	166	166
86	Εικόνα 86	Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 17 του γονιδίου KIT μέσω HRMA	167	167
87	Εικόνα 87	Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου KIT	167	167
88	Εικόνα 88	Γραφική αναπαράσταση της μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης της ποιότητας τως νουκλεοτιδίων	169	169
89	Εικόνα 89	Γραφική αναπαράσταση της μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης της ποιότητας τως νουκλεοτιδίων έπειτα από απομάκρυνση adapters-barcodes	170	170
90	Εικόνα 90	Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της ποσοστιαίας αναλογίας των adapters	171	171
91	Εικόνα 91	Γραφική αναπαράσταση της μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης της ποιότητας τως νουκλεοτιδίων έπειτα από απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας	172	172
92	Εικόνα 92	Ανάλυση της αναλογίας των τεσσάρων διαφορετικών τύπων νουκλεοτιδίων	172	172
93	Εικόνα 93	Γενομικός χάρτης όπου αντιπαραβάλλονται τα διαβάσματα ως προς το πρότυπο γονιδίωμα πριν την επισήμανση των διπλών διαβασμάτων	174	174
94	Εικόνα 94	Γενομικός χάρτης όπου αντιπαραβάλλονται τα διαβάσματα ως προς το πρότυπο γονιδίωμα μετά την επισήμανση των διπλών διαβασμάτων	175	176
95	Εικόνα 95	Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των διπλών διαβασμάτων	176	176

96	Εικόνα 96	Κανονικοποίηση των δεδομένων ποιότητας των νουκλεοτιδίων	177	177
97	Εικόνα 97	Τμήμα ενός αρχείου μεταλλάξεων (vcf file)	177	177
98	Εικόνα 98	Αραχνοειδή διαγράμματα (spider graphs) με τις αξιολογήσεις της παθογένειας των μεταλλάξεων	183	184
99	Εικόνα 99	Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MS-HRMA ειδικών εκκινητών προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1	185	185
100	Εικόνα 100	Πρότυπη καμπύλη μεθυλίωσης	185	186
101	Εικόνα 101	Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MS-HRMA	187	187
102	Εικόνα 102	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA	188	188
103	Εικόνα 103	Σχεδιασμός εκκινητών για MSP	189	189
104	Εικόνα 104	Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MSP ειδικών εκκινητών προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1	189	189
105	Εικόνα 105	PCR ενίσχυση του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών προς ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1	190	190
106	Εικόνα 106	Χρωματογραφήματα από ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1	190	191
107	Εικόνα 107	Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MSP	191	192
108	Εικόνα 108	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MSP	192	193
109	Εικόνα 109	Πολυδιάστατη απεικονιστική ανάλυση (principal component analysis, PCA) των RNA-Seq δεδομένων	194	194
110	Εικόνα 110	Κανονικοποίηση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης	194	195
111	Εικόνα 111	Διαγραμματικές απεικονίσεις της στατιστικής σημασίας των RNA-Seq δεδομένων.	196	197
112	Εικόνα 112	Συγκριτικό διάγραμμα Venn	197	197
113	Εικόνα 113	Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις στα MYN	200	200
114	Εικόνα 114	Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις στα ΜΔΣ/MYN	200	200
115	Εικόνα 115	Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε κύρια ή/και σε τροποποιητικά γονίδια σε ασθενείς με MYN	202	202
116	Εικόνα 116	Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε κύρια ή/και σε τροποποιητικά γονίδια σε ασθενείς με ΜΔΣ/MYN	203	203
117	Εικόνα 117	Κυκλικά διαγράμματα circos (circos plots)	203	204
118	Εικόνα 118	Πλήθος μεταλλάξεων ανά ασθενή	209	209
119	Εικόνα 119	Διαγραμματική απεικόνιση (scatterplot) αναλύσεων GO για τα υπερ-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI	216	216
120	Εικόνα 120	Διαγραμματική απεικόνιση (scatterplot) αναλύσεων GO για τα υπερ-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI	217	217
121	Εικόνα 121	Ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών όπου συμμετέχουν τα υπο-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI	218	219
122	Εικόνα 122	Μοντέλο εξέλιξης των MYN	219	219
123	Εικόνα 123	Διαβάσματα NGS	230	230
124	Εικόνα 124	Διαγραμματική απεικόνιση της ποιότητας των διαβασμάτων (fastQC)	231	231
125	Εικόνα 125	Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων Targeted-Seq	235	235
126	Εικόνα 126	Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων RNA-Seq	238	238

Πίνακες

A/A	Πίνακας	Τίτλος Πίνακα	Αρχική Σελίδα	Τελική Σελίδα
1	Πίνακας 1	Κατηγορίες μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών	2	3
2	Πίνακας 2	Κριτήρια διάγνωσης ΑΠ	5	5
3	Πίνακας 3	Κριτήρια διάγνωσης ΙΘ	6	6
4	Πίνακας 4	Κριτήρια διάγνωσης ΠΜΙ	7	8
5	Πίνακας 5	Κριτήρια διάγνωσης ΧΟΛ	8	9
6	Πίνακας 6	Ταξινόμηση της μαστοκυττάρωσης	9	9
7	Πίνακας 7	Κριτήρια διάγνωσης ΣΜ	9	10
8	Πίνακας 8	Ταξινόμηση της ΧΜΜΛ	11	11
9	Πίνακας 9	Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΔΣ/ΜΥΝ	54	54
10	Πίνακας 10	Συγκριτική ανάλυση τεχνολογιών προσδιορισμού πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων	85	86
11	Πίνακας 11	Χημικά αντιδραστήρια, βιολογικά αντιδραστήρια και ολοκληρωμένα συστήματα αντιδραστηρίων	89	90
12	Πίνακας 12	Εργαστηριακός αναλυτικός εξοπλισμός	90	90
13	Πίνακας 13	Κλινικό Υλικό	91	91
14	Πίνακας 14	Αντιδραστήρια για αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA, προς σύνθεση cDNA	96	96
15	Πίνακας 15	Συνθήκες αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής ολικού RNA, προς σύνθεση cDNA	97	97
16	Πίνακας 16	Αντιδραστήρια για ημιοσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F, με ARMS-PCR	98	98
17	Πίνακας 17	Συνθήκες αντίδρασης ARMS-PCR, για ημιοσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F	99	99
18	Πίνακας 18	Αντιδραστήρια για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2, με AS-PCR	100	100
19	Πίνακας 19	Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR, για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2	101	101
20	Πίνακας 20	Αντιδραστήρια για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL, με AS-PCR	102	102
21	Πίνακας 21	Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR, για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL	102	102
22	Πίνακας 22	Η αναλογική σχέση της διαχωριστικής ικανότητας της πηκτής αγαρόζης με την πυκνότητα.	103	103
23	Πίνακας 23	Αντιδραστήρια για για 8 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών	107	107
24	Πίνακας 24	Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης για τους HRMA ειδικούς εκκινητές	108	108
25	Πίνακας 25	Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης, για τους HRMA ειδικούς εκκινητές	108	108
26	Πίνακας 26	Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση Real-Time PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών	109	109
27	Πίνακας 27	Συνθήκες αντιδράσεων Real-Time PCR ενίσχυσης και ανάλυσης καμπύλης τήξης για τους HRMA ειδικούς εκκινητές	110	110
28	Πίνακας 28	Αντιδραστήρια για για 8 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των Sanger-Seq ειδικών εκκινητών	113	114
29	Πίνακας 29	Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης για τους Sanger-Seq ειδικούς εκκινητές	114	114
30	Πίνακας 30	Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των Sanger-Seq ειδικών εκκινητών	115	116
31	Πίνακας 31	Συνθήκες αντιδράσεων PCR ενίσχυσης για τους Sanger-Seq ειδικούς εκκινητές	116	116
32	Πίνακας 32	Αναλώσιμα για αντίδραση ενίσχυσης και προετοιμασίας των προϊόντων για προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger	121	121
33	Πίνακας 33	Αντίδραση ενίσχυσης και προετοιμασίας των προϊόντων για προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger	121	121
34	Πίνακας 34	Εξόνια γονιδίων που διερευνήθηκαν με τεχνολογία NGS	122	122
35	Πίνακας 35	Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών	126	126

36	Πίνακας 36	Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών	127	127
37	Πίνακας 37	Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών	127	127
38	Πίνακας 38	Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών	128	128
39	Πίνακας 39	Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών	128	129
40	Πίνακας 40	Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών	129	129
41	Πίνακας 41	Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών	130	130
42	Πίνακας 42	Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών	130	130
43	Πίνακας 43	Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης, για τους HRMA ειδικούς εκκινητές	130	130
44	Πίνακας 44	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για τη σημειακή μετάλλαξη JAK2V617F	133	133
45	Πίνακας 45	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για τις μεταλλάξεις MPLW515K/L	135	135
46	Πίνακας 46	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις CALR	139	139
47	Πίνακας 47	Σπάνιες μεταλλάξεις CALR	140	140
48	Πίνακας 48	Πλήθος και συχνότητα εμφάνισης επιμέρους κατηγοριών μεταλλάξεων CALR	140	140
49	Πίνακας 49	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις DNMT3A	143	143
50	Πίνακας 50	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις IDH1/2	147	147
51	Πίνακας 51	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις ASXL1	149	150
52	Πίνακας 52	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις SF3B1	153	153
53	Πίνακας 53	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις U2AF1	156	156
54	Πίνακας 54	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις SRSF2	159	159
55	Πίνακας 55	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις SETBP1	162	162
56	Πίνακας 56	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις CSF3R	165	165
57	Πίνακας 57	Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις CSF3R	168	168
58	Πίνακας 58	Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων	169	169
59	Πίνακας 59	Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων έπειτα από απομάκρυνση adapters-barcodes	171	171
60	Πίνακας 60	Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων έπειτα από απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας	173	173
61	Πίνακας 61	Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων έπειτα από προσαρμογή του μήκους των διαβασμάτων	173	173
62	Πίνακας 62	Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων έπειτα από αντιπαραβολή ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων	173	173
63	Πίνακας 63	Αλγόριθμοι διασύνδεσης βιολογικών και κλινικών στοιχείων	178	178
64	Πίνακας 64	Ανάλυση των τεχνικών χαρακτηριστικών της αντίδρασης NGS	178	179
65	Πίνακας 65	Ανάλυση των δεδομένων NGS σε επίπεδο RNA	179	179
66	Πίνακας 66	Ανάλυση των δεδομένων NGS σε επίπεδο πρωτεΐνης	180	180
67	Πίνακας 67	Κλινικά χαρακτηριστικά των δεδομένων NGS	180	181
68	Πίνακας 68	Αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης των νουκλεοτιδικών αλλαγών μέσω προβλεπτικών αλγόριθμων	181	181
69	Πίνακας 69	Δείγματα που αναλύθηκαν με MS-HRMA και τα σχετικά ποσοστά μεθυλίωσης	186	186
70	Πίνακας 70	Γονίδια με επαρκή επίπεδα έκφρασης, κατάλληλα για περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση των RNA-Seq δεδομένων	195	195
71	Πίνακας 71	Πλήθος και ποσοστιαία αναλογία μεταλλάξεων, όπως ανιχνεύθηκαν από τις αναλύσεις HRMA	201	201
72	Πίνακας 72	Αποτελέσματα αναλύσεων NGS	211	212
73	Πίνακας 73	Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA	221	221
74	Πίνακας 74	Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω Sanger-Seq	222	222
75	Πίνακας 75	Εκκινητές για ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω Sanger-Seq	223	223

76	Πίνακας 76	Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MS-HRMA	224	224
77	Πίνακας 77	Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP	224	224
78	Πίνακας 78	Εκκινητές για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP	224	224

Συντμήσεις

2-υδροξυ-γλουταρικό	2-HG	Αληθή Πολυκυτταραιμία	ΑΠ
2nd logarithm of counts per million reads	log2CPM	Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση	ΑΑΔΣ-Θ
3' splicing site	3'-ss	Αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ	αΜΔΣ/ΜΥΝ
5-carboxylcytosine	5-caC	Αταξινόμητα ΜΥΝ	αΜΥΝ
5-formylcytosine	5-fC	Αταξινόμητες Μυελοδυσπλαστικές/ Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές	αΜΔΣ/ΜΥΔ
5-hydroxymethylcytosine	5-hmC	Αταξινόμητες Χρόνιες Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές	αΧΜΥΔ
5-methylcytosine	5-mC	Άτυπη Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία	αΧΜΛ
5' splicing site	5'-ss	Δακτυλιωτοί Σιδηροβλάστες	ΔΣ
Adenosine 5' phosphosulfate	APS	Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία	ΙΘ
Adenosine triphosphate	ATP	Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/ Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα	ΜΔΣ/ΜΥΝ
AID/APOBEC deaminases	AADs	Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές	ΜΔΣ/ΜΥΔ
Allele Specific Polymerase Chain Reaction	AS-PCR	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες	ΜΔΣ-ΔΣ
Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction	ARMS-PCR	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο/ Μυελοϋπερπλαστικό Νεόπλασμα με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
Annealing Temperature	Ta	Μυελός των Οστών	ΜΟ
Base excision repair pathway	BER	Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα	ΜΥΣ
Base Quality Score Recalibration	BQSR	Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες	ΜΥΝ
Branching Site	BS	Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία	ΝΜΜΛ
Bromodomain and Extra-Terminal motif	BET	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	ΟΜΛ
Charge-coupled device	CCD	Οστεομυελική Βιοψία	ΟΜΒ
Chromatin immunoprecipitation	ChIP	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	Π.Ο.Υ.
Chronic Myeloproliferative Diseases	CMPDs	Πακέτα βιοπληροφορικών αναλύσεων	ΠΒΑ
complementary DNA	cDNA	Περιφερικό Αίμα	ΠΑ
Complementary DNA	cDNA	Πρωτοπαθή Μυελοϊνωση	ΠΜΙ
Copy Number Variations	CNVs	Συστηματική Μαστοκυττάρωση	ΣΜ
Counts per million reads	CPM	Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία, μη αλλιώς ταξινομημένη	ΧΗΛ
CpG islands	CGIs, or CpGs	Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία/Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο	ΧΗΛ/ΥΗΣ
Degree Celcius	°C	Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία	ΧΜΛ
Deoxy-adenosine triphosphate	dATP	Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία	ΧΜΜΛ
Deoxy-cytidine triphosphate	dCTP	Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία	ΧΟΛ
Deoxy-guanosine triphosphate	dGTP	Χρόνιες Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές	ΧΜΥΔ
Deoxy-ribonucleotide triphosphate	dNTP		
Deoxy-thymidine triphosphate	dTTP		
Deoxyribonucleic Acid	DNA		
Di-deoxy-adenosine triphosphate	ddATP		
Di-deoxy-cytidine triphosphate	ddCTP		
Di-deoxy-guanosine triphosphate	ddGTP		
Di-deoxy-ribonucleotide triphosphate	ddNTP		
Di-deoxy-thymidine triphosphate	ddTTP		
DNA methyltransferases	DNMTs		
Double distilled water	ddH2O		
Double stranded DNA	dsDNA		
Endpoint Polymerase Chain Reaction	PCR		
Erythropoietin	EPO		
Erythropoietin Receptor	EPOR		

Ethanol	EtOH		
Ethidium bromide	EtBr		
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA		
Exonic splicing silencers	ESSs		
Feline Leukemia viruses	FeLV		
Fluorescence quantity	Qf		
Fluorescence resonance energy transfer	FRET		
Fold change	FC		
Fold discovery rate (adjusted p-value)	FDR		
Gain-of-function Mutations	GOF		
Gigabase	Gb		
Granulocyte colony stimulating factor receptor	G-CSFR		
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSFR		
Growth Hormone receptor	GHR		
GTPase activating proteins	GAP		
Guanine nucleotide exchange factors	GEF		
Guanosine diphosphate	GDP		
Guanosine triphosphate	GTP		
Hematocrit	Hct		
Hematopoietic Stem Cells	HSCs		
Hemoglobin	Hb		
Histone acetyltransferases	HATs		
Histone deacetylases	HDACs		
Histone demethylases	HDMs		
Histone methyltransferases	HMTs		
Human leukocyte antigen	HLAs		
Insertion-Deletion Events	Indels		
Integrative genomic viewer	IGV		
Interleukin	IL		
Intronic splicing silencers	ISSs		
Lactate Dehydrogenase	LDH		
Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha	LIFR		
Long interspersed nucleotide elements	LINEs		
Long non-coding RNA	lncRNA		
Loss-of-function mutations	LOF		
Major histocompatibility complex	MHCs		
Mast cell leukemia	MCL		
Melting Temperature	Tm		
Messenger RNA	mRNA		
Methylation specific HRMA	MS-HRMA		
Methylation specific pyrosequencing	MSP		
Micro RNA	miRNA		
Minimal residual disease	MRD		
Multiple displacement-whole genome amplification	WGA		
Multiple nucleotide variants	MNVs		
Murine Myeloproliferative Leukemia Virus	MMLV		
Myelodysplastic/Myeloproliferative diseases	MDS/MPD		
Next Generation Sequencing	NGS		
no-Template control	NTC		
Nucleosome remodeling deacetylase complex	NuRD		
Nucleotide	nt		
Oncostatin M Receptor	OSMR		

Open Reading Frame	ORF		
Paired-end sequencing	PE		
Philadelphia Chromosome	Ph ¹		
Phosphate buffered Saline	PBS		
Polycomb repressive complex 1	PRC1		
Polycomb repressive complex 2	PRC2		
Polypyrimidine tract	PPT or Py-tract		
Post Real Time PCR High Resolution Melting Curve Analysis	HRMA		
Precursor-messenger RNA	pre-mRNA		
Primary Myelofibrosis	pmf		
Principal component analysis	PCA		
Prolactin receptor	PRLR		
Pyrophosphate inorganic	PPi		
Quality control	QC		
Red Cell Mass	RCM		
Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	RT-PCR		
Ribonucleic Acid	RNA		
Ribonucleoproteins	RNP		
Ribosomal RNA	rRNA		
RNA Polymerase	RNAP		
RNA recognition motif domain	RRM		
Runt-homology domain	RHD		
S-αδετυλο-μεθειονίνη	SAM		
Sequencing by Synthesis/Cyclic Reversible Termination	SBS/CRT		
Serine/arginine rich	SR		
Short interspersed nucleotide elements	SINEs		
Single Nucleotide Polymorphisms	SNPs		
Single nucleotide variants	SNVs		
Single-end sequencing	SE		
small nuclear ribonucleo proteins	snRNP		
small nuclear RNA	snRNA		
Standard deviation	SD		
Stem Cell factor	SCF		
Systemic Mastocytosis	SM		
Terabase	Tb		
Thrombopoietin	TPO		
Thrombopoietin Receptor	TPOR		
Thymine DNA glycosylase	TDG		
Topologically associating domains	TADs		
Trans-activating domain	TAD		
Tumor/Normal pair	T/N pair		
Untranslated regions	UTRs		
Variant allele frequency	VAF		
Variants of uncertain significance	VUS		
Whole Exome Sequencing	WES		
Whole Genome Sequencing	WGS		
World Health Organization	WHO		
α-Ketoglutaric acid	α-KG		

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα: Ανδρέας
Επώνυμο: Γιαννόπουλος
Όνομα πατρός: Ηλίας
Ημερομηνία γεννήσεως: 23 Μαρτίου 1986
Τόπος γεννήσεως: Καλαμάτα Μεσσηνίας

Διεύθυνση Κατοικίας: Θέτιδος 35, 175 61, Παλαιό Φάληρο
Τηλέφωνο Κατοικίας: (+30) 210 6597 396
Κινητό Τηλέφωνο: (+30) 694 3046 721
Διεύθυνση Εργασίας: Εργαστήριο Αιματολογίας
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
Σωρανού του Εφεσίου 4, 115 27

E-mail: andgianop@bioacademy.gr

ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

- Βιολόγος ΠΕ, Εργαστήριο Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.
- Υποψήφιος Διδάκτωρ στο Εργαστήριο Αιματολογίας - Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του ΙΙΒΕΑΑ, με θέμα: «Μελέτη των μοριακών διαταραχών του επιγενετικού μηχανισμού ρύθμισης των κυττάρων στην παθογένεια των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών». Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Κατερίνα Ζώη

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2003 Εισαγωγή στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.
- 2008 Αποφοίτηση από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών με βαθμό «Λίαν Καλώς» (7.01).
- 2008 Εισαγωγή στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Βιολογική Τεχνολογία», Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Πατρών.
- 2010 Λήψη του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Σπουδών με «Άριστα», από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Πατρών.
- 2014 Εκπόνηση Διδακτωρικής διατριβής στο Εργαστήριο Αιματολογίας - Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του ΙΙΒΕΑΑ, με θέμα: «Μελέτη των μοριακών διαταραχών του επιγενετικού μηχανισμού ρύθμισης των κυττάρων στην παθογένεια των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών». Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Κατερίνα Ζώη

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

04/2012 - σήμερα: Έμμισθος συνεργάτης στο Εργαστήριο Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

02/2012 - 04/2012: Άμισθος συνεργάτης στο Εργαστήριο Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Tapper W, Jones AV, Kralovics R, Harutyunyan AS, Zoi K, Leung W, Godfrey AL, Guglielmelli P, Callaway A, Ward D, Aranaz P, White HE, Waghorn K, Lin F, Chase A, Baxter EJ, Maclean C, Nangalia J, Chen E, Evans P, Short M, Jack A, Wallis L, Oscier D, Duncombe AS, Schuh A, Mead AJ, Griffiths M, Ewing J, Gale RE, Schnittger S, Haferlach T, Stegelmann F, Döhner K, Grallert H, Strauch K, Tanaka T, Bandinelli S, **GIANNOPOULOS A**, Pieri L, Mannarelli C, Gisslinger H, Barosi G, Cazzola M, Reiter A, Harrison C, Campbell P, Green AR, Vannucchi A, Cross NC. *Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms.* **Nat Commun.** 2015; 6:6691. DOI: 10.1038/ncomms7691.

2. GIANNOPOULOS A and Kriebardis AG. *Future Perspectives in HLA Typing Technologies.* In: Colette-Mauricio A (ed). *Umbilical Cord Blood Banking for Clinical Application and Regenerative Medicine.* **InTechOpen.** London (UK). 2017; 3:45-68. DOI: 10.5772/64850.

3. Lamprianidou E, Kordella C, Papoutselis M, Bezyrgiannidou Z, Nakou E, Papamichos S, Spanoudakis E, **GIANNOPOULOS A**, Zoi K, Kotsianidis I. *Myeloid Neoplasms with Isolated Isochromosome 17q: a yet to be Defined Entity.* **Mediterr J Hematol Infect Dis.** 2017; 9(1):e2017066. DOI: 10.4084/MJHID.2017.066.

4. Dimonitsas E, Liakea A, Sakellariou S, Thymara I, **GIANNOPOULOS A**, Stratigos A, Soura E, Saetta A, Korkolopoulou P. *An Update on Molecular Alterations in Melanocytic Tumors with Emphasis on Spitzoid Lesions.* **Ann Transl Med.** 2018; 6(12): 249. DOI: 10.21037/atm.2018.05.23.

5. Dryllis G, **GIANNOPOULOS A**, Zoi C, Pouliakis A, Logothetis E, Voulgarelis M6, Zoi K, Kouskouni E, Dinou A, Stavropoulos-Giokas C, Kreatsas G, Konstantopoulos K, Politou M. *Correlation of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the ANXA5 (annexin A5) gene with recurrent miscarriages in women of Greek origin.* **J Matern Fetal Neonatal Med.** 2018; 29:1-6. DOI: 10.1080/14767058.2018.1521799.

6. GIANNOPOULOS A, Rougkala N, Loupis T, Mantzourani M, Viniou NA, Variami E, Vassilakopoulos TP, Dryllis G, Kotsianidis I, Gougopoulou T, Politou M, Konstantopoulos K, Vassilopoulos G. *Detection of CALR mutations using high resolution melting curve analysis (HRM-A); application on a large cohort of greek et and mf patients.* **Mediterr J Hematol Infect Dis.** 2019; 11(1): e2019009, DOI: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2019.009>

Πρόλογος

Η Εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τη Διοίκηση του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών που με δέχθηκε και μου έδωσε τη δυνατότητα να ολοκληρώσω τη Διδακτορική μου Διατριβή, χρησιμοποιώντας όλες τις σύγχρονες εγκαταστάσεις και τις συσκευές υψηλής τεχνολογίας του Ιδρύματος. Η Διατριβή αυτή χρηματοδοτήθηκε από Ερευνητικό Πρόγραμμα του Κοινοφελούς Ιδρύματος Ιωάννη Σ. Λάτση προς την κ. Κατερίνα Ζώη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ομότιμο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή του Εργαστηρίου Αιματολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, κ. Δημήτρη Λουκόπουλο, ο οποίος στήριξε κάθε φάση εκπόνησης της παρούσας Διατριβής και συνέβαλε ενεργά στην ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, κ. Μαριάννα Πολίτου που δέχθηκε να είναι Επιβλέπουσα Καθηγήτρια της Διατριβής μου και με παρότρυνε για την ολοκλήρωση αυτής.

Ευχαριστώ ακόμη:

- Τον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας, κ. Κωνσταντίνο Κωνσταντόπουλο ο οποίος σαν μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, με το ενδιαφέρον και τις παρατηρήσεις του με βοήθησε να φθάσω μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής.
- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας, κ. Μαρίνα Μαντζουράνη, η οποία στάθηκε πλάι μου σε ιδιαίτερα σημαντικές στιγμές και ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Αιματολογίας κ. Γιώργο Βασιλόπουλο ο οποίος με τις καίριες παρατηρήσεις και με την έμπρακτη συνεισφορά του με βοήθησε να ολοκληρώσω τη διατριβή μου. Η επιστημονική του καθοδήγηση καθώς και η συμπαράσταση που μου παρείχε ήταν ανεκτίμητες.

Ευχαριστώ πολύ τους κ.κ. Μαρία Αγγελοπούλου και Θεόδωρο Βασιλακόπουλο που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής αξιολόγησης της Διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κ. Κατερίνα Ζώη, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, που εισηγήθηκε το Θέμα της παρούσας Διατριβής και παρακολούθησε ενεργά κι επέβλεψε όλες τις φάσεις εκπόνησης της εργασίας μου, μοιράστηκε μαζί μου τις σκέψεις και τις ιδέες της, έδωσε λύσεις σε πολλά προβλήματα και με τον ορθολογισμό και την εργαστηριακή της εμπειρία, συνέβαλε ουσιαστικά στη διεκπεραίωση ενός μεγάλου αριθμού πειραμάτων παρά το μεγάλο φόρτο εργασίας της. Πρωταρχικά όμως την ευχαριστώ για τις όλες τις ευκαιρίες που μου προσέφερε.

Το κλινικό υλικό και πολλές πολύτιμες πληροφορίες προέρχονται από τους ιατρούς κ.κ. Μαρία Αγγελοπούλου, Νίκο Αναγνωστόπουλο, Μαρία Αραπάκη, Ελένη Βαριάμη, Θεόδωρο Βασιλακόπουλο, Γεώργιο Βασιλόπουλο, Αμαλία Βάσσου, Ιωάννα Βλαχαδάμη, Μιχάλη Βουλγαρέλη, Νόρα-Αθηνά Βύνιου, Σταυρούλα Γιαννούλη, Δώρα Γουγωπούλου, Γεώργιο Δρύλλη, Αθανάσιο Ζώμα, Ζαφείρη Καρτάση, Ιωάννη Κοτσιανίδη, Λυδία Κυριαζοπούλου, Κωνσταντίνο Κωνσταντόπουλο, Στυλιανό Λαφιωνιάτη, Δημήτρη Λουκόπουλο, Μαρίνα Μαντζουράνη, Χρήστο Μέμμο, Βασιλική Παππά, Ευάγγελο Πόππη, Νίκη Ρουγκάλα, Μαρίνα Σιακαντάρη, Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Κίμων Χαχάμη. Προς όλους αυτούς εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου στο οποίο εκπονήθηκε η διατριβή και συγκεκριμένα τη Γεωργία Αρβανίτη, τον Θοδωρή Λούπη, τη Μαρία Γιαννούλη, την Ελπίδα Γκιουλαφέντη, αλλά και παλαιότερους συνεργάτες και φίλους μου από συνεργαζόμενα εργαστήρια και όχι μόνο, την Ευγενία Κουτσογιαννοπούλου, τη Χρυσαιγή Τουμπέκη, το Γιώργο Γιάγκα, τον Γιάννη Παναγούλια και την Καλλιόπη Γκούσκου. Όλοι τους μοιράστηκαν τις ανησυχίες μου και τους προβληματισμούς μου και με στήριξαν ηθικά και ψυχολογικά όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Κατερίνα Νάνου για την αμέριστη συμπαράσταση και τις υπομονετικές συζητήσεις μας στην προσπάθεια να βρώ το δρόμο μου, όταν αυτός φαινόταν μακρινός.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Λάκη Λιλόγλου, Λέκτορα του Πανεπιστημίου του Λίβερπουλ, για τη φιλοξενία και την ουσιαστική συμβολή του μέσα από επιστημονικές συζητήσεις μας και μέσα από πειραματικές διαδικασίες στις οποίες συνέδραμε, στο ξεκίνημα αυτής της διατριβής. Μεγάλο μερίδιο στο πως εξελίχθηκε αυτή η εργασία οφείλεται στον ίδιο.

Θερμές ευχαριστίες και στον Τάσο Κριεμπάρδη, Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηριακής Αιματολογίας & Αιμοδοσίας στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, για τις ευκαιρίες που μου έδωσε και τους ορίζοντες που μου αποκάλυψε. Οι συζητήσεις μαζί του ήταν πάντα ευχάριστες.

Ευχαριστώ μέσα απ' την καρδιά μου, την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου γιατί μου στάθηκαν, όπως πάντοτε άλλωστε και έδειξαν κατανόηση και πραγματική ανοχή στην προσπάθειά μου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου. Ήταν πάντα εκεί για μένα σε δύσκολες καταστάσεις, αλλά και σε ευχάριστες περιστάσεις. Φυσικά, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αδελφό μου Σταύρο, ο οποίος είναι πάντα δίπλα μου, ακόμη και τώρα που δεν διαμένουμε κοντά. Ελπίζω κάποια στιγμή να καταφέρω να περνώ περισσότερες ώρες μαζί τους.

Στο δύσκολο αυτό μονοπάτι που διάλεξα, όλα αυτά τα χρόνια, πολύτιμη ήταν η αγάπη και η στήριξη της συζύγου, μα πάνω απ' όλα φίλης μου Αλεξάνδρας. Είμαι σίγουρος πως οι κόποι μας και η υπομονή μας θα ανταμειφθούν. Η στιγμή που θα υποδεχτούμε το δώρο μας είναι ήδη κοντά... Σ' ευχαριστώ!

Περίληψη

Οι Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (ΜΥΝ) είναι κλωνικές διαταραχές του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζονται από άμετρο και άσκοπο κλωνικό πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς, τα οποία, ωστόσο, διατηρούν σχετικά φυσιολογική ωρίμανση. Ο πολλαπλασιασμός αυτός οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων ή αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα.

Αντίστοιχα, τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ), εκτός από αύξηση του αριθμού των κυττάρων μιας ή περισσότερων σειρών, εμφανίζουν ταυτόχρονα και δυσπλασία του μυελού.

Μέχρι πρόσφατα, η διάγνωση και πρόγνωση των υποκατηγοριών αυτών των νοσημάτων, βασιζόταν σχεδόν αποκλειστικά σε κυτταρολογικά χαρακτηριστικά και καρυοτυπικές αναλύσεις, με εξαίρεση πολύ συγκεκριμένες μοριακές βλάβες, όπως εκείνες στα γονίδια *JAK2* και *MPL*, που ανιχνεύονται στην πλειοψηφία των ασθενών με ΜΥΝ, σπάνια δε στα ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Η πρόοδος της τεχνολογίας οδήγησε σε καλύτερο χαρακτηρισμό της παθογένειας των μυελικών νεοπλασιών, με την ανάδειξη πληθώρας μεταλλάξεων σε γονίδια με ετερογενείς κυτταρικές λειτουργίες και μάλιστα με διαφορετική συχνότητα σε κάθε περίπτωση.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι συχνές μεταλλάξεις προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*, που ανιχνεύονται στην πλειοψηφία των ασθενών με Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) ή Μυελοϊνωση (ΜΙ), οι οποίοι ελέγχονται αρνητικοί για μεταλλάξεις *JAK2* και *MPL*.

Επιπλέον μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί σε γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του επιγενετικού μηχανισμού του κυττάρου, στον κυτταρικό κύκλο, στην ωρίμανση του mRNA και σε άλλες σημαντικές διεργασίες. Οι μεταλλάξεις αυτές θεωρείται πως συμβάλλουν στην πρόοδο και εξέλιξη των μυελικών νεοπλασιών, καθεμία σε διαφορετικό βαθμό, που εξαρτάται από την επίπτωση στο τελικό πρωτεϊνικό προϊόν, στους κυτταρικούς μηχανισμούς όπου εμπλέκεται κάθε γονίδιο, καθώς και στον κυτταρικό κλώνο που εμφανίζεται.

Ορισμένες μεταλλάξεις είναι κοινές στις διάφορες ετερογενείς κατηγορίες αιμοποιητικών διαταραχών και μάλιστα ανιχνεύονται σε υψηλά ποσοστά, όπως εκείνες στα γονίδια *ASXL1* και *SRSF2*, οι οποίες έχουν σχετιστεί με κακή πρόγνωση νόσου.

Ωστόσο, άλλες μεταλλάξεις φαίνεται πως είναι αποκλειστικές συγκεκριμένων νοσημάτων, όπως συμβαίνει με τα γονίδια *CSF3R* και *SETBP1*, που συμβάλλουν στη διαφορική διάγνωση των ΧΟΛ και αΧΜΛ, αντίστοιχα. Κατά τα άλλα, τα συγκεκριμένα νοσήματα είναι δύσκολο να διακριθούν μεταξύ τους.

Η μελέτη των κυτταρικών μηχανισμών που επηρεάζονται στις διαφορετικές υποκατηγορίες νοσημάτων του αίματος, εξαιτίας των παραπάνω, αλλά και επιπρόσθετων μεταλλάξεων, είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού με τον τρόπο αυτό αποκαλύπτονται σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία διαταράσσονται και στα οποία είναι δυνατόν να παρέμβουμε θεραπευτικά.

Οι σύγχρονες τεχνολογίες προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Next Generation Sequencing, NGS) έχουν ήδη συμβάλει προς αυτή την κατεύθυνση, μέσω μελέτης του ανθρώπινου μεταγραφώματος (RNA-seq).

Ωστόσο, αρχικός στόχος παραμένει, ο όσο το δυνατόν πληρέστερος χαρακτηρισμός του τοπίου των μοριακών βλαβών που φέρει κάθε ασθενής, ξεχωριστά. Η χαρτογράφηση των μεταλλάξεων μπορεί να γίνει είτε σταδιακά με τη μελέτη μεμονωμένων γενωμικών περιοχών με παλαιότερες,

ήδη εγκαθιδρυμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας, είτε σε μεγαλύτερη κλίμακα, με την ενσωμάτωση σύγχρονων τεχνικών, όπως η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome sequencing, WGS), μόνον των περιοχών που εκφράζονται (whole exome sequencing, WES), ή με την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών γενωμικών θέσεων (targeted sequencing), με τεχνολογία NGS.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, αναπτύξαμε και συγκρίναμε διαφορετικά πρωτόκολλα για τη μοριακή διερεύνηση γονιδίων τα οποία εμφανίζονται συχνά μεταλλαγμένα σε ασθενείς με MYN και ΜΔΣ/MYN. Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος των ασθενών με MI, με άτομα του γενικού πληθυσμού, σε μία προσπάθεια να διερευνήσουμε βαθύτερα το τοπίο αυτής της περίπλοκης νόσου. Τέλος, μελέτησαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των ασθενών με MI και ΜΔΣ/MYN, με στόχο να αποκαλύψουμε τυχόν αλλαγές στο πρότυπο αυτής, της πολύ σημαντικής τροποποίησης, δεδομένου ότι τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια που επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την επιγενετική κατάσταση του κυττάρου.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται ως εξής:

- i. Μελετήθηκαν, μέσω διερεύνησης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών, 266 ασθενείς με MYN τόσο για μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια της αιμοποίησης, *JAK2* (εξόνια 12 και 14), *MPL* (εξόνιο 10) και *CALR* (εξόνιο 9), όσο και για μεταλλάξεις σε γονίδια με τροποποιητική δράση, συγκεκριμένα στα *ASXL1* (εξόνιο 12), *DNMT3A* (εξόνιο 23), *IDH1* (εξόνιο 4), *IDH2* (εξόνιο 4), *SETBP1* (εξόνιο 4), *SF3B1* (εξόνια 14 και 15), *SRSF2* (εξόνιο 1), *U2AF1* (εξόνια 2 και 6), *CSF3R* (εξόνιο 14) και *KIT* (εξόνιο 17). Συνολικά, μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 241 ασθενείς (90.60%). Στις επιμέρους κατηγορίες, τα ποσοστά αυτά ανέρχονται σε 98.41% στην Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ, n=62/63), σε 86.73% στη ΙΘ (n=85/98), σε 89.89% στη MI (n=80/89), σε 100.00% στη Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ, n=6/6) και σε 80.00% στη Συστηματική Μαστοκυττάρωση (ΣΜ, n=8/10). Στο σύνολο των περιπτώσεων και σε ποσοστό 81.58% (n=217/266), ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια της αιμοποίησης, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των μεταλλάξεων με τροποποιητική δράση ανέρχεται σε μόλις 9.02% (n=24/266). Σε 16.54% (n=44/266) των ασθενών με MYN που μελετήθηκαν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις και στις δύο αυτές κατηγορίες γενετικών βλαβών, με το μοριακό τοπίο της MI να χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα πολύπλοκο, αφού το αντίστοιχο ποσοστό ανέρχεται σε 42.70% (n=38/89) των περιστατικών. Καμία από τις μεταλλάξεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν εμφανίστηκαν σε μία μικρή κοορτή ασθενών (n=0/29) με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) που μελετήθηκαν.
- ii. Για τις ίδιες μεταλλάξεις, με όμοιες μεθοδολογίες, μελετήθηκαν 110 ασθενείς με ΜΔΣ/MYN. Συνολικά, μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε 91 ασθενείς (82.73%). Στις επιμέρους κατηγορίες, τα ποσοστά αυτά ανέρχονται σε 70.18% στη Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ, n=40/57), σε 94.87% στην άτυπη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (αΧΜΛ, n=37/39) και σε 100.00% στα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα με παρουσία Δακτυλιωτών Σιδηροβλαστών και Θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ, n=14/14). Στο σύνολο των περιπτώσεων και σε ποσοστό 13.64% (n=15/110), ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια της αιμοποίησης, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των μεταλλάξεων με τροποποιητική δράση ανέρχεται σε 69.09% (n=76/110), φανερώνοντας το διαφορετικό μοριακό υπόβαθρο των ΜΔΣ/MYN, σε σύγκριση με τα MYN. Σε 11.82% (n=13/110) των

- ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ που μελετήθηκαν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις και στις δύο κατηγορίες μοριακών βλαβών.
- iii. Σε 25 ασθενείς πραγματοποιήθηκε διερεύνηση για μοριακές βλάβες μέσω targeted sequencing, με τεχνολογία NGS και ανάλυση με βιοπληροφορικό αλγόριθμο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Με την τεχνική αυτή μελετήθηκαν ταυτόχρονα, σε μία αντίδραση, 26 γονίδια, τα περισσότερα για παραπάνω από ένα εξόνια, ενώ για ορισμένα γονίδια ο έλεγχος αφορούσε ολόκληρη την κωδικοποιούσα αλληλουχία. Σε 13 περιπτώσεις ασθενών δεν είχαν ανιχνευθεί μεταλλάξεις, μέσω άλλων τεχνικών μοριακής βιολογίας οι οποίες διερευνούν μεμονωμένες γενωμικές περιοχές, όπως αντίδραση πολυμεράσης τελικού σημείου (PCR), ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου (HRMA) και κατά Sanger προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται 1 ασθενής με ΑΠ, 3 με ΙΘ, 4 με ΠΜΙ, 1 με ΧΜΜΛ, 2 με Οξεία Μυλογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) και 2 με οικογενή διαταραχή αιμοπεταλίων. Σε 12 περιπτώσεις ασθενών είχαν ήδη ανιχνευθεί μεταλλάξεις με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται 1 περίπτωση με ΑΠ, 1 με ΙΘ, 7 με ΜΙ, 1 με ΣΜ, 1 με ΧΟΛ και 1 με αΧΜΛ. Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (test group) για προσδιορισμό της ευαισθησίας και της ακρίβειας της μεθόδου. Σε όλες τις περιπτώσεις επιβεβαιώθηκαν οι ήδη γνωστές μεταλλάξεις, που είχαν ανιχνευθεί εκ των προτέρων με άλλες τεχνικές. Μεταλλάξεις επιπρόσθετες αυτών που ήταν ήδη γνωστές ανιχνεύθηκαν σε 5 ασθενείς, ενώ σε 7 περιστατικά τα οποία ήταν χωρίς ευρήματα, φανερώθηκαν μοριακές βλάβες. Τέλος, σε 6 ασθενείς δεν ανιχνεύθηκε καμία γενετική αλλοίωση.
 - iv. Στη συνέχεια μελετήθηκε το πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 (Long interspersed nucleotide elements, LINEs) σε ασθενείς με ΜΙ και με ΜΔΣ/ΜΥΝ. Τα στοιχεία αυτά μαζί με τις μικρότερες εκδοχές τους (Short interspersed nucleotide elements, SINEs), απαρτίζουν περίπου 40-50% του γονιδιώματος. Ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων, αποτυπώνει προσεγγιστικά τα επίπεδα αυτής της επιγενετικής τροποποίησης στο σύνολο του γονιδιώματος (estimation of global methylation levels). Με μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA), προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 σε 15 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και σε 15 ασθενείς με ΜΙ. Ως φυσιολογικά θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα επίπεδα από 6 άτομα του γενικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP), σε 8 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και σε 28 ασθενείς με ΜΙ, σε σύγκριση με 7 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση. Οι δύο τεχνικές αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές (p -value<0.05), ανιχνεύσιμες διαφορές, στο πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, στους ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, όχι όμως και στους ασθενείς με ΜΙ.
 - v. Σε μία προσπάθεια να χαρακτηριστεί καλύτερα η βιολογία της ΜΙ, προχωρήσαμε σε συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος των ασθενών αυτής της κατηγορίας (n=6), με άτομα του γενικού πληθυσμού (n=2), μέσω τεχνολογίας RNA-Seq και με βιοπληροφορικό αλγόριθμο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Συνολικά, αναδείχθηκαν 2010 γονίδια, ως στατιστικώς σημαντικά (FDR<0.05), διαφορετικά εκφραζόμενα στη ΜΙ, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Από τα παραπάνω γονίδια, τα 695 εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, ενώ τα 1315 αυξημένα. Υπερ-εκφραζόμενα εμφανίζονται γονίδια που

αφορούν σε μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, συγκεκριμένα σε ενισχυμένη δραστηριότητα των κοκκιοκύτταρων, για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων. Ωστόσο, υπο-εκφραζόμενα παρατηρούνται γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του λεμφικού ιστού.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες

1.1.1 Ορισμός

Οι ΜΥΝ είναι κλωνικές διαταραχές του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζονται από άμετρο και άσκοπο κλωνικό πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς, τα οποία, ωστόσο, διατηρούν σχετικά φυσιολογική ωρίμανση. Ο πολλαπλασιασμός αυτός οδηγεί σε αυξημένο αριθμό κοκκιοκυττάρων, ερυθροκυττάρων ή αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα.

1.1.2 Ταξινόμηση των Μυελοϋπερπλαστικών Νεοπλασιών

1.1.2.1 Ταξινόμηση κατά Dameshek

Ο όρος Μυελοϋπερπλαστικά Σύνδρομα (ΜΥΣ) εντάσσει την Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ), την Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ), την Πρωτοπαθή Μυελοϊνώση (ΠΜΙ) και τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ), σε μία κοινή ομάδα νοσημάτων, με βάση το σχετικά όμοιο κλινικό τους φαινότυπο και την πεποίθηση ότι όλες υπόκεινται σε ένα κοινό αδιευκρίνιστο ερέθισμα, που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μυελού των οστών (Dameshek 1951).

1.1.2.2 Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) το 2001 και η αναθεώρηση του 2008

Το 2001, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) (World Health Organization, WHO) κατέταξε τα ΜΥΣ σε μία ευρύτερη κατηγορία νοσημάτων, γνωστή ως Χρόνιες Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές (ΧΜΥΔ) (Chronic Myeloproliferative Diseases, CMPDs). Στην ίδια ομάδα προστέθηκαν η Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ), η Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία/Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο (ΧΗΛ/ΥΗΣ), καθώς και οι αταξινόμητες Χρόνιες Μυελοϋπερπλαστικές Διαταραχές (αΧΜΥΔ).

Κοινό χαρακτηριστικό αυτής της ετερογενούς ομάδας νοσημάτων αποτελεί η κλωνική υπερπλασία της μυελικής σειράς, η οποία στο περιφερικό αίμα ανιχνεύεται ως αύξηση των κοκκιοκυττάρων, των αιμοπεταλίων ή/και των ερυθροκυττάρων, χωρίς όμως να συνοδεύεται από δυσερυθροποίηση, δυσπλασία της κοκκιδώδους σειράς ή μονοκυττάρωση.

Αντίθετα, όταν η μυελική νεοπλασία συνοδεύεται από δυσερυθροποίηση, δυσπλασία ή μονοκυττάρωση, τότε τα αντίστοιχα σύνδρομα περιγράφονται ως Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές (ΜΔΣ/ΜΥΔ) (Myelodysplastic /Myeloproliferative diseases, MDS/MPD).

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται η άτυπη Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία (αΧΜΛ), η Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ), η Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΝΜΜΛ), καθώς και αταξινόμητες διαταραχές (αΜΔΣ/ΜΥΔ), όπως η προσωρινά ταξινομημένη οντότητα, Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση (ΑΑΔΣ-Θ).

Τέλος, οι διάφορες μορφές Μαστοκυττάρωσης αποτελούν μία ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό μαστοκυττάρων και ταξινομείται ανεξάρτητα (Vardiman et al. 2001).

Η αναθεώρηση της κατάταξης αυτής από τον Π.Ο.Υ. το 2008 στηρίχθηκε στις παραπάνω βασικές πληροφορίες, αλλά περιέλαβε και νεότερα κλινικά, γενετικά και μοριακά δεδομένα.

Συγκεκριμένα, ενσωματώθηκαν στα διαγνωστικά κριτήρια ορισμένοι μοριακοί δείκτες, περισσότερο ειδικοί των ΜΥΝ. Σημειακές μεταλλάξεις στα εξόνια 12 και 14 του γονιδίου *JAK2* και στο εξόνιο 10 του γονιδίου *MPL* παρατηρούνται σε υψηλό ποσοστό ασθενών με ΙΘ, ΑΠ και ΠΜΙ και φαίνεται πως διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη αυτών.

Στο ίδιο πλαίσιο εντάσσεται και η ανίχνευση του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph^1 , μη-φυσιολογικό χρωμόσωμα 22), που χαρακτηριστικά οδηγεί στη διάγνωση της ΧΜΛ. Το χρωμόσωμα αυτό σχηματίζεται από την αμοιβαία μετάθεση τμημάτων των χρωμοσωμάτων 9 και 22, η οποία επιφέρει σύντηξη του 5' τμήματος του γονιδίου *BCR* με το 3' τμήμα του γονιδίου *ABL*, προς σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL* που θεωρείται το γενεσιουργό αίτιο της νόσου.

Τέλος, παρόμοιες γενετικές και, κατ' επέκταση, μοριακές αναδιατάξεις θεωρούνται υπαίτιες για την εμφάνιση διαφόρων τύπων υπερηωσινοφιλικών συνδρόμων, ενώ η σημειακή μετάλλαξη *KITD816V*, αποτελεί μοριακό χαρακτηριστικό ορισμένων μορφών μαστοκυττάρωσης.

Τέλος, ο όρος "διαταραχές" αντικαταστάθηκε από τον όρο "νεοπλάσματα", οπότε οι κύριες κατηγορίες ΧΜΥΔ και ΜΔΣ/ΜΥΔ, μετονομάστηκαν σε Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΥΝ) και Μυελοδυσπλαστικά/Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ), αντίστοιχα (Tefferi and Vardiman 2008).

1.1.2.3 Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Αναθεώρηση του 2016

Η ταξινόμηση του 2008 συμπληρώθηκε με πρόσφατα δεδομένα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA πολλών ασθενών με ΜΥΝ, με τεχνολογίες αλληλούχισης δεύτερης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS).

Κύρια σημεία της αναθεώρησης είναι:

α) Η εύρεση συχνών μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*, σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΜΥΝ, κυρίως ΙΘ και ΠΜΙ, οι οποίοι ελέγχονταν αρνητικοί για μεταλλάξεις *JAK2* και *MPL*, μέχρι πρότινος.

β) Η διάκριση της ΠΜΙ σε δύο περαιτέρω υποκατηγορίες, ανάλογα με το βαθμό της ίνωσης που παρατηρείται στο μυελό (προϊνωτικό στάδιο και στάδιο ίνωσης).

γ) Ο χαρακτηρισμός της ΑΑΔΣ-Θ ως αλληλεπικαλυπτόμενο νόσημα και η μετονομασία αυτής σε Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο/Μυελοϋπερπλαστικό Νεόπλασμα με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ).

δ) Η ένταξη της μαστοκυττάρωσης σε χωριστή κατηγορία, λόγω της μοναδικής κλινικής και παθολογοανατομικής εικόνας που παρουσιάζει (Arber et al. 2016).

Π.Ο.Υ. 2016: Αναθεώρηση ταξινόμησης Μυελικών Νεοπλασιών
Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλασίες (ΜΥΝ)
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ), BCR-ABL ⁺ Χρόνια Ουδετεροφιλική λευχαιμία (ΧΟΛ)

Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ) Πρωτοπαθής Μυελοϊνώση (ΠΜΙ) 4.1 ΠΜΙ σε προ-ινωτικό στάδιο 4.2 ΠΜΙ σε ίνωση Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) Χρόνια Ηωσινοφιλική Λευχαιμία, μη αλλιώς ταξινομημένη (ΧΗΛ) Αταξινόμητα ΜΥΝ (αΜΥΝ)		
Μαστοκυττάρωση		
Μυελοδυσπλαστικά (ΜΔΣ/ΜΥΝ)	Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικά	Νεοπλάσματα
Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ) Άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΜΛ), BCR-ABL ⁻ Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΝΜΜΛ) ΜΔΣ/ΜΥΝ με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ) Αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ (αΜΔΣ/ΜΥΝ)		
Μυελικά Νεοπλάσματα με Ηωσινοφιλία και αναδιατάξεις των γονιδίων PDGFRA, PDGFRB και FGFR1		
Μυελικά Νεοπλάσματα με αναδιάταξη των γονιδίων PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 Προσωρινή οντότητα: Μυελικές ή Λεμφικές Νεοπλασίες με αναδιάταξη των γονιδίων <i>PCM1-JAK2</i>		

Πίνακας 1. Κατηγορίες μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασιών (αναθεώρηση Π.Ο.Υ. 2016) (τροποποίηση από Arber et al. 2016).

1.2 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και υποκείμενες γενετικές βλάβες

1.2.1 Κλασικά Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΥΝ)

Τα κλασικά ΜΥΝ διακρίνονται σε δύο ευρείες κατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή απουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια, περισσότερες πληροφορίες για το οποίο παρέχονται στο κεφάλαιο 1.3.1, που ακολουθεί.

Το τροποποιημένο αυτό χρωμόσωμα, παρατηρείται σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) και αποτελεί μοριακό δείκτη διάγνωσης της νόσου.

Τα υπόλοιπα κλασικά ΜΥΝ (ΑΠ, ΙΘ, ΠΜΙ) χαρακτηρίζονται από άλλου είδους μοριακές βλάβες τις οποίες θα αναλύσουμε εκτενώς στο κεφάλαιο 1.3.2.

1.2.1.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ)

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, η οποία χαρακτηρίζεται από υπερπλασία του μυελού των οστών λόγω του άμετρου πολλαπλασιασμού ενός ή περισσότερων τύπων κυττάρων, κυρίως της μυελικής σειράς.

Στην τυπική της μορφή και μάλιστα πριν από την εισαγωγή της αντίστοιχης στοχευμένης θεραπείας, η ΧΜΛ εξελίσσεται σε τρεις διαδοχικές φάσεις, τη χρόνια, την επιταχυνόμενη και τη βλαστική κρίση.

Η χρόνια φάση διαρκεί από 3-5 έτη, εκδηλώνεται στη μέση ηλικία και χαρακτηρίζεται από αύξηση της αναλογίας της κοκκιδώδους σειράς, με ταυτόχρονη επικράτηση των

πρόδρομων κυτταρικών μορφών. Η αναλογία των βλαστών δεν ξεπερνά το 2-3% (Faderl et al. 1999, Sawyers 1999).

Η επιταχυνόμενη φάση διαρκεί από 6 έως 9 μήνες. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα έχουν ήδη απωλέσει την ικανότητα τελικής διαφοροποίησης, οπότε επικρατούν οι πρόδρομες μορφές κυττάρων με διαφορετικό βαθμό διαφοροποίησης, ενώ παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των βασεόφιλων και των θρομβοκυττάρων.

Η βλαστική κρίση αποτελεί καταληκτικό σημείο της νόσου, όπου τα ανώριμα βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Το στάδιο αυτό διαρκεί από 3 έως 6 μήνες (Kantarjian et al. 1985, Silver 1990).

Το 1960 οι Nowell και Hungerford διαπίστωσαν ότι σε κύτταρα μυελού των οστών, από ασθενείς με ΧΜΛ, ανιχνεύεται ένα χρωμόσωμα 22 μικρότερο από το κανονικό (22q⁻), το οποίο ονομάστηκε χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph¹). Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αυτό οφείλεται σε αμοιβαία μετάθεση τμημάτων γενετικού υλικού, μεταξύ των γονιδίων *ABL* και *BCR*, που εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 9 και 22 (t(9;22)(q34;q11)), προς σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου *BCR-ABL* (Nowell and Hungerford 1960).

1.2.1.2 Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)

Ο όρος πολυκυτταραιμία υποδηλώνει την αύξηση όλων των κυτταρικών σειρών της αιμοποίησης. Ωστόσο, συνήθως χρησιμοποιείται κυρίως για να περιγράψει μία αύξηση στον πληθυσμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία συνοδεύεται από τιμές αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη υψηλότερες του φυσιολογικού, αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με παράλληλη αύξηση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων.

Διακρίνονται δύο ευρείες κατηγορίες: (α) η σχετική πολυκυτταραιμία (relative polycythemia) και (β) η απόλυτη πολυκυτταραιμία (true polycythemia).

Οι αλλαγές των αιματολογικών παραμέτρων (αιμοσφαιρίνη, αιματοκρίτης, αριθμός ερυθρών), που παρατηρούνται στη σχετική πολυκυτταραιμία, δεν αποτελούν πραγματική μεταβολή της απόλυτης τιμής τους και στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται σε μείωση του όγκου του πλάσματος, που μπορεί να προκληθεί από ποικίλα αίτια (παχυσαρκία, υπέρταση, άγχος, αφυδάτωση, αλκοόλ, διουρητικά).

Αντίθετα, οι απόλυτες πολυκυτταραιμίες, χαρακτηρίζονται από πραγματικές μεταβολές στον αριθμό των ερυθροκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω, βάσει της υποκείμενης παθογενετικής αιτίας.

Έτσι, η αληθής πολυκυτταραιμία (ΑΠ), καθώς και οι πρωτοπαθείς οικογενείς (συγγενείς) πολυκυτταραιμίες, οφείλονται σε ενδογενείς μοριακές βλάβες στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, οι οποίες οδηγούν σε αυτόνομο υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανεξάρτητο της ρυθμιστικής δράσης της ορμόνης ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO).

Αντίθετα, οι δευτεροπαθείς πολυκυτταραιμίες οφείλονται σε εξωγενείς ή γενετικούς παράγοντες, που απορυθμίζουν το σύστημα ελέγχου του αριθμού των πρόδρομων ερυθροποιητικών κυττάρων, μέσω της EPO, με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή της και τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν τον υποδοχέα αυτής της ορμόνης (erythropoietin receptor, EPOR).

Η κλωνική διαταραχή που χαρακτηρίζεται ως Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ) (νόσος Osler ή Vasquez), οφείλεται σχεδόν καθολικά, σε μεταλλάξεις που παρατηρούνται στα εξόνια 12 και 14 του γονιδίου που κωδικοποιεί για την κινάση της πρωτεΐνης

JAK2, η οποία μετέχει στην ενεργοποίηση ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως περιγράφεται εκτενώς στο κεφάλαιο 1.3.2.1.1.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται η αντικατάσταση του αμινοξέος βαλίνη από φαινυλαλανίνη στη θέση 617 της αμινοξικής ακολουθίας (V617F). Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο με τη συγκεκριμένη αλλαγή, εμφανίζει αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, συγκριτικά με φυσιολογικά κύτταρα που δε φέρουν τη μετάλλαξη, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης EPO (Arber et al. 2016).

Αληθής Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)
Μείζονα Κριτήρια
1. Αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης (Hb) (Άνδρες: >16.5g/dl, Γυναίκες: >16g/dl), ή υψηλός αιματοκρίτης (Hct) (Άνδρες: >49%, Γυναίκες: >48%), ή αυξημένη μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων (RCM) (>25% της αναμενόμενης τιμής) 2. Οστεομυελική Βιοψία (OMB): Μυελός κυτταροβριθής Αύξηση σε απόλυτη τιμή, όλων των κυτταρικών σειρών (ερυθροειδική, κοκκιοκυτταρική, μεγακαρυοκυτταρική) Μεγακαρυοκύτταρα με πλειομορφικά χαρακτηριστικά 3. Ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2V617F, ή άλλης μετάλλαξης στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2
Ελάσσονα Κριτήρια
1. Μειωμένα επίπεδα ερυθροποιητίνης ορού
Για τη διάγνωση της ΑΠ απαιτούνται τα τρία μείζονα κριτήρια, ή δύο από τα μείζονα κριτήρια και το μοναδικό ελάσσον κριτήριο

Πίνακας 2. Κριτήρια διάγνωσης ΑΠ (Π.Ο.Υ. 2106) (τροποποίηση από Arber et al. 2016).

1.2.1.3 Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)

Ως θρομβοκυττάρωση χαρακτηρίζεται η αύξηση της τιμής των αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα.

Η Ιδιοπαθής (Πρωτοπαθής) Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ) αποτελεί κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, όπως και τα υπόλοιπα MYN. Χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων, με επακόλουθο τον αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα, σε επίπεδα άνω των $450 \times 10^9/L$.

Η ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων είναι ενδογενής και ανεξάρτητη των επιπέδων EPO ή θρομβοποιητίνης (TPO). Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθές νόσημα.

Επομένως, δε θα πρέπει να συγχέεται με δευτεροπαθείς θρομβοκυτταρώσεις, οι οποίες εκδηλώνονται αντιδραστικά σε ποικίλες παθολογικές ή άλλες καταστάσεις (χρόνιες φλεγμονές, διάφορα νεοπλάσματα, σιδηροπενική αναιμία, σπληνεκτομή, τραυματισμοί, αιμορραγίες).

Ο αιματοκρίτης των ασθενών είναι συνήθως φυσιολογικός, ενώ το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΧΜΛ δεν ανιχνεύεται.

Στην ΙΘ ανιχνεύονται συχνά μεταλλάξεις στα γονίδια JAK2, MPL ή CALR, οι οποίες είναι αμοιβαία αποκλειόμενες, εκτός σπάνιων περιπτώσεων. Οι μισοί περίπου ασθενείς φέρουν τη μετάλλαξη JAK2V617F. Οι καταστάσεις αυτές προσομοιάζουν με ΑΠ, εμφανίζουν υψηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης και λευκοκυττάρων, όπως και πιο

έντονη σπληνομεγαλία. Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με φυσιολογική πρωτεΐνη JAK2, φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALR* (67-88%) (Klampfl et al. 2013, Nangalia et al. 2013), καθώς και ιδιαίτερα αυξημένες τιμές αιμοπεταλίων, ενώ οι περιπτώσεις που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης (TPOR ή *c-MPL*) είναι σχετικά περιορισμένες (Arber et al. 2016).

Ιδιοπαθής Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)
Μείζονα Κριτήρια
<ol style="list-style-type: none"> 1. Αριθμός αιμοπεταλίων $>450 \times 10^9/L$ 2. Οστεομυελική Βιοψία (OMB): Αυξημένος αριθμός ευμεγέθων μεγακαρυοκυττάρων με πολύλοβο πυρήνα Μικρή αύξηση ή αριστερή στροφή στον πληθυσμό των ουδετερόφιλων και ερυθρών κυττάρων Αμελητέα παρουσία ίνωσης του μυελού (βαθμού 1) 3. Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΜΙ, Rh^1 θετικής ΧΜΛ, ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας 4. Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ή <i>MPL</i>
Ελάχισονα Κριτήρια
1. Παρουσία άλλου κλωνικού δείκτη, ή απουσία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης
Για τη διάγνωση της ΙΘ απαιτούνται όλα τα τέσσερα μείζονα κριτήρια, ή τρία από τα μείζονα κριτήρια και το μοναδικό ελάχισον κριτήριο

Πίνακας 3. Κριτήρια διάγνωσης ΙΘ (Π.Ο.Υ. 2016) (τροποποίηση από Arber et al. 2016).

1.2.1.4 Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ)

Η Πρωτοπαθής Μυελοϊνωση (ΠΜΙ) αποτελεί χρόνια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ίνωσης στο μυελό των οστών (ΜΟ). Πρόκειται για σχετικά σπάνιο κλωνικό νεόπλασμα (0.5-1.5 νέες περιπτώσεις ανά 100,000 άτομα κάθε χρόνο), το οποίο προσβάλλει κυρίως μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες.

Αναπτύσσεται άλλοτε *de novo* και άλλοτε ως πρόοδος της ΑΠ (post-PV MF) ή συχνότερα, της ΙΘ (post-ET MF), με ίδια περίπου κλινική εικόνα. Η έναρξη της νόσου οφείλεται σε ανεξέλεγκτη υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες που προάγουν την ανάπτυξη των ινοβλαστών και κατά συνέπεια τη δημιουργία ινών κολλαγόνου, στο μυελό των οστών.

Λόγω της συνεχώς εξελισσόμενης ίνωσης, οι νησίδες όπου πραγματοποιείται η αιμοποίηση, σταδιακά συρρικνώνονται. Ως αποτέλεσμα, τη διαδικασία αναλαμβάνουν ανεπαρκώς, δευτερογενή αιμοποιητικά όργανα, όπως το ήπαρ και ο σπλήνας, τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος.

Διάφορα διαγνωστικά και προγνωστικά μοντέλα έχουν προταθεί κατά καιρούς, που ισχύουν τόσο για τη αρχική διάγνωση, όσο και για τη σταδιοποίηση και ορθή διαχείριση της νόσου. Όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν, η ΠΜΙ διακρίνεται δύο υποκατηγορίες. Η πρώτη αφορά στα πρώιμα στάδια της νόσου, ενώ η δεύτερη αναφέρεται σε μεταγενέστερα, όψιμα στάδια.

Σε μοριακό επίπεδο, ανιχνεύονται μεταλλάξεις κοινές, για τα Rh^1 αρνητικά, κλασικά ΜΥΝ, (*JAK2*, *MPL* και *CALR*), αλλά και επιπρόσθετες τροποποιητικές μεταλλάξεις, σε άλλα γονίδια, που εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες.

Πρώιμη ΠΜΙ (prePMF)
Μείζονα Κριτήρια
<p>1. ΜΟ: Αυξημένος πολλαπλασιασμός μεγακαρυοκυττάρων, χωρίς ταυτόχρονη παρουσία ιδιαίτερα έντονης ίνωσης (βαθμού 0 ή 1). Αυξημένη κυτταροβρίθεια, κυρίως λόγω υπέρμετρου πολλαπλασιασμού των κοκκιοκυττάρων, η οποία συνοδεύεται από μειωμένη ερυθροποίηση.</p> <p>2. Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΙΘ, Ph¹ θετικής ΧΜΛ, ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας</p> <p>3. Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ή <i>MPL</i>, ή σε άλλον δείκτη κλωνικότητας*, όταν δεν διαπιστώνονται μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια, ή απουσία αντιδραστικής ίνωσης του ΜΟ** (βαθμού 0 ή 1)</p>
Ελάσσονα Κριτήρια
<p>1. Αναιμία που δεν οφείλεται σε συνοδό νόσημα</p> <p>2. Λευκοκυττάρωση: $\geq 11 \times 10^9/L$</p> <p>3. Ψηλαφητή σπληνομεγαλία</p> <p>4. Αυξημένα επίπεδα LDH</p>
Για τη διάγνωση της πρώιμης ΠΜΙ (pre PMF) απαιτούνται όλα τα τρία μείζονα κριτήρια, και τουλάχιστον ένα από τα ελάσσονα κριτήρια

Όψιμη ΠΜΙ (overt PMF)
Μείζονα Κριτήρια
<p>1. ΜΟ: Αυξημένος πολλαπλασιασμός μεγακαρυοκυττάρων, με ταυτόχρονη παρουσία έντονης ίνωσης (βαθμού 2 ή 3).</p> <p>2. Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΙΘ, Ph¹ θετικής ΧΜΛ, ΜΔΣ ή άλλης μυελικής νεοπλασίας</p> <p>3. Παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> ή <i>MPL</i>, ή σε άλλον δείκτη κλωνικότητας*, όταν δεν διαπιστώνονται μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια, ή απουσία αντιδραστικής ίνωσης του ΜΟ** (βαθμού 0 ή 1)</p>
Ελάσσονα Κριτήρια
<p>1. Αναιμία που δεν οφείλεται σε συνοδό νόσημα</p> <p>2. Λευκοκυττάρωση: $\geq 11 \times 10^9/L$</p> <p>3. Ψηλαφητή σπληνομεγαλία</p> <p>4. Αυξημένα επίπεδα LDH</p> <p>5. Λευκοερυθροβλάστωση</p>
Για τη διάγνωση της όψιμης ΠΜΙ (overt PMF) απαιτούνται όλα τα τρία μείζονα κριτήρια, και τουλάχιστον ένα από τα ελάσσονα κριτήρια

Πίνακας 4. Κριτήρια διάγνωσης ΠΜΙ (Π.Ο.Υ. 2016) Επάνω: Κριτήρια διάγνωσης πρώιμης (pre) ΠΜΙ και κάτω: Κριτήρια διάγνωσης όψιμης (overt) (τροποποίηση απο Arber et al. 2016).

* Συνοδές τροποποιητικές μεταλλάξεις, που διαμορφώνουν και τροποποιούν τη νόσο έχουν ανιχνευθεί σε γονίδια όπως τα *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1* και άλλα. Παρόλο που οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται λιγότερο συχνά πρέπει να διερευνώνται όταν υπάρχει δυνατότητα.

**** Η αντιδραστική ίνωση μπορεί να οφείλεται σε λοιμώξεις, αυτοάνοσα νοσήματα, διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, λευχαιμία τριχωτών κυττάρων ή άλλου τύπου νεοπλασία της λεμφικής κυτταρικής σειράς, διάφορες μεταστατικές νεοπλασίες, ή ακόμη σε χρόνιες μυελοπάθειες**

1.2.2 Μη Κλασικά Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα

1.2.2.1 Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ)

Η Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ) αποτελεί ένα σπάνιο κλωνικό μυελικό νεόπλασμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από αυξημένο αριθμό ώριμων ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα, υπερπλασία του μυελού των οστών, κυρίως λόγω επέκτασης της κοκκιδώδους σειράς, όπως και ηπατοσπληνομεγαλία.

Παράλληλα δεν παρατηρείται δυσπλασία των κοκκιοκυττάρων, ούτε μονοκυττάρωση, αποκλείοντας έτσι αλληλεπικαλυπτόμενα σύνδρομα όπως η αΧΜΛ και η ΧΜΜΛ, αντίστοιχα.

Χωρίς θεραπεία η νόσος εξελίσσεται σε ΟΜΛ σε διάστημα μόλις 12-24 μηνών. Η μέση επιβίωση των ασθενών κυμαίνεται από 21 έως 24 μήνες (Elliott and Tefferi 2016).

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν τη σημασία μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί στον υποδοχέα των κοκκιοκυττάρων (*CSF3R*), στην εκδήλωση της νόσου. Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται σε περισσότερο από το 80% των ασθενών με ΧΟΛ, συμβάλλοντας έτσι στην ορθή ταξινόμηση αυτής της σπάνιας νόσου (Dao et al. 2017, Maxson and Tyner 2017).

Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ)
Διαγνωστικά Κριτήρια
1. Περιφερικό αίμα (ΠΑ): Λευκοκύτταρα $\geq 25 \times 10^9/L$ Ουδετερόφιλα και ραβδοκύτταρα σε ποσοστό $\geq 80\%$ επί του συνόλου των λευκοκυττάρων Άωρα κύτταρα της κοκκιδώδους σειράς (προ-μυελοκύτταρα, μυελοκύτταρα και μετα-μυελοκύτταρα) $< 10\%$ επί του συνόλου των λευκοκυττάρων Μυελοβλάστες σπάνιες Μονοκύτταρα $< 1 \times 10^9/L$ Απουσία δυσχέρειας κατά την ωρίμανση των κοκκιοκυττάρων
2. Μυελός οστών (ΜΟ): Κυτταροβριθής Ουδετερόφιλα αυξημένα σε ποσοστό και σε απόλυτο αριθμό Φυσιολογική ωρίμανση ουδετερόφιλων Μυελοβλάστες σε ποσοστό $< 5\%$ των εμπύρηνων κυττάρων
3. Απουσία ενδείξεων υποκείμενης ΑΠ, ΙΘ, ΠΜΙ ή Rh^1 θετικής ΧΜΛ
4. Απουσία χρωμοσωμικών μεταθέσεων όπου εμπλέκονται τα γονίδια <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> , <i>PCM1-JAK2</i>
5. Παρουσία της μετάλλαξης <i>CSF3R</i> T618I, ή άλλης ενεργοποιητικής μετάλλαξης στο γονίδιο <i>CSF3R</i> . Επί απουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>CSF3R</i> , η διάγνωση βασίζεται στα ακόλουθα κριτήρια: Επίμονη ουδετεροφιλία (για διάστημα μεγαλύτερο από 3 μήνες)

Σπληνομεγαλία

Απουσία υποκείμενης αιτίας αντιδραστικής ουδετεροφιλίας, όπως νεοπλασία των πλασματοκυττάρων, ή επί υπάρξεως, απόδειξη κλωνικότητας των μυελικών κυττάρων με κυτταρογενετική ή μοριακή ανάλυση

Πίνακας 5. Κριτήρια διάγνωσης ΧΟΛ (Π.Ο.Υ. 2016) (τροποποίηση απο Arber et al. 2016).

1.2.2.2 Μαστοκυττάρωση

Σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση των διαγνωστικών κριτηρίων των MYN, από τον Π.Ο.Υ., η μαστοκυττάρωση έπαψε να ταξινομείται ως υποκατηγορία αυτών των διαταραχών και θεωρείται πλέον ξεχωριστή νοσολογική οντότητα, λόγω των μοναδικών κλινικών και παθολογικών ευρυμάτων που τη χαρακτηρίζουν (Pardanani 2016).

Η μαστοκυττάρωση αποτελεί μία ετερογενή κατηγορία νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των μαστοκυττάρων, τα οποία μορφολογικά και ανοσολογικά δεν είναι φυσιολογικά, με αποτέλεσμα να διηθούν και να σωρεύονται σε ένα ή περισσότερα συστήματα οργάνων, όπως στο μυελό των οστών, στο δέρμα και σε διάφορα σπλαχνικά όργανα.

Η βαρύτητα της διαταραχής κυμαίνεται από μία ιδιόμορφη δερματική νόσο (δερματική μαστοκυττάρωση), μέχρι μία επιθετική συστηματική νόσο (συστηματική μαστοκυττάρωση, ΣΜ), που μπορεί να εξελιχθεί σε μαστοκυτταρική λευχαιμία (Tefferi et al. 2009, Soucie et al. 2012, Pardanani 2016).

Κατηγορίες μαστοκυττάρωσης

1. Δερματική μαστοκυττάρωση
2. Συστηματική μαστοκυττάρωση (SM, Systemic mastocytosis)
Ήπια συστηματική μαστοκυττάρωση (indolent SM)
Συστηματική μαστοκυττάρωση συνδυαζόμενη με επιπρόσθετη κλωνική αιματολογική νόσο
Επιθετική συστηματική μαστοκυττάρωση (aggressive SM)
Μαστοκυτταρική λευχαιμία (MCL, Mast cell leukemia)
3. Μαστοκυτταρικό σάρκωμα

Πίνακας 6. Ταξινόμηση της μαστοκυττάρωσης (Π.Ο.Υ. 2016) (τροποποίηση απο Arber et al. 2016, Pardanani 2016).

Σε μοριακό επίπεδο, η συστηματική μαστοκυττάρωση χαρακτηρίζεται από συχνές μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT*, με συχνότερη την D816V. Η ανίχνευση αυτής ενσωματώθηκε στα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου (Arber et al. 2016, Jawhar et al. 2016).

Συστηματική Μαστοκυττάρωση

Μείζονα Κριτήρια

1. Παρουσία στον μυελό ή σε άλλο εξωδερματικό όργανο πολυεστιακών πυκνών αθροίσεων ≥ 15 μαστοκυττάρων, όπως αναγνωρίζονται με τη χρώση για τρυπτάση ή άλλες ειδικές χρώσεις

Ελάσσονα Κριτήρια

1. Άτυπη μορφολογία >25% των μαστοκυττάρων σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, μυελικά επιχρίσματα ή άλλους εξωδερματικούς ιστούς
2. Ανίχνευση της μετάλλαξης *KIT D816V* σε μυελό των οστών, περιφερικό αίμα ή άλλο εξωδερματικό όργανο
3. Έκφραση των δεικτών CD2 ή/και CD25, από τα μαστοκύτταρα του μυελού, του αίματος, ή άλλων εξωδερματικών θέσεων
4. Επίπεδα τρυπτάσης ορού >20 ng/mL (το κριτήριο αυτό καθίσταται άκυρο εάν ενυπάρχει συνοδή κλωνική διαταραχή του μυελού)

Για τη διάγνωση της συστηματικής μαστοκυττάρωσης απαιτείται το μοναδικό μείζον κριτήριο μαζί με τουλάχιστον ένα από τα ελάσσονα κριτήρια, ή τουλάχιστον τρία από τα τέσσερα ελάσσονα κριτήρια

Πίνακας 7. Κριτήρια διάγνωσης ΣΜ (Π.Ο.Υ. 2016) (τροποποίηση από Arber et al. 2016, Pardanani 2016).

1.2.3 Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα / Μυελοϋπερπλαστικά Νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ)

1.2.3.1 Άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΜΛ)

Η άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΜΛ) μοιράζεται πολλά κοινά κλινικά χαρακτηριστικά, αλλά και εργαστηριακά ευρήματα με τη ΧΜΛ. Η απουσία χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια στην αΧΜΛ, το οποίο ανιχνεύεται σχεδόν αποκλειστικά στη ΧΜΛ, βοηθά στη διάκριση μεταξύ των δύο νεοπλασιών.

Παράλληλα, το κυρίαρχο χαρακτηριστικό που διαχωρίζει την αΧΜΛ από τα υπόλοιπα νοσήματα, είναι η δυσπλασία των κοκκιοκυττάρων, τα οποία εμφανίζουν μη φυσιολογική κατάτμηση των πυρήνων τους. Τα δυσπλαστικά κύτταρα ανιχνεύονται τόσο στο μυελό των οστών, όσο και στο περιφερικό αίμα.

Επιπροσθέτως, στην αΧΜΛ παρατηρείται οργανομεγαλία και ιδιαίτερα έντονη λευκοκυττάρωση, καταστάσεις που απουσιάζουν ή εμφανίζονται πιο ήπιες στα αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ (Talati and Padron 2016).

Ένα ποσοστό περίπου 25% των ασθενών με αΧΜΛ, χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *SETBP1*, μόνες τους ή σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις συχνά στα γονδία *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *DNMT3A* ή/και *TET2*.

Οι ασθενείς με αΧΜΛ και μεταλλάξεις *SETBP1* εμφανίζουν αυξημένη λευκοκυττάρωση και χειρότερη πρόγνωση, συγκριτικά με αντίστοιχους ασθενείς, χωρίς τις εν λόγω μεταλλάξεις.

Οι μεταλλάξεις *SETBP1*, ανιχνεύονται επιπλέον στα υπόλοιπα ΜΔΣ/ΜΥΝ, σε ασθενείς με ΟΜΛ, αλλά και στη ΧΟΛ, όπου πιθανώς αποτελούν δευτερεύον γεγονός (Piazza et al. 2013, Makishima et al. 2013, Clara et al. 2016, Makishima 2017).

1.2.3.2 Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ)

Η ΧΜΜΛ είναι το συχνότερο από τα ΜΔΣ/ΜΥΝ. Αφορά κυρίως σε μεγαλύτερες ηλικίες, ενώ έχει κυμαινόμενη πρόγνωση, συνήθως δε κακή, με μέση επιβίωση ασθενών τους 20-30 μήνες. Περίπου το 15-25% των περιστατικών ΧΜΜΛ εξελίσσεται προς ΟΜΛ, η οποία είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αντιμετωπιστεί.

Η νόσος διακρίνεται κυρίως από την επίμονη ανίχνευση μονοκύτταρων, σε ποσοστό $\geq 10\%$, επί του συνόλου των λευκοκυττάρων, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από τρεις μήνες, χαρακτηριστικό που συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση από άλλα

νεοπλάσματα, όπως η αΧΜΛ και τα αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ. Επιπλέον, η μορφολογία των μονοκυττάρων είναι ανώμαλη, με ιδιόμορφους πυρήνες και κυτταροπλασματικά κοκκία.

Άλλες αιτίες αντιδραστικής μονοκυττάρωσης, που δεν πρέπει να συγχέονται με το κλωνικό νόσημα ΧΜΜΛ, συμπεριλαμβάνουν ιογενείς λοιμώξεις (φυματίωση, βρουκέλλωση, λεισμανίαση) και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η ενδοκαρδίτιδα βακτηριακής προέλευσης, η σαρκοείδωση, καθώς και οι διαταραχές του συνδετικού ιστού. Η απουσία άωρων κυττάρων στο επίχρισμα αίματος, καθώς και η αντιδραστική αύξηση των λεμφοκυττάρων, βοηθούν στη διάγνωση αυτών των καταστάσεων και στον αποκλεισμό κλωνικής νόσου.

Παράλληλα με την εμφάνιση μονοκυττάρωσης, οι ασθενείς με ΧΜΜΛ, παρουσιάζουν έντονη αύξηση του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα, η οποία έρχεται σε αντίθεση με την αναιμία και τη θρομβοπενία που συνυπάρχουν.

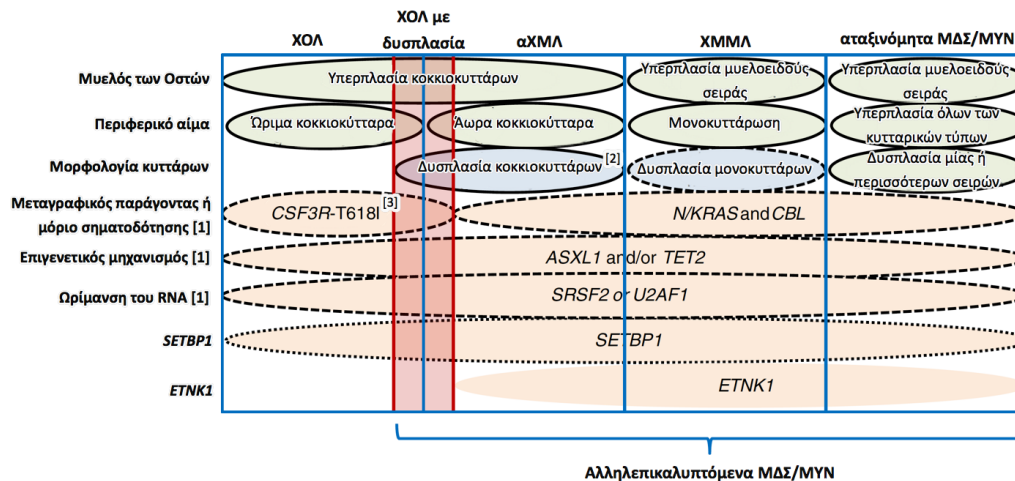
Επιπροσθέτως, η ΧΜΜΛ ταξινομείται σε τρεις υποκατηγορίες, βάσει του αριθμού των βλαστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα (ΠΑ) και στο μυελό των οστών (ΜΟ), όπως φαίνεται στον Πίνακα που ακολουθεί (Mughal et al. 2015, Clara et al. 2016, Patnaik and Tefferi 2016, Itzykson et al. 2017, Onida 2017).

Υποκατηγορία ΧΜΜΛ	Ποσοστό βλαστών ΠΑ	Ποσοστό βλαστών ΜΟ
ΧΜΜΛ-0	<2%	<5%
ΧΜΜΛ-1	2-4%	5-9%
ΧΜΜΛ-2	5-19%	10-19%

Πίνακας 8. Ταξινόμηση της ΧΜΜΛ (Itzykson et al. 2017, Onida 2017).

Το μοριακό προφίλ της μυελικής αυτής κακοήθειας υποδηλώνει έμμεσα ότι αποτελεί νόσο που εκδηλώνεται σε ομάδες μεγαλύτερης ηλικίας, η οποία εκδηλώνεται λόγω της φυσιολογικής γήρανσης των αιμοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων. Ωστόσο, η γενετική υπογραφή της ΧΜΜΛ δεν είναι πάντοτε η ίδια και διαφέρει στις περιπτώσεις *de novo* εκδήλωσης, συγκριτικά με καταστάσεις εξέλιξης από ΜΔΣ ή ΜΙ. Η ΧΜΜΛ συνοδεύεται από ανωμαλίες σε διάφορα γονίδια, όπως εκείνα που συμμετέχουν στην επιγενετική ρύθμιση του DNA (*TET2* 36-60%), στην ωρίμανση του RNA (*SRSF2* 29-53%), στην τροποποίηση των ιστονών (*ASXL1* 27-52%), στη σηματοδότηση από κυτταροκίνες (στοιχεία σηματοδοτικού μονοπατιού *RAS* 14-26%), και στη σύνθεση μεταγραφικών παραγόντων (*RUNX1* 15-37%).

Οι μεταλλάξεις *TET2* και *SRSF2* ανιχνεύονται αρκετά συχνά, ταυτόχρονα, σε ασθενείς με ΧΜΜΛ. Παράλληλα, συχνές μεταλλάξεις στα γονίδια *ASXL1*, *SRSF2*, *RUNX1* και *SETBP1* (4-15%), επιβαρύνουν την πρόγνωση (Clara et al. 2016, Reinig et al. 2016, Alfonso et al. 2017, Itzykson et al. 2017, Patnaik et al. 2018).



Εικόνα 1. Χαρακτηριστικά των ΧΟΛ και ΜΔΣ/ΜΥΝ. Η κατηγορία των *ETNK1* θετικών (χωρίς περίγραμμα) και *SETBP1* θετικών (ανοικτόχρωμο διακεκομένο περίγραμμα) περιστατικών, αφορούν <10% και περίπου 20-40% των περιπτώσεων ΜΔΣ/ΜΥΝ, αντίστοιχα. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων ή μορίων σηματοδότησης, καθώς και σε γονίδια του επιγενετικού μηχανισμού ή της ωρίμανσης του RNA (σκουρόχρωμο διακεκομένο περίγραμμα), αφορούν >50% των ΜΔΣ/ΜΥΝ. Κριτήριο διαφοροδιάγνωσης μεταξύ των ΧΟΛ και αΧΜΛ, που μέχρι πρόσφατα ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να διακριθούν, αποτελούν οι μεταλλάξεις *CSF3R*, οι οποίες εμφανίζονται αποκλειστικά στην πρώτη περίπτωση. [1] Λιγότερο συχνές μεταλλάξεις, εμφανίζονται επιπροσθέτως σε γονίδια που μετέχουν στις κυτταρικές διεργασίες που περιγράφονται στην εικόνα. [2] Η δυσπλασία των μονοκυττάρων, ενδέχεται να συνοδεύεται από δυσπλασία της ερυθράς και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς. [3] Άλλες μεταλλάξεις, πέραν της *T618I*, στο γονίδιο *CSF3R*, επίσης εμφανίζονται στην ΧΟΛ (Gambacorti-Passerini et al. 2015, Kosmider 2015, τροποποίηση από Dao et al. 2017).

1.2.3.3 ΜΔΣ/ΜΥΝ με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ)

Οι δακτυλιωτοί σιδηροβλάστες (ΔΣ) αποτελούν παθολογικές μορφές των ερυθροβλαστών, οι οποίες παρουσιάζουν μη φυσιολογική συσσώρευση σιδήρου, στα περιφερητικά μιτοχόνδρια, δίνοντας την εντύπωση δακτυλίου γύρω από τον πυρήνα. Το χαρακτηριστικό αυτό διαπιστώνεται σε κλωνικές και όχι μόνο διαταραχές, όπως οι διάφοροι τύποι μη κλωνικής σιδηροβλαστικής αναιμίας, η ανθεκτική αναιμία με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες, η οποία κατατάσσεται στα ΜΔΣ και η ανθεκτική αναιμία με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και θρομβοκυττάρωση, που αποτελεί ΜΔΣ/ΜΥΝ. Οι δύο τελευταίες αποτελούν νοσήματα μεγαλύτερης ηλικίας, με μέσο όρο εμφάνισης τα 71-75 έτη.

Τα ΜΔΣ-ΔΣ χαρακτηρίζονται από δυσπλασία μίας ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, <5% μυελοβλάστες, δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες στο ΜΟ και κανονικά αιμοπετάλια.

Τα ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ εμφανίζουν ομοιότητες, με τα ΜΔΣ-ΔΣ με δυσπλασία μίας κυτταρικής σειράς, με τη διαφορά ότι οι ασθενείς εμφανίζουν, επιπροσθέτως, αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων ($\geq 450 \times 10^9/L$) στο αιμοδιάγραμμα.

Οι ασθενείς αυτών των κατηγοριών εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* ($\geq 80-90\%$). Επιπλέον, οι περιπτώσεις ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ χαρακτηρίζονται από

επιπρόσθετες μεταλλάξεις (*JAK2V617F* 50%, *ASXL1* 20%, *DNMT3A* 15%, *SETBP1* 10% και *TET2* 25%).

Οι μεταλλάξεις *SF3B1* αποτελούν εύρημα καλής πρόγνωσης αδιευκρίνιστης σημασίας. Ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών με ή χωρίς αυτές είναι τα 6.9 και 3.3 χρόνια, αντίστοιχα.

Οι επιπρόσθετες μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στα ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ, όχι μόνο διαμορφώνουν τον τελικό φαινότυπό τους, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση των ασθενών (μεταλλάξεις *ASXL1*, *SRSF2* και *SETBP1*) (Clara et al. 2016, Talati and Padron 2016, Patnaik and Tefferi 2017, Yoshimi and Abdel-Wahab 2017).

1.3 Μοριακές βλάβες στα ΜΥΝ

Σε μία γενική συνοπτική θεώρηση, η παθογένεια του καρκίνου οφείλεται στη δημιουργία και επικράτηση κλωνικών κυτταρικών πληθυσμών που ξεφεύγουν από τους μηχανισμούς ελέγχου του φυσιολογικού τους πολλαπλασιασμού, μέσω απόκτησης μεταλλάξεων που οδηγούν σε διαφορετικά γονιδιακά μετάγραφα, τα οποία μετατρέπουν τη λειτουργία αυτή σε αυτόνομη και ανεξέλεγκτη.

Τα εναλλακτικά αυτά μετάγραφα, που υπό περιπτώσεις ευθύνονται για την παθογένεια των επι μέρους νοσημάτων, συντίθενται κυρίως μέσω δύο ευρέων κατηγοριών βιολογικών φαινομένων:

α) Η πρώτη κατηγορία αφορά σε μεταλλάξεις μεγάλης κλίμακας, όπου παρατηρούνται είτε διαγραφές/προσθήκες ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή εκτεταμένων τμημάτων αυτών, είτε αναδιατάξεις χρωμοσωμικού υλικού, κυρίως προς σχηματισμό υβριδικών γονιδίων. Στη δεύτερη περίπτωση, συχνά, παρατηρείται η γεινίαση και αλληλεπίδραση ισχυρών υποκινητών, με γονίδια που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως στην περίπτωση της ΧΜΛ που εκδηλώνεται λόγω δόμησης του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL*, εξαιτίας της χρωμοσωμικής αναδιάταξης t(9;22)(q34;q11).

β) Η δεύτερη κατηγορία αφορά σε μεταλλάξεις μικρής κλίμακας, όπου περιλαμβάνονται είτε σημειακές αντικαταστάσεις μοναδικών βάσεων, όπως εκείνες στα γονίδια *JAK2* και *MPL*, είτε διαγραφές/προσθήκες λίγων νουκλεοτιδίων, όπως οι μεταλλάξεις *CALR*.

Ωστόσο, σε μία προσπάθεια βαθύτερης κατανόησης της δράσης των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στους ασθενείς με ΜΥΝ, αυτές μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω, με βάση της συνεισφορά τους στη βαρύτητα της νόσου, σε δύο ανεξάρτητες των προηγούμενων κατηγορίες:

α) Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί και είναι πλέον γνωστό πως ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την εμφάνιση του παθολογικού φαινότυπου. Οι μεταλλάξεις αυτές χαρακτηρίζονται ως κύριες ή φαινοτυπικές (driver mutations), εντοπίζονται στα γονίδια *JAK2*, *MPL* και *CALR*, ενώ ανάμεσά τους συμπεριλαμβάνονται και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, όπως το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια στη ΧΜΛ.

β) Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις σε επιπρόσθετα γονίδια, που διαμορφώνουν και τροποποιούν τον φαινότυπο των ΜΥΝ. Οι μεταλλάξεις αυτές χαρακτηρίζονται ως δευτερεύουσες ή συνοδές μεταλλάξεις (passenger

mutations) και ενδεχομένως οδηγούν σε εξέλιξη της νόσου και σε εκτροπή προς Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ).

Συγκεκριμένα, τα τελευταία μόλις χρόνια, η δυνατότητα λεπτομερέστερης ανάλυσης του γονιδιώματος, έδειξε ότι σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις, μερικά γονίδια εμφανίζουν συχνότερα μεταλλάξεις, σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες.

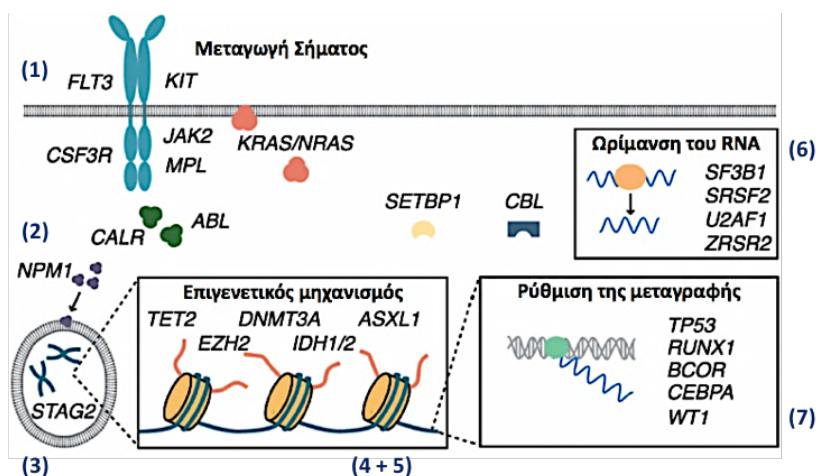
Οι μεταλλάξεις αυτές δεν έχουν άμεση σχέση με την παθογένεια των νοσημάτων, στα οποία διαπιστώνονται, προφανώς όμως συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη αυτών, αφού κατά κανόνα είναι συχνότερες στα νοσήματα με βαρύτερη πρόγνωση. Άλλωστε η παρουσία ορισμένων εξ αυτών, διαπιστώνεται ακόμη και σε άτομα χωρίς ενδείξεις νόσου, μάλιστα, με συχνότητα που αυξάνεται με την ηλικία.

Τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, για το είδος των μεταλλάξεων και κατ' επέκταση τη σημασία των μεταβολών που αυτές επιφέρουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο, είναι περιορισμένα.

Ωστόσο, η μελέτη τους αποτελεί επίκεντρο ερευνητικού ενδιαφέροντος και βρίσκει ήδη εφαρμογή στην κλινική πράξη ως προγνωστική παράμετρος διαφόρων νοσημάτων του αίματος, μεταξύ των οποίων και τα MYN.

Τα γονίδια στα οποία παρατηρούνται συνοδές μεταλλάξεις είναι πολλά και άσχετα μεταξύ τους, ενώ για λόγους απλούστευσης, μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με την κυτταρική λειτουργία στην οποία μετέχουν, όπως φαίνεται και στη γραφική αναπαράσταση που ακολουθεί. Έτσι διακρίνουμε τις εξείς κατηγορίες:

- 1) Ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος (*JAK2*, *MPL*, *CSF3R*, *KIT*, *RAS*, *FLT3* κ.α.)
- 2) Γονίδια με περισσότερες από μία λειτουργίες (*CALR*, *SETBP1*, *NPM1* κ.α.)
- 3) Πολλαπλασιασμός (*STAG2* κ.α.)
- 4) Επιγενετική ρύθμιση λειτουργίας του κυττάρου (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* κ.α.)
- 5) Τροποποίηση της χρωματίνης (*ASXL1*, *EZH2* κ.α.)
- 6) Ωρίμανση του πρόδρομου RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2* κ.α.)
- 7) Μεταγραφή (*TP53*, *RUNX1*, *BCOR*, *CEBPA*, *WT1* κ.α.)
- 8) Αποικοδόμηση των πρωτεϊνών
- 9) Απόπτωση του κυττάρου (Harada and Harada 2015).



Εικόνα 2. Οι κυτταρικές λειτουργίες σημαντικών γονιδίων της αιμοποίησης. Πληθώρα σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών επηρεάζονται από συχνά εμφανιζόμενες, αλλά και πιο σπάνιες μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια (Tremblay et al. 2018).

1.3.1 Μεταλλάξεις μεγάλης κλίμακας - Χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις

1.3.1.1 Το χιμαιρικό γονίδιο *BCR-ABL*

Σε γενετικό επίπεδο η ΧΜΛ χαρακτηρίζεται από τη χρωμοσωμική αμοιβαία μετάθεση t(9;22)(q34;q11), η οποία οδηγεί σε ανασυνδυασμό του γονιδίου *c-ABL* με το γονίδιο *BCR*, προς σχηματισμό ενός νέου υβριδικού γονιδίου, γνωστό ως *BCR-ABL* (Rowley 1973). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γονίδιο *c-ABL*, ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 9 και κωδικοποιεί σε μία πρωτεΐνη με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Αντίστοιχα, το γονίδιο *BCR*, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22.

Σε επίπεδο πρωτεΐνης, η αντιμετάθεση αυτή, οδηγεί στη σύνθεση ενός χιμαιρικού πρωτεϊνικού προϊόντος με ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης (Kantarjian 2000).

Τα σημεία θραύσης ποικίλουν με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφορετικών μεταγράφων που οδηγούν σε διαφορετικό κλινικό φαινότυπο. Πιο συχνά, σε τυπικές περιπτώσεις ΧΜΛ, απαντώνται τα μετάγραφα b2a2 και b3a2, που κωδικοποιούν στην πρωτεΐνη p210^{BCR/ABL}, ενώ σε πιο σπάνιες καταστάσεις, όπου παρατηρείται αυξημένος πολλαπλασιασμός των μονοκυττάρων ή των κοκκιοκυττάρων, ανιχνεύονται άλλα χιμαιρικά μετάγραφα, όπως τα e1a2 και e19a2. Συγκεκριμένα το μετάγραφο e1a2 (p190^{BCR/ABL}), ανιχνεύεται επιπροσθέτως στη *de novo* οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Β προγονικών κυττάρων (Bose et al. 1998).

1.3.2 Μεταλλάξεις μικρής κλίμακας - Σημειακές αντικαταστάσεις βάσεων και μεταλλάξεις προσθήκης/διαγραφής νουκλεοτιδίων

1.3.2.1 Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμβάλλουν στη μεταγωγή σήματος

1.3.2.1.1 Το γονίδιο *JAK2*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *JAK2* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9p24.1 και απαρτίζεται από 26 εξόνια.

β. Η πρωτεΐνη

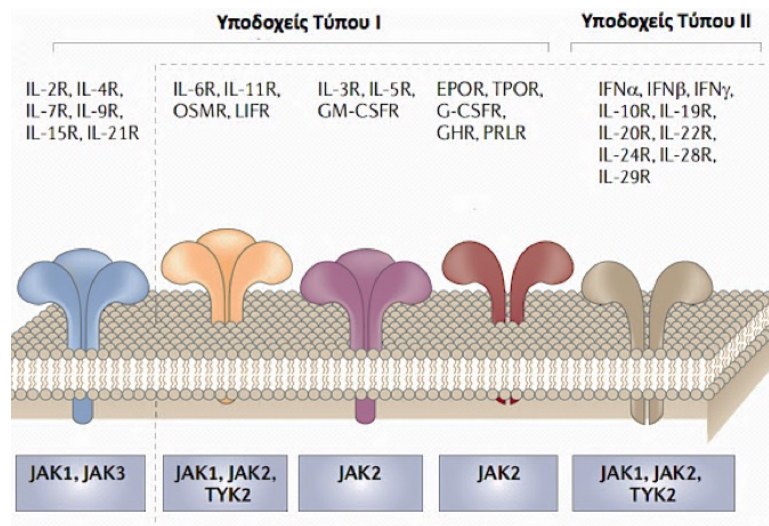
Το γονίδιο *JAK2* (Janus Kinase 2) κωδικοποιεί για την ομώνυμη πρωτεΐνη, με δράση κινάσης τυροσίνης, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων.

Η πρωτεΐνη αυτή ανιχνεύεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα υποδοχέων κυτταροκινών τύπου I και II (όπως υποδοχείς της ερυθροποιητίνης, της θρομβοποιητίνης κ.α.), οι οποίοι εδράζουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ωστόσο δεν έχουν εγγενή δράση κινάσης, επομένως, αδυνατούν να μεταβιβάσουν τη σήμανση ενεργοποίησης εντός του κυττάρου.

Η σύνδεση της κατάλληλης κυτταροκίνης στο εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, οδηγεί σε διμερισμό και ενεργοποίησή του μέσω φωσφορυλίωσης. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται η κινάση *JAK2*, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την

ενεργοποίηση πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών, εντός του κυττάρου, μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων.

Η οικογένεια πρωτεϊνών JAK, απαρτίζεται από τέσσερα μέλη και συγκεκριμένα τα JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2 (non-receptor tyrosine protein kinase 2).



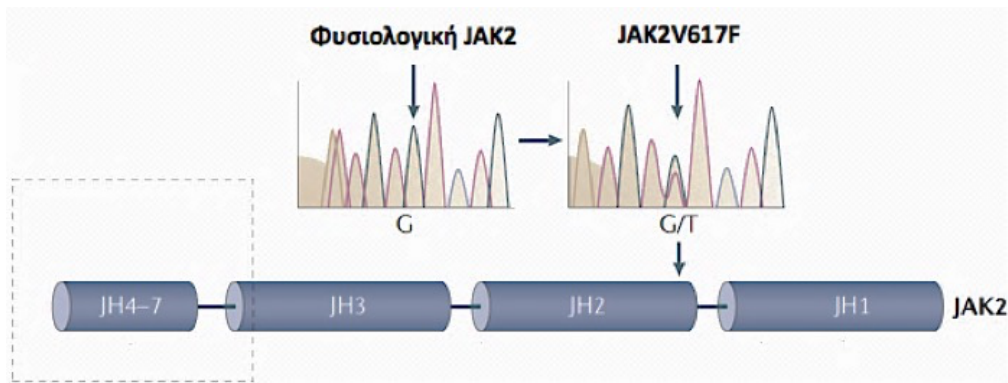
Εικόνα 3. Υποδοχείς χωρίς εγγενή δράση κινάσης, όπου ανιχνεύονται προσδεσμένα τα μέλη της οικογένειας κινασών JAK. Συντμήσεις: EPOR: υποδοχέας της ερυθροποιητίνης, GHR: υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης, G-CSFR: υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης των κοκκιοκυττάρων, GM-CSFR: υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης των κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων, IL: ιντερλευκίνη, LIFR: υποδοχέας του ανασταλτικού παράγοντα της λευχαιμίας, OSMR (IL-31R β): β -υπομονάδα του υποδοχέα της ογκοστατίνης-M, PRLR: υποδοχέας της προλακτίνης, TPOR (γονίδιο MPL): υποδοχέας της θρομβοποιητίνης (Τροποποίηση από Quintás-Cardama et al. 2011).

γ. Οι μεταλλάξεις

Η επίκτητη σωματική μετάλλαξη V617F στο εξόνιο 14 του γονιδίου JAK2, χαρακτηρίστηκε το 2005 (Vardiman et al. 2001, Baxter et al. 2005, Kralovics et al. 2005, Jones et al. 2005, Levine et al. 2005).

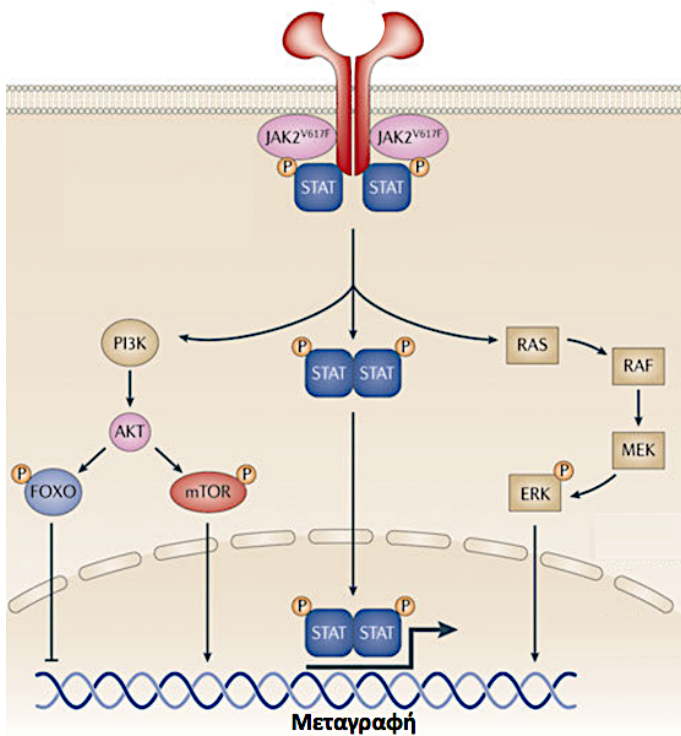
Η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος βαλίνης, από φαινυλαλανίνη στη θέση 617 (V617F) της αμινοξικής αλληλουχίας. Η θέση αυτή εντοπίζεται σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία δρα ως ψευδοκινάση (JH2).

Τα μέλη της οικογένειας JAK αριθμούν επτά ομόλογες περιοχές (JH1-JH7). Η JH2 εντοπίζεται πλησίον της καταλυτικής περιοχής με ρόλο κινάσης τυροσίνης (JH1) και υπο φυσιολογικές συνθήκες αλληλεπιδρά μαζί της άμεσα, λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής της πρωτεϊνικής λειτουργίας (Quintás-Cardama et al. 2011).



Εικόνα 4. Οι επιμέρους περιοχές της πρωτεΐνης JAK2, όπως και η μετάλλαξη JAK2V617F και η θέση όπου αυτή εντοπίζεται επί του πρωτεϊνικού προϊόντος (Τροποποίηση από Quintás-Cardama et al. 2011).

Η αμινοξική αλλαγή V617F έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ανασταλτικής λειτουργίας της περιοχής JH2. Ως συνέπεια, ενεργοποιούνται αδιάκοπα, μέσω αυτοφωσφορυλίωσης και διαδοχικών ετεροφωσφορυλίωσεων, υποκείμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπου εμπλέκονται μεταγραφικοί παράγοντες και άλλες κινάσες (STATs, RAS/ERK(MAPK) και PI3K/AKT), οδηγώντας εν τέλει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων.



Εικόνα 5. Η σηματοδότηση JAK2V617F. Διαρκώς ενεργοποιημένα σηματοδοτικά μονοπάτια λόγω απρόσκοπτης δράσης κινάσης που επιδεικνύει το μεταλλαγμένο πρωτεϊνικό προϊόν JAK2V617F, απουσία εξωκυτταρικού ερεθίσματος (Τροποποίηση από Quintás-Cardama et al. 2011).

Η μετάλλαξη JAK2V617F ανευρίσκεται στο 95% τουλάχιστον των περιπτώσεων ΑΠ και στο 50-60% των περιπτώσεων ΙΘ και ΠΜΙ (Jones et al. 2005, Zhao et al. 2005) και σε

ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, όπως αΧΜΛ (4-8%), ΧΜΜΛ (10%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (60%) (Jones et al. 2005, Zoi and Cross 2015).

Επιπρόσθετες μεταλλάξεις παρατηρούνται αποκλειστικά σε ασθενείς με ΑΠ, στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2*, σε σαφώς χαμηλότερα ποσοστά (1-2%). Τόσο η V617F, όσο και οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2*, είναι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (gain-of-function mutations, GOF) (Scott et al. 2007).

1.3.2.1.2 Το γονίδιο *MPL*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *MPL* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 1p34.2 και απαρτίζεται από 11 εξόνια. Το ανθρώπινο γονίδιο *c-MPL* αναγνωρίστηκε το 1992 και φέρει ομολογία με το ογκογονίδιο *v-mpl*, που ανιχνεύθηκε το 1990, σε στελέχη ιού που προκαλεί λευχαιμογένεση στα τρωκτικά (murine myeloproliferative leukemia virus, MMLV). Ο ιός αυτός έχει βρεθεί πως ευθύνεται για την αθανатоποίηση διαφόρων σειρών αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών.

Δεδομένα προσδιορισμού αλληλουχίας αποκάλυψαν πως το γονίδιο *c-MPL* κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη, η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων των αιμοποιητικών κυττάρων.

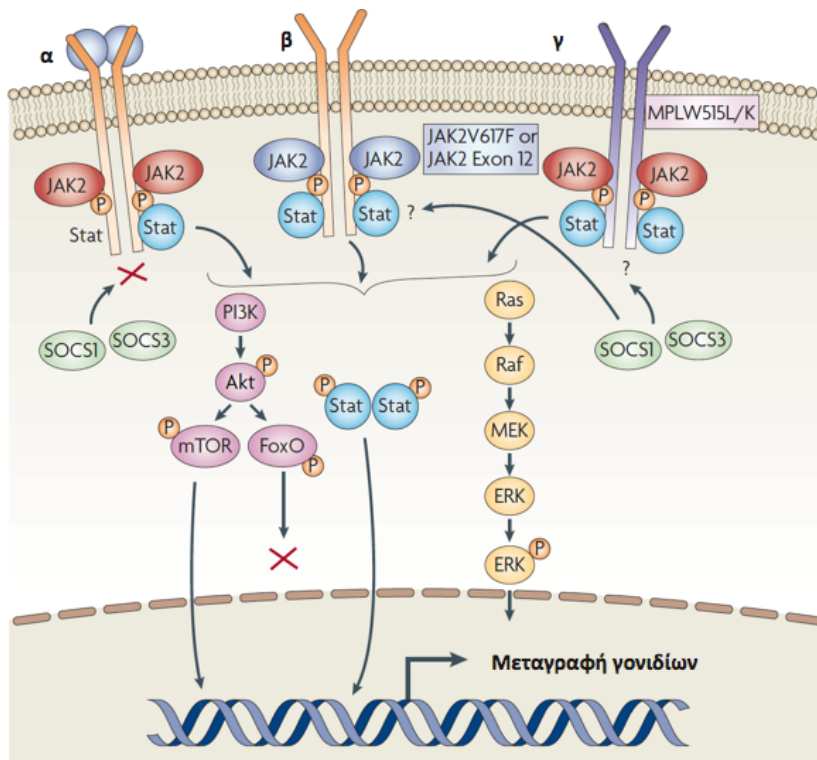
β. Η πρωτεΐνη

Το πρωτο-ογκογονίδιο *MPL* (*c-MPL*) (myeloproliferative leukemia virus), κωδικοποιεί για τον κυτταρικό υποδοχέα της θρομβοποιητίνης (TPOR), ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση.

Η πρόσδεση θρομβοποιητίνης (TPO) στον υποδοχέα της, επιφέρει το διμερισμό αυτού. Ακολουθεί ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης *JAK2*, η οποία εντοπίζεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Έτσι, μέσω διαδοχικών φωσφορυλιώσεων, δραστηριοποιούνται σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως περιγράφηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο (He et al. 2013).

γ. Οι μεταλλάξεις

Η αντικατάσταση του αμινοξέος τρυπτοφάνη (W), από ένα μόριο λευκίνης (L) ή λυσίνης (K), στη θέση 515 (W515L/K) της διαμεμβρανική περιοχής του υποδοχέα TPOR, οδηγεί σε απρόσκοπτη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών *JAK/STAT*, *PI3K/AKT/mTOR*, *RAS/MAPK*, δίχως να είναι απαραίτητη η πρόσδεση TPO στον υποδοχέα, με συνέπεια την ανεξέλεγκτη, μη φυσιολογική, αύξηση των μεγακαρυοκυττάρων.



Εικόνα 6. Φυσιολογική και μη φυσιολογική ενδοκυτταρική σηματοδότηση. α. Φυσιολογική ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων κυτταροκινών. Οι παράγοντες SOCS μειορρυθμίζουν την ενεργότητα της JAK2, όταν αυτή επιτελέσει το έργο της β. Η μεταλλαγμένη JAK2 ενεργοποιείται αυτόνομα, χωρίς να είναι απαραίτητη η πρόσδεση εξωτερικών σηματοδοτικών παραγόντων, στους υποδοχείς όπου εδράζει η κινάση γ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο MPL, επίσης, οδηγούν σε έκφραση τροποποιημένων υποδοχέων θρομβοποιητίνης, ικανών να ενεργοποιήσουν απρόσκοπτα, φυσιολογικά σε αυτή την περίπτωση, μόρια JAK2, απουσία θρομβοποιητίνης (Τροποποίηση από Levine et al. 2007).

Οι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (GOF) στο γονίδιο *MPL*, ανιχνεύονται συχνά σε ασθενείς με MYN οι οποίοι ελέγχονται αρνητικοί για άλλες κύριες μεταλλάξεις. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύονται σε ποσοστό 5% και 8% των ασθενών με ΙΘ και ΠΜΙ, αντίστοιχα, καθώς και σε ποσοστό περίπου 5% ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (He et al. 2013, Zoi and Cross 2015).

1.3.2.1.3 Το γονίδιο *CSF3R*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *CSF3R* εδράζει στο χρωμοσωμική περιοχή 1p34.3 και απαρτίζεται από 19 εξόνια (Maxson et al. 2013).

β. Η πρωτεΐνη

Το γονίδιο *CSF3R* κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης των κοκκιοκυττάρων (G-CSF3R, granulocyte colony-stimulating factor 3 receptor), ο οποίος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των ουδετερόφιλων.

Υπο φυσιολογικές συνθήκες, η δέσμευση της αυξητικής ορμόνης G-CSF, που αποτελεί προσδέτη του υποδοχέα G-CSF3R, οδηγεί σε ενεργοποίηση πληθώρας οδών μεταγωγής σήματος, όπου εμπλέκονται διάφορες κινάσες, όπως η JAK2, η SYK, καθώς και μέλη της οικογένειας SRC (Εικόνα 7α) (Maxson et al. 2013).

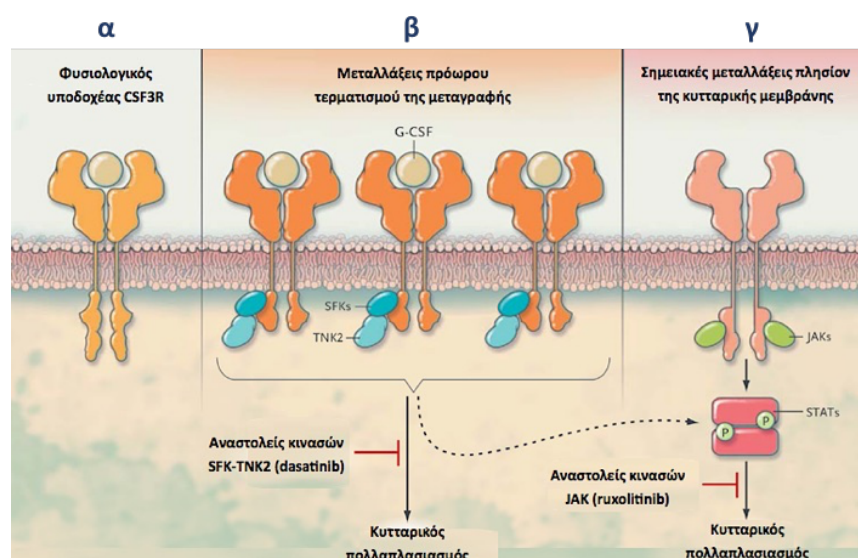
γ. Οι μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (GOF) που ανιχνεύονται στο γονίδιο *CSF3R*, ανήκουν σε δύο βασικές κατηγορίες.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν μεταλλάξεις δίχως νόημα (nonsense mutations) (Y752X, W791X) και μεταλλάξεις μετατόπισης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations) (D771fs, S783fs), οι οποίες όλες οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής. Ώς αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό προϊόν, το οποίο εμφανίζει σαφώς μικρότερο μέγεθος, έχει απωλέσει τμήμα του κυτταροπλασματικού άκρου της πρωτεΐνης. Έτσι, ο υποδοχέας παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα ενδοκυττάρωσης, ενώ παράλληλα τροποποιείται η δυνατότητα του να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι SHP-1/2, καθώς και με μέλη της οικογένειας SOCS. Στην περίπτωση αυτή, φαίνεται να επηρεάζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι SRC (SFK)-TNK2 (Εικόνα β).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν σημειακές μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations), με συχνότερη την T618I, οι οποίες εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό άκρο της πρωτεΐνης, πλησίον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι μεταλλάξεις αυτές ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK2-STAT (Εικόνα γ).

Οι μεταλλάξεις της δεύτερης κατηγορίας, φαίνεται να δρουν ανεξάρτητα και μπορούν ως μεμονωμένα συμβάντα να διαταράξουν την ικανότητα του υποδοχέα να ρυθμίζει ορθά τη διαφοροποίηση των κυττάρων της κοκκιδώδους σειράς, οδηγώντας σε αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα, χωρίς να απαιτείται πρόσδεση G-CSF. Αντίθετα, η επίδραση της πρώτης κατηγορίας μεταλλάξεων μάλλον είναι ανεπαρκής, ενώ απαιτούνται παράλληλα, επιπρόσθετα μοριακά συμβάματα για να επέλθει το ίδιο αποτέλεσμα (Maxson et al. 2013, Pardanani et al. 2013, Zoi and Cross 2015, Maxson JE and Tyner 2017, Zhang et al. 2017).



Εικόνα 7. Ο υποδοχέας *CSF3R*. Αριστερά: Φυσιολογικός υποδοχέας *CSF3R*. Κεντρικά: Οι ασθενείς με μεταλλάξεις πρόωρου τερματισμού της μεταγραφής παρουσιάζουν

ευασιθησία στη θεραπεία με αναστολείς των κινασών SRC (SFK)-TNK2, όπως το *dasatinib*. Δεξιά: Οι ασθενείς που ελέγχονται θετικοί για σημειακές μεταλλάξεις με λάθος νόημα, όπως η T618I και άλλες, αποκρίνονται επαρκώς σε θεραπεία με αναστολείς κινασών JAK, όπως το *ruxolitinib*. (Maxson et al. 2013).

Οι μεταλλάξεις *CSF3R*, φαίνεται να εμφανίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς με ΧΟΛ (80-90%). Επομένως, η ανίχνευση αυτών αποτελεί ένα πολύτιμο κριτήριο διαφοροδιάγνωσης, αφού πολλές φορές η διάκριση μεταξύ ΧΟΛ, αΧΜΛ και ΧΜΜΛ είναι ιδιαίτερα δύσκολη, δεδομένου ότι τα τρία αυτά νοσήματα μοιράζονται παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως ο αυξημένος αριθμός ουδετερόφιλων και η παρουσία βλαστών (Maxson et al. 2013, Wang et al. 2014, Dao et al. 2017).

Κοινές μεταλλάξεις, σε άλλα γονίδια, όπως στα *SETBP1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ASXL1* και *TET2*, ανιχνεύονται και στις τρεις προαναφερθείσες καταστάσεις. Μάλιστα, οι μεταλλάξεις *AXSL1*, καθώς και οι *SETBP1* σε συνδυασμό με εκείνες στο γονίδιο *CSF3R*, παρατηρούνται σε ποσοστό περίπου 45-57% και 14-35% των ασθενών με ΧΟΛ, αντίστοιχα, ενώ φαίνεται να σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση νόσου, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις *CSF3R* οι οποίες μεμονωμένα δε φαίνεται να επηρεάζουν τα προγνωστικά δεδομένα (Dao KH and Tyner 2015, Elliott and Tefferi 2016, Maxson JE and Tyner 2017, Szuber et al 2018).

1.3.2.1.4 Το γονίδιο *KIT*

α. Το γονίδιο

Το ανθρώπινο κυτταρικό πρωτο-ογκογονίδιο *KIT* (*c-KIT*), φέρει ομολογία και προφανώς αποτελεί εξελικτικό κατάλοιπο του ομώνυμου ογκογονιδίου (*v-KIT*) μίας συγκεκριμένης κατηγορίας ρετροϊών, που έχει βρεθεί πως επιμολύνουν οριζόντια τα αιλουροειδή, επάγοντας τη λευχαιμογένεση σε αυτά (*feline leukemia viruses, FeLV*) (Besmer et al. 1986, d'Auriol et al. 1988).

Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4q11 και απαρτίζεται από 21 εξόνια. Το πρώτο από αυτά συμπεριλαμβάνει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Τα εξόνια 2-9 κωδικοποιούν το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, το εξόνιο 10 τη διαμεμβρανική περιοχή, ενώ τα 11-21 το ενδοκυτταρικό κομμάτι της πρωτεΐνης.

Μέχρι στιγμής, στον άνθρωπο έχουν παρατηρηθεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές μεταγράφων, οι οποίες προκύπτουν μέσω της διαδικασίας εναλλακτικής ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA.

β. Η πρωτεΐνη

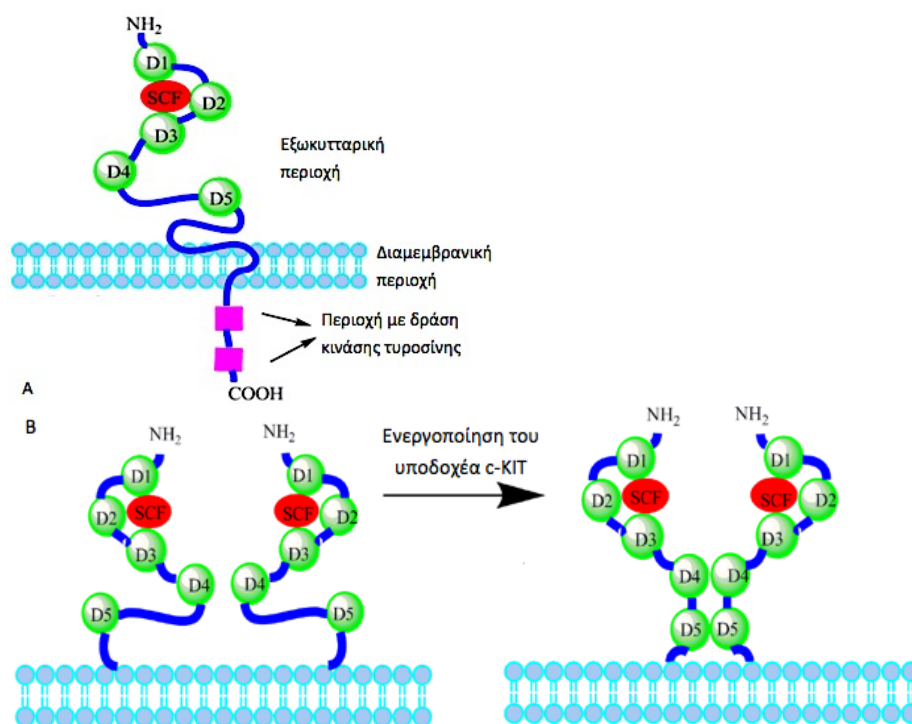
Το γονίδιο *KIT*, κωδικοποιεί σε έναν τύπου III υποδοχέα με εγγενή δράση κινάσης τυροσίνης. Ο υποδοχέας *KIT* ανιχνεύεται τόσο σε διάφορους τύπους μη αιμοποιητικών κυττάρων (γαμετικά κύτταρα, μελανοκύτταρα, κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, νευρικά κύτταρα), όσο και στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπου με τη σταδιακή ωρίμανση αυτών, η έκφρασή του μειορρυθμίζεται. Από τα ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα, μόνο τα μαστοκύτταρα, συνεχίζουν να εκφράζουν διαρκώς τον υποδοχέα σε υψηλά επίπεδα (Sun et al. 2009, Pardananani 2016).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρόσδεση του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων (SCF) στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, οδηγεί σε διμερισμό και ενεργοποίηση μέσω αυτοφωσφορυλίωσης του τελευταίου.

Ο μηχανισμός αυτός παρουσιάζεται αναλυτικά στη γραφική απεικόνιση που ακολουθεί. Η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα περιλαμβάνει 5 περιοχές (D1-D5) που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (Ig-like domains). Η ενδοκυτταρική περιοχή περιλαμβάνει την περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης, η οποία αποτελείται από δύο τμήματα που διαχωρίζονται μεταξύ τους από μία ενδιάμεση αμινοξική αλληλουχία (Εικόνα Α).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατόπιν πρόσδεσης του παράγοντα SCF, οι εξωκυτταρικές περιοχές D1-D3 του υποδοχέα διατηρούν τη στερεοδιαμόρφωσή τους, ενώ οι περιοχές D4 και D5, αλλάζουν διαμόρφωση στο χώρο, συμπλησιάζουν όμοιες τους περιοχές στο γειτνιάζον ενεργοποιημένο μόριο του υποδοχέα και συνενώνονται με αυτές. Οι εξωκυτταρικές περιοχές D4 και D5, δύο ελεύθερων μορίων του υποδοχέα c-KIT, αρχικά απωθούνται μεταξύ τους, κατά τη στιγμή της πρόσδεσης του παράγοντα SCF (Εικόνα 8B-αριστερά).

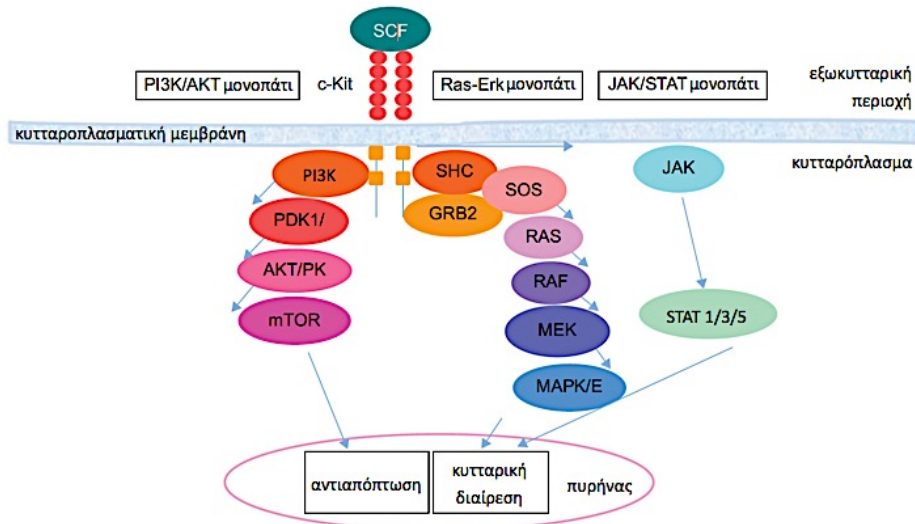
Μετά την σταθερή δέσμευση του συνδέτη, οι εξωκυτταρικές περιοχές D4 και D5, σταματούν να απωθούνται ηλεκτροστατικά, συνενώνονται και οδηγούν σε έναν πλήρως ενεργό διμερές του υποδοχέα KIT (Εικόνα 8B-δεξιά) (τροποποίηση από Liang et al. 2013).



Εικόνα 8. Η δομή του υποδοχέα KIT. Α. Γραφική απεικόνιση της πλήρους πρωτεϊνικής δομής ενός φυσιολογικού μονήρους μορίου υποδοχέα KIT. Β. Γραφική απεικόνιση των αλλαγών που συμβαίνουν στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα KIT κατά την ενεργοποίησή του, υπό φυσιολογικές συνθήκες (τροποποίηση από Liang et al. 2013).

Αυτό έχει ως συνέπεια την άμεση ενεργοποίηση της εγγενούς δράσης κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα. Με τον τρόπο αυτό δραστηριοποιεί καταρροϊκά

σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT και RAS/MAPK. Αυτά οδηγούν σε μεταγραφή γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαφοροποίηση και η μετακίνηση (Figueira et al. 2014).



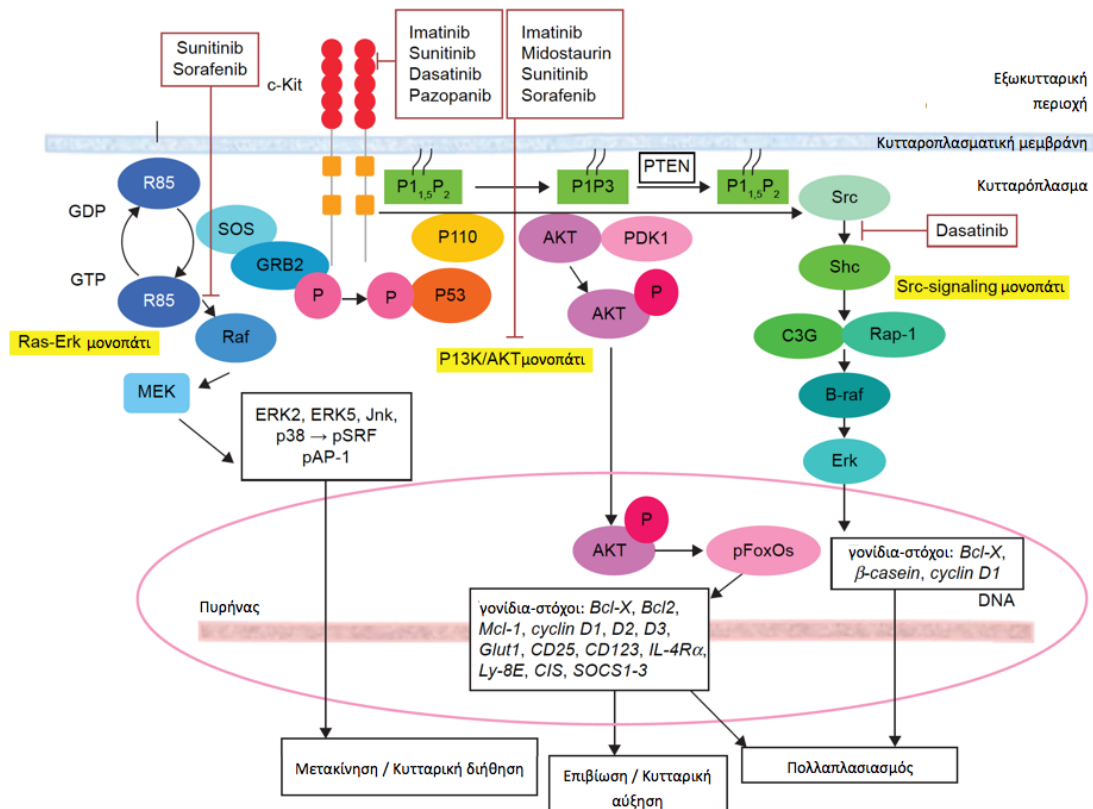
Εικόνα 9. Η δράση του ενεργοποιημένου φυσιολογικού υποδοχέα KIT (τροποποίηση από Babaei et al. 2016).

γ. Οι μεταλλάξεις

Στην πλειονότητα των ασθενών με συστηματική μαστοκυττάρωση (82-89%), ανιχνεύονται σωματικές μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (GOF), με συχνότερη την D816V, καθώς και άλλες πιο σπάνιες, όπως οι D816(H/Y), στο εξόνιο 17 του γονιδίου *KIT*. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβάλλουν στη διαρκή ενεργότητα του υποδοχέα, αφού εντοπίζονται στην περιοχή με δράση κινάσης τυροσίνης (Soucie et al. 2012, Jawhar et al. 2016).

Έτσι, έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που όλα συμβάλλουν στον ίδιο φαινότυπο, όπου περιλαμβάνονται η αναστολή της απόπτωσης και η προαγωγή της κυτταρικής αύξησης, του πολλαπλασιασμού και της μετακίνησης των κυττάρων.

Σήμερα, υπάρχουν διάφοροι θεραπευτικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι περισσότερο ή λιγότερο κατάλληλοι για την αναστολή του εκάστοτε μονοπατιού σηματοδότησης, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Babaei et al. 2016).



Εικόνα 10. Η δράση του διαρκώς ενεργοποιημένου μεταλλαγμένου υποδοχέα KIT (τροποποίηση από Babaei et al. 2016).

Οι μεταλλάξεις του υποδοχέα απαντώνται από κοινού, τόσο σε ήπιες, όσο και σε πιο επιθετικές μορφές μαστοκυττάρωσης, χωρίς να σχετίζονται με κάποια από τις δύο καταστάσεις. Ωστόσο, φαίνεται πως δεν επαρκούν για περαιτέρω εξέλιξη της νόσου, αφού έχει παρατηρηθεί πως σε τέτοιες καταστάσεις ανιχνεύονται επιπρόσθετες μεταλλάξεις (Soucie et al. 2012).

Τέτοιες μοριακές βλάβες εντοπίζονται συχνά στο γονίδιο *TET2*, σε κυμαινόμενο ποσοστό ασθενών με συστηματική μαστοκυττάρωση (15-47%), ανάλογα με τη βαρύτητα της ασθένειας και συχνά (50%), παράλληλα με τις μεταλλάξεις *KIT* D816. Οι περιπτώσεις αυτές σχετίζονται με μονοκυττάρωση και με επιθετικές μορφές της νόσου, χωρίς όμως να επηρεάζεται η συνολική επιβίωση των ασθενών (Tefferi et al. 2009, Soucie et al. 2012).

Επιπλέον μεταλλάξεις με ιδιαίτερα κακή πρόγνωση συνανιχνεύονται συχνά στα γονίδια *ASXL1* (20-29%), *SRSF2* (40-43%), *RUNX1* (8-23%), *N/KRAS* (14-16%), και *IDH2* (4-8%), σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

Επιπρόσθετες μεταλλάξεις, οι οποίες συμβάλλουν σε χαμηλότερης κακοήθειας (indolent) φαινότυπο, απαντώνται στα γονίδια *JAK2* (16%), *EZH2* (10%) και σε μικρότερο ποσοστό (<10%) σε άλλα γονίδια (*U2AF1*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *TP53*).

Ωστόσο, οι παραπάνω προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν είναι αποκλειστικές της μαστοκυττάρωσης (Jawhar et al. 2016, Jawhar et al. 2017).

1.3.2.1.5 Τα γονίδια *RAS*

α. Το γονίδιο

Η οικογένεια *RAS* (rat sarcoma) απαρτίζεται από υψηλά συντηρημένα γονίδια που ανευρίσκονται και εκφράζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το ακρωνύμιο έχει προέλευση σε πειράματα επιμόλυνσης αρουραίων (*rat*), με στελέχη ρετροϊών, που ευθύνονται για την εκδήλωση σαρκώματος (*sarcoma*) στα θηλαστικά. Οι ιοί του σαρκώματος ενοχοποιούνται ως παράγοντες μεταλλαξιγένεσης των γονιδίων *RAS*, με συνέπεια την εκδήλωση της ογκογόνου δράσης αυτών. Μάλιστα, λόγω της εμπλοκής τους στην καρκινογένεση, τα γονίδια *RAS* χαρακτηρίζονται ως πρωτο-ογκογονίδια.

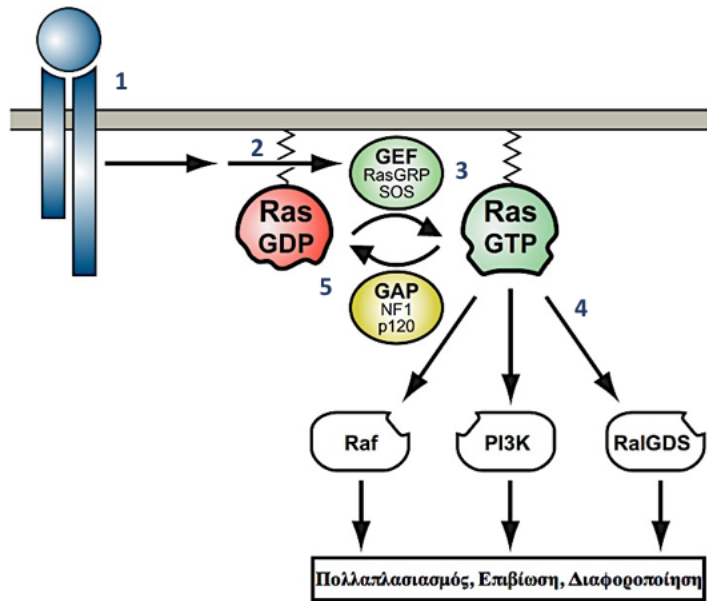
Εκτός από τα λειτουργικά γονίδια, οι υποοικογένειες *H-RAS* και *K-RAS*, συμπεριλαμβάνουν από ένα ψευδογονίδιο η κάθε μία (*c-H-RAS2* and *c-K-RAS1*), ενώ οφείλουν το όνομά τους στα στελέχη ρετροϊών αρουραίων των Harvey και Kirsten, αντίστοιχα. Το γονίδιο *N-RAS* πήρε την εν λόγω επωνυμία εξαιτίας της ανίχνευσης αυτού σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, όπου και εντοπίστηκε μεταγενέστερα, από την ερευνητική ομάδα του Robert Weiss. Με τη σειρά που αναφέρθηκαν, τα γονίδια *RAS* εδράζουν στα χρωμοσώματα 11p15.5, 12p12.1 και 1p13.2. Όλες οι τρεις προαναφερθείσες υποοικογένειες γονιδίων εκφράζονται στον άνθρωπο (Barbacid 1987, Scott et al. 2016).

β. Η πρωτεΐνη

Οι πρωτεΐνες *RAS* αποτελούν καθοριστικούς ρυθμιστές, σημαντικών κυτταρικών διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση, αφού μεσολαβούν της μετάδοσης εξωγενών ερεθισμάτων από διάφορους διαμεμβρανικούς υποδοχείς προς τον πυρήνα του κυττάρου, μέσω ενεργοποίησης πολυάριθμων πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Ουσιαστικά αποτελούν μοριακούς διακόπτες, όπου, μέσω μεταβολής της στερεοδομής των συμπλόκων που απαρτίζουν, εναλλάσσονται μεταξύ μίας ενεργούς δομής, η οποία διατηρεί δεσμευμένη μία τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate, GTP) (*Ras-GTP*) και μίας ανενεργούς δομής, όπου η GTP έχει απωλέσει ένα μόριο φωσφορικού οξέος (guanosine diphosphate, GDP) (*Ras-GDP*).

Όπως παρουσιάζεται και στη γραφική αναπαράσταση που ακολουθεί, η διαδικασία ξεκινά με τη δέσμευση ενός αυξητικού παράγοντα ή άλλου προσδέτη, από τον αντίστοιχο υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου (στάδιο 1). Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιούνται συγκεκριμένοι παράγοντες (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) (στάδιο 2) που προάγουν την ενεργό διαμόρφωση *Ras-GTP* (στάδιο 3), η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση πληθώρας καταρροϊκών σηματοδοτικών μονοπατιών (στάδιο 4). Υπο φυσιολογικές συνθήκες, η ενεργός σηματοδότηση σταματά, με την υδρόλυση του GTP προς GDP, που μεσολαβείται από την ενδογενή δράση GTPάσης της *RAS*, η οποία ενισχύεται από επιπρόσθετους παράγοντες (GTPase activating proteins, GAPs), κυρίως τους NF1 και p120 GAP (στάδιο 5) (Ward et al. 2012).



Εικόνα 11. Μοντέλο δράσης των πρωτεϊνών RAS. Συντμήσεις: GAP: GTPase activating proteins, GDP: guanosine diphosphate, GEF: guanine nucleotide exchange factors, GTP: guanosine triphosphate (τροποποίηση από Ward et al. 2012).

γ. Οι μεταλλάξεις

Οι σημειακές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται συχνότερα στο γονίδιο RAS, ευνοούν τη διατήρηση της ενεργής διαμόρφωσης GTP-RAS, μέσω μειωμένης υδρόλυσης του GTP, κυρίως λόγω ανθεκτικότητας στη δράση των GAPs.

Σε αυτή την περίπτωση, η θεραπευτική στόχευση είναι δυσχερής, αφού η μοριακή βλάβη ουσιαστικά αφορά στον ενδογενή μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης της πρωτεϊνικής δραστηριότητας και όχι σε ενισχυμένη ενεργότητα κινάσης, όπως, για παράδειγμα, συμβαίνει με τις μεταλλάξεις στα γονίδια EGFR, BRAF και BCR-ABL, η υπέρμετρη λειτουργία των οποίων καταστέλλεται με τη βοήθεια μικρομοριακών αναστολέων.

Για το λόγο αυτό, η ερευνητική κοινότητα έχει εστιάσει κυρίως στην αναστολή στοιχείων, που εντοπίζονται κατταροϊκά των σηματοδοτικών μονοπατιών Ras, όπως τα PI3K, AKT, mTOR και MEK (Ward et al. 2012, Al-Kali et al. 2013, Akutagawa et al. 2016).

Και ενώ στους συμπαγείς όγκους ανιχνεύονται κυρίως μεταλλάξεις KRAS, ιδιαίτερα δε σε περιπτώσεις καρκίνου, όπου εμπλέκονται επιθηλιακοί ιστοί, στις μυελικές διαταραχές παρατηρούνται συχνότερα μεταλλάξεις NRAS.

Μεταλλάξεις RAS εντοπίζονται κυρίως σε περιπτώσεις MM, NMMML και XMMML, σε ποσοστό 30-40%, 25-30% και >20%, αντίστοιχα.

Επιπλέον, τα γονίδια NRAS και KRAS, ανευρίσκονται αντίστοιχα μεταλλαγμένα σε ποσοστό ασθενών 10-11% και 5%, στην ΟΜΛ, ενώ στην ΟΛΛ αποτελούν το 20% και 24% των περιπτώσεων, αντίστοιχα.

Λιγότερο συχνά ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε ασθενείς με ΜΔΣ (5%), οπότε και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εκτροπής προς ΟΜΛ (Ward et al. 2012, Al-Kali et al. 2013, Oshima et al. 2016, Meggendorfer et al. 2018).

1.3.2.2 Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών

1.3.2.2.1 Το γονίδιο *CALR*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *CALR* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19p13.13 και απαρτίζεται από 9 εξόνια.

β. Η πρωτεΐνη

Το γονίδιο *CALR*, κωδικοποιεί στην ομώνυμη πρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

Στη φυσιολογική της μορφή δρα ως μοριακός συνοδός (chaperon), συμμετέχοντας στη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών, στην ομοίωση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} , ενώ παράλληλα αλληλεπιδρά με ορμονικούς υποδοχείς του πυρήνα (Heuser et al. 2014).

Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιλαμβάνει μια αρνητικά φορτισμένη, ανεξάρτητη λειτουργική περιοχή για τη δέσμευση ιόντων ασβεστίου, καθώς και ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο, για τη σταθερή πρόσδεση αυτής στο ενδοπλασματικό δίκτυο (KDEL).

γ. Οι μεταλλάξεις

Πρόσφατα, από δυο ανεξάρτητες ομάδες, δημοσιεύθηκε η παρουσία συχνών μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου της καλρετικουλίνης (calreticulin, *CALR*), κυρίως σε ασθενείς με MYN (Nangalia et al. 2013, Klampfl et al. 2013).

Μέχρι στιγμής έχουν ανιχνευτεί πάνω από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*, οι οποίες είναι μεταλλάξεις έλλειψης ή προσθήκης βάσεων, οι οποίες ανεξαιρέτως οδηγούν σε μετατόπιση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF).

Πιο συχνά απαντώνται, μια μετάλλαξη διαγραφής 52 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) (γνωστή ως μετάλλαξη Τύπου 1) και μια μετάλλαξη προσθήκης 5 ζευγών βάσεων (μετάλλαξη Τύπου 2), οι οποίες από κοινού αποτελούν το 80% των περιπτώσεων.

Όλες αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου της *CALR*, σε αμινοξέα με θετικό και ουδέτερο φορτίο, με συνέπεια την απώλεια του μοτίβου πρόσδεσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

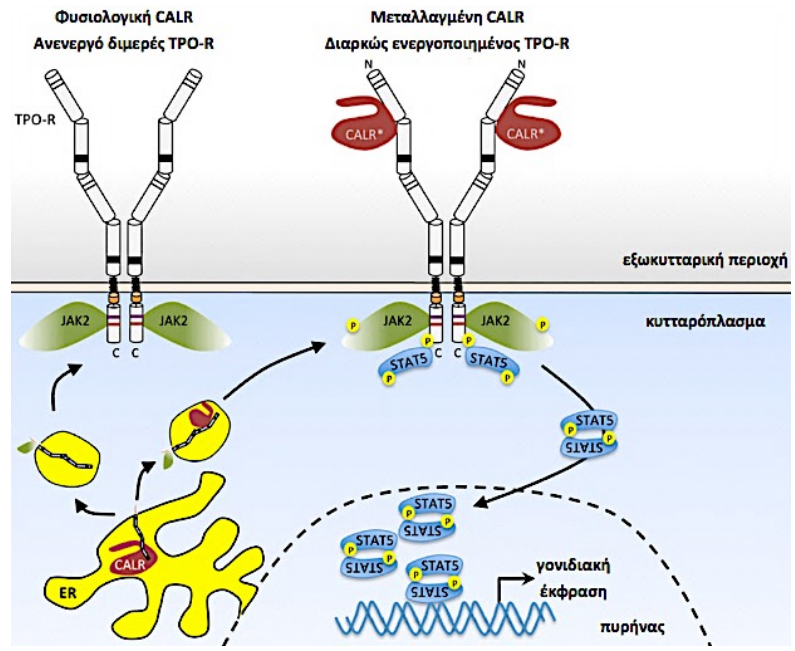
Αυτό οδηγεί την πρωτεΐνη, σε απώλεια της ικανότητας πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου, αλλά και σε διαταραχή της τοπογραφίας αυτής στο κύτταρο, κάτι που φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μη-φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις (Cazzola and Kralovics 2014).

Αν και ο νεοπλασματικός μηχανισμός μέχρι πρότινος δεν ήταν γνωστός, υπήρχαν ενδείξεις ότι η μεταλλαγμένη *CALR* δρα στον άξονα JAK/STAT, οδηγώντας σε ενεργοποίηση αυτού. Ωστόσο, πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αναδεικνύουν τον μηχανισμό δράσης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης.

Φαίνεται λοιπόν, πως η θετικά φορτισμένη μεταλλαγμένη *CALR*, που εντοπίζεται εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της

θρομβοποιητίνης και τον συνοδεύει στην πλασματική μεμβράνη, όπου εκεί διμερίζεται απουσία προσδέτη.

Αυτό συντελεί σε διαρκή ενεργοποίηση, τόσο του ίδιου του υποδοχέα, όσο και των υποκείμενων σηματοδοτικών μονοπατιών που περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια και τα οποία οδηγούν σε μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Cazzola 2016, Araki et al. 2016).



Εικόνα 12. Η δράση της CALR. Η φυσιολογική CALR, όπως παρουσιάζεται στα αριστερά της εικόνας, παραμένει προσδεσμένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μέσω της χαρακτηριστικής αλληλουχίας KDEL, η οποία απουσιάζει στα μεταλλαγμένα πρωτεϊνικά προϊόντα. Η σταθερή πρόσδεση της μεταλλαγμένης καλρετικουλίνης, στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, όπως φαίνεται στα δεξιά της εικόνας, οδηγεί σε διαρκή ενεργοποίηση της κινάσης JAK2 και των υποκείμενων σηματοδοτικών μονοπατιών. Αυτό συμβαίνει μέσω του μη-φυσιολογικού, θετικά φορτισμένου 3' άκρου της CALR, που προσδέεται με τη N-γλυκοζυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή του TPO-R, οπότε και τον ακολουθεί στην πλασματική μεμβράνη (Varghese et al. 2017).

Οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου της CALR ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με ΙΘ (15-25%), ΠΜΙ (20-25%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (5%) (Patnaik and Tefferi 2015).

Αυτό αντιστοιχεί σε ποσοστό 70-85% των ασθενών με ΙΘ και ΠΜΙ, που ελέγχονται αρνητικοί για μεταλλάξεις στα γονίδια JAK2 και MPL.

Οι ίδιες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε μικρό αριθμό ασθενών με ΜΔΣ (8%), αλλά χαρακτηριστικά όχι στην ΑΠ (Nangalia et al. 2013, Klampfl et al. 2013).

Οι ασθενείς με ΙΘ και μεταλλάξεις στο γονίδιο CALR, παρόλο που εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα αιμοπεταλίων, ταυτόχρονα παρουσιάζουν μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης θρομβώσεων και καλύτερη επιβίωση, πιθανότατα λόγω των χαμηλότερων τιμών αιματοκρίτη και λευκών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με ασθενείς που ελέγχονται θετικοί για τη μετάλλαξη JAK2V617F (Klampfl et al. 2013).

1.3.2.2.2 Το γονίδιο *SETBP1*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *SETBP1* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 18q12.3 και απαρτίζεται από 15 εξόνια. Κατόπιν εναλλακτικής ωρίμανσης προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA.

β. Η πρωτεΐνη

Το γονίδιο *SETBP1* κωδικοποιεί σε μία πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται κυρίως εντός του πυρήνα του κυττάρου, αλλά και στο κυτταρόπλασμα, επιτελώντας πληθώρα δράσεων. Το γονίδιο εκφράζεται τόσο σε βλαστικά και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, όσο και σε κύτταρα που έχουν ήδη δεσμευτεί προς μία συγκεκριμένη αιμοποιητική σειρά.

Η πρωτεΐνη *SETBP1* σχηματίζει ετεροδιμερές με το προϊόν του ογκογονιδίου *SET*, το οποίο ρυθμίζει αρνητικά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη φωσφατάση 2A (*PP2A*) που αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η συμπλοκοποίηση των πρωτεϊνών *SETBP1* και *SET* προστατεύει την τελευταία από αποικοδόμηση, αναστέλλοντας περαιτέρω τη δράση της *PP2A*, ενισχύοντας παράλληλα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

γ. Οι μεταλλάξεις

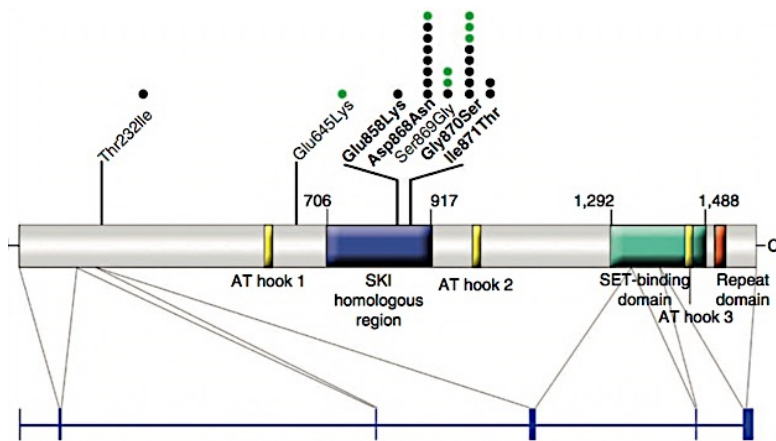
Οι μεταλλάξεις *SETBP1* διαταράσσουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο της πρωτεΐνης, όπου υπο φυσιολογικές συνθήκες, προσδένεται η λιγάση ουβικουτίνης E3. Η ουβικουτινυλίωση των πρωτεϊνών από τις λιγάσες E3, αποτελεί μείζονως σημασίας τροποποίηση, αφού ρυθμίζει πληθώρα κυτταρικών διεργασιών, όπως η μετακίνηση, η επιδιόρθωση του DNA, η κυτταρική σηματοδότηση και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Η απώλεια ουβικουτινυλίωσης του μεταλλαγμένου προϊόντος, οδηγεί σε μειωμένη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης *SETBP1* και κατά συνέπεια της *SET*. Συγχρόνως, η *PP2A* παρουσιάζει ιδιαίτερα μειωμένη δράση, με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να παρουσιάζουν έντονα αυξημένο ρυθμό αυτοανανέωσης.

Ο παθολογικός φαινότυπος επηρεάζεται περαιτέρω λόγω της υπέρμετρης ενεργοποίησης των γονιδίων *HOXA9* και *HOXA10*, όπως και μέσω αποσιώπησης του γονιδίου *RUNX1*, από τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *SETBP1*, η οποία προσδένεται στους υποκινητές αυτών (Maxson JE and Tyner 2017).

Οι συχνότερες σωματικές μεταλλάξεις *SETBP1* ανιχνεύονται μεταξύ των αμινοξέων Glu858 to Ile871, στην υψηλά συντηρημένη SKI-ομόλογη περιοχή, που παρουσιάζει μερική ομολογία με την ογκοπρωτεΐνη SKI.

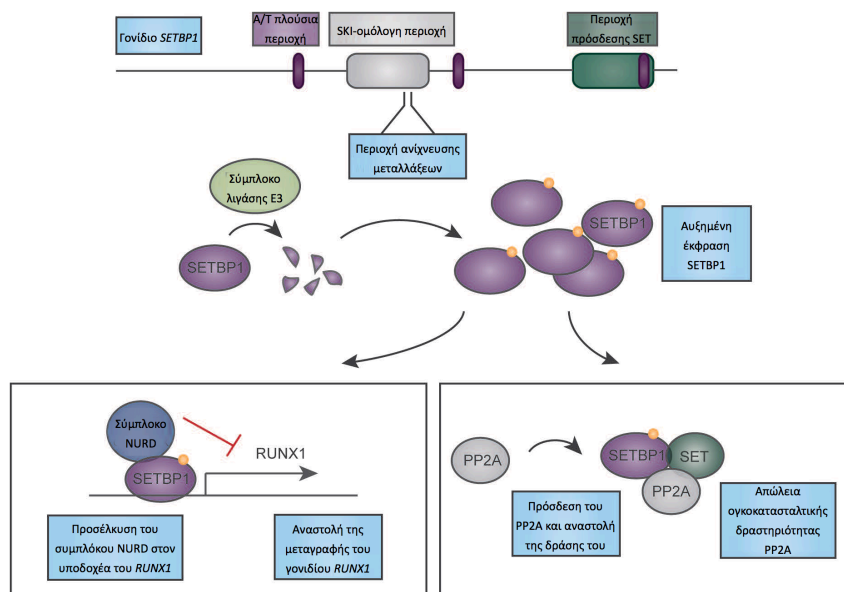
Υπο φυσιολογικές συνθήκες, το τμήμα αυτό είναι χρήσιμο για την πρόσδεση της E3 λιγάσης ουβικουτίνης, που προάγει την αποικοδόμηση της *SETBP1*.



Εικόνα 13. Μεταλλάξεις SETBP1. Οι συχνότερες σωματικές μεταλλάξεις SETBP1 ανιχνεύονται στην υψηλά συντηρημένη SKI-ομόλογη περιοχή (Piazza et al. 2013).

Οι μεταλλάξεις αυτές δεν επιτρέπουν την πρόσδεση της λιγάσης E3, οδηγώντας έτσι σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης SETBP1, με αποτέλεσμα τη διαρκή συμπλοκοποίηση με τον συμπαράγοντα SET και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PP2A, με συνέπεια την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης της τελευταίας.

Επιπλέον, η διαρκής πρόσδεση της μεταλλαγμένης SETBP1 στον υποκινητή του γονιδίου *RUNX1*, αναστέλλει την έκφραση του τελευταίου, μέσω προσέλευσης του συμπλόκου NuRD (nucleosome remodeling deacetylase complex)



Εικόνα 14. Μηχανισμός δράσης των μεταλλάξεων SETBP1 (Maxson JE and Tyner 2017).

Οι μεταλλάξεις SETBP1 ανιχνεύονται σε υψηλό ποσοστό ασθενών με αΧΜΛ (24-32%) ή με ΧΟΛ (25%), στην τελευταία κατάσταση σε συνδυασμό με μεταλλάξεις *CSF3R*, σπανιότερα δε παρατηρούνται σε περιπτώσεις ΧΜΜΛ (4-7%), ΜΔΣ (2%), ΠΜΙ και ΟΜΛ.

Αποτελούν παράγοντα ιδιαίτερα δυσμενούς πρόγνωσης, ειδικά δε, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις *CBL* ή *ASXL1*. Ασθενείς με μεταλλάξεις SETBP1 παρουσιάζουν σημαντικά

χαμηλότερη μέση επιβίωση 22 μηνών, συγκριτικά με τους 77 μήνες που επιβιώνουν κατά μέσο όρο οι ασθενείς χωρίς τέτοιες μεταλλάξεις.

Και ενώ οι μεταλλάξεις *ASXL1* και *SETBP1* συχνά συνανιχνεύονται, δεν συμβαίνει το ίδιο με τις μεταλλάξεις *TET2*, που εμφανίζονται ως μοριακός δείκτης ανεξάρτητος των μεταλλάξεων *SETBP1* (Makishima et al. 2013, Piazza et al. 2013, Zoi and Cross 2015, Clara et al. 2016, Elliott and Tefferi 2016, Shou et al. 2017).

1.3.2.3 Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιγενετική τροποποίηση του DNA

Η επιγενετική αναφέρεται στη μελέτη αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων χωρίς αυτά να παρουσιάζουν διαφορές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία (Jaenisch and Bird 2003, Kaushansky et al. 2016).

Αυτό επιτυγχάνεται με διεργασίες όπως η μεθυλίωση και η απομεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών, που οδηγούν σε αναδιάταξη της χρωματίνης, η οποία πλέον αλληλεπιδρά διαφορετικά με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν άμεσα τη γονιδιακή έκφραση, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες (Jaenisch and Bird 2003).

Μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με τη φυσιολογική λειτουργία των παραπάνω μηχανισμών, έχουν αναφερθεί σε διάφορες μεταβολικές, αυτοάνοσες και νευρολογικές ασθένειες, όπως επίσης στον καρκίνο.

Ο όρος μεθυλίωση του DNA αναφέρεται στην προσθήκη μεθυλομάδων (-CH₃), σε νουκλεοτίδια κυτοσίνης (Cyt), προς σχηματισμό 5-μεθυλο-κυτοσίνης (5-mC). Τα ένζυμα DNA μεθυλομεταφοράσες (DNA Methyltransferases, DNMTs) είναι υπεύθυνα για τη διεργασία αυτή (Santini et al. 2013).

Οι μεθυλικές ομάδες προστίθενται σε μόρια κυτοσίνης τα οποία ακολουθούνται από γουανίνη (CpG dinucleotides). Η διάταξη αυτή απαντάται συχνά σε περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες είναι ευρύτερα γνωστές ως νησίδες δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (CpG islands). Οι νησίδες αυτές εντοπίζονται συνήθως σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος, όπως οι ενισχυτές και οι υποκινητές των γονιδίων.

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί σημάδι αποσιώπησης των γονιδίων. Αυτό συμβαίνει είτε άμεσα, μέσω παρεμπόδισης της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, είτε έμμεσα, μέσω προσέγκυσης ειδικών καταστολέων που αναγνωρίζουν αλληλουχίες με έντονη μεθυλίωση και προσδέονται σε αυτές (Sansom et al. 2007).

Η αντίστροφη διαδικασία ονομάζεται απομεθυλίωση του DNA και μπορεί να είναι παθητική ή ενεργητική. Η παθητική απομεθυλίωση συμβαίνει σε κύτταρα υπό διαίρεση και οφείλεται σε αναστολή της δράσης ή σε δυσλειτουργία των DNMTs, πιο συγκεκριμένα της DNMT1, που ευθύνεται για τη διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης, όπως περιγράφεται εκτενέστερα μετέπειτα. Η ενεργητική απομεθυλίωση είναι μία ενζυμική διεργασία που καταλύεται από το ένζυμο TET2 (Moore et al. 2013).

1.3.2.3.1 Το γονίδιο *DNMT3A*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *DNMT3A* εδράζει στο χρωμόσωμα 2p23.3 ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων *DNMT*, τα οποία κωδικοποιούν μεθυλομεταφοράσες του DNA, που είναι

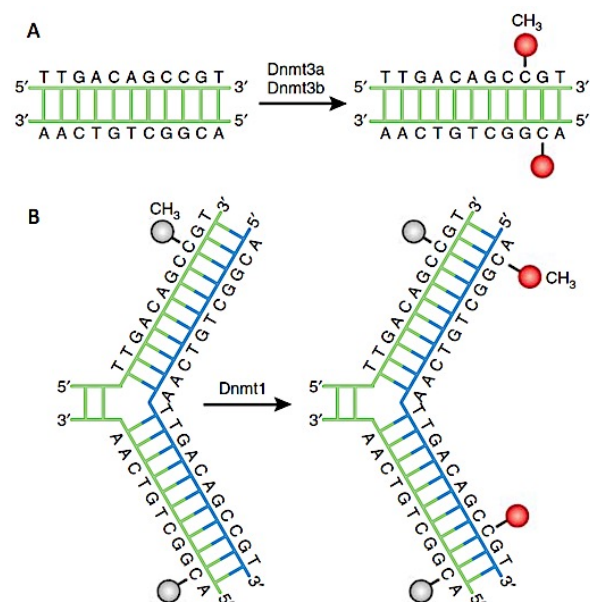
υπεύθυνες για την μεθυλίωση του DNA, μέσω της μετατροπής των βάσεων κυτοσίνης (Cyt) προς 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC) (Walter et al. 2011, Cross 2011).

β. Η πρωτεΐνη

Οι πρωτεΐνες DNMT3A/B οδηγούν σε de novo μεθυλίωση του DNA. Η DNMT3B φαίνεται να είναι περισσότερο απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, αφού η έκφρασή της είναι αμελητέα στους διαφοροποιημένους ιστούς, πλὴν του θυρεοειδούς αδένου, των όρχεων και του μυελού των οστών, όπου διατηρείται σε υψηλά επίπεδα.

Αντιθέτως, η DNMT3A, εκφράζεται σταθερά σε διαφοροποιημένους ιστούς, ενώ φαίνεται πως είναι χρήσιμη για τη φυσιολογική διαφοροποίηση των κυττάρων (Moore et al. 2013).

Η DNMT1 διατηρεί το υπάρχον πρότυπο μεθυλίωσης των νησίδων CpG. Η τελευταία, δρα σε ημιμεθυλωμένο υπόστρωμα, κατά την διαδικασία της αντιγραφής του γονιδιώματος, καθοδηγώντας τη μεθυλίωση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, με βάση το πρότυπο μεθυλίωσης της μητρικής αλυσίδας (Kaushansky et al. 2016, Im et al. 2014).



Εικόνα 15. Η διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA. Μία οικογένεια μεθυλομεταφορασών του DNA (DNA methyltransferases, DNMTs) καταλύει τη μεταφορά μίας μεθυλικής ομάδας από μία S-αδενυλο-μεθειονίνη (SAM) στον πέμπτο άνθρακα μίας κυτοσίνης, προς σχηματισμό 5-μεθυλο-κυτοσίνης (5-mC). Α. Οι DNMT3A και DNMT3B προσδέτουν μεθυλομάδες εκ νέου (de novo) στο DNA. Β. Αντίθετα η DNMT1 διατηρεί το ήδη υπάρχον πρότυπο μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA, προσδέτωντας μεθυλομάδες στη νεοσυντιθέμενη αλληλουχία, στα σημεία όπου υπάρχει ήδη το αντίστοιχο επιγενετικό σημάδι, επί της μητρικής αλυσίδας (τροποποίηση από Moore et al. 2013).

γ. Οι μεταλλάξεις

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στο γονίδιο DNMT3A είναι μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations) κυρίως στο εξόνιο 23. Σχεδόν σε κάθε περίπτωση εντοπίζονται σε ετεροζυγωτία. Πιο συχνά εμφανίζονται οι μεταβολές

R882(H/C/S) (Im et al. 2014), πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, όπου εντοπίζεται η λειτουργική περιοχή με ενεργότητα μεθυλομεταφοράς (Russler-Germain et al. 2014).

Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν πως η απώλεια δράσης της *DNMT3A*, σε πολυδύναμα αιμοποιητικά (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) και εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Embryonic Stem, ES) ποντικών, συντελεί σε μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης, καθώς και σε ενισχυμένη ικανότητα αυτοανανέωσης (Chen et al. 2003, Challen et al. 2011).

Η πρώτη δυσλειτουργία σχετίζεται με την ικανότητα της μεταλλαγμένης *DNMT3A* να προσελκύει το συμπλόκο με κατασταλτική δράση PRC1 (Polycomb repressive complex), σε συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τις E3 λιγάσες RING1A/B και μία από τις έξι διαφορετικές πρωτεΐνες PCGF (PCGF1-6), καθώς και επιπρόσθετους δευτερεύοντες παράγοντες και συμμετέχει στην επιγενετική τροποποίηση των ιστονών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα εισάγει την κατασταλτική σήμανση H2AK119ub, η οποία φαίνεται πως παράλληλα υποβοηθά την πρόσδεση του κατασταλτικού συμπλόκου PRC2 στο γονιδίωμα. Το τελευταίο εναποθέτει την τροποποίηση H3K27me3, συμβάλλοντας έτσι σε περαιτέρω καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Ως αποτέλεσμα, αποσιωπώνται γονίδια υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση των κυττάρων (Blackledge et al. 2014, Aranda et al. 2015, Balasubramani et al. 2015, Koya et al. 2016).

Η δεύτερη δυσλειτουργία οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα της μεταλλαγμένης *DNMT3A* να μεταφέρει μεθυλικές ομάδες στο γονιδίωμα (Koya et al. 2016). Πρόσφατα δεδομένα φανερώνουν πως το προϊόν της μετάλλαξης R882, δρα ανασταλτικά στον τετραμερισμό της πρωτεΐνης, που είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί μέγιστη ενεργότητα *de novo* μεθυλίωσης (Russler-Germain et al. 2014). Ως συνέπεια, γονίδια που συμμετέχουν στην αυτοανανέωση των κυττάρων συνεχίζουν να μεταγράφονται διαρκώς, λόγω μειωμένης μεθυλίωσης των υποκινητών τους.

Συμπερασματικά οι μεταλλάξεις *DNMT3A* συντελούν σε απώλεια συγκεκριμένων λειτουργιών (loss-of-function mutations, LOF mutations), ενώ ταυτόχρονα οδηγούν σε απόκτηση νέων (GOF) (Koya et al. 2016).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A*, ανευρίσκονται κυρίως σε ασθενείς με ΟΜΛ (20%) (Yamashita et al. 2010, Im et al. 2014) και ΜΔΣ (8-10%) (Walter et al. 2011), σπανιότερα δε σε ασθενείς με ΠΜΙ, είτε αυτή είναι πρωτοπαθής, είτε αποτελεί εξέλιξη από ΑΠ (5% και 8% αντίστοιχα) (Brecqueville et al. 2014).

Συνιστούν μεταλλάξεις με κακή πρόγνωση, ιδίως για τους ασθενείς με ΟΜΛ, ενώ στις περιπτώσεις αυτές, συνανιχνεύονται συχνά με μεταλλάξεις στα γονίδια *NPM1*, *FLT3* και *IDH1* (Koya et al. 2016).

1.3.2.3.2 Το γονίδιο *TET2*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *TET2* (Ten-Eleven Translocation 2), εδράζει στο χρωμόσωμα 4q24 και ανήκει στην οικογένεια γονιδίων *TET*.

β. Η πρωτεΐνη

Οι ομώνυμες πρωτεΐνες είναι ένζυμα με δράση υδροξυλάσης, τα οποία, σε ορισμένες περιπτώσεις, καταλύουν την μετατροπή της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5-mC), προς 5-

υδροξυλ-μεθυλοκυτοσίνη (5-hmC), παρουσία α -Κετογλουταρικού (α -KG) και δισθενών ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}). Στη συνέχεια, συμμετέχουν σε επιπρόσθετες ενζυμικές αντιδράσεις, με τελικό στόχο την απομεθυλίωση του DNA (Tahilian et al. 2009, Cross 2011).

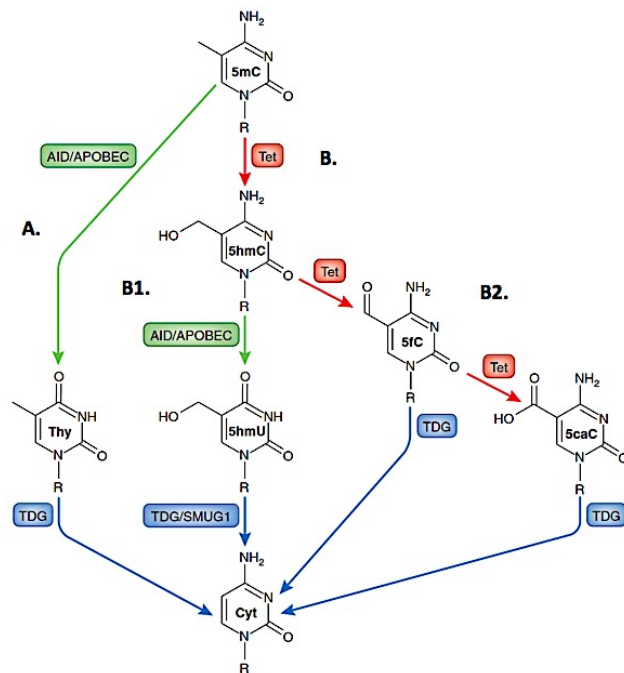
Πιο αναλυτικά, για να επιτευχθεί η απομεθυλίωση του DNA, υπάρχουν διάφορα μονοπάτια, όπως αυτά αναπαρίστανται γραφικά κάτωθι.

Στην πρώτη περίπτωση, η 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC) δύναται να τροποποιηθεί χημικά τόσο στην αμινομάδα, όσο και στη μεθυλομάδα. Απαμίνωση της 5-mC από το σύμπλοκο AID/APOBEC (AADs), οδηγεί σε μετατροπή αυτής της πλευρικής ομάδας σε θυμίνη (Thy). Η απώλεια συμπληρωματικότητας που προκύπτει αποκαθίσταται μέσω του μονοπατιού απομάκρυνσης λανθασμένων βάσεων (base excision repair (BER) pathway). Η αντίδραση καταλύεται από μία γλυκοζυλάση (thymine DNA glycosylase, TDG) που αντικαθιστά το λανθασμένο νουκλεοτίδιο θυμίνης, με μία κυτοσίνη (Cyt) (Εικόνα 16A).

Σε άλλη περίπτωση, τα ένζυμα TET είναι υπεύθυνα για την υδροξυλίωση της 5-mC, προς 5-υδροξυλ-μεθυλοκυτοσίνη (5-hmC). Ακολούθως, διακρίνονται δύο διαφορετικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η 5-hmC δύναται να μετατραπεί σε κυτοσίνη (Εικόνα 16B).

Ο πρώτος αφορά στην απαμίνωση της 5-hmC, προς 5-υδροξυλ-μεθυλουρακίλη (5-hmU), πάλι μέσω του συστήματος AID/APOBEC και μετέπειτα επιδιόρθωση από τις γλυκοζυλάσες TDG και SMUG1 (Single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1) (Εικόνα 16B1).

Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στην περαιτέρω οξείδωση της 5-hmC από τα ένζυμα TET, αρχικά προς 5-φορμυλ-μεθυλοκυτοσίνη (5-fC) και έπειτα προς 5-καρβοξυλ-μεθυλοκυτοσίνη (5-caC) και επιδιόρθωση αυτών σε οποιοδήποτε στάδιο από την TDG (Εικόνα 16B2) (Moore et al. 2013).



Εικόνα 16. Η διαδικασία της απομεθυλίωσης του DNA. Γραφική αναπαράσταση των διαφορετικών μονοπατιών ενεργητικής απομεθυλίωσης (τροποποίηση από Moore et al. 2013).

γ. Οι μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* είναι αρκετά συχνές σε ασθενείς με ΧΟΛ (30%) ΧΜΜΛ (40-60%), αΧΜΛ (30-40%) και αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ (30%) (Zoi and Cross 2015, Maxson and Tyner 2017), σπανιότερα δε ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΠΜΙ (14%), ή με μυελοϊνώση ως εξέλιξη ΑΠ (15%) ή ΙΘ (21%) (Brecqueville et al. 2014).

Αυτές αφορούν συνήθως μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations), κοντά στο καταλυτικό εξελικτικά συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) της πρωτεΐνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ενζυμικής λειτουργίας αυτής (LOF mutations), ενώ παρατηρούνται και στα δύο αντίγραφα του γονιδίου στον παθολογικό πληθυσμό κυττάρων.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2* και *DNMT3A* είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (Tefferi et al. 2009, Soucie et al. 2012, Larsson et al. 2013, Solary et al. 2014).

1.3.2.3.3 Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2*

α. Τα γονίδια

Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2* εντοπίζεται στις χρωμοσωμικές περιοχές 2q34 και 15q26.1, αντίστοιχα, ενώ απαρτίζονται από 12 εξόνια, έκαστος. Κατόπιν εναλλακτικής ωρίμανσης προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA.

β. Οι πρωτεΐνες

Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2* κωδικοποιούν ένζυμα με λειτουργία NADP⁺-εξαρτώμενων ισοκιτρικών αφυδρογονασών (Isocitrate Dehydrogenase, IDH). Το ένζυμο IDH1 δραστηριοποιείται στο κυτοσόλιο, ενώ η δράση του ενζύμου IDH2 περιορίζεται στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξυσώματα. Η αντίδραση που καταλύουν είναι η εξής:



Η αντίδραση αυτή είναι σημαντική τόσο για τον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs), όσο και για την μεθυλίωση του DNA.

Το α-Κετογλουταρικό (α-KG) (ή αλλιώς 2-οξογλουταρικό), μαζί με οξυγόνο (O₂) και ιόντα δισθενούς σιδήρου (Fe²⁺), είναι απαραίτητα στοιχεία για την λειτουργία του ενζύμου TET2, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Figueroa et al. 2010).

γ. Οι μεταλλάξεις

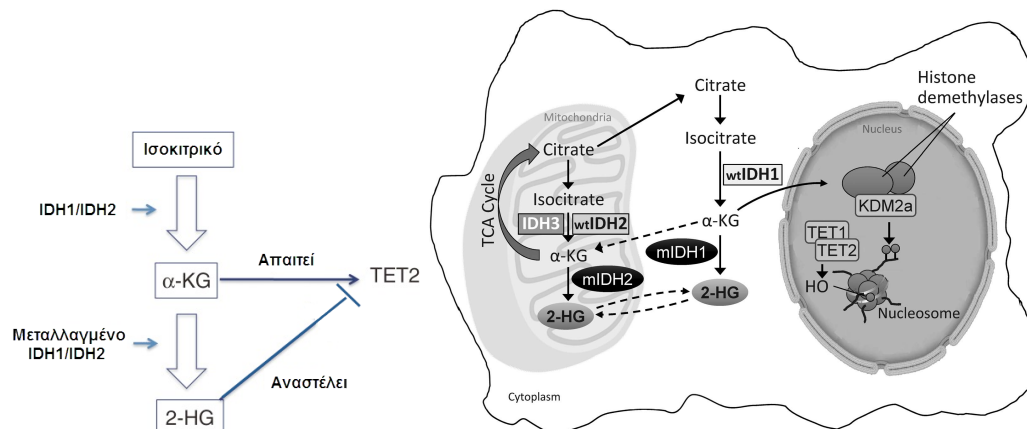
Στο γονίδιο *IDH1*, συχνά παρατηρείται η αντικατάσταση μίας αργινίνης (R) στη θέση 132 της αμινοξικής ακολουθίας, από ιστιδίνη (R132H), ή από κυστεΐνη (R132C). Αντίστοιχα στο γονίδιο *IDH2*, συχνότερα ανιχνεύεται η μετάλλαξη R140Q (80% των περιπτώσεων), ενώ σπανιότερα η R172K. Όλες οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (GOF).

Συνέπεια αυτών είναι η μετατροπή του α-KG προς 2-υδροξυ-γλουταρικό (2-HG), από τα ένζυμα IDH1/2. Οι δύο αυτές ενώσεις είναι δομικά ανάλογες, ενώ η μοναδική τους διαφορά, έγκειται στην αντικατάσταση της α-κετοομάδας του α-KG, από μια υδροξυλομάδα (-OH), οπότε και προκύπτει το 2-HG.

Η συσσώρευση του τελευταίου, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων α-KG, επηρεάζει την λειτουργία του ενζύμου TET2, του οποίου η δράση βασίζεται στη βιοδιαθεσιμότητα α-KG (Medeiros et al. 2017).

Συγκεκριμένα, παρεμποδίζεται η σύνδεση της TET2 με ιόντα δισθενούς σιδήρου, μία αντίδραση που όπως αναφέρθηκε ήδη στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι απαραίτητη για την απομεθυλίωση του DNA.

Η αδυναμία του κυττάρου να μετατρέψει την 5-mC προς 5-hmC οδηγεί σε υπέρμετρη μεθυλίωση του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως και γονιδίων που προάγουν την διαφοροποίηση των κυττάρων, γεγονότα που επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η επιβίωση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός (Kaushansky et al. 2016).



Εικόνα 17. Η δράση των ενζύμων IDH. Αριστερά: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση της δράσης των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων IDH1/2 (Τροποποίηση από Kitamura et al. 2014). Δεξιά: Τα μεταλλαγμένα ένζυμα IDH1 και IDH2 προάγουν τη συσσώρευση 2-HG, το οποίο αναστέλει σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, μέσω αναστολής της δράσης των ενζύμων που αφαιρούν τις μεθυλικές ομάδες από το DNA. Η υπέρμετρη μεθυλίωση που προκύπτει ως συνέπεια των ανωτέρω, τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση. Έτσι τα κύτταρα δεν μπορούν να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους και παραμένουν ως πρόδρομες μορφές αδιαφοροποίητων κυττάρων (Medeiros et al. 2017).

Μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1/2 ανιχνεύονται τόσο σε ασθενείς με ΟΜΛ, όσο και στις υπόλοιπες κατηγορίες μυελικών νεοπλασιών όπως ΜΔΣ, ΜΥΝ και αλληλεπικαλυπτόμενα σύνδρομα, σε διαφορετικές συχνότητες.

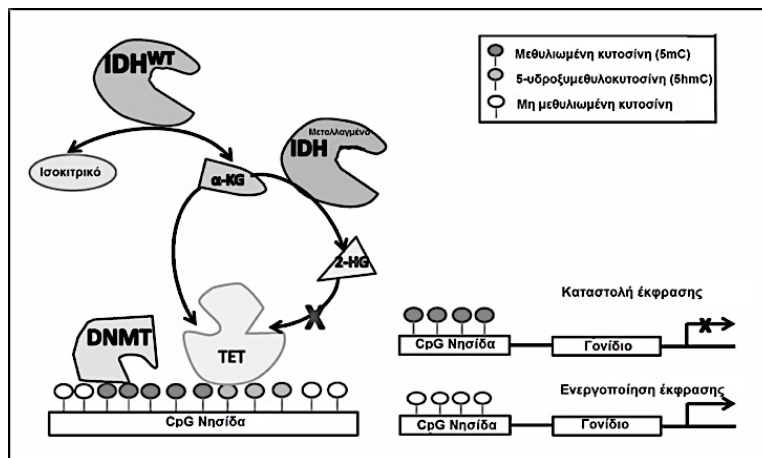
Οι μεταλλάξεις στα IDH1/2 ανιχνεύονται σε ετερόζυγη κατάσταση, ενώ παράλληλα είναι αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις TET2 (Ward et al. 2010, Gaidzik et al. 2012).

1.3.2.3.4 Σύνοψη κεφαλαίου

Τα ένζυμα DNMT εισαγάγουν μεθυλομάδες, ως πλευρικές ομάδες, σε νουκλεοτίδια κυτοσίνης στις νησίδες CpG, που αποσκοπούν στην αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης.

Αντιθέτως, τα ένζυμα TET, συμμετέχουν στην απομάκρυνση αυτής της επιγενετικής σήμανσης, με σκοπό να αυξήσουν τη γονιδιακή έκφραση. Η δράση των τελευταίων βασίζεται, μεταξύ άλλων, στην επάρκεια του κυττάρου σε α-κετογλουταρικό οξύ (α-KG), το οποίο προκύπτει από την ενζυμική μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος, με τη μεσολάβηση του ενζύμου IDH.

Οι μεταλλάξεις IDH οδηγούν σε αλλοιωμένη ενζυμική δράση, που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη διαθεσιμότητα α -KG, λόγω μετατροπής του σε 2-υδροξυγλουταρικό (2-HG). Συνέπεια αυτού είναι η μειωμένη δράση των ενζύμων TET.



Εικόνα 18. Ο μηχανισμός μεταβολής της επιγενετικής κατάστασης του DNA, συνολικά. Ο ρόλος των πρωτεϊνών DNMT, TET και IDH, στη μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA (Τροποποίηση από Larsson et al. 2013).

1.3.2.4 Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στην τροποποίηση των ιστονών πρωτεϊνών

Η διαμόρφωση της χρωματίνης στο χώρο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για την έκφραση των γονιδίων. Το εκάστοτε χρωμόσωμα καταλύει σε μία συγκεκριμένη περιοχή στον πυρήνα, γνωστή ως χρωμοσωμική επικράτεια. Ο βαθμός συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων επηρεάζει άμεσα την προσβασιμότητα των λειτουργικών και ρυθμιστικών περιοχών του γονιδιώματος, από μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα της μεταγραφής.

Τα νουκλεοσώματα αποτελούν τη βασική δομή συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων. Οι δομές αυτές απαρτίζονται από ένα οκταμερές ιστονών, που αποτελείται από 4 διπλές υπομονάδες πρωτεϊνών H2A, H2B, H3 και H4, γύρω από τις οποίες περιελίσσεται το DNA και με τον τρόπο αυτό συμπυκνώνεται στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Οι ιστόνες μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη πλευρικών ομάδων σε τρία συγκεκριμένα αμινοξέα στον αμινοτελικό τους άκρο (N-terminal histone tails). Οι διάφορες τροποποιήσεις, επιφέρουν αλλαγές στη διάταξη της χρωματίνης και κατά συνέπεια αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων (Moore et al. 2013).

Βασικά σημάδια τροποποίησης των ιστονών αποτελούν η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η ουβικουϊτινυλίωση και η σουμοϋλίωση, καθώς και η απώλεια κάθε μίας από αυτές τις πλευρικές ομάδες, αφού αποτελούν δυναμικές αλλαγές.

Τα ένζυμα που σχετίζονται με αυτές τις μεταβολές διαίρονται σε τρεις κατηγορίες, σε εκείνα που προσθέτουν (writers), σε αυτά που διαβάζουν (readers) και τέλος σε εκείνα που απομακρύνουν (erasers) την εκάστοτε σήμανση.

Η προσθήκη ή απομάκρυνση κάθε σήμανσης, ρυθμίζεται από συγκεκριμένα ένζυμα όπως οι ακετυλομεταφοράσες (histone acetyltransferases, HATs), οι αποακετυλάσες (histone deacetylases, HDACs), οι μεθυλομεταφοράσες (histone methyltransferases, HMTs), οι απομεθυλάσες (histone demethylases, HDMs), οι κινάσες, οι φωσφατάσες,

οι λιγασές ουβικουιτινυλίωσης και οι απο-ουβικουιτινάσες των ιστονών (Verma 2015).

Και ενώ η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να οδηγήσει τόσο σε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα, όσο και σε μεταγραφική αποσιώπηση, ανάλογα με το αμινοξύ που τροποποιείται, η ακετυλίωση αυτών αποτελεί σχεδόν πάντοτε σημάδι ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροποποιήσεων αποτελούν η τριπλή μεθυλίωση της ιστόνης H3, σε αμινοξέα λυσίνης στις θέσεις 4 και 6 (H3K4me3, H3K6me3), που αποτελούν ενδείξεις μεταγραφικής ενεργότητας.

Αντίθετα η διπλή και τριπλή μεθυλίωση της ιστόνης H3 στο κατάλοιπο της λυσίνης στη θέση 9 (H3K9me2/3), όπως και η τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K27me3), συνήθως οδηγούν σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (*abcam [Internet], [cited 2017 Jul 16]*).

Σε μικροσκοπικό επίπεδο, όπως διακρίνεται στην εικόνα που ακολουθεί, τα χρωμοσώματα αποτελούνται από διακριτές μονάδες (topologically associating domains, TADs), οι οποίες περιλαμβάνουν στοιχεία ενισχυτών και υποκινητών που σχηματίζουν θηλιές.

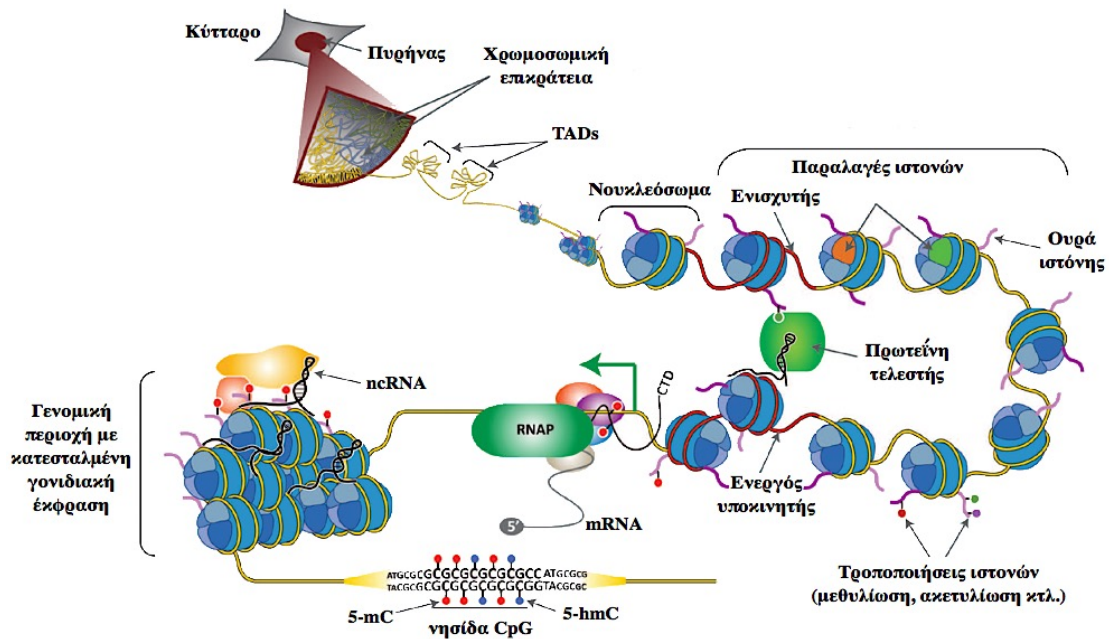
Οι δομές αυτές σταθεροποιούνται με τη βοήθεια πρωτεϊνών τελεστών (protein effectors), μη κωδικοποιών μορίων RNA (ncRNAs) και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (post-translational modifications, PTMs) των ιστονών, όπως αυτές που περιγράφηκαν ήδη.

Οι ενισχυτές και οι υποκινητές των γονιδίων διακρίνονται από την παρουσία συγκεκριμένων ιστονών, καθώς και PTMs στις ουρές αυτών των πρωτεϊνών.

Στις μεταγραφικά δραστήριες περιοχές του γονιδιώματος, το ένζυμο RNA πολυμεράση II (RNAP), που ενεργοποιείται κατόπιν φωσφορυλίωσης αμινοξέων σερίνης (Ser5 και Ser2) στο καρβοξυτελικό της άκρο, είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των πρόδρομων μορίων mRNA.

Αντίθετα, οι περιοχές που είναι μεταγραφικά ανενεργές, σχηματίζουν κατεσταλμένες χρωματινικές δομές που σταθεροποιούνται μέσω ncRNAs και κατασταλτικών πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Επιπλέον, οι περιοχές με επαναλαμβανόμενα μοτίβα, όπως οι νησίδες CpG (CpG islands, CGIs), υπόκεινται σε έλεγχο, μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων (5-mC και 5-hmC), όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (1.3.2.3). Με τον τρόπο αυτό συμμετέχουν και αυτές στον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων (Aranda et al. 2015, Kaushansky et al. 2016)



Εικόνα 19. Ιεράρχια της χρωματινικής δομής (Τροποποίηση από Aranda et al. 2015).

Είναι πλέον αποδεκτό, πως η μεταγραφική ενεργότητα ρυθμίζεται, όχι μεμονωμένα, αλλά μέσω της αλληλεπίδρασης πληθώρας επιγενετικών μηχανισμών, που συνεργάζονται παράλληλα με απώτερο στόχο την ενίσχυση ή αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.

Η μεθυλίωση του DNA, που αποτελεί σημάδι καταστολής της γονιδιακής έκφρασης και ρυθμίζεται από τα ένζυμα DNMTs, δρα συνεργιστικά με ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες, με στόχο τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Είναι γνωστό ότι οι DNMT1 και DNMT3A, αλληλεπιδρούν άμεσα με ένζυμα, όπως το SUV39H1, που εισάγει κατασταλτικά επιγενετικά σημάδια επί των ιστονών, όπως η μεθυλίωση H3K9.

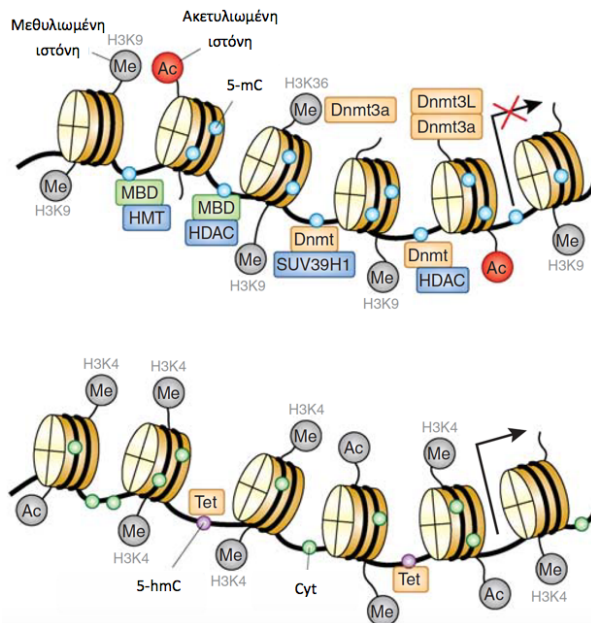
Ομοίως, οι DNMT1 και DNMT3B, συνεργάζονται με αποακετυλάσες των ιστονών, προκειμένου να απομακρύνουν σημάδια ακετυλίωσης, με στόχο μία πιο συμπαγή δομή χρωματίνης, που θα οδηγήσει σε μεταγραφική αποσιώπηση.

Συγκεκριμένοι παράγοντες, οι γνωστές μεθυλο-δεσμευόμενες πρωτεΐνες (methyl-binding proteins, MBDs), μεσολαβούν της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης των ιστονών, με στόχο να ενισχύσουν τη μεταγραφική καταστολή.

Κατά τρόπο ανάλογο, οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν παρομοίως να επηρεάσουν το πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA. Μία μη λειτουργική μορφή DNA μεθυλομεταφοράς, η DNMT3L, προσδέεται επί των ιστονών H3, προσελκύοντας έτσι τις DNMT3A/B, με στόχο τη μεθυλίωση του DNA.

Ίδιο αποτέλεσμα επιφέρει η σήμανση H3K36me3, που προσελκύει άμεσα την πρωτεΐνη DNMT3A.

Αντίθετα, σε περιοχές του γονιδιώματος όπου η μεταγραφή είναι ενεργή, τα ένζυμα TET έχουν ήδη απομακρύνει τις μεθυλομάδες από το DNA, ενώ οι ιστόνες αυτών των γενωμικών περιοχών, φέρουν την επιγενετική τροποποίηση H3K4me3, η οποία παρεμποδίζει την πρόσδεση των DNMT3A/B και της DNMT3L επί του DNA, αποτρέποντας έτσι τη μεθυλίωση των παραπλήσιων γενωμικών περιοχών (Moore et al. 2013).



Εικόνα 20. Επιγενετική αλληλεπίδραση. Η αλληλεπίδραση των επι μέρους επιγενετικών μηχανισμών αποσκοπεί στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (τροποποίηση από Moore et al. 2013).

1.3.2.4.1 Το γονίδιο ASXL1

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο ASXL1 (Additional sex combs-like 1) ανήκει στην τριμελή οικογένεια γονιδίων ASXL (ASXL1, ASXL2 ASXL3), που ανιχνεύονται στα θηλαστικά. Τα γονίδια αυτά είναι ομόλογα των Asx (additional sex combs) γονιδίων της *Drosophila*.

Στον άνθρωπο εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 20q11.21 και απαρτίζεται από 18 εξόνια.

β. Η πρωτεΐνη

Οι πρωτεΐνες ASXL δρουν ως κριώματα για την προσέλκυση επιγενετικών ρυθμιστών και μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και για τη συγκρότηση αυτών σε λειτουργικές ομάδες, σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος όπου παρατηρούνται συγκεκριμένα πρότυπα τροποποίησης των ιστονών (Kato 2013). Ταυτόχρονα διαθέτουν την ικανότητα να προσδένονται άμεσα στη χρωματίνη, μέσω μίας υψηλά συντηρημένης περιοχής (plant homeodomain, PHD), η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Abdel-Wahab et al. 2012, Score et al. 2012).

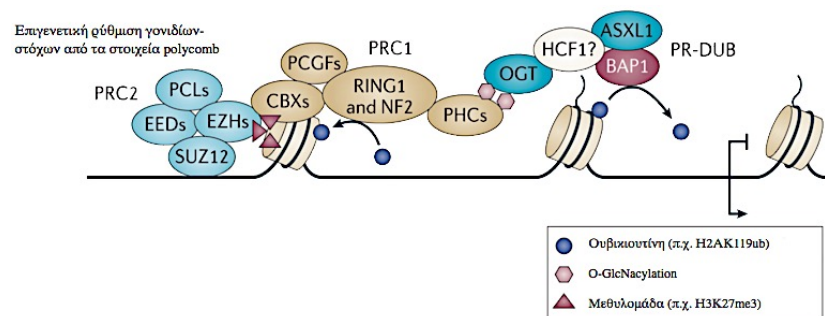
Στο παρελθόν, έχει αναφερθεί, πως η πρωτεΐνη ASXL1 συμμετέχει στη συγκρότηση και προσέλκυση στο γονιδίωμα, του κατασταλτικού συμπλόκου PRC2, μέσω αλληλεπίδρασης με κύριες υπομονάδες αυτού, όπως οι παράγοντες EZ (Enhancer of zeste), SUZ12 (Suppressor of zeste 12) και ESC (Extra sex combs), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *EZH1/2*, *SUZ12* και *EED*, αντίστοιχα. Το σύμπλοκο αυτό καταλύει την τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης 27, της ιστόνης 3 (H3K27me3), που αποτελεί σημάδι μεταγραφικής καταστολής (Abdel-Wahab et al. 2012, Inoue et al. 2013, Blackledge et al. 2014, Greenblatt and Nimer 2014, Geisler and Paro 2015).

Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αντικρούουν την παραπάνω παραδοχή και προτείνουν πως το σύμπλοκο PRC2 προσελκύεται σε περιοχές που έχουν ήδη εμπλουτιστεί με την τροποποίηση H2AK119ub, η οποία εισάγεται από το σύμπλοκο PRC1.

Αντίθετη δράση φαίνεται πως ασκεί η ASXL1, σε σύμπλοκο που σχηματίζει με την απο-ουβικιουτινάση BAP1 (BRCA1-associated protein 1) και επιπρόσθετους δευτερεύοντες παράγοντες, αφού από κοινού συγκροτούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο PR-DUB, που απομακρύνει την κατασταλτική τροποποίηση H2AK119ub, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας (Balasubramani et al. 2015, Sahtoe et al. 2016, Guo et al. 2018).

Παράλληλα, το ένζυμο OGT μεσολαβεί των PR-DUB και PRC1, προκειμένου να ρυθμίσει το ισοζύγιο αυτών επί του γονιδιώματος και κατά συνέπεια την μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων (Carbone et al. 2013).

Τα παραπάνω απεικονίζονται διαγραμματικά στο παρακάτω γράφημα.



Εικόνα 21. Επιγενετική ρύθμιση γονιδίων από στοιχεία Polycomb. Συντμήσεις ASXL1/2, Additional sex combs like 1/2, BAP1, BRCA1-associated protein 1, CBXs, mammalian chromobox protein homologues, EED, embryonic ectoderm development, EZHs, enhancer of zeste homologs, HCF1, Host cell factor 1, OGT, UDPglucose-dependent O-glucosyltransferase, PCGFs, Polycomb group ring fingers, PCLs, Polycomb Like proteins, PHCs, Polyhomeotic-like proteins, PRC1, Polycomb repressive complex 1, PRC2, Polycomb repressive complex 2, PR-DUB, Polycomb repressive deubiquitinase, RING1, Really interesting new gene 1, RNF2, RING finger protein 2, SUZ12, Suppressor of zeste 12 (Τροποποίηση από Carbone et al. 2013).

Επιπλέον, φαίνεται πως η ASXL1 συνεργάζεται με κύρια μέλη του συμπλόκου της κοχεσίνης, συγκεκριμένα τα RAD21, SMC1A, SMC3 και STAG1/STAG2, προκειμένου να διαχωριστούν ορθά οι χρωματίδες κατά τη μίτωση (Li et al. 2017).

γ. Οι μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις ASXL1 εντοπίζονται σε ετερόζυγη κατάσταση και αφορούν κυρίως σε προσθήκη ή διαγραφή νουκλεοτιδίων. Αυτές οδηγούν σε μετατόπιση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations) και σε πρόωρη λήξη της μετάφρασης. Τέτοιες μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως στο τελευταίο εξόνιο (εξόνιο 12) του γονιδίου, πριν την υψηλά συντηρημένη περιοχή PHD, στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, οπότε και συντελούν σε απώλεια αυτής. Η αμινοτελική περιοχή, μέσω της οποίας η πρωτεΐνη συμμετέχει στη δόμηση του συμπλόκου PR-DUB, παραμένει ανεπηρέαστη.

Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο εικάζεται πως, είτε επηρεάζει την έκφραση ή τη δράση του φυσιολογικού (dominant-negative effect), είτε δρα μέσω απόκτησης νέων

λειτουργιών (GOF) (Inoue et al. 2013, Blackledge et al. 2014, Balasubramani et al. 2015).

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες που στόχο έχουν να αναδείξουν το μηχανισμό μέσω του οποίου, αυτές οι μεταλλάξεις απαλειφής του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης ASXL1, επιφέρουν εξελικτικό πλεονέκτημα στα παθολογικά αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

Σε μία από αυτές τονίζεται η ενισχυμένη δραστηριότητα του συμπλόκου ASXL1-BAP1 (PR-DUB), που οδηγεί σε απομάκρυνση μέχρι και 90% της τροποποίησης H2AK119ub του κυττάρου στο σύνολό του (Balasubramani et al. 2015, Guo et al. 2018). Άλλη μελέτη εστιάζει στην περιορισμό της κατασταλτικής σήμανσης H3K27me3 του κυττάρου, λόγω μειωμένης προσέλευσης του συμπλόκου PRC2 στο γονιδίωμα, εξαιτίας της μειωμένης ουβικιουτινύλωσης της ιστόνης H2A στη θέση K119 (Inoue et al. 2013). Συνδυαστικά, οι δύο προαναφερθείσες αλλαγές, συμβάλλουν σε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα πληθώρας γονιδίων.

Επιπροσθέτως, η απώλεια λειτουργικής πρωτεΐνης ASXL1, φαίνεται πως επηρεάζει τη λειτουργικότητα του συμπλόκου της κοχεσίνης, με αποτέλεσμα το λανθασμένο διαχωρισμό των χρωματίδων κατά την τελόφαση της μίτωσης (Li et al. 2017).

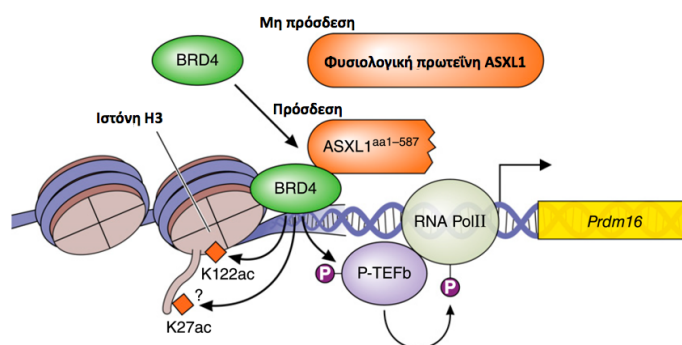
Τέλος, μόλις πρόσφατα αποδείχθηκε, πώς η μεταλλαγμένη ASXL1 αποκτά την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα BRD4, κάτι που δεν συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες (Εικόνα 22).

Η πρωτεΐνη BRD4 αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών BET, που απαρτίζεται από ένζυμα-αναγνώστες (readers) της ακετυλίωσης των ιστονών.

Το σύμπλοκο ASXL1/BRD4 αναγνωρίζει την ακετυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 122 (H3K122ac). Παράλληλα, αλληλεπιδρά με τον παράγοντα pTEFb, ο οποίος ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την RNA πολυμεράση II

Με τον μηχανισμό αυτό στοχεύει σε περιοχές στο γονιδίωμα με δράση ενισχυτή, μέσω των οποίων ρυθμίζει θετικά, κύρια γονίδια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (όπως το *PRDM16*), που συμβάλλουν στην ογκογένεση.

Η βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των μεταλλαγμένων προϊόντων του γονιδίου *ASXL1*, οδηγεί σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως οι αναστολείς BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif inhibitors) (Kitamura 2018, Yang et al. 2018).



Εικόνα 22. Αλληλεπίδραση της μεταλλαγμένης ASXL1 με τον BRD4 (τροποποίηση από Kitamura 2018).

Οι μεταλλάξεις *ASXL1* ανιχνεύονται σε υψηλά ποσοστά, τόσο σε ασθενείς με ΠΜΙ (28%) και ΜΙ σε εξέλιξη από ΑΠ (31%) ή ΙΘ (14%), όσο και σε ασθενείς με ΧΟΛ και

αΧΜΛ (30-60%), όπως και με άλλες μυελικές νεοπλασίες (ΧΜΜΛ, ΟΜΛ και ΜΔΣ), σε κυμαινόμενα ποσοστά (Gelsi-Boyer et al. 2009, Boultswood et al. 2010, Brecqueville et al. 2014, Maxson JE and Tyner 2017).

Σε κλινικό επίπεδο, τόσο σε ασθενείς με μυελικές νεοπλασίες, όσο και σε πειραματικά μοντέλα ποντικών, οι μεταλλάξεις *ASXL1* φαίνεται πως προάγουν τη θρομβοκυτταραιμία, καθώς και την υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων.

Τα κύτταρα αυτά είναι γνωστό πως συνθέτουν και εκκρίνουν πλειάδα προ-ινωτικών παραγόντων, γεγονός που συνάδει με την κλινική εικόνα των ασθενών, η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη ίνωσης στο μυελό των οστών (Kitamura 2018, Yang et al. 2018).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν πως η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *ASXL1*, σχετίζεται με πολύ κακή πρόγνωση και ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο πρόωρης λευχαιμικής εκτροπής, σε ασθενείς με ΠΜΙ, ΧΟΛ, καθώς και σε άλλα μυελικά νεοπλάσματα (Guglielmelli et al. 2011, Vannucchi et al. 2013, Elliott et al. 2015).

Έχει μάλιστα προταθεί ένα καινούργιο προγνωστικό μοντέλο για την αξιολόγηση του κινδύνου λευχαιμικής εκτροπής σε ασθενείς με ΠΜΙ, γεγονός που αποδεικνύει τη σημασία αυτών των μεταλλάξεων.

Συγκεκριμένα, ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALR*, ενώ παράλληλα ελέγχονται αρνητικοί για μεταλλάξεις *ASXL1* (*CALR*⁺/*ASXL1*⁻) φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση, από ασθενείς με μεταλλάξεις *ASXL1*, οι οποίοι ταυτόχρονα διαγιγνώσκονται αρνητικοί για μεταλλάξεις *CALR* (*CALR*⁻/*ASXL1*⁺), οι οποίοι επιδεικνύουν σαφώς μικρότερο ποσοστό επιβίωσης. Παράλληλα, ασθενείς στους οποίους ανιχνεύονται μεταλλάξεις και στα δύο αυτά γονίδια ταυτόχρονα (*CALR*⁺/*ASXL1*⁺), καθώς και ασθενείς χωρίς καθόλου μεταλλάξεις στους συγκεκριμένους γενετικούς τόπους (*CALR*⁻/*ASXL1*⁻), χαρακτηρίζονται ως ενδιάμεσου κινδύνου σε σχέση με τις δυο προηγούμενες κατηγορίες (Tefferi et al. 2014).

1.3.2.4.2 Το γονίδιο *EZH2*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *EZH2* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q36.1 και απαρτίζεται από 25 εξόνια. Κατόπιν εναλλακτικής ωρίμανσης προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA.

β. Η πρωτεΐνη

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, το γονίδιο *EZH2* κωδικοποιεί για μία καταλυτική υπομονάδα του κατασταλτικού συμπλόκου polycomb 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2), το οποίο αποτελεί μία μεθυλομεταφοράση. Η δράση της έγκειται στην προσθήκη της επιγενετικής σήμανσης H3K27me3.

γ. Οι μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *EZH2* ανιχνεύονται τόσο σε ασθενείς με ΜΔΣ/MYN (10-13%), όσο και σε ασθενείς με ΜΙ (8%), ενώ σχετίζονται με δυσμενή έκβαση, που περιλαμβάνει χαμηλή επιβίωση και ελαττωμένη περίοδο προόδου νόσου (Brecqueville et al. 2014, Zoi and Cross 2015).

Σε διάφορους τύπους συμπαγών όγκων (καρκίνος προστάτη, στήθους, ουροδόχου κύστης), οι μεταλλάξεις *EZH2* έχει αποδειχθεί πως οδηγούν σε απόκτηση νέων λειτουργιών. Αντιθέτως, στα αιματολογικά νοσήματα, φαίνεται πως συντελούν σε απώλεια (LOF mutations) της ογκοκατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης.

Μάλιστα, αφορούν κυρίως σε μεταλλάξεις πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης ή άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν άμεσα τη λειτουργική περιοχή με δράση μεθυλομεταφοράς (Ernst et al. 2010, You and Jones 2012, Rinke et al. 2017).

1.3.2.5 Μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων

1.3.2.5.1 Το γονίδιο *RUNX1*

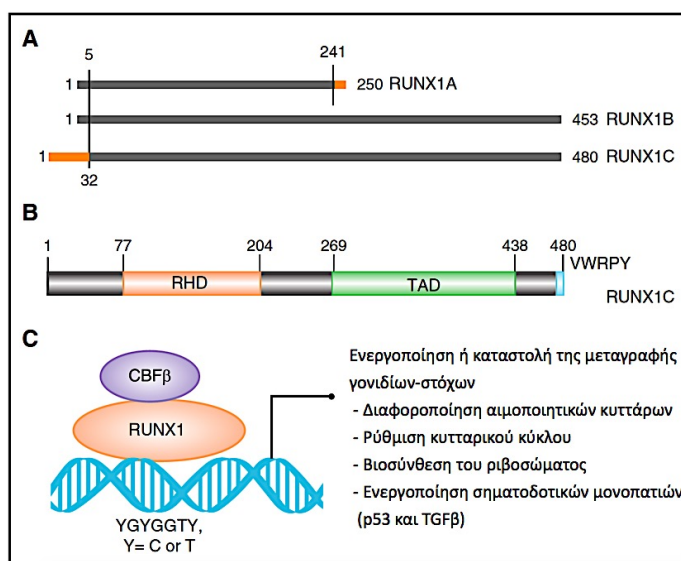
α. Το γονίδιο

Το *RUNX1*, αποτελεί το πρώτο μέλος μίας οικογένειας τριών γονιδίων, εδράζει στο χρωμόσωμα 21q22.12 και κωδικοποιεί για τρεις διαφορετικές ισομορφές πρωτεϊνών, οι οποίες προκύπτουν είτε εξαιτίας εναλλακτικής ωρίμανσης, είτε ως προϊόντα δύο ανεξάρτητων υποκινητών που απέχουν διαφορετική απόσταση από το γονίδιο.

β. Η πρωτεΐνη

Η μεταγραφή των ισομορφών 1A και 1B ξεκινά από τον υποκινητή που εντοπίζεται πλησίον του *RUNX1* και αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, ενώ η μεταγραφή της πρωτεΐνης 1C ξεκινά από τον πιο απομακρυσμένο υποκινητή του γονιδίου, προσδίδοντας έτσι 32 επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο, σε σύγκριση με την 1B (Εικόνα 23A).

Όλες οι ισομορφές ανεξαιρέτως περιλαμβάνουν μία συντηρημένη περιοχή 128 αμινοξέων (runt-homology domain, RHD), που χρησιμεύει για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA, ενώ οι 1B και 1C, περιέχουν μία επιπλέον περιοχή (transactivating domain, TAD) (Εικόνα 23B). Η τελευταία είναι χρήσιμη για τη δέσμευση και αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, που οδηγούν σε ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα *RUNX1* (Εικόνα 23C) (Sood et al. 2017).



Εικόνα 23. Δράση των ισομορφών *RUNX1* (τροποποίηση από Sood et al. 2017).

γ. Οι μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (LOF mutations), στο γονίδιο *RUNX1*, έχουν συσχετιστεί κυρίως με τα ΜΔΣ και με τη ΧΜΜΛ (37%), καθώς και με την εκτροπή αυτών προς ΟΜΛ.

Στις περιπτώσεις ασθενών με ΧΜΜΛ ανιχνεύονται μεταλλάξεις παρανοηματικές (missense mutations) στις περιοχές RHD ή TAD, ή ακόμη και μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations) ή μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), τόσο στο αμινοτελικό (-NH₂), όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο (-COOH) της πρωτεΐνης.

Σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με μεταλλάξεις *RUNX1*, συνανιχνεύονται μεταλλάξεις *FLT3* ή *RAS* (17%).

Σε ένα επίσης σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΧΜΜΛ και μεταλλάξεις *RUNX1* παρατηρείται συχνότερα εκτροπή νόσου (53%), συγκριτικά με αντίστοιχους ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο (33%). Το γεγονός αυτό, ωστόσο, φαίνεται πως είναι ανεξάρτητο της επιβίωσης, η οποία δε διαφέρει ανάμεσα στις δύο κοορτές (Kuo et al. 2009, Tsai et al. 2015, Cai et al. 2016, Reinig et al. 2016).

1.3.2.6 Μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στην ωρίμανση (μάτισμα) του RNA

Ως μάτισμα (splicing) ή ωρίμανση του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA), χαρακτηρίζεται η διαδικασία της αποκοπής και απομάκρυνσης των μη κωδικοποιουσών περιοχών (εσόνια) του pre-mRNA, με ταυτόχρονη συρραφή των περιοχών που κωδικοποιούν σε αμινοξέα (εξόνια), για το σχηματισμό ενός ώριμου μορίου mRNA, από το οποίο προκύπτουν λειτουργικές πρωτεΐνες μέσω της διαδικασίας της μετάφρασης.

Κατά την ωρίμανση, όμοια pre-mRNA δύνανται να παράξουν διαφορετικά ώριμα, πλήρως κωδικοποιά, μόρια mRNA, μέσω μίας φυσιολογικής διαδικασίας που είναι γνωστή ως εναλλακτικό μάτισμα.

Κατα τη διαδικασία αυτή, διαφορετικά εξόνια, σε κάθε περίπτωση, συμπλησιάζουν και ενώνονται μεταξύ τους, για να προσδώσουν μόρια ώριμου mRNA με διαφορετικό μήκος και αλληλουχία.

Το τελικό αποτέλεσμα είναι η σύνθεση πολλών διαφορετικών ισομορφών πρωτεϊνών από ένα μόνο γονίδιο. Μάλιστα οι πρωτεΐνες αυτές ενδέχεται να παρουσιάζουν διαφορετικές ή ακόμη και αντίθετες λειτουργίες (Will and Lührmann 2011, Qiu et al. 2016).

Τη διεργασία αυτή αναλαμβάνει το σωματίο ματίσματος (spliceosome). Αυτό είναι ένα μεγαλομοριακό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (ribonucleo proteins, RNP) σύμπλοκο, το οποίο απαρτίζεται από επιμέρους συμπλέγματα μικρών πυρηνικών RNA (small nuclear RNA, snRNA) με πρωτεΐνες, γνωστά ως μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (small nuclear ribonucleo proteins, snRNP), καθώς και από 50 τουλάχιστον επιπρόσθετες πρωτεΐνες.

Τα στοιχεία αυτά συναρμολογούνται στο σημείο συνένωσης εσονίου-εξονίου ενός pre-mRNA για να σχηματίσουν το σωματίο ματίσματος (Abdel-Wahab and Levine 2011).

Τα σωματίδια ματίσματος διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την ειδικότητα που έχουν:

- 1) Το U2-εξαρτώμενο σωματίδιο καταλύει την αφαίρεση των εσονίων τύπου U2. Αποτελείται από τα U1, U2, U5, και U4/U6 snRNPs, αλλά και από πολυάριθμες non-snRNP πρωτεΐνες. Ο τύπος αυτός αποτελεί την πλειονότητα των εσονίων που ανιχνεύονται (99%).
- 2) Το U12-εξαρτώμενο σωματίδιο καταλύει την αφαίρεση των λιγότερο συχνών εσονίων (1%) τύπου U12 και απαρτίζεται από τα U11, U12, U5, και U4atac/U6atac snRNPs (Patel and Steitz 2003, Abdel-Wahab and Levine 2011, Madan et al. 2015).

Η διαδικασία της ωρίμανσης ελέγχεται από συντηρημένες αλληλουχίες που φέρει το ίδιο το πρόδρομο mRNA (Εικόνα 24A):

- 1) Στο 3' άκρο του εξονίου που προηγείται κατά την ωρίμανση, ανιχνεύεται η 5' θέση ματίσματος του εσονίου (5' splicing site, 5'-ss). Η ριβονουκλεοτιδική αλληλουχία του εσονίου που αποκόπτεται ξεκινά με ένα μόριο γουανίνης ακολουθούμενο από ουρακίλη (GU).
- 2) Στο 5' άκρο του εξονίου που έπεται κατά την μάτισμα, ανευρίσκεται η 3' περιοχή ωρίμανσης του εσονίου (3' splicing site, 3'-ss), η οποία καταλήγει στη χαρακτηριστική ριβονουκλεοτιδική ακολουθία αδενίνη-γουανίνη (AG).
- 3) Η θέση διακλάδωσης (Branch site, BS) του εσονίου εντοπίζεται 18-40 νουκλεοτίδια πριν την 3'-ss. Σε αυτήν εμπεριέχεται μια βάση αδενοσίνης, η οποία χρησιμεύει για την πρώτη αντίδραση εστεροποίησης προς δημιουργία ενός ενδιάμεσου βρόγχου, ο οποίος διευκολύνει το συμπλησίωμα των δύο άκρων του εσονίου, ώστε να αποκοπεί τελικώς.
- 4) Η θέση διακλάδωσης ακολουθείται από μια πολυπυριμιδική αλληλουχία (polypyrimidine tract, PPT) περίπου 10 βάσεων, καθώς και από εξονικές και εσονικές αλληλουχίες ενισχυτών ή αποσιωπητών της ωρίμανσης (exonic and intronic splicing enhancers, ESEs and ISEs, exonic and intronic splicing silencers, ESSs and ISSs). Αυτές οι μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες ρυθμίζουν τη διαδικασία του ματίσματος (κύριο ή εναλλακτικό), προσδένοντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως αυτές της οικογένειας SR (Smith and Valcárcel 2000, Will and Lührmann 2011, Sperling et al. 2017).

Το σωματίδιο ματίσματος οργανώνεται επί του πρόδρομου mRNA, μέσω διαδοχικών προσδέσεων επιπρόσθετων snRNPs. Η διαδικασία της ωρίμανσης περιλαμβάνει συνοπτικά τα ακόλουθα στάδια (Εικόνα 24B):

- 1) Πρόσδεση του παράγοντα ματίσματος 1 (splicing factor 1, SF1) στο σημείο διακλάδωσης (BS).
- 2) Αναγνώριση της 5'-ss από το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σωματίδιο U1 snRNP.
- 3) Αναγνώριση της 3'-ss από τον βοηθητικό παράγοντα U2AF³⁵ (U2 auxiliary factor 35), που αποτελεί τη μικρή υπομονάδα του ετεροδιμερούς U2AF^{35/65}.
- 4) Αναγνώριση της πολυπυριμιδικής αλληλουχίας (PPT) από τον βοηθητικό παράγοντα U2AF⁶⁵ (U2 auxiliary factor 65), που αποτελεί τη μεγάλη υπομονάδα του ετεροδιμερούς U2AF^{35/65}.
- 5) Συμπλοκοποίηση ενός εκ των SRSF1/2 (serine-arginine rich splicing factors 1/2) και του ZRSR2 (Zinc finger RNA binding motif and serine/arginine rich 2), με το

ετεροδιμερές U2AF^{35/65}, με σκοπό τη σταθεροποίηση του τελευταίου επί του pre-mRNA.

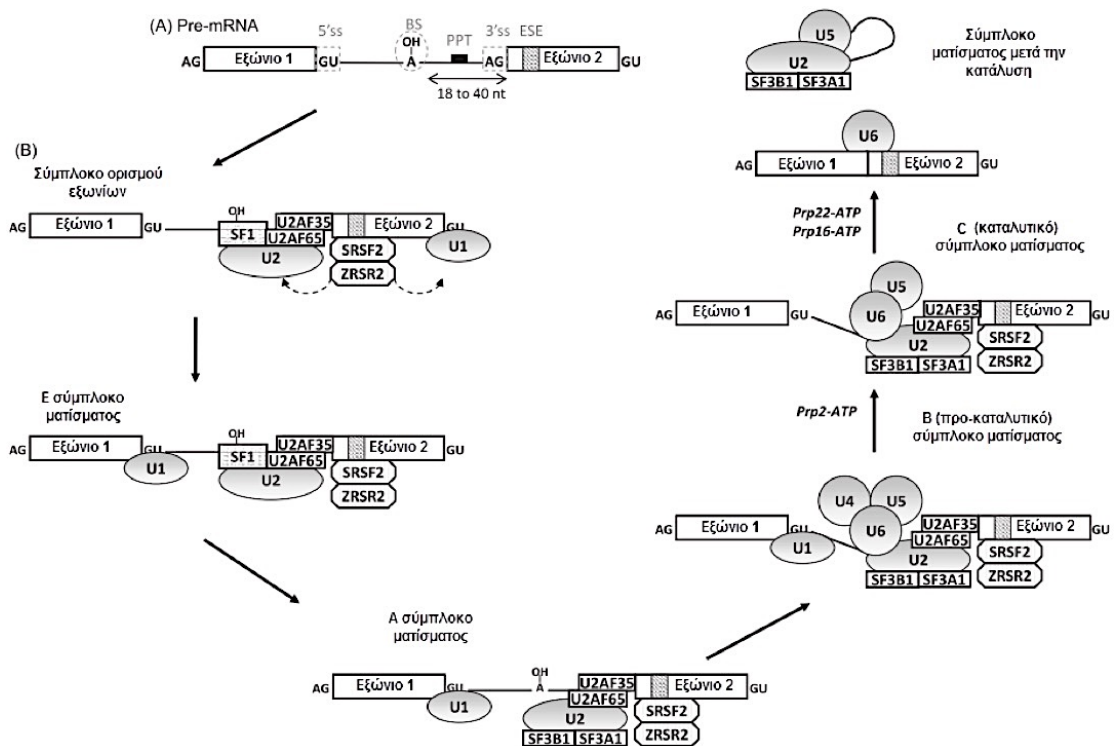
6) Πρόσδεση του ριβονουκλοπρωτεϊνικού συμπλόκου U2 snRNP, που αποτελείται από τις πρωτεΐνες SF3B1 και SF3A1, προς σχηματισμό του συμπλόκου ματίσματος E.

7) Απομάκρυνση του παράγοντα SF1, από το U2 snRNP, προς δόμηση του συμπλόκου ματίσματος A.

8) Το πρόδρομο καταλυτικό σωματίο ματίσματος (σύμπλοκο ματίσματος B) ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση των ριβονουκλοπρωτεϊνικών συμπλόκων U4/U6-U5.

9) Έπειτα από απομάκρυνση των U1 και U4 snRNPs και την ενσωμάτωση των ελκασών Prp2, Prp22 και Prp16, που φέρουν το χαρακτηριστικό μοτίβο DexHD, το σωματίο ματίσματος γίνεται λειτουργικό (σύμπλοκο ματίσματος C) και καταλύει την αντίδραση ωρίμανσης του mRNA. Τα εσόδια αφαιρούνται από το πρόδρομο mRNA μέσω δυο αντιδράσεων τρανσ-εστεροποίησης.

10) Ακολούθως, το σωματίο ματίσματος αποδιατάσσεται και τα στοιχεία του ανακυκλώνονται (Chesnais et al. 2012, Zoi and Cross 2015).



Εικόνα 24. Η διαδικασία της ωρίμανσης του RNA. Συντμήσεις: A, branch site, AG, splice acceptor site, ESE, exonic splicing enhancer, GU, splice donor site, SF1, splicing factor 1, PPT, polypyrimidine tract, Prp2, Prp22 and Prp16 elicases, SF3A1, splicing factor 3a subunit 1, SF3B1, splicing factor 3b subunit 1, SRSF2, serine and arginine rich splicing factor 2, U1-U6, U1-U6 small nuclear ribonucleo proteins, U2AF35, U2 small nuclear RNA auxiliary factor 35, U2AF65, U2 small nuclear RNA auxiliary factor 65, YYY, polypyrimidine tract, ZRSR2, zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2 (Τροποποίηση από Chesnais et al. 2012).

1.3.2.6.1 Το γονίδιο *SF3B1*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *SF3B1* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 2q33.1 και απαρτίζεται από 27 εξόνια. Κατόπιν εναλλακτικής ωρίμανσης προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA.

β. Η πρωτεΐνη

Το γονίδιο *SF3B1* κωδικοποιεί για την υπομονάδα 1 του παράγοντα ματίσματος 3b (subunit 1 of the splicing factor 3b, SF3B1). Από κοινού, με τον παράγοντα ματίσματος 3a (SF3a) και ένα 12S RNA, σχηματίζουν το U2 snRNP του σωματίου ματίσματος.

Το σύμπλοκο SF3a/SF3b προσδένεται ανοδικά του σημείου διακλάδωσης (branch site), στο εσόνιο ενός pre-mRNA, ανεξαρτήτως της ριβονουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Cazzola et al. 2013).

γ. Οι μεταλλάξεις

Στα αιματολογικά νοσήματα, στο γονίδιο *SF3B1*, ανιχνεύονται συνήθως σημειακές μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations), από το εξόνιο 14 έως το 16. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε απόκτηση λειτουργίας (GOF), εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία και εντοπίζονται κοντά στο συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελείται από 22 επαναλήψεις στοιχείων HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR).

Η μετάλλαξη με τη μεγαλύτερη συχνότητα, στο εξόνιο 15 του γονιδίου, οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος λυσίνη από γλουταμινικό οξύ στη θέση 700 του πρωτεϊνικού προϊόντος (K700E).

Άλλες μεταλλάξεις, όπως οι R625(H/C/L), H662Q, H662Q/D, E622D, K666(N/E/T/R/M/Q), N626Y, T663I, Y623C, ανευρίσκονται λιγότερο συχνά στο εξόνιο 14 (Chesnais et al. 2012, Broséus et al. 2013, Jeromin et al. 2013, Wan and Wu 2013).

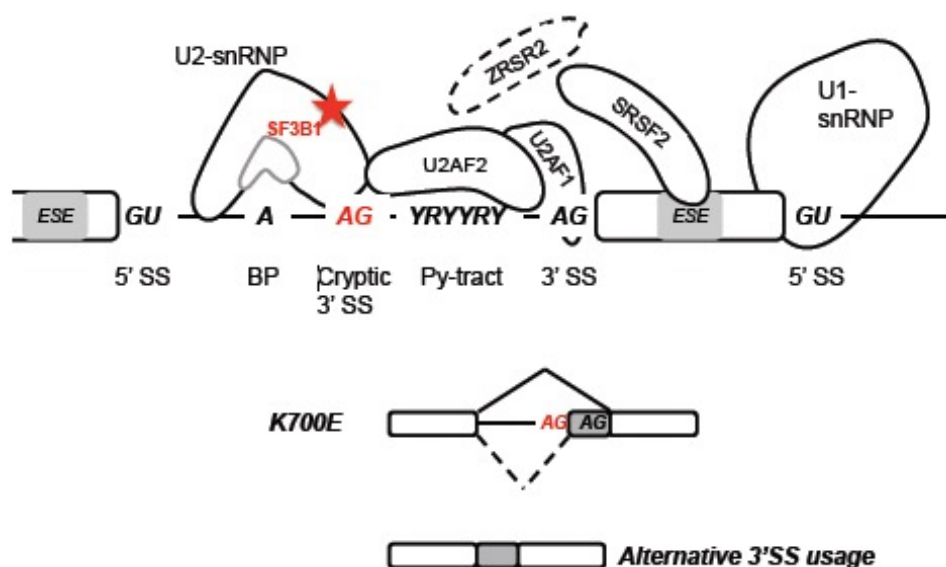
Σύμφωνα με *in silico* αναλύσεις, οι μεταλλάξεις που περιεγράφησαν, δεν εντοπίζονται σε σημεία ιδιαίτερως σημαντικά για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Συνεπώς, φαίνεται πως έχουν μικρότερη επίπτωση στη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης, διατηρώντας μερική ή/και ελαφρώς τροποποιημένη λειτουργικότητα (Paraemmanuil et al. 2011).

Επιπλέον, δεν παρατηρούνται συχνές μεταλλάξεις μετατόπισης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), καθώς και μεταλλάξεις δίχως νόημα (nonsense mutations), οι οποίες θα μπορούσαν να τροποποιήσουν σημαντικά το πρωτεϊνικό προϊόν.

Τα παραπάνω φαίνεται να συμφωνούν με κλινικά στοιχεία, τα οποία καταδεικνύουν πως οι μεταλλάξεις *SF3B1* σχετίζονται με ηπιότερο φαινότυπο νόσου (Broséus et al. 2013, Jeromin et al. 2013, Clara et al. 2016).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* εικάζεται πως επηρεάζουν είτε τον μηχανισμό του ματίσματος, είτε τον μηχανισμό της μεταγραφής, καθώς είναι πλέον γνωστό πως η ωρίμανση του πρόδρομου mRNA ξεκινά, όσο το μόριο μεταγράφεται ήδη στον πυρήνα του κυττάρου, μέσω διαρκούς αλληλεπίδρασης των μηχανισμών μεταγραφής και ματίσματος.

Τα στοιχεία που υπάρχουν σήμερα συντελούν στην εκτίμηση πως το τελικό αποτέλεσμα είναι η μειωμένη έκφραση (down regulation) γονιδίων που συμμετέχουν στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό (Paraemmanuil et al. 2011, Cazzola et al. 2013). Συγκεκριμένα η K700E, φαίνεται πως συντελεί σε σύνθεση προϊόντων εναλλακτικής ωρίμανσης, αφού η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη καθοδηγεί το σωματίο ματίσματος κατά τρόπο τέτοιο ώστε αναγνωρίζει εναλλακτικές 3'-ss θέσεις, οι οποίες εντοπίζονται ανάμεσα στη θέση διακλάδωση και την κανονική 3'ss, όπως φαίνεται στη γραφική απεικόνιση (Saez et al. 2017).



Εικόνα 25. Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων SF3B1. Συντημήσεις. SS: θέση ματίσματος, BP: θέση διακλάδωσης, Py-tract: πολυπυριμιδική αλληλουχία (Saez et al. 2017).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1 έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΧΛΛ (5-18%), με ΜΔΣ (20%) (Paraemmanuil et al. 2011), καθώς και με ΠΜΙ (5%) ή δευτεροπαθή ΜΙ απο ΙΘ (8%).

Ωστόσο, συχνότερα απαντώνται σε ασθενείς με ΜΔΣ-ΔΣ (60-80%) (Paraemmanuil et al. 2011, Chesnais et al. 2012, Wan and Wu 2013, Yoshimi and Abdel-Wahab 2017), με συνέπεια οι μεταλλάξεις του γονιδίου να συσχετίζονται σημαντικά με αυτόν τον παθολογικό φαινότυπο και πλέον τα SF3B1 θετικά ΜΔΣ-ΔΣ δύνανται να θεωρηθούν ως ξεχωριστή κλινική οντότητα (Harada and Harada 2015).

Σε παρόμοια ποσοστά (>80%) ανιχνεύονται μεταλλάξεις SF3B1 και στα ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ νεοπλάσματα. Σε αυτά, η συνανίχνευση της JAK2V617F με SF3B1 μεταλλάξεις, κυρίως την K700E και άλλες, αγγίζει περίπου το 64% των περιπτώσεων (Broséus et al. 2013, Jeromin et al. 2013).

1.3.2.6.2 Το γονίδιο U2AF1

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο U2AF1 εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 21q22.3 και απαρτίζεται από 11 εξόνια. Κατόπιν εναλλακτικής ωρίμανσης προκύπτουν διαφορετικοί συνδυασμοί εξονίων, οι οποίοι αποδίδουν διάφορες ισομορφές ώριμων προϊόντων mRNA.

β. Η πρωτεΐνη

Το γονίδιο *U2AF1* κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του παράγοντα U2AF (U2 auxiliary factor), η οποία έχει μέγεθος 35kD (kilo Daltons) και είναι γνωστή ως U2AF1 ή U2AF³⁵. Η μικρή υπομάδα U2AF³⁵, σε συνδυασμό με την μεγάλη υπομονάδα U2AF⁶⁵ (γονίδιο *U2AF2*) σχηματίζουν το ετεροδιμερές U2AF.

Ο παράγοντας U2AF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του σωματίου ματίσματος και κατά συνέπεια στην ωρίμανση του πρόδρομου mRNA.

Η υπομονάδα U2AF⁶⁵ αναγνωρίζει και προσδένεται στην πολυπυριμιδική αλληλουχία (PPT) του εσονίου, ενώ η U2AF³⁵ αναγνωρίζει την 3'-ss και προσδένεται σε αυτή κατά τα αρχικά στάδια οργάνωσης του σωματίου ματίσματος (Wu et al. 1999).

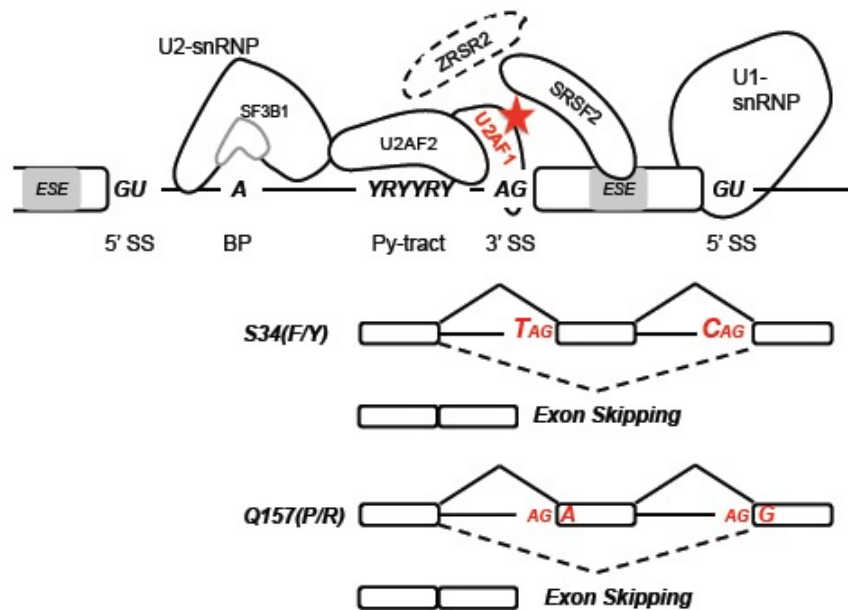
Η υπομονάδα U2AF³⁵, φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο τόσο στο κύριο, όσο και στο εναλλακτικό μάτισμα, μεσολαβώντας σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, αλλά και μεταξύ πρωτεΐνης-RNA, για αναγνώριση της 3'-ss.

Αυτό επιτυγχάνεται με δυο λειτουργικές δομικές περιοχές που φέρει. Το αμινοτελικό άκρο (-NH₂) της πρωτεΐνης U2AF³⁵ είναι πλούσιο σε κατάλοιπα σερίνης αργινίνης (SR rich) και χρησιμεύει για την αλληλεπίδραση του με πρωτεΐνες SR, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο επιτρέπει το σχηματισμό του ετεροδιμερούς U2AF³⁵/U2AF⁶⁵ (Zuo and Maniatis 1996).

γ. Οι μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις στο μόριο U2AF³⁵ εντοπίζονται σε δυο κυρίως περιοχές με δομή δακτύλου ψευδαργύρου (Zinc fingers), οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στην 3'-ss.

Η πρώτη είναι μία παρανοσηματική μετάλλαξη, στο εξόνιο 2, που οδηγεί σε μεταβολή της συντηρημένης σερίνης στη θέση 34 της πρωτεΐνης (S34), στον πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου, ενώ η δεύτερη εντοπίζεται στο εξόνιο 6, στις θέσεις R156 και Q157 του δεύτερου δακτύλου (Graubert et al. 2012). Οι δύο κατηγορίες μεταλλάξεων οδηγούν σε διαφορετικό πρότυπο ωρίμανσης του RNA (Maxson JE and Tyner 2017). Όπως φαίνεται στη γραφική απεικόνιση παρακάτω, οι μεταλλάξεις αυτές έχουν νεομορφική δράση (neomorphic activity mutations), καθώς επηρεάζουν την αναγνώριση των 3'-ss, οδηγούν έτσι σε παράλειψη εσονίων και μειωμένη έκφραση πληθώρας γονιδίων λόγω ανεπαρκούς ωρίμανσης του pre-mRNA, ως αποτέλεσμα της τροποποιημένης δράσης του μηχανισμού ματίσματος (Przychodzen et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις S34F/Y οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας της U2AF1 να προσδένεται στη θέση 3'-ss παρουσία ουρακίλης (U) στη συγκεκριμένη περιοχή του mRNA (αντίστοιχα θυμίνης (T) στο DNA, όπως φαίνεται στην εικόνα). Αντίστοιχα, οι μεταλλάξεις στο αμινοξύ Q157 προάγουν την επιλεκτική αναγνώριση των 3'-ss με μία γουανίνη (G), έναντι εκείνων με αδενίνη (A), αμέσως μετά το χαρακτηριστικό διουκλεοτίδιο AG.



Εικόνα 26. Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων U2AF1. Συντημήσεις. SS: θέση ματίσματος, BP: θέση διακλάδωσης: Py-tract: πολυπυριμιδική αλληλουχία (Saez et al. 2017).

Ένα μεγάλο ποσοστό, περίπου 5-10% του συνολικού μεταγραφώματος του κυττάρου επηρεάζεται από τις μεταλλάξεις U2AF1. Σε αυτό το ποσοστό συμπεριλαμβάνονται μετάγραφα γονιδίων που εμπλέκονται σε πληθώρα διεργασιών, όπως η μετάγραφή και η ωρίμανση του RNA, η μετάφραση, ο επιγενετικός μηχανισμό η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση (Saez et al. 2017).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο U2AF1 εντοπίζονται τόσο σε περιστατικά ΧΟΛ και αΧΜΛ, όσο και σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία (ΧΛΛ), ΧΜΜΛ, ΟΜΛ και σπανιότερα σε ΜΥΝ, ενώ στα ΜΔΣ οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με κακή πρόγνωση και πιθανότητα εκτροπή της νόσου σε ΟΜΛ (Graubert et al. 2012, Yoshida et al. 2011, Przychodzen et al. 2013).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται κυρίως σε ετεροζυγωτία και πως δεν συνδυάζονται με άλλες μεταλλάξεις γονιδίων του σωματίου ματίσματος καθώς φαίνεται πως κάτι τέτοιο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Makishima et al. 2012).

1.3.2.6.3 Το γονίδιο SRSF2

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο SRSF2 εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q25.1 και απαρτίζεται από 4 εξόνια. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δύο διαφορετικά λειτουργικά μετάγραφα, καθώς και ένα που δεν κωδικοποιεί πρωτεϊνικό προϊόν (non-coding mRNA).

β. Η πρωτεΐνη

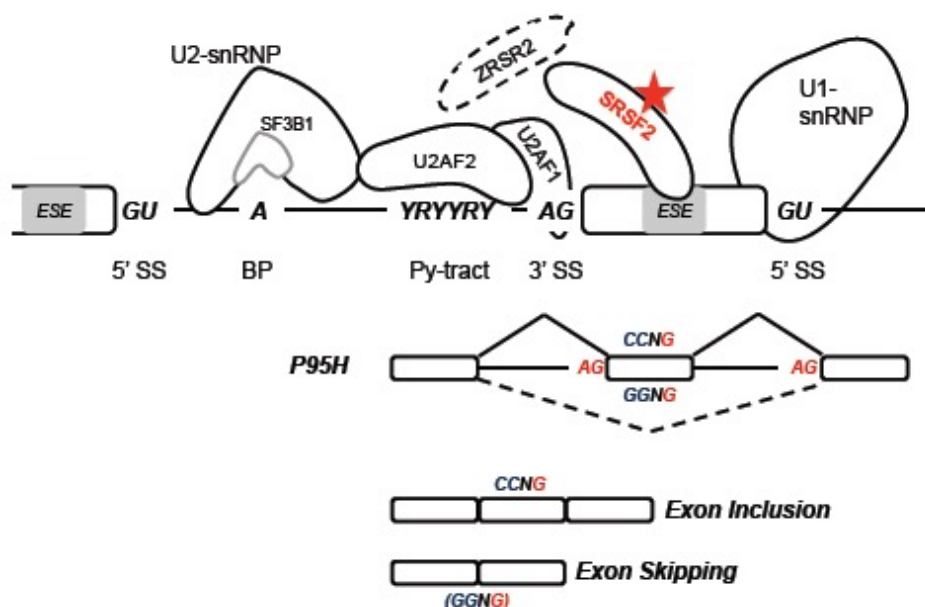
Το γονίδιο SRSF2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 25.5 kDa, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών SR (serine/arginine rich). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ως βασικό ρόλο την αναγνώριση των εσονίων από το σωματίο ματίσματος, μέσω πρόσδεσης τους σε ρυθμιστικές περιοχές για την ωρίμανση του RNA (Larsson et al. 2013).

Η πρωτεΐνη SRSF2 προσδένεται σε εξονικές θέσεις ενίσχυσης της ωρίμανσης (ESE, exonic splicing enhancers) των pre-mRNA μέσω της περιοχής αναγνώρισης RRM (RNA recognition motif domain) και δρα ουσιαστικά ως ενισχυτής για την αναγνώριση της 3'-ss από την υπομονάδα U2AF1 και βοηθά στην πρόσδεση της στο δινουκλεοτίδιο AG.

γ. Οι μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις αντικατάστασης του αμινοξέος προλίνη στη θέση 95 (P95) της πρωτεΐνης SRSF2 δεν συντελούν σε απώλεια λειτουργίας, έχουν ωστόσο νεομορφική δράση (neomorphic activity mutations), αφού οδηγούν σε προτιμητέα πρόσδεση της πρωτεΐνης, επί πλούσιων σε κυτοσίνη μοτίβων ESE (CCNG), έναντι αντίστοιχων περιοχών πλούσιων σε γουανίνη (GGNG), στο υπό ωρίμανση πρόδρομο mRNA.

Έτσι ορισμένα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος έχουν προτεραιότητα σύνθεσης έναντι άλλων. Αυτό οδηγεί σε υπέρμετρη σύνθεση δευτερευόντων πρωτεϊνικών προϊόντων, από τα οποία ενδεχομένως απουσιάζουν συγκεκριμένα εξόνια, που αποκόπτονται κατά την εναλλακτική ωρίμανση. Υπο φυσιολογικές συνθήκες τα δευτερεύοντα πρωτεϊνικά προϊόντα συντίθενται σε μικρότερες ποσότητες ή ακόμη και καθόλου (Saez et al. 2017).



Εικόνα 27. Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων SRSF2. Συντημήσεις. SS: θέση ματίσματος, BP: θέση διακλάδωσης, Py-tract: πολυπυριμιδινική αλληλουχία (Saez et al. 2017).

Ο δυσπλαστικός φαινότυπος που παρουσιάζουν οι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις εικάζεται ότι οφείλεται στη μειωμένη έκφραση κανονικών μεταγράφων γονιδίων όπως τα EZH2 and BCOR που εμπλέκονται έντονα στην παθογένεση των ΜΔΣ (Kim et al. 2015, Mughal et al. 2016).

Οι μεταλλάξεις SRSF2 στη θέση P95 του πρωτεϊνικού προϊόντος είναι οι δεύτερες πιο συχνές μοριακές βλάβες στα γονίδια του σωματίου ματίσματος στα ΜΔΣ (20-30%), ενώ εντοπίζονται και σε ασθενείς με ΧΜΜΑ (50%), αλλά και ΟΜΑ.

Οι μεταλλάξεις αυτές απαντώνται σχεδόν πάντα σε ετερόζυγη κατάσταση και σχετίζονται με κακή πρόγνωση (Kim et al. 2015), ενώ έχει παρατηρηθεί πως συνυπάρχουν αρκετά συχνά με κοινές μοριακές βλάβες στα γονίδια *IDH1* και *RUNX1* (Larsson et al. 2013).

1.3.2.6.4 Το γονίδιο *ZRSR2*

α. Το γονίδιο

Το γονίδιο *ZRSR2* εντοπίζεται επί του χρωμοσώματος X στη θέση p22.2 και απαρτίζεται από 14 εξόνια.

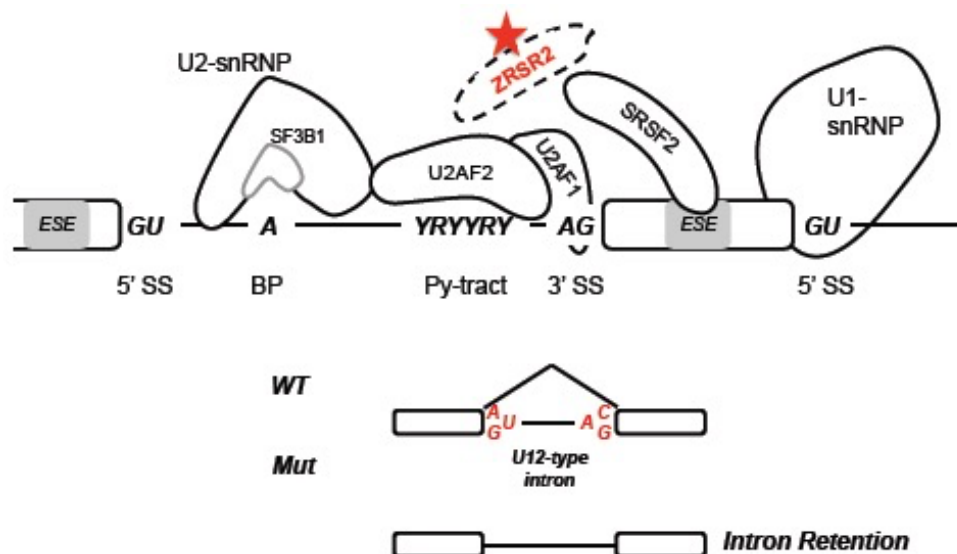
β. Η πρωτεΐνη

Ο παράγοντας *ZRSR2* που κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο, συμμετέχει στη διαδικασία ωρίμανσης του RNA, μέσω αναγνώρισης της 3'-ss. Αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία του πρόδρομου σωματίου ωρίμανσης, όπως το ετεροδιμερές U2AF2/U2AF1 και η πρωτεΐνη SRSF2, ενώ φαίνεται πως είναι απαραίτητος για το σωστό μάτισμα και των δύο τύπων εσονίων (εσόνια τύπου U2 και U12) (Madan et al. 2015).

γ. Οι μεταλλάξεις

Σε όλη την έκταση της κωδικής περιοχής, καθώς και στις θέσεις μάτισματος του γονιδίου *ZRSR2*, ανιχνεύονται μεταλλάξεις παρανοηματικές, χωρίς νόημα και μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας (LOF mutations) (Hong et al. 2015, Saez et al. 2017).

Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την ωρίμανση των εσονίων τύπου U12 (U12-type intron) κυρίως, οδηγώντας σε διατήρηση εσονικών περιοχών στο ώριμο mRNA και κατά συνέπεια σε διαφορετικό πρωτεϊνικό προϊόν (Saez et al. 2017).



Εικόνα 28. Μοντέλο δράσης των μεταλλάξεων *ZRSR2*. Συντμήσεις. SS: θέση μάτισματος, BP: θέση διακλάδωσης, Py-tract: πολυπυριμιδική αλληλουχία (Saez et al. 2017).

1.3.3 Συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων μικρής κλίμακας σε ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΥΝ/ΜΔΣ

Γονίδιο	Εξόνια	Λειτουργία	Πρόγνωση νόσου	Συχνότητα Εμφάνισης (%)							
				ΑΠ	ΙΘ	ΜΙ	ΧΟΛ	ΣΜ	αΧΜΛ	ΧΜΜΛ	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
JAK2	12	Κινάση τυροσίνης υποδοχέων	Δυσμενής	95 %	50-60 %	50-60 %	-	-	3-8 %	2-13 %	51-57 %
JAK2	14	Κινάση τυροσίνης υποδοχέων	Δυσμενής	2-5 %	-	-	-	-	-	-	-
CALR	9	Μοριακός συνοδός	Δυσμενής	-	15-25 %	20-25 %	-	-	3 %	-	0-5 %
MPL	10	Υποδοχέας κυτταροκινών	Δυσμενής	-	5-10 %	5-10 %	-	-	3 %	-	2-20 %
CSF3R	14+17	Υποδοχέας κυτταροκινών	Δυσμενής/Ουδέτερη	-	-	-	80-90 %	-	6 %	-	-
KIT	17	Υποδοχέας με εγγενή δράση κινάσης τυροσίνης	Ασαφής	-	-	-	-	82-89%	5 %	5 %	-
(K/N)RAS	2+3	GTPάση (Μεταγωγή σήματος)	Ουδέτερη	-	-	-	-	-	9-35 %	14-26 %	0-2 %
SETBP1	4	Μεταγραφικός παράγοντας	Ιδιαίτερα Δυσμενής	-	-	-	14-35 %	-	23-48 %	4-15 %	1 %
RUNX1	όλα	Μεταγραφικός παράγοντας	Ιδιαίτερα Δυσμενής	-	-	-	-	-	6-20 %	15-37 %	2 %
TET2	όλα	Επιγενετική δράση (DNA)	Ευνοϊκή	-	-	15-20 %	29 %	-	30-43 %	36-60 %	25-31 %
DNMT3A	όλα	Επιγενετική δράση (DNA)	Δυσμενής	-	-	5-8 %	-	-	5-20 %	2-6 %	15-18 %
IDH1/2	4	Επιγενετική δράση (DNA)	Δυσμενής/Ουδέτερη	-	-	5 %	-	-	1-10 %	5-10 %	-
ASXL1	12	Επιγενετική δράση (ιστόνες)	Ιδιαίτερα Δυσμενής	-	-	15-36 %	45-57 %	-	60-69 %	27-52 %	15-20 %
EZH2	όλα	Επιγενετική δράση (ιστόνες)	Δυσμενής	-	-	8 %	-	-	10-13 %	6 %	-
SF3B1	14-16	Ωρίμανση RNA	Ευνοϊκή	-	3 %	5-8 %	-	-	11 %	5-6 %	80-93 %
U2AF1	2+6	Ωρίμανση RNA	Δυσμενής	-	-	5-16 %	-	-	1-9 %	5-9 %	4-5 %
SRSF2	1	Ωρίμανση RNA	Δυσμενής	-	-	10-18 %	21-29 %	-	34-40 %	29-53 %	7-9 %
ZRSR2	όλα	Ωρίμανση RNA	Ασαφής	-	-	6-11 %	-	-	8-10 %	8 %	1-3 %

Πίνακας 9. Ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΔΣ/ΜΥΝ (Yoshida et al. 2011, Muramatsu et al. 2012, Klampfl et al. 2013, Nangalia et al. 2013, Al-Kali et al. 2013, Meggendorfer et al. 2014, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Zoi and Cross 2015, Clara et al. 2016, DiNardo et al. 2016, Ganguly and Kadam 2016, Mason et al. 2016, Rinke et al. 2017, Saez et al. 2017, Meggendorfer et al. 2018, Tefferi et al. 2018).

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα γονίδια που εμφανίζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις, στους ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΔΣ/ΜΥΝ (Κεφάλαιο 1). Επιπλέον, μελετήθηκαν και άλλες σποραδικές μεταλλάξεις, σε επιπρόσθετα γονίδια, που υποδηλώνουν την ανάπτυξη κλωνικών πληθυσμών, με αδιευκρίνιστη μέχρι στιγμής σημασία

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στις αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και την κριτική τους αξιολόγηση. Η τεχνική τους εκτέλεση αναφέρεται λεπτομερώς στο Β' μέρος της διατριβής (ημετέρα εργασία, κεφάλαιο 4).

Για την αποφυγή επαναλήψεων, η περιγραφή των τεχνικών που έχουν ήδη αναφερθεί λεπτομερώς στην βιβλιογραφία και, κυρίως, στις διατριβές που έχουν εκπονηθεί από το Εργαστήριό μας, είναι συνοπτική και περιλαμβάνει τις ακόλουθες τεχνικές:

- 1) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού σημείου (endpoint Polymerase Chain Reaction, PCR) και ανάδειξη των προϊόντων της PCR σε πήκκτη αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)
- 2) Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR)
- 3) Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR)
- 4) Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)
- 5) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)
- 6) Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου (Post Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)
- 7) Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων κατά τη μέθοδο Sanger (Sanger Sequencing)

Αντίθετα, στα ίδια κεφάλαια περιγράφονται εκτενώς οι μέθοδοι που έχουν πρόσφατα εισαχθεί στην έρευνα και χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή, μαζί με τις μεθόδους αξιολόγησης της πληροφορίας, την οποία αυτές μπορούν να αποδώσουν. Σε αυτή την ομάδα υπάγονται οι τεχνικές:

- 8) Μεθυλοειδική HRMA (Methylation specific HRMA, MS-HRMA)
- 9) Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)
- 10) Στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Targeted-Sequencing) με τεχνολογία επόμενης (δεύτερης) γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)
- 11) Ανάλυση μεταγραφώματος (RNA-Sequencing) με τεχνολογία επόμενης (δεύτερης) γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Γενική αρχή, ότι όλες οι τεχνικές Μοριακής Βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν, βασίζονται στον κανόνα της συμπληρωματικότητας, όπου κάθε αλυσίδα DNA αποτελεί μήτρα για το σχηματισμό της συμπληρωματικής της, ενώ τα νουκλεοτίδια αδενίνη και γουανίνη τοποθετούνται απέναντι σε θυμίνη και κυτοσίνη, αντίστοιχα.

2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τελικού σημείου (endpoint Polymerase Chain Reaction, PCR) και ανάδειξη των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)

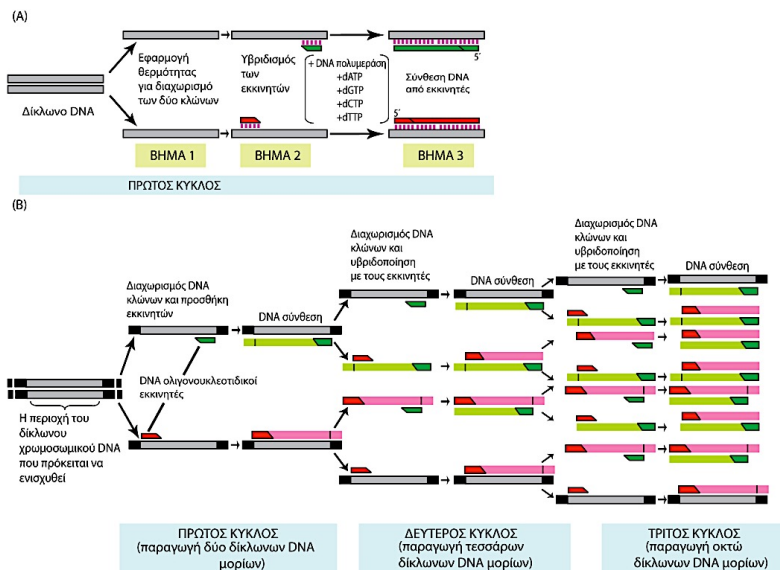
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση I, και επιτρέπει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος του γονιδιώματος (“ένισχυση”), ώστε αυτό να μελετηθεί περαιτέρω, για την ύπαρξη μεταλλάξεων ή για άλλους σκοπούς.

Η εφαρμογή της είναι εφικτή μόνον όταν η αλληλουχία ενός τμήματος της υπό διερεύνηση περιοχής αλληλουχίας είναι εκ των προτέρων γνωστή, ώστε επιτρέπει το σχεδιασμό και τη σύνθεση δύο ή περισσότερων τεχνητών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων, που είναι γνωστά ως εκκινητές (primers), τα οποία είναι απαραίτητα για τον αφορισμό του τμήματος πού θα ενισχυθεί κατά την αντίδραση.

Σε τεχνικό επίπεδο, η μέθοδος στηρίζεται σε διαδοχικούς κύκλους θερμοκρασιακών αλλαγών, όπου σε κάθε κύκλο ο αριθμός των προϊόντων διπλασιάζεται συγκριτικά με τον προηγούμενο.

Η ενίσχυση περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου υποστρώματος DNA (dissociation) ($92-96^{\circ}\text{C}$).
- 2) Πρόσδεση των εκκινητών (primer annealing), σε συμπληρωματικές αλληλουχίες επί του νουκλεϊκού οξέος (ιδανικά μεταξύ $50-70^{\circ}\text{C}$).
- 3) Επέκταση της περιοχής ενδιαφέροντος (extension) από πολυμέραση, με εναρκτήριο σημείο το 3' άκρο κάθε εκκινητή και κατεύθυνση 5'-3', επί αποδιατεταγμένου DNA (72°C).
- 4) Στο τέλος κάθε κύκλου, το προϊόν επιμήκυνσης κάθε εκκινητή αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή, στον επόμενο γύρο της αντίδρασης. Το προϊόν που προκύπτει είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA, τα άκρα του οποίου ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών, ενώ το μήκος του είναι ίσο με την απόσταση που απέχουν αυτοί μεταξύ τους (Sambrook and Russell 2001, Rychlik 2007).



Εικόνα 29. Η αντίδραση πολυμεράσης. (A) Τα στάδια μίας τυπικής αντίδρασης πολυμεράσης. (B) Εκθετική αύξηση των συντιθέμενων προϊόντων ανά κύκλο αντίδρασης (τροποποίηση από Alberts et al. 2002).

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, μέσω ηλεκτροφόρησης, συνήθως σε πηκτή αγαρόζη. Η αγαρόζη είναι γραμμικός πολυσακχαρίτης ουδέτερου φορτίου που απομονώνεται από θαλάσσια φύκη. Όταν μετατρέπεται σε πήκτωμα, δημιουργεί πόρους κατάλληλου μεγέθους για το διαχωρισμό μεγάλων μακρομορίων, με βάση το μέγεθός τους.

Στην πηκτή προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, μια αρωματική ένωση που παρεμβάλλεται στα δίκλινα μόρια νουκλεϊκών οξέων, προσδένεται σε αυτά και, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, αποδίδει ορατό φως, που μπορεί να καταγραφεί, αναδεικνύοντας την θέση τους, μετά την ηλεκτροφόρηση.

Η θέση αυτή αποτελεί ένδειξη για το μέγεθός τους, το οποίο μάλιστα μπορεί να καθορισθεί με σύγκριση προς ένα “μάρτυρα μεγέθους” που ηλεκτροφορείται παράλληλα. Ο μάρτυρας μεγέθους αποτελεί μία τεχνητά παρασκευασμένη ομάδα κατατμημένων τμημάτων DNA συγκεκριμένων μεγεθών.

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

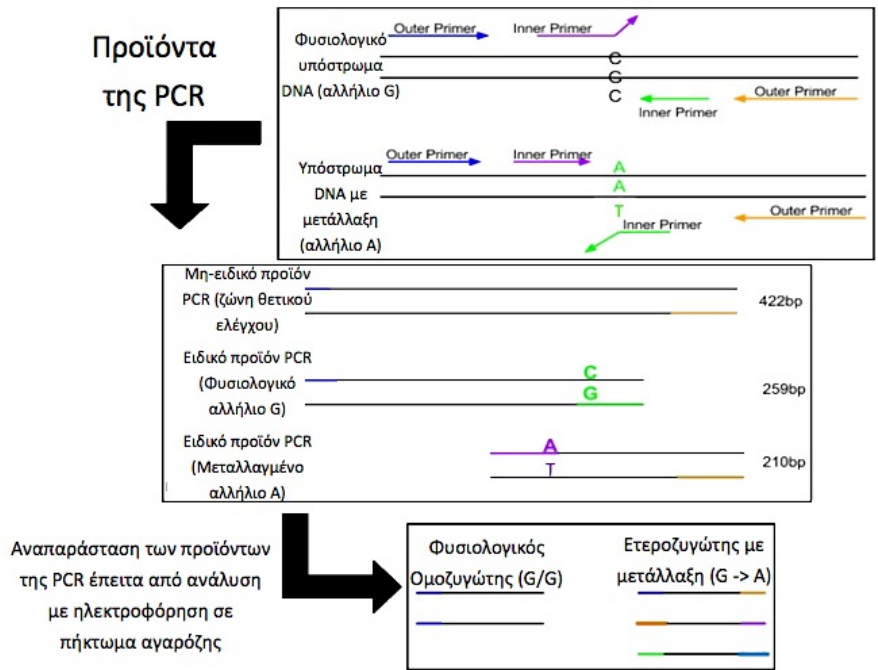
Το 1989, περιγράφηκε η εφαρμογή της PCR για την ανάλυση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων στο DNA και για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών μεταλλαγμένων γονότυπων.

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 υπο 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 αγαρόζη, καθότι διαφέρουν σε μέγεθος (Hu et al. 2012, Landsverk and Wong 2013).



Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση ARMS-PCR (με χρήση διπλού ζεύγους εκκινητών) (<http://35.9.122.10/inquiriesS2013/FOP/figure.jpg>)

2.3 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 31. Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR. Αριστερά: Απουσία μετάλλαξης συντίθενται μόνο ένα προϊόν που αφορά στη ζώνη θετικού ελέγχου. Δεξιά: Όταν υπάρχει μετάλλαξη, τότε

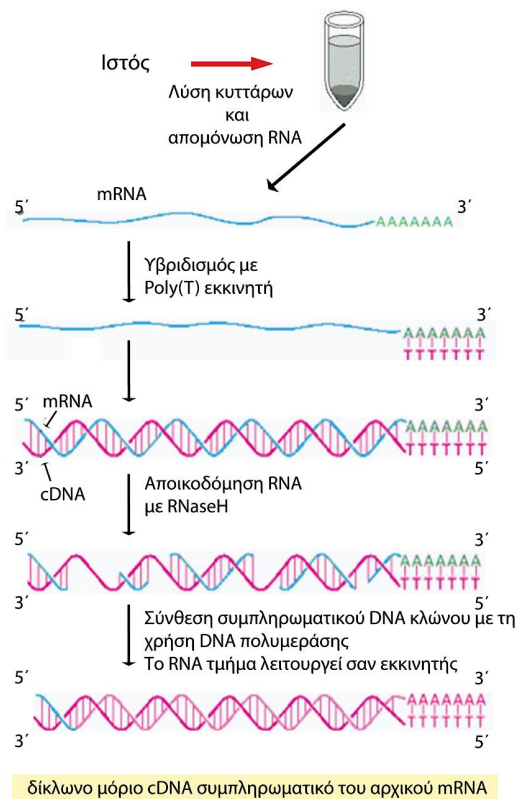
αναδεικνύονται δύο προϊόντα κατά την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης, η ζώνη θετικού ελέγχου, καθώς και ένα μικρότερο προϊόν, ειδικό του πολυμορφισμού.

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Παρομοίως με την PCR, η αντίστροφη μεταγραφή περιλαμβάνει διαδοχικές θερμοκρασιακές αλλαγές, με απώτερο στόχο την επέκταση του μεταγραφώματος στο σύνολό του. Το RNA χρησιμεύει ως εκμαγείο της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA, complementary DNA). Με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται υβριδικά δίκλινα μόρια, όπου ο ένας κλώνος αποτελείται από ριβονουκλεοτίδια, ενώ ο συμπληρωματικός του από δεοξυριβονουκλεοτίδια.

Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Η δράση του ενζύμου ξεκινά από την ελεύθερη υδροξυλομάδα, που εντοπίζεται στο 3' άκρο τυχαίων συνθετικών εξανουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τα οποία προσδένονται μη-ειδικά στο RNA εκμαγείο και λειτουργούν ως εκκινητές της μεταγραφής. Ακολουθεί επέκταση της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, με κατεύθυνση 5'-3'.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αναλύσεων που επιτελούνται σε επίπεδο RNA, είναι η ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, ή ακόμη και του πλήρους μεταγραφώματος, η ανίχνευση χιμαιρικών γονιδίων που προκύπτουν από φαινόμενα μεταθέσεων χρωμοσωμικών περιοχών του γενετικού υλικού, σπανιότερα η μελέτη σημειακών μεταλλάξεων και άλλες μελέτες (Wartman and Mardis 2016).



Εικόνα 32. Διαγραμματική απεικόνιση της αντίστροφης μεταγραφής.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), αποτελεί παραλλαγή της PCR τελικού σταδίου. Ωστόσο οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν εμφανείς, άλλα και ουσιαστικότερες διαφορές, όπως περιγράφεται ιστη συνέχεια:

1) Η προφανής διαφορά έγκειται στον τρόπο με τον οποίο παραλαμβάνονται και αναλύονται τα δεδομένα από τις δύο τεχνικές.

Η PCR τελικού σταδίου απαιτεί περαιτέρω χειρισμούς, όπως η ανάδειξη των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζη, ενώ παράλληλα, στηρίζεται σε οπτικά μέσα για την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Αντίθετα, στη Real Time PCR, το σύστημα είναι κλειστό, από τη στιγμή που ξεκινά η αντίδραση και μέχρι την ολοκλήρωσή αυτής. Η επέκταση των προϊόντων βασίζεται σε φθοριοχρώματα τα οποία προσδένονται στα δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης που σωρεύονται σταδιακά. Η διαδικασία αυτή παρακολουθείται καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω υπολογιστικού συστήματος. Ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα, ανάλογα με το πρωτόκολλο που έχει εφαρμοσθεί και το σκοπό που εξυπηρετεί η εκάστοτε πειραματική διαδικασία.

Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται μέσω ακτινοβολήσης και εκπέμπουν φθορίζοντα σωματίδια διαφορετικού μήκους κύματος, τα οποία γίνονται αντιληπτά από μία κάμερα υψηλής ανάλυσης που καταγράφει τη σταδιακή αύξηση του σήματος που προκύπτει.

2) Η ουσιαστική ωστόσο διαφορά, των δύο τεχνολογιών, έγκειται στην ανάλυση την οποία δύναται να επιτύχει καθεμιά εξ αυτών.

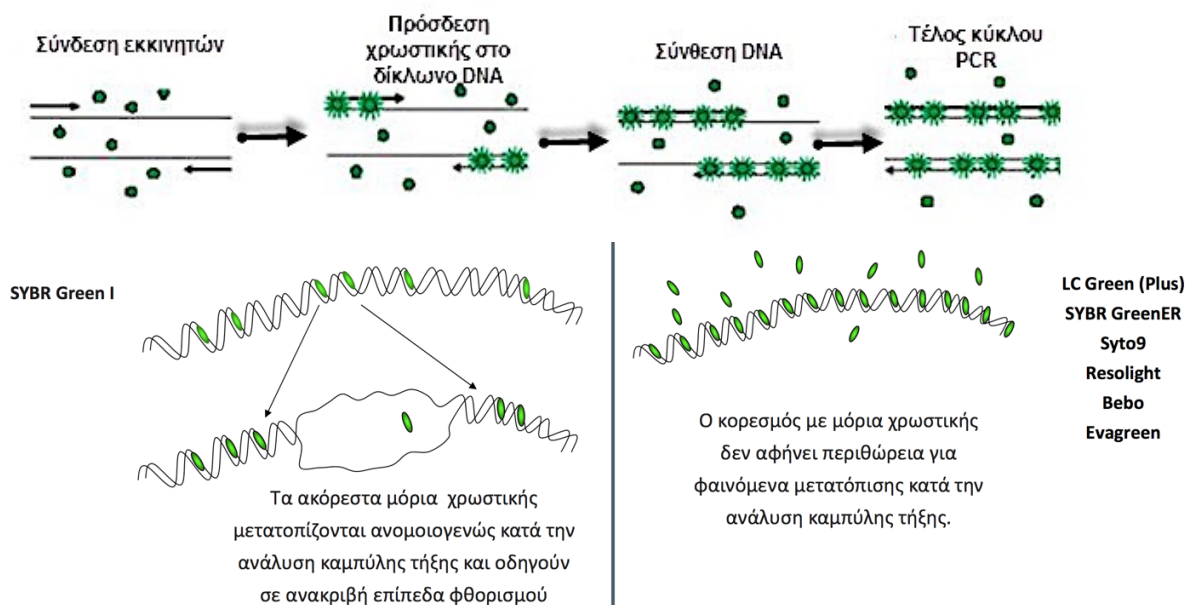
Η PCR τελικού σταδίου μπορεί να ανιχνεύσει συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις, μικρές διαγραφές ή προσθήκες νουκλεοτιδίων, καθώς και μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις με σχετική ευκολία, εφαρμόζοντας το κατάλληλο πρωτόκολλο.

Αντίστοιχα, η PCR πραγματικού χρόνου, αναγνωρίζει τα παραπάνω συμβάματα, πιο σύντομα και με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, ενώ παράλληλα απαιτεί λιγότερους χειρισμούς και μικρότερη ποσότητα υποστρώματος.

Παράλληλα όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιπρόσθετους αναλυτικούς σκοπούς, όπως είναι η παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειματικής νόσου στη ΧΜΛ και σε άλλες ομάδες ασθενών, μέσω απόλυτης ποσοτικής ανάλυσης (absolute quantification) χιμαιρικών μεταγραφών, ή ακόμη ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, μέσω σχετικής ποσοτικής ανάλυσης (relative quantification), καθώς και άλλες αναλύσεις (Zipper et al. 2004, Hu et al. 2012).

2.5.1 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 33. 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), η οποία θα περιγραφεί εκτενέστερα στη συνέχεια (Κεφάλαιο 2.7), αφού δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ξεχωριστή μεθοδολογία, με δική της παραμετροποίηση, που σήμερα χρησιμοποιείται ως τεχνική ταχείας ανίχνευσης νουκλεοτιδικών αλλαγών.

2.5.2 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 υποστρώμα 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 34 Α).

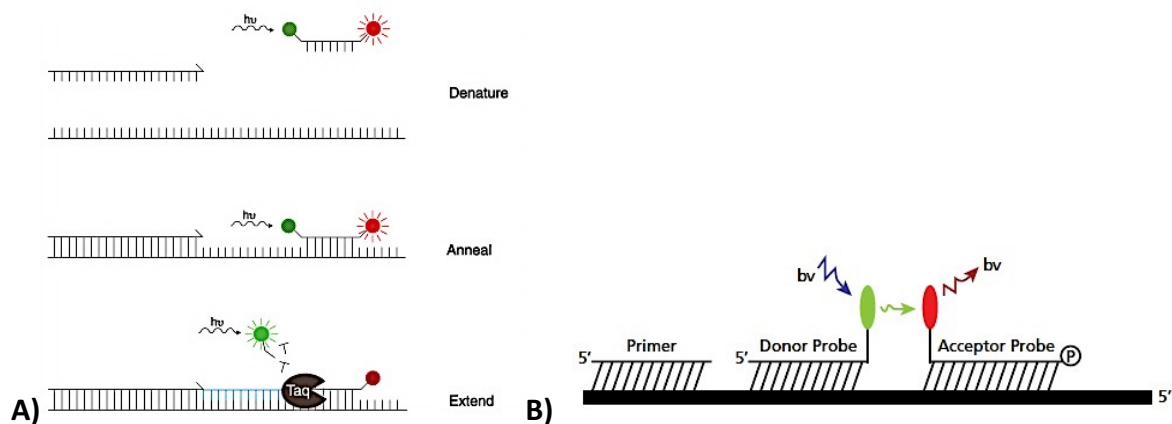
Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος και σε ελεύθερη κατάσταση στο διάλυμα τότε τα μόρια δότης και δέκτης είναι πλησίον. Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε αποσιώπηση του εκπεμπόμενου σήματος.

Εφόσον ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην συμπληρωματική του αλληλουχία εντός της περιοχής ενίσχυσης, τότε κατά το στάδιο της επέκτασης του προϊόντος της αντίδρασης, αυτός κατακερματίζεται απο 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 απο 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 επι του νουκλεϊκού οξέος που ενισχύεται με PCR (Εικόνα 34 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 απο 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

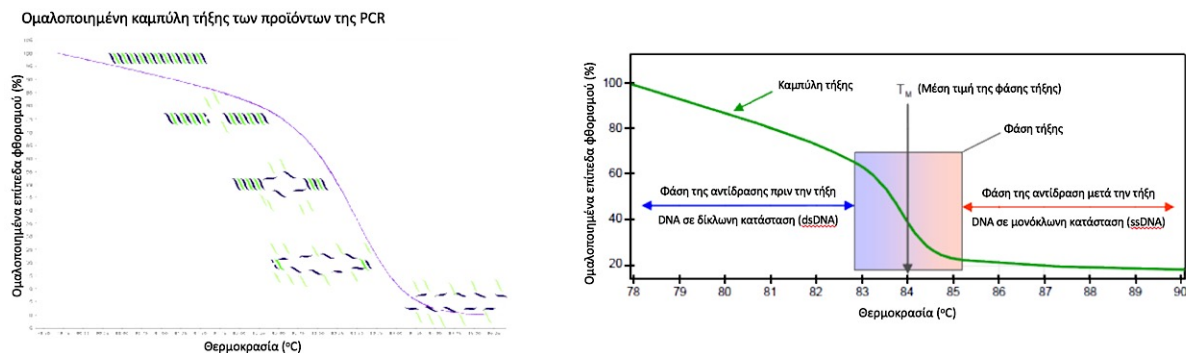


Εικόνα 34. PCR πραγματικού χρόνου με ειδικά φθοριοχρώματα. (Α) ιχνηθέτες υδρόλυσης και (Β) ιχνηθέτες υβριδοποίησης (Sigma-Aldrich 2008).

2.6 Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (Post Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR, είναι μία διαδικασία διακρίβωσης της ειδικότητας μίας αντίδρασης ενίσχυσης. Κατά την ανάλυση, η θερμοκρασία αυξάνεται αργά από τους 50-60°C, μέχρι τους 99°C, με ταυτόχρονη συνεχή παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, υπο φυσιολογικές συνθήκες, κατά την ανάλυση, ο φθορισμός των προϊόντων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στις χαμηλές θερμοκρασίες, όπου το σύνολο του DNA είναι δίκλωνο. Τα επίπεδα φθορισμού μειώνονται κατά τη φάση τήξης της ανάλυσης, οπότε και τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται σταδιακά, ενώ σταματούν να εκπέμπουν φθορισμό όταν πλέον ανιχνεύονται σε μονόκλωνη κατάσταση, στις πιο υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 35. Η καμπύλη τήξης. Αριστερά: Ανάλυση του προτύπου φθορισμού των προϊόντων PCR. Δεξιά: Η καμπύλη τήξης προκύπτει από την ανάλυση των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο (Τροποποίηση από Bio-Rad Laboratories Inc. 2010).

Όταν τα προϊόντα που προκύπτουν από την ενίσχυση με PCR, έχουν διαφορετικό μήκος λόγω προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων (Indels), ή έχουν διαφορετική αλληλουχία λόγω σημειακών αλλαγών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), σε σχέση με πρότυπα δείγματα φυσιολογικού γονότυπου, τότε όλα μεταξύ τους παρουσιάζουν ελαφρώς διαφοροποιημένο πρότυπο τήξης.

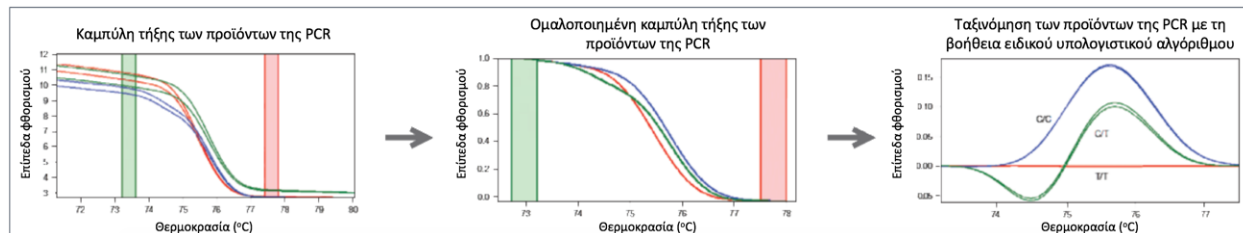
Έτσι, σε διάγραμμα με συντεταγμένες τα επίπεδα φθορισμού σε σχέση με τις θερμοκρασιακές αλλαγές, τα διαφορετικής αλληλουχίας δείγματα, εμφανίζονται ως διακριτές καμπύλες με διαφορετικό περίγραμμα και παραπλήσια ή όμοια κορυφή, η οποία αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή της φάσης τήξης (melting temperature, T_m).

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη διερεύνηση της ύπαρξης επιπρόσθετων κορυφών, σε θερμοκρασίες που αποκλείουν από την προαναφερθείσα μέση τιμή. Αυτές ενδέχεται να οφείλονται στο σχηματισμό επιπρόσθετων μη-εδικών προϊόντων της αντίδρασης, που μπορεί να επηρεάσουν τόσο την ενίσχυση της υπο μελέτη γενωμικής περιοχής, όσο και την ίδια την αναλυτική διαδικασία.

Με κατάλληλες συσκευές, υψηλής διακριτικής ικανότητας (π.χ. LightCycler480, Roche), οι ιδιότητες αυτής της μεθοδολογίας, χρησιμεύουν στην ταχεία ανίχνευση πολυμορφικών θέσεων

σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους, στην ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης σε υποκινητές γονιδίων, καθώς και για άλλους πειραματικούς σκοπούς.

Η τεχνική αυτή είναι ευρύτερα γνωστή ως υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR (post-Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA).



Εικόνα 36. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης. Το πρότυπο καμπύλης τήξης στην HRMA, τροποποιείται, ανάλογα με το γονότυπο κάθε δείγματος (Τροποποίηση από Bio-Rad Laboratories Inc. 2010).

2.6.1 Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική HRMA (Methylation specific HRMA, MS-HRMA)

Τα επίπεδα μεθυλίωσης είναι ήδη γνωστό ότι τροποποιούνται με το γήρας, καθώς και σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιολογικές παθήσεις (Delaney et al. 2015).

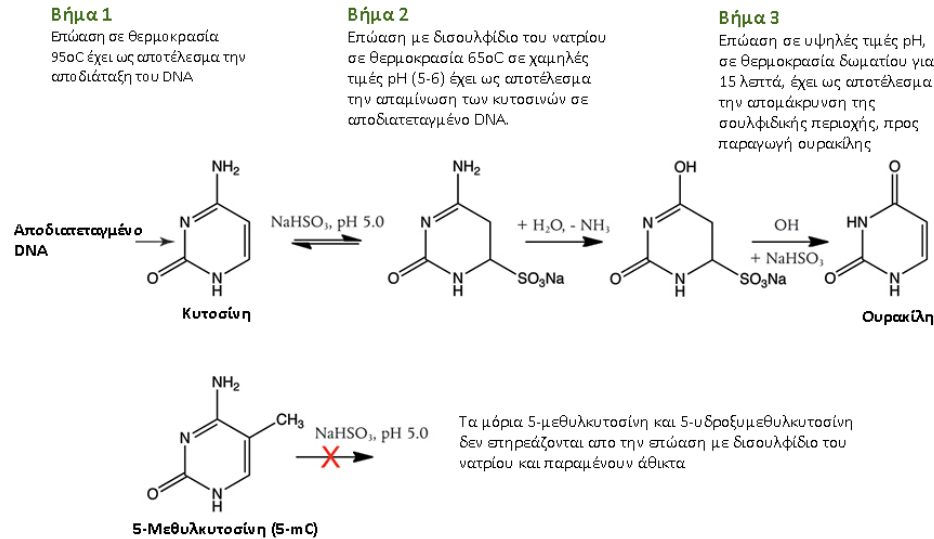
Ανεξάρτητα από τον προσδιορισμό των πολυμορφικών θέσεων, η μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA) και άλλες τεχνικές χρησιμεύουν στον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών (local methylation levels) (Wojdacz and Dobronic 2007, Migheli et al. 2013, Mastoraki et al. 2015), ή ακόμη και σε κατά προσέγγιση εκτίμηση αυτών των επιπέδων για ολόκληρο το γονιδίωμα (global methylation levels), μέσω της μελέτης διάσπαρτων πολυ-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, αφού το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται κατά 45% από τέτοια στοιχεία, τα οποία μάλιστα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι μεθυλιωμένα σε μεγάλο ποσοστό (Yang et al. 2004, Biotage AB 2007, Tse et al. 2011).

Ανεξάρτητα, η απώλεια μεθυλίωσης των στοιχείων, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση αυτών και γενετική αστάθεια, που εκδηλώνεται μέσω της μετάθεσής τους σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες είναι μεταγραφικά ενεργές, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης σημαντικών γονιδίων, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις (White et al. 2007, Newman et al. 2012, Moore et al. 2013).

Για τις αναλύσεις μεθυλίωσης, συνήθως απαιτείται ένα επιπρόσθετο προ-παρασκευαστικό στάδιο, κατά το οποίο πραγματοποιείται επεξεργασία του DNA με διθειφίδιο του νατρίου (sodium bisulfite treatment). Η χημική αυτή κατεργασία, οδηγεί σε σχηματισμό τεχνητών πολυμορφικών θέσεων στο υπόστρωμα, αφού τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης, τα οποία δεν ακολουθούνται από γουανίνη, μετατρέπονται σε ουρακίλη.

Αντίθετα, τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη (CpG), ενδέχεται να είναι μεθυλιωμένα. Εάν ισχύει αυτό, τότε προστατεύονται από τη χημική μετατροπή λόγω της

πλευρικής ομάδας που φέρουν, έτσι διατηρούνται ως νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Εάν όχι, τότε μετατρέπονται και αυτά σε ουρακίλη, όπως παρουσιάζεται στη γραφική αναπαράσταση που ακολουθεί (New England Biolabs 2015, Delaney et al. 2015).



Εικόνα 37. Η επίδραση του δισουλφιδίου του νατρίου στις κυτοσίνες (προσαρμογή από New England Biolabs 2015, Delaney et al. 2015).

Κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης, τα δείγματα με διαφορετικό ποσοστό μεθυλίωσης αποδιάσσονται με διαφορετικό ρυθμό. Τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης δεσμεύονται στα αντιπαράλληλα τους, νουκλεοτίδια γουανίνης, με τρεις φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, οι οποίοι απαιτούν δαπάνη μεγαλύτερης ποσότητας ενέργειας υπό μορφή θερμότητας, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη, συγκριτικά με τα ζεύγη θυμίνης-αδενίνης που φέρουν δύο δεσμούς. Έτσι, τα προϊόντα ενίσχυσης των δειγμάτων με αυξημένο ποσοστό μεθυλίωσης, τήκονται σε υψηλότερη θερμοκρασία, αφού φέρουν περισσότερες κυτοσίνες, σε σχέση με τα υπομεθυλιωμένα δείγματα, στα οποία οι μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες έχουν μετατραπεί σε ουρακίλες και στη συνέχεια κατά την ενισχυτική διαδικασία, σε θυμίνες, λόγω της χημικής κατεργασίας με δισουλφίδιο του νατρίου.

Κατά τη μεθυλοειδική HRMA, το ποσοστό της μεθυλίωσης των υπό διερεύνηση δειγμάτων, προσδιορίζεται μέσω αντιπαραβολής με μία καμπύλη αναφοράς. Αυτή καθορίζεται μέσω παράλληλης ανάλυσης, τεχνητά παρασκευασμένων πρότυπων δειγμάτων, με εκ των προτέρων γνωστά επίπεδα μεθυλίωσης, 0% και 100%. Τα δύο δείγματα με ακραίες τιμές μεθυλίωσης, αναμειγνύονται μεταξύ τους σε διαφορετικές αναλογίες και με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι ενδιάμεσες τιμές της πρότυπης καμπύλης.

Το μη-μεθυλιωμένο πρότυπο (0%) παρασκευάζεται μέσω PCR επέκτασης ολόκληρου του γονιδιώματος (multiple displacement-whole genome amplification, WGA), με χρήση του ενζύμου phi29 DNA Polymerase. Το πλήρως μεθυλιωμένο πρότυπο (100%) παρασκευάζεται μέσω ενζυμική μεταφοράς μεθυλομάδων στη θέση 5 του δακτυλίου της κυτοσίνης (5mC), όταν αυτή ακολουθείται από μία βάση γουανίνης (CpG), διεργασία που επιτελείται από το ένζυμο CpG μεθυλοτρανσφεράση (M.SssI).

2.7 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων κατά τη μέθοδο Sanger (Sanger Sequencing)

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, αναπτύχθηκαν μέθοδοι που κατέστησαν εφικτό τον εύκολο και γρήγορο προσδιορισμό της αλληλουχίας οποιουδήποτε κλάσματος DNA. Το DNA μπορεί να αναλυθεί με τη μέθοδο της χημικής διάσπασης σε συγκεκριμένες βάσεις, που αναπτύχθηκε από τους A. Maxam και W. Gilbert, ή με τη μέθοδο του ελεγχόμενου τερματισμού της αντιγραφής με τη χρήση δι-δεοξυαναλόγων που αναπτύχθηκε από τον F. Sanger και η οποία είναι η πιο διαδεδομένη (Sanger et al. 1977, Harrington et al. 2013).

2.7.1 Αυτοματοποιημένη μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger

Ο καθορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA, με τη μέθοδο του αυτοματοποιημένου ελεγχόμενου τερματισμού της αντιγραφής, με τη χρήση δι-δεοξυαναλόγων, περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του DNA-στόχου, ώστε να προκύψουν μονόκλωνες αλληλουχίες, οι οποίες θα χρησιμεύσουν ως εκμαγείο για *in vitro* αντιγραφή.
- 2) Ειδική πρόσδεση ενός εκκινητή, με συγκεκριμένη αλληλουχία, στο υπό μελέτη μονόκλωνο τμήμα DNA, ώστε να αρχίσει η αντιγραφή.
- 3) Αντιγραφή του υποστρώματος από μία τροποποιημένη DNA πολυμεράση χωρίς δραστηριότητα 5'-3' εξωνουκλεάσης. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται όλα τα τέσσερα διαφορετικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dGTP, dTTP, dCTP, dATP), αλλά και αντίστοιχες τροποποιημένες ισομορφές αυτών, γνωστές ως 2',3'-δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), καθεμία εκ των οποίων είναι επισημασμένη με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Τα ddNTPs, παρεμβάλλονται τυχαία στη συνθετική διαδικασία και σταματούν την επιμήκυνση της αλυσίδας, καθώς δε διαθέτουν στο 3' άκρο τους ένα ελεύθερο υδροξύλιο, που είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Οπότε, στο τελικό προϊόν, περιέχεται ένας μεικτός πληθυσμός τμημάτων DNA, που έχουν το ίδιο 5' άκρο, αλλά διαφορετική τροποποιημένη βάση στο 3' άκρο, ενώ παράλληλα, διαφέρουν ως προς το μήκος τους, ανάλογα με το σημείο στην αλληλουχία, όπου διακόπηκε η αντιγραφή. Το σύνολο των αντιγράφων, αναπαριστούν πλήρως τη συμπληρωματική αλληλουχία του υποστρώματος.
- 4) Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης σε τριχοειδή σωληνάκια.
- 5) Ανίχνευση των φθοριοχρωμάτων των επισημασμένων τμημάτων DNA, μέσω πηγής laser, ενόσω αυτά μετακινούνται εντός των τριχοειδών, μάλιστα, αντιστρόφως ανάλογα με το μεγεθός τους.
- 6) Αποθήκευση και ανάλυση των δεδομένων. Όλοι οι αυτόματοι αναλυτές περιέχουν προγράμματα περαιτέρω επεξεργασίας ή επιτρέπουν την εξαγωγή των δεδομένων, για ανάλυση σε άλλα προγράμματα επεξεργασίας νουκλεϊκών αλληλουχιών (Wartman 2013, Wartman and Mardis 2016).

Στην αρχική της μορφή, η τεχνική περιελάμβανε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις, όπου σε καθεμία περιέχονταν το υπόστρωμα DNA, σε μονόκλωνη κατάσταση, ένα ολιγονουκλεοτιδικό μόριο, που χρησιμεύει ως εκκινητής, το ένζυμο DNA πολυμεράση, τα τέσσερα διαφορετικά

τριφωσφωρικά νουκλεοτίδια (dNTPs), ένα εκ των οποίων είναι ραδιενεργά σημασμένο, μάλιστα αυτό είναι διαφορετικό στην εκάστοτε από τις τέσσερις αντιδράσεις, καθώς και το αντίστοιχο τροποποιημένο δι-δεοξυριβονουκλεοτίδιο (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), για τον τερματισμό της αντιγραφής.

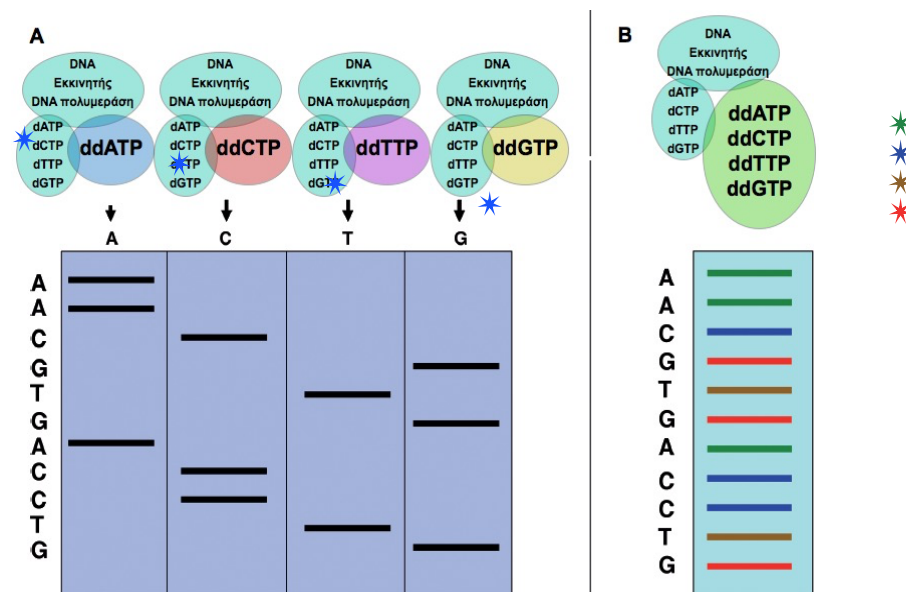
Η ανάλυση περιελάμβανε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των τμημάτων διαφορετικού μεγέθους και αυτοραδιογραφία (Εικόνα 37 Α).

Στην αυτοματοποιημένη της μορφή, η κατά Sanger μέθοδος προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, δεν περιλαμβάνει ραδιενεργά σημασμένα dNTPs, αλλά σημασμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα ddNTPs.

Η ανάλυση γίνεται σε μία αντίδραση, ενώ η σειρά των νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται μέσω της διαφορετικής κινητικότητας των τμημάτων όλων των πιθανών μεγεθών που σχηματίστηκαν κατά την ενίσχυση, με βάση το διαφορετικό φθοριόχρωμα, που φέρει το τροποποιημένο νουκλεοτίδιο που εισήχθει τελευταίο στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα (Εικόνα 37 Β) (Men et al. 2008).

Η ανάπτυξη αυτόματων αναλυτών αλληλουχίας, ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, υπήρξε σταθμός στην τεχνολογία ανάλυσης του DNA. Η τεχνολογία αυτή αυτοματοποίησε την ηλεκτροφόρηση, την ανίχνευση του σήματος και την ανάλυση του DNA, διαδικασίες που παλαιότερα απαιτούσαν ανθρώπινη παρέμβαση.

Επιπλέον, η χρήση φθοριζουσών χρωστικών στη θέση των ραδιενεργών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως μεγαλύτερη ασφάλεια χρήσης, κατάργηση των ραδιενεργών αποβλήτων, παραγωγή δεδομένων που μπορούν να γίνουν αντικείμενο επεξεργασίας κατευθείαν στον υπολογιστή, καθώς και μεγαλύτερη σταθερότητα αντιδραστηρίων (Wartman 2013, Wartman and Mardis 2016).



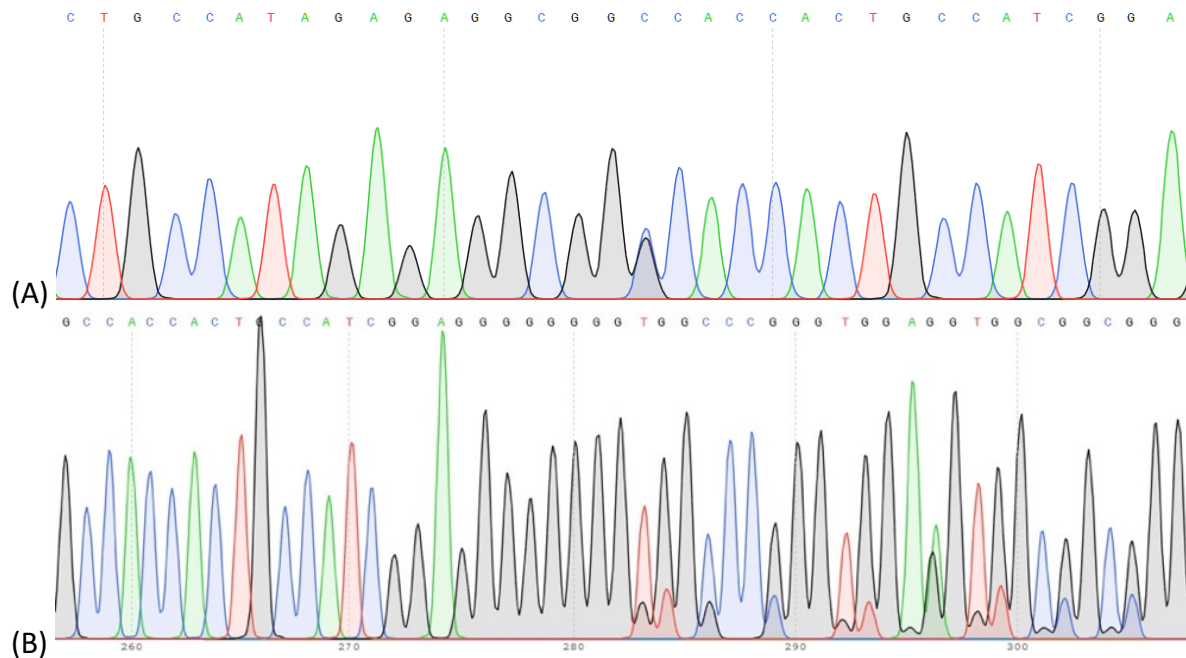
Εικόνα 38. Αρχή λειτουργίας του προσδιορισμού πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger. (Α) Αρχική μορφή της τεχνικής, όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά ραδιενεργά σημασμένα dNTPs σε κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται (Β) Αυτοματοποιημένη μορφή της μεθόδου όπου σε μία μόνο αντίδραση, περιλαμβάνονται όλα τα

τέσσερα ddNTPs, σημασμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα (προσαρμογή από Men et al. 2008).

2.7.2 Ανάλυση δεδομένων

Οι πολυμορφικές θέσεις, που οφείλονται σε σημειακή αντικατάσταση μίας βάσης, φαίνονται σαν δύο επικαλυπτόμενες κορυφές, σε καταστάσεις ετεροζυγωτίας (Εικόνα 38 A).

Στην περίπτωση των μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (ελλείψεις ή προσθήκες) έχουμε την εμφάνιση διπλών κορυφών από το σημείο που υπάρχει η μετάλλαξη μέχρι το τέλος του γραφήματος (Εικόνα 38 B) (Wartman 2013, Wartman and Mardis 2016).



Εικόνα 39. Ανάλυση δεδομένων προσδιορισμού κατά Sanger. (A) Σημειακή αντικατάσταση, η οποία εμφανίζεται ως διπλή ισοϋψής κορυφή, λόγω της συνύπαρξης, σε όμοιο ποσοστό, δύο διαφορετικών νουκλεοτιδίων στην ίδια θέση και (B) Εμφάνιση διπλών κορυφών, εξαιτίας προσθήκης μίας βάσης, η οποία προκαλεί αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης.

2.8 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)

2.8.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Με την τεχνική αυτή, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μίας νουκλεοτιδικής αλυσίδας επιτελείται ενόσω αυτή συντίθεται (sequence-by-synthesis, SBS).

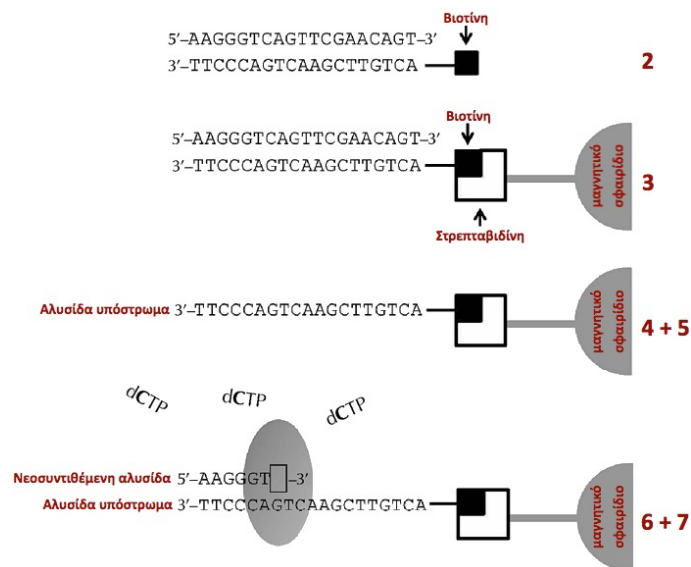
Η διαδικασία της σύνθεσης παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο μέσω της μέτρησης των μορίων πυροφωσφορικού οξέος, τα οποία εκλύονται κατά την πρόσδεση νουκλεοτιδίων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ ανιχνεύονται ως σωματίδια φωτεινής ακτινοβολίας μέσω κατάλληλων διαδοχικών ενζυμικών και χημικών αντιδράσεων (Nyrgén 1987, Hyman 1988).

2.8.2 Πειραματική και αναλυτική διαδικασία

2.8.2.1 Προετοιμασία της αντίδρασης

Το στάδιο της προετοιμασίας της αντίδρασης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Η αντίδραση αρχίζει με την ενίσχυση μίας ευρύτερης γενωμικής περιοχής, στην οποία περιλαμβάνεται και η υπό διερεύνηση νουκλεοτιδική αλληλουχία, μέσω αντίδρασης PCR.
- 2) Ένας από τους εκκινητές της PCR, φέρει ένα μόριο βιοτίνης στο 5' άκρο του. Κατά συνέπεια, στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης, οι αλυσίδες που προέχρονται από τον παραπάνω εκκινητή θα είναι σημασμένες με βιοτίνη.
- 3) Έπειτα, το δίκλωνο προϊόν της PCR προσκολλάται σε μαγνητικά σφαιρίδια, μέσω του βιοτυνλιωμένου άκρου της σημασμένης αλυσίδας, το οποίο συνδέεται με μόρια στρεπταβιδίνης που επαλείφουν τα σφαιρίδια. Κάθε σφαιρίδιο μπορεί να δεσμεύσει πολλές βιοτυνλιωμένες αλυσίδες.
- 4) Με εφαρμογή μαγνητικού πεδίου, τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται σε ειδικές κυψέλες, όπου αποδιατάσσονται χημικά, σε μονόκλωνες αλυσίδες.
- 5) Ακολουθεί έκπλυση κατά την οποία η μη-βιοτυνλιωμένη 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).



Εικόνα 40. Προετοιμασία αντίδρασης πυροαλληλούχισης. Κάθε σφαιρίδιο δεσμεύει αναρίθμητα προϊόντα PCR, ενώ εδώ απεικονίζεται μόνο ένα από αυτά, για λόγους ευκολίας ανάγνωσης (τροποποίηση από Harrington et al. 2013).

2.8.2.2 Κυρίως αντίδραση

Σε συνέχεια της προετοιμασίας για πυροαλληλούχιση, ακολουθεί η κυρίως αντίδραση:

- 6) Ένας εκκινητής, με καθορισμένη νουκλεοτιδική ακολουθία, προσδένεται στη συμπληρωματική του αλληλουχία, στη βιοτυνλιωμένη αλυσίδα.
- 7) Με την προσθήκη της κατάλληλης DNA πολυμεράσης (Klenow fragment), ξεκινά από το ελεύθερο 3' άκρο του εκκινητή, η προσθήκη dNTPs, στη νέα αλυσίδα, σε διαδοχικούς

γύρους. Σε κάθε γύρο, τα τέσσερα διαφορετικά dNTPs απελευθερώνονται μεμονωμένα, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους.

8) Εφόσον το dNTP που προστίθεται στο διάλυμα δεν είναι συμπληρωματικό προς το νουκλεοτίδιο της αλυσίδας που αντιγράφεται, τότε αυτό αποικοδομείται από το ένζυμο απυράση (apyrase), που υπάρχει ήδη στο περιβάλλον της αντίδρασης.

9) Αντίθετα, όταν υπάρχει συμπληρωματικότητα, τότε το dNTP συνδέεται, μέσω της πολυμεράσης, στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ ταυτόχρονα, απελευθερώνεται ένα μόριο ανόργανου πυροφωσφορικού οξέος (pyrophosphate inorganic, PPi) και ένα πρωτόνιο.

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

11) 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 φώς.

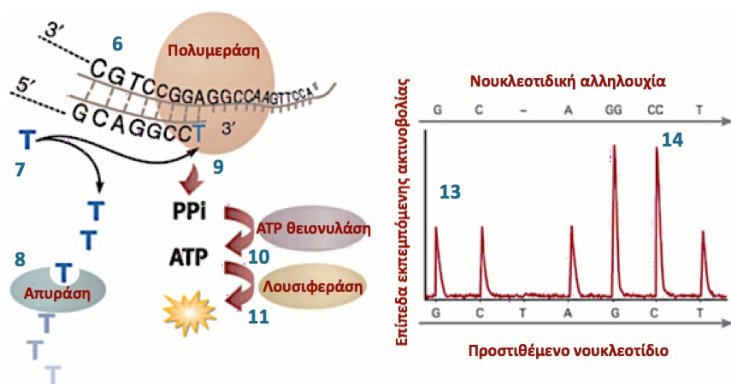
12) Το ATP και τα dNTPs που δεν ενσωματώθηκαν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, αποικοδομούνται από το ένζυμο απυράση για να ξεκινήσει ένας νέος γύρος διαδοχικής προσθήκης καθενός από τα τέσσερα διαφορετικά dNTPs, προκειμένου να ανιχνευθεί εκείνο που είναι συμπληρωματικό με το επόμενο στη σειρά νουκλεοτίδιο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

2.8.2.3 Ανάγνωση του αποτελέσματος

Τέλος, αναλύονται τα δεδομένα που προκύπτουν από την αντίδραση της πυροαλληλουχίσης

13) Η καταγραφή της φωτεινότητας που εκλύεται σε σχέση με το νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε κάθε βήμα της αντίδρασης αποδίδει την αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων στην αλυσίδα-μήτρα.

14) Και επειδή η ακτινοβολία είναι ανάλογη προς τον αριθμό των μορίων PPi που θα εκλυθούν, όταν 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 (Harrington et al. 2013).



Εικόνα 41. Χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις κατά την πυροαλληλούχηση (Hunja CW 2012).

2.8.3 Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική πυροαλληλούχιση (Methylation specific pyrosequencing, MSP)

Όπως έχει περιγραφεί ήδη για τις περισσότερες μελέτες μεθυλίωσης, έτσι και για τη μεθυλοειδική πυροαλληλούχιση το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου, με στόχο τη μετατροπή των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης, τα οποία δεν ακολουθούνται από γουανίνη, σε ουρακίλη και κατ'επέκταση σε θυμίνη. Ταυτόχρονα, τα μεθυλωμένα νουκλεοτίδια κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη (CpG), προστατεύονται από τη χημική μετατροπή και διατηρούνται ως νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Ωστόσο, εάν δε φέρουν μεθυλομάδες, τότε μετατρέπονται και αυτά σε ουρακίλη (New England Biolabs 2015, Delaney et al. 2015).

Ακολουθώντας, σχεδιάζονται PCR εκκινητές, κατάλληλοι για το χημικά τροποποιημένο υπόστρωμα. Οι ελεύθερες βάσεις κυτοσίνης, που εμπεριέχονται στην αλληλουχία του εκκινητή, αντιμετωπίζονται ως ουρακίλη, ωστόσο, η κατάσταση μεθυλίωσης των δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (CpG) είναι άγνωστη, για το λόγω αυτό κρίνεται σκόπιμο να αποφεύγονται. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, συντίθεται μεικτός πληθυσμός εκκινητών, για τη συγκεκριμένη θέση, που αφορά στην εκάστοτε περίπτωση.

Παράλληλα, ένας από τους εκκινητές φέρει μία ομάδα βιοτίνης, για πρόσδεση στην επικάλυψη με στρεπταβιδίνη, που φέρουν τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία συμμετέχουν στα στάδια καθαρισμού και αποδιάταξης των προϊόντων της αντίδρασης πυροαλληλούχισης, η οποία δε διαφέρει ως διαδικασία, σε σχέση με ό,τι περιγράφηκε προηγουμένως (Delaney et al. 2015).

2.8.4 Συγκριτική ανάλυση της πυροαλληλούχισης με τον προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger

Η πυροαλληλούχιση παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές, σε σύγκριση με τον προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger.

1) Κατά την πυροαλληλούχιση η σύνθεση της νέας αλυσίδας παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο. Αντίθετα, κατά τη μέθοδο Sanger, προηγείται η σύνθεση υπό ανάλυση τμημάτων, μέσω της διαδικασίας τερματισμού της αντιγραφής, με χρήση τροποποιημένων ddNTPs, ενώ, ο προσδιορισμός αλληλουχίας ακολουθεί σε δεύτερο στάδιο.

2) Σε αντίθεση με τον προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger, η πυροαλληλούχιση μπορεί να αποδώσει ποσοτικά αποτελέσματα, για συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές θέσεις, εφόσον η αλληλουχία της υπό διερεύνηση περιοχής είναι εκ των προτέρων γνωστή. Ταυτόχρονα όμως, απαιτείται, η παράλληλη ανάλυση πρότυπων δειγμάτων ομοζυγωτών, για κάθε νουκλεοτιδική θέση ενδιαφέροντος. Στα δείγματα αυτά, το ποσοστό ανίχνευσης της πρότυπης βάσης, η οποία έχει διευκρινιστεί εκ των προτέρων, λαμβάνει τις ποσοστιαίες αναλογίες 0% και 100%.

3) Η ευαισθησία της πυροαλληλούχισης, όσον αφορά στην ανίχνευση πολυμορφισμών, κυμαίνεται στο 5% και είναι σαφώς ανώτερη εκείνης που αποδίδει η τεχνική Sanger, η οποία προσδιορίζεται σε περίπου 10-20%.

4) Το μήκος διαβάσματος της πυροαλληλούχισης κυμαίνεται μεταξύ 100 και 400 βάσεων, ενώ ο προσδιορισμός αλληλουχίας κατά Sanger μπορεί να αναλύσει μέχρι και περίπου 1000 βάσεις (Harrington et al. 2013).

2.9 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία επόμενης (δεύτερης) γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

2.9.1 Ορισμοί

Ευαισθησία της ανάλυσης (Analytical Sensitivity)

Αντιπροσωπεύει την ικανότητα της ανάλυσης να αναδείξει μία μετάλλαξη, όταν αυτή είναι παρούσα, επομένως, αφορά στο ποσοστό των δειγμάτων τα οποία ορθά χαρακτηρίζονται θετικά για μία μετάλλαξη, την οποία φέρουν στην πραγματικότητα.

Ειδικότητα της ανάλυσης (Analytical Specificity)

Αντιπροσωπεύει την πιθανότητα η ανάλυση να μην αναδείξει μία μετάλλαξη, όταν αυτή δεν είναι παρούσα, επομένως, αφορά στο ποσοστό των δειγμάτων τα οποία ορθά χαρακτηρίζονται αρνητικά για μία μετάλλαξη, την οποία δε φέρουν στην πραγματικότητα.

Ακρίβεια (Accuracy)

Αντιπροσωπεύει το ποσοστό λάθος διαβασμένων νουκλεοτιδίων (error rate) και ταυτόχρονα την ακρίβεια με την οποία πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing accuracy). Προκύπτει έπειτα από αντιπαραβολή των δεδομένων με ένα πρότυπο γονιδίωμα.

Επαναληψιμότητα (Precision)

Αντιπροσωπεύει την επαναληψιμότητα, όσον αφορά στην ορθή ανίχνευση μεταλλάξεων, σε ανεξάρτητα πειράματα και με διαφορετικούς χειριστές.

Όριο ανίχνευσης (Detection limit)

Αντιπροσωπεύει το ελάχιστο ποσοστό μίας μετάλλαξης στον παθολογικό πληθυσμό κυττάρων, ώστε αυτή να είναι ανιχνεύσιμη από την αναλυτική συσκευή.

Βάθος διαβάσματος

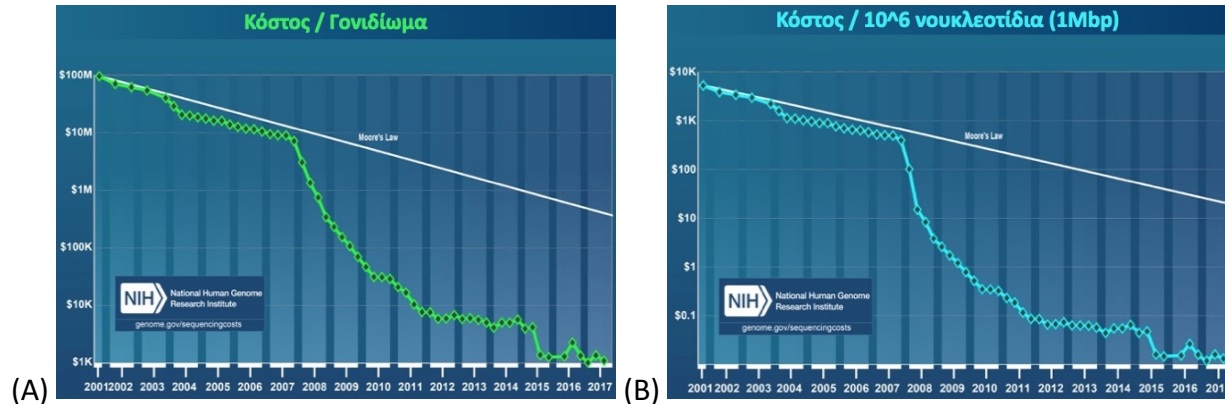
Αντιπροσωπεύει το πλήθος των διαβασμάτων για κάθε νουκλεοτιδική θέση (sequencing coverage) και αποτελεί μία χρήσιμη παράμετρο για την αξιοπιστία (confidence) με την οποία ανιχνεύονται και αναδεικνύονται οι μεταλλάξεις από την αναλυτική συσκευή (Luthra et al. 2015).

2.9.2 Εισαγωγή

Τριάντα περίπου χρόνια μετά την ανακάλυψη της μεθόδου προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με χρήση ddNTPs, πραγματοποιήθηκε εκ νέου σημαντική πρόοδος στο συγκεκριμένο τομέα, με την εμφάνιση εξελιγμένων αναλυτικών συσκευών.

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), μείωσε δραματικά το κόστος και το χρόνο μελέτης του γονιδιώματος, αφού επέτρεψε την ταυτόχρονη διερεύνηση περισσότερων γενωμικών περιοχών, για μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ταυτόχρονα σε μία αντίδραση.

Παράλληλα, η τεχνολογία NGS, παρέχει ποσοτικά στοιχεία σχετικά με το ποσοστό των μεταλλαγμένων αλληλίων σε ένα δείγμα (VAF, variant allele frequency), συγκρίνοντας το πλήθος των αλύσεων, κατά συνέπεια τον αριθμό των κυττάρων, που φέρουν μετάλλαξη, σε σχέση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές αλυσίδες (Luthra et al. 2015).



Εικόνα 42. Οικονομικοτεχνική ανάλυση της τεχνολογίας NGS.(A) Κόστος χαρτογράφησης ενός γονιδιώματος, ανά έτος και (B) κόστος προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων ανά μεγαβάση (1 Megabase (1 Mbp)), ανά έτος (Wetterstrand 2017).

Ωστόσο, σε συνδυασμό με τα θετικά στοιχεία της νέας τεχνολογίας, παράλληλα, επήλθαν καινούργιες τεχνικές προκλήσεις, ενώ άλλες προϋπάρχουσες μεγιστοποιήθηκαν.

Δύο μειονεκτήματα των νέων συσκευών, αφορούν στις σχετικά μικρότερου μήκους νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που μπορούν να διαβάσουν (read length) (35-700 bp), όπως και στο σχετικά υψηλότερο ποσοστό λάθους, κατά το διάβασμα των επί μέρους νουκλεοτιδίων (error rate) (0.1-2.0%), συγκριτικά με τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger (έως 900 bp μήκος διαβάσματος και λιγότερο από 0.001% ποσοστό λάθους).

Οι τιμές αυτές, πάντως, ποικίλουν ανάλογα με την πλατφόρμα NGS και την τεχνολογία που χρησιμοποιεί καθμία εξ αυτών, όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2.9.6.

Εν τω μεταξύ, σημαντική βελτίωση, στην αξιοπιστία (confidence) των αποτελεσμάτων, έχει σημειωθεί με την αυτοματοποίηση των σταδίων προετοιμασίας των βιβλιοθηκών, μέσω χρήσης ρομποτικών συστημάτων, γεγονός που συνέβαλε σε μειωμένη διακύμανση μεταξύ των πειραματικών διαδικασιών, αλλά και με τη βελτίωση της χημείας που χρησιμοποιεί κάθε τεχνολογία, οδηγώντας έτσι σε αύξηση του συνολικού αριθμού διαβασμάτων και ταυτόχρονα σε αυξημένο βάθος διαβάσματος (read depth) κάθε νουκλεοτιδικής θέσης. Οι παραπάνω, καθώς και επιπρόσθετες λιγότερο σημαντικές καινοτομίες, συνετέλεσαν σε ενισχυμένη ακρίβεια (accuracy), επαναληψιμότητα (precision), ειδικότητα (specificity) και ευαισθησία (sensitivity) της μεθόδου, ενώ παράλληλα μείωσαν τα όρια ανίχνευσης μεταλλάξεων (detection limit).

Παράλληλα, προς την ίδια κατεύθυνση συνεισέφερε και η ανάπτυξη περισσότερο εξελιγμένων αλγόριθμων βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων. Η απουσία συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας, καθιστά μονόδρομο τη χρήση πακέτων βιοπληροφορικών αναλύσεων. Έτσι, η αναζήτηση για ολοένα και πιο εξειδικευμένο προσωπικό σε συνδυασμό με την ανάγκη για αυξημένη υπολογιστική ισχύ, καθώς και μεγαλύτερους αποθηκευτικούς χώρους,

λόγω του τεράστιου όγκου δεδομένων (big data), που απορρέουν από αυτές τις τεχνολογίες, αυξάνει εν μέρη το κόστος χρήσης της νέας τεχνολογίας (Luthra et al. 2015, Park and Kim 2016, Wartman and Mardis 2016).

2.9.3 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε το 2005 από την εταιρεία Solexa (ιδρύθηκε το 1998 από τους Balasubramanian και Klepnerman), η οποία, την επόμενη χρονιά, εξαγοράστηκε από την Illumina, οπότε και έγινε ευρύτερα γνωστή και εμπορικά διαθέσιμη (Shendure et al. 2017).

Η εταιρεία Illumina παρέχει ένα ευρύ φάσμα συσκευών, με δυνατότητα κυμαινόμενου αριθμού διαβασμάτων (reads), από περίπου 25×10^6 έως 3×10^9 , τα οποία χρησιμεύουν στον ταυτόχρονο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας πολλαπλών γενετικών στόχων ανά αντίδραση, ενδεικτικά από 0.5×10^9 (gigabase, Gb), έως πάνω από 1.5×10^{12} (terabase, Tb) βάσεις.

Η κάθε αντίδραση διαρκεί από λίγες ώρες, έως μερικές ημέρες, γεγονός που εξαρτάται από το πλήθος των διαβασμάτων και κατά συνέπεια των δεδομένων που εξάγονται σε κάθε περίπτωση (data output) (Wartman and Mardis 2016).

Οι συσκευές Illumina βασίζονται στην τεχνολογία που είναι ευρύτερα γνωστή ως προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων, διαμέσου προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων, με την τεχνολογία του αντιστρεπτού τερματισμού της αντιγραφής (SBS/CRT, Sequencing by Synthesis/Cyclic Reversible Termination).

Συνοπτικά, κατά τη διαδικασία αυτή, οι αλληλουχίες που πρόκειται να αναλυθούν, προσδένονται σε μία επιφάνεια πυριτίου και χρησιμεύουν ως καλούπι για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων, που επεκτείνονται μέσω ενζυμικής προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων, τα οποία φέρουν διαφορετικά φθοριοχρώματα.

Οι ευρύτερα διαδεδομένες συσκευές Illumina ακολουθούν δύο διαφορετικές μεθοδολογίες ανίχνευσης των νουκλεοτιδίων που προστίθενται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Στη μία περίπτωση συμπεριλαμβάνονται τέσσερα διαφορετικά φθοριοχρώματα (4-channel sequencing), ένα για κάθε νουκλεοτίδιο (συσκευές MiSeq και HiSeq).

Στη δεύτερη περίπτωση, τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης και θυμίνης, φέρουν δύο διαφορετικά φθοριοχρώματα (2-channel sequencing), κόκκινο και πράσινο, αντίστοιχα, παράλληλα τα νουκλεοτίδια αδενίνης φέρουν και τις δύο αυτές χρώσεις ταυτόχρονα, αποδίδοντας συνδυαστικά, κίτρινο χρώμα, ενώ η μη απόδοση ακτινοβολίας εκλαμβάνεται ως προσθήκη νουκλεοτιδίου γουανίνης, αφού αυτά δε φέρουν κανένα από τα παραπάνω φθοριοχρώματα (συσκευές NextSeq και MiniSeq) (Luthra et al. 2015).

2.9.4 Πειραματική και αναλυτική διαδικασία

2.9.4.1 Προετοιμασία της αντίδρασης

Ανλυτικά, η διαδικασία της προετοιμασίας βιβλιοθηκών νουκλεϊκών οξέων για προσδιορισμό της αλληλουχίας αυτών περιλαμβάνει:

- 1) Απομόνωση του κατάλληλου κλάσματος νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA, το τελευταίο σε συνδυασμό με προετοιμασία cDNA), η οποία εξαρτάται από το στόχο της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας.

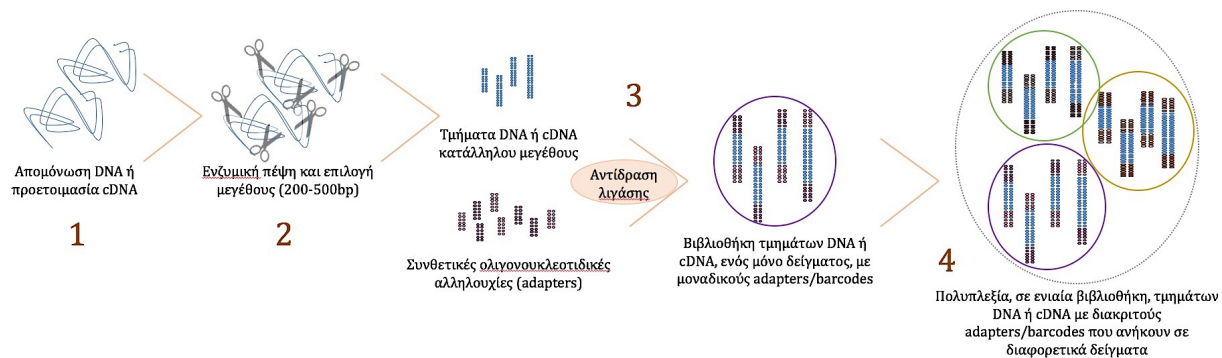
2) Κατακερματισμός των νουκλεϊκών οξέων, προς σχηματισμό αλυσίδων που κυμαίνονται σε μέγεθος, από 200 έως 500 βάσεις, ανάλογα με το πρωτόκολλο και το είδος της ανάλυσης.
 3) Αντίδραση λιγάσης, για ενσωμάτωση, στα άκρα των κατακερματισμένων τμημάτων, διακριτών για κάθε δείγμα, συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (adapters), οι οποίες έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο στο πειραματικό, όσο και στο αναλυτικό σκέλος της τεχνικής.

3α) Ένα μικρό τμήμα της συνθετικής αλληλουχίας (barcode), που περιλαμβάνει 6-8 τυχαία τοποθετημένα νουκλεοτίδια, προσδίδει την απαραίτητη ποικιλομορφία στα δείγματα μίας βιβλιοθήκης, εάν αυτή πρόκειται να συμπεριλάβει περισσότερα από ένα, τα οποία πρόκειται να αναμειχθούν και διαβαστούν ταυτόχρονα (πολυπλεξία). Η διαδικασία κατά την οποία συγκεκριμένα διαβάσματα αποδίδονται στο εκάστοτε δείγμα από το οποίο προέρχονται, είναι γνωστή ως αποπολυπλεξία και πραγματοποιείται μέσω μεθόδων βιοπληροφορικής, κατά την ανάλυση των δεδομένων.

3β) Η υπόλοιπη συνθετική αλληλουχία, είναι όμοια για όλα τα δείγματα, ενώ περιλαμβάνει τμήματα χρήσιμα για ποσοτικές αναλύσεις, για διάφορα στάδια ενζυμικής ενίσχυσης των επιμέρους δειγμάτων, πριν και μετά την πολυπλεξία (multiplexing), όπως επίσης για την πρόσδεση της βιβλιοθήκης σε μία μοναδικής χρήσης επιφάνεια πυριτίου (flow cell), όπου θα πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων.

4) Προαιρετικό στάδιο, προετοιμασίας μίας ενιαίας βιβλιοθήκης, η οποία απαρτίζεται από περισσότερα δείγματα, μέσω ανάμειξης ισομοριακής ποσότητας από το καθένα.

Διάφορα στάδια ποιοτικών και ποσοτικών αναλύσεων, παρεμβάλλονται σε διάφορα βήματα της διαδικασίας προετοιμασίας της αντίδρασης (Goodwin et al. 2016, Heather and Chain 2016).



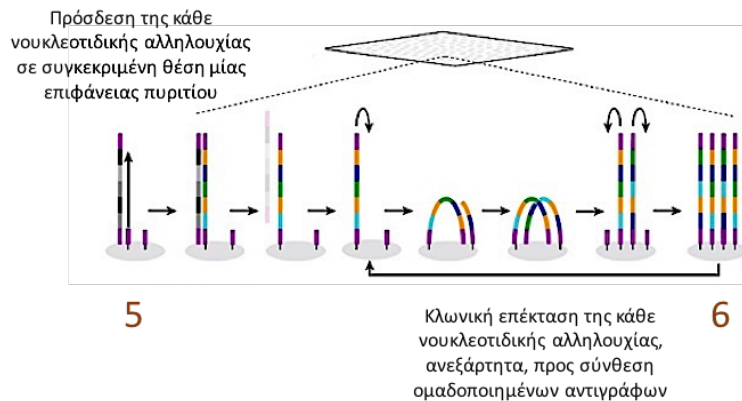
Εικόνα 43. Προετοιμασία βιβλιοθήκης DNA/cDNA, των δειγμάτων που προορίζονται για προσδιορισμό πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων, με τεχνολογία NGS.

2.9.4.2 Κυρίως αντίδραση

Αφού προετοιμαστεί η βιβλιοθήκη, η οποία απαρτίζεται από ένα ή περισσότερα δείγματα, ακολουθεί το κυρίως μέρος της διαδικασίας:

5) Χημική αποδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων, του δείγματος ή των δειγμάτων, που απαρτίζουν τη βιβλιοθήκη και πρόσδεση αυτών στο flow cell, μέσω συγκεκριμένων κοινών τμημάτων των adapters, που αναγνωρίζουν συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται σταθερά προσδεσμένες στο υπόστρωμα, εκ των προτέρων.

6) Κλωνική επέκταση (clonal amplification) της κάθε νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που οδηγεί σε σύνθεση ομαδοποιημένων αντιγράφων (clusters).



Εικόνα 44. Κλωνική επέκταση του συνόλου των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, που αφορούν στη βιβλιοθήκη DNA/cDNA, των δειγμάτων που προορίζονται για προσδιορισμό πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων, με τεχνολογία NGS. (προσαρμογή από Shendure et al. 2017).

7) Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων και καταγραφή των δεδομένων. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής ακολουθίας όλων των cluster που έχουν σχηματιστεί πραγματοποιείται ταυτόχρονα (massive parallel sequencing), για όλα τα δείγματα της βιβλιοθήκης, εφόσον αυτά είναι περισσότερα από ένα, ενώ περιλαμβάνει επιμέρους στάδια, όπως αυτά περιγράφονται στη συνέχεια:

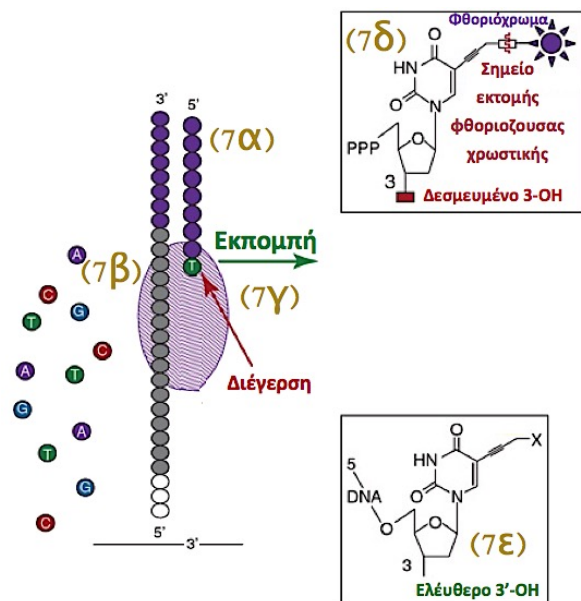
7α) Οι εκκινητές προσδένονται, μέσω συμπληρωματικότητας με κοινό τμήμα των adapters, σε καθεμία από τις προς ανάλυση ομαδοποιημένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες βρίσκονται προσδεδεδεμένες στο υπόστρωμα.

7β) Χημικά τροποποιημένα φθορίζοντα dNTPs, ενσωματώνονται ενζυμικά, από πολυμεράσες, στο 3' άκρο των εκκινητών, προς σχηματισμού των νεοσυντιθέμενων αλληλουχιών. Κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθεται, οδηγεί σε προσωρινή διακοπή της διαδικασίας επέκτασης, λόγω της ύπαρξης μίας αντιστρεπτής χημικής τροποποίησης, στο 3' άκρο κάθε dNTP.

7γ) Ένα σύστημα ακτινοβολίας διεγείρει τα φθοριοχρώματα των τεσσάρων διαφορετικών dNTPs, καθένα από τα οποία εκπέμπει φωτόνια σε διακριτό μήκος κύματος. Η ανίχνευση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας πραγματοποιείται μέσω μίας κάμερας υψηλής ευκρίνειας (Charge-coupled device, CCD).

7δ) Ακολουθεί απομάκρυνση των φθοριοχρωμάτων.

7ε) Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την απομάκρυνση της χημικής τροποποίησης από το 3' άκρο των dNTPs, ώστε επιτρέπεται ο επόμενος κύκλος ενσωμάτωσης (Goodwin et al. 2016, Heather and Chain 2016).



Εικόνα 45. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων, των δειγμάτων που απαρτίζουν τη βιβλιοθήκη DNA/cDNA (τροποποίηση από Mardis 2013).

7στ) Προαιρετικά, μόλις ολοκληρωθεί το διάβασμα των αλληλουχιών για κάθε cluster, προς μία κατεύθυνση (single-end sequencing, SE-Seq), υπάρχει η δυνατότητα διαβάσματος της νουκλεοτιδικής ακολουθίας και προς την αντίθετη κατεύθυνση (paired-end sequencing, PE-Seq). Αυτή η διάταξη αυξάνει την αξιοπιστία της χαρτογράφησης των δεδομένων κατά την αντιπαραβολή με το πρότυπο γονιδίωμα, σε μεταγενέστερο στάδιο, κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.9.4.3, βήμα 10, της πειραματικής διαδικασίας (Yohe and Thyagarajan 2017).

2.9.4.3 Ανάγνωση του αποτελέσματος

Τα δεδομένα που προκύπτουν από NGS αναλύσεις καταγράφονται σε ειδικά διαμορφωμένα υπολογιστικά αρχεία (fastq files), όπου για κάθε διάβασμα, η πρώτη σειρά περιλαμβάνει στοιχεία σχετικά με την πλατφόρμα που χρησιμοποιήθηκε, με την ημερομηνία και ώρα διεξαγωγής του πειράματος, καθώς και στοιχεία ειδικά της εκάστοτε αλληλουχίας, του κάθε δείγματος, όπως η αλληλουχία barcode του adapter, στη δεύτερη σειρά καταγράφεται η υπό διερεύνηση νουκλεοτιδική ακολουθία που διαβάστηκε, ενώ τα σύμβολα στην τέταρτη σειρά αφορούν σε ποιοτικά δεδομένα, σχετικά με το διάβασμα κάθε νουκλεοτιδίου.

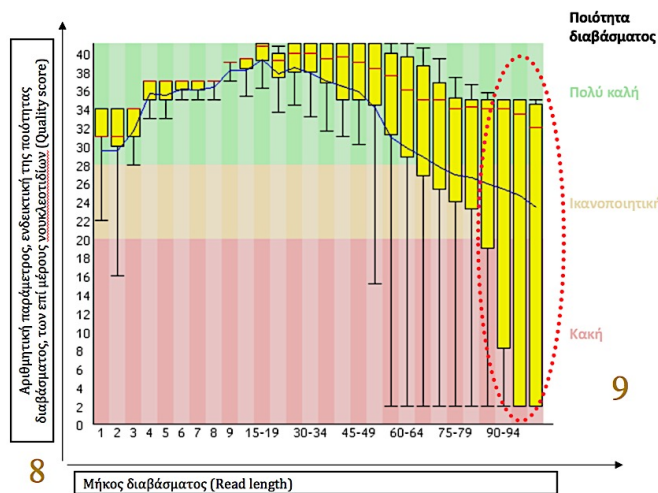
```
@SEQ_ID
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCACAGTTT
+
!''*((( (**+))%+%++)(%%%%).1***-+*'')**55CCF>>>>>CCCCCC65
```

Εικόνα 46. Αρχεία διαβασμάτων (fastq files). Ενδεικτική μορφή, με την οποία αποτυπώνονται τα δεδομένα, που προκύπτουν από προσδιορισμό αλληλουχίας με NGS, σε ειδικά υπολογιστικά αρχεία τύπου fastq. Η εικόνα αφορά σε ένα μόνον διάβασμα.

Ο μεγάλος όγκος πολύπλοκων δεδομένων που πηγάζει από τις σύγχρονες συσκευές προσδιορισμού αλληλουχίας, απαιτεί την ανάπτυξη ολοένα και πιο εκλεπτυσμένων αλγόριθμων, ωστόσο, σε γενικές γραμμές, η βιοπληροφορική αναλυτική διαδικασία ακολουθεί ορισμένα τυπικά στάδια, όπως αυτά περιγράφονται στη συνέχεια:

8) Ποιοτική ανάλυση των δεδομένων.

9) Απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων κατώτερης ποιότητας, καθώς και των νουκλεοτιδίων που ανήκουν σε adapters ή σε άλλες τεχνητές αλληλουχίες, που χρησιμεύουν μόνον στο τεχνικό κομμάτι της μεθοδολογίας, ενώ δεν αποτελούν τμήμα των υπο διερεύνηση περιοχών.



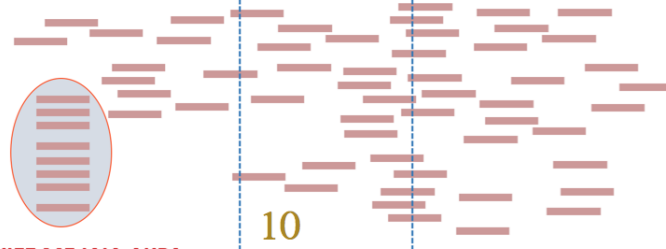
Εικόνα 47. Ποιοτική ανάλυση δεδομένων διαβασμάτων. Διαγραμματική απεικόνιση, μίας ενδεικτικής στατιστικής ανάλυσης (boxplot analysis), της ποιότητας των διαβασμάτων NGS, προκειμένου να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια που διαβάστηκαν με μειωμένη αξιοπιστία, εκ των υστέρων. Η τιμή της ποιότητας (Quality ή Q score) προκύπτει από τον τύπο $Q = -10 \log_{10} P$, όπου P είναι η πιθανότητα λανθασμένα διαβασμένων νουκλεοτιδίων, έτσι, ενδεικτικά, εάν απαντάται 1 λάθος ανά 100 διαβάσματα, τότε η τιμή Q ισούται με 20, που αντιπροσωπεύει 99% ακρίβεια διαβάσματος (accuracy). Όπως φαίνεται και στην εικόνα, η ποιότητα διαβάσματος μειώνεται όσο προχωρά το μήκος της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας, γεγονός που σχετίζεται με το τεχνικό κομμάτι της τεχνολογίας NGS, με συσκευές της Illumina (Leggett et al. 2013).

10) Αντιπαραβολή των διαβασμάτων (sequence alignment) επί πρότυπου γονιδιώματος (reference genome), για τη σύνθεση ενός χάρτη διαβασμάτων. Στο σημείο αυτό, αξίζει να τονίσουμε ξανά, τη σημασία του βάθους με το οποίο διαβάζονται τα νουκλεοτίδια (read depth), σε μία μεθοδολογία NGS, αφού αποτελεί μία ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο, για την αξιόπιστη ανάδειξη νουκλεοτιδικών αποκλίσεων (calling confidence) σε σύγκριση με το πρότυπο γονιδίωμα, όπως περιγράφηκε ήδη στο Κεφάλαιο 2.9.1.

11) Επισήμανση και απομάκρυνση από τη μετέπειτα αναλυτική διαδικασία, της περίσσειας πολλαπλά διαβασμένων, όμοιων, τεχνητών αντιγράφων μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, για την ανάδειξη των οποίων ευθύνεται το τεχνικό κομμάτι της μεθοδολογίας, συγκεκριμένα τα διάφορα στάδια PCR ενίσχυσης (PCR duplicates).

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

TCACCCAAGAGGAAAGGGACAGG **G** TAGGCACCCAGGTGA **G** TCTGACTCAAAAATGGTACTTCTTGTAAAC



ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΜΕ ΙΔΙΑ ΑΚΡΑ (PCR duplicates):

Απομάκρυνση περιπτώσεων 11 τεχνητών αντιγράφων !!!

Προσθέτουν «θόρυβο» κατά την ανάλυση

• ΒΑΘΟΣ ΔΙΑΒΑΣΜΑΤΟΣ (Read depth):

- Πόσες φορές έχει διαβαστεί μία γενωμική θέση
- Υψηλότερες τιμές = ΠΙΟ ΑΞΙΟΠΙΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
- Η τιμή εξαρτάται από την πολυπλοκότητα της αλληλουχίας του DNA (π.χ. πολυεπαναλαμβανόμενα στοιχεία), από τη μέθοδο προετοιμασίας της βιβλιοθήκης (amplification vs. probe), από το πλήθος διαβασμάτων και άλλους παράγοντες.

Εικόνα 48. Αντιπαραβολή των διαβασμάτων επί πρότυπου γονιδιώματος (Sequence alignment).

12) Ανάδειξη αποκλίσεων από το πρότυπο γονιδίωμα, μέσω διαφορετικών αλγόριθμων που αναγνωρίζουν διάφορους τύπους γενετικών αλλαγών, όπως εξαλλαγές ενός (SNVs, single nucleotide variants) ή περισσότερων νουκλεοτιδίων (MNVs, multiple nucleotide variants), καθώς και περιορισμένες ή ευρύτερες προσθήκες ή διαγραφές νουκλεοτιδίων (Indels, Insertion or deletion events), τόσο σε εξόνια, όσο και σε περιοχές σημαντικές για την ωρίμανση του pre-mRNA, αλλά και αριθμητικές αλλαγές που αφορούν σε εξόνια ή ολόκληρα γονίδια (Copy Number Variations, CNVs), καθώς και δομικές χρωμοσωμικές αλλαγές, όπως η δημιουργία χμαιρικών γονιδίων (fusion genes) λόγω μεταθέσεων γενωμικού υλικού, ή άλλες αναδιατάξεις. Επισκόπηση και επιβεβαίωση των μεταλλάξεων σε προγράμματα απεικόνισης γονιδιωματικών χαρτών.



Εικόνα 49. Απεικόνιση διαβασμάτων και μεταλλάξεων σε γονιδιωματικούς χάρτες. Επιβεβαίωση ενός SNV που ανιχνεύθηκε στο εργαστήριό μας, εν προκειμένω στο γονίδιο TP53, σε ασθενή με

ΟΜΛ, όπως αυτή παρουσιάζεται, σε υπολογιστικό πρόγραμμα απεικόνισης γονιδιωματικών χαρτών, συγκεκριμένα στο IGV (Integrative genomic viewer) (Robinson et al. 2011, Thorvaldsdóttir et al. 2013).

13) Εκτίμηση της επίδρασης των μεταλλαγών που ανιχνεύθηκαν, στο φαινότυπο των ασθενών μέσω:

13α) διασταύρωσης στοιχείων με βάσεις δεδομένων (annotation databases).

13β) προβλεπτικών αλγόριθμων (prediction algorithms).

13γ) αποκλεισμού κληρονομούμενων μεταλλάξεων (germline mutations).

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στην ανίχνευση επίκτητων μεταλλάξεων (σωματικές μεταλλάξεις) σε καρκινικά κύτταρα από συμπαγείς όγκους, συνεκτιμούν τυχόν προϋπάρχουσες κληρονομούμενες γενετικές αλλαγές (γαμετικές μεταλλάξεις), μέσω παράλληλης ανάλυσης ενός πληθυσμού φυσιολογικών κυττάρων του ασθενούς (T/N pair, Tumor/Normal pair).

Ωστόσο, στους ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, τα καρκινικά κύτταρα διηθούν επιπρόσθετους ιστούς, όπως το δέρμα ή το επιθήλιο της στοματικής κοιλότητας, οπότε η απομόνωση φυσιολογικού δείγματος, για αντιπαράβολή με το παθολογικό, είναι μία ιδιαίτερα δυσχερής διαδικασία.

Οπότε, αναμένεται η χρονική στιγμή που ο ασθενής θα βρεθεί σε ύφεση νόσου, εφόσον αυτό συμβεί, ώστε ενδεχομένως υπάρχει η δυνατότητα συλλογής επαρκούς ποσότητας φυσιολογικού δείγματος, από τους προαναφερθέντες ιστούς.

Εναλλακτικά απομονώνεται καθαρός πληθυσμός φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων, όπως κύτταρα της λεμφικής σειράς, για τους ασθενείς με μυελικές νεοπλασίες, μέσω εξειδικευμένων κυτταρόμετρων ροής ή με άλλες τεχνικές (Luthra et al. 2015, Wartman and Mardis 2016).

2.9.5 Παραλλαγές της μεθόδου και διαφορετικές χρήσεις της τεχνολογίας NGS

Η τεχνολογία NGS, εξυπηρετεί ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών και διαγνωστικών σκοπών, οι κυριότερες εκ των οποίων περιγράφονται στα Κεφάλαια 2.9.5.1 και 2.9.5.2. Διαφορετικά επιστημονικά ερωτήματα είναι δυνατόν να απαντηθούν, ανάλογα:

1) με το υποστρώμα, DNA ή RNA.

2) με την προέλευση του υποστρώματος, όπως ελεύθερα κυκλοφορούντα (circulating free DNA, cfDNA) ή ενδοκυτταρικά νουκλεϊκά οξέα ευκαρυωτικών οργανισμών, ακόμη και νουκλεϊκά οξέα μικροοργανισμών.

3) με τη μεθοδολογία απομόνωσης του υποστρώματος. Οι αναλύσεις DNA ενδέχεται να αφορούν σε ολόκληρο το γονιδίωμα, στο σύνολο των εξονίων ή σε διάσπαρτες στοχευμένες γενωμικές περιοχές. Οι αναλύσεις RNA μπορεί να εμπλέκουν το σύνολο των μεταγράφων (μεταγράψωμα), μονάχα το μεταφραζόμενο μεταγράψωμα (mRNA) ή μικρά μη κωδικά μετάγραφα (miRNA).

4) με την προαιρετική κατεργασία του υποστρώματος, πριν την ανάλυση, όπως η επεξεργασία με δισουλφίδιο του νατρίου για τη μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης του γονιδιώματος (methylation sequencing), ή η μονιμοποίηση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων και απομόνωση των τμημάτων DNA όπου αυτοί προσδένονται για τη χαρτογράφηση πιθανών αλληλουχιών-στόχων (ChIP sequencing, Chromatin immunoprecipitation sequencing) (Park and Kim 2016, Yohe and Thyagarajan 2017).

2.9.5.1 Στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Targeted-Sequencing) με τεχνολογία NGS

Αρχικά, οι πλατφόρμες NGS χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση οργανισμών με σχετικά μικρό μέγεθος γονιδιώματος. Καθώς η τεχνολογία εξελίχθηκε, κατέστη εφικτή η ανάλυση διαρκώς μεγαλύτερων γονιδιωμάτων. Ωστόσο, το αυξημένο μέγεθος και η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τα πιο σύνθετα γονιδιώματα, όπως το ανθρώπινο, δυσχεραίνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Οι περιορισμοί που προκύπτουν, από τη χρήση της υπάρχουσας τεχνολογίας, για τη μελέτη ολόκληρων ανθρώπινων γονιδιωμάτων (Whole Genome Sequencing, WGS), αφορούν κυρίως στο πεπερασμένο εύρος γενωμικών περιοχών που αναλύονται επαρκώς, σε ικανοποιητικό βάθος διαβάσματος, όπως επίσης στο είδος των μεταλλάξεων που είναι εφικτό να ανιχνευτούν αξιόπιστα, με τις υπάρχουσες μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης.

Μεταλλάξεις μικρής κλίμακας, όπως SNVs, MNVs και περιορισμένα σε μέγεθος Indels, μπορούν εύκολα να αναδειχθούν, σε αντίθεση με μεγαλύτερες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και με CNVs, συμβάματα που γίνονται πιο δύσκολα ανιχνεύσιμα.

Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το υψηλότερο κόστος, που προκύπτει εξαιτίας της ανάγκης για περισσότερα διαβάσματα, οδήγησαν στην ανάπτυξη προσεγγίσεων, που προσβλέπουν στο χαρακτηρισμό μόνον του συνόλου των εξονικών περιοχών (Whole Exome Sequencing, WES), ή στην ανάλυση ακόμη πιο περιορισμένων, προκαθορισμένων, γενωμικών περιοχών (Targeted DNA Resequencing).

Δύο κυρίως μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί προς αυτή την κατεύθυνση.

1) Σε μία περίπτωση χρησιμοποιούνται τεχνητοί εκκινητές (primers), που στοχεύουν στην ενζυμική επέκταση των περιοχών ενδιαφέροντος προτού αυτές αναλυθούν (amplicon sequencing).

2) Η άλλη τεχνική αφορά στην υβριδοποίηση λόγω συμπληρωματικότητας, τμήματος των περιοχών ενδιαφέροντος (hybridization-sequencing), με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, γνωστά ως ιχνηθέτες (probes). Οι ιχνηθέτες είναι τροποποιημένοι, ώστε φέρουν μία ομάδα βιοτίνης, μέσω της οποίας προσδένονται σε μαγνητικά σφαιρίδια με επικάλυψη στρεπταβιδίνης, επιτρέποντας την διατήρηση μόνο των περιοχών ενδιαφέροντος, καθώς το υπόλοιπο γονιδίωμα απορρίπτεται και αποκλείεται από την ανάλυση (Luthra et al. 2015, Wartman and Mardis 2016).

2.9.5.2 Ανάλυση μεταγραφώματος (RNA-Sequencing) με τεχνολογία NGS

Η ανάλυση του μεταγραφώματος, με τεχνολογία NGS, περιλαμβάνει την απομόνωση και διατήρηση του κατάλληλου κλάσματος RNA και τη μετέπειτα μετατροπή τους σε cDNA, προτού ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, όπως αυτή περιγράφεται σε γενικές γραμμές στο Κεφάλαιο 2.9.4. Δύο κυρίως μεθοδολογίες εφαρμόζονται, για το διαχωρισμό των διαφορετικών κλασμάτων ριβονουκλεϊκών οξέων:

1) Στην πρώτη περίπτωση, το ριβοσωμικό RNA (rRNA), που δεν είναι χρήσιμο για περαιτέρω αναλύσεις, αποτελεί ωστόσο το μεγαλύτερο κλάσμα μεταγράφων, κατακερματίζεται ενζυμικά μέσω ριβονουκλεασών (rRNA depletion). Έτσι απομονώνεται, ένας πληθυσμός

ριβονουκλεϊκών οξέων, που απαρτίζεται από κωδικά (mRNA) και μη κωδικά μόρια (miRNA, lncRNA κ.α.).

2) Στη δεύτερη περίπτωση, μαγνητικά σφαιρίδια, επικαλυμένα με ολιγο-θυμιδικές αλληλουχίες (oligo-dT), επιλέγουν κατά τρόπο ειδικό, το κλάσμα των mRNA μόνο, αφού καθένα από αυτά φέρει μία πολυ-αδενυλιωμένη ουρά (poly-A tail), η οποία προστίθεται στα πλαίσια των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων. Με αυτήν την τεχνική, απομακρύνονται τόσο τα rRNA, όσο και τα υπόλοιπα μη-κωδικά μόρια (González-Porta M. 2014).

Η πειραματική πορεία παραμένει ίδια μέχρι και το βήμα 11, που αφορά στο αναλυτικό στάδιο του πειράματος (Κεφάλαιο 2.9.4.3), αφού μετέπειτα, επιπρόσθετοι αλγόριθμοι, μπορούν να απαντήσουν σε διαφορετικά βιολογικά ερωτήματα, επιπλέον της δυνατότητας ανίχνευσης μεταλλάξεων. Τα είδη των αναλύσεων και οι κατηγορίες των μεταλλάξεων που διερευνώνται συχνότερα με RNA-Seq περιγράφονται συνοπτικά:

- 1) Μελέτη των διαφορετικών μεταγράφων (alternative transcripts), ενός μόνο γονιδίου, που προκύπτουν μέσω της διαδικασίας εναλλακτικής ωρίμανσης (RNA splicing)
- 2) Ανίχνευση μεταλλάξεων μεγάλης κλίμακας, που συμβάλλουν σε χιμαιρικά πρωτεϊνικά προϊόντα (fusion proteins)
- 3) Σπανιότερα χρησιμεύουν στην ανίχνευση μεταλλάξεων μικρής κλίμακας
- 4) Συγκριτική ανάλυση, των επιπέδων έκφρασης (expression analysis), των γονιδίων ενός παθολογικού κυτταρικού πληθυσμού ή μίας κοορτής ασθενών, σε σχέση με αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα ή με μία κοορτή υγιών ατόμων, αντίστοιχα (Feng et al. 2013, Illumina 2018).

2.9.6 Συγκριτική ανάλυση διαφορετικών τεχνολογιών προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία Sanger, πρώτης γενιάς, όπως και με τεχνολογία Illumina, δεύτερης γενιάς, έχουν ήδη περιγραφεί εκτενώς. Άλλες τεχνολογίες δεύτερης, αλλά και τρίτης γενιάς, έχουν αναπτυχθεί από διάφορες εταιρείες. Η αρχή λειτουργίας αυτών θα περιγραφεί συνοπτικά στη συνέχεια. Από την ανασκόπηση απουσιάζουν οι τεχνολογίες Solid και 454/Roche που έχουν ήδη καταργηθεί, παρατίθενται ωστόσο ενδεικτικά, στο συγκριτικό Πίνακα που ακολουθεί, για βιβλιογραφικούς κυρίως λόγους.

2.9.6.1 Thermo Ion Torrent

Η λειτουργία των συσκευών Ion Torrent, σε αντίθεση με εκείνων της Illumina, δε βασίζονται σε απεικονιστικές μεθόδους, για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων που προστίθενται σε μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.

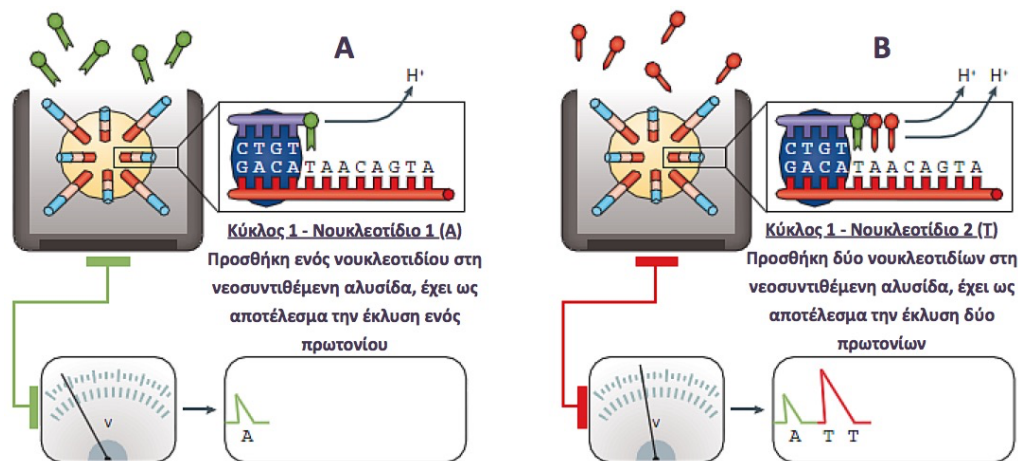
Αντίθετα, η ενσωμάτωση καθενός από τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια, τα οποία προστίθενται μεμονωμένα στο flow cell, σε διαδοχικούς επαναλαμβανόμενους κύκλους, οδηγεί σε εκπομπή ενός πρωτονίου, η οποία γίνεται αντιληπτή, από ειδικούς αισθητήρες, ως αλλαγή στο ιοντικό φορτίο ενός διαλύματος, που πληρεί τα μαγνητικά σφαιρίδια, επάνω στα οποία εντοπίζονται προσδεδεμένα τα υπο ανάλυση νουκλεϊκά οξέα, που λειτουργούν ως καλούπι για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας (Εικόνα 50 A).

Τα σφαιρίδια κείτονται μεμονωμένα σε ξεχωριστούς κλωβούς, ενώ στη βάση της συσκευής εντοπίζεται ο αισθητήρας αλλαγής ιοντικού φορτίου. Κάθε σφαιρίδιο φιλοξενεί ένα cluster νουκλεϊκών οξέων.

Εφόσον το πρώτο νουκλεοτίδιο που εισέρχεται στη συσκευή, δεν ενσωματωθεί, τότε δεν εκλύεται πρωτόνιο, κατά συνέπεια δεν ανιχνεύεται σήμα και αφού απομακρυνθεί, διαχέεται στο θάλαμο της συσκευής το δεύτερο νουκλεοτίδιο και στη συνέχεια, διαδοχικά, τα υπόλοιπα δύο, για να ολοκληρωθεί ο πρώτος κύκλος, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ο επόμενος.

Εαν ενσωματωθούν περισσότερα από ένα νουκλεοτίδια στη σειρά, τότε εκλύεται ανάλογος αριθμός πρωτονίων, κατά συνέπεια η αλλαγή στο ιοντικό φορτίο είναι και αυτή ανάλογη, μέχρι όμως ένα πεπερασμένο όριο 6-8 βάσεων, πάνω από το οποίο το σήμα δεν αυξάνεται δυσανάλογα, έτσι δεν μπορεί να καθοριστεί ο ακριβής αριθμός τους (Εικόνα 50 Β).

Για το λόγο αυτό οι συσκευές Ion Torrent, παρουσιάζουν μειονέκτημα, όσον αφορά στη μελέτη πολυ-επαναλαμβανόμενων περιοχών του γονιδιώματος (Yohse and Thyagarajan 2017).



Εικόνα 50. Αρχή λειτουργίας των συσκευών Ion Torrent (τροποποίηση από Goodwin et al. 2016).

Ωστόσο, πριν ακόμη οι αναλυτές δεύτερης γενιάς, φτάσουν στο μέγιστο σημείο των δυνατοτήτων τους, έχουν ήδη αναπτυχθεί συσκευές, για προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες χρησιμοποιούν τεχνολογία τρίτης γενιάς και αφορούν σε ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, μοναδικών μορίων DNA, μεγάλου μήκους (single molecule real time, SMRT), αντί για κατακερματισμένες αλληλουχίες, τα δεδομένα των οποίων αναλύονται σε δεύτερο χρόνο, με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης, όπως συμβαίνει με τις συσκευές δεύτερης γενιάς.

Οι τεχνολογίες τρίτης γενιάς δεν απαιτούν επιπρόσθετα στάδια PCR ενίσχυσης των υπο ανάλυση νουκλεϊκών οξέων, συμβάλλουν έτσι σε χαμηλότερα επίπεδα μη ειδικού σήματος (θόρυβος). Παράλληλα, οι δύο ευρύτερα γνωστές συσκευές που χρησιμοποιούν τη συγκεκριμένη τεχνολογία, οι Pacific Biosciences (PacBio) και Oxford Nanopore, επιτυγχάνουν ευρεία σε μέγεθος διαβάσματα, της τάξεως των 14-40Kbp και 8-10Kbp, αντίστοιχα.

Και οι δύο συσκευές, ωστόσο, είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε λάθη κατά το διάβασμα των νουκλεοτιδίων. Ενώ, όμως, τα λάθη που εισαγάγει η τεχνολογία της PacBio είναι τυχαία, έτσι με επαναλαμβανόμενα διαδοχικά διαβάσματα της αλληλουχίας, το ποσοστό αυτών μειώνεται

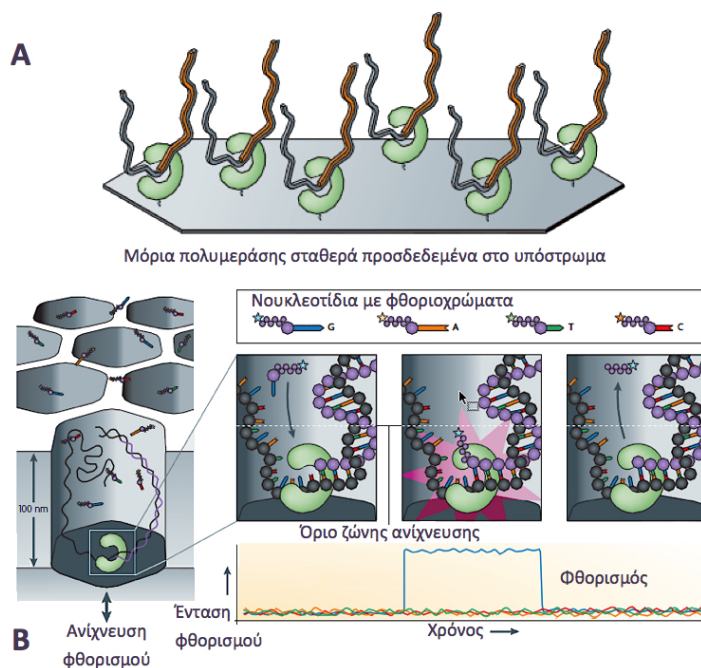
δραματικά, από την άλλη, η τεχνολογία Nanopore μεροληπτεί, όσον αφορά στην προσθήκη λανθασμένων νουκλεοτιδίων, ανάλογα με την περιοχή που αντιγράφεται. Συνεπώς, οι τεχνολογίες τρίτης γενιάς, δε φαίνονται έτοιμες για να ενσωματωθούν στον αλγόριθμο της κλινικής διάγνωσης, τόσο λόγω ελλιπούς δοκιμής τους, όσο και λόγω υψηλού κόστους και αυξημένου ποσοστού λάθους που παρουσιάζουν (Yohe and Thyagarajan 2017).

2.9.6.2 Pacific Biosciences (PacBio)

Οι συσκευές της PacBio διαθέτουν μικροσκοπικούς κλωβούς, όπου σε καθέναν από αυτούς αναλύεται ένα μόριο DNA, αφού στο βυθό τους εντοπίζεται, σταθερά προσδεδεμένη, μία DNA πολυμεράση (Εικόνα 51 Α).

Τα τέσσερα νουκλεοτίδια, που προστίθενται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, διαθέτουν διαφορετικό φθοριόχρωμα, έτσι αποδίδουν φως σε ξεχωριστό μήκος κύματος, που γίνεται αντιληπτό από έναν αισθητήρα στη βάση της συσκευής (Εικόνα 51 Β).

Η επιγενετική κατάσταση του νουκλεϊκού οξέος επίσης γίνεται αντιληπτή από τη συσκευή, αφού διαφέρει ο χρόνος ενσωμάτωσης, των τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, σε σχέση με εκείνα που δε φέρουν την οποιαδήποτε επιγενετική πλευρική ομάδα (Yohe and Thyagarajan 2017).



Εικόνα 51. Αρχή λειτουργίας των συσκευών PacBio (τροποποίηση από Metzker 2010, Goodwin et al. 2016).

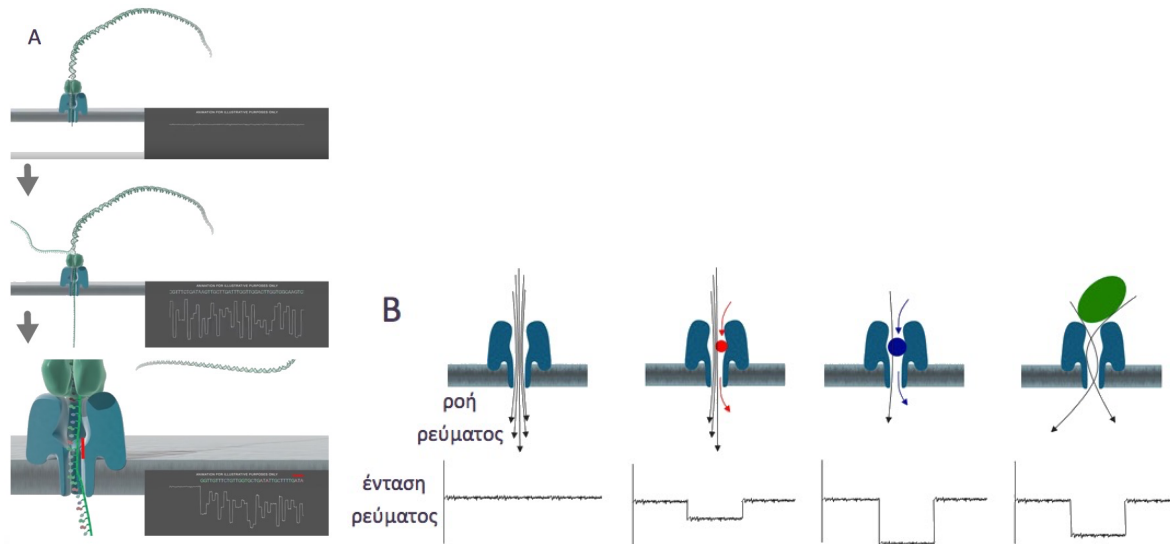
2.9.6.3 Oxford Nanopore

Οι συσκευές της Oxford Nanopore χρησιμοποιούν μία μεμβράνη, στην επιφάνεια της οποίας εντοπίζεται μία πρωτεΐνη, που σχηματίζει έναν πόρο, διαμέσω του οποίου διέρχονται τα υπό ανάλυση νουκλεϊκά οξέα, DNA ή RNA (Εικόνα 52 Α).

Παράλληλα, εφαρμόζεται ρεύμα συγκεκριμένης έντασης στα άκρα της μεμβράνης, το οποίο μεταβιβάζεται στον πρωτεϊνικό πόρο, έτσι καθώς διέρχονται τα τέσσερα νουκλεοτίδια, αυτά γίνονται αντιληπτά ως διαφορετικές διακυμάνσεις στην ένταση του ρεύματος, λόγω του

διαφορετικού μεγέθους και της αποκλειστικής τεταρτοταγούς δομής που παρουσιάζει καθένα από αυτά (Εικόνα 52 Β).

Επιπλέον, οι επιγενετικές διάφορες τροποποιήσεις, επιφέρουν αλλαγές στη στερεοδομή των νουκλεοτιδίων, που μεταφράζονται ως ξεχωριστές διακυμάνσεις στην ένταση του ρεύματος, έτσι, με την τεχνολογία αυτή, επιτρέπονται ταυτόχρονα, περισσότερο σύνθετες αναλύσεις του γονιδιώματος (Yohe and Thyagarajan 2017).



Εικόνα 52. Αρχή λειτουργίας των συσκευών Oxford Nanopore (τροποποίηση από Goodwin et al. 2016, Yirka 2017).

2.9.6.4 Σύνοψη

Τεχνολογία	Κατεύθυνση και Μήκος διαβάσματος	Απόδοση σε αριθμό βάσεων	Απόδοση σε διαβάσματα	Ποσοστό και Συχνότερη κατηγορία λαθών
Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία πρώτης γενιάς				
Sanger (CT)	(400-900bp)	1.9Kb-84Kb	-	<0.001%
Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς				
Illumina (SBS/CRT)	SE (36-150bp) PE (25-300bp)	540Mb-900Gb	12M-4B	0.1-1% - Αντικαταστάσεις βάσεων
Thermo Ion Torrent (SBS/SNA)	SE (200-400bp)	30Mb-15Gb	0.4M-80M	1-2% - Διαγραφές/προσθήκες και πολυεπαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
454/Roche (SNA/Pyrosequencing)	SE/PE (400-700bp)	35Mb-700Mb	0.1M-1M	1-2% - Διαγραφές/προσθήκες και πολυεπαναλαμβανόμενες αλληλουχίες
Thermo SOLiD (SBL)	SE (50-75bp)	80Gb-320Gb	700M-1.4B	0.1% - Αντικατάσταση βάσεων A/T
Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία τρίτης γενιάς				
Pacific BioSciences (SMRT)	15Kb	-	-	Από 5-15% για μοναδικό διάβασμα, έως <0.01% για περισσότερα διαβάσματα - Διαγραφές/προσθήκες
Oxford Nanopore (SMRT)	10 Kb	-	-	10-30% - Διαγραφές/προσθήκες

Πίνακας 10. Συγκριτική ανάλυση τεχνολογιών προσδιορισμού πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων. Συντμήσεις: SE (Single-end read): Μονή κατεύθυνση διαβάσματος (5'-3'), PE (Paired-end

read): Διπλή κατεύθυνση διαβάσματος (5'-3' και 3'-5'), *CT (Chain Termination)*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων διαμέσου προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων με την τεχνολογία του μη-αντιστρεπτού τερματισμού της αντιγραφής, *SBS/CRT (Sequencing by Synthesis/Cyclic Reversible Termination)*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων διαμέσου προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων με την τεχνολογία του αντιστρεπτού τερματισμού της αντιγραφής, *SNA/Pyrosequencing*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων διαμέσου προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων με την τεχνολογία της πυροαλληλούχισης, *SBS/SNA (Sequencing by Synthesis/Single Nucleotide Addition)*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων διαμέσου προσθήκης μονο-νουκλεοτιδίων με τεχνολογία παρακολούθησης της συνεπακόλουθης αλλαγής στο ιοντικό φορτίο του διαλύματος της αντίδρασης, *SBL (Sequencing by Ligation)*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω σύνθεσης νέων προϊόντων, διαμέσου προσθήκης δι-νουκλεοτιδίων με αντίδραση λιγάσης, *SMRT*: Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης, μέσω παρακολούθησης της συνθετικής διαδικασίας ενός μοναδικού, μεγάλου μήκους, νουκλεϊκού οξέος (Metzker 2011, Nagarajan and Pop 2013, Hodkinson and Grice 2015, Goodwin et al. 2016).

2.9.7 Εφαρμογές στην κλινική πράξη

Η τεχνολογία NGS προσφέρει τη δυνατότητα για την ανάπτυξη ιδιαίτερα εξειδικευμένων διαγνωστικών εξετάσεων, με την προοπτική της στοχευμένης θεραπευτικής παρέμβασης.

Η χρήση της, ωστόσο, οφείλει να ακολουθεί υψηλές προδιαγραφές, όπως εκείνες που τηρούν τα διαγνωστικά εργαστήρια σχετικά με τις συνθήκες εκτέλεσης των πειραματικών διαδικασιών, τις συνθήκες φύλαξης των κλινικών δειγμάτων, τις τεχνικές απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων και την ανάγκη για συγκατάθεση του ασθενούς, για την πραγματοποίηση των εξετάσεων.

Εφόσον τα παραπάνω κριτήρια πληρούνται, τότε οι αναλύσεις NGS μπορούν να χρησιμεύσουν ιδιαίτερος, σε διάφορες πτυχές της κλινικής πράξης, εν προκειμένω σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, όπως περιγράφεται στη συνέχεια:

- 1) Ταυτόχρονη διερεύνηση περισσότερων γενετικών τόπων, σε αντίθεση με παλαιότερες τεχνολογίες που παρείχαν δεδομένα για επιμέρους γενετικούς στόχους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η πιθανότητα ανάδειξης δεδομένων, που μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα για τον ασθενή, μάλιστα, σε μικρότερη χρονική διάρκεια από διάφορες συμβατικές τεχνικές.
- 2) Παραγωγή σημαντικών δεδομένων, σχετικά με την πολυπλοκότητα, σε επίπεδο μεταλλάξεων, που παρουσιάζουν οι επιμέρους παθολογικοί πληθυσμοί κλωνικών κυττάρων.

Έχει αποδειχθεί πως οι αιματολογικοί ασθενείς διακρίνονται από έναν κυτταρικό πληθυσμό, με υπαιτιότητα του οποίου εκδηλώνεται η διαταραχή, ωστόσο ενδέχεται να αναπτύξουν δευτερεύοντες κυτταρικούς υποπληθυσμούς, που έχουν εξελιχθεί από τον αρχικό, έπειτα από απόκτηση επιπρόσθετων μεταλλάξεων, οι οποίοι συμβάλλουν στην πρόοδο της νόσου και σε αλλαγές στα κλινικά χαρακτηριστικά. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως γενετική ετερογένεια (genomic heterogeneity) και μπορεί να γίνει αντιληπτό με διαδοχικούς μοριακούς ελέγχους μέσω NGS, σε δείγματα του ίδιου ασθενούς που προέρχονται από διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την εξέλιξη της νόσου ή τη θεραπευτική αντιμετώπιση αυτής.

Η στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση ενός δευτερεύοντος κλωνικού κυτταρικού υποπληθυσμού, που φέρει μία συγκεκριμένη μετάλλαξη, μπορεί να οδηγήσει σε

αριθμητική ελάττωση ή και εξάλειψη των κυττάρων αυτών, θα αφήσει όμως ανεπηρέαστο τον κλώνο κυττάρων που ευθύνεται, κατά βάση, για την εκδήλωση της εκάστοτε αιματολογικής διαταραχής και που διακρίνεται από επιπλέον μεταλλάξεις, οι οποίες εμπλέκουν γονίδια που συμμετέχουν σε διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες.

Αυτές οι πληροφορίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κλινική πράξη αφού καθορίζουν το θεραπευτικό σχήμα που πρέπει να χορηγηθεί σε κάθε περίπτωση, ώστε να επιτευχθεί ύφεση ή να αποτραπεί υποτροπή της νόσου.

3) Σαφέστατα πιά ευαίσθητη αναζήτηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (minimal residual disease, MRD). Με τον όρο MRD περιγράφεται η παρουσία, ανθεκτικών στη θεραπεία, παθολογικών κυττάρων, που παραμένουν κατά την ύφεση, ενώ παράλληλα, είναι μη ανιχνεύσιμα με συμβατικές κλινικές μεθόδους.

4) Μελέτες φαρμακοτοξικότητας και μεταβολισμού των φαρμάκων με βάση το γενετικό προφίλ του ασθενούς, αναδεικνύουν μία ακόμη χρησιμότητα των νέων τεχνολογιών (Wartman and Mardis 2016).

3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια, πως μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια, όπως τα *JAK2* και *MPL* οδηγούν στην εμφάνιση ΜΥΝ. Οι ίδιες μεταλλάξεις ανιχνεύονται επίσης σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, έρχονται να καλύψουν το κενό που υπάρχει στη γνώση μας, σχετικά με την εκδήλωση και εξέλιξη αυτών των νοσημάτων. Έτσι, μετά την αποκάλυψη μεταλλάξεων στο γονίδιο της *CALR*, που αποτελούν πρωταρχικό γεγονός, σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΙΘ και ΜΙ, οι οποίοι δε φέρουν μεταλλάξεις *JAK2* και *MPL*, πληθώρα δεδομένων καταδεικνύει τη σημασία επιπρόσθετων μεταλλάξεων, σε γονίδια που συμμετέχουν σε ποικίλες διεργασίες του κυττάρου και στις δύο κατηγορίες νοσημάτων.

Οι μεταλλάξεις αυτές είναι βαρύνουσας σημασίας, τόσο για την πρόγνωση και διαστρωμάτωση των αιματολογικών κακοηθειών, όσο και για την ορθή ταξινόμηση αυτών σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως με τις μεταλλάξεις *CSF3R* στην ΧΟΛ και τις μεταλλάξεις *SETBP1* στην αΧΜΛ.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι:

- i. Ο σχεδιασμός πειραματικών διαδικασιών για ανίχνευση μεταλλάξεων, μέσω ανάλυσης του προτύπου της καμπύλης τήξης των προϊόντων της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (post Real-time PCR HRM analysis, HRMA), με στόχο τη μοριακή διερεύνηση συνολικά 13 γενετικών περιοχών, σε 11 διαφορετικά γονίδια, συγκεκριμένα στα *ASXL1* (εξόνιο 12), *CALR* (εξόνιο 9), *DNMT3A* (εξόνιο 23), *IDH1* (εξόνιο 4), *IDH2* (εξόνιο 4), *SETBP1* (εξόνιο 4), *SF3B1* (εξόνια 14 και 15), *SRSF2* (εξόνιο 1), *U2AF1* (εξόνια 2 και 6), *CSF3R* (εξόνιο 14) και *KIT* (εξόνιο 17).
- ii. Ο σχεδιασμός πειραματικών διαδικασιών για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger, με στόχο την επιβεβαίωση και τον χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν μέσω HRMA στις προαναφερθείσες γενομικές περιοχές.
- iii. Ο σχεδιασμός πρωτοκόλλου για τον στοχευμένο προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία επόμενης γενιάς (targeted Next Generation Sequencing, Targeted-Seq), με στόχο την ανίχνευση μοριακών βλαβών στα γονίδια *ASXL1*, *BCOR*, *BCORL1*, *CALR*, *CBL*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *GATA1*, *GATA2*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KRAS*, *MPL*, *NRAS*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *ZRSR2*.
- iv. Η ανάπτυξη αλγόριθμου για τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων Targeted-Seq, με στόχο την ανάδειξη μεταλλάξεων στα παραπάνω γονίδια, καθώς και το χαρακτηρισμό της κλινικής σημασίας αυτών.
- v. Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, με τη μέθοδο της μεθυλοειδικής HRMA (MS-HRMA), σε ασθενείς με ΜΙ και ΜΔΣ/ΜΥΝ.
- vi. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, με τη μέθοδο της μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP), σε ασθενείς με ΜΙ και ΜΔΣ/ΜΥΝ.
- vii. Η συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφώματος των ασθενών με ΜΙ, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στον φυσιολογικό πληθυσμό, μέσω RNA-Seq.
- viii. Η ανάπτυξη αλγόριθμου για τη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων RNA-Seq, με στόχο την ανάδειξη αλλαγών στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης στους ασθενείς με ΜΙ, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό και το χαρακτηρισμό της κλινικής σημασίας αυτών.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Αντιδραστήρια

4.1.1 Χημικά αντιδραστήρια, βιολογικά αντιδραστήρια και ολοκληρωμένα συστήματα αντιδραστηρίων

Εταιρεία	Κωδικός	Αντιδραστήριο
Merck	P4417	Phosphate buffered saline (PBS) Tablets
Merck	T1503-1KG	Trizma base
Merck	B6768	Boric Acid
PanReac-AppliChem	A1104	EDTA disodium
Panreac-Applichem	A4969,0100	Ficoll® 400 Molecular Biology grade
Panreac-Applichem	A2331,0025	Bromophenol blue
DEMO	4328	Water Vial
Panreac-Applichem	A0889,0500	Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1
Panreac-Applichem	A2610,0500	Isoamyl Alcohol, for molecular biology
VWR Int. GmbH	20821	Ehtanol Absolute
Merck	10771-500ML	Histopaque-1077, aseptically filled
Merck	T9424-200ML	TRI-Reagent
Merck	C2432-500ML	Chloroform
Panreac-Applichem	CR131090	Propanol-2 Molecular Biology Grade/5Lt
Qiagen	51206	FlexiGene blood genomic DNA isolation kit
Qiagen	28706	Qiaquick gel extraction
Macherey-Nagel	744970.5	NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (150-800 bp)
Biotium	31006-T	AccuBlue High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (0,2-100 ng)
Agilent Tech.	5067-4626	Agilent High Sensitivity Kit
Merck	72068-100ML	Sodium hydroxide solution (BioUltra, Mol. Biol., 10 M in H ₂ O)
Thermo-Fischer	EP0091	phi29 DNA Polymerase (10 U/μL)
Thermo-Fischer	EF0221	Pyrophosphatase, Inorganic (0.1 U/μL)
Thermo-Fischer	SO181	Exo-Resistant Random Primer
NEB	M0348L	dsDNA Fragmentase (250 Rxns)
Macrogen Inc.	-	Oligo synthesis (50 nmol), MOPC purified (up to 30 bases)
Thermo-Fischer	-	TruSeqPCR1: AATGATACGGCGACCACCGA[*]G (*=phosphorothioate)
Thermo-Fischer	-	TruSeqPCR2: CAAGCAGAAGACGGCATAACGA[*]G (*=phosphorothioate)
Promega	M6101	RQ1 RNase-Free Dnase (1u/uL)
Thermo-Fischer	48190-011	Random Primers (3 μg/μL in 3 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2 mM EDTA)
Thermo-Fischer	28025-013	M-MLV RT (200 U/uL, 50 Rxns)
Thermo-Fischer	10297-018	100mM (4x25μmol) dNTP Set, PCR Grade
Thermo-Fischer	10777-019	RNase Out (requires 1 mM DTT to maintain activity)
Thermo-Fischer	10966-026	Platinum Taq DNA Polymerase
Qiagen	203205	Qiagen HotStart DNA Polymerase

NEB	N3231S	100 bp DNA ladder (0.1 to 1.5 kb) 500µg/mL
Merck	A9539-500GR	Agarose Molecular Biology Reagent
Mo-Bio	15005-100	UltraClean® Low Melt Agarose
Bioline	BIO-21111	MyTaq HS DNA Polymerase
Biotium	31000	Evagreen Dye, 20X in water
KAPA Biosystems	KK4203	KAPA HRM Fast Kit/1000 reactions (20uL)
Roche	04909631001	LightCycler 480 HRM Master (2x)
Thermo-Fischer	15585-011	Ethidium Bromide (10mg/ml)
Merck	4311320	Formamide
Thermo-Fischer	4316357	3100 POP-6 TM Performance Optimized Polymer
Thermo-Fischer	4337450	ABIPrism BigDye Terminator v1.1
Thermo-Fischer	402824	Genetic Analyzer 10x Running Buffer with EDTA
NEB	M0226L	CpG Methyltransferase (M.SssI) 4,000 units/mL
NuGen	0337-32	Ovation Human Blood RNA-Seq Multiplex System
NuGen	-	Ovation Target Enrichment custom panel
Illumina	MS-102-2003	MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles) (15M reads)
Promega	M6101	RQ1 RNase-Free DNase
NuGen	0337	Ovation® Human Blood RNA-Seq Library Systems
Illumina	FC-402-4022	HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 cycles) (G reads)

Πίνακας 11. Χημικά αντιδραστήρια, βιολογικά αντιδραστήρια και ολοκληρωμένα συστήματα αντιδραστηρίων.

4.1.2 Εργαστηριακός αναλυτικός εξοπλισμός

Εταιρεία	Συσκευή	Λειτουργία
Roche	LightCycler® 480	Real Time PCR, HRMA
Bio-Rad	T100 Thermal Cycler for PCR	PCR
Grant	Grant Sub waterbath	Υδατόλουτρο
Thermo-Fischer	Owl EasyCast Gel Electrophoresis	Συσκευή Ηλεκτροφόρησης
Thermo-Fischer	EC1000-90	Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης
Thermo-Fischer	Eppendorf centrifuge 5804	Φυγόκεντρος σωληναρίων τύπου Falcon
Thermo-Fischer	Biofuge pico Heraeus	Φυγόκεντρος σωληναρίων τύπου Eppendorf
Merck	Eppendorf concentrator 5301	Περιστροφική εξάτμιση διαλυμάτων υπό κενό
Thermo-Fischer	ABI 3100 Genetic Analyzer	Ποσοδιορισμός αλληλουχίας κατά Sanger
Illumina	MiSeq System	Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας
Illumina	HiSeq2500 System	Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας
Agilent Genomics	2100 Bioanalyzer	Ανάλυση μεγέθους νουκλεϊκών οξέων
Thermo-Fischer	Qubit Fluorometer	Ποσοτικός προσδιορισμός DNA
Thermo-Fischer	NanoDrop	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA
Thermo-Fischer	Biomate3 UV-Vis Spectrometer	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού DNA

Πίνακας 12. Εργαστηριακός αναλυτικός εξοπλισμός

4.2 Κλινικό Υλικό

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μελέτες:

1) Αρχικά χαρακτηρίστηκαν, 266 ασθενείς με MYN και 110 ασθενείς με ΜΔΣ/MYN, τόσο για μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια της αιμοποίησης *JAK2*, *MPL*, *CALR*, όσο και για μεταλλάξεις σε γονίδια με τροποποιητική δράση, όπως τα *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *SETBP1*, *CSF3R* και *KIT*.

Η διάγνωση των ασθενών έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO 2016, όπως αυτά περιγράφονται στο Κεφάλαιο 1.

Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω τεχνικών διερεύνησης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών, συγκεκριμένα PCR τελικού σημείου, HRMA και κατά Sanger προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων.

266 ασθενείς με MYN	
63 ασθενείς με	Αληθή Πολυκυτταραιμία (ΑΠ)
98 ασθενείς με	Ιδιοπαθή Θρομβοκυτταραιμία (ΙΘ)
89 ασθενείς με	Μυελοϊνώση (ΜΙ)
6 ασθενείς με	Χρόνια Ουδετεροφιλική Λευχαιμία (ΧΟΛ)
10 ασθενείς με	Συστηματική Μαστοκυττάρωση (ΣΜ)
110 ασθενείς με ΜΔΣ/MYN	
57 ασθενείς με	Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ)
39 ασθενείς με	άτυπη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (αΧΜΛ)
14 ασθενείς με	ΜΔΣ/MYN με δακτυλιωτούς σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ)

Πίνακας 13. Κλινικό Υλικό. Αναλυτικά οι κατηγορίες νοσημάτων και ο αριθμός των ασθενών στις επιμέρους κοορτές, που μελετήθηκαν για μεταλλάξεις σε μεμονωμένες γενωμικές περιοχές.

2) Επιπλέον μελετήθηκαν για τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις, 29 ασθενείς με ΧΜΛ, στους οποίους ανιχνεύθηκε το χιμαιρικό γονίδιο *BCR-ABL*.

3) Ακολούθησε στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με αναλυτικές συσκευές δεύτερης γενιάς (targeted Next Generation Sequencing, targeted NGS), ο οποίος πραγματοποιήθηκε σε 25 ασθενείς.

α) Σε αυτούς συμπεριλήφθηκαν, 1 ασθενής με ΑΠ, 3 με ΙΘ, 4 με ΠΜΙ, 1 με ΧΜΜΛ, 2 με ΟΜΛ και 2 με οικογενή διαταραχή αιμοπεταλίων στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις, ύστερα από ανάλυση με τεχνικές διερεύνησης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών, όπως PCR τελικού σημείου, HRMA και προσδιορισμός πρωτοδιάταξης μέσω Sanger.

β) Στους εναπομείναντες 12 ασθενείς της μελέτης, είχαν ήδη αναγνωρισθεί μεταλλάξεις εκ των προτέρων, με τις προαναφερθείσες τεχνικές. Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα δοκιμής (test group) της ευαισθησίας και ακρίβειας της μεθόδου, όπου περιλαμβάνονται 1 ασθενής με ΑΠ, 1 με ΙΘ, 7 με ΜΙ, 1 με ΣΜ, 1 με ΧΟΛ και 1 με αΧΜΛ.

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είχαν ήδη επιβεβαιωθεί ή επιβεβαιώθηκαν εκ των υστέρων, με άλλες μεθοδολογίες, όπως περιγράφονται στην παρούσα εργασία.

4) Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MS-HRMA και MSP, σε άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού με κανονικό γονότυπο (n=6 και n=7, αντίστοιχα), σε ασθενείς με MI (n=15, n=28, αντίστοιχα), καθώς και σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ (n=15, n=8).

5) Τέλος, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος μία ομάδας ασθενών με MI (n=6), με μία ομάδα ατόμων από το γενικό πληθυσμό (n=2),.

4.2.1 Φυσιολογικά Δείγματα Αναφοράς (normal control samples)

α) Ως φυσιολογικοί μάρτυρες, για τις αναλύσεις του προτύπου της καμπύλης τήξης, των προϊόντων της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (post Real-Time PCR HRMA), χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA ατόμων χωρίς αιματολογικές διαταραχές, χωρίς άλλο νόσημα ή θεραπεία και φυσιολογικό γονότυπο όσον αφορά στα υπό μελέτη γονίδια.

β) Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μέσω MS-HRMA και MPS, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από 6 και 7 υγιή άτομα, αντίστοιχα, με φυσιολογικό γονότυπο, ως αντιπαραβολή.

Σημειώνεται πως για όλους τους υγιείς δότες που μελετήθηκαν υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

4.2.2 Παθολογικά Δείγματα Αναφοράς (mutated control samples)

α) Ως παθολογικοί μάρτυρες, για τη διερεύνηση και ταξινόμηση των μεταλλάξεων, μέσω HRMA, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από άτομα με αιματολογικές διαταραχές στα οποία, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις, στους εκάστοτε υπό μελέτη γονιδιακούς στόχους, κατά την πορεία της πειραματικής διαδικασίας.

Σημειώνεται πως για όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

4.2.3 Δείγματα Αναφοράς για Μελέτες Μεθυλίωσης (methylation control samples)

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

β) Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, παρασκευάστηκε τεχνητό πλήρως μεθυλιωμένο (100% 5'-mC) 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).

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

4.2.4 Προέλευση Δειγμάτων Ασθενών

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από συνεργαζόμενες Αιματολογικές Κλινικές και Τμήματα Νοσοκομείων της Αττικής και της Περιφέρειας, συγκεκριμένα, από την Αιματολογική Κλινική της Ευρωκλινικής Αθηνών, την Αιματολογική Κλινική και το Αιματολογικό Τμήμα της Κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας του ΠΓΝ Αθηνών "Λαϊκό", το Αιματολογικό Εργαστήριο της Υπηρεσίας Αιμοδοσίας του ΠΝ "Αρεταίειο", την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Λάρισας, την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Αλεξανδρούπολης, την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Ιωαννίνων, την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ "Αττικόν", την Αιματολογική Κλινική του ΓΝ Αθηνών "Γ. Γεννηματάς" και την Αιματολογική Κλινική του ΓΝ Αθηνών "Ο Ευαγγελισμός".

Η διαχείριση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Κατόπιν ενημέρωσης από τον θεράποντα ιατρό, ζητήθηκε και ελήφθη, έγγραφη συγκατάθεση, από όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν.

4.3 Τεχνικές Επεξεργασίας Νουκλεϊκών Οξέων

4.3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών, πραγματοποιήθηκε με το ολοκληρωμένο σύστημα FlexiGene DNA Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen).

4.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA σε φασματοφωτόμετρο μάζας

Διαδικασία

1. Προηγείται 1:100 αραιώση του διαλύματος DNA, σε ddH₂O.

2. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260nm και 280nm. Οι τιμές είναι αποδεκτές όταν το πηλίκο της οπτικής πυκνότητας (optical density, O.D.), σε μήκος κύματος 260nm, προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm, κυμαίνεται μεταξύ 1.6 και 2.0 ($O.D._{260}/O.D._{280}=1.6-2.0$). Η τιμή αυτή είναι ενδεικτική της καθαρότητας του διαλύματος από προσμείξεις, αλλά και της πυκνότητας του DNA.
3. Η συγκέντρωση του DNA προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση, έχοντας υπόψιν το δεδομένο πως σε μήκος κύματος 260nm, ένα δείγμα DNA, με συγκέντρωση 50mg/mL, έχει οπτική πυκνότητα που ισούται με τη μονάδα:

$$\text{Συγκέντρωση DNA} = (1/\text{αραίωση}) \times 50 \times O.D._{260}$$

4.3.3 Απομόνωση RNA

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

1. Φικόλη
2. Διάλυμα PBS (Phosphate buffered Saline, Sigma-Aldrich)
3. Διάλυμα Trizol (φαινόλη, 2'-μερκαπτοαιθανόλη, ισοθειοκυανικό γουανίδιο, Sigma-Aldrich)
4. Χλωροφόρμιο (Sigma-Aldrich)
5. Απόλυτη αιθανόλη (EtOH 100%)
6. Διάλυμα αιθανόλης 75% (EtOH 75%)
7. ddH₂O

4.3.3.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

1. Φικόλη (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich)
2. Διάλυμα PBS (Phosphate buffered Saline, Sigma-Aldrich)

Διαδικασία

1. Αραίωση ολικού αίματος (1:1) ή μυελού των οστών (1:2) με διάλυμα PBS
2. Επιστοίβαση 5-7mL αραιωμένου αίματος ή μυελού των οστών σε 3mL φικόλης σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15mL.
3. Φυγοκέντρηση για 15min, 1900rpm, 4°C
4. Συλλογή στιβάδας μονοπύρηνων και μεταφορά σε σωληνάριο των 15mL
5. Προσθήκη 10mL διαλύματος PBS και ήπια ανακίνηση
6. Φυγοκέντρηση για 15min, 1900rpm, 4°C
7. Απόρριψη υπερκείμενου
8. Επανεναίωση του ιζήματος μονοπύρηνων με μηχανική θραύση
9. Επανάληψη των σταδίων 5-8 για μία ακόμα φορά
10. Επανεναίωση του ιζήματος μονοπύρηνων σε 1mL PBS
11. Μέτρηση κυττάρων

4.3.3.2 Απομόνωση ολικού κλάσματος RNA

Αντιδραστήρια – Διαλύματα

1. Διάλυμα Trizol (φαινόλη, 2'-μερκαπτοαιθανόλη, ισοθειοκυαντικό γουανίδιο, Sigma-Aldrich)
2. Χλωροφόρμιο
3. Απόλυτη αιθανόλη (EtOH 100%)
4. Διάλυμα αιθανόλης 75% (EtOH 75%)
5. ddH₂O

Διαδικασία

1. Μεταφορά 5x10⁶ κυττάρων σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL
2. Φυγοκέντρηση
3. Απόρριψη του υπερκείμενου PBS
4. Προσθήκη 200uL διαλύματος Trizol ανά 10⁶ κύτταρα
5. Προσθήκη χλωροφορμίου σε υποδεκαπλάσιο όγκο (1:10), συγκριτικά με την ποσότητα Trizol
6. Ισχυρή ανακίνηση για 3sec, μέχρι πλήρους ομογενοποίησης
7. Τοποθέτηση σε παγοθρύμματα για 3min
8. Φυγοκέντρηση για 10min, 10500rpm, 4°C
9. Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf των 2mL
10. Επανάληψη των σταδίων 5-9 για μία ακόμα φορά
11. Προσθήκη ίσου όγκου (1:1) απόλυτης αιθανόλης (EtOH 100%)
12. Καταβύθιση του RNA για 1h, σε θερμοκρασία -20°C
13. Φυγοκέντρηση για 10min, 10500rpm, 4°C
14. Απόρριψη υπερκείμενου
15. Έκπλυση του ιζήματος RNA με προσθήκη 1mL αιθανόλης 75% (EtOH 75%)
16. Φυγοκέντρηση για 10min, 10500rpm, 4°C
17. Απόρριψη υπερκείμενου
18. Αποξήρανση του ιζήματος RNA σε κενό
19. Διαλυτοποίηση του ιζήματος RNA σε 30-100uL ddH₂O
20. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C

4.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA σε συσκευή NanoDrop

Διαδικασία

1. Η διαχείριση της συσκευής NanoDrop γίνεται μέσω υπολογιστή, όπου και καταγράφονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.
2. Επιλέγεται το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα.
3. Σε κατάλληλο βάθρο της συσκευής, μεταξύ δύο οπτικών ινών, εναποτίθεται 1uL RNA, που συγκρατείται μέσω επιφανειακής τάσης.

4. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε δύο μήκη κύματος, 260nm και 280nm. Οι τιμές είναι αποδεκτές όταν το πηλίκο της οπτικής πυκνότητας (optical density, O.D.) σε μήκος κύματος 260nm, προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm, κυμαίνεται μεταξύ 1.6 και 2.0 ($O.D._{260}/O.D._{280}=1.6-2.0$). Η τιμή αυτή είναι ενδεικτική της καθαρότητας και της πυκνότητας του RNA.
5. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται αυτόματα από το υπολογιστικό πρόγραμμα, ενώ προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση, έχοντας υπόψιν το δεδομένο πως σε μήκος κύματος 260nm ένα δείγμα RNA με συγκέντρωση 40mg/1mL, έχει οπτική πυκνότητα που ισούται με τη μονάδα:

$$\text{Συγκέντρωση DNA} = 40 \times O.D._{260}$$

4.3.5 Αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA – Σύνθεση cDNA

Αρχικά συντίθεται συμπληρωματικό DNA (cDNA) από 1μg ολικού κυτταρικού RNA. με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με το πρωτόκολλο των τυχαίων εξαμερών.

Στο πρωτόκολλο αυτό, ως εκκινητές (primers) για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από πολλαπλές θέσεις της μητρικής αλυσίδας RNA, χρησιμοποιούνται εξανουκλεοτίδια με τυχαία αλληλουχία.

Την αντίδραση καταλύει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση του ρετροϊού Moloney που προκαλεί λευχαιμία σε ποντικούς (Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT).

Σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf τοποθετούνται 1μg RNA, 2uL από τυχαία εξανουκλεοτίδια ως εκκινητές και ddH₂O, μέχρι τελικής ποσότητας 20uL, όπως υπολογίζεται για το τελικό μείγμα και καθορίζεται από τον όγκο του διαλύματος RNA.

Το μείγμα αποδιατάσσεται αρχικά στους 65°C για 5min, κατόπιν μεταφέρεται σε πάγο για 5min. Στη συνέχεια προστίθεται 200U από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση του ιού λευχαιμίας των ποντικών του Moloney (M-MLV RT, Invitrogen), 40U αναστολέα των ριβονουκλεασών, 0.1mM διθειοθρεϊτόλης, 4uL ρυθμιστικού διαλύματος 5x, καθώς και ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs, Invitrogen), σε τελική συγκέντρωση 1mM.

Το μείγμα επωάζεται για μία ώρα στους 37°C, οπότε και πραγματοποιείται η σύνθεση του cDNA, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί τελική αποδιάταξη στους 94°C για 2min. Συνοπτικά το πρωτόκολλο που μόλις περιγράφηκε παρουσιάζεται παρακάτω:

Αντιδραστήρια για αντίστροφη μεταγραφή

- RNA: 1μg
- Εκκινητές: τυχαία εξανουκλεοτίδια (Random Hexamers, Invitrogen): 2uL
- Ένζυμο (200Units/uL): Αντίστροφη μεταγραφάση του ιού λευχαιμίας των ποντικών του Moloney (M-MLV RT, Invitrogen): 1uL
- Αναστολέας ριβονουκλεασών (RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor) (40U/uL, Invitrogen): 1uL
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (σύνθεση διαλύματος 5x: 250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, pH 8.3, Invitrogen): 4uL
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT) (0.2mM/uL, Invitrogen): 0.5uL
- Ισομοριακό μείγμα ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (40mM dNTPs, Invitrogen) με ολική συγκέντρωση 1mM: 0.5uL
- ddH₂O: μέχρι τελικού όγκου 20uL

Πίνακας 14. Αντιδραστήρια για αντίστροφη μεταγραφή ολικού RNA, προς σύνθεση cDNA.

Συνθήκες αντίδρασης για αντίστροφη μεταγραφή

- Αρχική αποδιάταξη: 65°C - 5'
- Σύνθεση: 37°C - 60'
- Τελική αποδιάταξη: 94°C - 2'

Πίνακας 15. Συνθήκες αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής ολικού RNA, προς σύνθεση cDNA.

4.4 Τελικού σημείου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (endpoint PCR), ακολουθούμενες από ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, για ανίχνευση μεταλλάξεων

4.4.1 Ημιοσοτικός προσδιορισμός της σημειακής μετάλλαξης *JAK2V617F*, μέσω του Συστήματος Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System PCR, ARMS-PCR)

4.4.1.1 Η τεχνική

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

Ακριβώς επειδή η Taq πολυμεράση δεν έχει δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης, δε μπορεί να επιδιορθώσει τυχόν ασυμφωνίες στο 3' άκρο του εκκινητή. Ως αποτέλεσμα, ο βαθμός συμπληρωματικότητας του άκρου αυτού του εκκινητή, με το υπόστρωμα, είναι καθοριστικός παράγοντας απόδοσης της αντίδρασης.

Για το λόγο αυτό, η επιλογή ενός εκκινητή που είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο και εμφανίζει ασυμφωνία βάσεως στο 3' άκρο του με το μεταλλαγμένο, θα οδηγήσει σε επιλεκτική ενίσχυση του πρώτου. Κατά αντίστοιχο τρόπο, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο θα ενισχυθεί εάν το 3' άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό με το ίδιο και όχι με το φυσιολογικό.

Η εισαγωγή μίας επιπλέον θέσης ασυμφωνίας κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω την ειδικότητά του, δηλαδή την ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στο φυσιολογικό και στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Έτσι, δύο εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα, ώστε να ενισχύσουν επιλεκτικά ο ένας το μεταλλαγμένο, ενώ ο δεύτερος το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Σε κάθε περίπτωση, ο εκάστοτε εκκινητής δεσμεύεται μόνο στο αλληλόμορφο για το οποίο είναι ειδικός, ενώ το μη-ειδικό για αυτόν αλληλόμορφο ανθίσταται στην ενίσχυση.

Κατά τη διεξαγωγή μίας αντίδρασης ARMS-PCR, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται παράλληλα μία αντίδραση ελέγχου προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως η έλλειψη προϊόντος, από το συγκεκριμένο δείγμα, οφείλεται στην απουσία είτε μεταλλαγμένων, είτε φυσιολογικών αλληλομόρφων, αλλά όχι σε αποτυχία διεξαγωγής της PCR αντίδρασης.

Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη δύο επιπλέον εκκινητών στην αντίδραση. Οι δύο αυτοί, εξωτερικοί εκκινητές, ενισχύουν ένα ευρύ τμήμα, όπου εμπεριέχεται η μετάλλαξη και το οποίο χρησιμεύει ως ζώνη θετικού ελέγχου.

Η ζώνη αυτή επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του DNA για επιπλέον ενίσχυση και περαιτέρω ανάλυση από τους δύο εσωτερικούς αλληλοειδικούς εκκινητές. Η απόσταση κάθε εξωτερικού εκκινητή από το υπο μελέτη νουκλεοτίδιο είναι διαφορετική, γεγονός που εξυπηρετεί την τεχνική, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Οι δύο επιπρόσθετοι εσωτερικοί αλληλοειδικοί εκκινητές, διαφέρουν στο 3' άκρο τους. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ο δεύτερος με το μεταλλαγμένο. Διαφέρουν επίσης ως προς την αλυσίδα επι της οποίας προσδένονται. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με την κωδική αλυσίδα του DNA, ενώ ο δεύτερος με τη μη-κωδική.

Οδηγούν έτσι σε σύνθεση δύο προϊόντων διαφορετικού μεγέθους, αφού κάθε εσωτερικός εκκινητής δρα συνδυαστικά με έναν μόνο από τους δύο εξωτερικούς, μη-ειδικούς εκκινητές, οι οποίοι είναι άνισα τοποθετημένοι, σε σχέση με την υπό διερεύνηση μετάλλαξη.

Οι ειδικοί εκκινητές παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης φυσιολογικών και μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, σε ετεροζυγώτες που χαρακτηρίζονται και από τους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς, ή μόνο μίας κατάστασης ξεχωριστά, σε ομοζυγώτες που φέρουν ή όχι τη μετάλλαξη που μελετάται.

Μάλιστα το ποσοστό ενίσχυσης κάθε ειδικής ζώνης αντιπροσωπεύει την αναλογία των δύο πληθυσμών κυττάρων, επιτρέποντας την ημι-ποσοτική εκτίμηση του φορτίου της νόσου (Hu et al. 2012, Landsverk and Wong 2013).

Προκειμένου να ανιχνευθεί, μέσω ARMS-PCR, η μετάλλαξη V617F, που εντοπίζεται στην περιοχή με δράση κινάσης του γονιδίου *JAK2*, ενισχύθηκε τμήμα DNA στο εξονίο 14. Αυτό επιτυγχάνεται με το σχεδιασμό και χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών (primers), δηλαδή μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20-30 βάσεων, τα οποία είναι συμπληρωματικά, καθένα για μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική ακολουθία. Μεταξύ των δύο εκκινητών εντοπίζεται η αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί. Κατόπιν, σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf τοποθετούνται 25ng DNA και στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα με την προσθήκη κατάλληλων αντιδραστηρίων, όπως αυτά περιγράφονται στη συνέχεια.

Αντιδραστήρια ARMS-PCR για ανίχνευση της μετάλλαξης *JAK2V617F*

Υπόστρωμα	DNA: 50ng
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)*	5.0uL (1x)
Ιόντα Μαγνησίου (MgCl ₂) (25mM)	2.0uL (1.0mM) **
dNTPs (40mM)	1.0uL (0.8mM)
Εκκινητές (50uM) (n=4)	1.0uL (1uM) (JAK2.FO, JAK2.RO) 0.5uL (0.5uM) (JAK2.Fwt, JAK2.Rmt)
Ένζυμο (5U/uL)	Taq DNA πολυμεράση***: 2.5U
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 50uL

Πίνακας 16. Αντιδραστήρια για ημιποσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης *JAK2V617F*, με ARMS-PCR. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης ARMS-PCR για ανίχνευση της μετάλλαξης JAK2V617F

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 10'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 30 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 1'
 - Πρόσδεση εκκινητών: 60°C - 1'
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 1'
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 17. Συνθήκες αντίδρασης ARMS-PCR, για ημιποσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης JAK2V617F.

4.4.1.2 Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης

α) Αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA, εξετάζονται δύο δείγματα από άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, χωρίς τη σημειακή μετάλλαξη JAK2V617F (“αρνητικός μάρτυρας”).

β) Αποκλεισμός ανεπιθύμητης πρόσμειξης (contamination) των υλικών

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται δύο σωληνάρια με όλα τα αντιδραστήρια, χωρίς το DNA.

γ) Επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της αντίδρασης (αληθώς θετικά αποτελέσματα)

Σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονται δείγματα τα οποία έχει επιβεβαιωθεί εκ των προτέρων πως είναι θετικά για την αντίδραση (“θετικός μάρτυρας”). Αυτά προέρχονται από ασθενείς με υψηλό φορτίο νόσου, που ταυτοποιούνται ως ομοζυγώτες για τη σημειακή μετάλλαξη JAK2V617F, καθώς και από ασθενείς με χαμηλότερα ποσοστά ανίχνευσης αυτής, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως ετεροζυγώτες. Με την τεχνική ARMS-PCR επομένως, καθίσταται εφικτή η επιπρόσθετη ημι-ποσοτική εκτίμηση του φορτίου της νόσου.

δ) Αποκλεισμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω κακής ποιότητας του DNA

Με την τεχνική ARMS-PCR, ταυτόχρονα με τις αλληλουχίες στόχους, ενισχύεται μία ευρύτερη περιοχή του γονιδίου, όπου εσωκλείονται οι υπο μελέτη μεταλλάξεις. Η περιοχή αυτή καθορίζεται από τους δύο εξωτερικούς εκκινητές (JAK2.FO και JAK2.RO).

4.4.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2* με Αλληλοειδική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Allele Specific PCR, AS-PCR)

4.4.2.1 Η τεχνική

Η μέθοδος της αλληλοειδικής PCR τελικού σταδίου, βασίζεται στο σχεδιασμό εκκινητών που αναγνωρίζουν με απόλυτα εξειδικευμένο τρόπο τις αλληλουχίες του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στη σιαμόρφωση εκκινητών, των οποίων το 3' άκρο υβριδίζεται με το υπόστρωμα και επιτρέπει την πρόσδεση της πολυμεράσης, κατά συνέπεια την έναρξη της αντίδρασης, μόνον όταν αυτό είναι απόλυτα συμπληρωματικό προς τη μετάλλαξη. Η επιτυχία της αντίδρασης διασφαλίζεται με το σχηματισμό ενός επιπρόσθετου προϊόντος, γνωστό ως ζώνης αναφοράς, μεταξύ ενός ζεύγους εκκινητών που προσδένονται εκατέρωθεν του σημείου όπου εντοπίζεται η υπό διερεύνηση μετάλλαξη.

Οι αλληλοειδικοί εκκινητές, το 3' άκρο των οποίων συμπίπτει με τη μετάλλαξη που μελετάται, σχηματίζουν προϊόν με έναν εκ των δύο εξωτερικών εκκινητών που χρησιμεύουν για το σχεδιασμό της ζώνης ελέγχου, μόνον όταν υπάρχει μετάλλαξη.

Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε γνωστή σημειακή μετάλλαξη ή μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό, δεν χρησιμοποιεί ραδιενέργεια και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό για την ανίχνευση των αλληλομόρφων.

Προκειμένου να γίνει ανάλυση στην περιοχή του εξονίου 12 του γονιδίου *JAK2*, ενισχύθηκε τμήμα DNA, εντός του εξονίου 12 και συγκεκριμένα στην περιοχή όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις c.1624_1629delAATGAA (p.N542_E543del), c.1615_1616AA>TT (p.K539L), c.1611_1616delTCACAA (p.F537_K539>L), c.1613_1616ACAA>T (p.H538_K539>L).

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων του εξονίου 12 του γονιδίου *JAK2* πραγματοποιείται με τη βοήθεια των εκκινητών Common Forward (CF), Common Reverse (CR) και Forward mutant specific (Fmt). Ο τελευταίος είναι ειδικός για κάθε μετάλλαξη, ξεχωριστά, ενώ οι δύο πρώτοι αντιπροσωπεύουν τους μη-ειδικούς εξωτερικούς εκκινητές της ζώνης ελέγχου. Για μία αντίδραση, καθεμιάς εκ των τεσσάρων διαφορετικών αντιδράσεων, χρησιμοποιούμε τις ακόλουθες αναλογίες, σε διαφορετικά σωληνάρια τύπου Eppendorf.

Αντιδραστήρια AS-PCR για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2*

Υπόστρωμα	DNA: 50ng
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)*	5.0uL (1x)
Ιόντα Μαγνησίου (MgCl ₂) (25mM)	2.0uL (1.0mM) **
dNTPs (40mM)	1.0uL (0.8mM)
Εκκινητές (50uM) (n=3)	0.5uL (0.5uM) (JAK2.CR, JAK2.Fmt) 0.25uL (0.25uM) (JAK2.CF)
Ένζυμο (5U/uL)	Taq DNA πολυμεράση***: 2.5U
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 50uL

Πίνακας 18. Αντιδραστήρια για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2*, με AS-PCR. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 10'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 30 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 94°C - 1'
 - Πρόσδεση εκκινήτων: 66°C - 1'
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 1'
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 19. Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR, για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2.

4.4.2.2 Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης

α) Αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA, εξετάζονται δύο δείγματα ατόμων φυσιολογικού πληθυσμού, χωρίς μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου JAK2 ("αρνητικός μάρτυρας").

β) Αποκλεισμός ανεπιθύμητης πρόσμειξης (contamination) των υλικών

Σε κάθε ξεχωριστή πειραματική διαδικασία περιλαμβάνονται δύο σωληνάρια τα οποία περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια όχι όμως DNA.

γ) Επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της αντίδρασης (αληθώς θετικά αποτελέσματα)

Σε κάθε ξεχωριστή πειραματική διαδικασία, συμπεριλαμβάνεται δείγμα ασθενούς, που φέρει την εκάστοτε μετάλλαξη υπό διερεύνηση ("θετικός μάρτυρας"). Τα δείγματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί εκ των προτέρων στο εργαστήριο.

δ) Αποκλεισμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω κακής ποιότητας του DNA

Με την τεχνική AS-PCR, ταυτόχρονα με τις αλληλουχίες στόχους, ενισχύεται και μία ευρύτερη περιοχή του γονιδίου, όπου εσωκλείονται οι υπο μελέτη μεταλλάξεις. Η περιοχή αυτή καθορίζεται από τους δύο εξωτερικούς εκκινήτες (JAK2.CF και JAK2.CR).

4.4.3 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου *c-MPL* με Αλληλοειδική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Allele Specific PCR, AS-PCR)

4.4.3.1 Η τεχνική

Η αλληλοειδική PCR εφαρμόζεται και για την ανίχνευση των μεταλλάξεων W515L/K του γονιδίου *c-MPL*, που κωδικοποιεί στον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης. Τμήμα DNA στο εξόνιο 10 του εν

λόγω γονιδίου, όπου εντοπίζονται οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις επεκτείνεται με ένα ζευγάρι εξωτερικών εκκινητών (MPL.FO, MPL.RO) που ενισχύουν μία ζώνη ελέγχου, ενώ ένας ενδότερος εκκινητής (MPL.Fmt), ο οποίος είναι ειδικός για μία εκ των δύο μεταλλάξεων, προστίθεται στο διάλυμα της εκάστοτε αντίδρασης πολυμεράσης, οι οποίες πρέπει να τονισθεί πως παρασκευάζονται ξεχωριστά. Για καθεμία εκ των δύο διαφορετικών αντιδράσεων, χρησιμοποιούμε τις ακόλουθες αναλογίες, σε δύο διαφορετικά σωληνάρια τύπου Eppendorf.

Αντιδραστήρια AS-PCR για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL	
Υπόστρωμα	DNA: 50ng
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x)*	5.0uL (1x)
Ιόντα Μαγνησίου (MgCl ₂) (25mM)	2.0uL (1.0mM) **
dNTPs (40mM)	1.0uL (0.8mM)
Εκκινητές (50uM) (n=3)	1.0uL (1uM) (MPL.RO, MPL.Fmt) 0.5uL (0.5uM) (MPL.FO)
Ένζυμο (5U/uL)	Taq DNA πολυμεράση***: 2.5U
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 50uL

Πίνακας 20. Αντιδραστήρια για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL, με AS-PCR. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 34 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 94°C - 1'
 - Πρόσδεση εκκινητών: 66°C - 1'
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 1'
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 21. Συνθήκες αντίδρασης AS-PCR, για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου MPL.

4.4.3.2 Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της αντίδρασης

α) Αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA, εξετάζονται δύο δείγματα από άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, χωρίς μεταλλάξεις στο εξόνιο 10 του γονιδίου *c-MPL* ("αρνητικός μάρτυρας").

β) Αποκλεισμός ανεπιθύμητης πρόσμειξης (contamination) των υλικών

Σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται δύο σωληνάρια με όλα τα αντιδραστήρια, όχι όμως DNA.

γ) Επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της αντίδρασης (αληθώς θετικά αποτελέσματα)

Σε κάθε ξεχωριστή πειραματική διαδικασία, συμπεριλαμβάνεται δείγμα ασθενούς, που φέρει την εκάστοτε μετάλλαξη υπό διερεύνηση ("θετικός μάρτυρας"). Τα δείγματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί εκ των προτέρων στο εργαστήριο.

δ) Αποκλεισμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω κακής ποιότητας του DNA

Με την τεχνική AS-PCR, ταυτόχρονα με τις αλληλουχίες στόχους, ενισχύεται και μία ευρύτερη περιοχή του γονιδίου, όπου εσωκλείονται οι υπο μελέτη μεταλλάξεις. Η περιοχή αυτή καθορίζεται από τους δύο εξωτερικούς εκκινητές (MPL.FO και MPL.RO).

4.4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR τελικού σημείου

4.4.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική ικανότητα νουκλεϊκών οξέων
Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό των τμημάτων του DNA με βάση το μέγεθός τους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες:

α) Μοριακό μέγεθος DNA

Η ταχύτητα μετακίνησης (απομάκρυνσης από την κάθοδο του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στο οποίο διενεργείται η ηλεκτροφόρηση) είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται.

β) Συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης

Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυκνότητας της πηκτής. Χρησιμοποιώντας πηκτές διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Συνήθως για τον διαχωρισμό των προϊόντων επώασης διενεργείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης από 1% έως 3%.

% Αγαρόζης στην πηκτή	Διαχωρισμός γραμμικών DNA
0.5	1Kb - 30Kb
0.7	800bp - 12Kb
1.0	500bp - 10Kb
1.2	400bp - 7Kb
1.5	200bp - 3Kb
2.0	50bp - 2Kb
3.0	5bp - 1Kb

Πίνακας 22. Η αναλογική σχέση της διαχωριστικής ικανότητας της πηκτής αγαρόζης με την πυκνότητα.

γ) Στερεοδιάταξη του DNA (κλειστό κυκλικό, ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό)

Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και το γραμμικό DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της κλειστής κυκλικής μορφής του DNA.

δ) Τάση του ηλεκτρικού πεδίου

Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ανάλογη με την τάση που εφαρμόζεται, δηλαδή ανάλογη με την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, που διαπερνά το πήκτωμα. Η αύξηση της τάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του κάθε τμήματος DNA με διαφορετικό συντελεστή, ο οποίος εξαρτάται από το μοριακό βάρος του κομματιού DNA. Για το λόγο αυτό, καθώς αυξάνεται η τάση μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται, όταν το DNA ηλεκτροφορείται σε τάση μικρότερη ή ίση με 5 Volts ανά εκατοστό μήκους πεδίου.

4.4.4.2 Ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων ARMS-PCR και AS-PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3.0%

Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 3.0%

- Ζυγίζονται 3.0g αγαρόζης
- Διαλύονται σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (90mM Tris / 100mM Boric Acid, 2mM EDTA, pH8.0)
- Η φιάλη θερμαίνεται με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη
- Προστίθενται 3uL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 0.5μg/mL)
- Το διάλυμα ρίχνεται σε κατάλληλα προετοιμασμένο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική "χτένα", για τη δημιουργία των θέσεων (slots), στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Τεχνική

Τα προϊόντα των ARMS-PCR και AS-PCR αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πηκτή αγαρόζης 3.0% πυκνή (Agarose Molecular Biology Reagent, Sigma-Aldrich), όπου εμπεριέχεται βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/mL). Μόλις 10uL προϊόντος περιέχουν αρκετή ποσότητα νουκλεϊκών οξέων για την ανάλυση. Ως μάρτυρας μεγέθους, ηλεκτροφορούνται παράλληλα 500ng τεχνητών τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών (100bp DNA ladder, Invitrogen).

4.5 Πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (Real Time PCR), ακολουθούμενες από προσδιορισμό της Πρωτοδιάταξης του DNA (Sanger Sequencing), για ανίχνευση και προσδιορισμό μεταλλάξεων

4.5.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας Ανάλυση της Καμπύλης Τήξης προϊόντων PCR Πραγματικού Χρόνου (post Real Time PCR HRMA)

Παραλλαγή της κλασικής PCR (PCR) αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), όπου η ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης καταγράφεται σε υπολογιστό σύστημα, καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Αυτό επιτυγχάνεται μέσω κάμερας υψηλής ευκρίνειας (CCD), η οποία ανιχνεύει τα διαρκώς αυξανόμενα επίπεδα φθορίζουσας ακτινοβολίας, συγκεκριμένου μήκους κύματος, που εκπέμπονται καθόλη τη διαδικασία ενίσχυσης, από ειδικά φθοριοχρώματα.

Οι φθορίζουσες αυτές χρωστικές, είτε κυκλοφορούν στο διάλυμα της αντίδρασης ως μη-δεσμευμένα μόρια, οπότε προσδένονται στα δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης κατά τρόπο μη-ειδικό (Κεφ. 2.5.1), είτε προσαρτώνται επί τροποποιημένων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών, όπως οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης (hybridization probes) και οι ιχνηθέτες υδρόλυσης (hydrolysis probes) (Κεφ. 2.5.2).

1) Η πρώτη κατηγορία αφορά σε φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο δίκλινο DNA (dsDNA) και όταν διεγείρονται αποδίδουν ακτινοβολία ανιχνεύσιμου μήκους κύματος. Μάλιστα, η ένταση της ακτινοβολίας είναι ισχυρότερη όταν η χρωστική είναι προσδεσμένη σε δίκλινα μόρια DNA, συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή αυτής, στο διάλυμα, οπότε τα επίπεδα φθορισμού (background signal) είναι ιδιαίτερα χαμηλά και δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου (HRMA).

Βασικό μειονέκτημα αυτής της κατηγορίας χρωστικών αποτελεί η μη-ειδική πρόσδεση, σε οποιαδήποτε δίκλινη νουκλεοτιδική αλληλουχία συντεθεί, κατά την αντίδραση πολυμεράσης. Συνεπώς απαιτείται ιδιαίτερα προσεκτικός σχεδιασμός εκκινητών και επιλογή κατάλληλων συνθηκών αντίδρασης, ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα αυτής (specificity) και να αποφευχθεί η σύνθεση μη αναμενόμενων προϊόντων.

Ωστόσο, πλεονεκτήμα αποτελεί η δυνατότητα παρατήρησης οποιασδήποτε αλλαγής στην υπο διερεύνηση νουκλεοτιδική ακολουθία, που ορίζεται από τους εκκινητές της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν επιπρόσθετες μεταλλάξεις, ανεξάρτητες εκείνων που είναι ήδη γνωστές και για τις οποίες πραγματοποιείται η ανάλυση εξ αρχής.

2) Στον αντίποδα, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες, ανιχνεύουν συγκεκριμένες μόνον μεταλλάξεις, αφού ουσιαστικά αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με το υπόστρωμα, τα οποία προσδένονται μόνον παρουσία της μετάλλαξης που διερευνά το εκάστοτε πρωτόκολλο. Ωστόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτού του τύπου των ανιχνευτών είναι ιδιαίτερα αυξημένη.

Η τεχνική της υψηλής διακριτικής ικανότητας, ανάλυσης της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (post Real Time PCR HRMA), επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη, τόσο για την ευαισθησία και την αξιοπιστία που παρέχει, όσο και για την ταχύτητα ανάκτησης των δεδομένων, για το χαμηλό της κόστος, καθώς και για την ευκολία σχεδιασμού πρωτοκόλλων και εκτέλεσης των πειραματικών διαδικασιών, κυρίως όμως για τη δυνατότητα να ανιχνεύει και πιο σπάνιες μεταλλάξεις στις υπό διερεύνηση γενωμικές περιοχές.

Συνοπτικά, τα προϊόντα της PCR με το πέρας της ενίσχυσης, εντοπίζονται σε δίκλωνη κατάσταση εκπέμποντας μέγιστα επίπεδα φθορισμού. Ακολουθεί σταδιακή αποδιάταξη αυτών, με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας, οπότε και ο φθορισμός φθίνει, φτάνοντας σε μηδενικά επίπεδα όταν πλέον όλα τα μόρια εντοπίζονται σε μονόκλωνη κατάσταση.

Η καμπύλη τήξης προκύπτει από την ανάλυση των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο, μετά απο κανονικοποίηση των δεδομένων. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74 (Roche Diagnostics, USA).

Με την τεχνική αυτή, στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *CALR*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *SETBP1*, *SRSF2*, *CSF3R* και *KIT*.

- Το πρότυπο της καμπύλης στα φυσιολογικά δείγματα διαφέρει σε σύγκριση με τα δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση, αλλά και στις δύο αυτές καταστάσεις μεταξύ τους.
- Παράλληλα με τα δείγματα προς ταυτοποίηση, σε κάθε αναλυτική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε, ίση ποσότητα από πρότυπα δείγματα αναφοράς (control samples), από φυσιολογικούς δότες, αλλά και από ασθενείς με μεταλλάξεις στις υπό μελέτη γενωμικές περιοχές, ο γονότυπος των οποίων χαρακτηρίστηκε σταδιακά μέσω HRMA, ακολουθούμενης από προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger.
- Δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν απροσδιόριστες αποκλίσεις στην καμπύλη τήξης, συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς, αναλύθηκαν εκ νέου με προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger, για ταυτοποίηση των πολυμορφικών θέσεων.

Οι εκκινητές (Παράρτημα I) σχεδιάστηκαν με κατάλληλα λογισμικά, συγκεκριμένα τα Oligo Primer Analysis Software v. 7 (Molecular Biology Insights), PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) και Tm Calculator (Applied Biosystems).

Σε κάθε περίπτωση, η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, T_a), για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής ειδικότητας, ανιχνεύτηκε πειραματικά μέσω PCR διαβαθμιζόμενων θερμοκρασιών (gradient PCR), σε συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler, συνοδευόμενη από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυνκή (Κεφ. 4.4.4.2).

4.5.1.1 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/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)
HRM mix (2x)*	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	8μL (2.5mM)	8.0μL (2.5mM)	8.0μL (2.5mM)	9.6μL (3.0mM)	8.0μL (2.5mM)	9.6μL (3.0mM)	8.0μL (2.5mM)	8.0μL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25μM)	3.2μL (1.0μM) CALR. e9.HF	1.6μL (0.5μM) CSF3R. e14.HF	1.6μL (0.5μM) DNMT3A. e23.HF	1.12μL (0.35μM) IDH2. e4.HF	1.28μL (0.4μM) SETBP1. e4.HF	3.2μL (1.0μM) SF3B1. e14.HF	1.6μL (0.5μM) SF3B1. e15.HF	1.6μL (0.5μM) SRSF2. e1.HF
Εκκινητής 2 (25μM)	1.6μL (0.5μM) CALR. e9.HR	1.6μL (0.5μM) CSF3R. e14.HR	1.6μL (0.5μM) DNMT3A. e23.HR	1.12μL (0.35μM) IDH2. e4.HR	1.28μL (0.4μM) SETBP1. e4.HR	3.2μL (1.0μM) SF3B1. e14.HR	1.6μL (0.5μM) SF3B1. e15.HR	1.6μL (0.5μM) SRSF2. e1.HR
ddH ₂ O	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL

A.	<i>U2AF1</i> εξόνιο 2	<i>U2AF1</i> εξόνιο 6
Υπόστρωμα DNA (5ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)
HRM mix (2x)*	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	8.0μL (2.5mM)	6.4μL (2.0mM)
Εκκινητής 1 (25μM)	1.6μL (0.5μM) U2AF1. e2.HF	0.96μL (0.3μM) U2AF1. e6.HF
Εκκινητής 2 (25μM)	1.6μL (0.5μM) U2AF1. e2.HR	0.96μL (0.3μM) U2AF1. e6.HR
ddH ₂ O	Έως 80μL	Έως 80μL

B.	<i>ASXL1</i> εξόνιο 12	<i>IDH1</i> εξόνιο 4	<i>KIT</i> εξόνιο 17
Υπόστρωμα DNA (5ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)	20μL (1.25 ng/μL)
HRM mix (2x)**	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)	40.0μL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	8μL (2.5mM)	9.6μL (3.0mM)	8.0μL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25μM)	1.28μL (0.4μM) ASXL1. e12.HF	0.64μL (0.2μM) IDH1. e4.HF	0.96μL (0.3μM) KIT. e17.HF
Εκκινητής 2 (25μM)	1.28μL (0.4μM) ASXL1. e12.HR	2.56μL (0.8μM) IDH1. e4.HR	0.96μL (0.3μM) KIT. e17.HR
ddH ₂ O	Έως 80μL	Έως 80μL	Έως 80μL

Πίνακας 23. 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: 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 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 24. Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR για τους HRMA ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα.

4.5.1.2 Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR, με ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη

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 οC):
 - Αρχική θερμοκρασία: 65°C
 - Τελική θερμοκρασία: 99°C

Πίνακας 25. 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 πηκτική αγαρόζη 3% πυκνή, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο **4.4.4.2**.

4.5.1.3 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. e9.HR	0.2uL (0.5uM) CSF3R. e14.HR	0.2uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HR	0.14uL (0.35uM) IDH2. e4.HR	0.16uL (0.4uM) SETBP1. e4.HR	0.4uL (1.0uM) SF3B1. e14.HR	0.2uL (0.5uM) SF3B1. e15.HR	0.2uL (0.5uM) SRSF2. 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	B.	ASXL1 εξόνιο 12	IDH1 εξόνιο 4	KIT εξόνιο 17
HRM mix (2x)*	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	HRM mix (2x)**	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	1.0uL (2.5mM)	0.8uL (2.0mM)	MgCl ₂ (25mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.2uL (0.5uM) U2AF1. e2.HF	0.12uL (0.3uM) U2AF1. e6.HF	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)	0.2uL (0.5uM) U2AF1. e2.HR	0.12uL (0.3uM) U2AF1. e6.HR	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	1.1uL	1.46uL	ddH ₂ O	1.68uL	0.9uL	1.26uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	7.5uL	7.5uL	Συνολικός όγκος αντίδρασης	8.0uL	7.5uL	7.5uL

Πίνακας 26. Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση Real-Time PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών, σε 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 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/μL, μέχρι τελικού όγκου 10μL. 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 27. 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.

4.5.1.4 Ανάλυση των δεδομένων της post Real Time PCR HRMA

Μετά την HRMA, ακολουθεί ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν με το λογισμικό LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74 (Roche Diagnostics, USA).

Αρχικά προσδιορίζεται ο χρόνος ανάδειξης των προϊόντων (cycling point, Cp), οπότε και χαρακτηρίζεται η αριθμητική επάρκεια αυτών για περαιτέρω αναλύσεις.

Έπειτα προσδιορίζεται η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των προϊόντων της αντίδρασης έχει αποδιαταχθεί (melting temperature, Tm).

Ακολουθεί καθορισμός των ακραίων τιμών επιπέδων φθορισμού, 100% και 0%. Η πρώτη τιμή χαρακτηρίζει προϊόντα σε δίκλωνη κατάσταση, τα οποία ανιχνεύονται κατά την έναρξη της ανάλυσης καμπύλης τήξης, ενώ η τελευταία αφορά σε μονόκλιωνα προϊόντα, τα οποία έχουν αποδιαταχθεί λόγω έντονης θερμοκρασιακής αύξησης και τα οποία ανιχνεύονται μετά το πέρας της ανάλυσης καμπύλης τήξης.

Αμέσως μετά καθορίζονται τα επίπεδα θορύβου του φθορισμού (background fluorescence), πραγματοποιείται κανονικοποίηση των δεδομένων, ενώ τέλος γίνεται ομαδοποίηση (grouping) των διαφορετικών γονότυπων που έχουν ανιχνευθεί.

4.5.1.5 Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της post Real Time PCR HRMA (PCR controls)

α) Αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

Παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA, εξετάζονται δύο δείγματα φυσιολογικών ατόμων χωρίς μεταλλάξεις στα επι μέρους εξόνια των υπο διερεύνηση γονιδίων ("αρνητικός μάρτυρας").

β) Αποκλεισμός ανεπιθύμητης πρόσμειξης (contamination) των υλικών

Σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονται δύο αντιδράσεις οι οποίες περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια όχι όμως DNA. Η απαραίτητη υπολειπόμενη ποσότητα αντίδρασης μέχρι τα 10uL, καλύπτεται με την προσθήκη 2.5uL HPLC grade H₂O.

γ) Επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της αντίδρασης και ομαδοποίηση των δεδομένων (αληθώς θετικά αποτελέσματα)

Σε κάθε ξεχωριστή πειραματική διαδικασία, συμπεριλαμβάνονται δείγματα ασθενών, που φέρουν μεταλλάξεις επι μέρους εξόνια των γονιδίων που αναλύονται ("θετικός μάρτυρας"). Τα δείγματα αυτά έχουν αναλυθεί εκ των προτέρων στο εργαστήριο, ενώ παράλληλα έχει επιβεβαιωθεί και ταυτοποιηθεί η εκάστοτε μετάλλαξη μέσω ανάλυσης πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (DNA Sequencing).

4.5.2 Επιβεβαίωση και χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν με post Real Time PCR HRMA, μέσω προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (Sanger Sequencing)

Σε δείγματα με μεταλλάξεις, οι οποίες δεν είχαν τυποποιηθεί προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger Όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια, αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές για την ενίσχυση των περιοχών ενδιαφέροντος. Ο σχεδιασμός των εκκινητών (Παράρτημα II) έγινε μέσω

κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων Oligo Primer Analysis Software v. 7 (Molecular Biology Insights), PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) και Tm Calculator (Applied Biosystems).

Η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, Ta), για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής ειδικότητας, ανιχνεύτηκε πειραματικά μέσω PCR διαβαθμιζόμενων θερμοκρασιών (gradient PCR), σε συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Κεφ. 4.5.2.1 και 4.5.2.2).

Ακολούθησε ενίσχυση μέσω αντίδρασης πολυμεράσης και ανάλυση μικρής ποσότητας αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (Κεφ. 4.5.2.3 και 4.5.2.4).

Στη συνέχεια οι προσμείξεις της αντίδρασης απομάκρυνθηκαν και τα προϊόντα συμπυκνώθηκαν, μέσω διαφορετικών σε κάθε περίπτωση τεχνικών (Κεφ. 4.5.2.5).

- Έτσι, τα δείγματα με μεταλλάξεις διαγραφής ή προσθήκης νουκλεοτιδίων, καθώς και πιο πολύπλοκες μεταλλάξεις (complex mutations), αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης (UltraClean Low Melt Agarose, 15005-100, Mo-Bio), ακολούθησε εκτομή των επιθυμητών ζωνώσεων (gel bands), ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και συμπύκνωση των προϊόντων με το ολοκληρωμένο σύστημα επεξεργασίας QiaQuick Gel Extraction kit (Qiagen) (Κεφ. 4.5.2.5.1).
- Αντίθετα, η απομάκρυνση των προσμείξεων και η συμπύκνωση των προϊόντων της ενισχυτικής διαδικασίας, για το χαρακτηρισμό σημειακών μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε είτε με πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, 25:24:1) και χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (Chloroform - Isoamyl alcohol, 24:1), ακολουθούμενο από διαδοχικά στάδια κατακρήμνισης και συμπύκνωσης με αιθανόλη (EtOH) (Κεφ. 4.5.2.5.2), είτε με μαγνητικά σφαιρίδια (Κεφ. 4.5.2.5.3).

Τα συμπυκνωμένα και χωρίς προσμείξεις προϊόντα της διαδικασίας ενίσχυσης, ποσοτικοποιήθηκαν μέσω φθοριοχρωμάτων (AccuBlue High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit, 31006-T, Biotium), σε συσκευή Qubit (Thermo-Fischer Scientific) (Κεφ. 4.5.2.6).

Η αλληλουχία των υπο διερεύνηση γενωμικών περιοχών, προσδιορίστηκε σε συσκευή που λειτουργεί αυτοματοποιημένα (capillary electrophoresis; ABI 3100 Genetic Analyzer), με το ολοκληρωμένο σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας μέσω τερματισμού της αντιγραφής BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Applied Biosystems). Η ανάλυση των χρωματογραφήματων έγινε μέσω των υπολογιστικών προγραμμάτων BioEdit v.7.2.6.1 (Tom Hall) και SnapGene Viewer 4.0.4 (GSL Biotech LLC).

4.5.2.1 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. Κάθε πρωτόκολλο αφορά σε οκτώ αντιδράσεις gradient PCR.

A1.	<i>ASXL1</i> εξόνιο 12	<i>CALR</i> εξόνιο 9	<i>CSF3R</i> εξόνιο 14	<i>DNMT3A</i> εξόνιο 23	<i>IDH1</i> εξόνιο 4	<i>IDH2</i> εξόνιο 4	<i>KIT</i> εξόνιο 17
Υπόστρωμα DNA (5ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	24uL (1.5 ng/uL)	24uL (1.5 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	3.2uL (1.0mM)	3.2uL (1.0mM)	2.4uL (0.75mM)	3.2uL (1.0mM)	4.8uL (1.5mM)	3.2uL (1.0mM)	1.6uL (0.5mM)
dNTPs (40mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	3.2uL (1.0uM) ASXL1. e12.SF	1.6uL (0.5uM) CALR. e9.SF	2.4uL (0.75uM) CSF3R. e14.SF	2.4uL (0.75uM) DNMT3A. e23.SF	3.2uL (1.0uM) IDH1. e4.SF	1.28uL (0.4uM) IDH2. e4.SF	0.8uL (0.25uM) KIT. e17.SF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.28uL (0.4uM) ASXL1. e12.SR	1.6uL (0.5uM) CALR. e9.SR	2.4uL (0.75uM) CSF3R. e14.SR	2.4uL (0.75uM) DNMT3A. e23.SR	3.2uL (1.0uM) IDH1. e4.SR	1.28uL (0.4uM) IDH2. e4.SR	0.8uL (0.25uM) KIT. e17.SR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)
5x Q-Solution	-	-	-	16.0uL (1x)	16.0uL (1x)	-	-
ddH ₂ O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

A2.	<i>SETBP1</i> εξόνιο 4	<i>SF3B1</i> εξόνιο 14	<i>SF3B1</i> εξόνιο 15	<i>SRSF2</i> εξόνιο 1	<i>U2AF1</i> εξόνιο 2	<i>U2AF1</i> εξόνιο 6
Υπόστρωμα DNA (5ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)	16uL (1.0 ng/uL)
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)	8.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	2.4uL (0.75mM)	3.2uL (1.0mM)	3.2uL (1.0mM)	4.0uL (1.25mM)	3.2uL (1.0mM)	3.2uL (1.0mM)
dNTPs (40mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	1.6uL (0.5uM) SETBP1. e4.SF	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e14.SF	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.SF	2.4uL (0.75uM) SRSF2. e1.SF	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.SF	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e6.SF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.6uL (0.5uM) SETBP1. e4.SR	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e14.SR	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.SR	2.4uL (0.75uM) SRSF2. e1.SR	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.SR	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e6.SR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)
5x Q-Solution	-	-	-	-	-	-
ddH ₂ O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

Πίνακας 28. Αντιδραστήρια για 8 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των Sanger-Seq 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 * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** HotStarTaq DNA Polymerase. Προέλευση: Qiagen. **** 5x Q-Solution: Διάλυμα με δράση ενίσχυσης της απόδοσης της αντίδρασης πολυμεράσης, ιδιαίτερα σε απαιτητά υποστρώματα, όπως γενωμικές περιοχές με υψηλό ποσοστό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ή/και υψηλό ποσοστό νουκλεοτιδίων κυτοσίνης/γουανίνης (C/G)

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν, το διάλυμα διαμοιράζεται ισόποσα, σε οκτώ ανεξάρτητα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα εκ των οποίων τοποθετείται σε διαφορετική σειρά (row) της συσκευής PCR για να πραγματοποιηθούν 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. Σε κάθε περίπτωση, οι συνθήκες της αντίδρασης, που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων, περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 40 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 20"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 52-67°C - 40"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30"
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 29. Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR για τους Sanger-Seq ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα.

4.5.2.2 Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη
Τα προϊόντα της gradient PCR αναδεικνύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.4.4.2.

4.5.2.3 PCR για ενίσχυση της υπό διερεύνηση περιοχής πριν από τον προσδιορισμό αλληλουχίας

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα προσθέτοντας διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στο πρωτόκολλο που ακολουθεί. Το πρωτόκολλο αυτό αφορά σε μία αντίδραση. Με κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται η ποσότητα των αναλωσίμων που απαιτείται για περισσότερες αντιδράσεις.

A1.	ASXL1 εξόνιο 12	CALR εξόνιο 9	CSF3R εξόνιο 14	DNMT3A εξόνιο 23	IDH1 εξόνιο 4	IDH2 εξόνιο 4	KIT εξόνιο 17
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	1.5uL (0.75mM)	2.0uL (1.0mM)	3.0uL (1.5mM)	2.0uL (1.0mM)	1.0uL (0.5mM)
dNTPs (40mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	2.0uL (1.0uM) ASXL1. e12.SF	1.0uL (0.5uM) CALR. e9.SF	1.5uL (0.75uM) CSF3R. e14.SF	1.5uL (0.75uM) DNMT3A. e23.SF	2.0uL (1.0uM) IDH1. e4.SF	0.8uL (0.4uM) IDH2. e4.SF	0.5uL (0.25uM) KIT. e17.SF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.8uL (0.4uM) ASXL1. e12.SR	1.0uL (0.5uM) CALR. e9.SR	1.5uL (0.75uM) CSF3R. e14.SR	1.5uL (0.75uM) DNMT3A. e23.SR	2.0uL (1.0uM) IDH1. e4.SR	0.8uL (0.4uM) IDH2. e4.SR	0.5uL (0.25uM) KIT. e17.SR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)
5x Q-Solution	-	-	-	10.0uL (1x)	10.0uL (1x)	-	-
ddH ₂ O	28.7uL	27uL	26.5uL	13.5uL	11.5uL	24.9uL	31.5uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	40uL	37.5uL	37.5uL	35uL	35uL	35uL	40uL

A2.	SETBP1 εξόνιο 4	SF3B1 εξόνιο 14	SF3B1 εξόνιο 15	SRSF2 εξόνιο 1	U2AF1 εξόνιο 2	U2AF1 εξόνιο 6
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	1.5uL (0.75mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)	2.5uL (1.25mM)	2.0uL (1.0mM)	2.0uL (1.0mM)
dNTPs (40mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)	1.25uL (1.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	1.0uL (0.5uM) SETBP1. e4.SF	1.0uL (0.5uM) SF3B1. e14.SF	1.0uL (0.5uM) SF3B1. e15.SF	1.5uL (0.75uM) SRSF2. e1.SF	1.0uL (0.5uM) U2AF1. e2.SF	1.0uL (0.5uM) U2AF1. e6.SF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.0uL (0.5uM) SETBP1. e4.SR	1.0uL (0.5uM) SF3B1. e14.SR	1.0uL (0.5uM) SF3B1. e15.SR	1.5uL (0.75uM) SRSF2. e1.SR	1.0uL (0.5uM) U2AF1. e2.SR	1.0uL (0.5uM) U2AF1. e6.SR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)	0.25uL (1.25U)
5x Q-Solution	-	-	-	-	-	-
ddH ₂ O	30uL	29.5uL	29.5uL	25.5uL	29.5uL	29.5uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	40uL	40uL	40uL	37.5uL	40uL	40uL

Πίνακας 30. Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση Real-Time PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των Sanger-Seq ειδικών εκκινητών, σε καθεμιά από τις υπο διερεύνηση γενωμικές περιοχές. MgCl₂: Δισθενή Κατιόντα Μαγνησίου ddH₂O: Νερό * Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα * Σύνθεση

ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15mM $MgCl_2$, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα ισοκατανέμεται σε ξεχωριστά σωληνάρια τύπου Eppendorf για κάθε δείγμα, σε ποσότητα ίση με εκείνη που αναφέρεται στον πίνακα ως συνολικός όγκος αντίδρασης. Κατόπιν, σε κάθε προσημειωμένο σωληνάριο, διαμοιράζεται ποσότητα διαλύματος DNA με συγκέντρωση 5ng/uL, μέχρι τελικού όγκου 50uL. Ακολουθεί vortex, σύντομη φυγοκέντρηση και τοποθέτηση σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler.

Συνθήκες αντίδρασης PCR

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση:
Διεξάγεται σε 45 κύκλους (*CALR* εξόνιο 9 και *DNMT3A* εξόνιο 23),
ή σε 37 κύκλους (*ASXL1* εξόνιο 12, *CSF3R* εξόνιο 14, *IDH1* εξόνιο 4, *IDH2* εξόνιο 4, *KIT* εξόνιο 17, *SETBP1* εξόνιο 4, *SF3B1* εξόνιο 14, *SF3B1* εξόνιο 15, *SRSF2* εξόνιο 1, *U2AF1* εξόνιο 2, *U2AF1* εξόνιο 6).
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 20''
 - Πρόσδεση εκκινητών: x°C - 40''
x°C = 60°C (*IDH1* εξόνιο 4)
x°C = 64°C (*ASXL1* εξόνιο 12, *CALR* εξόνιο 9, *CSF3R* εξόνιο 14, *DNMT3A* εξόνιο 23, *KIT* εξόνιο 17, *SF3B1* εξόνιο 14, *SF3B1* εξόνιο 15, *U2AF1* εξόνιο 2, *U2AF1* εξόνιο 6)
x°C = 67°C (*IDH2* εξόνιο 4, *SETBP1* εξόνιο 4, *SRSF2* εξόνιο 1,)
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30''
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 31. Συνθήκες αντιδράσεων PCR ενίσχυσης καθεμιάς από τις υπό διερεύνηση γενωμικές περιοχές, πριν από Sanger sequencing.

4.5.2.4 Ανάδειξη των προϊόντων της PCR πριν από Sanger sequencing με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Τα προϊόντα της PCR πριν από Sanger sequencing αναδεικνύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% πυκνή, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.4.4.2.

4.5.2.5 Απομάκρυνση προσμείξεων και συμπύκνωση των προϊόντων της PCR

4.5.2.5.1 Απομάκρυνση προσμείξεων μέσω Qiaquick Gel extraction kit

Παρασκευή πηκτικής αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης (Low melting point) 3.0% πυκνή

- Ζυγίζονται 3.0g αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης (UltraClean Low Melt Agarose, Mo-Bio)

- Διαλύονται σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (90mM Tris / 100mM Boric Acid, 2mM EDTA, pH8.0)
- Η φιάλη θερμαίνεται με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη
- Προστίθενται 3uL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 0.5μg/mL)
- Το διάλυμα ρίχνεται σε κατάλληλα προετοιμασμένο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική "χτένα", για τη δημιουργία των θέσεων (slots), στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Τεχνική

Ολόκληρη η ποσότητα προϊόντων PCR αναλύεται μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 3.0% πυκνή, όπου εμπεριέχεται βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/mL). Ως μάρτυρας μεγέθους ηλεκτροφορούνται παράλληλα 500ng τεχνητών τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών (100bp DNA ladder, Invitrogen). Ακολουθεί έκθεση της πηκτής σε υπεριώδες φως, φωτογράφιση σε κατάλληλο σύστημα έκθεσης (Dolphin-Doc Plus, Wealtec Corp) και εκτομή των ζωνών ενίσχυσης ενδιαφέροντος, για καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων, με το εμπορικά διαθέσιμο Qiaquick Gel extraction kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Προϊόντα γονιδιακών περιοχών που αφορά η διαδικασία

Με την τεχνική αυτή προετοιμάστηκαν για περαιτέρω ανάλυση εκείνα τα προϊόντα PCR, των εξονίων 9 και 12, των γονιδίων *CALR* και *ASXL1*, αντίστοιχα, τα οποία έφεραν μεταλλάξεις διαγραφής ή προσθήκης νουκλεοτιδίων, καθώς και πιο πολύπλοκες μεταλλάξεις (complex mutations), όπως αυτό καθορίστηκε κατόπιν ανάδειξης, των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης (Κεφ. 4.5.2.4).

4.5.2.5.2 Απομάκρυνση προσμείξεων με πρωτόκολλο φαινόλης - χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης

Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα φαινόλης - χλωροφορμίου - Ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)
2. Διάλυμα χλωροφορμίου - Ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)
3. Απόλυτη αιθανόλη
4. Αιθανόλη 75%
5. Διάλυμα οξικού νατρίου 3M (CH₃COONa 3M, pH 5.2)
6. ddH₂O

Τεχνική

1. Μετά την αντίδραση PCR (Κεφ. 4.5.6.3) ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 10uL προϊόντων (Κεφ. 4.4.4.2). Στα 40uL εναπομείνουσας ποσότητας προϊόντων PCR, προστίθενται 160uL ddH₂O, οπότε προκύπτει διάλυμα 200uL που διευκολύνει τους χειρισμούς κατά τη διαδικασία του καθαρισμού
2. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου (1:1) διαλύματος φαινόλης - χλωροφορμίου - Ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1)
3. Γαλακτωματοποίηση

4. Φυγοκέντρηση για 10min (13000rpm, 4°C)
5. Συλλογή υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf
6. Προσθήκη ίσου όγκου (1:1) φρέσκου διαλύματος χλωροφόρμιου - Ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1)
7. Γαλακτωματοποίηση
8. Φυγοκέντρηση για 10min (13000rpm, 4°C)
9. Συλλογή υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf
10. Προσθήκη δυόμιση φορές τον όγκο σε απόλυτη EtOH (1:2.5)
11. Προσθήκη υποδεκαπλάσιου όγκου (1:10) CH₃COONa 3M, pH5.2 (τελική συγκέντρωση 0.3M)
12. Καταβύθιση στους -80°C για 30min
13. Φυγοκέντρηση για 30min (13000rpm, 4°C)
14. Προσεκτική συλλογή και απόρριψη του υπερκείμενου - Διατήρηση του ιζήματος
15. Προσθήκη 1mL EtOH 75%
16. Σύντομη ανάδευση
17. Φυγοκέντρηση για 15min (13000rpm, 4°C)
18. Προσεκτική συλλογή και απόρριψη του υπερκείμενου - Διατήρηση του ιζήματος
19. Αποξήρανση του DNA υπό κενό
20. Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 25-50uL ddH₂O
21. Ποσοτικοποίηση του καθαρισμένου προϊόντος

Προϊόντα γονιδιακών περιοχών που αφορά η διαδικασία

Με την τεχνική αυτή προετοιμάστηκαν για περαιτέρω ανάλυση τα προϊόντα PCR, του εξονίου 12 του γονιδίου *ASXL1* (εξόνιο 12), με σημειακές μεταλλάξεις, όπως αυτό καθορίστηκε κατόπιν ανάδειξης των προϊόντων σε πηκτική αгарόζης (Κεφ. 4.5.2.4).

4.5.2.5.3 Απομάκρυνση προσμείξεων με μαγνητικά σφαιρίδια και διπλή επιλογή μεγέθους

Αντιδραστήρια

1. Μαγνητικά σφαιρίδια (NucleoMag NGS Clean-up and Size Select, Macherey Nagel)
2. Απόλυτη αιθανόλη
3. Αιθανόλη 85%
4. ddH₂O

Τεχνική

1. Μετά την αντίδραση PCR (Κεφ. 4.5.8.3) ακολούθησε ηλεκτροφόρηση ποσότητας προϊόντων ίσης με 10uL (Κεφ. 4.5.8.4). Στα 40uL εναπομείνουσας ποσότητας προϊόντων PCR, προστίθενται 21.6uL (0.54x) διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων.
2. Σύντομη ανάδευση vortex
3. Επώαση 5' σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χώρου (room temperature, RT)
4. Τοποθέτηση του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε μαγνητική βάση (magnetic rack)
5. Επώαση 5' RT
6. Μεταφορά 60uL διαλύματος σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf. Απόρριψη των μαγνητικών σφαιριδίων. Μετά την πρώτη διαλογή, τυχόν ανεπιθύμητα προϊόντα PCR

μεγάλου μεγέθους (>900bp), απορρίπτονται αφού παραμένουν προσδεμένα επί των μαγνητικών σφαιριδίων.

7. Σε 60uL διαλύματος προϊόντων PCR, μοριακού μεγέθους μικρότερου από 900 βάσεις και ρυθμιστικού διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων, προστίθενται 9.2uL (0.77x) διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων.
8. Επώαση 5' RT
9. Τοποθέτηση του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε μαγνητική βάση (magnetic rack)
10. Επώαση 5' RT
11. Απόρριψη διαλύματος - Διατήρηση των μαγνητικών σφαιριδίων σε συνάφεια με το μαγνήτη. Με τη δεύτερη διαλογή τυχόν ανεπιθύμητα προϊόντα PCR μικρού μεγέθους (<260bp), απορρίπτονται αφού παραμένουν στο διάλυμα. Στο διάλυμα πλέον, έχουν απομείνει προϊόντα PCR μεταξύ 260-900bp.
12. Προσθήκη 180uL φρέσκιας αιθανόλης 85%
13. Επώαση 30"
14. Απόρριψη αιθανόλης.
15. Επανάληψη σταδίων 12-14
16. Αποξήρανση των μαγνητικών σφαιριδίων με παραμονή αυτών σε συνάφεια με το μαγνήτη για 8'
17. Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 19uL ddH₂O
18. Επώαση 5' RT
19. Τοποθέτηση του σωληναρίου τύπου Eppendorf σε μαγνητική βάση (magnetic rack)
20. Επώαση 5' RT
21. Μεταφορά 17uL διαλύματος σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf
22. Ποσοτικοποίηση του καθαρισμένου προϊόντος

Προϊόντα γονιδιακών περιοχών που αφορά η διαδικασία

Με την τεχνική αυτή προετοιμάστηκαν για περαιτέρω ανάλυση τα προϊόντα PCR, των γονιδίων *IDH1* (εξόνιο 4), *IDH2* (εξόνιο 4), *DNMT3A* (εξόνιο 23), *SF3B1* (εξόνιο 14 και 15), *U2AF1* (εξόνια 2 και 6), *SETBP1* (εξόνιο 4), *SRSF2* (εξόνιο 1) και *CSF3R* (εξόνιο 14) με σημειακές μεταλλάξεις, όπως αυτό καθορίστηκε κατόπιν ανάδειξης των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης (Κεφ. 4.5.2.4).

4.5.2.6 Προσδιορισμός της αυγκέντρωσης των συμπυκνωμένων και χωρίς προσμείξεις προϊόντων της PCR με χρήση φθοριοχρωμάτων

Η ανάλυση του DNA με χρήση φθοριοχρωμάτων, αποτελεί μία γρήγορη και αξιόπιστη τεχνική για τον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας των νουκλεϊκών οξέων.

Αντιδραστήρια

1. DNA: Καθαρισμένο προϊόν της αντίδρασης PCR
2. Ρυθμιστικό διάλυμα με χρωστική: AccuBlue dsDNA Quantitation Solution (Biotium, USA)
3. Ενισχυτής σήματος: 100x Enhancer (Biotium, USA)
4. Πρότυπο δείγμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης για καθορισμό της μέγιστης τιμής σήματος: Pre-diluted dsDNA standard (10ng/uL) (Biotium, USA)
5. ddH₂O

Τεχνική

1. Αρχικά προετοιμάζεται 1:10 αραιωμένο διάλυμα καθαρισμένου προϊόντος της αντίδρασης PCR, με προσθήκη ddH₂O.
2. Έπειτα, για κάθε δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί, αναμειγνύονται 198uL ρυθμιστικού διαλύματος με χρωστική, με 2uL ενισχυτή σήματος (100x Enhancer). Δύο επιπλέον αντιδράσεις, μία που αφορά στην ελάχιστη τιμή μέτρησης και μία στη μέγιστη, συνυπολογίζονται στο στάδιο αυτό. Οι μετρήσεις των δύο ακραίων τιμών σήματος είναι απαραίτητες για τη βαθμονόμηση (calibration) της συσκευής (Qubit 1.0, Thermo Fishcer Scientific).
3. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση του μείγματος.
4. Το μείγμα διαμοιράζεται σε προκαθορισμένα, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων διαφανή σωληνάρια τύπου Eppendorf, τα οποία είναι ειδικά κατασκευασμένα για μετρήσεις σε φθοριόμετρο. Η ποσότητα είναι συγκεκριμένη, και περιλαμβάνει 190uL μείγματος ανά σωληνάριο. Παράλληλα με τα σωληνάρια των δειγμάτων, προετοιμάζονται δύο επιπλέον σωληνάρια για τις δύο αντιδράσεις βαθμονόμησης της συσκευής.
5. Στο σωληνάριο που προορίζεται για βαθμονόμηση η οποία αφορά στην ελάχιστη τιμή σήματος προστίθενται 10uL ddH₂O.
6. Στο σωληνάριο που προορίζεται για βαθμονόμηση η οποία αφορά στη μέγιστη τιμή σήματος προστίθενται 10uL πρότυπου δείγματος DNA (10ng/uL).
7. Στα σωληνάρια που προορίζονται για μετρήσεις φθορισμού άγνωστων δειγμάτων προστίθενται 7uL ddH₂O και 3uL 1:10 αραιωμένου διαλύματος καθαρισμένου προϊόντος της αντίδρασης PCR.
8. Οι μετρήσεις (fluorescence quantity, Qf) αναφέρονται σε συγκεντρώσεις ng/mL και αφορούν αραιωμένες ποσότητες DNA, οπότε και ανάγονται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο.

$$c \text{ (PCR product) (ng/uL) } = ((Qf) \times (200/\gamma) \times (1/z))/1000$$

Όπου,

- Qf είναι η μέτρηση που έδωσε η συσκευή για ένα συγκεκριμένο δείγμα σε ng/mL
- γ είναι η ποσότητα 1:10 αραιωμένου διαλύματος καθαρισμένου προϊόντος της αντίδρασης PCR που προστέθηκε στην αντίδραση μέτρησης
- z είναι η αραιώση που πραγματοποιήθηκε στο καθαρισμένο προϊόν της αντίδρασης PCR

Οπότε η εξίσωση αυτομάτως μετατρέπεται στην ακόλουθη μορφή.

$$c \text{ (PCR product) (ng/uL) } = [(Qf) \times (200/3) \times (1/1/10)]/1000$$

4.5.2.7 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Sanger Sequencing)

Αντιδραστήρια

1. DNA: Καθαρισμένο προϊόν της αντίδρασης PCR
2. Εκκινητής: (Παράρτημα III)
3. Big Dye Terminator
4. 5x Sequencing Reaction buffer
5. ddH₂O

Τεχνική

Προκειμένου να γίνει προσδιορισμός αλληλουχίας, πραγματοποιείται αντίδραση ενίσχυσης του εκάστοτε τμήματος DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται ακολούθως.

Υπόστρωμα	DNA: 2uL καθαρισμένο προϊόν της αντίδρασης PCR (10-50ng)
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x *	1.75uL
Εκκινητής (3.2pmol/uL)	50pmol
Ένζυμο	Big Dye Terminator *: 0.5uL
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 10uL

Πίνακας 32. Αναλώσιμα για αντίδραση ενίσχυσης και προετοιμασίας των προϊόντων για προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger. * Προέλευση: Applied Biosystems (Thermo-Fisher Scientific)

Οι συνθήκες αντίδρασης που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης ενίσχυσης πριν από κατά Sanger προσδιορισμό νουκλεοτιδικής ακολουθίας

- Αρχική αποδιάταξη: 96°C - 1'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 25 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 96°C - 10"
 - Πρόσδεση εκκινητή: 50°C - 5"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 60°C - 4"

Πίνακας 33. Αντίδραση ενίσχυσης και προετοιμασίας των προϊόντων για προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger.

Ακολούθως, το προϊόν της PCR καθαρίζεται από προσμείξεις, με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Αντιδραστήρια

1. Διαλύμα NaOAc/EtOH (Για προετοιμασία 2mL διαλύματος αναμειγνύονται 75uL NaOAc 3M, pH 4.4 και 1562.5uL EtOH 100%)
2. Αιθανόλη 70%
3. Φορμαμίδιο

Τεχνική

1. Κατακρήμνιση του προϊόντος της αντίδρασης με την προσθήκη 40uL διαλύματος NaOAc/EtOH
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min
3. Φυγοκέντρηση για 30min (3600rpm)
4. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 70uL 70% EtOH
5. Φυγοκέντρηση για 3min (1400 rpm)
6. Αποξήρανση ιζήματος υπό κενό
7. Προσθήκη 10uL φορμαμίδιο

Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρονται σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων και τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή ABI3100 SDS (Applied Biosystems, USA), όπου ηλεκτροφορούνται σε τριχοειδή σωληνάρια. Τα αποτελέσματα αποθηκεύονται αυτόματα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με το σύστημα και κατόπιν αναλύονται με κατάλληλα προγράμματα επεξεργασίας αλληλουχιών, όπως τα BioEdit v.7.2.6.1 (Tom Hall) και SnapGene Viewer 4.0.4 (GSL Biotech LLC).

4.6 Στοχευμένος Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με Τεχνολογία Δεύτερης Γενιάς (targeted Next Generation Sequencing, targeted NGS)

Οι τεχνικές που περιγράφησαν προηγουμένως είναι ήδη εγκαθιδρυμένες, αφού χρησιμοποιούνται επί σειρά ετών για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων και άλλες μελέτες. Ωστόσο, μπορούν να διερευνήσουν μεμονωμένες γενωμικές περιοχές. Ως εκ τούτου, σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών με μυελικές νεοπλασίες, δεν είναι εφικτός ο επαρκής χαρακτηρισμός του γενετικού προφίλ, με αποτέλεσμα η ορθή ταξινόμηση, η πρόγνωση και η αντιμετώπιση της νόσου, να είναι ιδιαίτερα δυσχερής.

Οι τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας, με συσκευές νέας γενιάς, έχουν αναπτυχθεί σε βαθμό που μπορούν πλέον να καλύψουν ευρύτερες γενωμικές περιοχές, αναζητώντας πληθώρα διαφορετικών τύπων μεταλλάξεων, με στόχο να καλύψουν το κενό που υπάρχει, στην κατανόηση των αιματολογικών κακοηθειών, όπως και άλλων νοσημάτων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν γονίδια τα οποία, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, εμφανίζουν μεταλλάξεις σε υψηλό ποσοστό ασθενών με μυελικές νεοπλασίες. Τα εξόνια των γονιδίων που διερευνήθηκαν με τεχνολογία NGS, καταγράφονται στον Πίνακα που ακολουθεί. Πολλά από αυτά έχουν περιγραφεί ήδη, ενώ ορισμένα, αναλύθηκαν ταυτόχρονα, με τεχνικές που εφαρμόζονταν ήδη ή που αναπτύχθηκαν παράλληλα, στο εργαστήριο Αιματολογίας του ΙΙΒΕΑΑ, οι οποίες, μάλιστα, αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

<i>ASXL1</i> (exon 12)	<i>BCOR</i> (exons 2-15)	<i>BCORL1</i> (exon 3 + 4)	<i>CALR</i> (exon 9)	<i>CBL</i> (exons 1-16)	<i>CSF3R</i> (exons 14-17)
<i>CUX1</i> (exons 1-23)	<i>DNMT3A</i> (exons 3-23)	<i>EZH2</i> (exons 2-20)	<i>GATA1</i> (exons 2+3)	<i>GATA2</i> (exons 3-6)	<i>IDH1</i> (exon 4)
<i>IDH2</i> (exon 4)	<i>JAK2</i> (exons 12-14)	<i>KRAS</i> (exons 2+3)	<i>MPL</i> (exon 10)	<i>NRAS</i> (exons 2+3)	<i>RUNX1</i> (exons 2-9)
<i>SF3B1</i> (exons 13-18)	<i>SH2B3</i> (exons 2-8)	<i>SRSF2</i> (exons 1+2)	<i>STAG2</i> (exons 3-35)	<i>TET2</i> (exons 3-11)	<i>TP53</i> (exons 2-11)
<i>U2AF1</i> (exons 2+6)	<i>ZRSR2</i> (exons 1-11)				

Πίνακας 34. Εξόνια γονιδίων που διερευνήθηκαν με τεχνολογία NGS.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια. Σε κάθε πειραματική πορεία προετοιμάζονται δείγματα, σε πλήθος πολλαπλάσιο του 8, αφού έτσι επιβεβαιώνεται η ελάχιστη δυνατή απώλεια αναλωσίμων, κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Ovation Custom Target Enrichment System, NuGen).

4.6.1 Παρασκευή διαλύματος 0.5M EDTA

Το διάλυμα προετοιμάζεται κατάλληλα όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

- Υπολογισμοί:
Ισχύει ότι $0.5M = 0.5\text{mol}$ ουσίας σε 1000mL διαλύματος EDTA
Άρα σε 10mL διαλύματος EDTA, θα υπάρχουν $0.5\text{mol}/100 = 0.005\text{mol}$ (ή 5mmol) ουσίας
Το μοριακό βάρος του EDTA είναι $372,24\text{g/mol}$.
Άρα, 1mol EDTA περιλαμβάνεται σε $372,24\text{g}$ αυτού.
Έτσι 0.005mol EDTA θα περιλαμβάνονται σε $0.005\text{mol} \cdot 372,24\text{g}/1\text{mol} = 1.8612\text{g}$
- Προετοιμασία διαλύματος σε γυάλινο δοχείο Duran 50mL:

Συστατικό	Ποσότητα/Όγκος
EDTA	1.8612g
ddH ₂ O	10mL
Συνολικός όγκος	10mL

4.6.2 Ενζυμικός κατακερματισμός DNA

Ο ενζυμικός κατακερματισμός του DNA αποσκοπεί στο δημιουργία νουκλεοτιδικών ακολουθιών που κυμαίνονται μεταξύ 300 και 1,000bp, με μέσο μέγεθος 500bp.

- Προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων σε σωληνάριο PCR 0.2mL, για κάθε δείγμα ξεχωριστά, ανάδευση σε συσκευή vortex και τοποθέτηση σε πάγο:

Αντιδραστήριο PCR	Όγκος
Υπόστρωμα DNA (μέχρι 3 μg)	1.0–16.0 μL
Ρυθμιστικό διάλυμα (Fragmentase Rxn Buffer v2, NEB)	2.0 μL
WFI	μέχρι συμπλήρωσης 18 μL
Συνολικός όγκος	18.0μL

- Ανάδευση πεπτικών ενζύμων, NEBNext dsDNA Fragmentase (NEB), σε συσκευή vortex και γρήγορη κατακρήμνιση (Quick spin), πριν από άμεση προσθήκη 2 μL στο διάλυμα buffer-DNA, που παρασκευάστηκε μόλις. Συνολικός όγκος αντίδρασης ίσος με 20 μL .
- Ανάδευση του κάθε μείγματος, σε συσκευή vortex, γρήγορη κατακρήμνιση και τοποθέτηση σε πάγο, μέχρι να προστεθούν πεπτικά ένζυμα και στα υπόλοιπα δείγματα.
- Ταυτόχρονη επώαση όλων των δειγμάτων, σε συσκευή PCR, σε θερμοκρασία 37°C, για χρονικό διάστημα 23'.
- Άμεση απομάκρυνση των σωληναρίων από τη συσκευή PCR και τοποθέτηση σε πάγο.
- Προσθήκη 5 μL EDTA 0.5M και ανάδευση με πιπέτα, ώστε να τερματίσει η αντίδραση πέψης. Συνολικός όγκος αντίδρασης ίσος με 25 μL .
- Άμεσος καθαρισμός των προϊόντων (βήμα 3).

4.6.3 Απομάκρυνση προσμείξεων της αντίδρασης πέψης και διπλή επιλογή μεγέθους τμημάτων DNA

Έπειτα από την αντίδραση πέψης, ακολουθεί απομάκρυνση των προσμείξεων, με ταυτόχρονη διπλή επιλογή (0.53x-0.77x) των τμημάτων DNA κατάλληλου μήκους (300-1,000bp), μέσω μαγνητικών σφαιριδίων.

- Επώαση διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χώρου (ΘΠ), για 20' πριν από τη χρήση αυτών.
- Προσθήκη 75uL WFI, στα 25uL αντίδρασης. Συνολικός όγκος αντίδρασης ίσος με 100uL.
- Προσθήκη 53uL διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων. Συνολικός όγκος αντίδρασης ίσος με 153uL.
- Ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση μείγματος για 5' σε ΘΠ.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων PCR 0.2mL σε κατάλληλες υποδοχές μίας αυτοσχέδιας βάσης, όπου ειδικοί μαγνήτες (rare-earth magnets) ασκούν ελκτική δύναμη, επί των μαγνητικών σφαιριδίων, επάνω στα οποία προσδένονται τμήματα DNA μεγαλύτερα από 1,000bp.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 5' σε ΘΠ.
- Ποσότητα ίση με 143uL διαλύματος, που περιέχει τμήματα DNA, μικρότερα από 1,000bp, μεταφέρονται σε νέο προσημασμένο σωληνάριο PCR 0.2mL. Τα σωληνάρια με τα μαγνητικά σφαιρίδια, από το προηγούμενο στάδιο της διαδικασίας, απορρίπτονται.
- Προσθήκη 24uL διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων. Συνολικός όγκος αντίδρασης ίσος με 167uL.
- Ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση μείγματος για 5' σε ΘΠ.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων PCR 0.2mL επί της μαγνητικής βάσης. Τα μαγνητικά σφαιρίδια, αυτή τη φορά, προσδένουν τα τμήματα DNA με μέγεθος μεγαλύτερο από 300bp.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 5' σε ΘΠ.
- Ποσότητα ίση με 157uL διαλύματος, που περιέχει τμήματα DNA, μικρότερα από 300bp, απορρίπτονται. Πλέον στα μαγνητικά σφαιρίδια εντοπίζονται προσδεδεμένα, τμήματα DNA μεταξύ 300 και 1,000 νουκλεοτιδίων (μέσο μέγεθος 500bp).
- Ακολουθεί προσθήκη 180uL αιθανόλης (EtOH) 85%.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 30" σε ΘΠ.
- Απομάκρυνση 180uL αιθανόλης (EtOH) 85%.
- Ακολουθεί δεύτερη προσθήκη 180uL αιθανόλης (EtOH) 85%.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 30" σε ΘΠ.
- Απομάκρυνση 180uL αιθανόλης (EtOH) 85%.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 7' σε ΘΠ και απομάκρυνση περίσσιας αιθανόλης από τη βάση του σωληναρίου.
- Απομάκρυνση του σωληναρίου από τη μαγνητική βάση και ενυδάτωση των σφαιριδίων με το DNA, μέσω προσθήκης 22uL WFI.
- Ανάδευση με πιπέτα.
- Επώαση μείγματος για 3' σε ΘΠ.
- Τοποθέτηση του σωληναρίου στη μαγνητική βάση.
- Επώαση μείγματος επί της μαγνητικής βάσης, για 3' σε ΘΠ.
- Μεταφορά 20uL διαλύματος DNA σε νέο προσημασμένο σωληνάριο PCR των 0.2mL.

- Αποθήκευση σε θερμοκρασία +4°C για μετέπειτα επεξεργασία, ή άμεση έναρξη της διαδικασίας προετοιμασίας της βιβλιοθήκης δειγμάτων DNA, κατόπιν ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης των δειγμάτων.

4.6.4 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κατακερματισμένων τμημάτων DNA, πραγματοποιήθηκε μέσω κατάλληλων φθοριοχρωμάτων, σε συσκευή Qubit, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.5.2.6.

4.6.5 Ποιοτική ανάλυση

Η ανάλυση της ποιότητας και του μεγέθους των κατακερματισμένων τμημάτων DNA, πραγματοποιήθηκε μέσω μικροηλεκτροφόρησης σε συσκευή Bioanalyzer, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο ολοκληρωμένο σύστημα High Sensitivity DNA kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Agilent).

4.6.6 Προετοιμασία βιβλιοθήκης δειγμάτων

Η προετοιμασία κάθε βιβλιοθήκης DNA, για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας των υπό διερεύνηση γενωμικών περιοχών, με αναλυτική συσκευή δεύτερης γενιάς, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο ολοκληρωμένο σύστημα Ovation Custom Target Enrichment System, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (NuGEN).

Τα δείγματα που αναλύονται ταυτόχρονα στη συσκευή, φέρουν διαφορετικές διακριτές τεχνητές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, για να ξεχωρίζουν κατά την ανάλυση. Αυτές οι αλληλουχίες προσαρτώνται στα άκρα των υπό μελέτη κατακερματισμένων νουκλεϊκών οξέων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο παρασκευής των βιβλιοθηκών.

4.6.7 Προσδιορισμός αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των κατακερματισμένων δειγμάτων DNA, που απαρτίζουν τη βιβλιοθήκη, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή MiSeq (Illumina), ακολουθώντας το πρωτόκολλο, όπως αυτό περιγράφεται στο ολοκληρωμένο σύστημα MiSeq Reagent Kit v2 (2x500 cycles), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Illumina).

4.6.8 Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS Targeted-Seq δεδομένων

Τα στάδια της βιοπληροφορικής ανάλυσης, καθώς και οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο και περιγράφονται στο Παράρτημα VII.

4.7 Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 με MS-HRMA και MSP

4.7.1 Επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου

Η επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης (C), σε νουκλεοτιδία ουρακίλης (U), τα οποία καταλήγουν σε θυμίνη (T), έπειτα από ενίσχυση μέσω αντίδρασης πολυμεράσης. Ωστόσο, τα τροποποιημένα

μόρια μεθυλοκυτοσίνης (5'-mC) και υδροξυμεθυλοκυτοσίνης (5'-hmC), που προηγούνται μίας γουανίνης δεν επηρεάζονται από τη χημική κατεργασία. Ως αποτέλεσμα, οι γενωμικές περιοχές με μεθυλιωμένα μόρια κυτοσίνης, διαφέρουν σε αλληλουχία, συγκριτικά με όμοιες τους περιοχές χωρίς επιγενετική τροποποίηση.

Αυτή η διαφορά στη νουκλεοτιδική ακολουθία γίνεται ανιχνεύσιμη τόσο μέσω μεθυλοειδικής HRMA (MS-HRMA), όσο και μέσω μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP), τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες μεθυλίωσης του γονιδιώματος (Tsiatis et al. 2010).

Στην παρούσα εργασία, προσδιορίστηκε το πρότυπο μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, σε άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, καθώς και σε ασθενείς με MI και με ΜΔΣ/MYN, τόσο μέσω MS-HRMA, σε συσκευή LightCycler480 (Roche), όσο και μέσω MSP, σε συσκευή PyroMark Q96 (Qiagen). Η κατάσταση μεθυλίωσης των διάσπαρτων στοιχείων LINE-1, παρέχει μία κατά προσέγγιση εκτίμηση των επιπέδων μεθυλίωσης στο σύνολο του γονιδιώματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναλύθηκαν συγκριτικά για τις τρεις κοορτές, για κάθε τεχνική ξεχωριστά.

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA, επεξεργασμένα με διουλφίδιο του νατρίου, με το εμπορικά διαθέσιμο EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.7.2 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για τις δύο διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες, έγινε μέσω κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων (Oligo 7; Qiagen PyroMark Assay Design 2.0, Applied Biosystems Tm Calculator). Η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, Ta), για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής ειδικότητας, ανιχνεύτηκε πειραματικά μέσω PCR διαβαθμιζόμενων θερμοκρασιών (gradient PCR), σε συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Για έξι αντιδράσεις gradient PCR χρησιμοποιήσαμε τις ακόλουθες αναλογίες.

Αντιδραστήρια gradient PCR για τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές	
Υπόστρωμα DNA (6ng/uL)	60.0uL (3ng/uL)
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	12.0uL (1x)
MgCl₂ (50mM) **	6.0uL (2.5mM)
dNTPs (40mM)	3.0uL (1.0mM)
Εκκινητής h.LINE-1.1 (25.0uM)	1.92uL (0.4nM) pF
Εκκινητής h.LINE-1.2 (25.0uM)	1.92uL (0.4nM) pR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.6uL (3.0U)
ddH₂O	Έως 120uL

Πίνακας 35. Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στα στοιχεία LINE-1. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. ** Platinum Taq DNA Polymerase. Προέλευση: Thermo-Fischer.

Αντιδραστήρια gradient PCR για τους MSP LINE-1 εκκινητές	
Υπόστρωμα DNA	18.0uL
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	18.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	4.5uL (0.625mM)
dNTPs (5mM)	7.2uL (200nM)
Εκκινητής p.LINE-1.1 (11.25uM)	2.4uL (150nM) pF
Εκκινητής p.LINE-1.2 (11.25uM)	4.8uL (300nM) pR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.9uL (1.25U)
ddH ₂ O	Έως 180uL

Πίνακας 36. Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στα στοιχεία LINE-1. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** HotStarTaq DNA Polymerase. Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν, το διάλυμα που παρασκευάστηκε, διαμοιράζεται ισόποσα, σε έξι ανεξάρτητα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα εκ των οποίων τοποθετείται σε διαφορετική σειρά (row) της συσκευής PCR, προκειμένου να πραγματοποιηθούν έξι 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. Οι συνθήκες της αντίδρασης, που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων, περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR για τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές

- Αρχική αποδιάταξη: 94°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 45 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 94°C - 15"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 50-67°C - 30"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15"
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 37. Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης επί των LINE-1.

Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR για τους MSP LINE-1 εκκινητές

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 40 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 20"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 50-60°C - 40"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30"
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 38. Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MSP ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης επί των LINE-1.

4.7.3 Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
Τα προϊόντα gradient PCR αναδεικνύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Κεφ. 4.4.4.2).

4.7.4 PCR για ενίσχυση των υπό διερεύνηση περιοχών

Ακολούθησε ενίσχυση μέσω PCR, πριν από διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης των γενωμικών περιοχών, τόσο μέσω HRMA, όσο και μέσω MSP. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf προστίθενται διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στο πρωτόκολλο που ακολουθεί και το οποίο αφορά σε μία αντίδραση. Με κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται η ποσότητα των αναλωσίμων που απαιτείται για περισσότερες αντιδράσεις.

Αντιδραστήρια για PCR ενίσχυση με τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές	
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	2.0uL (1x)
MgCl ₂ (50mM) **	1.0uL (2.5mM)
dNTPs (40mM)	0.5uL (1.0mM)
Εκκινητής h.LINE-1.1 (25.0uM)	0.32uL (0.4nM) pF
Εκκινητής h.LINE-1.2 (25.0uM)	0.32uL (0.4nM) pR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.1uL (0.5U)
ddH ₂ O	Έως 10uL

Πίνακας 39. Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1. * Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. ** Platinum Taq DNA Polymerase. Προέλευση: Thermo-Fischer.

Αντιδραστήρια για PCR ενίσχυση με τους MSP LINE-1 εκκινητές	
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *	3.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM) **	0.75uL (0.625mM)
dNTPs (5mM)	1.2uL (200nM)
Εκκινητής p.LINE-1.1 (11.25uM)	0.4uL (150nM) pF
Εκκινητής p.LINE-1.2 (11.25uM)	0.8uL (300nM) pR
Ένζυμο (5U/uL) ***	0.15uL (1.25U)
ddH ₂ O	Έως 27uL

Πίνακας 40. Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1. * Σύνθεση ρυθμιστικού

διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15mM $MgCl_2$, pH 8.7. ** Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. *** HotStarTaq DNA Polymerase. Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα ισοκατανέμεται σε ξεχωριστά σωληνάρια τύπου Eppendorf για κάθε δείγμα, σε ποσότητα ίση με εκείνη που αναφέρεται στον πίνακα ως συνολικός όγκος αντίδρασης.

- Κατόπιν, για την MS-HRM σε κάθε προσημειωμένο σωληνάριο, διαμοιράζονται συνολικά 10uL διαλύματος DNA προ-επεξεργασμένου με δισουλφίδιο του νατρίου και αραιωμένου σε συγκέντρωση (6ng/uL), τόσο από τα προς ανάλυση δείγματα, όσο και από τα δείγματα αναφοράς, μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 20uL. Τα δείγματα αναφοράς διαμοιράζονται σε ποσότητες όπως αυτές περιγράφονται στον πιο κάτω πίνακα, ώστε να σχηματιστεί μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που αφορά σε διαβαθμιζόμενα ποσοστά μεθυλίωσης. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση κάθε σωληνάριου, τα οποία έπειτα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Roche LightCycler480.

Ποσοστό μεθυλίωσης που αντιστοιχεί σε κάθε σημείο της πρότυπης καμπύλης	Απαιτούμενη ποσότητα από πλήρως μεθυλωμένο (100%) δείγμα αναφοράς (uL)	Απαιτούμενη ποσότητα από πλήρως μη-μεθυλωμένο (0%) δείγμα αναφοράς (uL)
100 %	10.0	0.0
90 %	9.0	1.0
70 %	7.0	3.0
50 %	5.0	5.0
30 %	3.0	7.0
10 %	1.0	9.0
0 %	0.0	10.0

- Αντίστοιχα για την MSP σε κάθε προσημειωμένο σωληνάριο, διαμοιράζονται 3uL διαλύματος DNA προηγουμένως επεξεργασμένου με δισουλφίδιο του νατρίου, μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 30uL. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση κάθε σωληνάριου, τα οποία έπειτα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των στοιχείων LINE-1 περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης με τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές

- Αρχική αποδιάταξη: 94°C - 8'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 45 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 94°C - 15"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 60°C - 30"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15"
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 41. Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1.

Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης με τους MSP LINE-1 εκκινητές

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 40 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 20"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 53°C - 40"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30"
- Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'

Πίνακας 42. Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1.

4.7.4.1 MS-HRMA

Η διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης μέσω MS-HRMA, των υπο μελέτη δειγμάτων, τα οποία επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου και ενισχύθηκαν μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Roche LightCycler480. Συγκεκριμένα, στο ενισχυμένο προϊόν προστέθηκαν 5uL φθορίζουσας χρωστικής EvaGreen συγκέντρωσης 5x (Biotium), σε τελική συγκέντρωση 1x, η οποία προσδένεται μη-ειδικά σε δίκλινα υποστρώματα και είναι κατάλληλη για τέτοιου είδους αναλύσεις.

Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης των στοιχείων LINE-1

- 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 43. Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων PCR ενίσχυσης, για τους MS-HRMA ειδικούς εκκινητές, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1.

4.7.4.2 MSP

Η διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης μέσω MSP, των υπο μελέτη δειγμάτων, που υπέστησαν επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου και ενισχύθηκαν μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PyroMark Q96, με τυπικές συνθήκες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Της MSP προηγήθηκε ανάδειξη μικρής ποσότητας του ενισχυμένου προϊόντος, προκειμένου να διαπιστωθεί η επάρκεια αυτού για περαιτέρω ανάλυση.

4.8 Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με MI και ατόμων του γενικού πληθυσμού με τεχνολογία NGS (RNA-Seq)

Η μελέτη ολόκληρου ή μέρους του μεταγραφώματος αποτελεί μία σύγχρονη τεχνική, η οποία επιτρέπει τη συγκριτική ανάλυση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης μεταξύ δύο καταστάσεων. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να προκύψουν αξιοποιήσιμα δεδομένα σχετικά με τη βιολογία και τη φυσιολογία των καταστάσεων που διερευνώνται, μέσω κατανόησης των κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζονται, από τις διαφορές στο πρότυπο έκφρασης (Lowe et al. 2017).

Η τεχνολογία περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση του RNA από το κλινικό υλικό που μελετάται. Έπειτα, τα δείγματα επεξεργάζονται κατάλληλα μέσω αντίδρασης με ένζυμο που εξειδικεύονται στην πέψη δίκλωνων νουκλεϊκών οξέων (RQ1 DNase, Promega). Ακολουθεί καθαρισμός από ενζυμικά ή άλλα υπολλείματα της αντίδρασης πέψης. Το RNA μετατρέπεται σε cDNA μέσω αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και ακολουθούν τα υπόλοιπα στάδια προετοιμασίας βιβλιοθηκών σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Ovation human Blood RNA-Seq Library System, NuGen).

Όπως και στο στοχευμένο προσδιορισμό αλληλουχίας με τεχνολογία δεύτερης γενιάς (targeted NGS, Κεφ. 4.6), τα δείγματα που αναλύονται ταυτόχρονα στη συσκευή προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, φέρουν διαφορετικές διακριτές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, για να ξεχωρίζουν κατά την ανάλυση. Αυτές οι αλληλουχίες προσαρτώνται στα άκρα των υπό μελέτη κατακερματισμένων νουκλεϊκών οξέων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο παρασκευής των βιβλιοθηκών.

4.8.1 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA από δείγματα περιφερικού αίματος των ασθενών, αλλά και των ατόμων του γενικού πληθυσμού με φυσιολογικό γονότυπο, των οποίων η γονιδιακή έκφραση χρησίμευσε ως επίπεδο αναφοράς, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφ. 4.3.3.

4.8.2 Απομάκρυνση προσμείξεων DNA, μέσω πέψης με ένζυμο (DNA-se treatment)

Τα πεπτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται στο στάδιο αυτό, είναι εξειδικευμένα για δίκλιωνα υποστρώματα, έτσι το RNA παραμένει ανεπηρέαστο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο πρωτόκολλο του κατασκευαστή (RQ1 DNase, Promega)

4.8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή nanodrop, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.3.4.

4.8.4 Ποιοτική ανάλυση

Η ανάλυση της ποιότητας και του μεγέθους του RNA, πραγματοποιήθηκε μέσω μικροηλεκτροφόρησης σε συσκευή Bioanalyzer, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο ολοκληρωμένο σύστημα High Sensitivity DNA kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Agilent).

4.8.5 Προετοιμασία βιβλιοθήκης δειγμάτων

Η προετοιμασία κάθε βιβλιοθήκης RNA, πραγματοποιήθηκε μέσω του ολοκληρωμένου συστήματος Ovation human Blood RNA-Seq Library System, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NuGen), όπου περιλαμβάνεται και το στάδιο παρασκευής cDNA.

Με το πέρας της προετοιμασίας τα δείγματα είναι έτοιμα για ανάλυση σε συσκευή προσδιορισμού αλληλουχίας με τεχνολογία δεύτερης γενιάς της Illumina.

4.8.6 Προσδιορισμός αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε σε συσκευή HiSeq2500 (Illumina), ακολουθώντας το πρωτόκολλο, όπως αυτό περιγράφεται στο ολοκληρωμένο σύστημα HiSeq Rapid SBS Kit v2 (1x50 cycles), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Illumina).

4.8.7 Βιοπληροφορική ανάλυση NGS RNA-Seq δεδομένων

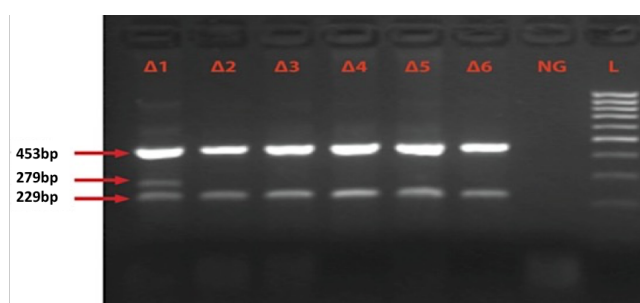
Τα στάδια της βιοπληροφορικής ανάλυσης, καθώς και οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο και περιγράφονται στο Παράρτημα VIII.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Τελικού σημείου Αλυσιδωτές Αντιδράσεις Πολυμεράσης (endpoint PCR), ακολουθούμενες από ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης, για ανίχνευση μεταλλάξεων

5.1.1 ARMS-PCR για ημιποσοτικό προσδιορισμό της μετάλλαξης *JAK2V617F*

Τα προϊόντα της ARMS-PCR, για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της σημειακής μετάλλαξης V617F, του γονιδίου *JAK2*, ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% πυκνό, φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί. Η ζώνη ελέγχου, μεγέθους 453 bp, αποτελεί ένδειξη της ποιότητας του DNA και της επάρκειας της PCR. Μια ζώνη ενίσχυσης, μεγέθους 279 bp, εμφανίζεται σε εκείνα τα δείγματα που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, ενώ μία ζώνη 229 bp σχηματίζεται λόγω εμφάνισης του αντίστοιχου φυσιολογικού γονότυπου.



Εικόνα 53. Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης 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, NTC (NG): αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας DNA (0.1 to 1.5 kb DNA ladder, 15628-019, Thermo-Fischer Scientific).

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης *JAK2V617F*, με ARMS-PCR, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

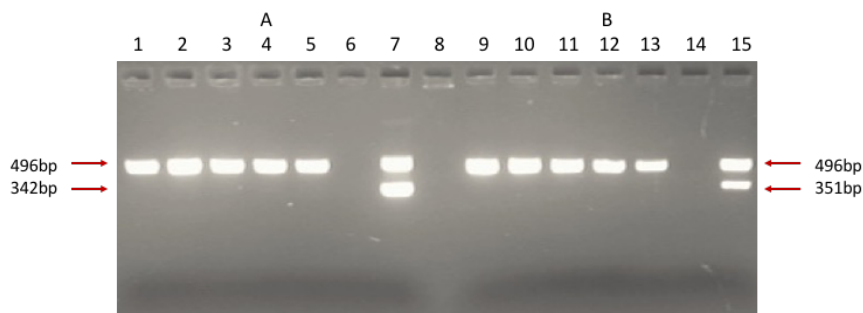
<i>JAK2V617F</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	59	93.65	4	6.35
ΙΘ	98	54	55.10	44	44.90
ΜΙ	89	47	52.81	42	47.19
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	7	12.28	50	87.72
αΧΜΛ	39	1	2.56	38	97.44
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	7	50.00	7	50.00

Πίνακας 44. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για τη σημειακή μετάλλαξη V617F του γονιδίου *JAK2*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Τα δεδομένα μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου και εκεί παρατηρείται αξιοσημείωτα υψηλό ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης *JAK2*V617F σε πάσχοντες από ΑΠ (95%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (51-57%). Η μικρή απόκλιση που παρατηρείται στην τελευταία κοορτή, ενδεχομένως οφείλεται στο περιορισμένο πλήθος των προς ανάλυση δειγμάτων. Ιδιαίτερως σημαντικά είναι τα αντίστοιχα ποσοστά και σε ασθενείς με ΙΘ και ΜΙ (50-60%), σύμφωνα και με προηγούμενες παρατηρήσεις (Vardiman et al. 2001, Baxter et al. 2005, Kralovics et al. 2005, Jones et al. 2005, Levine et al. 2005, Zhao et al. 2005). Η μετάλλαξη *JAK2*V617F, την οποία ανιχνεύσαμε σε έναν ασθενή με ΧΟΛ, έχει αναφερθεί ξανά στο παρελθόν σε ανάλογα περιστατικά, ωστόσο αυτά είναι πολύ σπάνια (Mc Lornan et al. 2005, Gajendra et al. 2014).

5.1.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2* με την τεχνική AS-PCR

Τα προϊόντα της AS-PCR, για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, στο εξόνιο 12, του γονιδίου *JAK2*, ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% πυκνό, φαίνονται στην εικόνα κάτωθι. Η ζώνη ελέγχου, μεγέθους 496 bp, αποτελεί ένδειξη γενωμικού υλικού καλής ποιότητας και επάρκειας ενίσχυσης. Μια ζώνη ενίσχυσης, μεγέθους 342 bp, εμφανίζεται σε εκείνα τα δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη c.1624_1629delAATGAA (p.N542_E543del). Αντίστοιχα, μια ζώνη ενίσχυσης, μεγέθους 351 bp, εμφανίζεται στα δείγματα με τη μετάλλαξη c.1615_1616AA>TT (p.K539L). Καμία επιπρόσθετη ζώνη δεν σχηματίζεται όταν ο γονότυπος είναι φυσιολογικός.



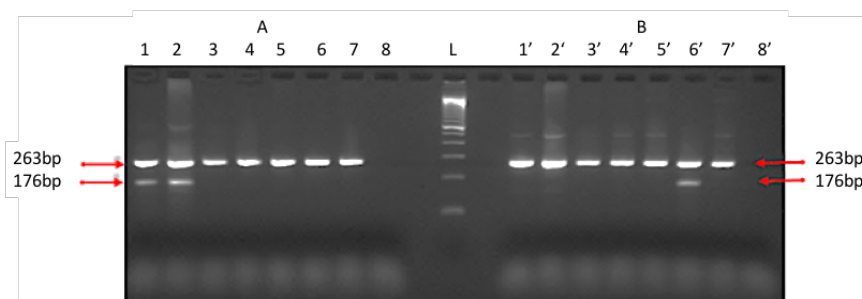
Εικόνα 54. Ενδεικτικά αποτελέσματα της AS-PCR για την ανίχνευση των μεταλλάξεων *JAK2* N542_E543del (A) και *JAK2* K539L (B). Δείγματα που φέρουν είτε τη πρώτη (7), είτε τη δεύτερη (15) εμφανίζουν δύο ζώνες. Αντίθετα τα δείγματα φυσιολογικού γονότυπου σχηματίζουν μόνο τη ζώνη ελέγχου της αντίδρασης. NTC (6, 14): αρνητικός μάρτυρας.

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 12, του γονιδίου *JAK2*, με AS-PCR, προέκυψαν τρία δείγματα με ΑΠ (3/63, 4.76%) τα οποία ελέγχθηκαν θετικά για την αντίδραση πολυμεράσης, εκ των οποίων δύο έφεραν τη μετάλλαξη c.1624_1629delAATGAA (p.N542_E543del) και ένα τη μετάλλαξη c.1615_1616AA>TT (p.K539L). Από τις υπόλοιπες κοορτές ασθενών δεν εντοπίστηκαν δείγματα με μεταλλάξεις. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου και εκεί, οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 12, του γονιδίου *JAK2* φαίνεται να ανιχνεύονται σε χαμηλά ποσοστά,

αποκλειστικά σε ασθενείς με ΑΠ (2-5%), όπως έχει ήδη αναφερθεί και προηγουμένως (Scott et al. 2007).

5.1.3 Ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων W515L/K στο εξόνιο 10 του γονιδίου *MPL* με την τεχνική AS-PCR

Τα προϊόντα της AS-PCR, σχετικά με την ανίχνευση των μεταλλάξεων W515L/K, στο εξόνιο 10, του γονιδίου *MPL*, ύστερα απο ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% πυκνό, φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί. Η ζώνη ελέγχου, μεγέθους 263 bp, αποτελεί ένδειξη της ποιότητας του DNA και της επάρκειας της PCR. Μια ζώνη ενίσχυσης, μεγέθους 176 bp, εμφανίζεται σε εκείνα τα δείγματα που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Καμία επιπρόσθετη ζώνη δεν σχηματίζεται όταν ο γονότυπος είναι φυσιολογικός.



Εικόνα 55. Ενδεικτικά αποτελέσματα της AS-PCR για την ανίχνευση των μεταλλάξεων *MPL* W515K (A) και *MPL* W515L (B). Δείγματα που φέρουν είτε τη πρώτη (1, 2), είτε τη δεύτερη (6') εμφανίζουν δύο ζώνες. Αντίθετα τα δείγματα φυσιολογικού γονότυπου σχηματίζουν μόνο τη ζώνη ελέγχου της αντίδρασης. NTC (8, 8'): αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας DNA (0.1 to 1.5 kb DNA ladder, 15628-019, Thermo-Fischer Scientific).

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, για τις μεταλλάξεις W515L/K, στο εξόνιο 10, του γονιδίου *MPL* με AS-PCR, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>MPL</i> W515L/K	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	7	7.14	91	92.86
ΜΙ	89	6	6.74	83	93.26
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	0	0.00	57	100.00
αΧΜΛ	39	0	0.00	39	100.00
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 45. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για τις μεταλλάξεις W515K και W515L στο εξόνιο 10 του γονιδίου *MPL*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Τα δεδομένα μας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, όπου και εκεί, οι μεταλλάξεις W515L/K, στο εξόνιο 10, του γονιδίου *MPL* φαίνεται να ανιχνεύονται σε χαμηλά ποσοστά σε ασθενείς με ΙΘ και ΜΙ (5-10%) (He et al. 2013, Zoi and Cross 2017).

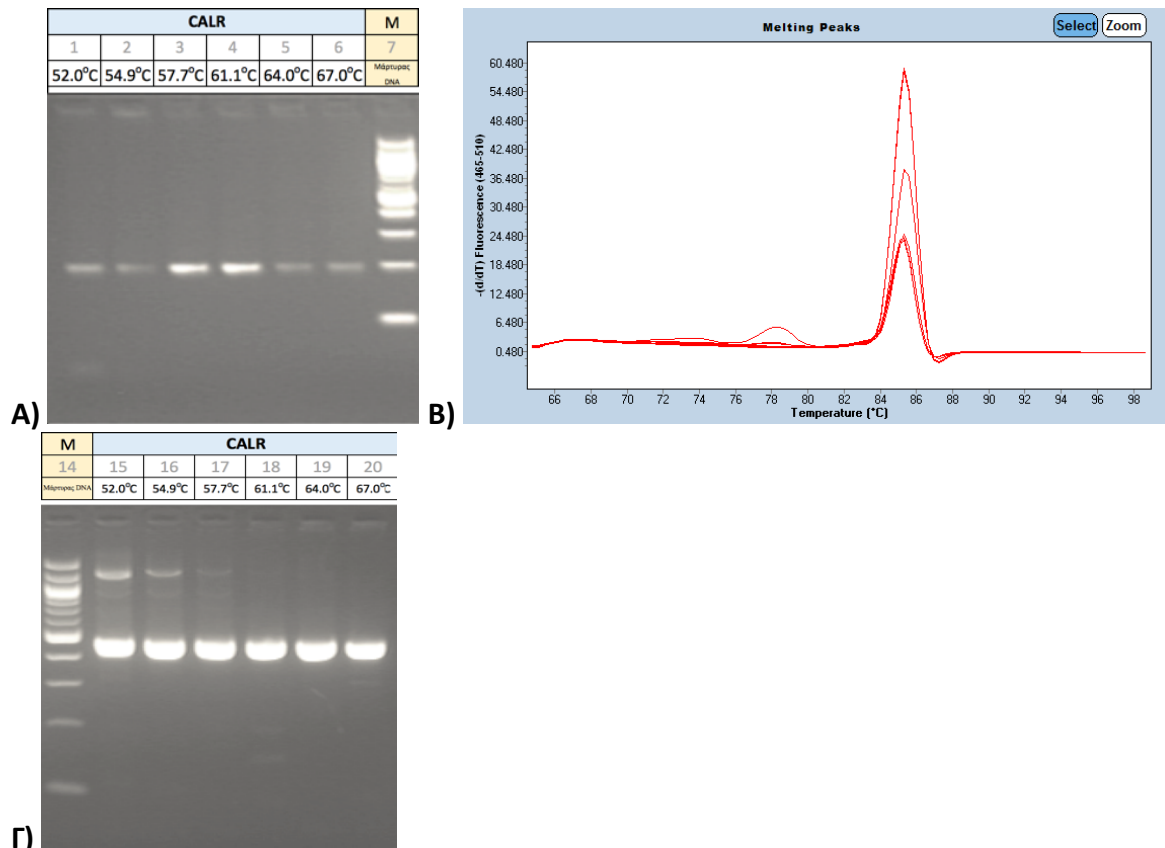
5.2 Αναλύσεις καμπύλης τήξης έπειτα από πραγματικού χρόνου αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (Real Time PCR HRMA), ακολουθούμενες από προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης του DNA (Sanger Sequencing), για ανίχνευση και χαρακτηρισμό μεταλλάξεων

5.2.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *CALR*

5.2.1.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 9 του γονιδίου της *CALR* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA. Τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν μέσω ανάλυσης σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν, μέσω Sanger sequencing.

Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).

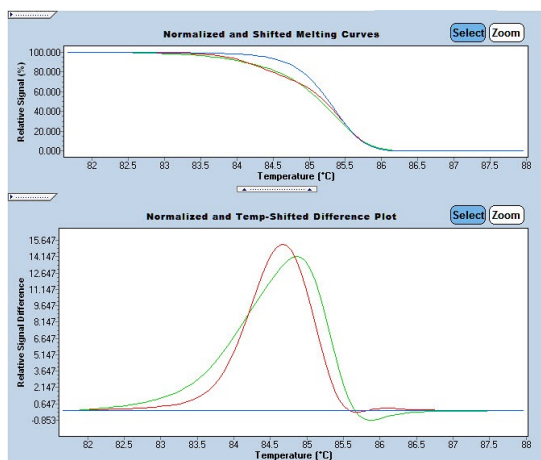


Εικόνα 56. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινήτων για ανάλυση του γονιδίου *CALR*. Α) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινήτες για τις αντιδράσεις HRMA,

αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο CALR έχει μήκος 204 ζεύγη βάσεων (*basepairs*, bp). Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πρίν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο CALR, έχει μήκος 469 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.1.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

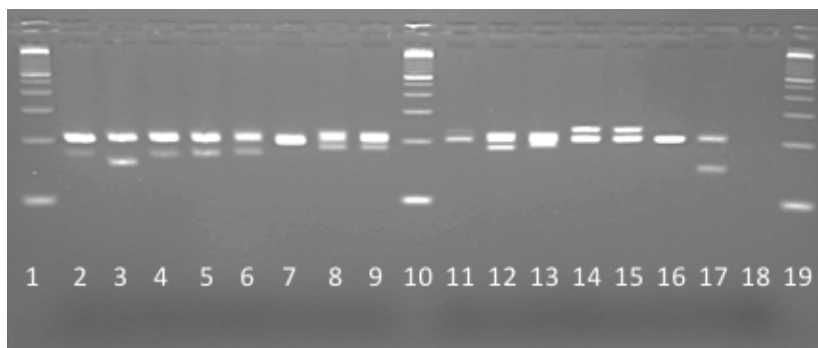
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων Τύπου-I και Τύπου-II στο γονίδιο CALR, μέσω HRMA, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 57. Ανίχνευση των δύο συχνότερων μεταλλάξεων στο εξόνιο 9, του γονιδίου CALR, μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα με φυσιολογικό γονότυπο. Με πράσινο χρώμα εμφανίζεται ένα δείγμα με μετάλλαξη Τύπου-I διαγραφής 52 νουκλεοτιδίων (c.1092_1143del52), ενώ με κόκκινο ένα δείγμα με μετάλλαξη Τύπου-II (c.1154_1155insTTGTC).

5.2.1.3 Επιβεβαίωση μεταλλάξεων μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης

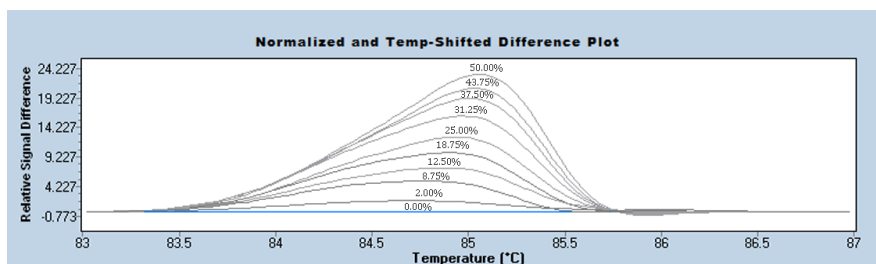
Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν μέσω HRMA, αναλύθηκαν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης, πυκνότητας 3%, για επιβεβαίωση.



Εικόνα 58. Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων με μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR, σε πήκτωμα αγαρόζης 3% πυκνό. Ανάμεσά τους διακρίνονται οι δύο συχνότερες μεταλλάξεις, εκείνες Τύπου-I και Τύπου-II, των οποίων η ανάλυση με HRMA παρουσιάστηκε στην προηγούμενη εικόνα. Αναλυτικότερα από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται: σειρά 1, MW marker - σειρά 2, διαγραφή 34 bp (E364fs*55) - σειρά 3, Τύπου-1 διαγραφή 52 bp (L367fs*46) - σειρά 4, διαγραφή 37 bp (L367fs*50) - σειρά 5, διαγραφή 34 bp (L367fs*52) - σειρά 6, διαγραφή 31 bp (D373fs*47) - σειρά 7, πολύπλοκη μετάλλαξη (D373fs*56) - σειρά 8, πολύπλοκη μετάλλαξη (D373fs*51) - σειρά 9, διαγραφή 19 bp (K375fs*49) - σειρά 10, MW marker - σειρά 11, πολύπλοκη μετάλλαξη (K377fs*55) - σειρά 12, διαγραφή 19 bp (K377fs*47) - σειρά 13, πολύπλοκη μετάλλαξη (E379fs*47) - σειρά 14, προσθήκη 5 bp (E386fs*46) - σειρά 15, μετάλλαξη Τύπου-2 προσθήκης 5 bp (K385fs*47) - σειρά 16, δείγμα φυσιολογικού γονότυπου - σειρά 17, δείγμα DNA από την κυτταρική σειρά MARIMO με μετάλλαξη διαγραφής 61 bp (L367fs*43) - σειρά 18, αντίδραση χωρίς DNA (NTC) - σειρά 19, MW marker. MW marker: Ένα κατακερματισμένο τεχνητό δείγμα DNA χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του μεγέθους των τμημάτων που ενισχύθηκαν μέσω PCR αντίδρασης (100 bp molecular-weight size marker, Thermo-Fischer Scientific).

5.2.1.4 Ελέγχος της ευαισθησίας του πρωτοκόλλου HRMA

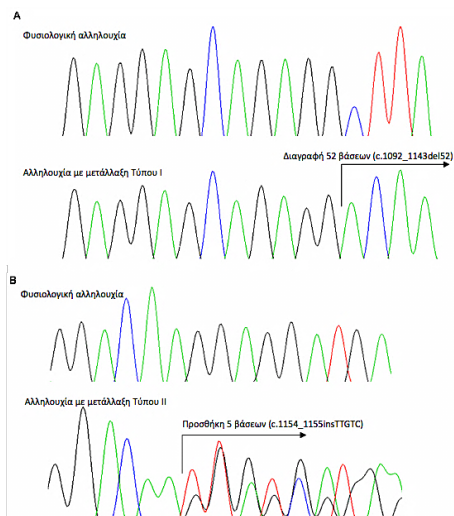
Τα επίπεδα ευαισθησίας του πρωτοκόλλου HRMA για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR, προσδιορίστηκαν μέσω διαδοχικών αραιώσεων (serial dilutions) ενός δείγματος με μετάλλαξη διαγραφής νουκλεοτιδίων Τύπου-1 (L367fs*46) και φορτίο περίπου 50%, όπως αυτό χαρακτηρίστηκε μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger. Η τεχνική εντοπίζει μεταλλαγμένα αλληλόμορφα σε ποσοστό μέχρι και 2% επί του συνόλου των αλληλίων.



Εικόνα 59. Όριο ανίχνευσης μεταλλάξεων CALR. Το πρωτόκολλο HRMA που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου της καλρετικουλίνης (CALR), έχει όριο ανίχνευσης της τάξης του 2%.

5.2.1.5 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας δειγμάτων με μεταλλάξεις Τύπου-I και Τύπου-II στο γονίδιο της *CALR*, καθώς και η αλληλουχία ενός φυσιολογικού δείγματος, με κανονική αλληλουχία και για τις δύο περιοχές του γονιδίου, ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 60. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *CALR*. A) Μετάλλαξη Τύπου-I διαγραφής 52 bp (c.1092_1143del52). B) Μετάλλαξη Τύπου-II προσθήκης 5 bp (c.1154_1155insTTGTC). Και τα δύο αντιπαραβάλλονται με δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.1.6 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας κατά Sanger, προκύπτουν τα δεδομένα που παρατίθενται στον πίνακα.

<i>CALR</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	23	23.47	75	76.53
ΜΙ	89	20	22.47	69	77.53
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	0	0.00	57	100.00
αΧΜΛ	39	0	0.00	39	100.00
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 46. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Σε μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία, αναχνεύθηκαν μεταλλάξεις Τύπου-I διαγραφής 52 νουκλεοτιδίων (c.1092_1143del52, p.L367fs*46) και Τύπου-II προσθήκης 5 νουκλεοτιδίων (c.1154_1155insTTGTC, p.K385fs*47). Σπανιότερες μεταλλάξεις συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

α/α	Αλλαγή στην νουκλεοτιδική ακολουθία της κωδικής αλυσίδας	Αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης	Πλήθος	COSMIC
1	c.1091_1124del34	p.E364fs*55	1	NAI
2	c.1094_1130del37	p.L367fs*50	1	OXI
3	c.1098_1131del34	p.L367fs*52	1	NAI
4	c.1116_1146del31	p.D373fs*47	1	NAI
5	c.1118_1125>CTTG	p.D373fs*56	1	OXI
6	c.1118_1140>CGTT	p.D373fs*51	1	OXI
7	c.1122_1140del19	p.K375fs*49	1	NAI
8	c.1129_1132>TTTTGCTTA	p.K377fs*55	1	OXI
9	c.1129_1147del19	p.K377fs*47	1	OXI
10	c.1131-1151>GGAGTGTC	p.E379fs*47	1	OXI
11	c.1154_1155insATGTC	p.K386fs*46	1	NAI

Πίνακας 47. Σπάνιες μεταλλάξεις που ανιχνεύσαμε στο εξόνιο 9 του γονιδίου CALR, στους ασθενείς που μελετήθηκαν. Οι μεταλλάξεις με αύξον αριθμό (α/α) 2, 5, 6, 8, 9 και 10 ανιχνεύονται για πρώτη φορά, αφού δε συμπεριλαμβάνονται στην πρόσφατη έκδοση (v85) της βάσης δεδομένων COSMIC.

Αναλυτικότερα οι κατηγορίες μεταλλάξεων CALR που ανιχνεύθηκαν ανά νοσολογική οντότητα, καθώς και η συχνότητα εμφάνισης αυτών, παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

ΙΘ (N=98)	Σύνολο μεταλλάξεων	Τύπου-1	Τύπου-1 ομοιάζουσες	Τύπου-2	Τύπου-2 ομοιάζουσες	Πολύπλοκες (complex)
n	23	12	3	5	1	2
%	23.47	52.17	13.04	21.74	4.35	8.70
ΜΙ (N=89)	Σύνολο μεταλλάξεων	Τύπου-1	Τύπου-1 ομοιάζουσες	Τύπου-2	Τύπου-2 ομοιάζουσες	Πολύπλοκες (complex)
n	20	11	3	4	0	2
%	22.47	55.00	15.00	20.00	0.00	10.00
ΠΜΙ (N=65)	Σύνολο μεταλλάξεων	Τύπου-1	Τύπου-1 ομοιάζουσες	Τύπου-2	Τύπου-2 ομοιάζουσες	Πολύπλοκες (complex)
n	15	8	2	4	0	1
%	23.08	53.33	13.33	26.67	0.00	6.67
ΜΙ ως εξέλιξη από ΙΘ (N=24)	Σύνολο μεταλλάξεων	Τύπου-1	Τύπου-1 ομοιάζουσες	Τύπου-2	Τύπου-2 ομοιάζουσες	Πολύπλοκες (complex)
n	5	3	1	0	0	1
%	20.83	60.00	20.00	0.00	0.00	20.00

Πίνακας 48. Πλήθος και συχνότητα των επιμέρους κατηγοριών μεταλλάξεων CALR ανά νόσημα.

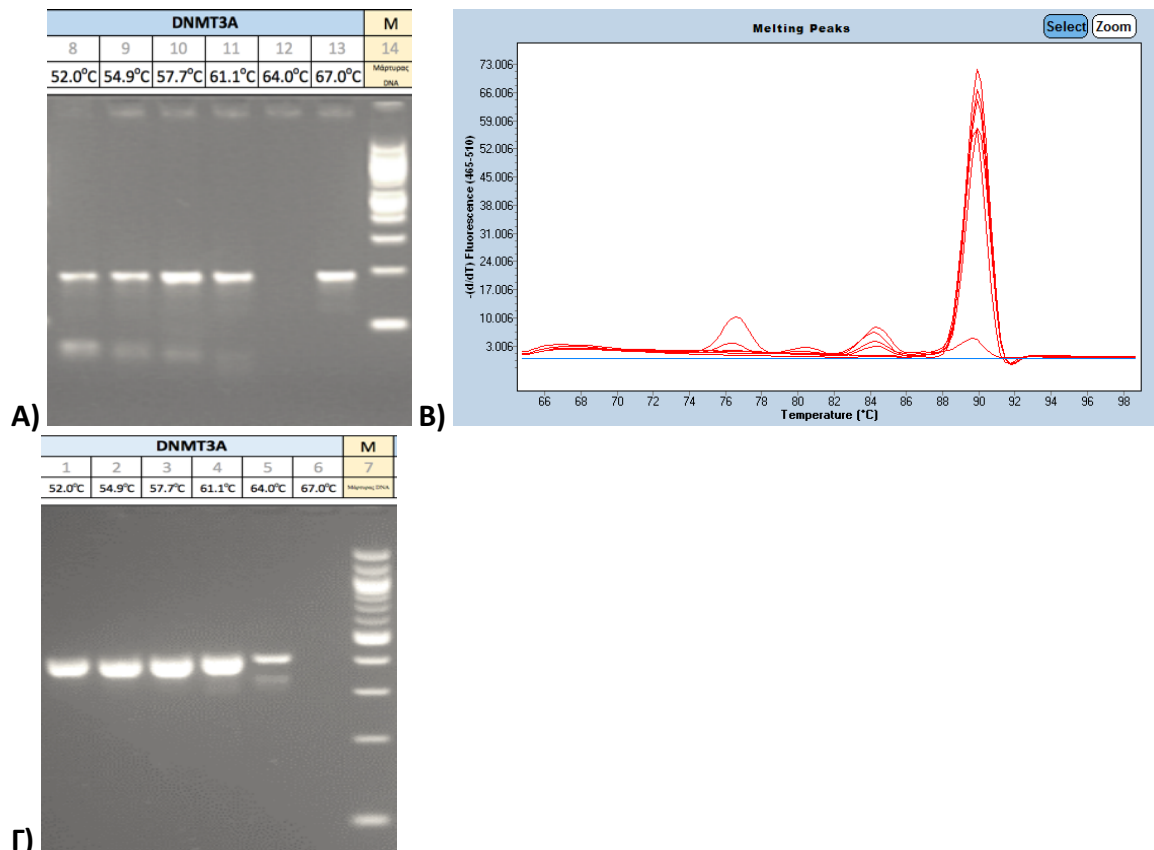
Τα δεδομένα μας συμφωνούν με την πρόσφατη βιβλιογραφία, που αναφέρεται στο σχετικά υψηλό ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*, στις ΙΘ (15-25%) και ΜΙ (20-25%) (Nangalia et al. 2013, Klampfl et al. 2013, Patnaik and Tefferi 2015, Zoi and Cross 2017). Παρά τις αναφορές για εμφάνιση μεταλλάξεων *CALR*, σε χαμηλά ποσοστά ασθενών με ΧΟΛ (Cui et al. 2014), δεν εντοπίσαμε καμία τέτοια περίπτωση, που ενδεχομένως οφείλεται στο περιορισμένο πλήθος διαθέσιμων δειγμάτων.

5.2.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 23 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *DNMT3A*

5.2.2.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 23 του γονιδίου *DNMT3A* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).

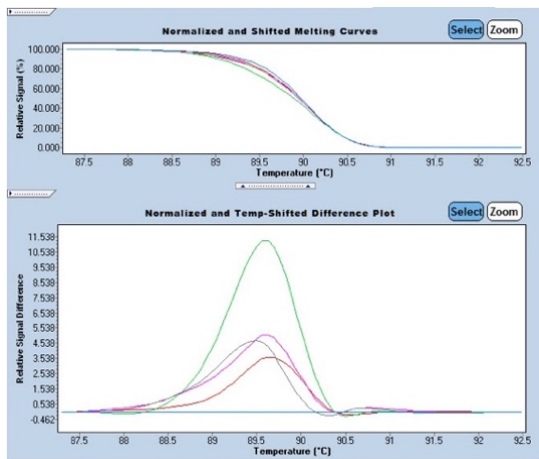


Εικόνα 61. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινήτων, για ανάλυση του γονιδίου *DNMT3A*. Α) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινήτες για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινήτων της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την

ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο DNMT3A έχει μήκος 184 bp. Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο DNMT3A, έχει μήκος 403 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.2.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων DNMT3A, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 62. Ανάδειξη μεταλλάξεων στο εξόνιο 23 του γονιδίου DNMT3A με HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο εμφανίζεται η μετάλλαξη S878Y (c.2633C>A), με μωβ η N879fs*40 (c.2634_2635insC), με πράσινο η R882C (c.2644C>T), ενώ με γκρι η R882H (c.2645G>A).

5.2.2.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο DNMT3A, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 63. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου DNMT3A. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι c.2633C>A, c.2634_2635insC, c.2644C>T, c.2645G>A και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.2.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο DNMT3A με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

DNMT3A	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	1	1.02	97	98.98
ΜΙ	89	5	5.62	84	94.38
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	2	3.51	55	96.49
αΧΜΛ	39	3	7.69	36	92.31
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	2	14.29	12	85.71

Πίνακας 49. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 23 του γονιδίου DNMT3A. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Σε μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία ανιχνεύθηκαν συχνές μεταλλάξεις, συγκεκριμένα εκείνες που αφορούν σε αντικαταστάσεις με λάθος νόημα, του αμινοξέος αργινίνη, στη θέση 882 (R882) της πρωτεϊνικής ακολουθίας, αλλά και σπανιότερες, όπως οι S878Y και N879fs*40.

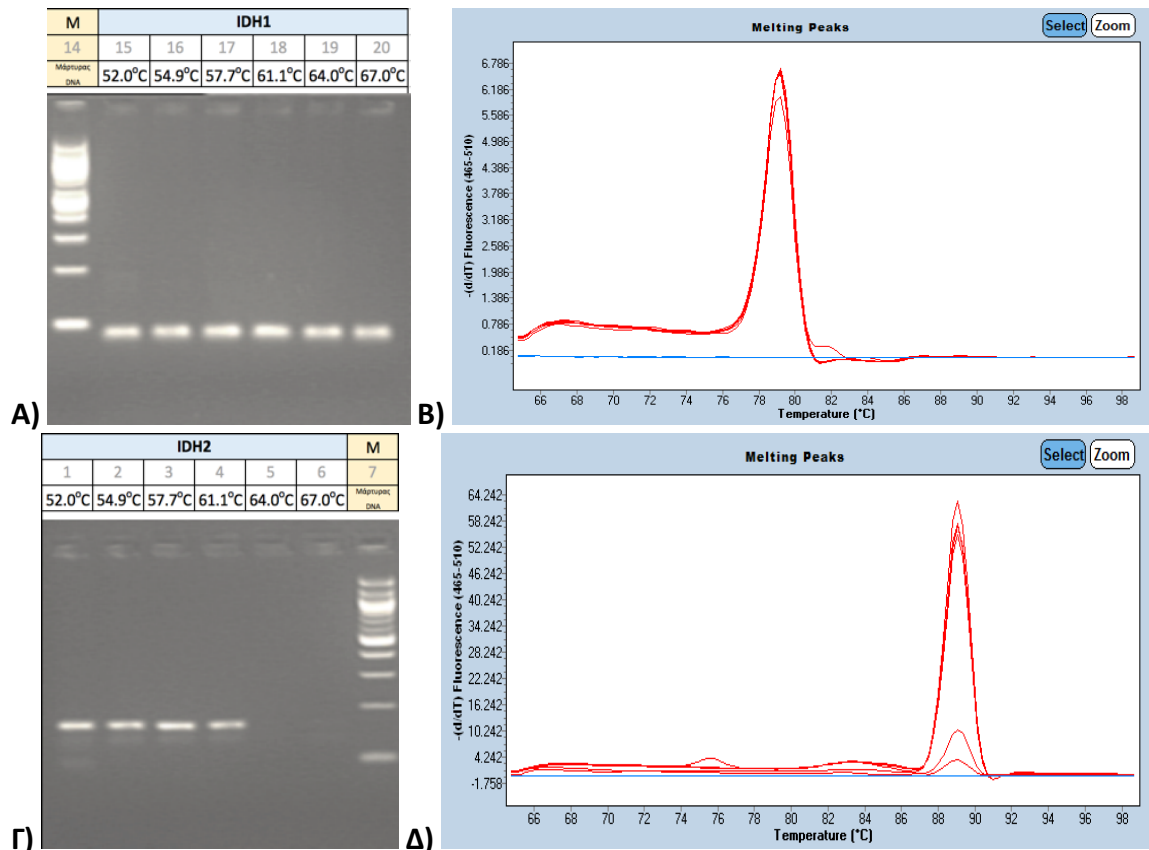
Τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο σχετικά κυμαινόμενο ποσοστό εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *DNMT3A*, σε ασθενείς με MI (5-8%), σποραδικά δε σε νοσούντες με ΑΠ ή ΙΘ, όπως επίσης σε διαγνωσθέντες με ΜΔΣ/ΜΥΝ (5-20% σε αΧΜΛ, 2-6% σε ΧΜΜΛ, 15-18% σε ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ) (Muramatsu et al. 2012, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Zoi and Cross 2017).

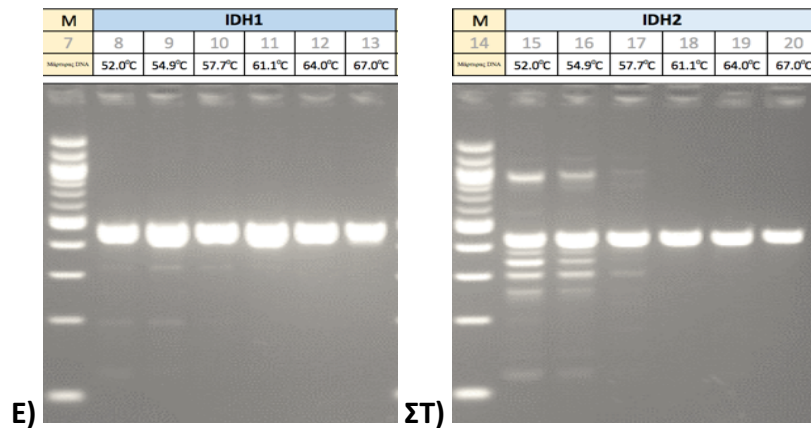
5.2.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 (GRCh37/hg19) των γονιδίων *IDH1* και *IDH2*

5.2.3.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 4 των γονιδίων *IDH1/2* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).

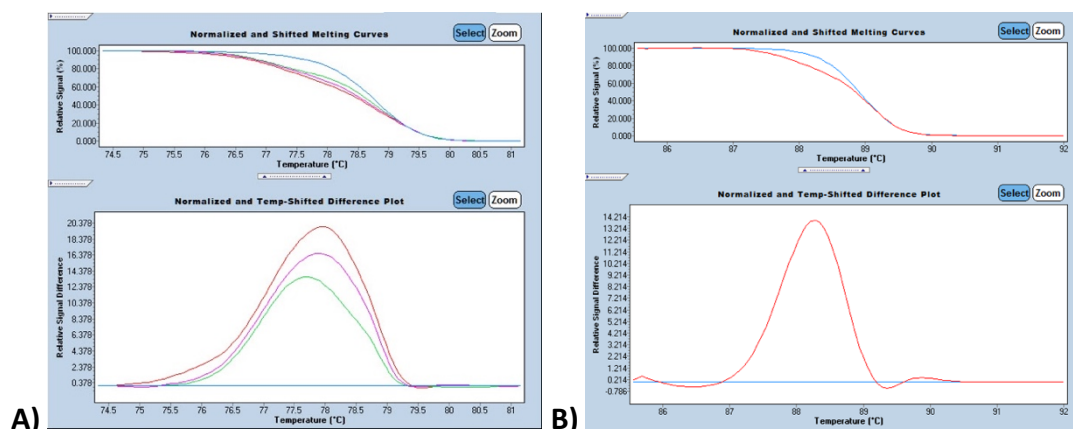




E) ΣΤ)
 Εικόνα 64. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση των γονιδίων IDH1/2. Α) και Γ) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) και Δ) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Τα προϊόντα ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο εξόνιο 4 καθενός εκ των δύο γονιδίων, IDH1 και IDH2, έχουν μήκος 82 και 165 bp, αντίστοιχα. Ε και ΣΤ) Τα αντίστοιχα προϊόντα των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο εξόνιο 4 καθενός εκ των δύο γονιδίων, IDH1 και IDH2, έχουν μήκος 470 και 428 bp, αντίστοιχα, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.3.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων στα γονίδια IDH1 και IDH2, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.

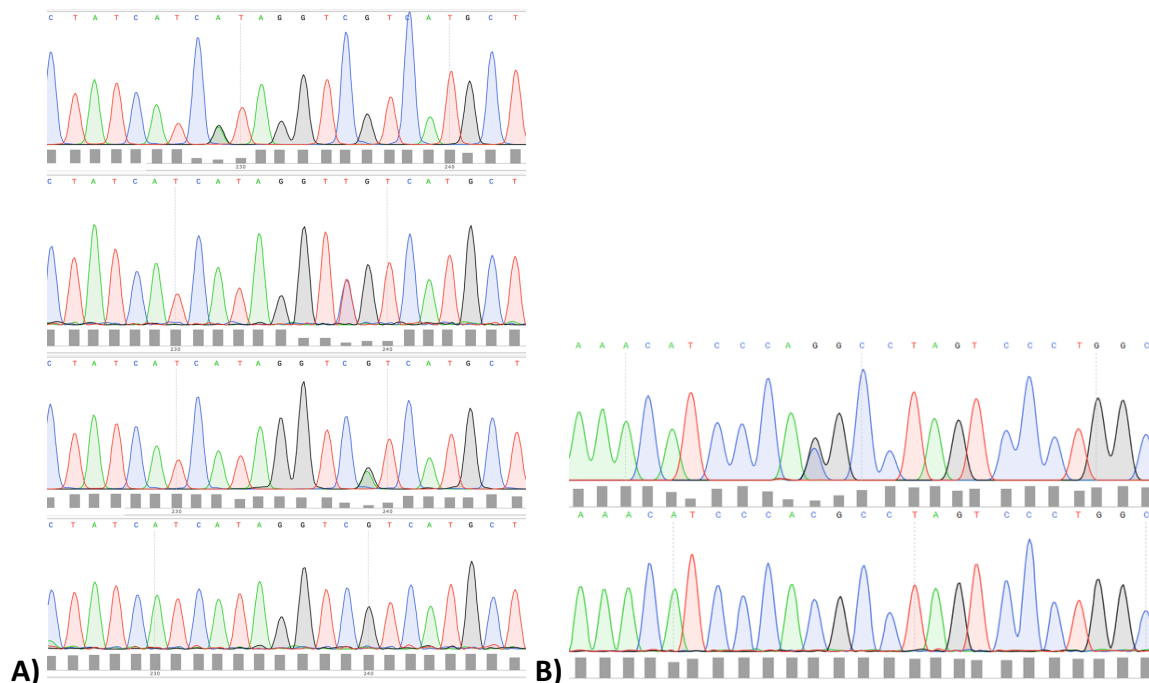


A) Β)
 Εικόνα 65. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 των γονιδίων IDH1/2 μέσω HRMA. Α) Ανάδειξη μεταλλάξεων στο εξόνιο 4, του γονιδίου IDH1, μέσω υπολογιστικού προγράμματος, έπειτα από

HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο διακρίνεται η μετάλλαξη I130V (c.388A>G), με πράσινο η R132C (c.394C>T), ενώ με μωβ η R132H (c.395G>A). B) Ανάδειξη μεταλλάξεων στο εξόνιο 4, του γονιδίου IDH2, μέσω υπολογιστικού προγράμματος, έπειτα από HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο διακρίνεται η μετάλλαξη R159G (c.475C>G).

5.2.3.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1 και IDH2, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



A) **B)**
 Εικόνα 66. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας των γονιδίων IDH1/2. A) Χρωματογραφήματα μεταλλάξεων στο γονίδιο IDH1, έπειτα απο προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις c.388A>G, c.394C>T και c.395G>A, όπως και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. B) Χρωματογραφήματα μεταλλάξεων στο γονίδιο IDH2, έπειτα απο προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζεται η μετάλλαξη c.475C>G, όπως και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.3.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια IDH1/2 με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>IDH1</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	1	1.12	88	98.88
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	1	1.75	56	98.25
αΧΜΛ	39	0	0.00	39	100.00
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

<i>IDH2</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	1	1.12	88	98.88
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	0	0.00	57	100.00
αΧΜΛ	39	0	0.00	39	100.00
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 50. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 4 των γονιδίων *IDH1/2*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

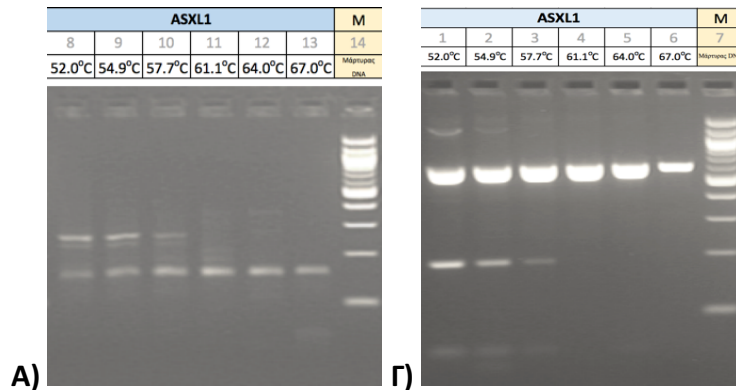
Με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε, ταυτοποιήθηκαν συχνές μεταλλάξεις, συγκεκριμένα εκείνες που αφορούν σε μη συνώνυμη αντικατάσταση του αμινοξέος αργινίνη στη θέση 132 (R132) της πρωτεϊνικής ακολουθίας, αλλά και σπανιότερες, όπως η I130V στο γονίδιο *IDH1* και η R159G στο γονίδιο *IDH2*, στα υπο μελέτη δείγματα. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με την πρόσφατη βιβλιογραφία, όπου γίνεται αναφορά στο σχετικά χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων, στο εξόνιο 4 των γονιδίων *IDH1/2*, κυρίως σε ασθενείς με ΜΙ (5-6%), ΧΜΜΛ (5-10%) ή αΧΜΛ (1-10%) (Muramatsu et al. 2012, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Zoi and Cross 2017).

5.2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *ASXL1*

5.2.4.1 Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 12 του γονιδίου *ASXL1* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

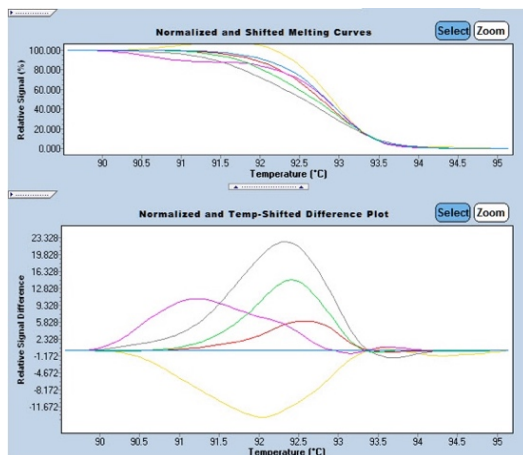
Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 67. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου ASXL1. A) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο ASXL1 έχει μήκος 152 bp. Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο ASXL1, έχει μήκος 592 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.4.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων ASXL1, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο.

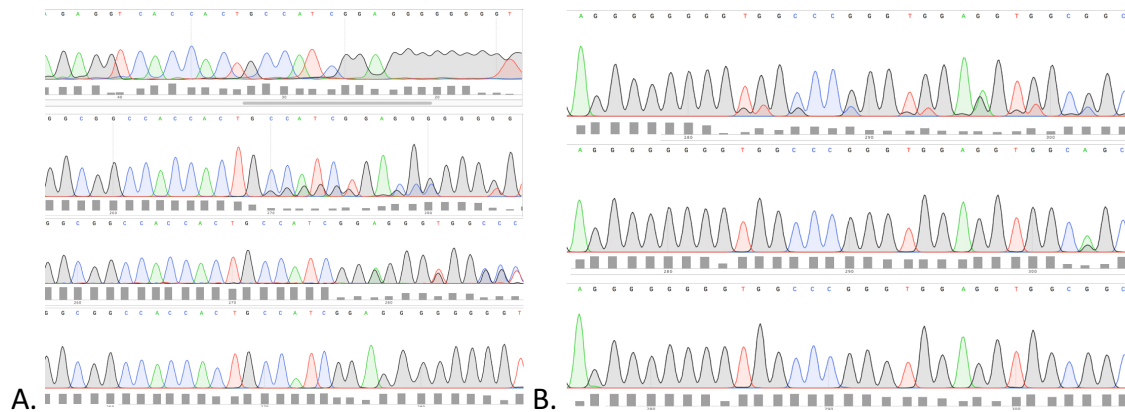


Εικόνα 68. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου ASXL1 μέσω HRMA. Με κίτρινο απεικονίζεται η μετάλλαξη E635fs*15 (c.1888_1910del23), με μωβ η A640fs*13

(c.1919_1929del11), με γκρι η G642del (c.1926_1928delAGG), με κόκκινο η G646fs*12 (c.1934_1935insG), με πράσινο η G652S (c.1954G>A) και με μπλε ο φυσιολογικό γονότυπος.

5.2.4.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1*, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 69. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *ASXL1*. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Α. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις c.1888_1910del23, c.1919_1929del11, c.1926_1928delAGG, ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Β. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις c.1934_1935insG και c.1954G>A, καθώς και ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.4.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *ASXL1* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>ASXL1</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	1	1.61	62	98.39
ΙΘ	98	5	5.10	93	94.90
ΜΙ	89	29	32.58	60	67.42
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	3	50.00	3	50.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	23	40.35	34	59.65
αΧΜΛ	39	22	56.41	17	43.59
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	2	14.29	12	85.71

Πίνακας 51. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου *ASXL1*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Κυρίως ανιχνεύθηκε, η πιο συχνά αναφερόμενη στη βιβλιογραφία, μετάλλαξη προσθήκης μίας επιπλέον γουανίνης, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1934 και 1935 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (c.1934_1935insG). Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε μετατόπιση του μεταγραφικού πλαισίου ανάγνωσης, προκαλώντας πρόωρο τερματισμό της μεταφραστικής διαδικασίας (p.G646fs*12). Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα είναι η σύνθεση μίας πρωτεΐνης με ελλιπές 3' αμινοτελικό άκρο, της οποίας οι ιδιότητες, διαφέρουν κατά πολύ, από εκείνες του φυσιολογικού προϊόντος. Σποραδικά ανιχνεύθηκαν και άλλες μεταλλάξεις, όπως οι E635fs*15, A640fs*13, G642del και G652S.

Τα δεδομένα μας συμφωνούν με την πρόσφατη βιβλιογραφία, όπου αναφέρονται κυμαινόμενα ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *ASXL1* σε ασθενείς με MYN, κυρίως με MI (15-36%), σποραδικά δε σε νοσούντες με ΙΘ ή ΑΠ (Langabeer et al 2015, Zoi and Cross 2017).

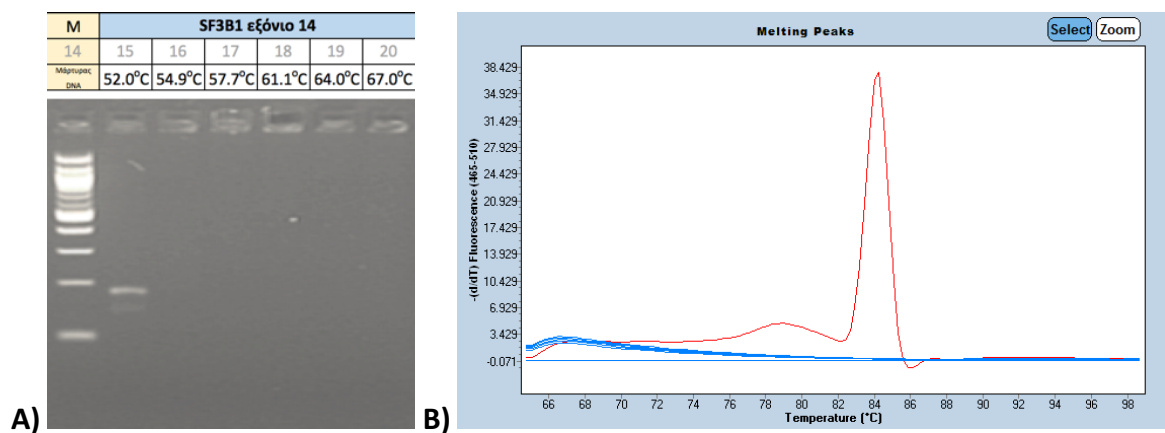
Ιδιαίτερως υψηλό είναι το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων *ASXL1* διαγνωσθέντες με ΧΟΛ (45-57%), οι οποίες κατά κύριο λόγο συνανιχνεύονται με μεταλλάξεις *CSF3R*, οπότε και συντελούν σε χειρότερη πρόγνωση νόσου (Meggendorfer et al. 2014, Tefferi et al. 2015, Elliott et al. 2015). Οι ασθενείς με ΜΔΣ/MYN, επίσης εμφανίζουν υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων *ASXL1* (60-69% σε αΧΜΛ, 27-52% σε ΧΜΜΛ, 15-20% σε ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ) (Muramatsu et al. 2012, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Meggendorfer et al. 2018).

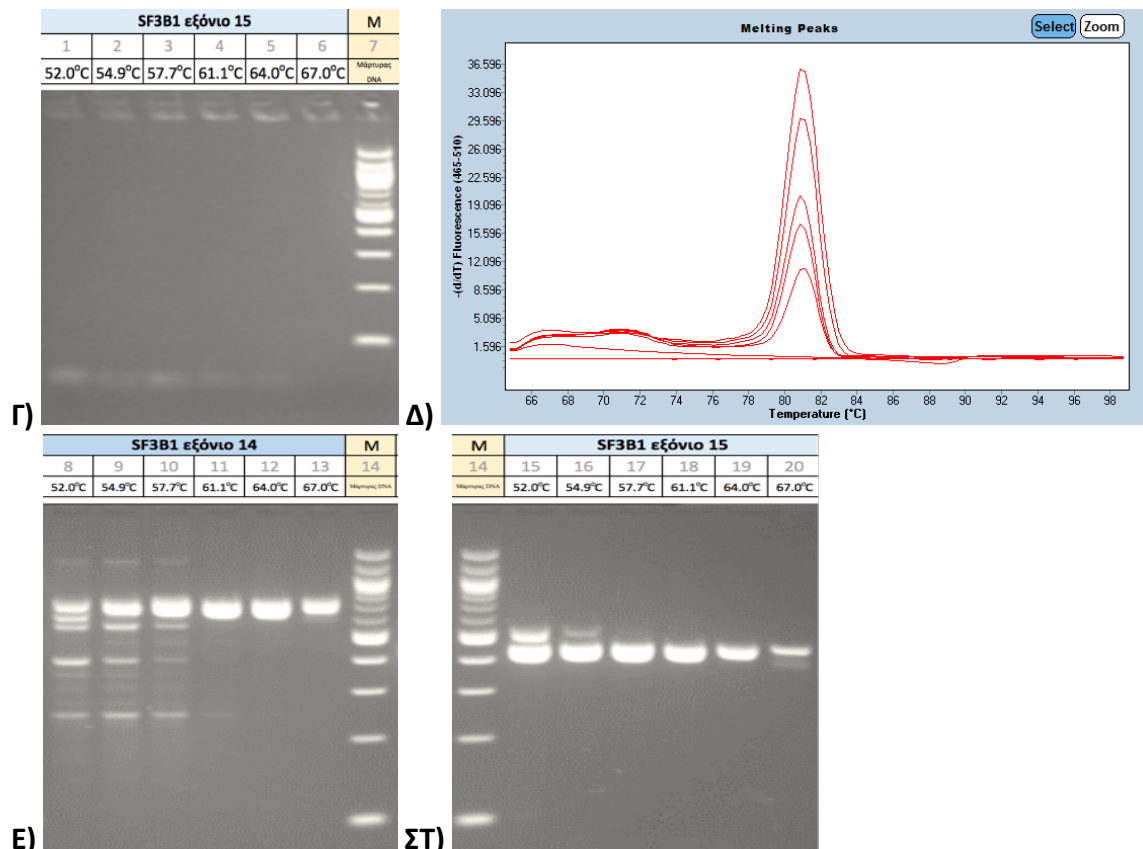
5.2.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 14 και 15 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *SF3B1*

5.2.5.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση των εξονίων 14 και 15 του γονιδίου *SF3B1* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).

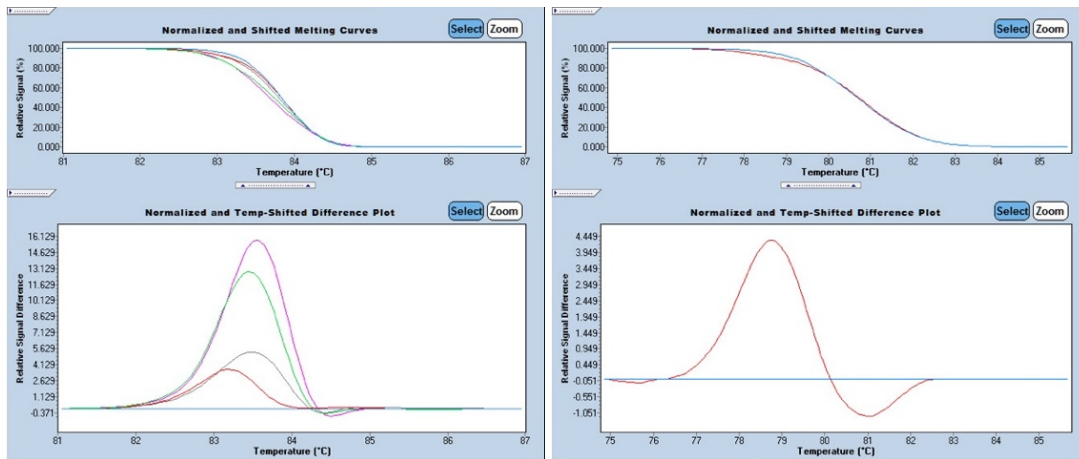




Εικόνα 70. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου *SF3B1*. Α) και Γ) Τα προϊόντα της *gradient PCR*, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) και Δ) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στα εξόνια 14 και 15 του γονιδίου *SF3B1*, έχουν μήκος 186 και 55 bp, αντίστοιχα. Ε και ΣΤ) Τα αντίστοιχα προϊόντα των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από *Sanger sequencing* και αφορούν στα εξόνια 14 και 15 του γονιδίου *SF3B1*, έχουν μήκος 710 και 447 bp, αντίστοιχα, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από *gradient PCR*.

5.2.5.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

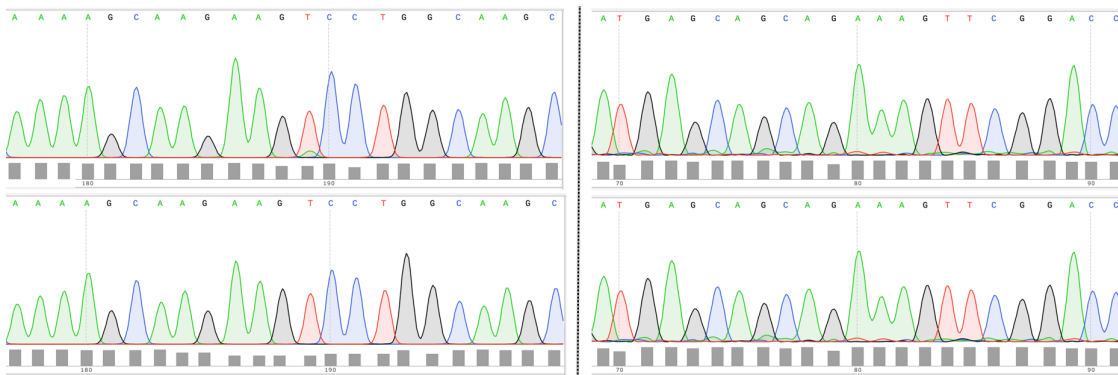
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων *SF3B1*, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 71. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 14 και 15 του γονιδίου SF3B1 μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή και στις δύο εικόνες, απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Στην εικόνα αριστερά (εξόνιο 14) παρατηρούνται, με γκρι η R625C (c.1873C>T), με μωβ η N626D (c.1876A>G), με κόκκινο η μετάλλαξη S657T (c.1969T>A), με πράσινο η H662Y (c.1984C>T). Στην εικόνα δεξιά (εξόνιο 15) διακρίνεται, η μετάλλαξη K700E (c.2098A>G), με κόκκινο χρώμα.

5.2.5.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων, ασθενών με MYN, με μεταλλάξεις στο γονίδιο SF3B1, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 72. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου SF3B1. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Στην αριστερά εικόνα, από επάνω προς τα κάτω, παρουσιάζονται η μετάλλαξη c.1969T>A και ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου για τη νουκλεοτιδική θέση 1969. Στη δεξιά εικόνα, από επάνω προς τα κάτω, εμφανίζεται η μετάλλαξη c.2098A>G, όπως και ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου για τη θέση 2098.

5.2.5.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο SF3B1 με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>SF3B1</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	1	1.02	97	98.98
ΜΙ	89	5	5.62	84	94.38
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	0	0.00	57	100.00
αΧΜΛ	39	0	0.00	39	100.00
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	11	78.57	3	21.43

Πίνακας 52. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στα εξόνια 14 και 15 του γονιδίου *SF3B1*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Πιο συχνά ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη, που οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος λυσίνη, στη θέση 700 της αμινοξικής ακολουθιάς, από γλουταμικό οξύ (p.K700E). Σε άλλες περιπτώσεις έχουμε ανιχνεύσει επιπρόσθετες μεταλλάξεις στο εξόνιο 14 του γονιδίου *SF3B1*, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.

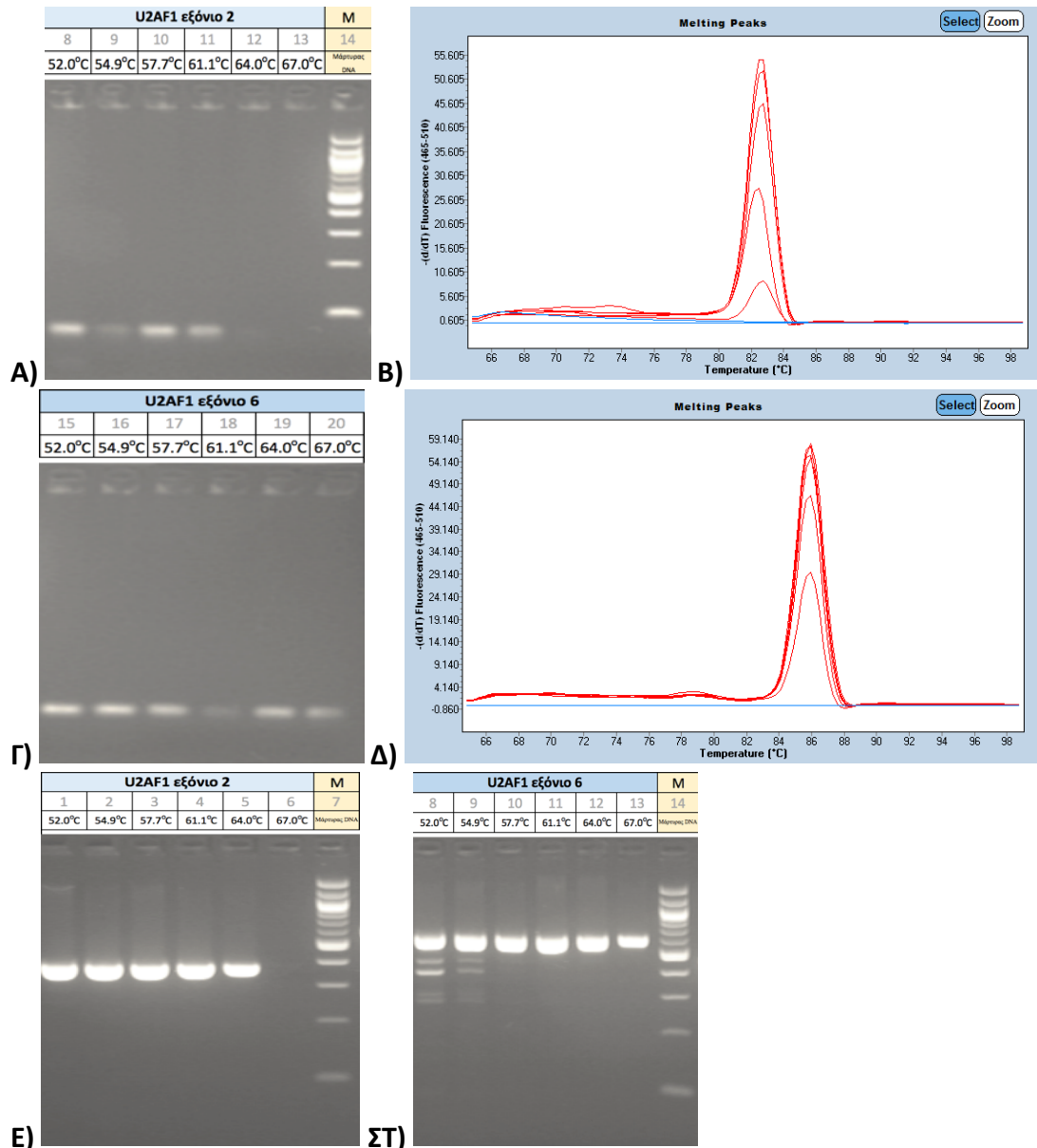
Επιπλέον, τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο σχετικά χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *SF3B1*, κυρίως σε ασθενείς με ΙΘ (3%) και ΜΙ (5-8%) (Zoi and Cross 2017). Αντιθέτως το ποσοστό αυτό είναι ιδιαίτερος υψηλό σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (80-93%), ενώ πιο σπάνια εντοπίζονται επιπροσθέτως σε νοσούντες με αΧΜΛ (11%) και ΧΜΜΛ (5-6) (Yoshida et al. 2011, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Muramatsu et al. 2012, Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Saez et al. 2017).

5.2.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 2 και 6 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *U2AF1*

5.2.6.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση των εξονίων 2 και 6 του γονιδίου *U2AF1* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

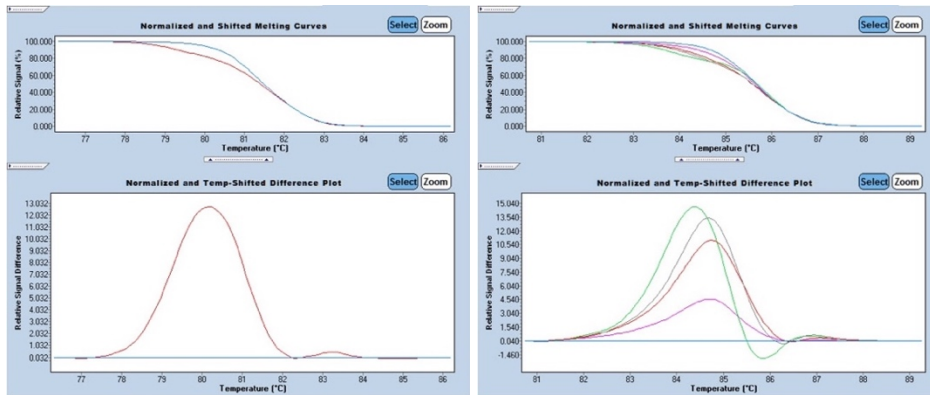
Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 73. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου U2AF1. A) και Γ) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. B) και Δ) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στα εξόνια 2 και 6 του γονιδίου U2AF1, έχουν μήκος 77 και 78 bp, αντίστοιχα. E και ΣΤ) Τα αντίστοιχα προϊόντα των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στα εξόνια 2 και 6 του γονιδίου U2AF1, έχουν μήκος 370 και 597 bp, αντίστοιχα, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.6.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

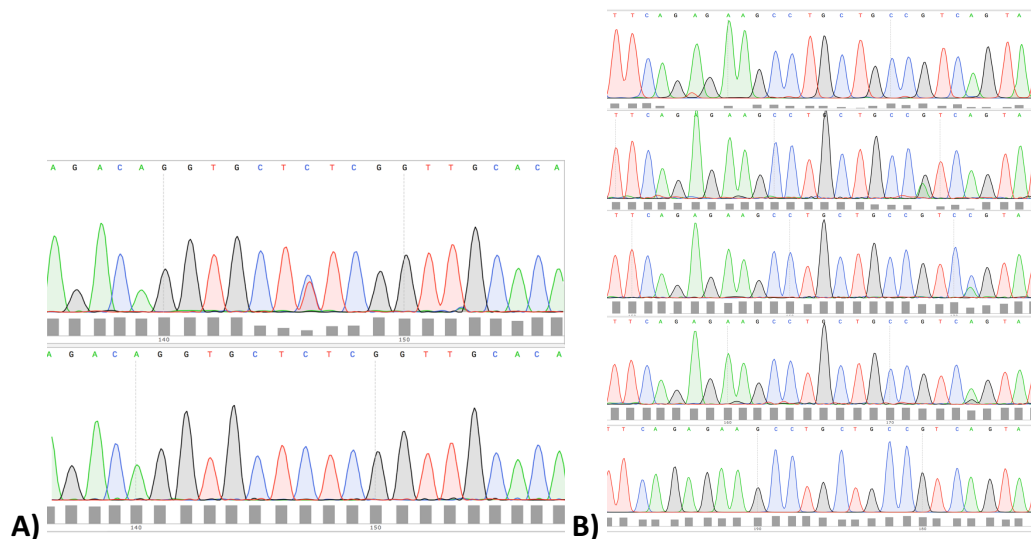
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων *U2AF1*, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 74. Ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 2 και 6 του γονιδίου *U2AF1* μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή και στις δύο εικόνες, απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Στην εικόνα αριστερά (εξόνιο 2) διακρίνεται με κόκκινο η μετάλλαξη S34F (c.101C>T). Στην εικόνα δεξιά (εξόνιο 6) παρατηρούνται, με μωβ η μετάλλαξη η R151S (c.453A>T), με πράσινο η R156H (c.467G>A), με κόκκινο η Q157P (c.470A>C), ενώ με γκρι η Q157R (c.470A>G).

5.2.6.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *U2AF1*, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



A) B)

Εικόνα 75. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *U2AF1*. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Α) Από επάνω προς τα κάτω, παρουσιάζονται η

μετάλλαξη c.101C>T και ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου για τη νουκλεοτιδική θέση 101. Β) Από επάνω προς τα κάτω, εμφανίζονται οι μεταλλάξεις c.453A>T, c.467G>A, c.470A>C και η c.470A>G, όπως και ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου για αυτές τις θέσεις.

5.2.6.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο U2AF1 με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

U2AF1	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	8	8.99	81	91.01
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	1	1.75	56	98.25
αΧΜΛ	39	4	10.26	35	89.74
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	1	7.14	13	92.86

Πίνακας 53. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στα εξόνια 2 και 6 του γονιδίου U2AF1. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Ανιχνεύθηκαν, συχνές μη-συνώνυμες σημειακές μεταλλάξεις, που οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος στη θέση 157 (Q157), αλλά και πιο σπάνιες μεταλλάξεις, όπως οι S34F, R151S και R156H.

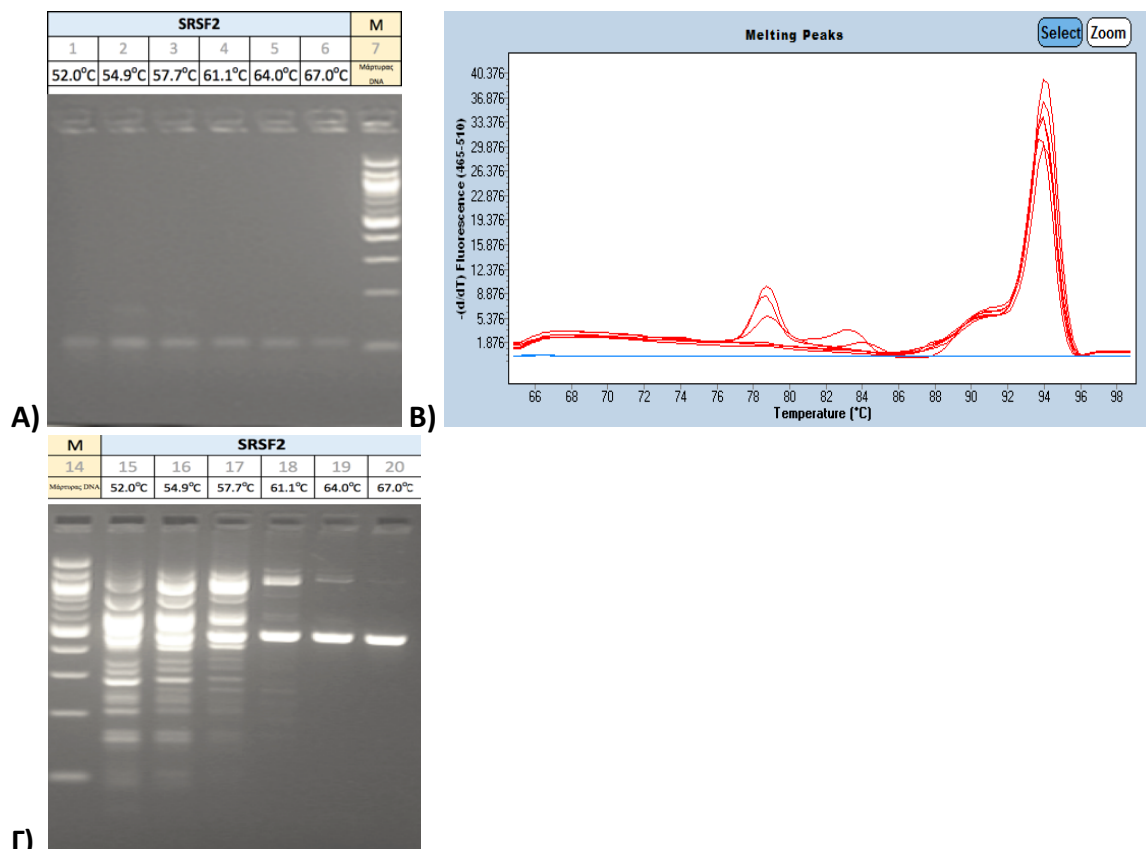
Επιπλέον, τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο σχετικά χαμηλό ποσοστό εύρεσης μεταλλάξεων στο γονίδιο U2AF1, κυρίως σε ασθενείς με MI (5-16%), και ΜΔΣ/ΜΥΝ (1-9% σε αΧΜΛ, 5-9% σε ΧΜΜΛ, 4-5% σε ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ) (Yoshida et al. 2011, Muramatsu et al. 2012, Langabeer et al 2015, Padron 2015, , Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Saez et al. 2017, Zoi and Cross 2017, Tefferi et al. 2018).

5.2.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 1 (GRCh37/hg19) του γονιδίου SRSF2

5.2.7.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 1 του γονιδίου SRSF2 πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

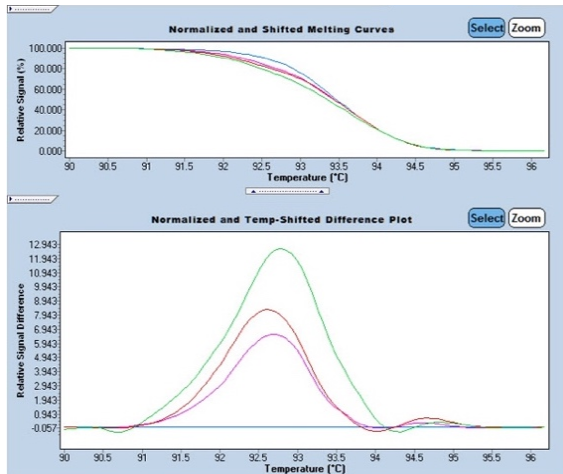
Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 76. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου *SRSF2*. Α) Τα προϊόντα της *gradient PCR*, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις *HRMA*, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της *HRMA*, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Γ) Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για *HRMA* και αφορούν στο γονίδιο *SRSF2* έχει μήκος 110 bp. Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για *PCR* ενίσχυση πριν από *Sanger sequencing* και αφορούν στο γονίδιο *SRSF2*, έχει μήκος 484 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από *gradient PCR*.

5.2.7.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω *HRMA*

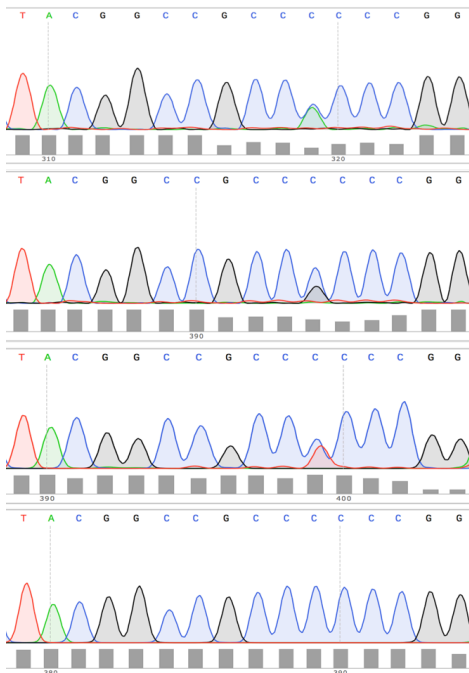
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων *SRSF2*, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 77. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 1 του γονιδίου SRSF2 μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με μωβ απεικονίζεται η μετάλλαξη P95H (c.284C>A), με κόκκινο η P95R (c.284C>G) και με πράσινο η P95L (c.284C>T).

5.2.7.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο SRSF2, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 78. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου SRSF2. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις c.284C>A, c.284C>G και c.284C>T όπως και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.7.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *SRSF2* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>SRSF2</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	14	15.73	75	84.27
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	3	50.00	3	50.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	18	31.58	39	68.42
αΧΜΛ	39	13	33.33	26	66.67
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 54. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 1 του γονιδίου *SRSF2*. Συντημήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Ανιχνεύθηκαν όλες οι κοινές μεταλλάξεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και αφορούν σε σημειακή, μη συνώνυμη, αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη στη θέση 95, της αμινοξικής αλληλουχίας (p.P95).

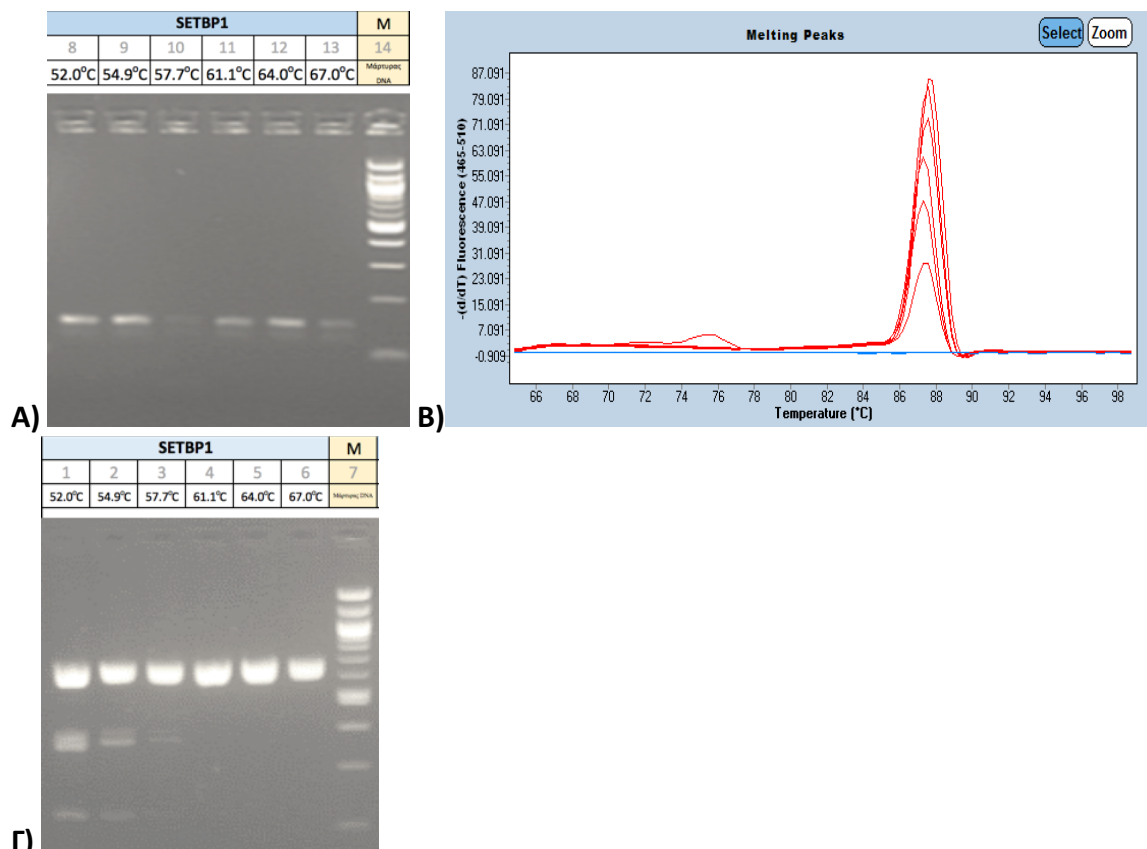
Επιπλέον, τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *SRSF2*, κυρίως σε ασθενείς με αΧΜΛ (34-40%), ΧΜΜΛ (29-53%) και ΧΟΛ (21-29%), σπανιότερα δε σε ασθενείς με ΜΙ (10-18%), ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (7-9%) και σποραδικά σε ΑΠ ή ΙΘ (Yoshida et al. 2011, Muramatsu et al. 2012, Meggendorfer et al. 2014, Langabeer et al 2015, Padron 2015, Clara et al. 2016, Mason et al. 2016, Saez et al. 2017, Zoi and Cross 2017, Meggendorfer et al. 2018).

5.2.8 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *SETBP1*

5.2.8.1 Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 4 του γονιδίου *SETBP1* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

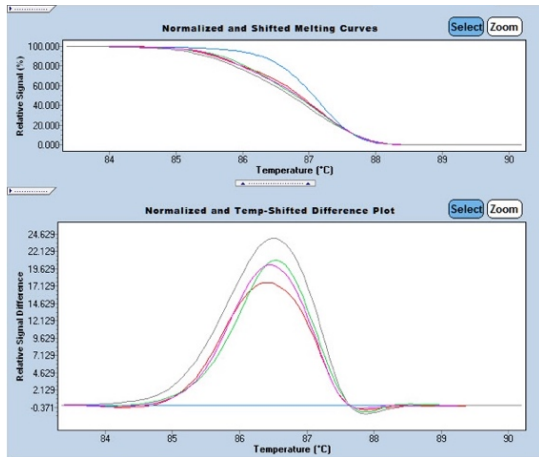
Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενη θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 79. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου SETBP1. A) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. B) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο SETBP1 έχει μήκος 154 bp. Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο SETBP1, έχει μήκος 665 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.8.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

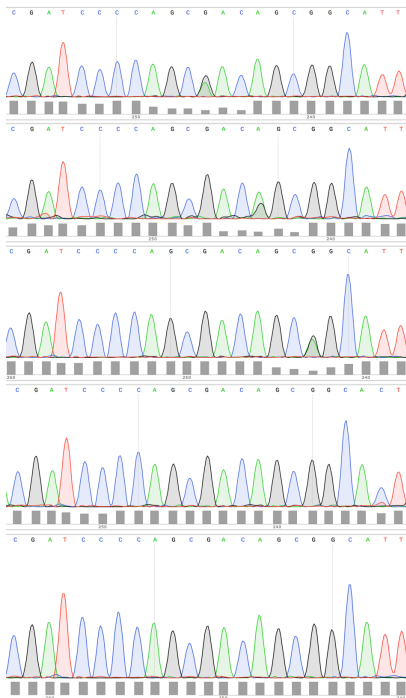
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων SETBP1, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 80. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 4 του γονιδίου *SETBP1* μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο απεικονίζεται η μετάλλαξη D868N (c.2602G>A), με πράσινο η S869G (c.2605A>G), με μωβ η G870S (c.2608G>A) και με γκρι η I871T (c.2612T>C).

5.2.8.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *SETBP1*, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 81. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *SETBP1*. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται οι

μεταλλάξεις *c.2602G>A*, *c.2605A>G*, *c.2608G>A* και *c.2612T>C*, όπως και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.8.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *SETBP1* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>SETBP1</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	0	0.00	89	100.00
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	3	50.00	3	50.00
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	7	12.28	50	87.72
αΧΜΛ	39	9	23.08	30	76.92
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 55. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 4 του γονιδίου *SETBP1*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές σημειακές αντικαταστάσεις, από ένα νουκλεοτιδιο σε κάθε περίπτωση, οι οποίες οδηγούν σε μη συνώνυμα κωδικόνια και κατά συνέπεια σε διαφοροποιημένο πρωτεϊνικό προϊόν. Αυτές είναι οι D868N, S869G, G870S και I871T.

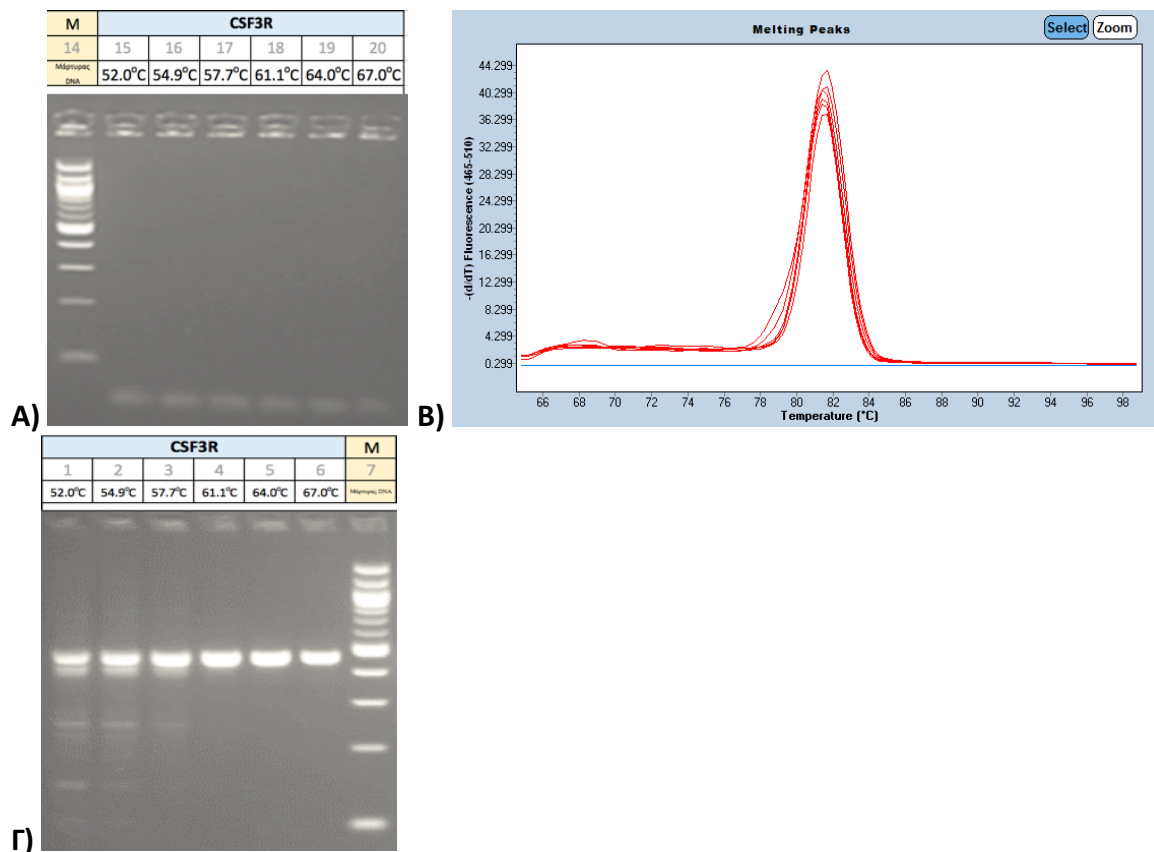
Επιπλέον, τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων στο γονίδιο *SETBP1*, κυρίως σε ασθενείς με αΧΜΛ (23-48%), αλλά και σε ασθενείς με ΧΜΜΛ (4-15%) ή ΧΟΛ (14-35%). Στην τελευταία κοορτή, συνήθως ανιχνεύονται ταυτόχρονα μεταλλάξεις στο γονίδιο *CSF3R*, οι οποίες συμβάλλουν σε κακή πρόγνωση (Li et al. 2014, Tefferi et al. 2016, Song et al. 2017, Piazza et al. 2013, Makishima et al. 2013, Cui et al. 2014, Tefferi et al. 2015, Langabeer et al 2015).

5.2.9 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 14 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *CSF3R*

5.2.9.1 Σχεδιασμός εκκινήτων και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 14 του γονιδίου *CSF3R* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

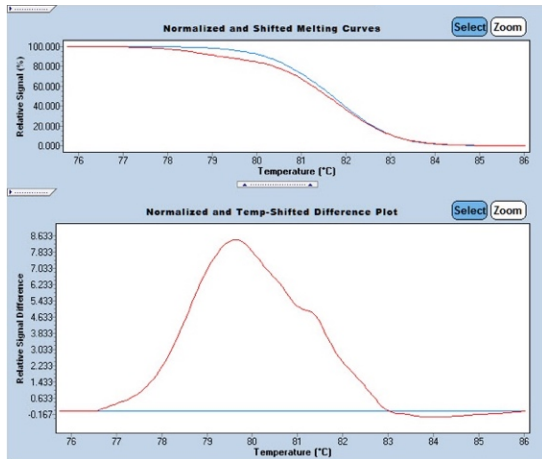
Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 82. Έλεγχος των συνθηκών πρόσδεσης των εκκινητών για ανάλυση του γονιδίου CSF3R. Α) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο CSF3R έχει μήκος 54 bp. Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο CSF3R, έχει μήκος 470 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.9.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

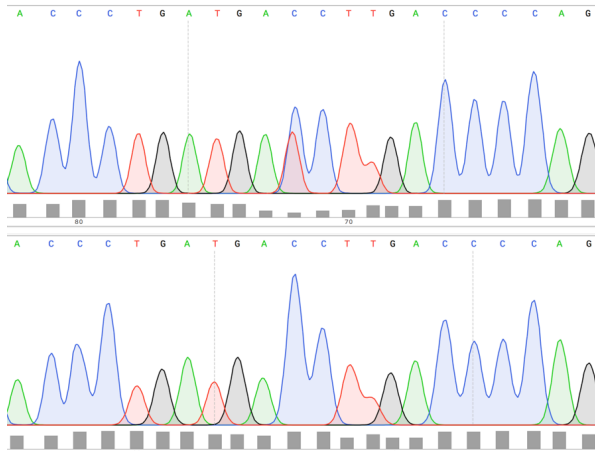
Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων CSF3R, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 83. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 14 του γονιδίου *CSF3R* μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο απεικονίζεται η μετάλλαξη T618I (c.1853C>T).

5.2.9.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CSF3R*, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 84. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *CSF3R*. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται η μετάλλαξη c.1853C>T και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.9.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών με ΧΟΛ, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *CSF3R* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

CSF3R	N	mt	mt %	wt	wt %
ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	0	0.00	89	100.00
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	5	83.33	1	16.67
ΣΜ	10	0	0.00	10	100.00
ΧΜΜΛ	57	0	0.00	57	100.00
αΧΜΛ	39	2	5.13	37	94.87
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 56. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών για μεταλλάξεις στο εξόνιο 14 του γονιδίου *CSF3R*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

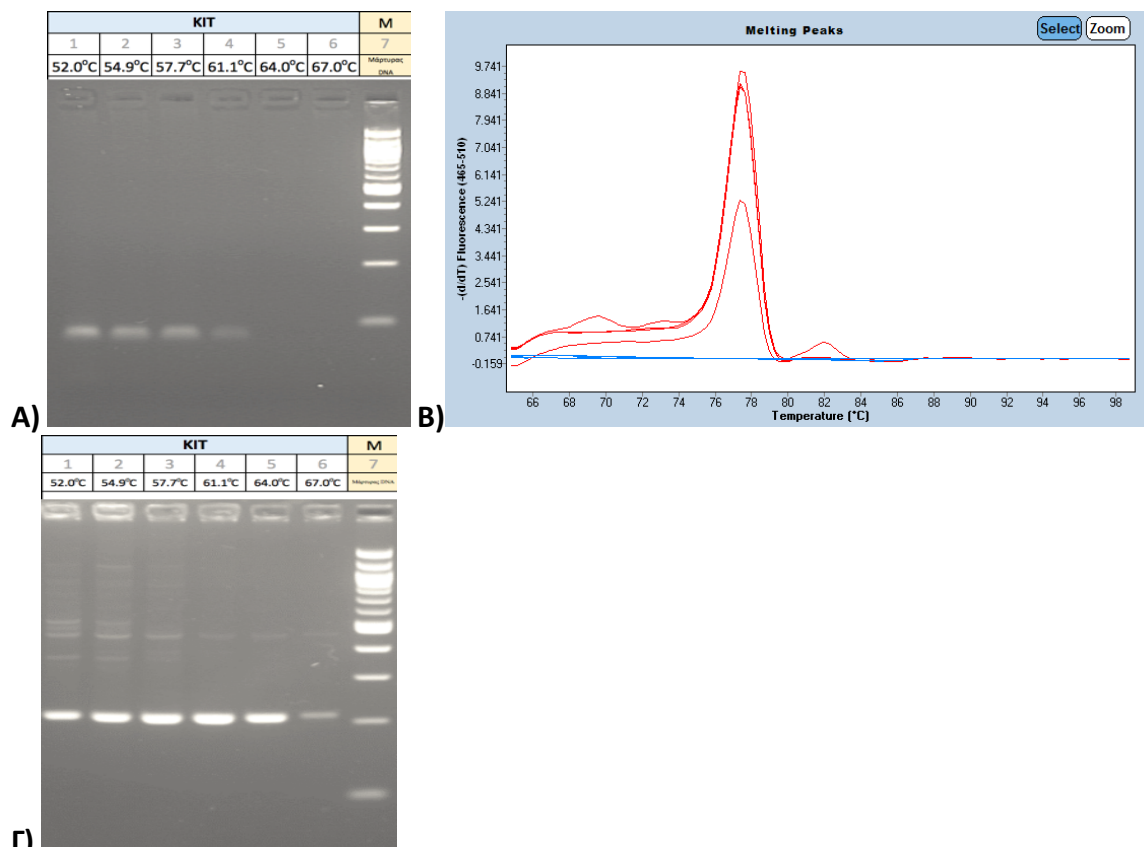
Μόνον η μετάλλαξη *CSF3RT618I* ανιχνεύθηκε στην αντίστοιχη γενωμική περιοχή που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα δεδομένα μας συμφωνούν με την πρόσφατη βιβλιογραφία, όπου γίνεται αναφορά στα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *CSF3R* σε ασθενείς με ΧΟΛ (80-90%), σπανιότερα δε σε αΧΜΛ (6%). Ωστόσο πλέον πιστεύεται πως στο σύνολό τους οι ασθενείς στους οποίους έχει ανιχνευθεί η μετάλλαξη *CSF3RT618I*, πρέπει να επαναταξινομηθούν ως ΧΟΛ, αφού θεωρείται πως αποτελεί αποκλειστικό γνώρισμα της συγκεκριμένης κακοήθειας (Maxson et al. 2013, Tefferi et al. 2014, Cui et al. 2014, Tefferi et al. 2015, Langabeer et al 2015, Maxson and Tyner 2017).

5.2.10 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 17 (GRCh37/hg19) του γονιδίου *KIT*

5.2.10.1 Σχεδιασμός εκκινητών και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Η ανάλυση του εξονίου 17 του γονιδίου *KIT* πραγματοποιήθηκε μέσω HRMA, ενώ τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν θετικά για οποιαδήποτε μετάλλαξη, επιβεβαιώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν, μέσω προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger.

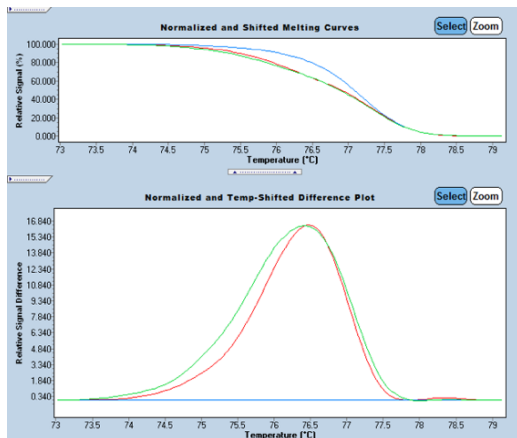
Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, επιβεβαιώθηκαν ως προς την ικανότητά τους να ενισχύουν ικανοποιητικά το υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας (gradient PCR).



Εικόνα 85. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 17 του γονιδίου KIT μέσω HRMA) Τα προϊόντα της gradient PCR, που αφορούν στους εκκινητές για τις αντιδράσεις HRMA, αναδεικνύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Β) Παράλληλα αναλύεται η καμπύλης τήξης των εκκινητών της HRMA, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης αυτών στο υπόστρωμα. Το σήμα της ζώνης ενίσχυσης κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία, αλλά και κατά την ανάλυση καμπύλης τήξης, θα πρέπει να είναι ισχυρό και χωρίς δευτερεύοντα προϊόντα. Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών που είναι ειδικό για HRMA και αφορούν στο γονίδιο KIT, έχει μήκος 90 bp. Γ) Το αντίστοιχο προϊόν των εκκινητών που είναι ειδικό για PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing και αφορούν στο γονίδιο KIT, έχει μήκος 214 bp, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ενίσχυσης, επίσης καθορίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή, έπειτα από gradient PCR.

5.2.10.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω HRMA

Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων KIT, όπως αυτές προκύπτουν έπειτα από μετασχηματισμό της εκάστοτε καμπύλης τήξης, μέσω κανονικοποίησης των δεδομένων, ως προς τις τιμές φθορισμού και θερμοκρασίας, σε διάγραμμα απεικόνισης των επιπέδων φθορισμού ανα το χρόνο.



Εικόνα 86. Ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 17 του γονιδίου *KIT* μέσω HRMA. Η μπλε γραμμή απεικονίζει ένα δείγμα φυσιολογικού γονότυπου. Με κόκκινο απεικονίζεται η μετάλλαξη D816V (c.2446G>T), ενώ με πράσινο χρώμα η μετάλλαξη D816Y (c.2447A>T)

5.2.10.3 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων μέσω Sanger sequencing

Στη συνέχεια παρατίθενται χρωματογραφήματα, ύστερα από κατά Sanger προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT*, καθώς και η αλληλουχία ενός δείγματος με φυσιολογικό γονότυπο ως αντιπαραβολή.



Εικόνα 87. Χρωματογραφήματα από κατά Sanger προσδιορισμό αλληλουχίας του γονιδίου *KIT*. Φυσιολογικό δείγμα, με κανονική νουκλεοτιδική αλληλουχία, αντιπαραβάλλεται ως προς τους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται η μετάλλαξη c.2447A>T, η c.2446G>T, καθώς και το δείγμα φυσιολογικού γονότυπου.

5.2.10.4 Καταγραφή και ανάλυση δεδομένων

Απο την ανάλυση των ασθενών με ΣΜ, της παρούσας μελέτης, σχετικά με την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *KIT* με HRMA και επιβεβαίωση με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα.

<i>KIT</i>	N	mt	mt %	wt	wt %
------------	---	----	------	----	------

ΑΠ	63	0	0.00	63	100.00
ΙΘ	98	0	0.00	98	100.00
ΜΙ	89	0	0.00	89	100.00
ΧΜΛ	29	0	0.00	29	100.00
ΧΟΛ	6	0	0.00	6	100.00
ΣΜ	10	8	80.00	2	20.00
ΧΜΜΛ	57	3	5.26	54	94.74
αΧΜΛ	39	2	5.13	37	94.87
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ	14	0	0.00	14	100.00

Πίνακας 57. Ανάλυση δειγμάτων ασθενών με ΣΜ για μεταλλάξεις στο εξόνιο 17 του γονιδίου *KIT*. Συντμήσεις: N=πλήθος δειγμάτων υπό ανάλυση, mt=πλήθος δειγμάτων με μετάλλαξη/εις, wt=πλήθος δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Ανιχνεύθηκαν, τόσο η συχνή μη-συνώνυμη σημειακή μετάλλαξη, που οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος στη θέση 816 (D816V), αλλά και μία πιο σπάνια μετάλλαξη στην ίδια γενωμική θέση (D816Y).

Τα δεδομένα μας συμφωνούν με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου γίνεται αναφορά στο υψηλό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *KIT* σε ασθενείς με ΣΜ (82-89%) και σπανιότερα σε πάσχοντες από αΧΜΛ και ΧΜΜΛ (5%). Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις *KIT* σχετίζονται με εκτροπή προς ΟΜΛ (Tefferi et al. 2009, Soucie et al. 2012, Jawhar et al. 2016, Jawhar et al. 2017, Muramatsu et al. 2012, Padron 2015).

5.3 Στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

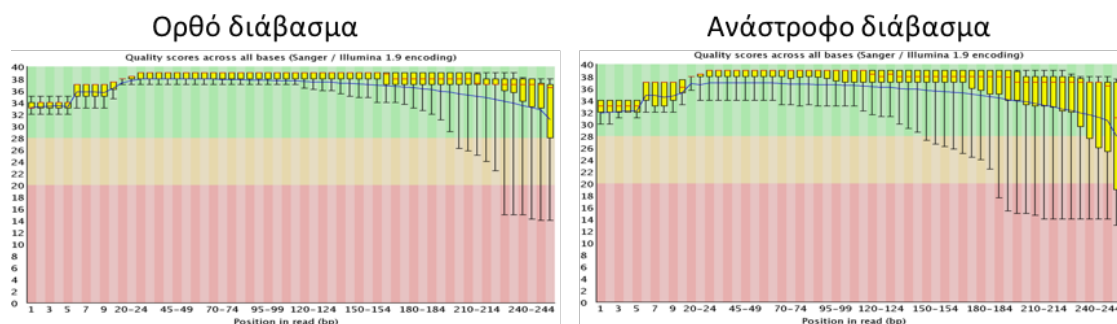
Στοχευμένος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς πραγματοποιήθηκε σε 25 ασθενείς. Σε αυτούς συμπεριλήφθηκαν 1 ασθενής με ΑΠ, 3 με ΙΘ, 4 με ΠΜΙ, 1 με ΧΜΜΛ, 2 με ΟΜΛ και 2 με οικογενή διαταραχή αιμοπεταλίων στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις, ύστερα από ανάλυση με τεχνικές διερεύνησης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών, όπως PCR τελικού σημείου, HRMA και προσδιορισμός πρωτοδιάταξης μέσω Sanger. Στους υπόλοιπους ασθενείς της μελέτης, είχαν ήδη αναγνωριστεί μεταλλάξεις εκ των προτέρων. Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα δοκιμής (test group) της ευαισθησίας και της ακρίβειας της μεθόδου. Αναμεσα τους συμπεριλήφθηκαν 1 ασθενής με ΑΠ, 1 με ΙΘ, 7 με ΜΙ, 1 με ΣΜ, 1 με ΧΟΛ και 1 με αΧΜΛ.

Στη συνέχεια θα περιγραφούν ενδεικτικά αποτελέσματα, από τη διαδικασία βιοπληροφορικής ανάλυσης δεδομένων, όπως αυτή περιγράφηκε ήδη στο Παράρτημα ΙΙ του Κεφαλαίου 4, με στόχο την ανάδειξη μεταλλάξεων, σε ένα από τα δείγματα με ΙΘ που διερευνήθηκαν. Στο συγκεκριμένο ασθενή είχε ήδη ανιχνευθεί η μετάλλαξη *JAK2V617F*. Η ανάλυση των δεδομένων NGS, ανέδειξε μία επιπρόσθετη μετάλλαξη, με προβλεπόμενη παθογόνο επίδραση (pathogenic functional prediction) στο φαινότυπο του ασθενούς, συγκεκριμένα στο γονίδιο *SF3B1*. Η ίδια αναλυτική πορεία ακολουθήθηκε ανεξαιρέτως και για τα υπόλοιπα δείγματα.

5.3.1 Προσδιορισμός της ποιότητας των διαβασμάτων (quality control, QC)

Τα αρχικά στάδια της ανάλυσης των δεδομένων NGS περιλαμβάνουν την προετοιμασία των διαβασμάτων για αντιπαραβολή με ένα πρότυπο γονιδίωμα.

Δεδομένα από διάφορες στατιστικές αναλύσεις λαμβάνονται υπόψιν κατά τον έλεγχο ποιότητας των δεδομένων, με απώτερο στόχο τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των διαβασμάτων. Παράλληλα, διατηρούνται ποσοτικά δεδομένα, που αφορούν στο πλήθος των διαβασμάτων βέλτιστης ποιότητας τα οποία είναι κατάλληλα για ανίχνευση μεταλλάξεων.



Εικόνα 88. Γραφική αναπαράσταση με ραβδογράμματα (boxplot analysis), όπου απεικονίζεται η μέση τιμή (mean value) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) της ποιότητας των νουκλεοτιδίων σε κάθε θέση, επί του συνόλου των ορθών και των ανάστροφων διαβασμάτων (paired-end sequencing), για ένα δείγμα, έπειτα από αποπολυπλεξία, αμέσως μετά τη λήψη των δεδομένων από τη συσκευή, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία.

Η τιμή της ποιότητας, μέσω της παρακάτω λογαριθμικής εξίσωσης, μεταφράζεται σε πιθανότητα με την οποία κάθε νουκλεοτίδιο ενδεχομένως έχει διαβαστεί λανθασμένα.

$$Q = -10 \log_{10} P, \text{ όπου } P \text{ είναι η πιθανότητα λανθασμένα διαβασμένων νουκλεοτιδίων}$$

Επι περαδείγματι, τιμή ποιότητας Q ίση με 20, ουσιαστικά σημαίνει, πως εάν ένα νουκλεοτίδιο σε μία συγκεκριμένη θέση, διαβάστηκε συνολικά εκατό φορές, τότε τις 99 διαβάστηκε σωστά, ενώ τη μία λάθος. Αυτό, εν δυνάμει, θα μπορούσε να εκληφθεί ως πραγματική νουκλεοτιδική αλλαγή στην αλληλουχία, ενώ δεν είναι τίποτα περισσότερο από ανακρίβεια της τεχνολογίας. Για το λόγο αυτό, μεγαλύτερες τιμές ποιότητας, κοντά στο 30, μεταφράζονται σε πιο αξιόπιστα διαβάσματα. Αυτή είναι μία ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος που λαμβάνεται υπόψιν κατά την ανάλυση δεδομένων NGS.

Βήμα 0	Ορθό διάβασμα	Ανάστροφο διάβασμα
Σύνολο διαβασμάτων	216771	216771
Χαμηλής ποιότητας διαβάσματα 0		0
Μήκος διαβασμάτων	251	251
%GC	49	50

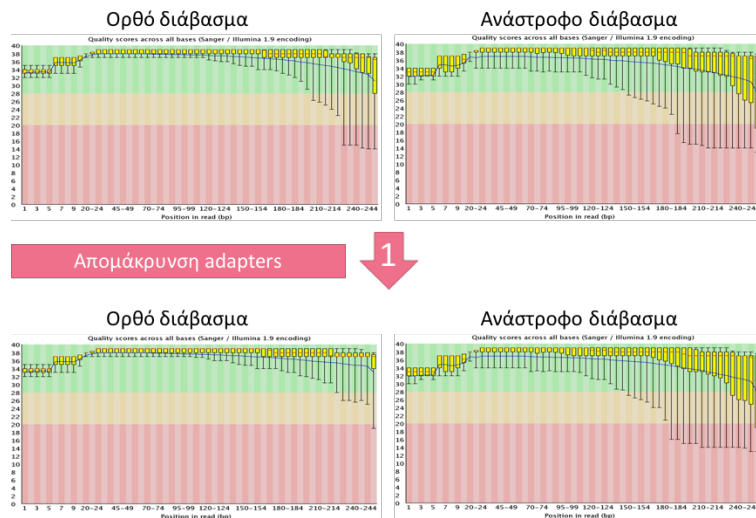
Πίνακας 58. Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων (paired-end sequencing), για ένα δείγμα, έπειτα από αποπολυπλεξία, αμέσως μετά τη λήψη των δεδομένων από τη συσκευή, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία.

5.3.2 Επεξεργασία των διαβασμάτων

5.3.2.1 Απομάκρυνση adapters (adapters clipping)

Ακολουθεί απομάκρυνση των adapters, όπου εμπεριέχεται η μεταβλητή αλληλουχία barcode για τη διάκριση των επιμέρους δειγμάτων, καθώς και επιπρόσθετες μη-μεταβλητές αλληλουχίες. Οι τελευταίες συμμετέχουν τόσο σε διάφορα στάδια PCR ενίσχυσης, κατά την προετοιμασία των βιβλιοθηκών δειγμάτων, όσο και στην πρόσδεση των νουκλεϊκών οξέων στο υπόστρωμα, κατά τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης αυτών.

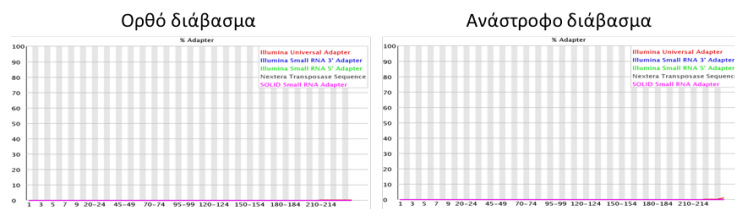
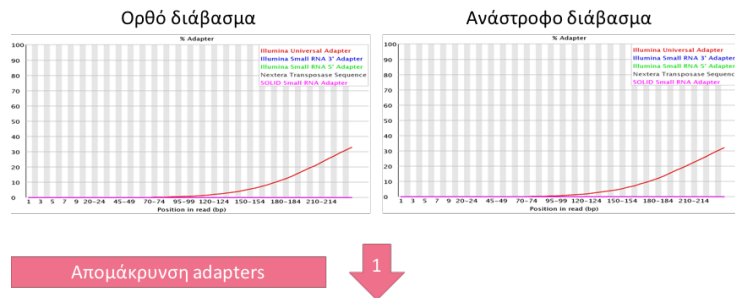
Επομένως, οι αλληλουχίες των adapters δεν είναι πλέον χρήσιμες, αφού έχουν ήδη εξυπηρετήσει το σκοπό τους και για το λόγο αυτό απορρίπτονται υπολογιστικά.



Εικόνα 89. Γραφική αναπαράσταση με ραβδογράμματα (boxplot analysis), όπου απεικονίζεται η μέση τιμή (mean value) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) της ποιότητας των νουκλεοτιδίων σε κάθε θέση, εκ του συνόλου των ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων ενός δείγματος, έπειτα από απομάκρυνση των αλληλουχιών που ανήκουν σε adapters-barcodes.

Η απομάκρυνση των αλληλουχιών adapters/barcodes συνεισφέρει ελάχιστα στη βελτίωση της ποιότητας των διαβασμάτων, κυρίως δε στα ορθά διαβάσματα και ιδιαίτερα στα άκρα αυτών, όπου συνήθως παρατηρούνται χαμηλότερης ποιότητας νουκλεοτιδία. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι εγγενές της υπάρχουσας τεχνολογίας.

Ανεξάρτητα πάντως από την περιορισμένη βελτίωση στην ποιότητα των διαβασμάτων, η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη αφού η ποσοστιαία αναλογία των adapters δεν είναι αμελητέα, όπως φαίνεται στο επόμενο γράφημα.



Εικόνα 90. Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της ποσοστιαίας αναλογίας των adapters, επί του συνόλου των νουκλεοτιδίων, στην εκάστοτε νουκλεοτιδική θέση των ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων ενός δείγματος, έπειτα από απομάκρυνση των αλληλουχιών που ανήκουν σε adapters-barcodes.

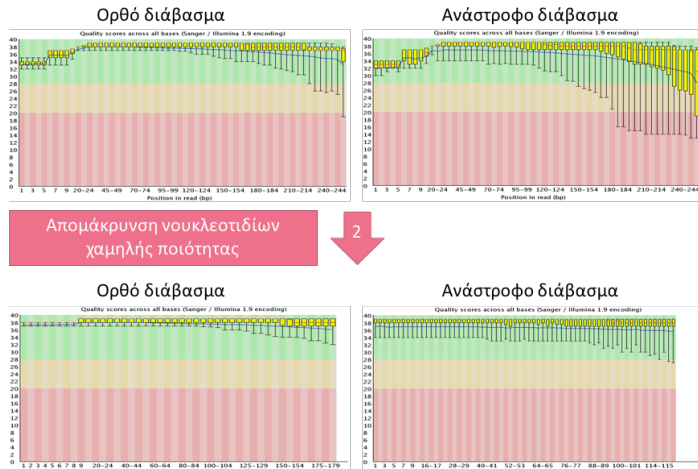
Επιπλέον, εφεξής, παρατηρείται δυσαναλογία στο πλήθος και στο ζευγάρωμα ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων, η οποία επιδιορθώνεται σε μεταγενέστερο στάδιο της υπολογιστικής προετοιμασίας των δειγμάτων για αντιπαραβολή με το πρότυπο γονιδίωμα

Βήμα 1	Ορθό διάβασμα	Ανάστροφο διάβασμα
Σύνολο διαβασμάτων	209468	216752
Χαμηλής ποιότητας διαβάσματα	0	0
Μήκος διαβασμάτων	1-251	3-251
%GC	49	50

Πίνακας 59. Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων, για ένα δείγμα, έπειτα από απομάκρυνση των αλληλουχιών που ανήκουν σε adapters-barcodes.

5.3.2.2 Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας (trimming of low quality nucleotides)

Στη συνέχεια απομακρύνονται τα χαμηλής ποιότητας νουκλεοτίδια από τα άκρα των διαβασμάτων. Η βελτίωση της ποιότητας, πλέον, είναι εμφανής, τόσο στα ορθά, όσο και στα ανάστροφα διβάσματα.



Εικόνα 91. Γραφική αναπαράσταση με ραβδογράμματα (boxplot analysis), όπου απεικονίζεται η μέση τιμή (mean value) και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) της ποιότητας των νουκλεοτιδίων σε κάθε θέση, εκ του συνόλου των ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων ενός δείγματος, έπειτα από απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας.

Σε αυτό το αναλυτικό βήμα, η εξομάλυνση της ποιότητας των δεδομένων, συγκριτικά με το προηγούμενο στάδιο επεξεργασίας αυτών, γίνεται ακόμη πιο έκδηλη, μέσω της διαγραμματικής απεικόνισης της αναλογίας των τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων σε κάθε θέση του συνόλου των διαβασμάτων, όπως φαίνεται στη συνέχεια.



Εικόνα 92. Η απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας εξομαλύνει επαρκώς την ανομοιογένεια που παρατηρείται μέσω ανάλυσης της αναλογίας των τεσσάρων διαφορετικών τύπων νουκλεοτιδίων, συγκριτικά με τα προηγούμενα αναλυτικά στάδια.

Παράλληλα, ελάχιστες μόνον χιλιάδες διαβασμάτων απορρίφθηκαν με τη διαδικασία αυτή, γεγονός που ενθαρύνει τη συγκεκριμένη πρακτική, της οποίας η χρησιμότητα παραμένει αμφιλεγόμενη, αφού συμβάλλει σε σμίκρυνση των αλληλουχιών.

Βήμα 2	Ορθό διάβασμα	Ανάστροφο διάβασμα
Σύνολο διαβασμάτων	205263	216750
Χαμηλής ποιότητας διαβάσματα 0		0
Μήκος διαβασμάτων	1-181	15-121
%GC	49	49

Πίνακας 60. Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων, για ένα δείγμα, έπειτα από απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας.

5.3.2.3 Προσαρμογή μήκους διαβασμάτων (read length adjustment)

Η προσαρμογή του μεγέθους των διαβασμάτων, διευκολύνει την ορθότερη αντιπαραβολή αυτών με το πρότυπο γονιδίωμα, στη συνέχεια. Το στάδιο αυτό, δεν επηρεάζει την ποιότητα των δεδομένων, η οποία συνεχίζει να διατηρείται στα ίδια υψηλά επίπεδα.

Βήμα 3	Ορθό διάβασμα	Ανάστροφο διάβασμα
Σύνολο διαβασμάτων	182554	215294
Χαμηλής ποιότητας διαβάσματα 0		0
Μήκος διαβασμάτων	70-181	70-121
%GC	49	49

Πίνακας 61. Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων, για ένα δείγμα, έπειτα από προσαρμογή του μήκους των διαβασμάτων.

5.3.2.4 Αντιπαραβολή ορθών (forward read) και αντίστροφων διαβασμάτων (reverse read)

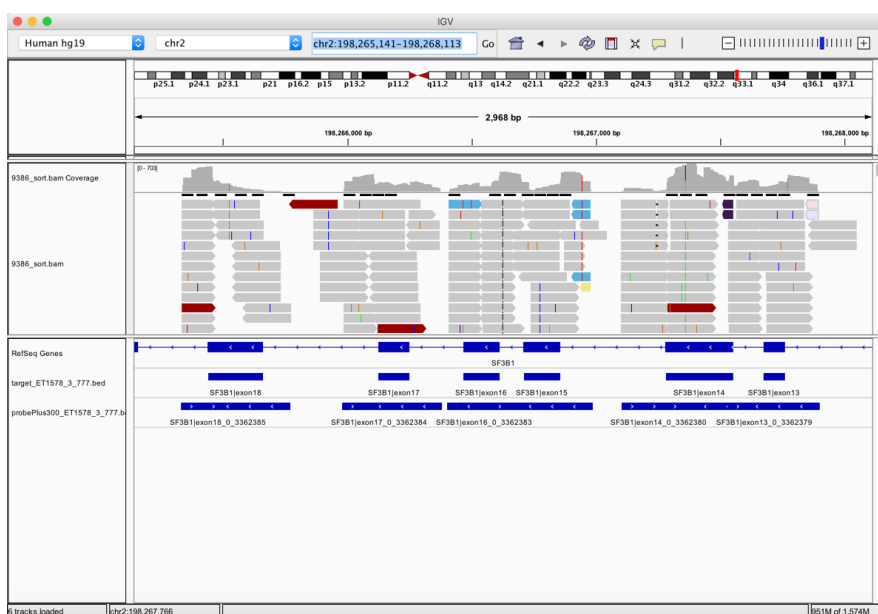
Η αντιπαραβολή ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων, οδηγεί σε αριθμητική ισορροπία μεταξύ των δύο, που κρίνεται απαραίτητη για την χαρτογράφηση στο πρότυπο γονιδίωμα, στη συνέχεια. Τα διαβάσματα που δεν βρίσκουν ταίρι αντίθετης κατεύθυνσης απορρίπτονται από τη συνέχεια της αναλυτικής διαδικασίας. Το στάδιο αυτό, επίσης δεν επηρεάζει την ποιότητα των δεδομένων.

Βήμα 4	Ορθό διάβασμα	Ανάστροφο διάβασμα	Αζευγάρωτα απορριφθέντα διαβάσματα
Σύνολο διαβασμάτων	182527	182527	32794
Χαμηλής ποιότητας διαβάσματα 0		0	0
Μήκος διαβασμάτων	70-181	77-121	70-181
%GC	49	49	50

Πίνακας 62. Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων ορθών και ανάστροφων διαβασμάτων, για ένα δείγμα, έπειτα από αντιπαραβολή ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων. Τα αζευγάρωτα διαβάσματα απορρίπτονται σε ξεχωριστό αρχείο και δε συμμετέχουν σε περαιτέρω αναλύσεις.

5.3.3 Αντιπαραβολή των επεξεργασμένων διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος (alignment to reference)

Τα εξισορροπημένα διαβάσματα χαρτογραφούνται επί ενός πρότυπου γονιδιώματος και πλέον μπορούν να οπτικοποιηθούν μέσω κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων, γνωστοί ως γενωμικοί χάρτες, όπως το IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute). Με τον τρόπο αυτό γίνεται αντιπαραβολή της κανονικής αλληλουχίας όλων των χρωμοσωμάτων, με τις υπο διερεύνηση νουκλεοτιδικές ακολουθίες (διαβάσματα). Στο σημείο αυτό, τα αρχεία είναι ανέτοιμα ακόμα για να αναδειχθούν με αξιοπιστία οι οποιεσδήποτε νουκλεοτιδικές εξαλλαγές. Θα πρέπει να προηγηθεί επισήμανση των τεχνητών διπλών διαβασμάτων, που είναι παράγωγα των επιμέρους σταδίων PCR ενίσχυσης, κατά την παρασκευή των βιβλιοθηκών δειγμάτων.



Εικόνα 93. Γενωμικός χάρτης (genetic map) όπου αντιπαραβάλλονται τα διαβάσματα ως προς το πρότυπο γονιδίωμα (reference genome). Στο κάτω μέρος της εικόνας, με μπλε χρώμα, φαίνεται το υπό διερεύνηση γονίδιο, εν προκειμένω το SF3B1, καθώς και οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση των υπο διερεύνηση περιοχών. Τα διαβάσματα, με γκρι χρώμα στο κέντρο του γραφήματος, περικλείονται από εκκινητές και καλύπτουν εξώνια, αλλά και εσώνια, αφού οι εκκινητές προσδένονται ευρύτερα, ώστε να επιτύχουν πλήρη κάλυψη του γονιδίου.

5.3.4 Προετοιμασία του αρχείου αντιπαραβεβλημένων διαβασμάτων (alignment file) για ανίχνευση μεταλλάξεων

5.3.4.1 Προσθήκη κεφαλίδας δείγματος (read group), ανάλυση βάθους διαβάσματος (coverage) και επισήμανση διπλών διαβασμάτων (flag duplicate reads)

Η προσθήκη κεφαλίδας (read group) είναι απαραίτητη για τη πρόοδο της αναλυτικής διαδικασίας, αφού εκεί περιλαμβάνονται στοιχεία που αφορούν στο δείγμα που αναλύεται, όπως και άλλα λιγότερο χρήσιμα δεδομένα.

Ο προσδιορισμός του βάθους διαβάσματος (read depth ή coverage) μεταφράζεται ως ανάλυση των επιπέδων αξιοπιστίας με την οποία αναδεικνύεται μία μετάλλαξη, αφού αναφέρεται στο πλήθος των διαβασμάτων που διέρχονται από την εκάστοτε γενωμική θέση. Όσο περισσότερες φορές έχει διαβαστεί μία χρωμοσωμική συντεταγμένη, τόσο πιο αξιόπιστη είναι μία ενδεχόμενη νουκλεοτιδική εξαλλαγή που εμφανίζεται στη συγκεκριμένη γενωμική θέση.

Τέλος, τα διπλά διαβάσματα (PCR duplicates) είναι απόρροια της υπάρχουσας τεχνολογίας κατασκευής βιβλιοθηκών νουκλεϊκών οξέων και προσδιορισμού νουκλεοτιδικής ακολουθίας, αφού και οι δύο διαδικασίες περιλαμβάνουν επιμέρους στάδια PCR ενίσχυσης. Στην εικόνα που ακολουθεί, τα διπλά διαβάσματα διακρίνονται ως αλληλουχίες με πανομοιότυπα άκρα, οι οποίες μάλιστα αποτελούν ένα διόλου ευκαταφρόνητο ποσοστό του συνόλου των διαβασμάτων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Τα διπλά διαβάσματα επισημαίνονται υπολογιστικά, ώστε κατά την ανάδειξη των μεταλλάξεων δεν συμμετέχουν παραπάνω από μία φορά στην αναλυτική διαδικασία, αφού κάτι τέτοιο θα αποτελούσε ανακρίβεια (θόρυβος):

- Εάν όλα τα διπλά διαβάσματα σε μία συγκεκριμένη γενωμική περιοχή λαμβάνονταν υπόψιν και αν υποθέσουμε ότι πράγματι υπήρχε μία νουκλεοτιδική αλλαγή σε κάποιο σημείο της αλληλουχίας τους, τότε το ποσοστό αυτής θα ήταν υπερεκτιμημένο.
- Εάν πάλι η αλλαγή αυτή δεν υπάρχει στην πραγματικότητα, αλλά αποτελεί λανθασμένα διαβασμένο νουκλεοτίδιο κατά τον προσδιορισμό αλληλουχίας ή λανθασμένα τοποθετημένο νουκλεοτίδιο κατά τα επιμέρους στάδια PCR ενίσχυσης, τότε μπορεί να αναδειχθεί κακώς ως μετάλλαξη και μάλιστα με ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό ανίχνευσης.

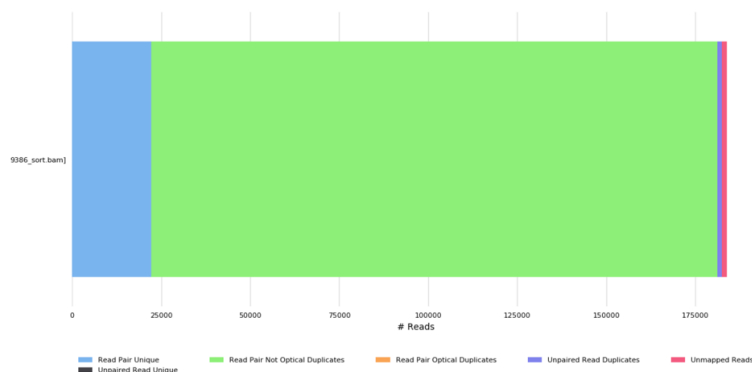


Εικόνα 94. Γενωμικός χάρτης όπου αντιπαραβάλλονται τα διαβάσματα ενός ή περισσότερων δειγμάτων, ως προς το πρότυπο γονιδίωμα. Στη συγκεκριμένη εικόνα, πραγματοποιείται συγκριτική ανάλυση των διαβασμάτων ενός δείγματος, τα οποία εμφανίζονται ως στοιβές με γκρι κυρίως χρώμα, τόσο πριν, όσο και μετά την επισήμανση των διπλών διαβασμάτων. Οι κάτω συστάδες (piles) αφορούν σε διαβάσματα που έχουν απομείνει μετά από τη συγκεκριμένη διαδικασία. Τα διπλά διαβάσματα δεν λαμβάνονται υπόψιν για περαιτέρω αναλύσεις. Η ανάλυση βάθους διαβάσματος εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα διαβαθμισμένης έντασης

(*heatmap*), στην κορυφή των διαβασμάτων. Περιοχές με πιο έντονο χρώμα μεταφράζονται σε περισσότερα διαβάσματα και παρέχουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Αριστερά ακριβώς από την ανάλυση βάθους διαβάματος με γκρί φόντο εμφανίζεται ο κωδικός του δείγματος που προσθέσαμε ως κεφαλίδα του αρχείου διαβασμάτων

5.3.4.2 Ανάλυση ποσοστού διπλών διαβασμάτων (duplication percentage)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ενώ παράλληλα φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, το ποσοστό των διπλά διαβασμένων νουκλεοτιδίων αποτελεί την πλειονότητα των διαβασμάτων. Κυμαίνεται δε συνήθως από 50-80%, ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της βιβλιοθήκης νουκλεϊκών οξέων, το χειριστή και άλλους παράγοντες.

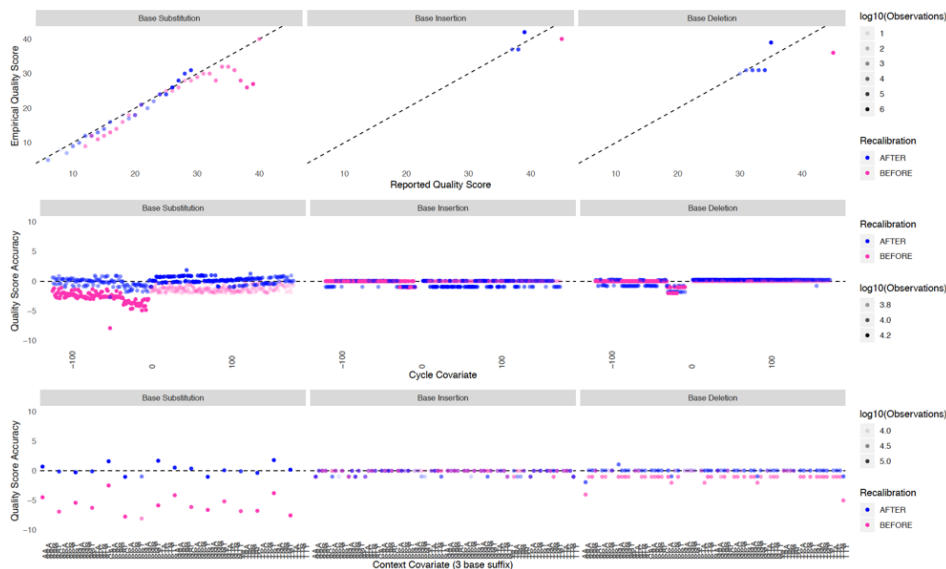


Picard Deduplication Stats

Εικόνα 95. Τα διπλά διαβάσματα, με πράσινο χρώμα, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό διαβασμάτων. Με μπλε χρώμα εμφανίζονται τα μονά διαβάσματα, τα οποία είναι χρήσιμα για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτά προσεγγίζουν το 20% επί του συνόλου των διαβασμάτων.

5.3.4.3 Αναβαθμονόμηση των δεδομένων ποιότητας των νουκλεοτιδίων (Base Quality Score Recalibration, BQSR)

Η αναβαθμονόμηση της ποιότητας των διαβασμάτων, είναι μία προαιρετική διεργασία, που υποβοηθά την εξομάλυνση των δεδομένων, τα οποία χαρτογραφούνται σε διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος. Κατά την ανάλυση αυτή λαμβάνεται υπόψιν ο κυμαινόμενος βαθμός δυσκολίας με τον οποίο η υπάρχουσα τεχνολογία χαρτογραφεί χρωμοσωμικές περιοχές με διαφορετικά τεχνικά χαρακτηριστικά, όπως το ποσοστό νουκλεοτιδίων γουανίνης και κυτοσίνης (GC content), οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και άλλες δομές.



Εικόνα 96. Κανονικοποίηση των δεδομένων ποιότητας των νουκλεοτιδίων, με βάση τη δυσκολία που παρουσιάζουν οι επιμέρους περιοχές του γονιδιώματος ως προς τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους.

5.3.5 Ανάδειξη μεταλλάξεων

Ελέγξαμε δύο διαφορετικούς αλγόριθμους για την ανάδειξη μεταλλάξεων, τόσο σε δείγματα με εκ των προτέρων γνωστές μεταλλάξεις, όσο και σε δείγματα χωρίς μεταλλάξεις στις γονιδιακές περιοχές που ελέγχθηκαν.

Καταλήξαμε πως ο αλγόριθμος HaplotyperCaller (GATK) υπερέχει έναντι του συνδυασμού αλγορίθμων samtools/bcftools, αφού παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης σημειακών αντικαταστάσεων, αλλά και μεταλλάξεων προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων, τεχνικό χαρακτηριστικό που διαφεύγει από τον συνδυαστικό αλγόριθμο. Για το λόγο αυτό, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον αλγόριθμο που προκρίθηκε. Τα αρχεία μεταλλάξεων έχουν τη μορφή που παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί.

```

1 ##fileformat=VCFv4.2
2 #CHROM POS ID REF ALT QUAL FILTER INFO FORMAT 9386
3 chr2 25536827 rs41284843 G A 128.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-1.202;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=25;ExcessHet=3.0103;FS=3.851;M
4 chr2 198265526 rs788018 A G 402.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=14;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=28.77;S
5 chr2 198267359 . C A 585.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.093;ClippingRankSum=0.000;DP=64;ExcessHet=3.0103;FS=2.351;MLEAC=1;MLEAF
6 chr4 106196829 rs34402524 T G 113.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-0.014;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=17;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;M
7 chr4 106196951 rs2454206 A G 475.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.000;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=72;ExcessHet=3.0103;FS=3.565;ML
8 chr7 101916647 rs813000 A G 1382.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=48;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=29.42;S
9 chr7 101917521 rs803064 G A 508.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=3.461;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=43;ExcessHet=3.0103;FS=12.377;M
10 chrX 39932808 rs144606152 G A 819.77 . AC=2;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=1.041;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=61;ExcessHet=3.0103;FS=1.056;ML
11 chrX 39933339 rs5917933 A G 1166.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=46;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=27.78;S
12 chr9 5073770 rs77375493 G T 298.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-3.726;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=26;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC
13 chr12 11884608 rs3184504 T C 308.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=0.042;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=21;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;ML
14 chr17 7578645 rs2909430 C T 4522.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;BaseQRankSum=-0.615;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=166;ExcessHet=3.0103;FS=6.849;MLEAC
15 chr17 7578711 . CTTTTT CTT,C 2843.73 . AC=1,1;AF=0.500,0.500;AN=2;BaseQRankSum=-1.736;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=118;ExcessHet=3.0103;FS=0.000
16 chr17 7579472 rs1042522 G C 1336.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=48;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=27.85;SOR=1
17 chr17 7579801 rs1642785 G C 630.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=25;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=25.23;SOR=4
18 chr17 74732507 rs237058 A G 344.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=2.073;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=34;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;ML
19 chr17 74733099 rs237057 G A 309.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-1.189;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=39;ExcessHet=3.0103;FS=1.258;M
20 chr20 31022959 rs6058694 T C 1730.77 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=72;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=25.45;S
21 chr20 31024274 rs4911231 T C 186.80 . AC=2;AF=1.00;AN=2;DB;DP=7;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=2;MLEAF=1.00;MQ=60.00;NDA=1;QD=26.69;SC
22 chr21 44514788 . G C 83.77 . AC=1;AF=0.500;AN=2;BaseQRankSum=-3.588;ClippingRankSum=0.000;DB;DP=14;ExcessHet=3.0103;FS=0.000;MLEAC=1;MLEAF

```

Εικόνα 97. Τμήμα ενός αρχείου μεταλλάξεων (vcf file). Από αριστερά προς τα δεξιά καταγράφονται το χρωμόσωμα, η θέση σε αυτό όπου ανιχνεύτηκε μία νουκλεοτιδική εξαλλαγή, ο αριθμός καταχώρησης αυτής στη βάση δεδομένων πολυμορφισμών dbSNP, εφόσον είναι καταχωρημένη, το κανονικό νουκλεοτίδιο, η μετάλλαξη, η ποιότητα με την οποία καλέστηκε η μετάλλαξη και στη συνέχεια διάφορα ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα.

5.3.6 Ενημέρωση των αρχείων μεταλλάξεων με βιολογικά και κλινικά δεδομένα

Η αρχική ενημέρωση των αρχείων μεταλλάξεων περιλαμβάνει το χαρακτηρισμό των νουκλεοτιδικών εξαλλαγών, με βάση τη λειτουργική περιοχή όπου αυτές εντοπίζονται στο εκάστοτε υπό διερεύνηση γονίδιο, καθώς και την υφιστάμενη αμινοξική υποκατάσταση, εφόσον αυτό συμβαίνει. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος snpEff/snpSift.

Συνώνυμες μεταλλάξεις που καταλήγουν στη σύνθεση αμινοξέος όμοιου με το φυσιολογικό, εξαιτίας εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, καθώς και μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου, όπως οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions, UTRs) και τα εσόνια (introns), αποκλείστηκαν από περαιτέρω αναλύσεις.

Στη συνέχεια δοκιμάσαμε δύο ανεξάρτητους αλγόριθμους, για τη διασύνδεση των δεδομένων βιολογικής και κλινικής σημασίας.

Προτιμήσαμε την εκδοχή 3.5 του αλγόριθμου dbNSFP, αφού είναι πιο σύγχρονος και ολοκληρωμένος συγκριτικά με τον αλγόριθμο oncotator. Με τον τρόπο αυτό τα αρχεία μεταλλάξεων ενημερώθηκαν περαιτέρω με στοιχεία από διάφορες βάσεις δεδομένων, καθώς και με προβλεπτικές αναλύσεις, σχετικά με την πιθανή επίδραση των νουκλεοτιδικών εξαλλαγών στο φαινότυπο του ασθενούς.

Πακέτα διασύνδεσης δεδομένων	Βάσεις Δεδομένων					Προβλεπτικοί αλγόριθμοι			
	Βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλλαγών	Βάσεις δεδομένων κλινικής σημασίας	Βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών	Βάσεις φαρμακολογικών δεδομένων	Βάσεις πληθυσμιακών δεδομένων	Πρόβλεψη που στηρίζεται κυρίως σε βιολογικούς κανόνες (Biological principles)	Πρόβλεψη που στηρίζεται κυρίως σε βάσεις δεδομένων (Machine learning based on training sets)	Πρόβλεψη που στηρίζεται κυρίως σε δεδομένα φυλογένεσης-συντήρησης (Evolutionary approach)	Συνδυαστικοί αλγόριθμοι
SnpEff/SnpSift	dbSNP	ClinVar	UniProt	Drugbank	1000G	FATHMM (un-weighted)	FATHMM (weighted)	GERP++	Eigen
Oncotator		COSMIC	InterPro	ParmGKB	ExAC	SIFT	Polyphen2 (HDIV/HVAR)	PhastCons	REVEL
dbNSFP				OncokB	gnomAD	Mutation Assessor	Mutation Taster	PhyloP	CADD/DANN
					GWAS	PROVEAN	VEST3	Siphy	M-CAP (Ensembl)
									MetaLR/MetaSVM (Ensembl)

Πίνακας 63. Οι αλγόριθμοι διασύνδεσης στοιχείων, εμπλουτίζουν με βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ύστερα από βιοπληροφορική ανάλυση των NGS δεδομένων. Παράλληλα, μέσω προβλεπτικών αλγόριθμων χαρακτηρίζουν το βαθμό με τον οποίο μία μετάλλαξη ενδεχομένως επιδρά στο φαινότυπο μίας παθολογικής κατάστασης.

POS	TYPE	SAO	CAF	SAC	DP	VAF	QD	BaseQRankSum	MQ	ReadPosRankSum
chr12 g.111884608T>C	snp	0	[0.2181,0.7819]	46,38,74,63	221	61.99	14.7	0.042	60	0.869
chr17 g.7579472G>C	snp	1	[0.3981,0.6019]	0,0,119,129	248	100.00	27.9	?	60	?
chr2 g.198267359C>A	snp	?	?	75,63,54,49	241	42.74	9.6	0.093	60	-0.331
chr4 g.106196829T>G	snp	0	[0.9077,0.09229]	69,55,66,45	235	47.23	7.58	-1.014	60	2.707
chr4 g.106196951A>G	snp	0	[0.7585,0.2415]	77,85,39,43	244	33.61	7	0.904	60	0.829
chr9 g.5073770G>T	snp	3	[1,,0]	74,86,77,89	326	50.92	11.5	-3.726	60	-0.077

Πίνακας 64. Ανάλυση των τεχνικών χαρακτηριστικών της αντίδρασης προσδιορισμού νουκλεοτιδικής ακολουθίας, όσον αφορά στις ανιχνευθείσες μεταλλάξεις. Από αριστερά προς τα δεξιά καταγράφονται βασικά διακριτά χαρακτηριστικά, όπως το χρωμόσωμα (#CHROM), η χρωμοσωμική συντεταγμένη (POS), το κανονικό αλλήλιο (REF), το μεταλλαγμένο αλλήλιο (ALT). Ακολουθούν ο βιολογικός υπότυπος της νουκλεοτιδικής εξαλλαγής (πολυμορφισμός, SNP ή διαγραφή/προσθήκη νουκλεοτιδίων, indel κτλ.) (TYPE), ο εντοπισμός αυτής σε γαμετικά ή σε σωματικά κύτταρα (0=αδιεκρίνηση προέλευση, 1=κληρονομούμενη μετάλλαξη, 2=επίκτητη μετάλλαξη, 3=κληρονομούμενη ή/και επίκτητη μετάλλαξη) (SAO), η συχνότητα εμφάνισης στον

πληθυσμό σύμφωνα με τη βάση δεδομένων 1000 Genome Project (CAF), τα επιμέρους βάθη διαβάσματος των φυσιολογικών και παθολογικών αλληλόμορφων ορθής και ανάστροφης κατεύθυνσης (φυσιολογικό ορθό, φυσιολογικό ανάστροφο, μεταλλαγμένο ορθό, μεταλλαγμένο ανάστροφο) (SAC), το συνολικό βάθος διαβάσματος της χρωμοσωμική συντεταγμένης (DP), το ποσοστό ανίχνευσης της μετάλλαξης που προκύπτει ως πηλίκο του αθροίσματος των διαβασμάτων με τη μετάλλαξη, ως προς το συνολικό πλήθος διαβασμάτων για την εκάστοτε γενωμική θέση (VAF), η αξιοπιστία με την οποία αναδείχθηκε μία μετάλλαξη (QD), δεδομένα στατιστικής ανάλυσης (*Z-score from Wilcoxon rank sum test*) που αφορούν σε προκατειλημμένη ανάδειξη ενός εκ των δύο αλληλομόρφων (*nucleotide bias*) (*BaseQRankSum*), η αξιοπιστία με την οποία χαρτογραφήθηκαν τα διαβάσματα με ή χωρίς μετάλλαξη στο πρότυπο γονιδίωμα (MQ), δεδομένα στατιστικής ανάλυσης (*Phred scaled p-value using Fischer's exact test*) που αφορούν σε προκατειλημμένη ανάδειξη μόνο ορθών ή ανάστροφων διαβασμάτων (*read bias*), για ένα εκ των δύο αλληλομόρφων (*ReadPosRankSum*).

POS	Refseq_id	Transcript_id_VEST3	ANN	refcodon	codonpos
chr12 g.111884608T>C	NM_005475; NM_001291424	NM_005475.2;ENST00000538307; ENST00000341259;ENST00000551001	C missense_variant MODERATE SH2B3 ENSG00000111252 transcript ENST00000341259 protein_coding 3/8 c.784T>C p.Trp262Arg 1141/5406 784/1728 262/575	TGG	1
chr17 g.7579472G>C	NM_000546	CCDS45605.1;ENST00000413465;NM_001126112.2; NM_001276696.1;ENST00000359597; NM_001276760.1;ENST00000455263; NM_001126113.2;ENST00000269305; CCDS11118.1;NM_001276695.1;ENST00000508793; NM_000546.5;ENST00000503591;NM_001126114.2; ENST00000445888;NM_001126118.1; ENST00000420246;NM_001276761.1	C missense_variant MODERATE TP53 ENSG00000141510 transcript ENST00000269305 protein_coding 4/11 c.215C>G p.Pro72Arg 405/2579 215/1182 72/393	CCC	2
chr2 g.198267359C>A	NM_001005526	NM_012433.2;ENST00000335508	A missense_variant MODERATE SF3B1 ENSG00000115524 transcript ENST00000335508 protein_coding 14/25 c.1998G>T p.Lys666Asn 2090/6526 1998/3915 666/1304 A upstream_gene_variant MODIFIER SNORA4 ENSG00000202434 transcript ENST00000365564 snoRNA n.-2083C>A 2083	AAG	3
chr4 g.106196829T>G	NM_001127208; NM_017628	ENST00000540549;ENST00000513237; ENST00000380013;NM_001127208.2	G missense_variant MODERATE TET2 ENSG00000168769 transcript ENST00000513237 protein_coding 11/11 c.5225T>G p.Leu1742Trp 6022/10166 5225/6072 1742/2023	TTG	2
chr4 g.106196951A>G	NM_001127208; NM_017628	ENST00000540549;ENST00000513237; ENST00000380013;NM_001127208.2	G missense_variant MODERATE TET2 ENSG00000168769 transcript ENST00000513237 protein_coding 11/11 c.5347A>G p.Ile1783Val 6144/10166 5347/6072 1783/2023	ATA	1
chr9 g.5073770G>T	NM_001322194	ENST00000381652;ENST00000544510; NM_004972.3;ENST00000539801	T missense_variant MODERATE JAK2 ENSG00000096968 transcript ENST00000381652 protein_coding 14/25 c.1849G>T p.Val617Phe 2343/5285 1849/3399 617/1132 T downstream_gene_variant MODIFIER AL161450.1 ENSG00000268155 transcript ENST00000601793 protein_coding c.*3393C>A 3393 WARNING_TRANSCRIPT_NO_START_CODON	GTC	1

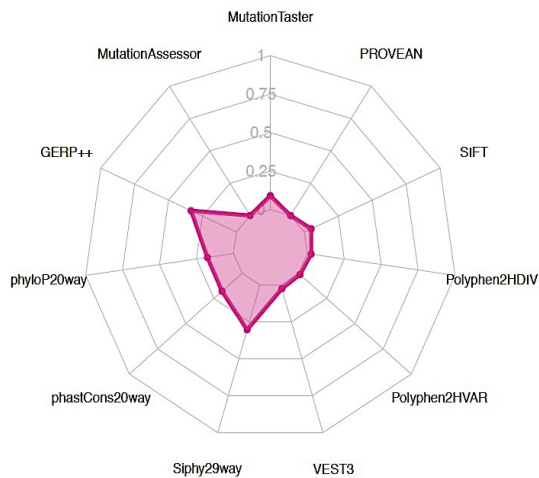
Πίνακας 65. Ανάλυση των δεδομένων NGS σε επίπεδο RNA. Από αριστερά προς τα δεξιά καταγράφονται τα βασικά διακριτά χαρακτηριστικά. Ακολουθούν ο αριθμός καταχώρησης του μεταλλαγμένου μεταγράφου στις βάσεις NCBI (*Refseq_id*) και Ensembl (*Transcript_id_VEST3*), μαζί με δεδομένα σχετικά με τις τροποποιήσεις που επιφέρουν οι μεταλλάξεις τόσο στα κανονικά, όσο και στα πιθανά δευτερεύοντα λιγότερο κοινά μετάγραφα, που προκύπτουν ως προϊόντα εναλλακτική ωρίμανση των mRNAs (*ANN*), ενώ τέλος καταχωρείται το κανονικό κωδικόνιο με την αλλαγή (*refcodon*) και επισημαίνεται η θέση του νουκλεοτιδίου που παρουσιάζεται μεταλλαγμένο, επί του κωδικονίου (*codonpos*).

POS	Uniprot_id	Uniprot_acc	Ensembl_proteinid	aapos	aaref	aaalt	Interpro_domain	Tissue_specificity(Uniprot)
chr12 g.111884608T>C	SH2B3_HUMAN	Q9UQQ2	ENSP00000345492;ENSP0000440597	262;60	W	R	PH domain-like;PH domain-like Pleckstrin homology domain	TISSUE SPECIFICITY: Preferentially expressed by lymphoid cell lines.;
chr17 g.7579472G>C	P53_HUMAN	P04637	ENSP00000410739;ENSP0000352610;ENSP00000478219;ENSP00000269305;ENSP00000481638;ENSP00000482258;ENSP00000398846;ENSP00000391127;ENSP00000482222;ENSP00000480868;ENSP00000391478;ENSP00000482537;ENSP00000482903;ENSP00000424104;ENSP00000473895;ENSP00000426252	72;72;33;72;33;72;72;72;33;33;72;33;72;72;72	P	R	.	TISSUE SPECIFICITY: Ubiquitous. Isoforms are expressed in a wide range of normal tissues but in a tissue-dependent manner. Isoform 2 is expressed in most normal tissues but is not detected in brain, lung, prostate, muscle, fetal brain, spinal cord and fetal liver. Isoform 3 is expressed in most normal tissues but is not detected in lung, spleen, testis, fetal brain, spinal cord and fetal liver. Isoform 7 is expressed in most normal tissues but is not detected in prostate, uterus, skeletal muscle and breast. Isoform 8 is detected only in colon, bone marrow, testis, fetal brain and intestine. Isoform 9 is expressed in most normal tissues but is not detected in brain, heart, lung, fetal liver, salivary gland, breast or intestine. (ECO:0000269 PubMed:1631611);
chr2 g.198267359C>A	SF3B1_HUMAN	O75533	ENSP00000335321	666	K	N	Armadillo-like helical Armadillo-type fold	.
chr4 g.106196829T>G	TET2_HUMAN	Q6N021	ENSP00000425443;ENSP0000442788;ENSP00000369351	1742;1721;1721	L	W	20GFeDO, oxygenase domain WD40/YVTN repeat-like-containing domain	TISSUE SPECIFICITY: Broadly expressed. Highly expressed in hematopoietic cells; highest expression observed in granulocytes. Expression is reduced in granulocytes from peripheral blood of patients affected by myelodysplastic syndromes. (ECO:0000269 PubMed:12646957, ECO:0000269 PubMed:19483684);
chr4 g.106196951A>G	TET2_HUMAN	Q6N021	ENSP00000425443;ENSP0000442788;ENSP00000369351	1783;1762;1762	I	V	20GFeDO, oxygenase domain WD40/YVTN repeat-like-containing domain	TISSUE SPECIFICITY: Broadly expressed. Highly expressed in hematopoietic cells; highest expression observed in granulocytes. Expression is reduced in granulocytes from peripheral blood of patients affected by myelodysplastic syndromes. (ECO:0000269 PubMed:12646957, ECO:0000269 PubMed:19483684);
chr9 g.5073770G>T	JAK2_HUMAN	O60674	ENSP00000371067	617	V	F	Janus kinase 2, pseudokinase domain Protein kinase domain Protein kinase-like domain Serine-threonine/tyrosine-protein kinase, catalytic domain Tyrosine-protein kinase, catalytic domain	TISSUE SPECIFICITY: Ubiquitously expressed throughout most tissues. (ECO:0000269 PubMed:16424865);

Πίνακας 66. Ανάλυση των δεδομένων NGS σε επίπεδο πρωτεΐνης. Από αριστερά προς τα δεξιά καταγράφονται τα βασικά διακριτά χαρακτηριστικά. Ακολουθούν η ονομασία (Uniprot_id) και ο αριθμός καταχώρησης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στις βάσεις Uniprot (Uniprot_acc) και Ensembl (Ensembl_proteinid), η θέση της αλλαγής στην αμινοξική ακολουθία, η οποία αποτελεί προϊόν από κανονικά ή δευτερεύοντα μετάγραφα (aapos), το φυσιολογικό κανονικό αμινοξύ (aaref) και το αμινοξύ που το αντικατέστησε (aaalt), οι επιμέρους δομές της πρωτεΐνης με λειτουργική σημασία, όπως είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων Interpro (Interpro_domain), καθώς και ο ιστικός εντοπισμός της πρωτεΐνης υπό φυσιολογικές συνθήκες, σύμφωνα με τη βάση Uniprot (Tissue_specificity(Uniprot)).

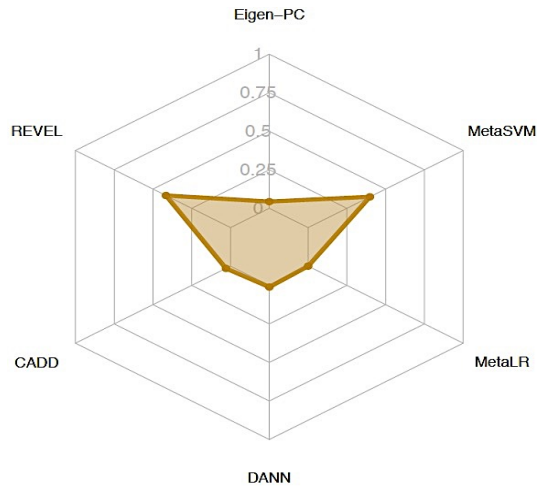
POS	clinvar_rs	clinvar_trait	CLNSIG
chr12 g.111884608T>C	.	.	?
chr17 g.7579472G>C	rs1042522	CODON 72 POLYMORPHISM, (rs1042522) not provided not specified Hereditary cancer-predisposing syndrome paclitaxel response - Efficacy, Toxicity/ADR cyclophosphamide response - Efficacy, Toxicity/ADR antineoplastic agents response - Efficacy, Toxicity/ADR fluorouracil response - Efficacy, Toxicity/ADR cisplatin response - Efficacy, Toxicity/ADR Li-Fraumeni syndrome	drug_response
chr2 g.198267359C>A	rs377023736	Myelodysplastic syndrome progressed to acute myeloid leukemia Acute myeloid leukemia	Pathogenic/Likely_pathogenic
chr4 g.106196829T>G	.	.	not_provided
chr4 g.106196951A>G	.	.	not_provided
chr9 g.5073770G>T	rs77375493	Polycythemia vera Thrombocytopenia 3 Budd-Chiari syndrome Myeloproliferative disorder	Pathogenic/Likely_pathogenic,_Affects,_risk_factor

Πίνακας 67. Κλινικά χαρακτηριστικά των δεδομένων NGS. Από αριστερά προς τα δεξιά καταγράφονται τα βασικά διακριτά χαρακτηριστικά. Ακολουθεί ο αριθμός καταχώρησης (clinvar_rs) και η νοσολογική οντότητα (clinvar_trait) όπου συμμετάσχει η εκάστοτε μετάλλαξη, σύμφωνα με τη βάση παθολογικών δεδομένων ClinVar. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στην κλινική



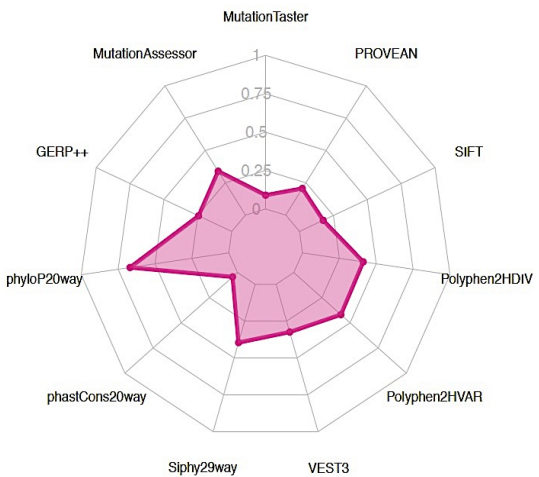
A.

Pathogenicity prognostication algorithms
SH2B3 W262R



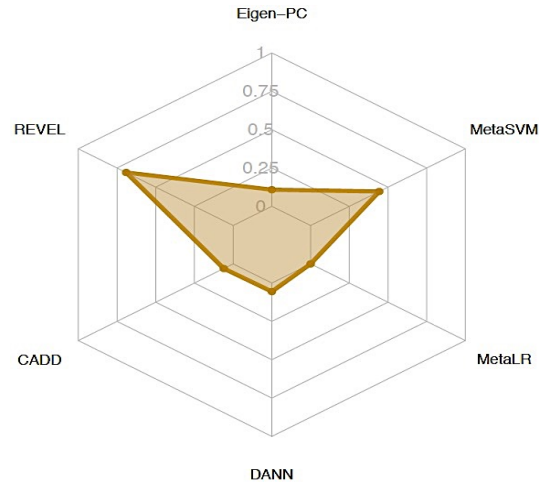
B.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
SH2B3 W262R



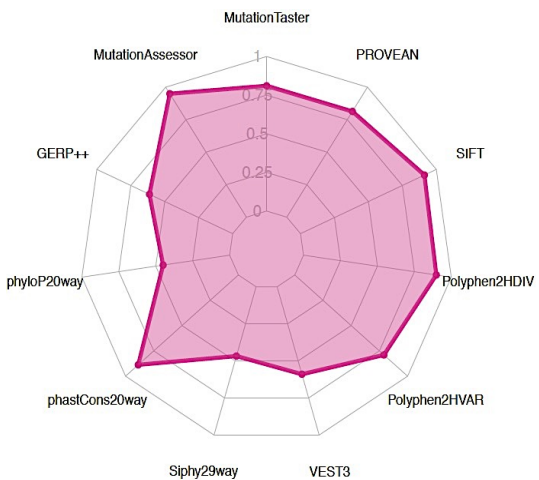
Γ.

Pathogenicity prognostication algorithms
TP53 P72R



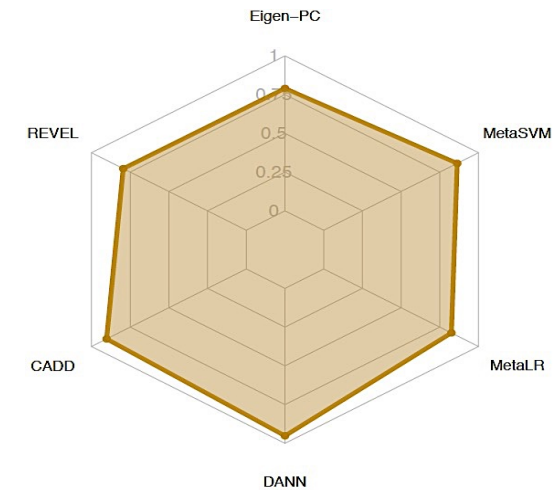
Δ.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
TP53 P72R



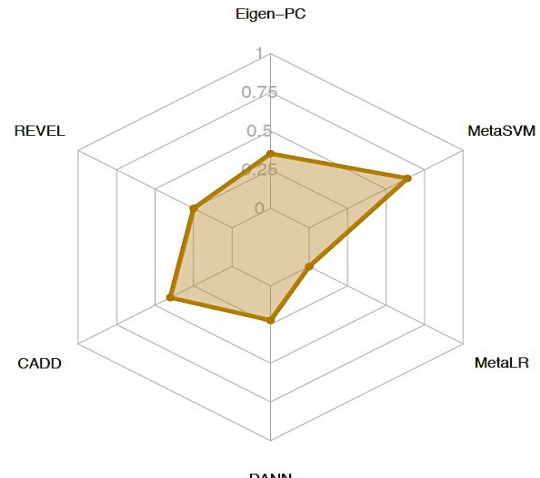
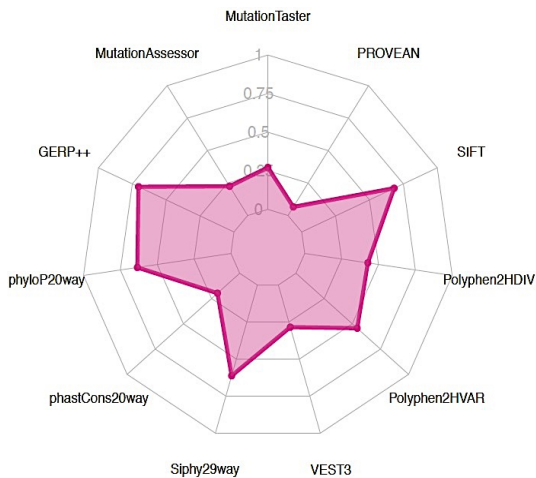
E.

Pathogenicity prognostication algorithms
SF3B1 K666N



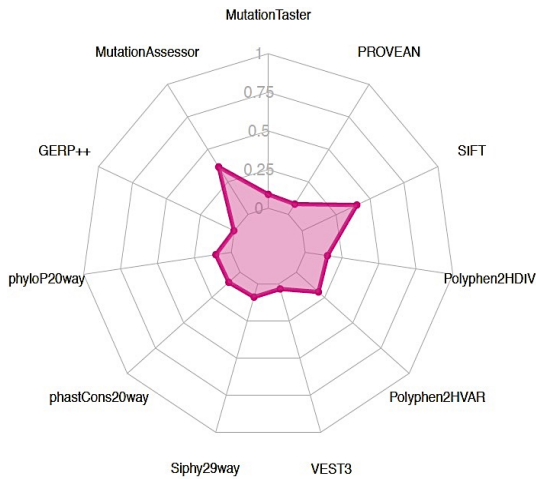
ΣΤ.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
SF3B1 K666N



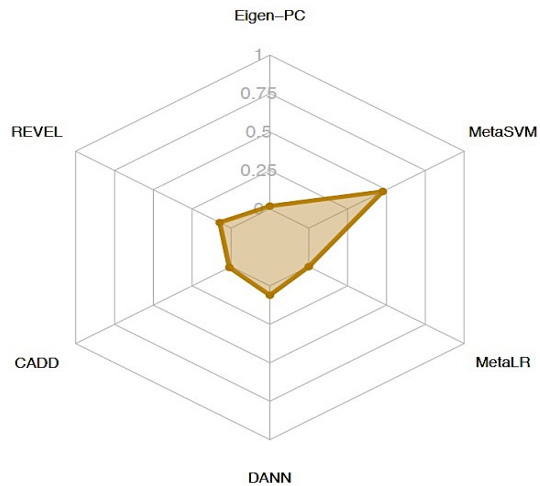
Z.

Pathogenicity prognostication algorithms
TET2 L1721W



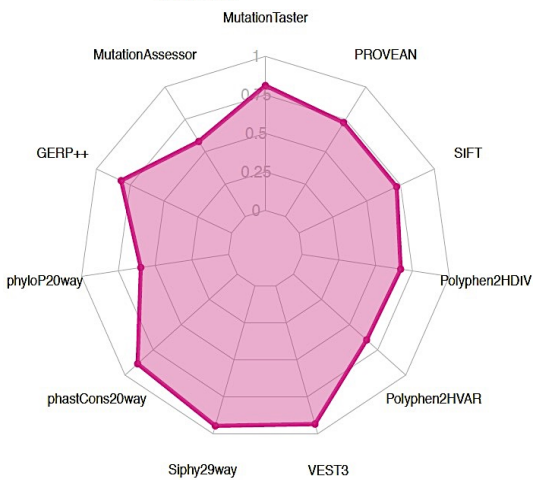
H.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
TET2 L1721W



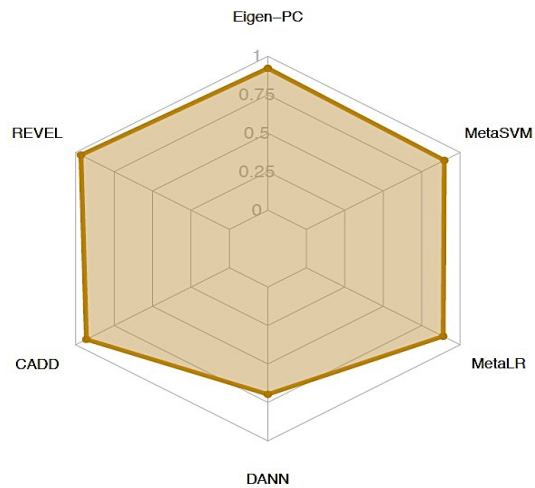
Θ.

Pathogenicity prognostication algorithms
TET2 I1762V



I.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
TET2 I1762V



K.

Pathogenicity prognostication algorithms
JAK2 V617F

Λ.

Combinatory pathogenicity prognostication algorithms
JAK2 V617F

Εικόνα 98. Αραχνοειδή διαγράμματα (spider graphs) με τις αξιολογήσεις της παθογένειας των μεταλλάξεων. Σε κάθε περίπτωση, αριστερά παρουσιάζονται απλοί αλγόριθμοι που βασίζονται

σε δεδομένα που σχετίζονται με τις επιμέρους νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλλαγές, καθώς και με δεδομένα φυλογένεσης-συντήρησης, ενώ δεξιά απεικονίζονται πιο σύνθετοι αλγόριθμοι που συνδυάζουν χαρακτηριστικά των προηγούμενων. Βαθμολογίες κοντά στο 0 ή στο 1, χαρακτηρίζουν μεταλλάξεις οι οποίες σύμφωνα με τον κάθε αλγόριθμο ενδεχομένως δεν συμβάλλουν ή συμβάλλουν, αντίστοιχα στην παθογένεια της νόσου. Από επάνω προς τα κάτω απεικονίζονται οι προβλέψεις για τις μεταλλάξεις SH2B3W262R (Α και Β), TP53P72R (Γ και Δ), SF3B1K666N (Ε και ΣΤ), TET2L1721W (Ζ και Η), TET2I1762V (Θ και Ι), JAK2V617F (Κ και Λ).

5.4 Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης διάσπαρτων πολυεπαναλαμβανόμενων μικρών ή μεγάλων μεταθετών στοιχείων, όπως οι αλληλουχίες SINE (short interspersed nucleotide elements, π.χ. Alu repetitive elements) και LINE (long interspersed nucleotide elements), παρουσιάζουν αποκλίσεις από το φυσιολογικό, σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμβάλλοντας έτσι σε γενετική αστάθεια και εξέλιξη της νόσου (Kitkumthorn and Mutirangura 2011).

Τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδιώματος ρυθμίζονται από 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.

Διάφορες τεχνικές, αποσκοπούν στον κατά προσέγγιση προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (global methylation levels), μέσω ανάλυσης των μεταθετών στοιχείων LINE-1. Το ανθρώπινο γονιδίωμα απαρτίζεται κατά 45% από τέτοιες δομές, όπου μάλιστα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτές εντοπίζονται έντονα μεθυλιωμένες (Yang et al. 2004, Biotage AB 2007, Tse et al. 2011).

Προκειμένου να ανιχνεύσουμε μία πιθανή αλλαγή στο πρότυπο της 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).

5.4.1 Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA)

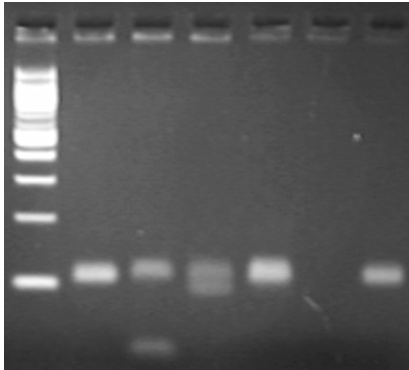
5.4.1.1 Κλινικό υλικό

Χρησιμοποιήσαμε MS-HRMA για να προσδιορίσουμε ενδεχόμενες αποκλίσεις στο πρότυπο της μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και ΜΙ, συγκριτικά με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού. Με την τεχνική αυτή μελετήθηκαν συνολικά 15 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, 15 ασθενείς με ΜΙ και 6 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση.

5.4.2.2 Σχεδιασμός εκκινήτων για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

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

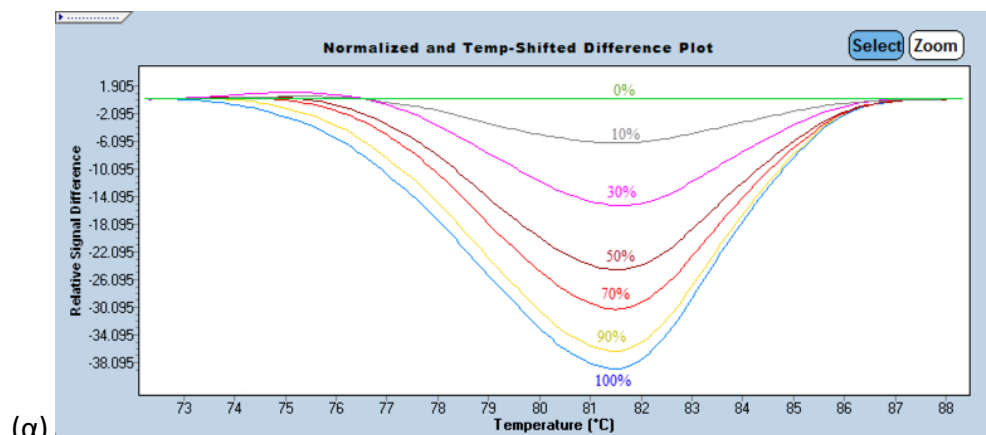
Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινήτων στο προηγουμένως επεξεργασμένα υποστρώματα καθορίστηκε μέσω ταυτόχρονης ενίσχυσης, σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad). Κατόπιν, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.

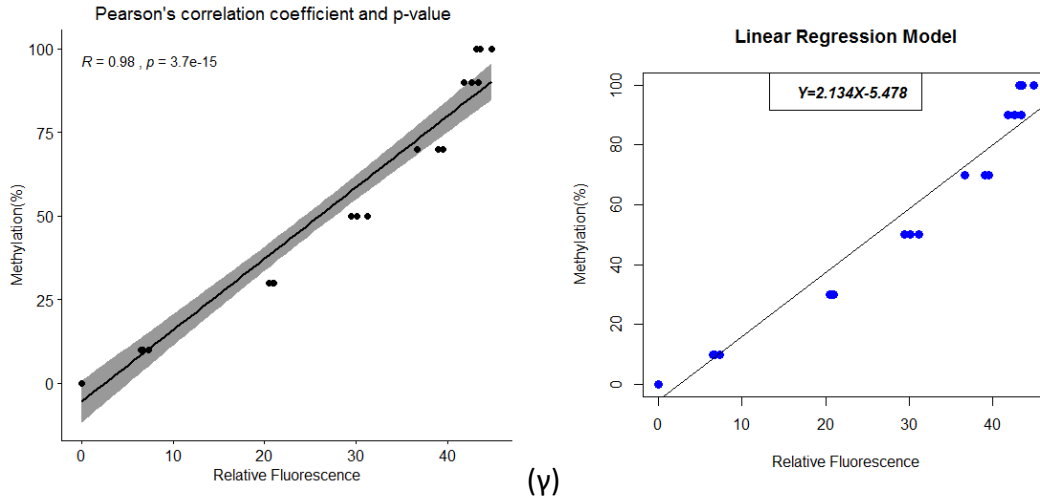


Εικόνα 99. Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MS-HRMA ειδικών εκκινήτων, προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Από αριστερά προς δεξιά οι θερμοκρασίες πρόσδεσης κυμαίνονται, από τους 50 έως τους 67 βαθμούς κελσίου.

5.4.1.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την πρότυπη καμπύλη παρασκευάστηκαν δείγματα αναφοράς με ακραίες τιμές μεθυλίωσης 0% και 100%, μέσω WGA (Κεφ.4.2.3.α) και τεχνητής μεταφοράς μεθυλομάδων (Κεφ.4.2.3.β), αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναφοράς, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα, προηγουμένως, επεξεργάστηκαν με διουλφίδιο 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).





(β) (γ)

Εικόνα 100. Πρότυπη καμπύλη μεθυλίωσης. (α) 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-μεθυλιωμένο πρότυπο δείγμα (0%). (β) 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). (γ) 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*).

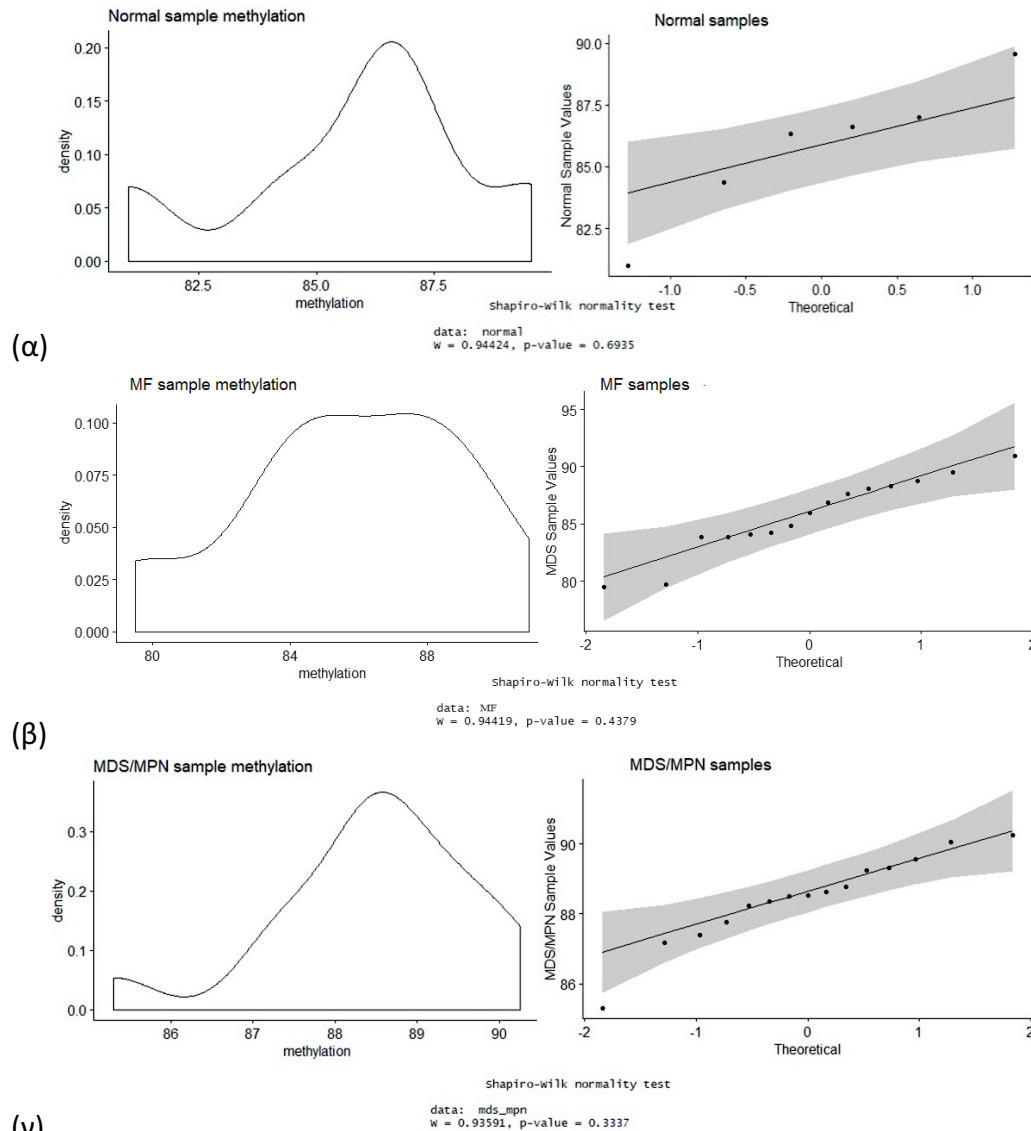
5.4.1.3 Αποτελέσματα MS-HRMA

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

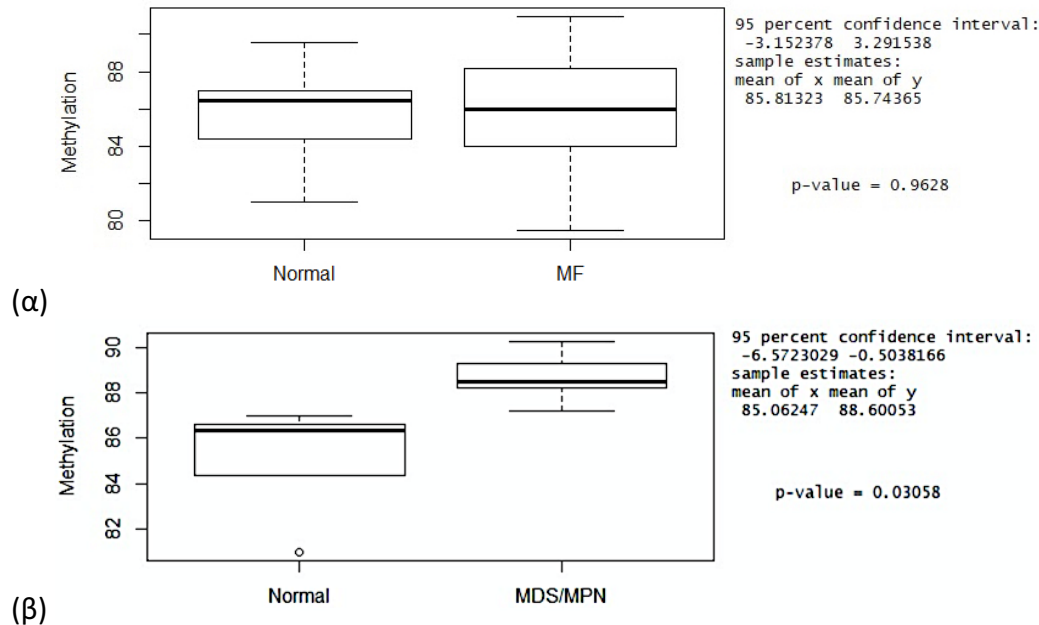
Διάγνωση	Φύλο	Ηλικία	Ποσοστό Μεθυλίωσης (%)	Κύρια γονίδια	Αμινοξική υποκατάσταση	Τροποποιητικά γονίδια	Αμινοξική υποκατάσταση
RARS-T	M	75	88.24039	JAK2	V617F	DNMT3A	R882C
CMML	M	65	88.34216	JAK2	V617F	ASXL1	G646fs*12
CMML	M	81	85.305	Αρνητικό	-	DNMT3A	R882H
RARS-T	M	69	89.56179	JAK2	V617F	SF3B1	K700E
RARS-T	M	65	87.17468	JAK2	V617F	SF3B1	H662Y
RARS-T	F	73	87.40028	Αρνητικό	-	SF3B1	K700E
RARS-T	M	77	88.51089	JAK2	V617F	SF3B1	K700E
RARS-T	F	76	90.25012	JAK2	V617F	Αρνητικό	-
CMML	M	85	89.30531	Αρνητικό	-	ASXL1	G646fs*12
CMML	M	80	88.61913	JAK2	V617F	SRSF2	P95H
CMML	M	86	88.52174	Αρνητικό	-	SRSF2	P95L
CMML	M	85	88.77425	Αρνητικό	-	SRSF2	P95H
CMML	F	42	87.76476	CALR	Type-I	Αρνητικό	-
CMML	M	77	90.0601	Αρνητικό	-	SRSF2	P95H
RARS-T	F	75	89.24624	Αρνητικό	-	SF3B1	K700E
Φυσιολογικό	F	35	86.9929	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-
Φυσιολογικό	F	23	84.37886	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-
Φυσιολογικό	F	35	86.61851	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-
Φυσιολογικό	F	35	81.00075	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-
Φυσιολογικό	M	31	86.32132	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-
Φυσιολογικό	M	23	89.56705	Αρνητικό	-	Αρνητικό	-

Πίνακας 69. Δείγματα που αναλύθηκαν με MS-HRMA και τα σχετικά ποσοστά μεθυλίωσης.

5.4.1.4 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων



Εικόνα 101. Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Τόσο, η κοορτή των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού (α), όσο και εκείνη των ασθενών με MI (β) και με ΜΔΣ/ΜΥΝ (γ), παρουσιάζουν τιμές μεθυλίωσης που ακολουθούν κανονική κατανομή, η οποία επιτρέπει την εφαρμογή παραμετρικών στατιστικών αναλύσεων.



Εικόνα 102. 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 MI (α) και εκείνων με ΜΔΣ/ΜΥΝ (β), με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, ξεχωριστά.

Από τα δεδομένα προκύπτει πώς τα στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά ($p\text{-value}=0.03058$), αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης (88.60%), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (85.06%), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Αντιθέτως, δεν προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p\text{-value}=0.9628$), στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των ασθενών με MI (86.81%) και των ατόμων με φυσιολογική αιμοποίηση (85.74%).

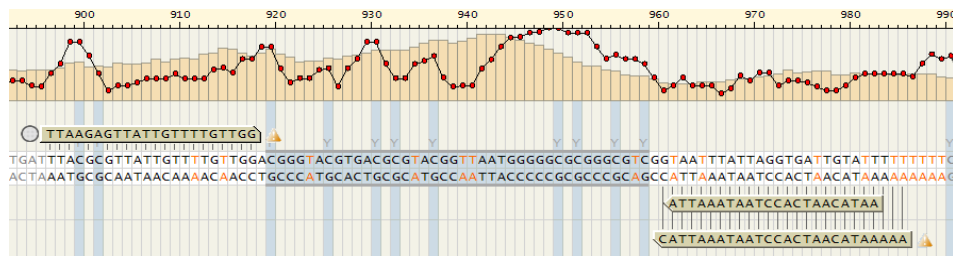
5.4.2 Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP)

5.4.2.1 Κλινικό υλικό

Χρησιμοποιήσαμε MSP για να επαληθεύσουμε τα δεδομένα της MS-HRMA. Για το λόγο αυτό ελετήθηκαν 8 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και 28 ασθενείς με MI, των οποίων το πρότυπο της μεθυλίωσης προσδιορίστηκε προσεγγιστικά μέσω ανάλυσης των επιπέδων μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, συγκριτικά με 7 άτομα τα οποία παρουσίαζαν φυσιολογική αιμοποίηση.

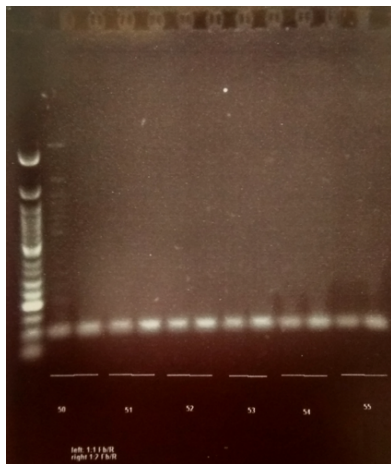
5.4.2.2 Σχεδιασμός εκκινήτων για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

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



Εικόνα 103. 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 προσδένεται συμπληρωματικά στην απομονωθείσα αλυσίδα και ενισχύει το προς ανάλυση τμήμα DNA.

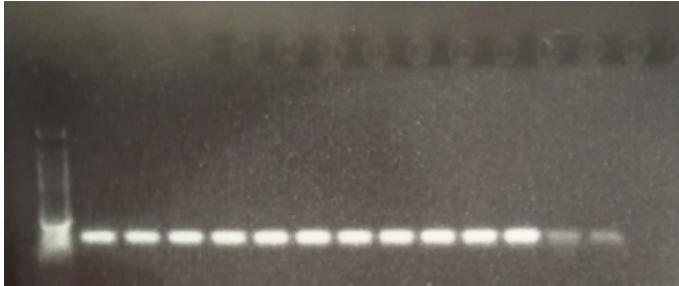
Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στα επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research) καθορίστηκε μέσω ταυτόχρονης ενίσχυσης σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), ενώ κατόπιν, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή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



Εικόνα 104. 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.

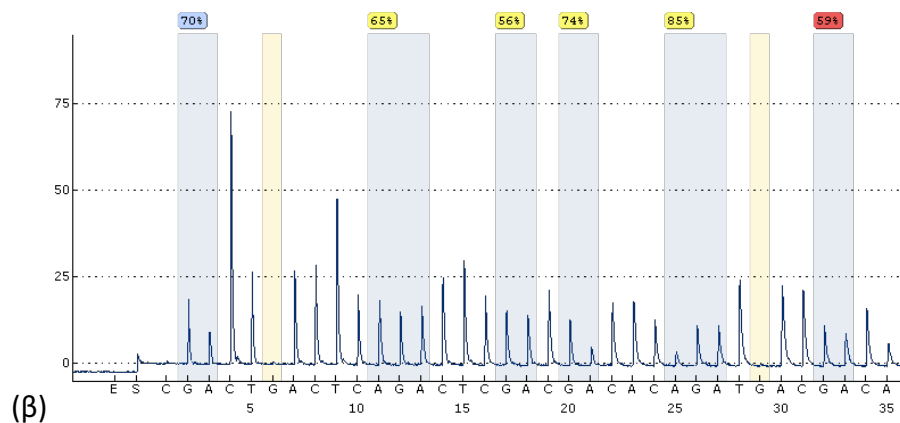
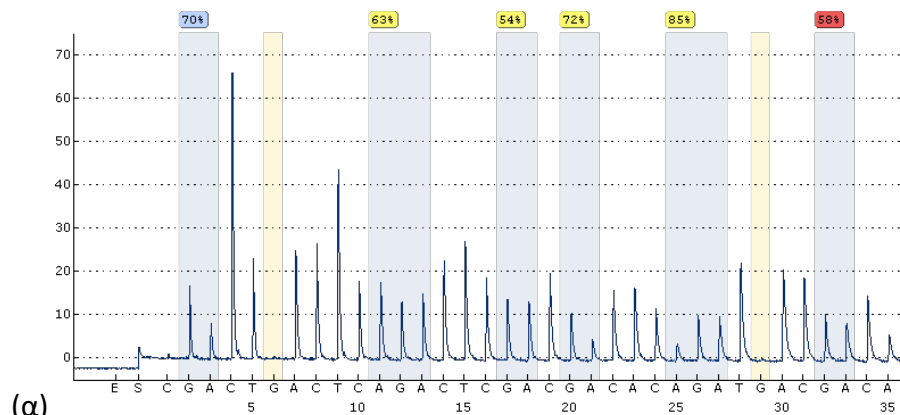
5.4.2.3 Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP

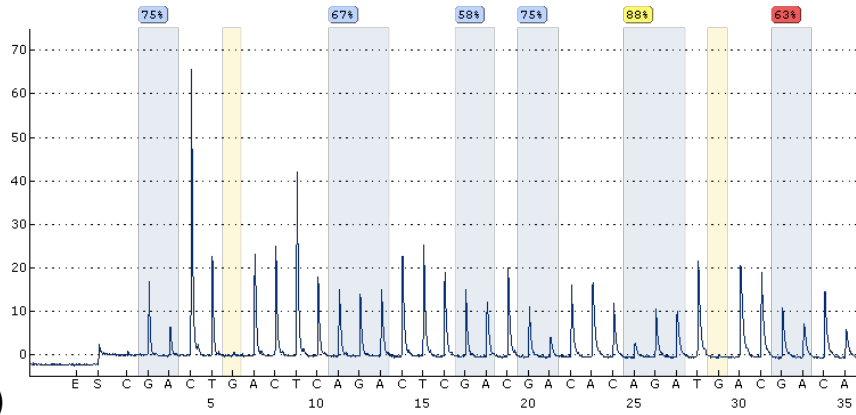
Ακολούθησε επεξεργασία των υποστρώματων και των δειγμάτων αναφοράς, με δισουλφίδιο του νατρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research), ενίσχυση μέσω PCR, προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με MSP.



Εικόνα 105. 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.

5.4.2.4 Αποτελέσματα MSP

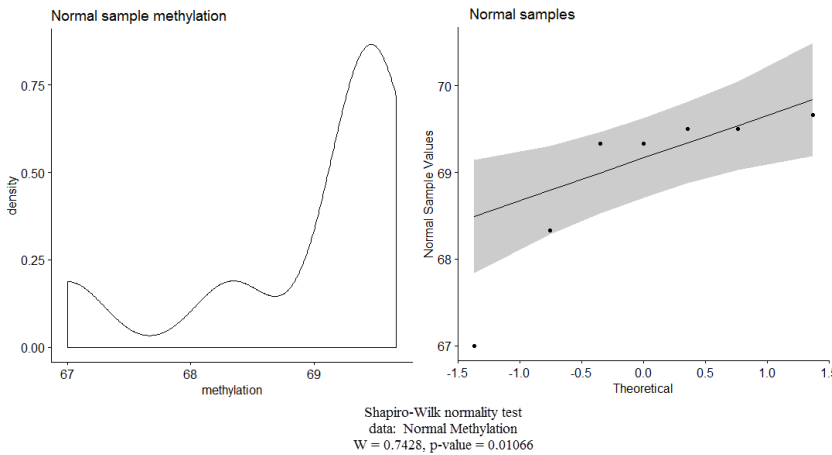




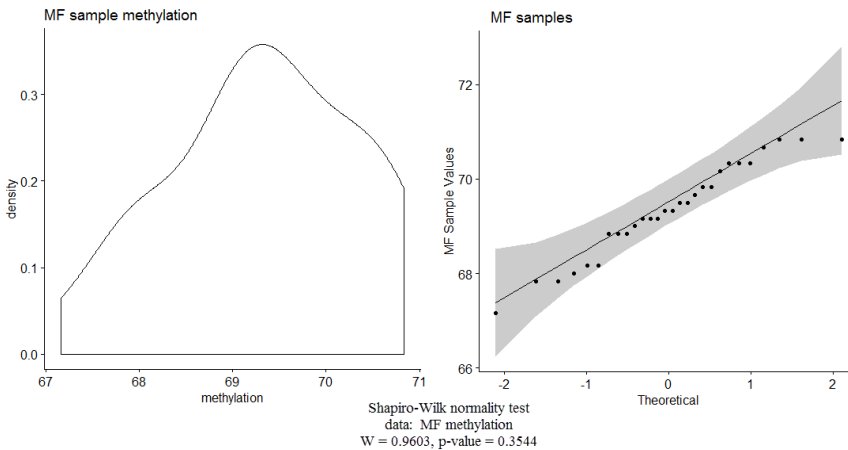
(γ)

Εικόνα 106. Χρωματογραφήματα από ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται, ένα δείγμα ατόμου από το φυσιολογικό πληθυσμό (α), ένα δείγμα ασθενούς με MI (β) και ένα δείγμα ασθενούς με ΜΔΣ/ΜΥΝ (γ). 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.

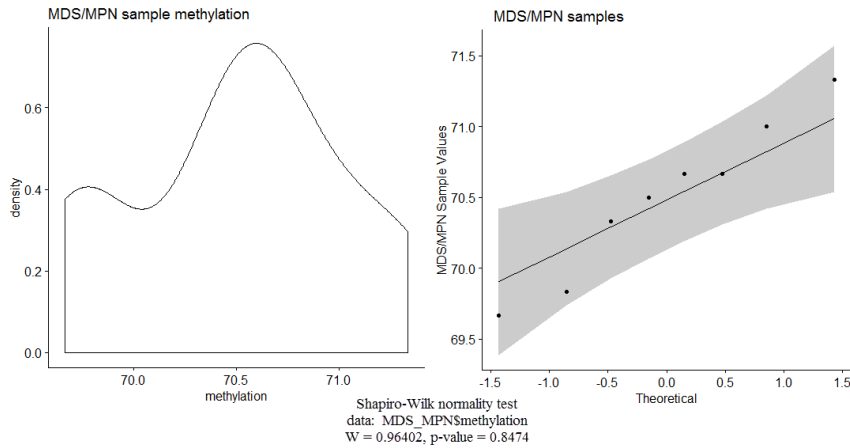
5.4.2.5 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων



(α)

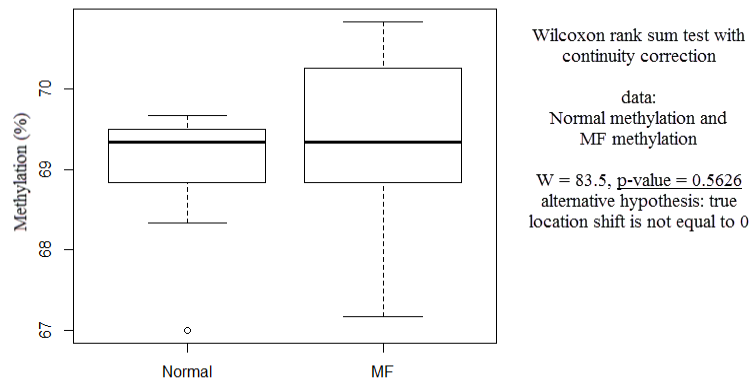


(β)

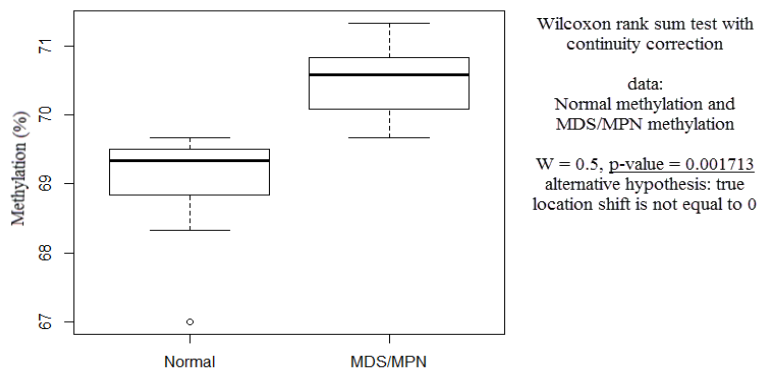


(γ)

Εικόνα 107. Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MSP. Η κορτή 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 κορτές των ασθενών με MI (β) και ΜΔΣ/ΜΥΝ (γ) ακολουθούν κανονική κατανομή.



(α)



(β)

Εικόνα 108. 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 MI (α) και εκείνων με ΜΔΣ/ΜΥΝ (β), με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, ξεχωριστά.

Όπως αποδείχτηκε προηγουμένως, από τις MS-HRMA αναλύσεις και επιβεβαιώθηκε από τα περιγράμματα με MSP, τα στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά, αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (p -value=0.001713), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Αντιθέτως, δεν προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p -value=0.5626) στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των ασθενών με ΜΙ και των ατόμων με φυσιολογική αιμοποίηση.

5.5 Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με ΜΙ και φυσιολογικού πληθυσμού μέσω RNA-Seq

5.5.1 Κλινικό Υλικό

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος 6 ασθενών με ΜΙ και 2 ατόμων από το γενικό πληθυσμό, χωρίς οποιαδήποτε μετάλλαξη. Από τους ασθενείς με ΜΙ 3 έφεραν από δύο μεταλλάξεις έκαστος (s19:CALR⁺ASXL1⁺, s465:JAK2⁺ASXL1⁺, s7960:JAK2⁺SRSF2⁺), 2 έφεραν από μία μετάλλαξη έκαστος (s7505:CALR⁺, s1990:ASXL1⁺), ενώ σε 1 δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις (s:1029).

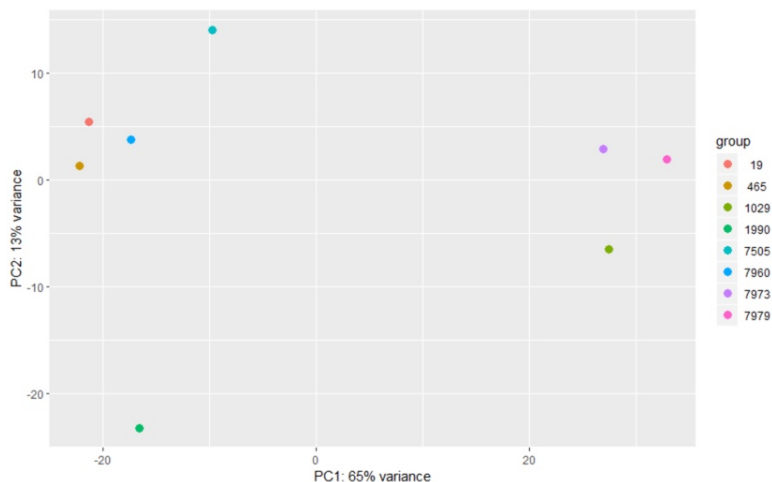
Οι βιβλιοθήκες των RNA προετοιμάστηκαν με το Ovation Human Blood RNA-Seq Multiplex System 1-8 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (NuGen). Μάλιστα, με τη συγκεκριμένη ολοκληρωμένη λύση, απομακρύνεται τόσο ριβοσωμικό RNA, που αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του συνόλου των μεταγράφων των κυττάρων, όσο και τα μετάγραφα των σφαιρινών.

5.5.2 Αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης

Τα αρχεία των διαβασμάτων (fastq files) επεξεργάστηκαν κατάλληλα με αλγόριθμο που αναπτύχθηκε ως μέρος της διατριβής. Από την επεξεργασία προκύπτει ένα πλήθος διαβασμάτων που διέρχονται από το εκάστοτε γονίδιο, φυσικά για κάθε δείγμα, ξεχωριστά. Τα διαβάσματα αθροίζονται και η τιμή αυτή, θεωρητικά, ανταποκρίνεται στον αριθμό των μεταγράφων, δηλαδή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο υπό ανάλυση δείγμα.

Πρακτικά ωστόσο μεσολαβούν διάφορα στάδια κανονικοποίησης των δεδομένων, προκειμένου να αποφευχθούν ανακρίβειες λόγω του θορύβου που εισάγει η τεχνική, καθώς και η αναλυτική διαδικασία.

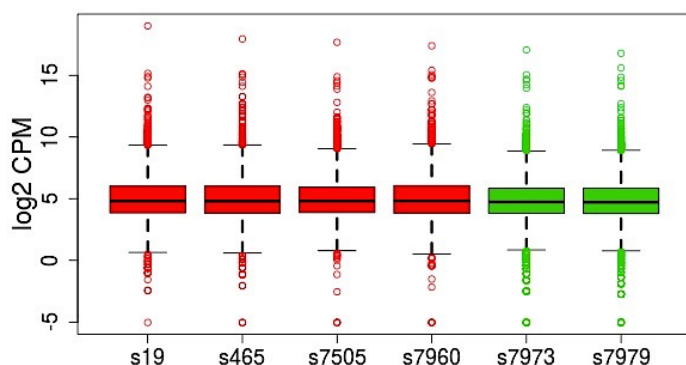
Στη συνέχεια οι λίστες, με τις τιμές έκφρασης κάθε γονιδίου, αναλύονται ταυτόχρονα και σε αντιπαραβολή μεταξύ τους, για όλα τα δείγματα, αφού όμως πρώτα αυτά ομαδοποιηθούν κατάλληλα. Έτσι προκύπτουν τα δεδομένα μίας συγκριτικής ανάλυσης του μεταγραφώματος. Συνήθως, η σύγκριση πραγματοποιείται μεταξύ δύο διαφορετικών καταστάσεων, στην προκειμένη περίπτωση αναλύθηκε το προφίλ έκφρασης των ασθενών με ΜΙ, σε σύγκριση με το αντίστοιχο προφίλ σε άτομα του γενικού πληθυσμού.



Εικόνα 109. Πολυδιάστατη απεικονιστική ανάλυση (principal component analysis, PCA) των RNA-Seq δεδομένων. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων, με βάση το συνολικό προφίλ έκφρασης (level of similarity of individual cases of a dataset). Τα δείγματα μίας ομάδας παρουσιάζουν ομοιογενή επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Αντίθετα, όσο περισσότερο αποκλίνουν επί του χάρτη, δύο ομάδες δειγμάτων, τόσο διαφορετικό προφίλ έκφρασης εμφανίζουν, μεταξύ τους.

Από την μελέτη PCA, προάχθηκαν δύο ομάδες για περαιτέρω ανάλυση. Αυτές αποτελούνταν από 2 άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (s7973 και s7979), για αντιπαραβολή με 4 ασθενείς με MI και μεταλλάξεις σε κύρια γονίδια της αιμοποίησης (s19, s465, s7505 και s7960). Οι 2 εναπομείναντες ασθενείς με MI, που δεν παρουσίαζαν κύριες μεταλλάξεις (s1029 και s1990), απορρίφθηκαν από περαιτέρω αναλυτικά στάδια, αφού το πρότυπο έκφρασής τους απέκλεινε αισθητά από οποιαδήποτε ομαδοποίηση, έτσι θα επηρέαζε αρνητικά το αποτέλεσμα.

Σε κάθε περίπτωση, για τις αναλύσεις δεδομένων RNA-Seq, θεωρείται ιδανικό να συγκρίνονται δύο διαφορετικές ομαδοποιημένες καταστάσεις μεταξύ τους, οι οποίες μάλιστα θα απαρτίζονται από δύο ή περισσότερα δείγματα, ώστε να εξομαλύνονται τυχαίες διαφορές και να ενισχύεται η πραγματική βιολογική απόκλιση, όσον αφορά στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 110. Κανονικοποίηση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Το πλήθος των επιμέρους διαβασμάτων, που αντιστοιχούν σε κάθena από τα γονίδια, του εκάστοτε δείγματος, υπολογίζεται εκ νέου, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα και σε άμεση συνάρτηση με το συνολικό αριθμό διαβασμάτων, για κάθε δείγμα της βιβλιοθήκης. Με τον τρόπο αυτό

απομακρύνεται τυχόν θόρυβος που εισάγει η τεχνική διαδικασία της κατασκευής βιβλιοθηκών και της ανάγνωσης των διαβασμάτων. *log2CPM* (2nd logarithm of counts per million reads): Δεύτερος λογάριθμος των επιπέδων έκφρασης, του συνόλου των γονιδίων, για κάθε δείγμα ξεχωριστά (Li Y and Jorge 2017).

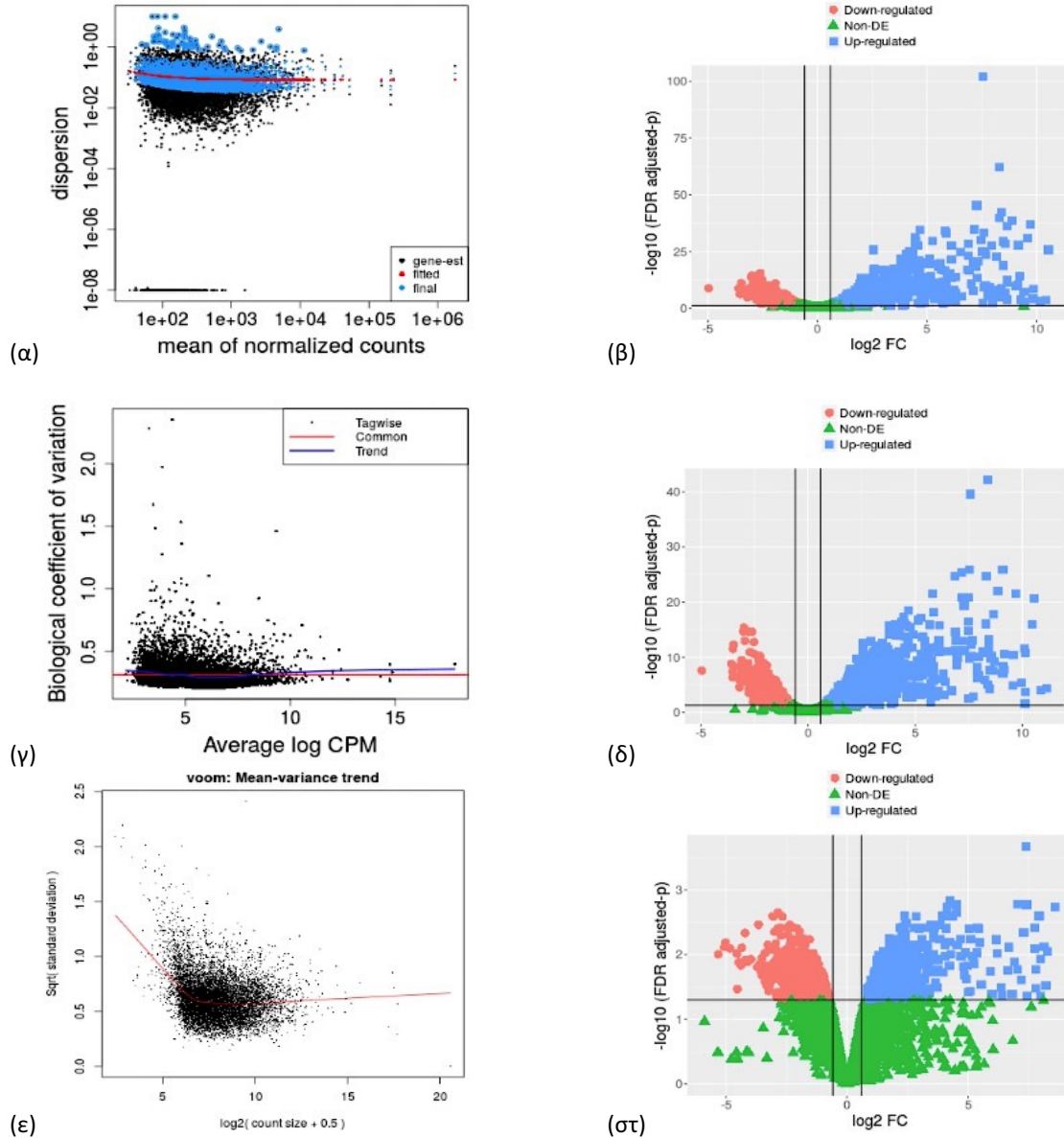
Κατά την κανονικοποίηση των δεδομένων, εφαρμόζονται μέθοδοι στατιστικής, που στόχο έχουν την ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων που εμφανίζει το πρότυπο έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων, το οποίο οφείλεται σε διακυμάνσεις που παρουσιάζονται ως προς το μέγεθος της βιβλιοθήκης RNA. Το επίπεδο γονιδιακής έκφρασης που ορίζεται ως κατώφλι (expression cutoff value), μεταφράζεται σε μονάδες έκφρασης ανά εκατομμύριο διαβάσματα (counts per million, CPM). Κάτω από το σημείο αυτό, τα επίπεδα έκφρασης, θεωρούνται αμελητέα και τα γονίδια αυτά απομακρύνονται από περαιτέρω αναλύσεις.

Πρωτότυπα δεδομένα (Raw Count Summary)			Απαλειφή γονιδίων με χαμηλά επίπεδα έκφρασης		
Δείγματα (n=6)	Μέγεθος βιβλιοθήκης	Παράγοντας κανονικοποίησης	Δείγματα (n=6)	Μέγεθος βιβλιοθήκης	Παράγοντας κανονικοποίησης
s19	8.95e ⁺⁰⁶	0.79	s19	8.76e ⁺⁰⁶	0.74
s465	5.33e ⁺⁰⁶	0.88	s465	5.23e ⁺⁰⁶	0.91
s7505	6.87e ⁺⁰⁶	1.05	s7505	6.71e ⁺⁰⁶	1.06
s7960	1.67e ⁺⁰⁶	0.92	s7960	1.64e ⁺⁰⁶	0.96
s7973	5.81e ⁺⁰⁶	1.20	s7973	5.66e ⁺⁰⁶	1.20
s7979	7.07e ⁺⁰⁶	1.23	s7979	6.88e ⁺⁰⁶	1.22
Γονίδια	25938		Γονίδια	9383	

Πίνακας 70. Γονίδια με επαρκή επίπεδα έκφρασης, κατάλληλα για περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση των RNA-Seq δεδομένων. Από το σύνολο των εκφραζόμενων γονιδίων και άλλων στοιχείων που μεταγράφονται στο κύτταρο (25938), τα 9383 είναι εκείνα που δέχθηκαν επαρκή διαβάσματα ώστε παρέμειναν για ανάλυση, έπειτα κανονικοποίηση των δεδομένων μεταξύ των δειγμάτων και απομάκρυνση των γονιδίων με χαμηλή έκφραση (CPM=10) (Li Y and Jorge 2017).

Εκτός όμως από το επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, λαμβάνεται υπόψιν και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, σύμφωνα με το οποίο αναδεικνύεται ένα γονίδιο, ως διαφορετικά εκφραζόμενο, όπως φαίνεται και στις παρακάτω διαγραμματικές απεικονίσεις διασποράς των δεδομένων.

Για τις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν τρεις αλγόριθμοι (DESeq2, edgeR, Limma-voom), από τους οποίους προέκυψαν λίστες με γονίδια που παρουσιάζουν αποκλίνοντα επίπεδα έκφρασης στη MI, συγκριτικά με τα άτομα του γενικού πληθυσμού. Η τελευταία ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς (baseline) των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης.



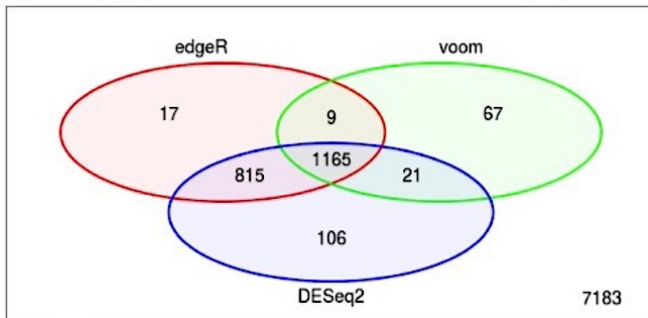
Εικόνα 111. Διαγραμματικές απεικονίσεις της στατιστικής σημασίας των RNA-Seq δεδομένων. Αριστερά: Διαγραμματική απεικόνιση της διασποράς (estimated dispersion) που παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (κάθετοι άξονες y), σε σχέση με τη μέση τιμή τους (παράλληλοι άξονες x), για όλα τα υπό ανάλυση δείγματα, όπως προκύπτουν από τους αλγόριθμους DESeq2 (α), edgeR (γ), Limma-voom (ε). Τα γονίδια που απομακρύνονται από τη μέση τιμή της διασποράς (γραμμή με κόκκινο χρώμα) είναι συνήθως εκείνα που εκφράζονται χαμηλότερα. Δεξιά: Διαγραμματική απεικόνιση (volcano exploration) της διαφοράς που εντοπίζεται στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, μεταξύ των δειγμάτων που αναλύονται, (παράλληλοι άξονες x), σε συνδυασμό με το επίπεδο σημαντικότητας με το οποίο εμφανίζονται αυτές οι αλλαγές (κάθετοι άξονες y), όπως προκύπτουν από τους αλγόριθμους DESeq2 (β), edgeR (δ), Limma-voom (στ). Ως δείγματα αναφοράς (baseline) για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν άτομα χωρίς διαταραχή της αιμοποίησης. Επομένως, τα γονίδια των ασθενών με MI που

εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα στην εικόνα, εκφράζονται λιγότερο από τα αντίστοιχα γονίδια στα φυσιολογικά άτομα, ενώ αυτά με μπλε εκφράζονται περισσότερο, με τη διαφορά στην έκφραση να αυξάνεται, όσο πιο πολύ απομακρύνονται από το κέντρο της διασποράς ($Fold\ change, (FC) > 1.5$). Επιπλέον, όσο ψηλότερα, στον άξονα y, εντοπίζονται αυτά τα γονίδια, τόσο πιο αξιόπιστα έχει αναδειχθεί η απόκλιση αυτή ($fold\ discovery\ rate\ adjusted\ p\text{-value}\ (FDR) < 0.05$) (Li Y and Jorge 2017).

Έτσι, από τα 9383 γονίδια με επαρκές επίπεδο έκφρασης, οι αλγόριθμοι, DESeq2, edgeR και Limma-voom, προήγαγαν συνολικά, για περαιτέρω ανάλυση, 2200 γονίδια, με στατιστική σημασία.

Από αυτά διατηρήσαμε μόνο 2010 γονίδια, τα οποία εντοπίζονται στις τομές τουλάχιστον δύο αλγόριθμων, ενώ τα υπόλοιπα αποκλείστηκαν, με στόχο να αυξηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Με αυτά προσπαθήσαμε να εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με τη βιολογία και την κλινική εικόνα της μυελοϊνώσεως, σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 112. Συγκριτικό διάγραμμα Venn. Πλήθος των γονιδίων που εμφανίζουν αποκλίνουσα έκφραση στη ΜΙ, έπειτα από συγκριτική ανάλυση με άτομα που παρουσιάζουν φυσιολογική αιμοποίηση, όπως προκύπτει από τους αλγόριθμους DESeq2, edgeR, Limma-voom. Το πρότυπο έκφρασης των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς (baseline) (Li Y and Jorge 2017).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Γενικά στοιχεία και παρατηρήσεις στα MYN και ΜΔΣ/MYN

Οι MYN και τα ΜΔΣ/MYN αποτελούν ετερογενείς κατηγορίες κλωνικών διαταραχών της αιμοποίησης, ωστόσο και οι δύο χαρακτηρίζονται από άμετρο και άσκοπο κλωνικό πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων προγονικών κυττάρων της μυελικής σειράς.

Μέχρι πρόσφατα, η διάγνωση και πρόγνωση των υποκατηγοριών αυτών των νοσημάτων, βασιζόταν σχεδόν αποκλειστικά σε κυτταρολογικά χαρακτηριστικά και καρυστυπικές αναλύσεις, με εξαίρεση πολύ συγκεκριμένες μοριακές βλάβες, όπως εκείνες στα γονίδια *JAK2* και *MPL*, που ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με Φιλαδέλεια αρνητικά κλασικά MYN, αλλά και η *KITD816V* στη συστηματική μαστοκυττάρωση, οι οποίες και εντάχθηκαν στα διαγνωστικά κριτήρια του Π.Ο.Υ. κατά την αναθεώρηση του 2008.

Η πρόοδος της τεχνολογίας οδήγησε σε καλύτερο χαρακτηρισμό της παθογένειας των μυελικών νεοπλασιών, με την ανάδειξη πληθώρας μεταλλάξεων σε γονίδια με διακριτές λειτουργίες και μάλιστα με διαφορετική συχνότητα σε κάθε περίπτωση.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι συχνές μεταλλάξεις προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 9 του γονιδίου *CALR*, που ανιχνεύονται στην πλειοψηφία των ασθενών με ΙΘ ή ΜΙ, οι οποίοι ελέγχονται αρνητικοί για μεταλλάξεις *JAK2* και *MPL*. Οι μεταλλάξεις *CALR* εντάχθηκαν στα κριτήρια διάγνωσης των MYN από τον Π.Ο.Υ., κατά την πρόσφατη μεγάλη αναθεώρηση του 2016.

Επιπλέον, οι μεταλλάξεις *CSF3R* και *SETBP1* συνεισφέρουν στη διαφορική διάγνωση νοσημάτων που μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά όπως οι ΧΟΛ και αΧΜΛ, αντίστοιχα.

Άλλες εξαιρετικά συχνές μεταλλάξεις, οι οποίες ωστόσο δεν είναι ειδικές συγκεκριμένων κατηγοριών νοσημάτων, όπως εκείνες στα γονίδια *ASXL1* και *SRSF2*, μπορεί να μην αποτελούν κριτήριο διαφοροδιάγνωσης, ωστόσο έχουν προγνωστική αξία, αφού έχουν συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση νόσου.

Παράλληλα, διαφορετικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο, φαίνεται να είναι ευαίσθητες, σε διαφορετικές στοχευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως συμβαίνει με το γονίδιο *CSF3R*. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις πρόωρου τερματισμού της μεταγραφής παρουσιάζουν ευαισθησία στη θεραπεία με αναστολείς των κινασών SRC (SFK)-TNK2, όπως *dasatinib*. Οι ασθενείς που ελέγχονται θετικοί για σημειακές μεταλλάξεις με λάθος νόημα, στο κυτταροπλασματικό άκρο της πρωτεΐνης, πλησίον της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπως η T618I και άλλες, αποκρίνονται επαρκώς σε θεραπεία με αναστολείς κινασών JAK, όπως *ruxolitinib*. (Maxson et al. 2013).

Τα κλινικοδιαγνωστικά εργαστήρια στηρίζονται σε δεδομένα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί κατά τα προηγούμενα χρόνια, για την ανάπτυξη τεχνικών που θα μπορούν με αξιοπιστία να ανιχνεύουν μεταλλάξεις σε πληθώρα γονιδίων ταυτόχρονα.

Για το λόγο αυτό αναπτύξαμε και συγκρίναμε διαφορετικά πρωτόκολλα για τη μοριακή διερεύνηση γονιδίων τα οποία εμφανίζονται συχνά μεταλλαγμένα σε ασθενείς με MYN και ΜΔΣ/MYN.

6.2. Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική HRMA και χαρακτηρισμός τους, μέσω προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων κατά Sanger

6.2.1. Γονίδια που αναλύθηκαν μέσω HRMA και η συχνότητα με την οποία αυτά εμφανίζουν μεταλλάξεις

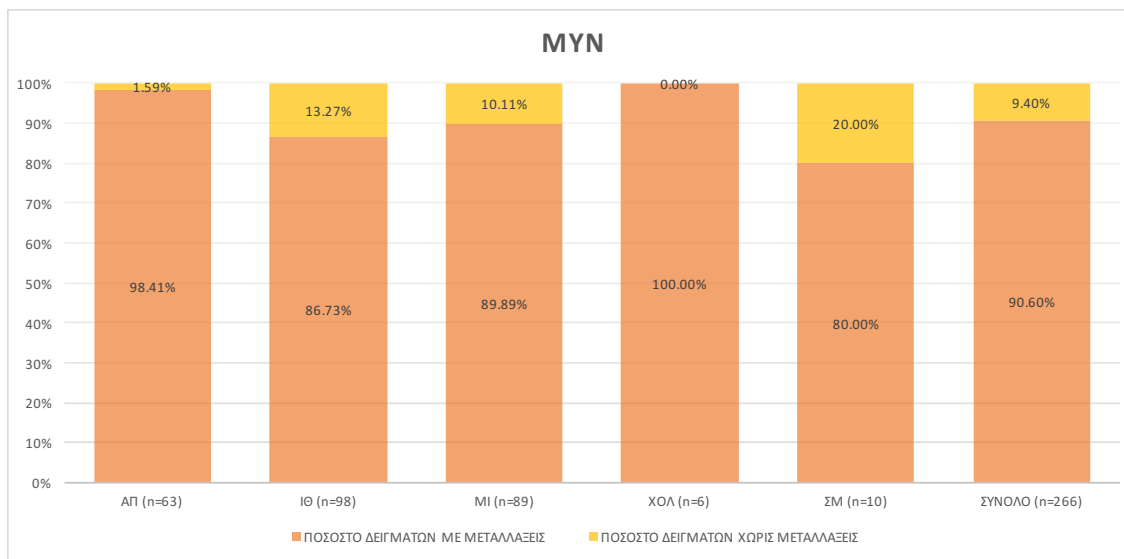
Η μεθοδολογία HRMA, αποτελεί μία ιδιαίτερα αξιόπιστη προσέγγιση για την εύκολη, γρήγορη και οικονομική ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα, ωστόσο για μεμονωμένες γενωμικές περιοχές. Επιπλέον, δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με το γονότυπο των ασθενών που μελετώνται. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητες περαιτέρω αναλυτικές διαδικασίες, όπως ο κατά Sanger προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων, στις περιπτώσεις ασθενών, των οποίων η ομαδοποίηση αποκλίνει από εκείνη των πρότυπων δειγμάτων με φυσιολογικό γονότυπο.

Με τη μέθοδο αυτή μελετήθηκαν συνολικά 266 ασθενείς με MYN και 110 ασθενείς με ΜΔΣ/MYN, τόσο για μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου, *JAK2* (εξόνια 12 και 14), *MPL* (εξόνιο 10) και *CALR* (εξόνιο 9), όσο και για μεταλλάξεις σε γονίδια με τροποποιητική δράση, συγκεκριμένα στα *ASXL1* (εξόνιο 12), *DNMT3A* (εξόνιο 23), *IDH1* (εξόνιο 4), *IDH2* (εξόνιο 4), *SETBP1* (εξόνιο 4), *SF3B1* (εξόνια 14 και 15), *SRSF2* (εξόνιο 1), *U2AF1* (εξόνια 2 και 6), *CSF3R* (εξόνιο 14) και *KIT* (εξόνιο 17).

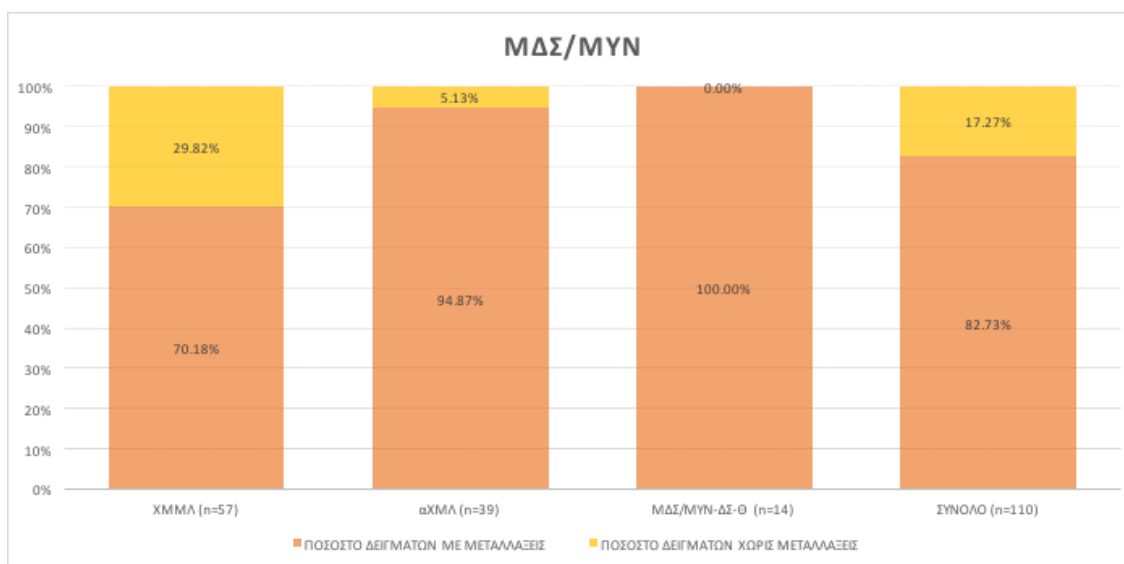
Απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα ή/και μυελό των οστών με καθιερωμένες τεχνικές και πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών των παραπάνω γονιδίων όπου ανιχνεύονται μεταλλάξεις πιο συχνά (hotspots), σύμφωνα με την βάση δεδομένων COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (Tate et al. 2018).

Τα γονίδια *JAK2* και *MPL* είχαν αναλυθεί ή αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής, με εγκαθιδρυμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας (ARMS-PCR και AS-PCR με ευαισθησία <1%). Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στις υπόλοιπες γενωμικές περιοχές σχεδιάστηκαν και εφαρμόστηκαν εξατομικευμένα πρωτόκολλα HRMA, ακολουθούμενα από κατά Sanger προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας στις περιπτώσεις που αυτό κρίνεται απαραίτητο, για επιβεβαίωση και χαρακτηρισμό του γονότυπου των ασθενών.

Από τη μελέτη προέκυψαν στοιχεία, σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στις παραπάνω κακοήθειες, τα οποία σε μεγάλο βαθμό συνάδουν με δεδομένα της βιβλιογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, με τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν, ανιχνεύσαμε μεταλλάξεις σε 241 από τους 266 ασθενείς με MYN (90.60%) και σε 91 από τους 110 ασθενείς με ΜΔΣ/MYN (82.73%) που μελετήθηκαν. Τυχόν μικρές αποκλίσεις που παρατηρούνται στη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένες κατηγορίες νοσημάτων, οφείλονται στο γεγονός πως με τη συγκεκριμένη τεχνική μελετήθηκαν μόνο 13 πολύ συγκεκριμένες, ωστόσο συχνά μεταλλαγμένες γενωμικές περιοχές σε 11 διαφορετικά γονίδια για έναν ικανοποιητικό, αλλά σχετικά μικρό αριθμό ασθενών, σε αντίθεση με μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες όπου πλέον η ανάλυση συνήθως πραγματοποιείται μέσω NGS, μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερες κοόρτες. Ωστόσο, η μελέτη αποκλειστικά των παραπάνω γονιδίων παρέχει σημαντικές πληροφορίες και αποκαλύπτει ένα μεγάλο μέρος των μοριακών διαταραχών, που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, υποδεικνύοντας έτσι την υποκείμενη γενετική και επιγενετική πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει συγκεκριμένες κατηγορίες MYN, ειδικότερα τη MI, αλλά κυρίως τα ΜΔΣ/MYN.



Εικόνα 113. Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις, τόσο ανά υποκατηγορία νοσημάτων, όσο και στο σύνολο των ασθενών με ΜΥΝ.



Εικόνα 114. Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με ή χωρίς μεταλλάξεις, τόσο ανά υποκατηγορία νοσημάτων, όσο και στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Πιο αναλυτικά, αναφορικά με τις μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου, πιο συχνά, συναντήσαμε τη μετάλλαξη *JAK2V617F*, σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΑΠ (59/63, 93.65%), σε μικρότερα ποσοστά στους ασθενείς με ΙΘ (54/98, 55.10%), ΜΙ (47/89, 52.81%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (7/14, 50.00%), σπάνια δε σε ασθενείς με ΧΜΜΛ (7/57, 12.28%) και αΧΜΛ (1/39, 2.56%). Σποραδικά, αναδείχθηκαν μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου *JAK2*, σε ασθενείς με ΑΠ (3/63, 4.76%). Το γονίδιο *MPL* εντοπίστηκε μεταλλαγμένο τόσο σε ασθενείς με ΙΘ (7/98, 7.14%), όσο και με ΜΙ (6/89, 6.74%). Τέλος, μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALR* αναφέρθηκαν επίσης σε ασθενείς με ΙΘ (23/98) και ΜΙ (20/89), σε ποσοστό 23.47% και 22.47%, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στα γονίδια του μηχανισμού επιγενετικής ρύθμισης του κυττάρου, αυτά ανιχνεύθηκαν μεταλλαγμένα τόσο σε ασθενείς με ΙΘ (το *DNMT3A* σε 1/98 με ποσοστό 1.02%) και ΜΙ (το *DNMT3A* σε 5/89 με ποσοστό 5.62% και τα *IDH1* και *IDH2* σε 1/89 με ποσοστό 1.12% το καθένα), όσο και σε ασθενείς με ΧΜΜΛ (το *DNMT3A* σε 2/57 με ποσοστό 3.51% και το *IDH1* σε 1/57 με ποσοστό 1.75%), αΧΜΛ (το *DNMT3A* σε 3/39 με ποσοστό 7.69%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (το *DNMT3A* σε 2/14 με ποσοστό 14.29%), αντίστοιχα.

Το γονίδιο *ASXL1* εμφανίζεται μεταλλαγμένο αρκετά συχνά σε ασθενείς με ΜΙ (29/89, 32.58%), ΧΜΜΛ (23/57, 40.35%) και αΧΜΛ (22/39, 56.41%). Μεταλλάξεις *ASXL1* επίσης αναδείχθηκαν σε σποραδικές περιπτώσεις ΑΠ (1/62, 1.59%) και ΙΘ (5/98, 5.10%), αλλά και σε νοσολογικές οντότητες με λιγότερα διαθέσιμα περιστατικά, όπως ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (2/14, 14.29%) και ΧΟΛ (3/6, 50%).

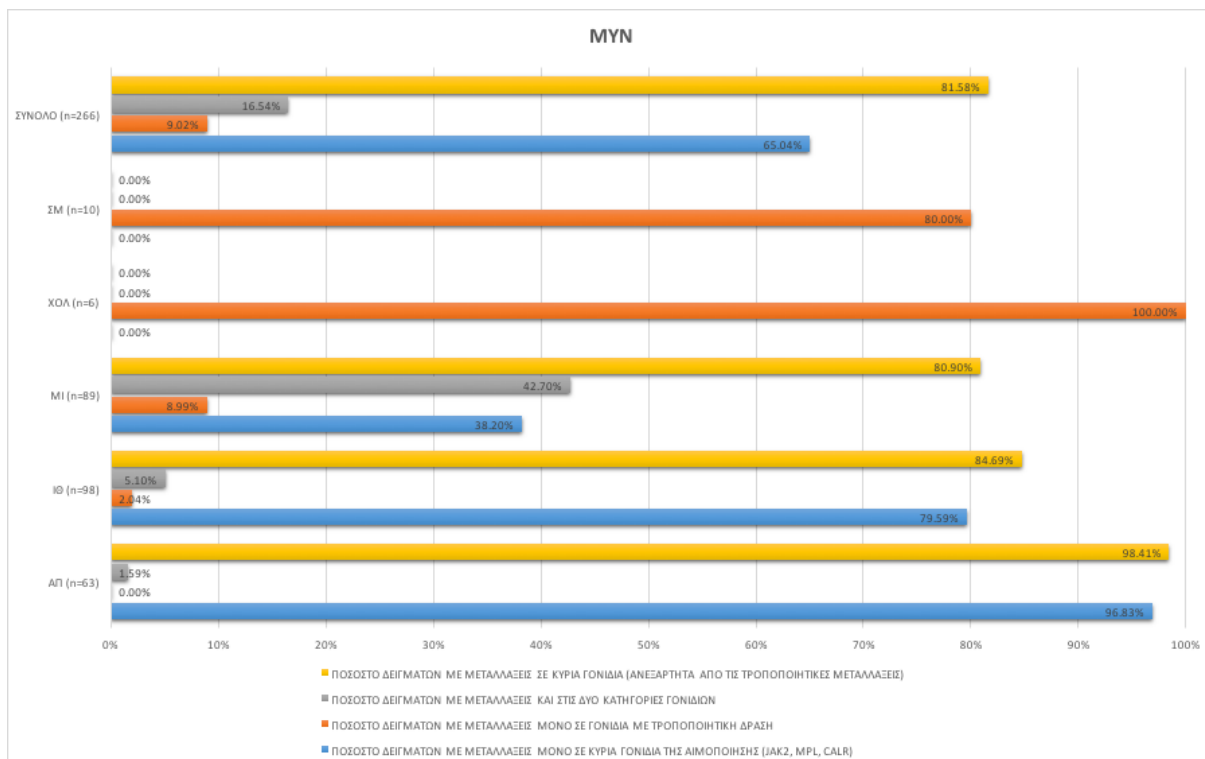
Μεταλλάξεις στα γονίδια του μηχανισμού ματίσματος του RNA, εντοπίστηκαν κυρίως σε ασθενείς με ΜΙ (το *SRSF2* σε 14/89 με ποσοστό 15.73%, το *SF3B1* σε 5/89 με ποσοστό 5.62%, το *U2AF1* σε 8/89 με ποσοστό 8.99%), ΧΜΜΛ (το *SRSF2* σε 18/57 με ποσοστό 31.58%, το *U2AF1* σε 1/57 με ποσοστό 1.75%), αΧΜΛ (το *SRSF2* σε 13/39 με ποσοστό 33.33%, το *U2AF1* σε 4/39 με ποσοστό 10.26%) και ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (το *SF3B1* σε 11/14 με ποσοστό 78.57%, το *U2AF1* σε 1/14 με ποσοστό 7.14%). Επιπλέον μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σποραδικά σε ασθενείς με ΙΘ (*SF3B1*, 1/98, 1.02%), αλλά και σε πιο σπάνιες παθολογικές καταστάσεις, όπως η ΧΟΛ (*SRSF2*, ενώ 3/6, 50.00%).

Ενώ οι μεταλλάξεις στα παραπάνω γονίδια δε φαίνεται να είναι ειδικές για μία συγκεκριμένη κατηγορία νοσημάτων, οι μεταλλάξεις *KIT* φαίνεται πως αποτελούν αποκλειστικό σχεδόν χαρακτηριστικό των ασθενών με ΣΜ (8/10, 80.00%) και σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις ανιχνεύονται σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες, όπως ΧΜΜΛ (3/57, 5.26%) και αΧΜΛ (2/39, 5.13%), κυρίως δε κατά την εκτροπή αυτών προς ΟΜΛ. Παρομοίως, οι μεταλλάξεις *CSF3R*, εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με ΧΟΛ (5/6, 83.33%), όπου πλέον αποτελούν διαγνωστικό κριτήριο της νόσου, σπανιότερα δε στην αΧΜΛ (2/39, 5.13%). Τέλος, οι ασθενείς με ΧΟΛ, ΧΜΜΛ και αΧΜΛ μοιράζονται από κοινού μεταλλάξεις *SETBP1*, σε ποσοστό 50.00% (3/6), 12.28% (7/57) και 23.08% (9/39), αντίστοιχα.

	JAK2	MPL	CALR	ASXL1	DNMT3A	IDH1	IDH2	SRSF2	SF3B1	U2AF1	SETBP1	CSF3R	KIT
ΑΠ (n=63)	62	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ΙΘ (n=98)	54	7	23	5	1	0	0	0	1	0	0	0	0
ΜΙ (n=89)	47	6	20	29	5	1	1	14	5	8	0	0	0
ΧΟΛ (n=6)	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	3	5	0
ΣΜ (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
ΧΜΜΛ (n=57)	7	0	0	23	2	1	0	18	0	1	7	0	3
αΧΜΛ (n=39)	1	0	0	22	3	0	0	13	0	4	9	2	2
ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ (n=14)	7	0	0	2	2	0	0	0	11	1	0	0	0
	98.41%	0.00%	0.00%	1.59%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	55.10%	7.14%	23.47%	5.10%	1.02%	0.00%	0.00%	0.00%	1.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	52.81%	6.74%	22.47%	32.58%	5.62%	1.12%	1.12%	15.73%	5.62%	8.99%	0.00%	0.00%	0.00%
	0.00%	0.00%	0.00%	50.00%	0.00%	0.00%	0.00%	50.00%	0.00%	0.00%	50.00%	83.33%	0.00%
	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	80.00%
	12.28%	0.00%	0.00%	40.35%	3.51%	1.75%	0.00%	31.58%	0.00%	1.75%	12.28%	0.00%	5.26%
	2.56%	0.00%	0.00%	56.41%	7.69%	0.00%	0.00%	33.33%	0.00%	10.26%	23.08%	5.13%	5.13%
	50.00%	0.00%	0.00%	14.29%	14.29%	0.00%	0.00%	0.00%	78.57%	7.14%	0.00%	0.00%	0.00%

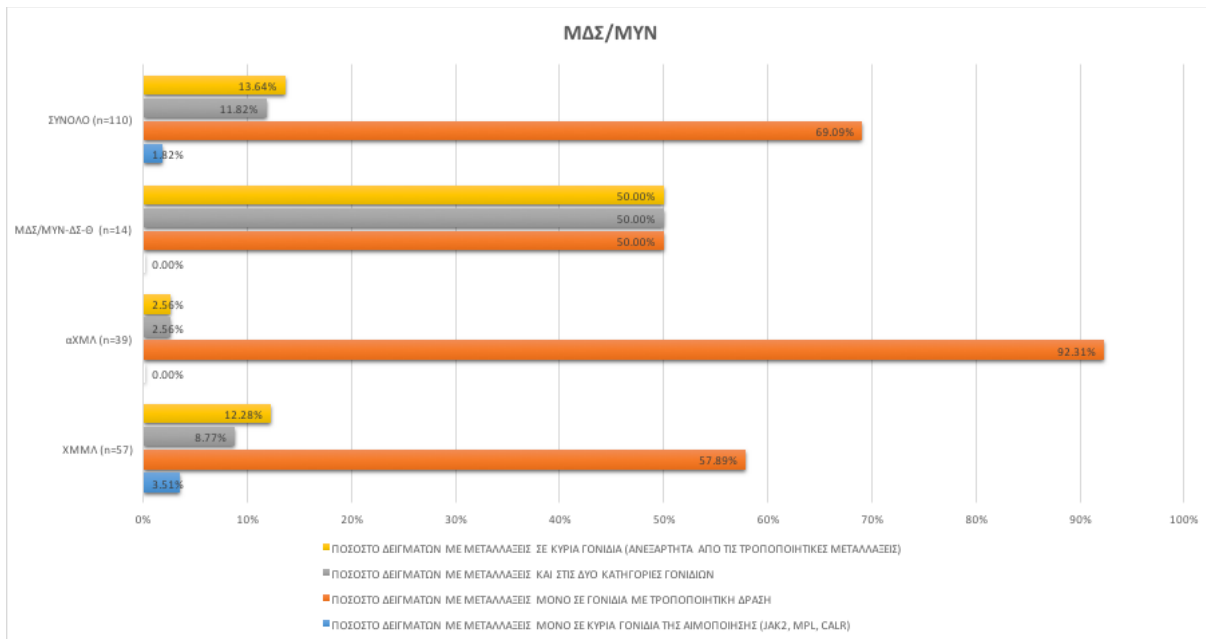
Πίνακας 71. Πλήθος και ποσοστιαία αναλογία μεταλλάξεων, όπως ανιχνεύθηκαν από τις αναλύσεις HRMA, ταξινομημένα ανά νοσολογική οντότητα.

Συνοψίζοντας, τα MYN χαρακτηρίζονται σε μεγάλο ποσοστό από πολύ συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα στην ΑΠ ανιχνεύονται μεταλλάξεις *JAK2* στα εξόνια 12 και 14, σχεδόν καθολικά. Στις ΙΘ και ΜΙ εντοπίζονται συχνά μεταλλάξεις στα 3 γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου, *JAK2*, *MPL* και *CALR*, ωστόσο, οι ασθενείς με ΜΙ φέρουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις με τροποποιητική δράση και μάλιστα σε κατηγορίες γονιδίων με ετερογενή δράση, κάτι που συναντάται σποραδικά στις ΙΘ και ΑΠ. Τέλος, οι ασθενείς με ΣΜ και ΧΟΛ, εμφανίζουν κυρίως από μεταλλάξεις *KIT* και *CSF3R*, αντίστοιχα, παράλληλα, από αυτές τις υποκατηγορίες νοσημάτων απουσιάζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου.



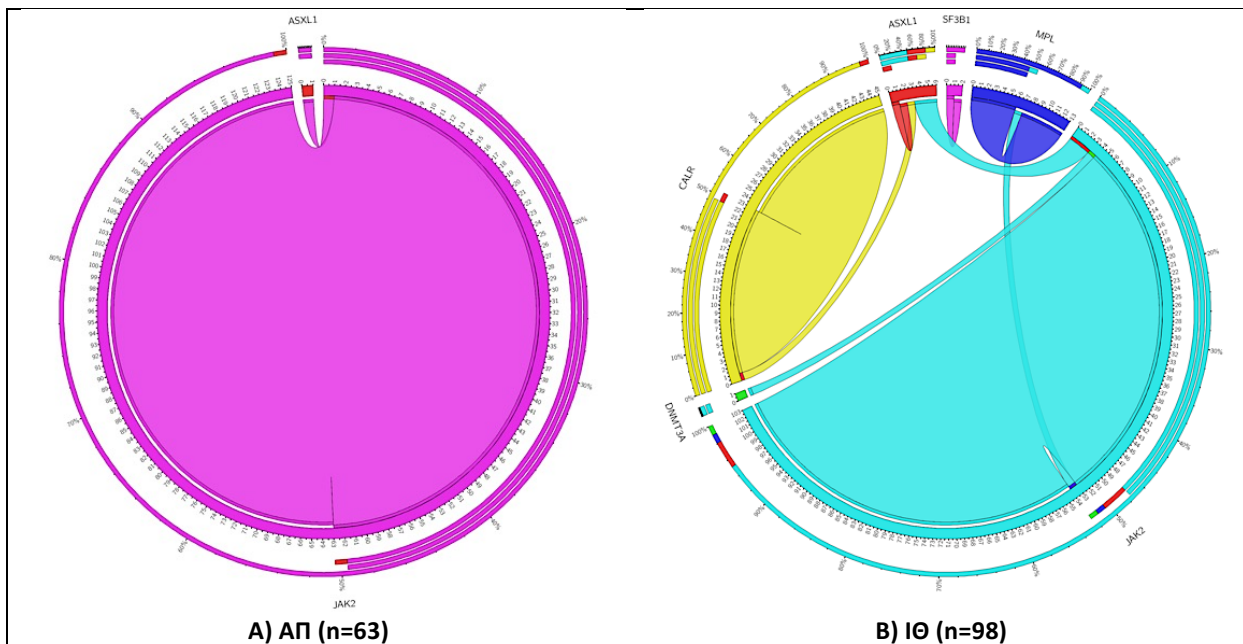
Εικόνα 115. Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου ή/και σε τροποποιητικά γονίδια της αιμοποίησης ανά υποομάδα, αλλά και στο σύνολο των ασθενών με MYN.

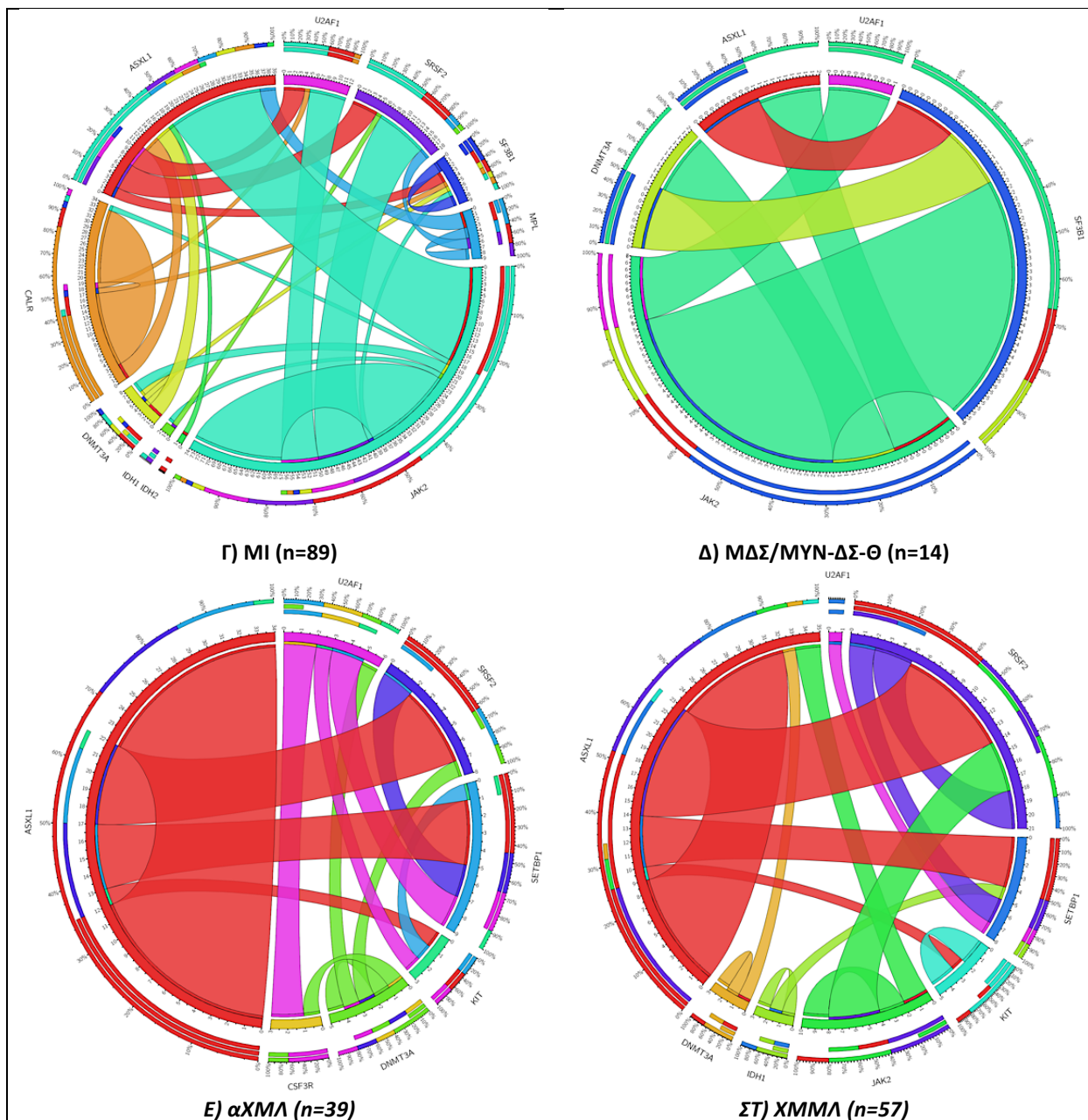
Αντίθετα με τα MYN, τα ΜΔΣ/MYN χαρακτηρίζονται κυρίως από μεταλλάξεις σε διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων με τροποποιητική δράση. Λιγότερο συχνά και κυρίως στα ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ και αΧΜΛ, αυτές συνδυάζονται με μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου, συνηθέστερα στο *JAK2*, δικαιολογώντας ίσως σε ένα βαθμό τον αλληλεπικαλυπτόμενο χαρακτήρα των ΜΔΣ/MYN. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταλλάξεις σε γονίδια, που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος όπως τα *JAK2*, *MPL* και ίσως *CALR*, προσδίδουν σε αυτή τη νοσολογική οντότητα έναν υπερπλαστικό χαρακτήρα, ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό ωρίμανσης του RNA, στην επιγενετική ρύθμιση του κυττάρου και σε άλλες διεργασίες, ενδεχομένως ευθύνονται για τα δυσπλαστικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 116. Συγκριτική ανάλυση της εκατοστιαίας αναλογίας των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου ή/και σε τροποποιητικά γονίδια της αιμοποίησης ανά υποομάδα, αλλά και στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Η συνύπαρξη μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια ανά νόσημα, γίνεται εμφανέστερη μέσω των χαρακτηριστικών για αυτού του είδους τις αναλύσεις, γραφημάτων Circos, όπως αυτά που παρουσιάζονται στη συνέχεια.





Εικόνα 117. Κυκλικά διαγράμματα *circos* (*circos plots*). Οι γραφικές αυτές αναπαραστάσεις φανερώνουν τη συνανίχνευση των μεταλλάξεων στα επιμέρους νοσήματα. Η ΑΠ χαρακτηρίζεται αποκλειστικά από μεταλλάξεις στο γονίδιο *JAK2*, ενώ η ΙΘ από μεταλλάξεις στα γονίδια *JAK2*, *MPL* και *CALR*. Οι ασθενείς με ΜΙ αντίθετα, παρουσιάζουν ετερογένεια όσον αφορά στο μοριακό προφίλ, αφού αρκετοί από αυτούς φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου, σε συνδυασμό όμως με επιπρόσθετες τροποποιητικές μεταλλάξεις. Οι ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ φέρουν μεταλλάξεις *JAK2* και *SF3B1* σε μεγάλο ποσοστό. Αντίστοιχα, οι ασθενείς με αΧΜΛ και ΧΜΜΛ χαρακτηρίζονται κυρίως από μεταλλάξεις στα γονίδια *ASXL1*, *SRSF2* και *SETBP1*.

6.2.2. Η διαγνωστική αξία των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στα υπό μελέτη γονίδια

Η ετερογένεια των υποκείμενων μοριακών βλαβών που χαρακτηρίζει τα MYN, κυρίως δε τη MI, καθώς και τα ΜΔΣ/MYN, δημιουργεί ένα περίπλοκο γενωμικό τοπίο, όπου μέχρι και σήμερα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητό.

Παρόλα αυτά η τεράστια πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στα πλαίσια του μοριακού χαρακτηρισμού των μυελικών νεοπλασιών και στην ανάδειξη νέων μοριακών βλαβών, έχει οδηγήσει σε σημαντικές βελτιώσεις σε ό,τι αφορά στην πρόγνωση αλλά και στην αξιολόγηση του κινδύνου των ασθενών ανάλογα με το είδος, το συνδυασμό και τον αριθμό των μεταλλάξεων που φέρει.

Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια έχουν συσχετιστεί ισχυρά με την έκβαση της νόσου, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις σε κάποια από αυτά να σχετίζονται με καλύτερη (π.χ. *SF3B1*) ή με χειρότερη πρόγνωση (π.χ. *IDH1/2*), ενώ πρόσφατες, πολυκεντρικές μελέτες υποδεικνύουν πως η συσσώρευση μεταλλάξεων (≥ 2 μεταλλάξεις) σε συγκεκριμένα γονίδια συσχετίζεται σημαντικά με πτωχή πρόγνωση και χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με ασθενείς που φέρουν μία ή καμία μετάλλαξη (Paraemmanuil et al. 2013, Ganguly and Kadam, 2016).

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, γίνεται προφανές ότι υπάρχει τόσο ποιοτική (είδος γονιδίου που έχει υποστεί μετάλλαξη), όσο και ποσοτική (αριθμός μεταλλαγμένων γονιδίων) επίδραση στη διαμόρφωση του κλινικού φαινοτύπου των ασθενών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μετάλλαξη V617F του γονιδίου *JAK2*. Η μετάλλαξη αυτή χαρακτηρίζει κυρίως ασθενείς με MYN, ενώ παράλληλα εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά ασθενών με ΜΔΣ/MYN και συγκεκριμένα ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ. Σε μικρότερα ποσοστά ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα γονίδια *MPL* και *CALR* (Bilbao-Sieyro et al. 2013, He et al. 2013, Patnaik and Tefferi 2015, Giannopoulos et al. 2019).

Οι μεταλλάξεις και στα τρία αυτά γονίδια οδηγούν άμεσα (*JAK2*, *MPL*) ή έμμεσα (*CALR*) σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος JAK/STAT, έτσι η παρουσία μεταλλάξεων σε κάποιο από αυτά τα γονίδια εν μέρει αιτιολογεί τα χαρακτηριστικά υπερπλασίας που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένες νοσολογικές ομάδες.

Στην παρούσα εργασία η μετάλλαξη *JAK2V617F* ανιχνεύεται σε περίπου 94% των περιπτώσεων ασθενών με ΑΠ και κατά προσέγγιση στο 50% των ασθενών με MI, ΙΘ ή ΜΔΣ/MYN-ΔΣ-Θ, ενώ στο σύνολο των ασθενών με ΜΔΣ/MYN που μελετήθηκαν, αυτή ανιχνεύεται σε ποσοστό περίπου 14%. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και συνάδουν με την τρέχουσα βιβλιογραφία (Patnaik and Tefferi 2015).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *MPL* ανιχνεύθηκαν σε περίπου 7% των ασθενών με ΙΘ ή με MI και σε κανέναν από τους ασθενείς με ΜΔΣ/MYN που μελετήθηκαν, όπου αποτελεί σπάνιο συμβάν όπως επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα μεγάλων πολυκεντρικών μελετών. Η παρουσία μεταλλάξεων *MPL* στην ΙΘ και στη MI, συσχετίζεται με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά στο μυελό των οστών, αναιμία και υψηλό απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων, δηλαδή κλινικά γνωρίσματα που απαντώνται και στην νοσολογική οντότητα των ΜΔΣ/MYN (Patnaik and Tefferi 2015).

Σε ό,τι αφορά στις μεταλλάξεις στο γονίδιο *CALR* αυτές ανιχνεύθηκαν σε περίπου 23% των ασθενών με ΙΘ ή MI, όχι όμως και σε ασθενείς με ΜΔΣ/MYN, όπου απαντώνται σποραδικά, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μια μάλλον σπάνια μοριακή βλάβη. Οι μεταλλάξεις *CALR* σε ασθενείς με MYN, επίσης συσχετίζονται με δυσπλαστικά χαρακτηριστικά στο μυελό των οστών,

αναιμία και υψηλό απόλυτο αριθμό αιμοπεταλίων, δηλαδή κλινικά γνωρίσματα που απαντώνται και στην νοσολογική οντότητα των ΜΔΣ/ΜΥΝ (Patnaik and Tefferi 2015).

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2*, του επιγενετικού μηχανισμού, εντοπίστηκαν σε μόλις δύο και σε μία περιπτώσεις, αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις *IDH1* ανιχνεύθηκαν σε έναν ασθενή με ΜΙ σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στα γονίδια *JAK2* και *SRSF2* και σε έναν με ΧΜΜΛ, όπου συνανιχνεύθηκε μία μετάλλαξη *SETBP1*, ενώ η μετάλλαξη *IDH2* σε έναν ασθενή με ΜΙ, μαζί με μετάλλαξη *ASXL1*. Τα γονίδια *IDH1/2* εντοπίζονται σπάνια μεταλλαγμένα και σε χαμηλό ποσοστό ασθενών (κοντά στο 5%) ακόμα και σε πολυπληθείς μελέτες. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια σχετίζονται με πολύ χαμηλότερη συνολική επιβίωση των ασθενών με μυελικές νεοπλασίες, καθώς και με αυξημένο κίνδυνο μετασχηματισμού προς ΟΜΛ, συγκριτικά με ασθενείς χωρίς τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις (Tefferi et al. 2010, Tefferi et al. 2012, Laborde et al. 2013, Vannucchi et al. 2013, Nangalia and Green 2017).

Δυσμενή πρόγνωση προσδίδουν και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A* σε ασθενείς με ΜΥΝ και ΜΔΣ/ΜΥΝ, ειδικότερα εκείνες που αφορούν στο αμινοξύ R882, αφού έχουν συσχετισθεί με μικρό προσδόκιμο ζωής και αυξημένο κίνδυνο λευχαιμογένεσης (Im et al. 2014, Wang et al. 2014, Balasubramanian et al. 2017). Πρόσφατα δεδομένα, υποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις *DNMT3A* αποτελούν πρώιμη ή ακόμη και πρωταρχική μοριακή βλάβη, σε αρκετές περιπτώσεις μυελικών νεοπλασιών (Nangalia et al. 2015, Ganguly and Kadam 2016). Ειδικότερα στα ΜΥΝ, η σειρά με την οποία εμφανίζονται οι μεταλλάξεις *DNMT3A*, φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον κλινικό φαινότυπο. Σε γενικές γραμμές, εμφάνιση της *JAK2V617F* σε *DNMT3A* ή/και *TET2*-αρνητικό υπόβαθρο οδηγεί σε εκδήλωση ΑΠ, ενώ αντίθετα, εμφάνιση μεταλλάξεων *DNMT3A* ή *TET2* πριν από την *JAK2V617F*, προάγει την ΙΘ (Nangalia et al. 2015). Στη παρούσα εργασία, στην κοορτή των ΜΥΝ, μεταλλάξεις *DNMT3A* ανιχνεύθηκαν σε μία περίπτωση ασθενούς με ΙΘ, σε συνανίχνευση με την *JAK2V617F*, καθώς και σε 5 ασθενείς με ΜΙ, όπου στις τέσσερις περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικούς συνδυασμούς με επιπρόσθετες μεταλλάξεις στα γονίδια *JAK2*, *ASXL1* και *SF3B1* και σε μία μόνο περίπτωση η μετάλλαξη *DNMT3A* ανιχνεύθηκε ως αποκλειστικό μοριακό συμβάν. Στα ΜΔΣ/ΜΥΝ, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις *DNMT3A* σε 2 περιπτώσεις ΧΜΜΛ, μία ως μοναδική γενετική βλάβη και μία σε συνδυασμό με *ASXL1*, σε 3 περιπτώσεις αΧΜΛ, σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις και σε 2 περιπτώσεις ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ, στη μία μαζί με *JAK2* και στην άλλη με *SF3B1*.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1*, που οδηγούν σε μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations), όπως και εκείνες που οδηγούν σε τερματισμό της μεταγραφής (nonsense mutations), σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση, σε αντίθεση με εκείνες που οδηγούν σε αμινοξική υποκατάσταση (missense mutations). Χαρακτηριστικά στη ΜΙ και στη ΧΜΜΛ, οι οποίες αποτελούν τις πιο κοινές κατηγορίες των ΜΥΝ και ΜΔΣ/ΜΥΝ, αντίστοιχα, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* εμφανίζονται σε περίπου 30% και 40% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Μάλιστα, οι μεταλλάξεις αυτές, συνηγορούν σε μικρότερη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΜΙ και ΧΜΜΛ, ενώ παράλληλα στη ΜΙ φαίνεται πως ταυτόχρονα επιταχύνεται η λευχαιμογένεση, κάτι που δε συμβαίνει στη ΧΜΜΛ (Gelsi-Boyer et al. 2012, Alvarez Argote and Dasanu 2018). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γονίδιο *ASXL1*, εμφανίζεται αρκετά συχνά μεταλλαγμένο σε ασθενείς, τόσο με ΜΥΝ, όσο και με ΜΔΣ/ΜΥΝ. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΜΙ που ελέγχθηκαν θετικοί για μετάλλαξη *ASXL1* ανέρχονται σε 29, οι περιπτώσεις ΧΜΜΛ σε 23 και οι αΧΜΛ σε 22. Σπανιότερα ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στις ΑΠ, ΙΘ, ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ και ΧΟΛ. Και ενώ σε όλες τις περιπτώσεις ΜΙ, οι μεταλλάξεις *ASXL1*

ανιχνεύονται σε συνδυασμό με μεταλλάξεις σε γονίδια που καθορίζουν το φαινότυπο της νόσου ή/και σε επιπλέον τροποποιητικά γονίδια της αιμοποίησης, στις ΧΜΜΛ και αΧΜΛ, εμφανίζεται αυξημένο το ποσοστό των ασθενών στους οποίους εντοπίζονται μεμονωμένες μεταλλάξεις *ASXL1*, χωρίς επιπρόσθετη μοριακή βλάβη (9/23 ΧΜΜΛ και 12/22 αΧΜΛ). Αυτό ενδεχομένως οφείλεται σε τεχνικούς περιορισμούς, αφού με την τεχνική HRMA, δεν είναι εφικτό να ελεγχθούν όλα εκείνα τα γονίδια που ανιχνεύονται συχνά μεταλλαγμένα στα ΜΔΣ/ΜΥΝ, ενδεικτικά ανφερόμαστε στα *TET2*, *(N/K)RAS*, *RUNX1* και άλλα (Meggendorfer et al. 2018).

Το γονίδιο *SRSF2* εμφανίζεται συχνά μεταλλαγμένο σε ασθενείς με ΧΜΜΛ, αΧΜΛ και ΜΙ. Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην αμινοξική θέση 95 και αφορούν σε αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη (P) με ένα εκ των αλανίνη (A), λευκίνη (L), ή ιστιδίνη (H). Οι μεταλλάξεις *SRSF2* δε φαίνεται να σχετίζονται πάντα με χειρότερη πρόγνωση, όπως συμβαίνει με τις μεταλλάξεις *ASXL1*, μάλιστα η αμινοξική υποκατάσταση P95H έχει παρατηρηθεί πως συνεργεί σε καλύτερη πρόγνωση συγκριτικά με τις P95A και P95L (Meggendorfer et al. 2012). Στην αΧΜΛ οι μεταλλάξεις *SRSF2* συχνά συνανιχνεύονται με μεταλλάξεις *ASXL1* και *SETBP1*, οι οποίες ούτως ή άλλως συμβάλλουν σε χειρότερο κλινικό αποτέλεσμα (Itzykson et al. 2013, Aujla et al. 2018). Στη δική μας κοορτή ασθενών με αΧΜΛ, η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται αφού συνολικά από 4 ασθενείς σε κάθε περίπτωση έφεραν τους συνδυασμούς *SRSF2-ASXL1* και *SRSF2-SETBP1*, 1 ασθενής έφερε και τις τρεις αυτές μεταλλάξεις (*SRSF2-ASXL1-SETBP1*), 1 έφερε το συνδυασμό *SRSF2-DNMT3A*, ενώ μονάχα 6 χαρακτηρίζονταν από τη μετάλλαξη *SRSF2* και καμία άλλη μοριακή βλάβη για τα γονίδια που μελετήθηκαν. Τέλος, στη ΜΙ, κανένας ασθενής με μετάλλαξη *SRSF2* δεν έφερε παράλληλα μετάλλαξη *CALR*, γεγονός που συνάδει με βιβλιογραφικά δεδομένα, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την επιβίωση της συγκεκριμένης ομάδας, συγκριτικά με ασθενείς που φέρουν συνδυασμούς μεταλλάξεων *JAK2-SRSF2* και *MPL-SRSF2*. Ανεξαρτήτως, είναι ωστόσο γνωστό, πως οι ασθενείς με μεταλλάξεις *JAK2*, όπως επίσης οι τριπλά αρνητικοί ασθενείς (*JAK2-MPL-CALR*) έχουν χειρότερη επιβίωση συγκριτικά με τους *CALR*⁺ ασθενείς (Bartels et al. 2015).

Όσον αφορά σε μεταλλάξεις *SF3B1*, στην περίπτωση των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ το ποσοστό αυτών ανέρχεται σε 78.57%. και συνάδει με εκείνο που αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία (65-80%) για τη συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα (Paraemmanuil et al. 2011, Chesnais et al. 2012, Wan et al. 2013). Επιβεβαιώνεται έτσι, ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου *SF3B1* συσχετίζονται σημαντικά με τον παθολογικό αυτό φαινότυπο, ώστε πλέον οι *SF3B1*-θετικοί ασθενείς θεωρούνται ξεχωριστή κλινική οντότητα σύμφωνα με την πρόσφατη αναθεώρηση του ΠΟΥ (Arber et al. 2016). Η έλλειψη, μεταλλάξεων *SF3B1* στο υπόλοιπο ποσοστό ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ δημιουργεί ερωτήματα για το λόγο εμφάνισης δακτυλιωτών σιδηροβλαστών σε αυτούς τους ασθενείς. Αρκετοί από αυτούς στην παρούσα μελέτη φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *JAK2*, *ASXL1* και άλλα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η εμφάνιση του φαινοτύπου των δακτυλιωτών σιδηροβλαστών οφείλεται όχι μόνο σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* αλλά και σε συνδυασμό επιπρόσθετων γονιδίων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση του ίδιου φαινοτύπου, τονίζοντας για ακόμη μια φορά την μεγάλη ετερογένεια των μοριακών ανωμαλιών, που διέπουν τις ομάδες αυτών των μυελικών νεοπλασιών.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *U2AF1* ανιχνεύθηκαν σε 14 περιπτώσεις ασθενών, εκ των οποίων 1 αφορούσε σε ασθενή με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ, ο οποίος ελέγχθηκε αρνητικός για μετάλλαξη *SF3B1*, 8 περιπτώσεις αφορούσαν σε ασθενείς με ΜΙ, 4 περιπτώσεις αΧΜΛ και 1 ΧΜΜΛ. Συνολικά, μεταλλάξεις στο γονίδιο *U2AF1* ανιχνεύονται σε 4% των περιπτώσεων που μελετήθηκαν,

ποσοστό ελάχιστα χαμηλότερο από αυτό που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία (Ganguly and Kadam, 2016). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *U2AF1* σε ασθενείς με ΧΜΜΛ, ΟΜΛ, ΜΥΝ και ΜΔΣ, συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και αυξημένη πιθανότητα εκτροπής της νόσου προς ΟΜΛ (Yoshida et al. 2011, Graubert et al. 2012, Przychodzen et al. 2013).

Οι μεταλλάξεις *CSF3R*, φαίνεται να εμφανίζονται αποκλειστικά σε ασθενείς με ΧΟΛ (80-90%). Επομένως, η ανίχνευση αυτών αποτελεί ένα πολύτιμο κριτήριο διαφοροδιάγνωσης, αφού πολλές φορές η διάκριση μεταξύ ΧΟΛ, αΧΜΛ και ΧΜΜΛ είναι ιδιαίτερα δύσκολη, δεδομένου ότι τα τρία αυτά νοσήματα μοιράζονται παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως ο αυξημένος αριθμός ουδετερόφιλων και η παρουσία βλαστών (Maxson et al. 2013, Wang et al. 2014, Dao et al. 2017). Κοινές μεταλλάξεις, σε άλλα γονίδια, όπως στα *SETBP1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ASXL1* και *TET2*, ανιχνεύονται και στις τρεις προαναφερθείσες καταστάσεις. Μάλιστα, οι μεταλλάξεις *ASXL1*, καθώς και οι *SETBP1* σε συνδυασμό με εκείνες στο γονίδιο *CSF3R*, παρατηρούνται σε ποσοστό περίπου 45-57% και 14-35% των ασθενών με ΧΟΛ, αντίστοιχα, ενώ φαίνεται να σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση νόσου, σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις *CSF3R* οι οποίες μεμονωμένα δε φαίνεται να επηρεάζουν τα προγνωστικά δεδομένα (Dao KH and Tyner 2015, Elliott and Tefferi 2016, Maxson JE and Tyner 2017, Szuber et al 2018).

Οι μεταλλάξεις *SETBP1* ανιχνεύονται σε υψηλό ποσοστό ασθενών με αΧΜΛ (24-32%) ή με ΧΟΛ (25%), στην τελευταία κατάσταση σε συνδυασμό με μεταλλάξεις *CSF3R*, σπανιότερα δε παρατηρούνται σε περιπτώσεις ΧΜΜΛ (4-7%), ΜΔΣ (2%), ΠΜΙ και ΟΜΛ.

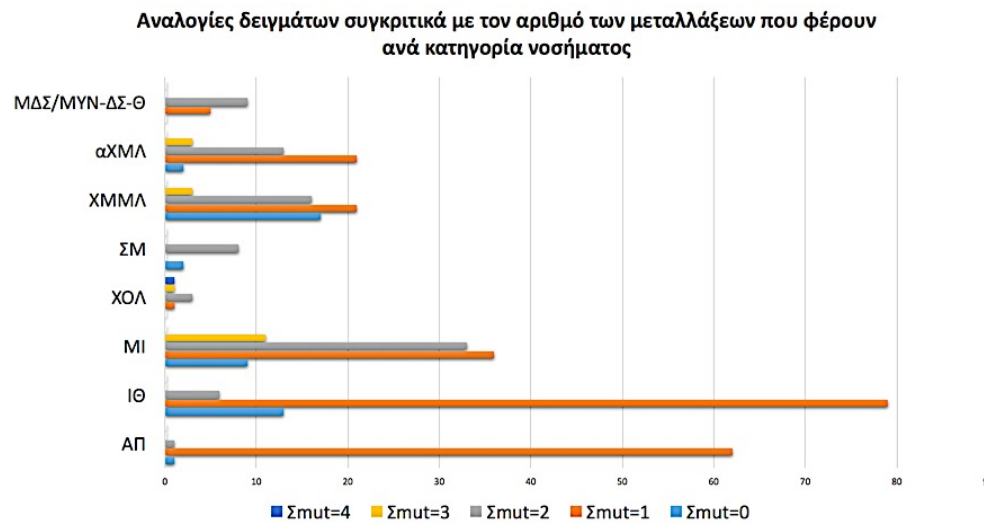
Αποτελούν παράγοντα ιδιαίτερα δυσμενούς πρόγνωσης, ειδικά δε, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις *CBL* ή *ASXL1*. Ασθενείς με μεταλλάξεις *SETBP1* παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη μέση επιβίωση 22 μηνών, συγκριτικά με τους 77 μήνες που επιβιώνουν κατά μέσο όρο οι ασθενείς χωρίς τέτοιες μεταλλάξεις. Και ενώ οι μεταλλάξεις *ASXL1* και *SETBP1* συχνά συνανιχνεύονται, δεν συμβαίνει το ίδιο με τις μεταλλάξεις *TET2*, που εμφανίζονται ως μοριακός δείκτης ανεξάρτητος των μεταλλάξεων *SETBP1* (Makishima et al. 2013, Piazza et al. 2013, Zoi and Cross 2015, Clara et al. 2016, Elliott and Tefferi 2016, Shou et al. 2017).

Στην πλειονότητα των ασθενών με συστηματική μαστοκυττάρωση (82-89%), ανιχνεύονται σωματικές μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας (GOF mutations), με συχνότερη την D816V, καθώς και άλλες πιο σπάνιες, όπως οι D816(H/Y), στο εξόνιο 17 του γονιδίου *KIT* (Soucie et al. 2012, Jawhar et al. 2016). Οι μεταλλάξεις του υποδοχέα *KIT* απαντώνται από κοινού, τόσο σε ήπιες, όσο και σε πιο επιθετικές μορφές μαστοκυττάρωσης, χωρίς να σχετίζονται με κάποια από τις δύο καταστάσεις. Ωστόσο, φαίνεται πως δεν επαρκούν για περαιτέρω εξέλιξη της νόσου, αφού έχει παρατηρηθεί πώς σε τέτοιες καταστάσεις ανιχνεύονται επιπρόσθετες μεταλλάξεις (Soucie et al. 2012). Τέτοιες μοριακές βλάβες εντοπίζονται συχνά στο γονίδιο *TET2*, σε κυμαινόμενο ποσοστό ασθενών με συστηματική μαστοκυττάρωση (15-47%), ανάλογα με τη βαρύτητα της ασθένειας και συχνά (50%), παράλληλα με τις μεταλλάξεις *KIT* D816. Οι περιπτώσεις αυτές σχετίζονται με μονοκυττάρωση και με επιθετικές μορφές της νόσου, χωρίς όμως να επηρεάζεται η συνολική επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον μεταλλάξεις με ιδιαίτερα κακή πρόγνωση συνανιχνεύονται συχνά στα γονίδια *ASXL1* (20-29%), *SRSF2* (40-43%), *RUNX1* (8-23%), *N/KRAS* (14-16%), και *IDH2* (4-8%), σε προχωρημένα στάδια της νόσου (Tefferi et al. 2009, Soucie et al. 2012). Επιπρόσθετες μεταλλάξεις, οι οποίες συμβάλλουν σε πιο ήπιο φαινότυπο, απαντώνται στα γονίδια *JAK2* (16%), *EZH2* (10%) και σε μικρότερο ποσοστό (<10%) σε άλλα γονίδια (*U2AF1*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *TP53*). Ωστόσο, οι παραπάνω προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν είναι αποκλειστικές της μαστοκυττάρωσης (Jawhar et al. 2016, Jawhar et al. 2017).

Στο σημείο αυτό, σημαντικό είναι να τονισθεί για μία ακόμη φορά, πως στην εκδήλωση και παθογένεια των μυελικών νεοπλασιών, όπως φαίνεται άλλωστε και στην παρούσα μελέτη, οι παραπάνω μεταλλάξεις δεν συμβάλλουν πάντα μεμονωμένα, αφού στην πλειονότητα των περιπτώσεων, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο συνδυασμός αυτών μεταξύ τους.

Εξαιρέση αποτελούν οι μεταλλάξεις *SF3B1* που πλέον θεωρούνται και ως κύριες μεταλλάξεις στους ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ, χωρίς ωστόσο να αποτελούν την μοναδική αιτία για την εμφάνιση του φαινοτύπου των δακτυλιωτών σιδηροβλαστών, όπως επίσης οι μεταλλάξεις *CSF3R* στη ΧΟΛ και οι μεταλλάξεις *KIT* στη ΣΜ.

Ο συνδυασμός μεταλλάξεων των υπό μελέτη γονιδίων τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλες υποκείμενες γενετικές ανωμαλίες στο πέρασμα του χρόνου συμβάλλει σημαντικά στον κλινικό φαινότυπο νόσου, στην επιθετικότητα και στην μετέπειτα εξέλιξη της, με την συσσώρευση γονιδιακών μεταλλάξεων σε αυτά τα γονίδια να οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση και μεγαλύτερη πιθανότητα εκτροπής προς ΟΜΛ (Larsson et al. 2013).



Εικόνα 118. Πλήθος μεταλλάξεων ανά ασθενή. Ο αριθμός μεταλλάξεων που συσσωρεύονται στον εκάστοτε αιματολογικό ασθενή, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Περίπου 50% των ασθενών με ΜΙ εμφανίζουν περισσότερες από 2 μεταλλάξεις. Αντίθετα, το μοριακό τοπίο των ΑΠ και ΙΘ είναι λιγότερο ετερογενές, αφού οι ασθενείς εμφανίζουν 1 μόνο μετάλλαξη στην πλειονότητα των περιπτώσεων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της ήδη υπάρχουσας βιβλιογραφίας, ενώ τυχόν αποκλίσεις, πέραν των λόγων που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα γονίδια ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία της κωδικής τους αλληλουχίας, όπου παρατηρούνται τα υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων, και όχι σε όλη την έκταση αυτών.

Η προσπάθεια απόλυτης αντιστοίχισης των αποτελεσμάτων της ανάλυσης HRMA με εκείνα μεγάλων πολυκεντρικών ερευνών δεν είναι δυνατή, παρέχει ωστόσο σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη διαστρωμάτωση της πρόγνωσης και της εξέλιξης της νόσου, ενώ αναδεικνύει το πολύπλοκο μοριακό τοπίο που χαρακτηρίζει τις μυελικές νεοπλασίες.

6.2.3. Η τεχνική HRMA ως ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδεικνύουν την χρησιμότητα του μοριακού ελέγχου για τις μεταλλάξεις των γονιδίων του επιγενετικού μηχανισμού και του μηχανισμού ματίσματος του RNA ασθενών με MYN και ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Σημαντικό, είναι δε ο μοριακός έλεγχος να γίνεται τόσο στην αρχή της νόσου όσο και κατά την διάρκεια της για την καλύτερη παρακολούθηση αυτής, την αποτελεσματικότερη αξιολόγηση του κινδύνου για κάθε ασθενή, αλλά και την καλύτερη θεραπευτική επιλογή, εάν αυτή υπάρχει.

Συνοπτικά, η τεχνική HRMA και το πάνελ γονιδίων που σχεδιάσαμε:

- Έχει τη δυνατότητα ελέγχου έως και 46 δειγμάτων ανά αντίδραση. (Κάθε πάνελ έχει 96 θέσεις αντιδράσεων όπου το κάθε δείγμα αναλύεται εις διπλούν ως τεχνικό αντίγραφο).
- Ο σχεδιασμός που έχει γίνει, παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης περισσότερων γενωμικών περιοχών, σε μία αντίδραση Real-time PCR, με τις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας.
- Ο χρόνος της εκάστοτε αντίδρασης δεν ξεπερνά τις 2 ώρες και τα αποτελέσματα μπορούν να αναλυθούν απ' ευθείας σε Η/Υ με ειδικό λογισμικό.
- Ο όγκος που απαιτείται για κάθε αντίδραση είναι μικρός, μειώνοντας έτσι το κόστος των αναλώσιμων.
- Υπό κατάλληλες συνθήκες σχεδιασμού και ανάλυσης, αλλά και με την χρήση γνωστών δειγμάτων μπορεί να παρέχει τον ακριβή τύπο της εκάστοτε μετάλλαξης, χωρίς την ανάγκη για προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας μίας γενωμικής περιοχής.
- Η ευαισθησία της ανάλυσης φθάνει το 2.5% και υπό κατάλληλες συνθήκες σχεδιασμού και ανάλυσης το 1.0%, σε μελέτες ευαισθησίας που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο μας σε αντίθεση με την ευαισθησία του Sanger Sequencing που φθάνει μόλις το 7-10%.

Η post Real-time PCR HRMA αποτελεί τελικά μια γρήγορη, οικονομική, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο για την ταυτόχρονη ανίχνευση μεταλλάξεων στις υπό μελέτη περιοχές γονιδίων και άρα ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο.

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα τμήματα νουκλεϊκών οξέων που αναλύονται μέσω HRMA ή με άλλες τεχνικές, οι οποίες διερευνούν μεμονωμένες γενωμικές περιοχές, είναι περιορισμένα σε έκταση. Επομένως η ανάλυση ολόκληρων γονιδίων, είτε καθίσταται ανέφικτη, είτε αποτελεί μία ιδιαίτερα επίπονη, χρονοβόρα και με υψηλό κόστος διαδικασία.

Η τεχνολογία NGS, μπορεί να καλύψει το κενό αυτό, αφού σε πολλές περιπτώσεις μυελικών νεοπλασιών, κρίνεται σκόπιμος ο χαρακτηρισμός περισσότερων ή ακόμη και όλων των κωδικοποιών εξονίων ορισμένων γονιδίων, καθώς αυτά συχνά χαρακτηρίζονται από διάσπαρτες επιβλαβείς γενετικές αλλαγές.

6.3. Ανίχνευση μεταλλάξεων με τεχνολογία δεύτερης γενιάς για τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (NGS)

Η τεχνική του στοχευμένου προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής ακολουθίας με ενσωμάτωση αναλυτών δεύτερης γενιάς (NGS) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη (1-5%) σε σχέση με άλλες μεθόδους μοριακής βιολογίας, που επίσης χρησιμεύουν ως διαγνωστικά και προγνωστικά εργαλεία.

Επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης διερεύνησης περισσότερων γενωμικών περιοχών, ολόκληρων εξονίων ή γονιδίων, για περισσότερους από έναν ασθενείς σε μία μόνο αντίδραση.

Τα προαναφερθέντα τεχνικά χαρακτηριστικά βελτιστοποιούνται μέσω αντιδραστηρίων καλύτερης χημείας, ακριβέστερων αλγόριθμων βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων NGS, πληρέστερων βάσεων δεδομένων, αλλά και πιο εκλεπτυσμένων στατιστικών μοντέλων, με βάση τα οποία χαρακτηρίζεται η παθογένεια των ανιχνευόμενων μοριακών βλαβών.

Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τη σταδιακή μείωση του κόστους λειτουργίας των συσκευών NGS, αναμένεται να ωθήσουν τα εργαστήρια, να στραφούν προς αυτή την τεχνολογία για τη διάγνωση πληθώρας νοσημάτων, στο άμεσο μέλλον (Metzker 2011, Nagarajan and Pop 2013, Hodkinson and Grice 2015, Goodwin et al. 2016, Wartman and Mardis 2016).

Το πρωτόκολλο NGS που αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, αποσκοπεί στην ανάδειξη μεταλλάξεων σε γονίδια που μετέχουν σε διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες, ενώ εμπλέκονται στην εμφάνιση και εξέλιξη ετερογενών κατηγοριών μυελικών διαταραχών.

Με τη μέθοδο αυτή ταυτοποιήσαμε μεταλλάξεις, σε ασθενείς για τους οποίους δεν είχαμε προηγουμένως καταφέρει να αποκομίσουμε μοριακά δεδομένα με τη χρήση συμβατικών τεχνικών, οι οποίες μελετούν μεμονωμένες γενωμικές περιοχές.

Συνολικά, 25 ασθενείς με αιματολογικές διαταραχές, μελετήθηκαν μέσω της τεχνολογίας NGS, για την ύπαρξη μοριακών βλαβών, σε διάφορες επιμέρους περιοχές 26 γονιδίων-στόχων, που ανιχνεύονται συχνά μεταλλαγμένα σε αυτές τις κατηγορίες νοσημάτων. Συγκεκριμένα, η ανάλυση αφορά στα γονίδια *ASXL1*, *BCOR*, *BCORL1*, *CALR*, *CBL*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *GATA1*, *GATA2*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KRAS*, *MPL*, *NRAS*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *ZRSR2*.

A/A	Μυελική Νεοπλασία	Μεταλλάξεις
6578	MYN (AT)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:261, VAF:14.91%]
9530	MYN (AT)	-
9338	MYN (IO)	-
9386	MYN (IO)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:326, VAF:50.92%] SF3B1 : c.1998G>T, p.K666N [DP:241, VAF:42.74%]
9645	MYN (IO)	-
9759	MYN (IO)	-
1222	MYN (MI ως εξέλιξη από AT)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:306, VAF:93.42%]
9130	MYN (MI ως εξέλιξη από IO)	ASXL1 : c.1888_1910del23, p.E635fs*15 [DP:254, VAF:32.00%] CALR : c.1322_1346del19, p.K375fs*49 [DP:259, VAF:33.98%] CALR : c.1154_1155insTTGTC, p.K385fs*47 [DP:381, VAF:52.50%] EZH2 : c.2069G>C, p.R690P [DP:351, VAF:80.39%]
7071	MYN (PMI)	-
9017	MYN (PMI)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:252, VAF:11.18%]
9080	MYN (PMI)	CUX1 : c.676G>A, p.A226T [DP:282, VAF:56.71%]
9099	MYN (PMI)	CALR : c.1092_1143del52, p.L367fs*46 [DP:297, VAF:42.55%] DNMT3A : c.1055G>A, p.S352N [DP:246, VAF:42.36%] BCOR : c.2035G>A, p.V679 [DP:852, VAF:51.64%]
9387	MYN (PMI)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:196, VAF:89.26%] SRSF2 : c.161C>T, p.S54F [DP:244, VAF:36.36%]
9438	MYN (PMI)	-
9514	MYN (PMI)	-
9719	MYN (PMI)	-
9790	MYN (PMI)	JAK2 : c.1849G>T, p.V617F [DP:243, VAF:41.86%]
9840	MYN (SM)	KT : c.2447A>T, p.D816V [HRMA]
9225	MYN (XOΔ)	ASXL1 : c.1934_1935insG, p.G646fs*12 [DP:361, VAF:42.86%] CSF3R : c.1853C>T, p.T618I [HRMA] SETBP1 : c.2608G>A, p.G870S [HRMA] SRSF2 : c.284C>T, p.P95L [DP:462, VAF:24.75%] TET2 : c.1567G>T, p.G523* [DP:415, VAF:55.77%] TET2 : c.4546C>T, p.R1516* [DP:490, VAF:42.33%]
9283	ΜΔΖ/ΜΥΝ (XMMΔ)	NRAS : c.34G>T, p.G12C [DP:300, VAF:31.00%] TET2 : c.100C>T, p.L34F [DP:340, VAF:64.11%]
9526	ΜΔΖ/ΜΥΝ (xMMΔ)	KT : c.2447A>T, p.D816V [HRMA] SETBP1 : c.2602G>A, p.D868N [HRMA] TET2 : c.100C>T, p.L34F [DP:320, VAF:66.71%] U2AF1 : c.470A>G, p.Q157R [DP:332, VAF:21.88%]
9825	Οικογενής διαταραχή των αιμοπεταλίων	STAG2 : c.3344T>C, p.M1115T [DP:317, VAF:44.44%]
9826	Οικογενής διαταραχή των αιμοπεταλίων	STAG2 : c.3344T>C, p.M1115T [DP:308, VAF:44.28%] ZRSR2 : c.1314_1315insAGCCCG, p.439_439s>9RS [DP:257, VAF:50.00%]
9159	OMΔ	TP53 : c.742C>T, p.R248W [DP:358, VAF:27.21%]
10055	OMΔ	CSF3R : c.2422G>A, p.E808K [DP:273, VAF:25.36%] RUNX1 : c.941_942delCT, p.S314fs [DP:264, VAF:26.83%]
Ταξινόμηση κατά ACMG (Richards et al. 2015)		
Παθογόνος νουκλεοτιδική αλλαγή (Pathogenic)		
Πιθανώς παθογόνος νουκλεοτιδική αλλαγή (Likely Pathogenic)		
Νουκλεοτιδική αλλαγή με άγνωστη σημασία (VUS, Variant of Uncertain Significance)		
Πιθανώς ουδέτερη νουκλεοτιδική αλλαγή (Likely Benign)		
Ουδέτερη νουκλεοτιδική αλλαγή (Benign)		

Πίνακας 72. Αποτελέσματα αναλύσεων NGS. Μεταλλάξεις με προβλεπόμενη παθογόνο, πιθανή παθογόνο ή άγνωστη σημασία για τον ασθενή, που ανιχνεύθηκαν στα 25 δείγματα της μελέτης

μέσω *Targeted-Seq* με τεχνολογία *NGS*. Οι μεταλλάξεις με ουδέτερη ή πιθανώς ουδέτερη σημασία, για την κλινική εικόνα του ασθενούς, δεν αναφέρονται εδώ.

6.3.1. Ασθενείς χωρίς εκ των προτέρων ανιχνευθείσες μεταλλάξεις

Ανάμεσα στους ασθενείς που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβάνονται 13 περιπτώσεις, στις οποίες δεν είχαν ανιχνευθεί μεταλλάξεις, μέσω άλλων τεχνικών μοριακής βιολογίας οι οποίες διερευνούν μεμονωμένες γενωμικές περιοχές, όπως PCR τελικού σημείου, HRMA και κατά Sanger προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων. Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται 1 ασθενής με ΑΠ, 3 με ΙΘ, 4 με ΠΜΙ, 1 με ΧΜΜΛ, 2 με ΟΜΛ και 2 με οικογενή διαταραχή αιμοπεταλίων.

Στο μοναδικό ασθενή με ΑΠ σε αυτή την ομάδα, όπως επίσης στους 3 ασθενείς με ΙΘ οι οποίοι επιλέχθηκαν για ανάλυση, δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις μέσω *NGS*. Ωστόσο, τα νοσήματα αυτά, μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά με άλλες παθολογικές ή μη καταστάσεις. Ως εκ τούτου, ενδέχεται να μην αποτελούν κλωνικές καταστάσεις και για το λόγο αυτό ενδεχομένως δεν εντοπίστηκαν οποιεσδήποτε μοριακές βλάβες.

Σε 2 ασθενείς με ΜΙ, επίσης δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις, χωρίς αυτό να αποκλείει την ύπαρξη μοριακών συμβαμάτων σε διαφορετικά γονίδια τα οποία δεν διερευνήθηκαν με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο.

Σε 2 άλλους ασθενείς με ΜΙ ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις *CUX1* A226T και *BCOR* V679I, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως άγνωστης σημασίας για το φαινότυπο του ασθενούς (variants of uncertain significance, VUS). Αυτό σημαίνει πως δεν ανήκουν ούτε σε βάσεις δεδομένων πολυμορφισμών, ούτε σε βάσεις δεδομένων μεταλλάξεων με κλινική σημασία. Επιπλέον, οι προβλεπτικοί αλγόριθμοι απέτυχαν να κατηγοριοποιήσουν τις μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από τις υπόλοιπες κατηγορίες. Ενδεχομένως, οι μεταλλάξεις αυτές να απενοχοποιηθούν ή αντίστοιχα να αποκτήσουν κλινική υπόσταση, σε μελλοντική αναθεώρηση των βάσεων δεδομένων, ή με την ανάπτυξη πιο εξελιγμένων υπολογιστικών μοντέλων, τα οποία θα μπορούν να προβλέψουν ικανοποιητικά και με ασφάλεια τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζεται το πρωτεϊνικό προϊόν.

Στον μοναδικό ασθενή με ΧΜΜΛ, στη συγκεκριμένη ομάδα, ανιχνεύθηκε μία παθογόνος μετάλλαξη στο γονίδιο *NRAS* (G12C) και μία μετάλλαξη άγνωστης σημασίας στο γονίδιο *TET2* (L34F).

Σε έναν ασθενή με ΟΜΛ ανιχνεύθηκε η παθογόνος μετάλλαξη *TP53* R248W. Η παθογένεια αυτής επιβεβαιώθηκε μέσω της εκδοχής R19 της βάσης δεδομένων IARC TP53 (Αύγουστος 2018) (Bouaoun et al. 2016)

Ο δεύτερος ασθενής με ΟΜΛ χαρακτηρίζεται από δύο μεταλλάξεις. Η παθογόνος μετάλλαξη μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης *RUNX1* S314fs, οδηγεί σε σχηματισμό διαφορετικών μεταγράφων, τα οποία κωδικοποιούν για διαφορετικό πρωτεϊνικό προϊόν από το κανονικό, σε ένα σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό (26.83%). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως επηρεάζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, ενώ δεν είναι απίθανο να αποτελεί αιτία εκδήλωσης ή εξέλιξης μίας παθολογικής κατάστασης, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ΟΜΛ. Στον ίδιο ασθενή παρατηρήθηκε μία επιπλέον μετάλλαξη, με άγνωστη ωστόσο κλινική σημασία, αυτή τη φορά στο γονίδιο *CSF3R* (E808K).

Οι παραπάνω μεταλλάξεις δε θα ήταν εφικτό να χαρακτηριστούν χωρίς την τεχνολογία *NGS*. Ακόμη και εκείνες οι μεταλλάξεις, οι οποίες επί του παρόντος χαρακτηρίζονται ως άγνωστης

σημασίας για τους ασθενείς, καταχωρούνται σε βάσεις δεδομένων, ενώ παράλληλα μελλοντικές έρευνες ενδέχεται να αποσαφηνίσουν την πραγματική τους δράση.

Τα δύο συγγενικά πρόσωπα με οικογενή αιμοπεταλιακή διαταραχή μοιράζονται μία κοινή νουκλεοτιδική αλλαγή με αδιευκρίνιστη σημασία, στο γονίδιο *STAG2* (M1115T), σε ποσοστό περίπου 50%, που προδιαθέτει σε πολυμορφισμό. Αξίζει να σημειωθεί πως ένας εκ των δύο ασθενών, ο οποίος εκδήλωσε κακοήθεια, φέρει επιπροσθέτως, μία παθογόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *ZRSR2* (439_439S>SRS).

6.3.2. Ασθενείς με εκ των προτέρων γνωστές μεταλλάξεις

Ανάμεσα στους ασθενείς που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβάνονται 12 ασθενείς στους οποίους είχαν ήδη ανιχνευθεί μεταλλάξεις, με άλλες τεχνικές. Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου της ευαισθησίας και ακρίβειας της μεθόδου και αφορούν σε 1 περίπτωση με ΑΠ, σε 1 με ΙΘ, σε 7 με ΜΙ, σε 1 με ΣΜ, σε 1 με ΧΟΛ και σε 1 με αΧΜΛ.

Ο μοναδικός ασθενής της κατηγορίας με ΑΠ, καθώς και τρεις ασθενείς με ΜΙ έφεραν μονάχα από μία μετάλλαξη *JAK2V617F*, έκαστος, ενώ ένας άλλος ασθενής με ΜΙ ήταν ήδη γνωστό πως έφερε μετάλλαξη διαγραφής νουκλεοτιδίων, στο γονίδιο *CALR*. Ένας πέμπτος ασθενής με ΜΙ έφερε ταυτόχρονα από μία μετάλλαξη στα γονίδια *JAK2* και *SRSF2*, ενώ ένας ασθενής με ΣΜ είχε ήδη χαρακτηριστεί με τη μετάλλαξη *KITD816V*. Στους ασθενείς αυτούς δεν ανιχνεύθηκαν επιπρόσθετες μοριακές βλάβες.

Σε έναν ασθενή με ΙΘ, πλέον της μετάλλαξης *JAK2V617F* που ήταν ήδη γνωστό πως έφερε, χαρακτηρίστηκε επιπροσθέτως η παθογόνος μετάλλαξη *SF3B1K666N*. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έγινε αντιληπτή, αφού εντοπίζεται σε εξόνιο του γονιδίου διαφορετικό από εκείνα που είχαν ήδη μελετηθεί μέσω HRMA.

Σε έναν έκτο ασθενή με ΜΙ, εκτός από τις μεταλλάξεις στα γονίδια *ASXL1* και *CALR*, που ήταν εκ των προτέρων γνωστό πως έφερε, αναδείχθηκε μία παθογόνος μετάλλαξη στο γονίδιο *EZH2* (R690P). Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται συχνά μεταλλαγμένο σε ασθενείς με ΜΙ, αλλά και σε άλλες κατηγορίες μυελικών κακοηθειών. Η τεχνική NGS αποτελεί τη μοναδική προσέγγιση που μπορεί να ελέγξει ικανοποιητικά το γονίδιο, αφού η διερεύνηση συγκεκριμένων μόνον περιοχών του γονιδίου κρίνεται ανεπαρκής, δεδομένου πως παθογόνες μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε όλα τα εξόνια.

Ο έβδομος ασθενής με ΜΙ έφερε ήδη μετάλλαξη Τύπου-1 στο γονίδιο *CALR*, ενώ αναγνωρίστηκε μία ακόμη μετάλλαξη, απροσδιόριστης ωστόσο σημασίας, αυτή τη φορά στο γονίδιο *DNMT3A* (S352N), το οποίο επίσης κρίνεται σκόπιμο να μελετάται σε όλη του την έκταση, παρόλο που συχνότερα χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις σε μία συγκεκριμένη περιοχή (hotspot) στο εξόνιο 23.

Ο ασθενής με ΧΟΛ και μεταλλάξεις στα γονίδια *ASXL1*, *CSF3R*, *SETBP1* και *SRSF2*, προσδιορίστηκε με δύο επιπλέον παθογόνες μεταλλάξεις χωρίς νόημα στο γονίδιο *TET2* (G523* και R1516*). Οι μεταλλάξεις δίχως νόημα, οδηγούν σε μη φυσιολογική άμεση παύση της διαδικασίας μετάφρασης, που στόχο έχει τη σύνθεση λειτουργικής πρωτεΐνης. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή κανονικών μεταγράφων mRNA με κωδικόνια τερματισμού, σε σημεία όπου δεν θα έπρεπε να απαντώνται, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ως εκ τούτου, τα μεταλλαγμένα πρωτεϊνικά προϊόντα, στη συγκεκριμένη περίπτωση οι πρωτεΐνες TET2, έχουν μέγεθος μικρότερο του φυσιολογικού, αφού έχουν απολέσει τμήμα του καρβοξυτελικού τους άκρου. Το γεγονός αυτό

είναι πολύ πιθανό να αποτελεί αιτία εκδήλωσης ή εξέλιξης μίας παθολογικής κατάστασης, εν προκειμένο ΧΟΛ.

Τέλος, σε έναν ασθενή με αΧΜΛ, εκτός από τις ήδη γνωστές μεταλλάξεις στα γονίδια *KIT*, *SETBP1* και *U2AF1*, ανιχνεύθηκε η απροσδιόριστη σημασίας μετάλλαξη *TET2L34F*.

6.5. Μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1

Η μεθυλίωση του DNA και η διατήρηση ενός συγκεκριμένου μοτίβου, αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό μηχανισμό για διάφορες κυτταρικές διεργασίες, ανάμεσά τους η διαφοροποίηση των κυττάρων και η διατήρηση ενός σταθερού προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Αποκλίσεις από τα φυσιολογικά επίπεδα μεθυλίωσης έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις (ερυθηματώδης λύκος, νόσος Alzheimer's, διαβήτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.α.). Στον καρκίνο συγκεκριμένα, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, έχει βρεθεί πως συμβάλλει στην εξέλιξη του όγκου.

Αντίστοιχα, η μεθυλίωση του DNA, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, αφού συμβάλλει στη διαφοροποίηση αυτών, προς όλους τους δυνατούς τύπους κυττάρων του αίματος. Επιπλέον, συμμετέχει στην περαιτέρω διαμόρφωση των υποπληθυσμών Τ-βοηθητικών και Τ-κυττάρων μνήμης, καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης κυτταρολυτικών ενζύμων, όπως περφορίνες και γκρανένζυμα, στα κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer cells, NK cells) και στα ενεργοποιημένα Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα.

Το πρότυπο της μεθυλίωσης επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς (διατροφή, κάπνισμα, σωματική άσκηση κ.α.) ή μη παράγοντες (φλεγμονή). Ως εκ τούτου, η μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης, με στόχο την ανάδειξη αυτής της επιγενετικής τροποποίησης ως βιοδείκτη και ως θεραπευτική στόχευση, αποτελεί πρόσφατο εύρημα.

Στο παρελθόν έχει πραγματοποιηθεί ξανά μελέτη της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 και δεδομένου πως αυτά εντοπίζονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα και μάλιστα σε πολύ υψηλά ποσοστά, η ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης παρέχει μία προσεγγιστική εκτίμηση των αντίστοιχων επιπέδων στον ιστό που μελετάται, συνολικά.

Τα αποτελέσματα από τις διάφορες δημοσιεύσεις φαίνεται να είναι αντικρουόμενα, χωρίς αυτό να σημαίνει πως οποιαδήποτε αλλαγή στο πρότυπο της μεθυλίωσης δεν είναι παράγοντας αστάθειας. Ωστόσο περαιτέρω αναλύσεις είναι απαραίτητες προκειμένου να διαλευκανθεί το τοπίο (Rodriguez et al. 2013; Barchitta et al. 2014).

Για το λόγο αυτό μελετήσαμε την επιγενετική κατάσταση των στοιχείων LINE-1 σε ασθενείς με ΠΜΙ και με ΜΔΣ/ΜΥΝ, μέσω MS-HRMA. Συνολικά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης σε 15 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και σε 15 ασθενείς με ΜΙ. Ως φυσιολογικά θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα επίπεδα από 6 άτομα του γενικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1 μέσω MSP, σε 8 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και σε 28 ασθενείς με ΜΙ, σε σύγκριση με 7 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση.

Οι δύο τεχνικές αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές (p -value<0.05) ανιχνεύσιμες διαφορές στο πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, στους ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, όχι όμως και στους ασθενείς με ΜΙ.

Είναι πιθανόν, ο τρόπος με τον οποίο εκδηλώνονται τα δύο αυτά κλωνικά νοσήματα, αλλά και οι φαινοτυπικές διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους, να επηρεάζουν διαφορετικά τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1. Ωστόσο, δεν αποκλείεται η αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης που παρατηρείται στα ΜΔΣ/MYN, να αποτελεί παράγοντα ανάδρασης, που ενισχύει την πρόοδο νόσου.

Ανεξάρτητα, η μελέτη της μεθυλίωσης αυτών των γενωμικών περιοχών, θα πρέπει να διευρυνθεί σε μεγαλύτερες και πιο ετερογενείς κοορτές καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με μυελικές νεοπλασίες, ώστε να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα και να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

6.6 Συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος ασθενών με MI και φυσιολογικού πληθυσμού μέσω RNA-Seq

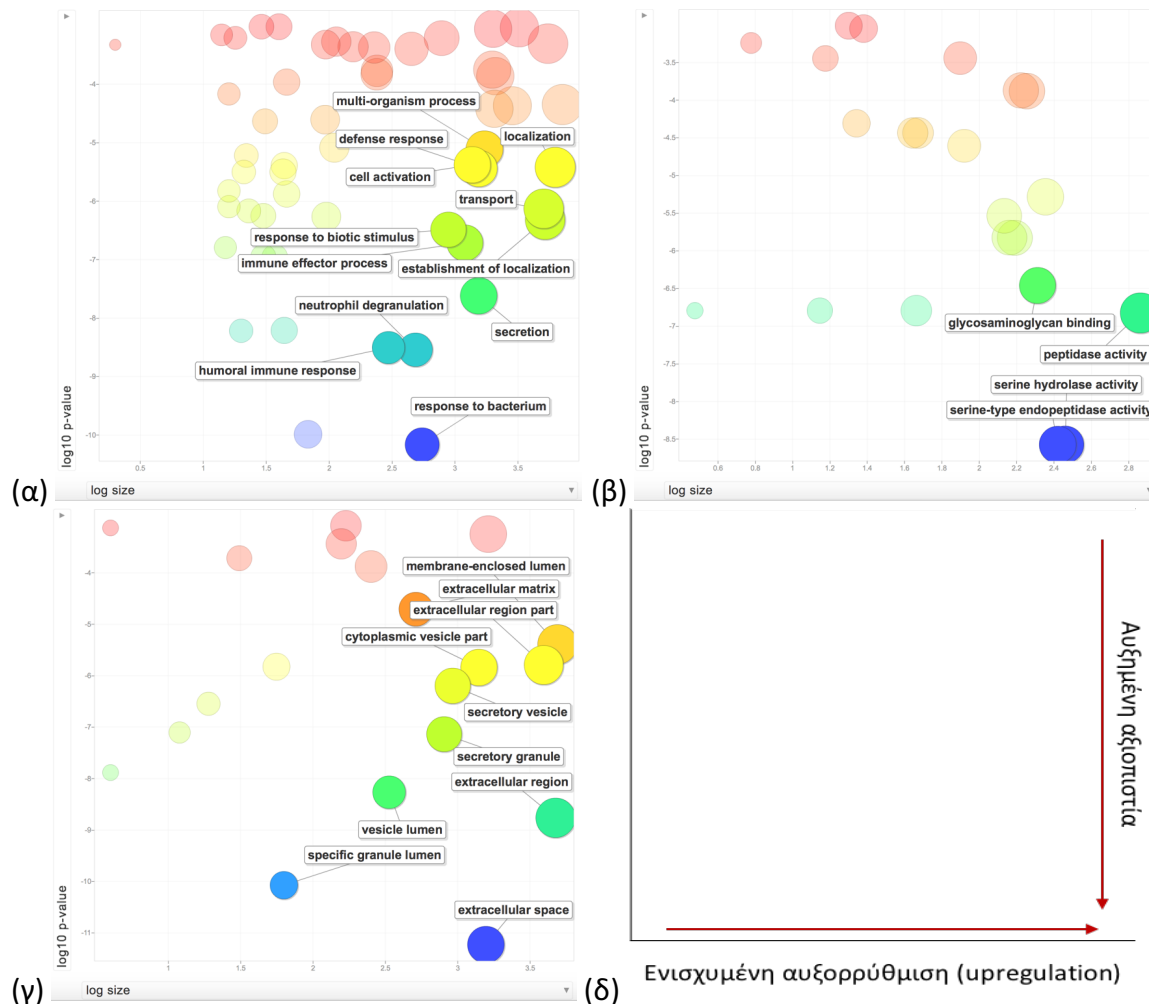
6.6.1 Βιολογική και κλινική σημασία των γονιδίων με διαφορεική έκφραση (Gene ontology (GO) and pathway analysis)

Απο τη μελέτη του μεταγραφώματος, μέσω RNA-Seq, που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, εντοπίστηκαν 2010 γονίδια, που αναδείχθηκαν ως διαφορεικά εκφραζόμενα στη MI, σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Από αυτά, τα 695 εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης, ενώ τα 1315 αυξημένα.

Με τις αναλύσεις που ακολουθούν γίνεται μία προσπάθεια να αποτυπωθεί απεικονιστικά η σημασία που έχουν τα γονίδια με διαφορεική έκφραση στον οργανισμό των ασθενών με MI. Για να γίνει αυτό, τα γονίδια ταξινομούνται με βάση το λογαριθμημένο βαθμό απόκλισης (log fold change) που παρουσιάζουν, από τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, ενώ παράλληλα έχουν ληφθεί υπόψιν μόνο τα γονίδια που έχουν αναδειχθεί ως διαφοροποιημένα με υψηλή στατιστική σημασία (FDR<0.05).

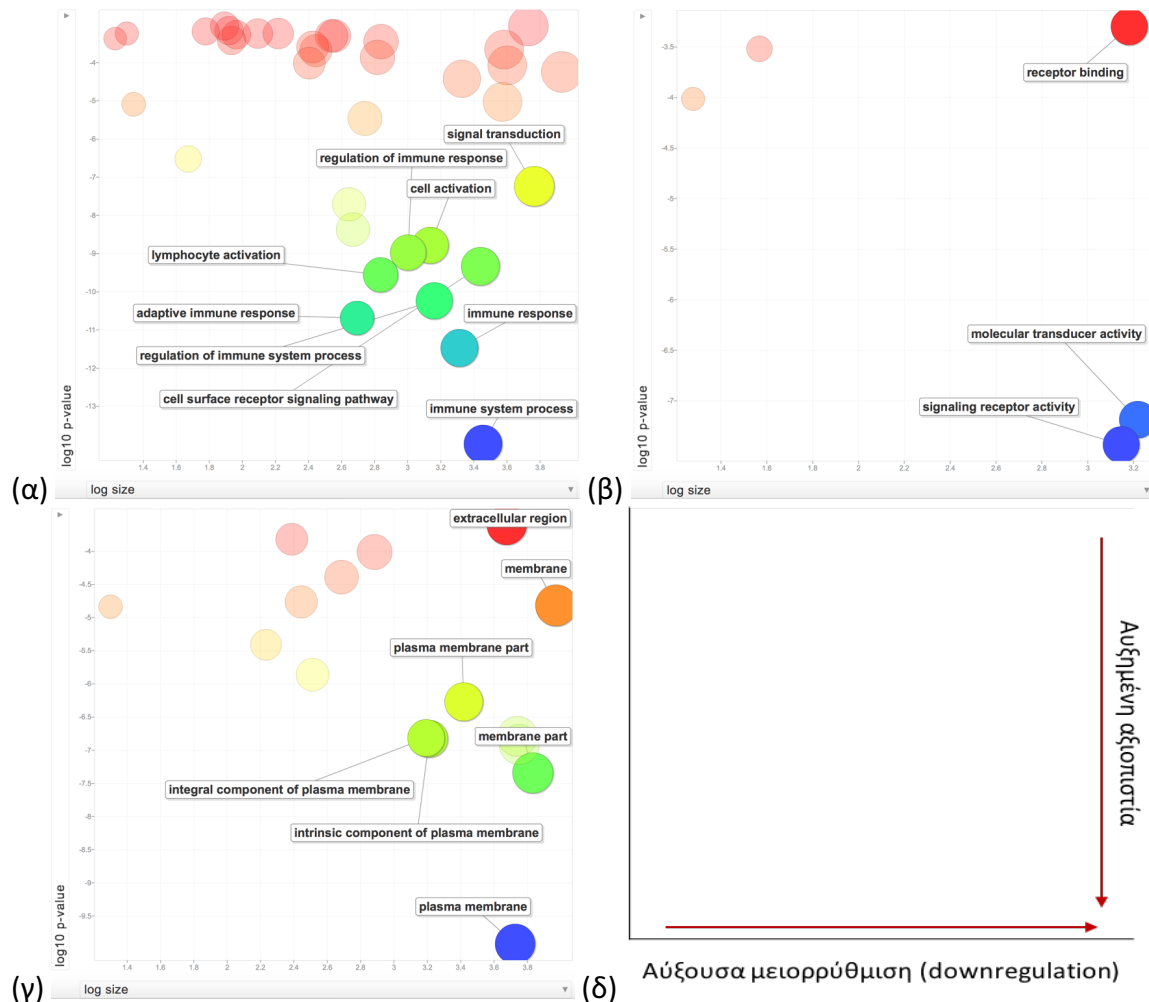
Στη συνέχεια τα γονίδια ομαδοποιούνται από κατάλληλα λογισμικά, όπως τα GOrilla (Eden et al. 2009) και REVIGO (Suzek et al. 2011), με βάση κοινά χαρακτηριστικά και κοινές διεργασίες όπου συμμετέχουν, σύμφωνα με διάφορες βάσεις δεδομένων.

Όσον αφορά στα γονίδια που παρουσιάζουν αξιόπιστα αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με MI που μελετήθηκαν, αυτά φαίνεται πως σχετίζονται κυρίως με τη μετακίνηση και ενεργοποίηση των κοκκιοκυττάρων (cell activation, transport, localization, immune effector process, humoral immune response, secretion, neutrophil degranulation), ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα (defense response, response to bacterium, multi-organism process), ενδεχομένως λόγω συχνών βακτηριακών λοιμώξεων που εμφανίζουν οι αιματολογικοί ασθενείς. Παράλληλα, ιδιαίτερα υπερεκφρασμένα παρατηρούνται γονίδια που σχετίζονται με την πρόσδεση και μετακίνηση των κυττάρων (glycosaminoglycan binding), όπως επίσης με τη σύνθεση (vesicle lumen, specific granule lumen) και έκκριση (extracellular region, extracellular space) ενζυμικών παραγώγων που επίσης σχετίζονται με τη δράση των κυττάρων της μυελικής σειράς, τα οποία μετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (peptidase, serine hydrolase, endopeptidase).



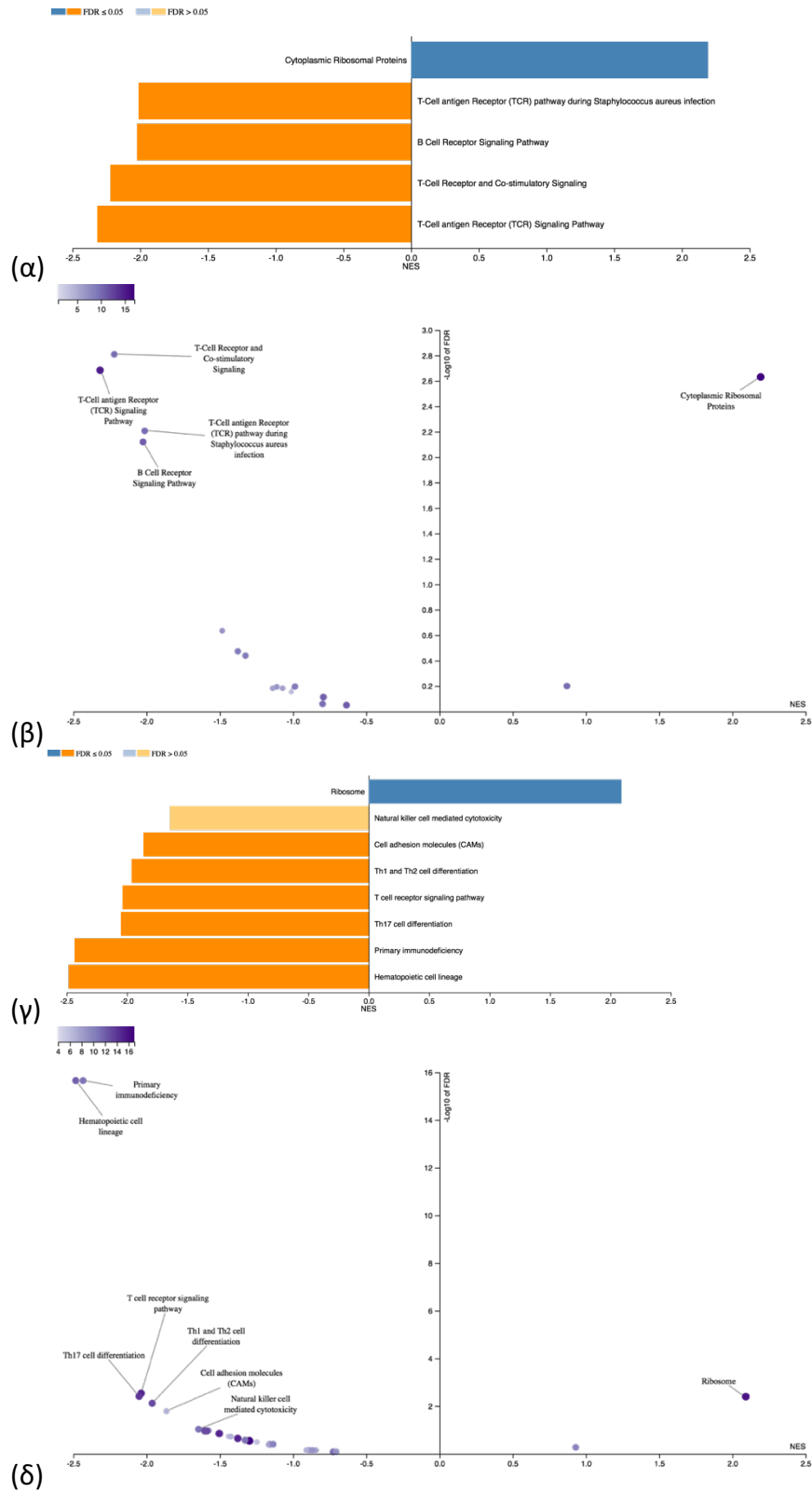
Εικόνα 119. Διαγραμματική απεικόνιση (scatterplot) αναλύσεων GO για τα υπερ-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI, σχετικά (α) με τις βιολογικές διεργασίες (biological processes) όπου συμμετέχουν, όπως επίσης (β) με τις μοριακές λειτουργίες (molecular functions) που αυτά επιτελούν και (γ) με τα κυτταρικά ή ιστικά διαμερίσματα (cellular/tissue compartments) όπου εκδηλώνεται αυτή η αλλαγή στην έκφραση. Τα γονίδια που εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα ενισχυμένης έκφρασης (άξονας x), ενώ ταυτόχρονα έχουν αναδειχθεί με υψηλότερη αξιοπιστία (άξονας y), εμφανίζονται κάτω δεξιά σε όλα τα διαγράμματα, όπως επεξηγείται στην εικόνα (δ). Το μέγεθος κάθε σφαίρας αντιπροσωπεύει το πλήθος των γονιδίων που υποστηρίζουν κάθε παρατήρηση (Eden et al. 2009, Suprek et al. 2011).

Αντίστοιχα, τα γονίδια που παρουσιάζουν αξιόπιστα μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς με MI που μελετήθηκαν, φαίνεται πως και αυτά σχετίζονται με τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (immune response, immune system process), πιο συγκεκριμένα με την μειορρύθμιση του λεμφικού συστήματος (adaptive immune response, lymphocyte activation), σε αυτή την περίπτωση.



Εικόνα 120. Διαγραμματική απεικόνιση (scatterplot) αναλύσεων GO για τα υπερ-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI, σχετικά (α) με τις βιολογικές διεργασίες (biological processes) όπου συμμετέχουν, όπως επίσης (β) με τις μοριακές λειτουργίες (molecular functions) που αυτά επιτελούν και (γ) με τα κυτταρικά ή ιστικά διαμερίσματα (cellular/tissue compartments) όπου εκδηλώνεται αυτή η αλλαγή στην έκφραση. Τα γονίδια που εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα μειωμένης έκφρασης (άξονας x), ενώ ταυτόχρονα έχουν αναδειχθεί με υψηλότερη αξιοπιστία (άξονας y), εμφανίζονται κάτω δεξιά σε όλα τα διαγράμματα, όπως επεξηγείται στην εικόνα (δ). Το μέγεθος κάθε σφαίρας αντιπροσωπεύει το πλήθος των γονιδίων που υποστηρίζουν κάθε παρατήρηση (Eden et al. 2009, Supek et al. 2011).

Για να υποστηρίξουμε περαιτέρω την τελευταία ένδειξη, μελετήσαμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια (pathway analysis) όπου συμμετέχουν τα μειωμένα γονίδια, στους ασθενείς με MI, αφού πρώτα ομαδοποιήθηκαν κατάλληλα από το λογισμικό πρόγραμμα που πραγματοποίησε την ανάλυση (Webgestat) (Wang et al. 2017).



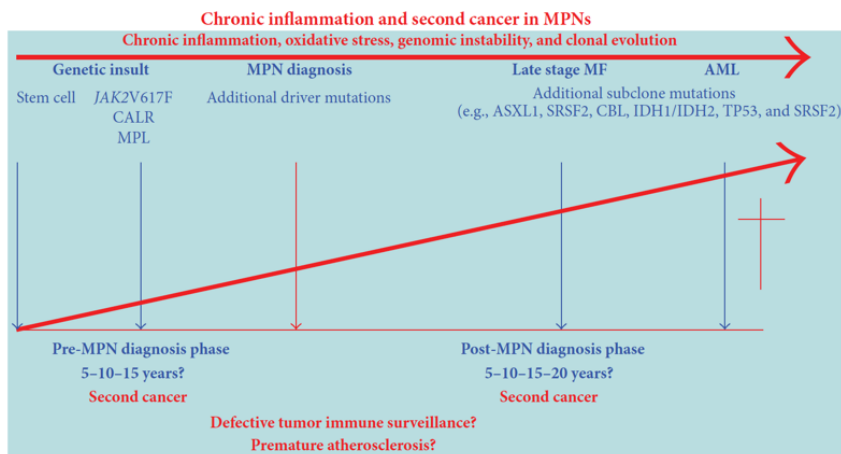
Εικόνα 121. Ανάλυση των σηματοδοτικών μονοπατιών όπου συμμετέχουν τα υποεκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI. (α και γ) Διαγραμματική απεικόνιση (box plot) των επιπέδων σημαντικότητας των σηματοδοτικών μονοπατιών (pathway analysis) που

συμμετέχουν τα υπο-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI. (β και δ) Διαγραμματική απεικόνιση (volcano plot) των σηματοδοτικών μονοπατιών (pathway analysis) όπου συμμετέχουν τα υπο-εκφραζόμενα ομαδοποιημένα γονίδια στη MI. Τα γονίδια που εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα μειωμένης έκφρασης (άξονας x), ενώ ταυτόχρονα έχουν αναδειχθεί με υψηλότερη αξιοπιστία (άξονας y), εμφανίζονται αριστερά και επάνω και στα δύο διαγράμματα. Το μέγεθος κάθε σφαίρας αντιπροσωπεύει το πλήθος των γονιδίων που υποστηρίζουν κάθε παρατήρηση. Τα αποτελέσματα προέκυψαν ύστερα από ατιπαραβολή των στοιχείων με τις βάσεις δεδομένων KEGG (α και β) και Wikipathway (γ και δ), ($Genes-in-a-set > 5$, $FDR < 0.08$) (NES: Normalized expression score, FDR: false discovery rate) (Webgelstat) (Wang et al. 2017).

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται, υποστηρίζονται από παρόμοιες μελέτες, οι οποίες αναφέρονται στη μειορρύθμιση γονιδίων που συμμετέχουν στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Τα αίτια ωστόσο μπορεί να είναι ετερογενή.

Ενδεχομένως αυτή η παρατήρηση να οφείλεται σε ανισοκατανομή των πληθυσμών των αιμοποιητικών κυττάρων, εξαιτίας της αύξησης που παρατηρείται στα κλωνικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, όπου και οφείλεται η νόσος εξαρχής.

Εάν αποκλιστεί αυτό το ενδεχόμενο, τότε είναι πιθανό τα κύτταρα της λεμφικής σειράς να είναι όντως λιγότερα σε απόλυτη τιμή, από το φυσιολογικό, ενδεχομένως μέσω μειωμένης αντιγονοπαρουσιαστικής δραστηριότητας εκ μέρους των κυττάρων της μυελοειδούς σειράς, λόγω μειωμένης έκφρασης των HLAs (MHCs) (Skon et al. 2013). Η τελευταία παρατήρηση εξηγεί και το μοντέλο της μειωμένης επίβλεψης των καρκινικών κυττάρων που εικάζεται ότι μαζί με άλλους παράγοντες συμβάλλει στην εξέλιξη τόσο των αιματολογικών κακοηθειών, όσο και των συμπαγών όγκων, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 122. Μοντέλο εξέλιξης των ΜΥΝ. Οι ασθενείς με ΜΥΝ παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν δευτεροπαθείς κακοήθειες, τόσο λόγω της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης που επικρατεί, όσο και εξαιτίας του οξειδωτικού στρες, της γενετικής αστάθειας, της κλωνικής εξέλιξης της νόσου, μέσω απόκτησης επιπλέον μεταλλάξεων, αλλά και της μειωμένης επίβλεψης, κατά συνέπεια παρέμβασης, του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι των καρκινικών κυττάρων (Hasselbalch and Bjørn, 2015).

Ωστόσο, στην περίπτωση που και αυτός ο μηχανισμός δεν αρκεί για να εξηγήσει αυτή τη μειορρύθμιση στην έκφραση των γονιδίων των κυττάρων της λεμφικής σειράς, τότε θα πρέπει να συμβαίνει μία πραγματική αποσιώπηση, η οποία χρίζει περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου να διαλευκανθεί η αιτιολογία της. Μελέτη μεγαλύτερων κοορτών ασθενών θα αποκαλύψει το πραγματικό αίτιο πίσω από αυτή την ανάλυση (Wang et al. 2015).

Παράρτημα Ι - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Αντιπρόσωπος HRM mix	Ta (°C)
CALRe9HF	CAGCAGAGAAACAAATGAATCA	22	CALRe9HR	ACAGCTCGTCCTTGGCTCT	19	204	ROCHE	67
ASXL1e12HF	GGACCCTCGCAGACACTG	18	ASXL1e12HR	GCCACCTCCCTCATCGGTCT	20	152	KAPA	67
DNMT3Ae23HF	TGTGGTTAGACGGCTTCCCA	20	DNMT3Ae23HR	AGGTGGCGGATGACTGACA	19	184	ROCHE	67
IDH1e4HF	TTGTGAGTGGATGGGTAAAAAG	22	IDH1e4HR	TTATTGCCAACATGACTTACTTGAAG	26	82	KAPA	59
IDH2e4HF	CTGAAGAAGATGTGGAAAAGGGC	23	IDH2e4HR	GCCTACCTGGTCGCCAT	17	165	ROCHE	59
SF3B1e14HF	CCTGATATAGATAACTGT	18	SF3B1e14HR	AAGAATAGCTATCTGCTG	18	186	ROCHE	52
SF3B1e15HF	AGGTCTTGTGGATGAAGA	18	SF3B1e15HR	GGCCAAAGCACTGATGGC	18	55	ROCHE	59
U2AF1e2HF	ATTGGAGCATGTCGTATC	18	U2AF1e2HR	AAACAAACCTGGCTAAACAAT	21	77	ROCHE	59
U2AF1e6HF	CACGCCGAGCTGTCAAAT	18	U2AF1e6HR	CCTCACTACCCCATCTCATCCG	23	78	ROCHE	67
CSF3Re14HF	ACAGTACAGTCCTCACTAA	19	CSF3Re14HR	CTCTCCCCTTACCTGACT	18	54	ROCHE	67
SETBP1e4HF	AGGAAATCACGCTGTCCCCTGTCCA	25	SETBP1e4HR	GAGCAGAAATCAAAAGAGTACCTTTC	26	154	ROCHE	67
KITe17HF	TCCTTACTCATGGTCCGA	18	KITe17HR	CTTTAACCACATAATTAGAAAGG	23	90	KAPA	59
SRSF2e1HF	CGCTGAGGACGCTATTCC	18	SRSF2e1HR	GGCTGTGGTGTGAGTGGC	18	110	ROCHE	67

Πίνακας 73. 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 PCR ενίσχυση πριν από Sanger sequencing

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Ta (°C)
CALRe9SF	ACGATGAGGCATACGCTCAT	20	CALRe9SR	CACCCCAAATCCGAACCTCC	20	469	64
ASXL1e12SF	GACCCTTAAGCTACTAGAATCCA	23	ASXL1e12SR	AACTGTAGCCCTCTGTAATC	20	592	64
DNMT3Ae23SF	AGATTCGGCAGAACTAAGCGTG	22	DNMT3Ae23SR	CATGTTCTTGGTGTTTTATTAACA	24	403	64
IDH1e4SF	TTTAGGGTGTGCCAGTGCTAGA	22	IDH1e4SR	TTATTGCCAACATGACTTACTTGCCCT	26	470	60
IDH2e4SF	GTCTGGCTGTGTTGTTTA	19	IDH2e4SR	ACTCCCACTCCTTGACACCCAG	23	428	64
SF3B1e14SF	CTATGCTAGAGTGGAAGGCCCCC	23	SF3B1e14SR	CAGATAATATAACAAACCCATCATAATAC	29	710	64
SF3B1e15SF	GCTATGGTTCATGTTTTGCTCTA	23	SR3B1e15SR	TAAGAGGAATAAGATACCCAATAGCAC	27	447	64
U2AF1e2SF	AAATACAGCAAGGAAGAGGACAG	23	U2AF1e2SR	AAATGGAAAATACAACACTACGACCA	24	370	64
U2AF1e6SF	TATTTGCCTACACAGCCATATTATC	25	U2AF1e6SR	ACAACGGGCACAGGAATCA	19	597	64
CSF3Re14SF	TAAAGCACATTGGCAAGACCTT	22	CSR3Re14SR	AAGTCAGTCCCCAGCTACTTA	22	470	64
SETBP1e4SF	TCCAATGGCAACCTGACAC	19	SETBP1e4SR	AGCAACGGGTCATACTGGATCAG	23	665	67
KITe17SF	AGAGACTTGGCAGCCAGGGG	20	KITe17SR	GATTTACATTATGAAAGTCACGGTAG	26	214	64
SRSF2e1SF	CGGCGCCCAGTTGTTAC	17	SRSR2e1SR	CTGTGGTGTGAGTCGCC	17	484	67

Πίνακας 74. Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για PCR ενίσχυση των γενομικών περιοχών ενδιαφέροντος, προκειμένου αυτές να αναλυθούν μέσω κατά Sanger-Seq προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων. Συντημήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

Παράρτημα III - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για Sanger sequencing

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Κατεύθυνση	Μέγεθος διαβάσματος (nt)
CALRe9SeqR	AGAAAGTTCTCGAGTCAT	18	Reverse	400
ASXL1e12SeqF	GACCCTTAAGCTACTAGAATAAT	23	Forward	549
DNMT3Ae23SeqF	GCGTCAGAGGAGTTGATT	18	Forward	340
IDH1e4SeqF	TAGGCATAGAGAATCGCAG	19	Forward	265
IDH2e4SeqR	TGGCTAGGCGAGGAGTTG	18	Reverse	282
SF3B1e14SeqF	AAGATTAATATTACCAAGGA	20	Forward	543
SF3B1e15SeqF	TGATATATTGAGAGAATCTGGGTC	24	Forward	325
U2AF1e2SeqF	TGTGTCATGTTTCTGTGAGAGT	22	Forward	278
U2AF1e6SeqF	TCTGATATACTTGGATTGGTAATTGTC	27	Forward	379
CSF3Re14SeqR	AGTCCCAGCTACTCTCACTC	21	Reverse	422
SETBP1e4SeqR	CCAGGTCTGCCAGAAACCAC	20	Reverse	484
KITe17SeqF	AGAGACTTGGCAGCCAGCCT	20	Forward	194
SRSF2e1SeqF	GCCCAGAGCTGAGGAAACC	19	Forward	330

Εικόνα 75. Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για κατά Sanger-Seq προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων στις γενομικές περιοχές ενδιαφέροντος. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων.

Παράρτημα IV - 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 76. 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 V - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από πυροαλληλούχιση

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

Πίνακας 77. 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 VI - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση

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

Εικόνα 78. Εκκινητές για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων.

Παράρτημα VII - Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS Targeted-Seq

VII.1 Προετοιμασία του υπολογιστικού περιβάλλοντος

Οι εντολές που ακολουθούν έπειτα από το σύμβολο του δολλαρίου και καταγράφονται με πράσινου χρώματος φόντο κειμένου, στη συνέχεια, λειτουργούν μέσω του τερματικού συστήματος του υπολογιστή (terminal), με στόχο την παραμετρική ενεργοποίηση πακέτων βιοπληροφορικών αναλύσεων (ΠΒΑ). Το σύμβολο του δολλαρίου χρησιμοποιείται από το τερματικό, για να υποδείξει μία νέα σειρά εντολών.

VII.1.1 Προετοιμασία περιβάλλοντος Python - Λήψη και εγκατάσταση ΠΒΑ μέσω Python

Αρχικά, προετοιμάζεται κατάλληλα, το περιβάλλον της γλώσσας προγραμματισμού python. Για να μην επηρεαστεί η προεγκατεστημένη, στο υπολογιστικό σύστημα, εκδοχή της Python, κατασκευάζεται ένα τοπικό περιβάλλον (miniconda), ύστερα από λήψη και εγκατάσταση του κατάλληλου προγράμματος διαμόρφωσης του περιβάλλοντος.

<https://conda.io/miniconda.html>

```
$ sh /Users/andreasgi/Downloads/Miniconda2-latest-MacOSX-x86_64.sh  
$ conda create --name conda_p27 python=2.7
```

Το τοπικό περιβάλλον μπορεί να ενεργοποιηθεί, απενεργοποιηθεί και απεγκατασταθεί με τις παρακάτω διαδοχικές εντολές, αντίστοιχα.

```
$ source activate conda_p27  
$ source deactivate conda_p27  
$ conda env remove --name conda_p27
```

Το τοπικό περιβάλλον διαμορφώνεται κατάλληλα.

```
$ conda config --add channels defaults  
$ conda config --add channels conda-forge  
$ conda config --add channels bioconda
```

Μία εντολή που επικαλείται τον εξειδικευμένο διαχειριστή λήψεων της python, γνωστή ως "pip", χρησιμεύει σε διάφορες λειτουργίες, ανάμεσα τους, η απομακρυσμένη λήψη πακέτων αλγόριθμων, που χρησιμεύουν σε συγκεκριμένα στάδια της βιοπληροφορικής ανάλυσης, των δεδομένων που προκύπτουν από συσκευές NGS.

```
$ sudo pip install pipdeptree  
$ conda install -c bioconda multiqc  
$ pip install numpy  
$ pip install pysam  
$ pip install pyfaidx  
$ pip install multiqc  
$ pip install --no-binary :all: ngslib==1.1.18  
$ pip install numpy  
$ pip install pysam  
$ pip install enum34==1.1.2  
$ pip install numpy==1.11.0  
$ sudo pip install pandas==0.18.0  
$ pip install pysam==0.9.0
```

Το ΠΒΑ Oncotator, αποτελεί στην ουσία, μία αυτόνομη βάση δεδομένων, η οποία λειτουργεί σε περιβάλλον python και είναι προσεγγίσιμη μέσω διαχειριστών απομακρυσμένων λήψεων, όπως το υπολογιστικό πρόγραμμα filezilla.

<https://filezilla-project.org>

Συμπληρώνοντας κατάλληλα τα απαραίτητα πεδία (credentials), όπως καταγράφεται στη συνέχεια, με γκρι χρώμα φόντου κειμένου, είναι εφικτή η λήψη απομακρυσμένων φακέλων και αρχείων, όπως το ΠΒΑ Oncotator, που διατίθεται ελεύθερα από το Ινστιτούτο BROAD. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η εκδοχή oncotator_v1_ds_April052016 GRCh37/hg19.

```
Host name:      ftp://gsapubftp-anonymous@ftp.broadinstitute.org/bundle/oncotator/  
Username:      gsapubftp-anonymous
```

Download folder: /bundle/oncotator

Download file: oncotator_v1_ds_April052016.tar.gz

Ακολουθώς το ΠΒΑ Oncotator εγκαθίσταται και είναι πλέον έτοιμο για χρήση.

```
$ cd /Users/andreasgi/NGS/algorithms/oncotator-1.9.8.0
$ sudo python /Users/andreasgi/NGS/algorithms/oncotator-1.9.8.0/setup.py build
$ sudo python /Users/andreasgi/NGS/algorithms/oncotator-1.9.8.0/setup.py install
```

VII.1.2 Προετοιμασία περιβάλλοντος Perl - Λήψη και εγκατάσταση ΠΒΑ μέσω Perl

Ακολουθεί λήψη, εγκατάσταση, ενεργοποίηση και κατάλληλη διαμόρφωση, ενός τοπικού περιβάλλοντος της γλώσσας προγραμματισμού perl (perlbrew), που δεν θα επηρεάζει τη προεγκατεστημένη εκδοχή.

```
$ sudo \curl -L https://install.perlbrew.pl | bash
$ perlbrew init
$ export PERLBREW_ROOT=~/.perl5/perlbrew
$ sudo perlbrew install-patchperl
$ perlbrew available
$ cd /Users/andreasgi/perl5/perlbrew/build/perl-5.26.0/perl-5.26.0; make install
$ perlbrew switch perl-5.26.0
```

Μέσω του διαχειριστή λήψεων της Perl (MCPAN), εγκαθίστανται χρήσιμα ΠΒΑ. Πρίν και μετά τη λήψη αυτών πραγματοποιείται ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του διαχειριστή, αντίστοιχα.

```
$ sudo perl -MCPAN -e shell
$ cpan> install Bundle::CPAN
$ cpan> reload cpan
$ sudo cpan install DateTime::TimeZone Bundle::LWP CPAN::Modulelist IPC::System::Simple YAML
SVG Readonly Config::General Font::TTF::Font Font::TTF List::MoreUtils Math::Bezier
Math::VecStat Math::Round Params::Validate Regexp::Common Set::IntSpan Text::Format
Statistics::Basic local::lib Test::Deep Clone.pm Bundle::DBI DBD::mysql local::lib Test::Deep
$ cpan> exit.
```

Εαν προκύψει οποιοδήποτε πρόβλημα με το διαχειριστή λήψεων η διαδικασία αποκατάστασης είναι πολύ απλή.

```
$ rm -rf /home/user/.cpan
$ perl -MCPAN -e shell
$ install Bundle::LWP
```

Οι πιο πρόσφατες εκδοχές ορισμένων αλγόριθμων λαμβάνονται μόνο μέσω της ιστοσελίδας τους.

CGI::Session

<http://search.cpan.org/~markstos/CGI-Session/>

Error

<http://search.cpan.org/~shlomif/Error>

FreezeThaw

<http://search.cpan.org/~ilyaz/FreezeThaw/>

HTML::Tree

<http://search.cpan.org/~petek/HTML-Tree>

Time-modules

<http://search.cpan.org/~muir/Time-modules/>

Αυτοί εγκαθίστανται χειροκίνητα, όπως περιγράφεται στη συνέχεια

```
$ perl Makefile.PL
$ make
$ make test
$ make install
```

Εάν ωστόσο αναζητάται μία συγκεκριμένη παλαιότερη εκδοχή ενός συγκεκριμένου αλγόριθμου και εφόσον γνωρίζουμε την απομακρυσμένη θέση αυτού στο διαδίκτυο, τότε πραγματοποιείται αυτόματη λήψη μέσω τερματικού, όπως περιγράφεται παρακάτω.

```
$ curl -O http://www.cpan.org/authors/id/L/LD/LDS/GD-2.50.tar.gz
$ tar -xvzf /Users/andreasgi/GD-2.50.tar.gz -C /Users/andreasgi/NGS/algorithms
```

```
$ cd /Users/andreasgi/NGS/algorithms/GD-2.50
$ perl Makefile.pl
$ make
$ make test
$ make install
```

Ακολουθεί η λήψη, εγκατάσταση των ΠΒΑ circos και ipvn, που λειτουργούν σε περιβάλλον perl. Μάλιστα, υπάρχει η δυνατότητα, να δημιουργηθεί συντόμευση (alias), η οποία διευκολύνει τη συγγραφή των εντολών στο τερματικό.

Προκειμένου μία συντόμευση να είναι λειτουργική, τόσο αυτή, όσο και το μονοπάτι των υποφακέλων, όπου περιέχεται το εκάστοτε ΠΒΑ, καθώς και επιπρόσθετα χρήσιμα δεδομένα, καταγράφονται εκ των προτέρων στο προφίλ του χειριστή (bash_profile), στο υπολογιστικό σύστημα όπου πραγματοποιούνται οι αναλύσεις, όπως αυτά καταγράφονται με ροζ χρώματος φόντο κειμένου στη συνέχεια.

```
$ curl -O http://circos.ca/distribution/circos-0.64.tgz
$ tar -xvzf /Users/andreasgi/circos-0.64.tgz -C /Users/andreasgi/NGS/algorithms
$ git clone git:github.com/kylase/CircosAPI
$ circos -debug_flag io
$ circos -conf /Users/andreasgi/NGS/TargetSEQ/algorithms/circos-0.69-4/example/etc/circos.conf
alias circos="circos -conf /Users/andreasgi/NGS/algorithms/circos-0.69-4/example/etc/circos.conf"
alias ipvn="perl /Users/andreasgi/NGS/algorithms/ipvn/script/SNPtoAA_44_colorMuts.pl"
```

Τέλος, το τοπικό περιβάλλον της γλώσσας perl απενεργοποιείται.

```
$ perlbrew off
```

VII.1.3 Προετοιμασία περιβάλλοντος Homebrew - Λήψη και εγκατάσταση ΠΒΑ μέσω Homebrew

Αρχικά εγκαθίσταται τοπικά, από το διαδίκτυο, μία πλατφόρμα εύρεσης και εύκολης εγκατάστασης ΠΒΑ, που καλείται διαχειριστής λήψεων (download manager).

```
$ ruby -e "$(curl -fsSL https://raw.githubusercontent.com/Homebrew/install/master/install)"
```

Ακολουθως, εγκαθίστανται τα κατάλληλα ΠΒΑ, μέσω του διαχειριστή λήψεων:

```
$ brew install bamtools
$ brew install bcftools
$ brew install bedtools
$ brew install bwa
$ brew install ea-utils
$ brew install fastq-tools
$ brew install fastx_toolkit
$ brew install igv
$ brew install p7zip
$ brew install picard-tools
$ brew install samtools
$ brew install snpeff
$ brew install trimmomatic
$ brew install vcftools
```

VII.1.4 Ανεξάρτητα ΠΒΑ

Επιπρόσθετα αλγοριθμικά πακέτα (μπλε χρώμα φόντου κειμένου), τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του διαχειριστή, εγκαθίστανται απευθείας, από την ιστοσελίδα του εκάστοτε κατασκευαστή (webpage), όπως αυτές καταγράφονται στη συνέχεια, με κίτρινο χρώμα φόντου κειμένου, ενώ παράλληλα εγκαθίστανται τοπικά στον υπολογιστή, σε συγκεκριμένα μονοπάτια υποφακέλων (paths), από όπου μπορούν να επικαλεστούν, όταν κρίνεται σκόπιμο, ώστε να επιτελέσουν μία λειτουργία.

BBTools-37.48

<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>

```
export PATH="/Users/andreasgi/NGS/algorithms/BBTools-37.48:$PATH"
```



```
alias repair="/Users/andreasgi/NGS/algorithms/BBTools-37.48/repair.sh"
BAMStats-1.25
http://bamstats.sourceforge.net
export PATH="/Users/andreasgi/NGS/algorithms/BAMStats-1.25:$PATH"
alias bamstats="java6 /Users/andreasgi/NGS/algorithms/BAMStats-1.25/BAMStats-GUI-1.25.jar"
dbNSFP3.5
https://drive.google.com/uc?export=download&id=0B4SLNoZhyUgod3ZmT1pUM21VSEE
export
PATH="/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbNSFP/dbNSFP3.5/dbNSFP3.5.txt.gz:$PATH"
GenomeAnalysisTK-3.6-0-g89b7209
https://software.broadinstitute.org/gatk/download/archive
export PATH="/Users/andreasgi/NGS/algorithms/GenomeAnalysisTK-3.6-0-g89b7209:$PATH"
alias gatk="java6 /Users/andreasgi/NGS/algorithms/GenomeAnalysisTK-3.6-0-g89b7209/GenomeAnalysisTK.jar"
```

VII.2 Προετοιμασία πρότυπων αρχείων (reference files)

Τα πρότυπα αρχεία γονιδιώματος και βάσεων δεδομένων μεταλλάξεων, πολυμορφισμών, κλινικών και βιολογικών δεδομένων, επεξεργάζονται κατάλληλα, πριν από ενσωμάτωση αυτών σε διάφορα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας.

VII.2.1 Πρότυπο γονιδίωμα hg19

Τοπική αποθήκευση, της διαδικτυακής εκδοχής, του πρότυπου γονιδιώματος hg19, που παρέχεται από το Ινστιτούτο UCSC.

```
http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/bigZips/hg19.2bit
```

Τοπική αποθήκευση, της διαδικτυακής εκδοχής, κατάλληλου λογισμικού που προσφέρει το Ινστιτούτο UCSC στην ιστοσελίδα του, για ψηφιακή μετατροπή του παραπάνω τύπου αρχείου σε κατάλληλη μορφή.

```
http://hgdownload.cse.ucsc.edu/admin/exe/linux.x86_64/twoBitToFa
```

Μετακίνηση των αρχείων σε προτιμητέο φάκελο του υπολογιστικού συστήματος και μετακίνηση του περιβάλλοντος λειτουργίας του τερματικού στο φάκελο αυτό.

```
$ cd /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/2BitToFa
```

Μετατροπή του αρχείου πρότυπου γονιδιώματος, τύπου 2bit, σε μορφή fasta, η οποία είναι κατάλληλη για περαιτέρω αναλύσεις.

```
$ ./twoBitToFa /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/2BitToFa/hg19.2bit
/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta
```

Δημιουργία άλλων απαραίτητων τύπων αρχείων, hg19.fasta, hg19.fasta.amb, hg19.fasta.ann, hg19.fasta.bwt, hg19.fasta.pac, hg19.fasta.sa, hg19.dict, hg19.fasta.fai, hg19_sizes.genome.

```
$ bwa index -a bwtsv /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta
$ picard CreateSequenceDictionary R=/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta
O=/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.dict
$ samtools faidx /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta
$ faidx /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta -i chromsizes >
/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19_sizes.genome
```

Έλεγχος της αριτιότητας και της συνάφειας των αρχείων του πρότυπου γονιδιώματος, τύπου fasta και fasta.fai, συγκεκριμένα των hg19.fasta και hg19.fasta.fai, αντίστοιχα, όσον αφορά στην ονοματολογία των χρωμοσωμάτων και στην αριθμητική ταξινόμηση αυτών, κατά αύξουσα σειρά.

```
$ grep ">" /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta
$ cut -f 1 /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.fasta.fai
```

VII.2.2 Αρχείο γενομικών περιοχών υπο διερεύνηση (τύπου BED)

Το αρχείο των γενομικών περιοχών που αποτελούν στόχους της ανάλυσης παρέχεται από την εταιρεία που παρασκεύασε τα αναλώσιμα για την κατασκευή των βιβλιοθηκών (NuGen). Το αρχείο αυτό τροποποιείται κατάλληλα για περαιτέρω χρήση, με την εντολή που ακολουθεί, ώστε οι χρωμοσωμικές συντεταγμένες (genomic coordinates) ταξινομούνται κατά αριθμητική σειρά.

```
$ sort -k 1,1
/Users/andreasgi/NGS/targetSEQ/01b_PanelDesign_NuGen/design_ver03/01_ET1578_3_NuGenFiles/target_ET1578_3_777.bed >
/Users/andreasgi/NGS/targetSEQ/01b_PanelDesign_NuGen/design_ver03/01_ET1578_3_NuGenFiles/target_ET1578_3_777_sorted.bed
```

Ακολουθεί συμπύκνωση του αρχείου και κατασκευή ευρετηρίου.

```
$ bgzip -c
/Users/andreasgi/NGS/targetSEQ/01b_PanelDesign_NuGen/design_ver03/01_ET1578_3_NuGenFiles/target_ET1578_3_777.bed >
/Users/andreasgi/NGS/targetSEQ/01b_PanelDesign_NuGen/design_ver03/01_ET1578_3_NuGenFiles/target_ET1578_3_777_sorted.bed.gz
$ tabix
/Users/andreasgi/NGS/targetSEQ/01b_PanelDesign_NuGen/design_ver03/01_ET1578_3_NuGenFiles/target_ET1578_3_777_sorted.bed.gz
```

VII.2.3 dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism database)

Η βάση δεδομένων dbSNP, που διατίθεται ελεύθερα από το Ινστιτούτο BROAD, αποσκοπεί στην καταγραφή πολυμορφικών θέσεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η έκδοση dbsnp 138 GRCh37/hg19.

```
Host name:      gsarubftp-anonymous@ftp.broadinstitute.org/bundle/hg19/
Username:      gsarubftp-anonymous
Download file: /dbsnp_138.hg19.vcf.gz
Download file: /dbsnp_138.hg19.vcf.idx.gz
```

Ακολουθεί, έλεγχος του τοπικού αρχείου τύπου vcf (Variant Call Format), της βάσης δεδομένων dbSNP, όπου διατηρούνται στοιχεία σχετικά με πολυμορφισμούς, όσον αφορά στην αρτιότητα και στη συνάφεια αυτών, ως προς την ονοματολογία των χρωμοσωμάτων και την αριθμητική τους ταξινόμηση, ώστε να συμφωνεί με το αρχείο του πρότυπου γονιδιώματος τύπου fasta.

```
$ grep -v "^#" /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbSNP/dbSNP_138/dbsnp_138.hg19.vcf | cut -f 1 |
uniq
$ awk '{if($0 !~ /^#/) print "chr"$0; else print $0}'
/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbSNP/dbSNP_138/dbsnp_138.hg19.vcf >
/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbSNP/dbSNP_138/dbsnp_138.hg19_2bit.vcf
$ picard SortVcf I=/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbSNP/dbSNP_138/dbsnp_138.hg19_2bit.vcf
O=/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/dbSNP/dbSNP_138/dbsnp_138.hg19_2bit_SORTED.vcf
SEQUENCE_DICTIONARY=/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Genome/fasta/hg19.dict
```

VII.3 Αρχεία διαβασμάτων (fastq files)

Αποθήκευση σε τοπικό σκληρό δίσκο, των δεδομένων που προκύπτουν από τη συσκευή MiSeq (Illumina). Με το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, τα διαβάσματα (reads), τα οποία καταγράφονται αυτόματα σε κατάλληλο αρχείο, τύπου fastq, έχουν τη μορφή που περιγράφεται στη συνέχεια:

1. Η πρώτη σειρά δεδομένων, περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τη συσκευή όπου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση, καθώς και στοιχεία που αφορούν στο εκάστοτε διάβασμα, όπως το δείγμα στο οποίο ανήκει αυτό, εφόσον η βιβλιοθήκη απαρτίζεται από περισσότερα του ενός (πολυπλεξία).
2. Στη δεύτερη σειρά δεδομένων, καταγράφεται η ακολουθία με την οποία ανιχνεύθηκαν τα νουκλεοτίδια του συγκεκριμένου διαβάσματος.

3. Στην τρίτη σειρά δεδομένων, περιέχονται πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα, με την οποία διαβάστηκε το κάθε νουκλεοτίδιο της δεύτερης σειράς.

```
Σειρά 1 → @M03483:21:000000000-D10AY:1:1102:5977:19175 1:N:0:1
           CTAGATCCTCTTGACAGCCTTACTTCACTCTGGACTGTGCCATCTCGAGGAGGCAGTGACAGCA
Σειρά 2 → ATGGCAGTTACTGTCAACAGGTGGACATTGAAAAGCTGAAAATCAACGGAGACTCTGAAGCACT
           GAGTCCTCACGGGGAGTCCACGGATACAGCCTCCGACTTGAAGGTCACCTCACGGAGGACAGC
           AGTGAGGCTGACACTAGAGAAGCTGCAGTGACAAAGGGATCTTCGGTGGACAAGGATGA
           +
           AAAABFFFFFFF4GGDGCFFGGHFHCFHGHNNHHGHGDHFDGHFC5FEGFAAEEGFGHNNH5EEF
Σειρά 3 → FHHHBAEG5FDHNNHFGBG@BG@BBF3G@FGFFFFGHHGHNNHGHBFHBEGGGGH34FGHGFB
           GHFDED?33/FF//<C/@2@BDC/AEHHFGCHB?.A>~<DBFGF1<DGGDCFCEGDC.?..:CEE
           HE;:G:GE.A?/000FB0BFGBB0:F/9;B00CBBCB.CB9//99.;DA9F.F..F/9
```

Εικόνα 123. Διαβάσματα NGS. Ένα διάβασμα (read), που περιλαμβάνεται σε ένα τυπικό αρχείο, τύπου *fastq*, όπου εμπεριέχονται πληροφορίες σχετικά με τη συσκευή, το δείγμα όπου ανήκει το διάβασμα, τη σειρά των νουκλεοτιδίων, όπως και την ποιότητα ανίχνευσης κάθε νουκλεοτιδίου.

Εφόσον επιλεγεί το κατάλληλο πρωτόκολλο, κατά το στάδιο του προσδιορισμού αλληλουχίας (Κεφάλαιο 4.6.7), τότε παρέχεται η δυνατότητα τόσο για ορθό διάβασμα (forward read, R1), όσο και για αντίστροφο διάβασμα (reverse read, R2), του εκάστοτε cluster νουκλεοτιδικών ακολουθιών (paired end sequencing).

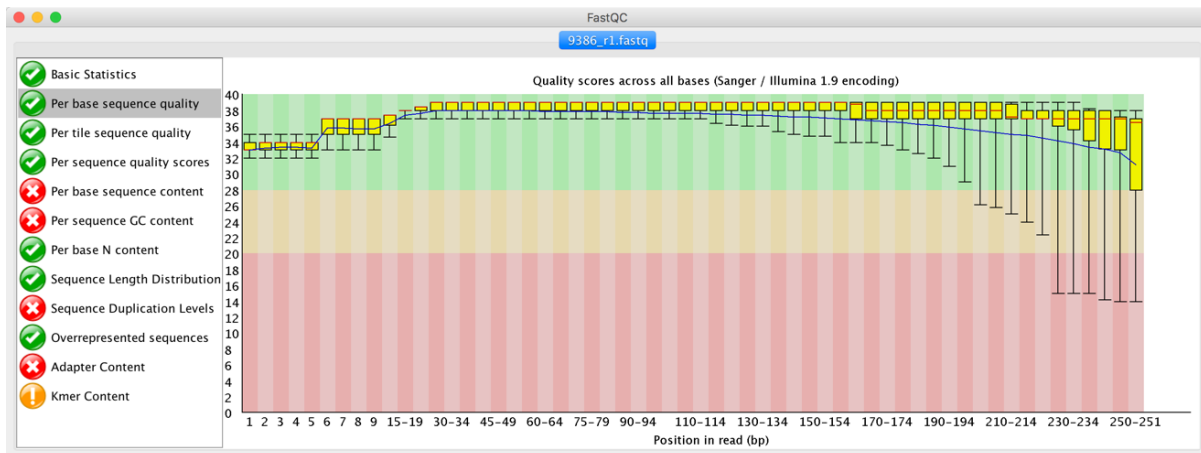
Η διάταξη αυτή προσφέρει αναλυτικό πλεονέκτημα, αφού ενισχύει την αρτιότητα της διαδικασίας αντιπαραβολής των διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος, οδηγώντας εν τέλει σε μεγαλύτερη αξιοπιστία κατά την ανίχνευση μεταλλάξεων.

VII.4 Αποπολυπλεξία των δειγμάτων (samples demultiplexing)

- Ακολουθεί μία διαδικασία αντιστοίχισης των διαβασμάτων, με το δείγμα από το οποίο προέκυψε κάθε διάβασμα, εφόσον στην αντίδραση περιλαμβάνονται ταυτόχρονα, περισσότερα από ένα δείγματα.
- Η αποπολυπλεξία των δειγμάτων ενός πειράματος βασίζεται στον μοναδικό συνδυασμό νουκλεοτιδίων του barcode που εμπεριέχεται στην αλληλουχία του adapter, του συγκεκριμένου δείγματος.

VII.5 Προσδιορισμός της ποιότητας των διαβασμάτων (quality control)

- Τοπική εγκατάσταση, από το διαδίκτυο, του λογισμικού προγράμματος FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html>) που λειτουργεί σε περιβάλλον Java (<https://java.com/en/download/>), το οποίο θα πρέπει να βρίσκεται ήδη εγκατεστημένο στον υπολογιστή.
- Μία χαρακτηριστική ανάλυση παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα, όπου απεικονίζεται διαγραμματικά (boxplot analysis), ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση, της ποιότητας με την οποία ανιχνεύτηκαν τα νουκλεοτιδία, στην εκάστοτε θέση, του συνόλου των διαβασμάτων, ενός μόνον δείγματος.
- Όπως φαίνεται, η ποιότητα διαβάσματος φθίνει, καθώς αυξάνεται σε μήκος η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, με την προσθήκη μονο-νουκλεοτιδίων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πολυμερισμού. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι εγγενές της τεχνολογίας που υπάρχει σήμερα.



Εικόνα 124. Διαγραμματική απεικόνιση της ποιότητας των διαβασμάτων (fastQC).

VII.6 Επεξεργασία των διαβασμάτων

- Το στάδιο της επεξεργασία των διαβασμάτων, αποσκοπεί στη βελτιστοποίηση της ποιότητας αυτών, όπως επίσης στην επακόλουθη προσαρμογή του μεγέθους και στην εξισορρόπηση των ζευγών ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων, εφόσον έχει επιλεγεί η συγκεκριμένη πειραματική διάταξη, ώστε να μην υπάρχουν μονήρεις νουκλεοτιδικές ακολουθίες, πριν την αντιπαραβολή τους επί του πρότυπου γονιδιώματος.

VII.6.1 Απομάκρυνση adapters (adapters clipping)

- Απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων που ανήκουν σε adapters, ή σε άλλες τεχνητές αλληλουχίες με χαρακτηριστική νουκλεοτιδική ακολουθία.

VII.6.2 Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας (trimming of low quality nucleotides)

- Τα νουκλεοτίδια χαμηλής ποιότητας συνήθως εντοπίζονται στα άκρα των διαβασμάτων, κυρίως δε προς το τέλος αυτών.

VII.6.3 Προσαρμογή μήκους διαβασμάτων (read length adjustment)

- Αλληλουχίες με μέγεθος μικρότερο από 70 νουκλεοτίδια απομακρύνονται από τη συνέχεια της αναλυτικής διαδικασίας, αφού έτσι διευκολύνεται το έργο τόσο του αλγόριθμου συγκριτικής ανάλυσης και προσαρμογής των αρχείων ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων, όσο και του αλγόριθμου αντιπαραβολής των διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος.

VII.6.4 Αντιπαραβολή ορθών (forward read) και αντίστροφων διαβασμάτων (reverse read)

- Εξισορρόπηση των ζευγαριών, ορθών και αντίστροφων διαβασμάτων, ώστε να μην υπάρχουν νουκλεοτιδικές ακολουθίες οι οποίες διαβάστηκαν μονάχα ως προς τη μία κατεύθυνση. Οι τελευταίες απαλείφονται από περαιτέρω αναλύσεις.

VII.7 Αντιπαραβολή των επεξεργασμένων διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος (alignment to reference)

- Ο αλγόριθμος bwa (Burrows-Wheeler Aligner) έχει παρατηρηθεί πως αποδίδει τα βέλτιστα αποτελέσματα, όσον αφορά στην αντιπαραβολή των διαβασμάτων επί ενός πρότυπου γονιδιώματος.

VII.8 Προετοιμασία του αρχείου αντιπαραβεβλημένων διαβασμάτων (alignment file) για ανίχνευση μεταλλάξεων

- Μετατροπή του αρχείου κειμένου, το οποίο προέκυψε κατά το προηγούμενο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας και περιέχει διαβάσματα αντιπαραβεβλημένα επί ενός πρότυπου γονιδιώματος (SAM alignment file), στη δυαδική μορφή αυτού (BAM alignment file).
- Ταξινόμηση κάθε αρχείου BAM, σύμφωνα με τις χρωμοσωμικές συντεταγμένες (genomic coordinates) των αντιπαραβεβλημένων διαβασμάτων, κατά αύξουσα σειρά.
- Δημιουργία ενός αρχείου καταλόγου (.bam.bai), που λειτουργεί ως ευρετήριο.

VII.9 Επισήμανση διπλών διαβασμάτων (flag duplicate reads)

- Τα διπλά διαβάσματα αποτελούν ενδεικτικό χαρακτηριστικό της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται σήμερα για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής των νουκλεϊκών οξέων με τεχνολογίες δεύτερης γενιάς.
- Οφείλονται δε σε επιμέρους στάδια ενίσχυσης των νουκλεοτιδικών αλυσίδων, μέσω PCR, τα οποία αποτελούν μέρος της διαδικασίας σύνθεσης βιβλιοθήκης δειγμάτων.
- Τα διπλά διαβάσματα επισημαίνονται, ώστε αργότερα δεν συνυπολογίζονται στην ανάλυση, αφού ενδέχεται να συμβάλλουν σε λανθασμένη ανάδειξη μεταλλάξεων, οι οποίες δεν υπάρχουν στην πραγματικότητα στο δείγμα (false positives) ή σε ενίσχυση του ποσοστού με το οποίο ανιχνεύονται μεταλλάξεις (variant allele frequency, VAF), οι οποίες όντως υφίστανται.

VII.10 Προσθήκη κεφαλίδας δείγματος (read group)

- Η κεφαλίδα των διαβασμάτων ενός δείγματος περιλαμβάνει στοιχεία για την τεχνολογία και τη συσκευή NGS που χρησιμοποιήθηκε, για το μήκος και την κατεύθυνση διαβάματος, για το εκάστοτε δείγμα που αναλύεται επί του παρόντος, καθώς και επιπρόσθετα στοιχεία, που είναι χρήσιμα τόσο για την αναλυτική διαδικασία, όσο και για τη μετέπειτα αρχειοθέτηση των δεδομένων.

VII.11 Ανάλυση ποσοστού διπλών διαβασμάτων (duplication percentage)

- Το ποσοστό διπλών διαβασμάτων αποτελεί ένα χρήσιμο στατιστικό στοιχείο που φανερώνει την ποιότητα μίας αντίδρασης προσδιορισμού αλληλουχίας (NGS run), καθώς και την αξιοπιστία με την οποία αναδεικνύονται οι επιμέρους μεταλλάξεις, σε κάθε δείγμα.

VII.12 Ανάλυση βάθους διαβάματος (coverage)

- Προηγείται η δημιουργία ενός νέου αρχείου καταλόγου (.bam.bai).
- Το βάθος διαβάματος (read depth) αποτελεί επιμέρους στατιστικό στοιχείο, που αναδεικνύει την επαρκή κάλυψη των υπο ανάλυση γονιδιωματικών περιοχών (coverage), ενώ αποτελεί ενδεικτικό χαρακτηριστικό, της ποιότητας μίας αντίδρασης προσδιορισμού αλληλουχίας (NGS run), καθώς και της αξιοπιστία με την οποία αναδεικνύονται οι επιμέρους μεταλλάξεις, σε κάθε δείγμα.

VII.13 Αναβαθμονόμηση των δεδομένων ποιότητας των νουκλεοτιδίων (Base Quality Score Recalibration, BQSR)

- Η διαδικασία αυτή χρησιμεύει στην αναβαθμονόμηση της ποιότητας με την οποία διαβάστηκε κάθε νουκλεοτίδιο, κατά τη διάρκεια μίας αντίδρασης NGS, προτού αναδειχθούν οι νουκλεοτιδικές εξαλλαγές στα ακόλουθα στάδια της βιοπληροφορικής αναλυτικής πορείας.
- Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται μία εξομάλυνση των δεδομένων στο σύνολό τους, αφού οι επι μέρους τιμές, που αφορούν στην ποιότητα του εκάστοτε διαβάσματος (quality scores), ενδεχομένως εμπεριέχουν συστηματικά λάθη, που μπορεί να οφείλονται στην ίδια τη συσκευή, όπως και σε άλλες παραμέτρους που επηρεάζουν το κάλεσμα των νουκλεοτιδίων σε κάθε γύρο διαβάσματος.
- Ακολουθεί, επισκόπηση της αναβαθμονόμησης, των τιμών της ποιότητας των διαβασμάτων και καταγραφή αυτών σε κατάλληλο αρχείο (τύπου pdf).
- Έπεται, επισήμανση των διαβασμάτων που δεν έχουν αντιπαραβληθεί επιτυχώς επί του πρότυπου γονιδιώματος.
- Δημιουργία ενός νέου αρχείου καταλόγου (.bam.bai).
- Επιβεβαίωση της ακεραιότητας, του αρχείου αναβαθμονομημένων διαβασμάτων, τα οποία έχουν αντιπαραβληθεί επιτυχώς επί του πρότυπου γονιδιώματος, πριν από την ανάδειξη μεταλλάξεων.

VII.14 Ανάδειξη μεταλλάξεων με τον αλγόριθμο HaplotypeCaller (GATK)

- Ο αλγόριθμος HaplotypeCaller, που παρέχεται από το Ινστιτούτο BROAD, αποτελεί ένα μόνον από τα διαθέσιμα εργαλεία βιοπληροφορικών αναλύσεων, που έχουν αναπτυχθεί από το συγκεκριμένο φορέα, με στόχο την ανίχνευση μεταλλάξεων, σε δεδομένα αντιδράσεων NGS.
- Το σύνολό των ΠΒΑ που παρέχονται τελεί υπό τη γενική ονομασία εργαλειοθήκη ανάλυσης του γονιδιώματος (Genome Analysis Toolkit, GATK).
- Οι αναδεδειγμένες μεταλλάξεις καταγράφονται σε αρχείο τύπου vcf.

VII.15 Ανάδειξη μεταλλάξεων μέσω συνδυασμού των αλγόριθμων samtools/bcftools

- Η συνδυαστική χρήση συγκεκριμένων εντολών, των αλγόριθμων samtools και bcftools, χρησιμεύει στην ανάδειξη μεταλλάξεων, όπως ακριβώς και ο αλγόριθμος HaplotypeCaller. Ο τελευταίος, ωστόσο, αναγνωρίζει επιπρόσθετους τύπους μεταλλάξεων, όπως διαγραφές και προσθήκες νουκλεοτιδίων, δυνατότητα που δεν παρέχεται από το συνδυασμό των δύο πρώτων αλγόριθμων, οι οποίοι λειτουργούν κυρίως ως μηχανισμός επιβεβαίωσης των προηγουμένως αναδεδειγμένων σημειακών νουκλεοτιδικών εξαλλαγών.
- Αρχικά, πραγματοποιείται προετοιμασία του αρχείου, μέσω προσθήκης χρήσιμων δεδομένων.
- Ακολούθως, διαμορφώνεται ένα αρχείο που λειτουργεί ως ευρετήριο.
- Τέλος, καλούνται οι νουκλεοτιδικές εξαλλαγές, οι οποίες, όπως και προηγουμένως, καταγράφονται σε αρχείο τύπου vcf.

VII.16 Ενημέρωση των αρχείων μεταλλάξεων με βιολογικά και κλινικά δεδομένα

- Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται ενημέρωση των αρχείων μεταλλάξεων με βιολογικά και κλινικά στοιχεία, που υπάρχουν διαθέσιμα σε διεθνείς βάσεις

δεδομένων, προκειμένου οι αναδεδειγμένες μεταλλάξεις να αξιολογηθούν κατάλληλα, σε επόμενο στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας.

- Αρχικά προστίθενται στοιχεία που περιλαμβάνονται σε προεγκατεστημένη βάση δεδομένων του αλγόριθμου snpEff. Η βάση δεδομένων που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να επιλεγεί εκ των προτέρων και να εγκατασταθεί τοπικά. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η πιο πρόσφατα ενημερωμένη έκδοσή της 19ης έκδοσης ανθρώπινου γονιδιώματος (hg19), GRCh37.75, η οποία προσεγγίστηκε απομακρυσμένα μέσω της παρακάτω εντολής.

```
$ snpEff download -v GRCh37
```

- Στη συνέχεια, προστίθενται στοιχεία, σχετικά με την επίπτωση των αναδεδειγμένων μεταλλάξεων, καθώς και επιπρόσθετα δεδομένα.
- Μεταλλάξεις χωρίς επίπτωση στο γενετικό προφίλ του ασθενούς, όπως εκείνες που συντελούν σε συνώνυμα κωδικώνια (silent mutations), αρχικά επισημαίνονται και έπειτα απομακρύνονται μέσω διαδοχικών εντολών.
- Ακολουθεί επισήμανση των διαβασμάτων και των νουκλεοτιδίων με χαμηλή ποιότητα και βάθος διαβάσματος.
- Παράλληλα, οι διαγραφές/προσθήκες νουκλεοτιδίων, κάθε επί μέρους γενομικής περιοχής ενδιαφέροντος, ευθυγραμμίζονται στο αριστερό τους άκρο (left alignment), μία πάγια τακτική που απαλείφει παρερμηνείες του εναρκτήριου σημείου, αυτού του είδους των μεταλλάξεων. Το πρόβλημα αυτό ανακύπτει, λόγω της αδυναμίας που παρουσιάζουν οι αλγόριθμοι ανάδειξης μεταλλάξεων, να αναγνωρίζουν επαναλαμβανόμενα νουκλεοτιδικά μοτίβα, στα άκρα των μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα να μην αντιλαμβάνονται ότι πρόκειται για την ίδια μετάλλαξη, όπως επίσης ποιό είναι το εναρκτήριο σημείο αυτής. Η διαδικασία αυτή, αποτελεί μία σύμβαση, που ενισχύει την ομοιογένεια των δεδομένων που προέρχονται από διαφορετικές NGS πειραματικές διαδικασίες.

VII.16.1 Ολοκληρωμένη βάση δεδομένων Oncotator

Επιπρόσθετα στοιχεία, ενσωματώνονται στα αρχεία μεταλλάξεων, μέσω του ολοκληρωμένου συστήματος Oncotator.

VII.16.2 Ολοκληρωμένη βάση δεδομένων dbNSFP3.5

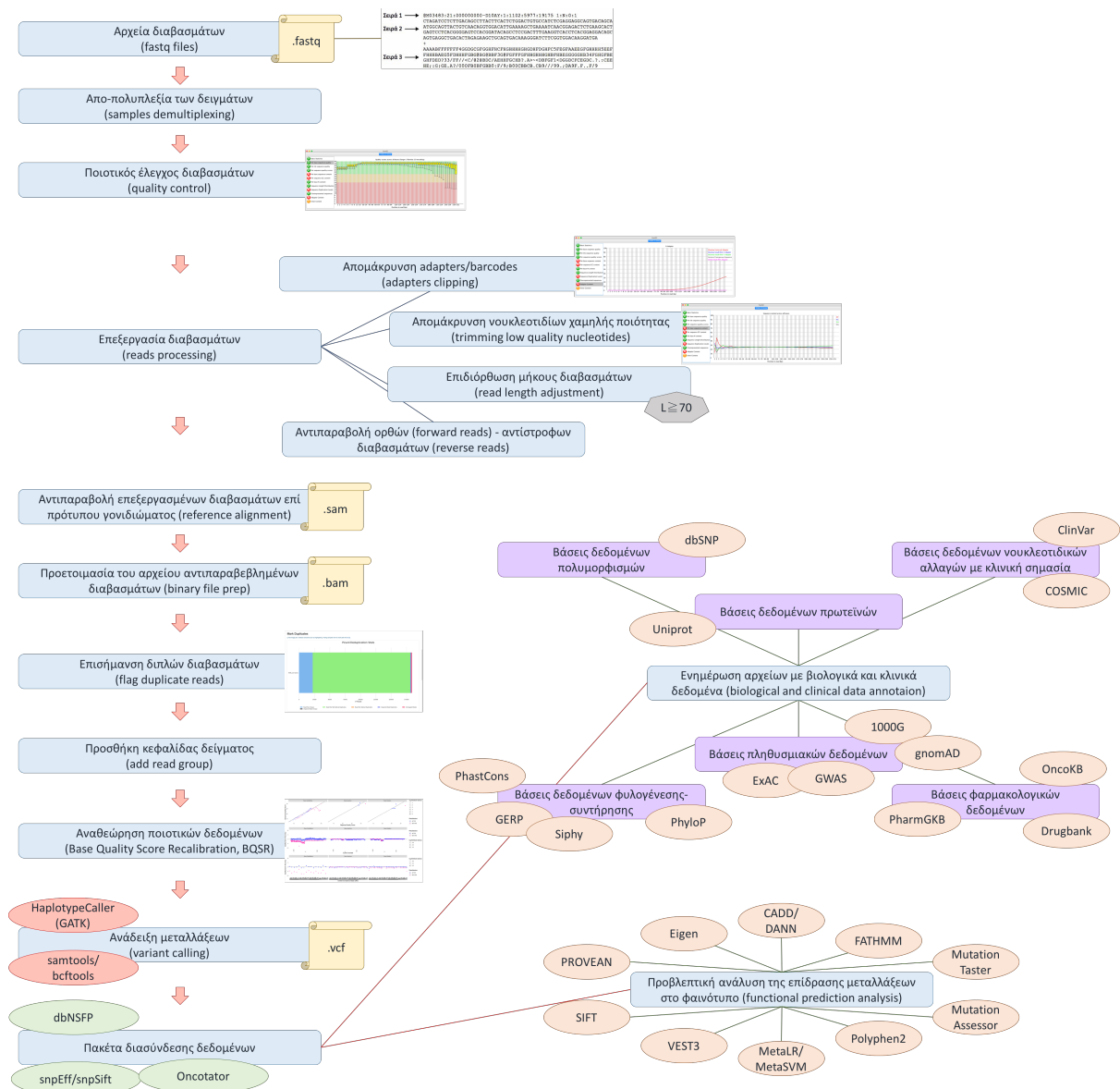
Επιπρόσθετα στοιχεία, ενσωματώνονται στα αρχεία μεταλλάξεων, μέσω του ολοκληρωμένου συστήματος dbNSFP3.5.

VII.17 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης δεδομένων

Μέχρι στιγμής, ακολουθώντας την παραπάνω αλγοριθμική πορεία, έχουν υλοποιηθεί τέσσερις διαφορετικές κύριες αναλυτικές διαδικασίες:

- *HaplotypeCaller (GATK) -> snpEff/snpSift -> oncotator*
- *samtools/bcftools -> snpEff/snpSift -> oncotator*
- *HaplotypeCaller (GATK) -> snpEff/snpSift -> dbNSFP3.5*
- *samtools/bcftools -> snpEff/snpSift -> dbNSFP3.5*

Τα δεδομένα που προέρχονται από αυτές τις αναλύσεις, μεταφράζονται και αποθηκεύονται σε αρχεία που μπορούν να αξιολογηθούν μέσω απλών υπολογιστικών προγραμμάτων, όπως φυλλομετρητές. Η αναλυτική πορεία περιγράφεται συνοπτικά στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 125. Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων Targeted-Seq. Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας βιοπληροφορικής ανάλυσης, των δεδομένων που προκύπτουν από πειράματα στοχευμένου προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων (Targeted-Seq), με τεχνολογία NGS.

Παράρτημα VIII - Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων NGS RNA-Seq

VIII.1 Προετοιμασία του υπολογιστικού περιβάλλοντος

VIII.1.1 Λήψη και εγκατάσταση επιπρόσθετων ΠΒΑ μέσω Python

Το ΠΒΑ htseq-count είναι υπεύθυνο για την ανάδειξη του πλήθους των διαβασμάτων που αριθμεί το κάθε γονίδιο της ανάλυσης RNA-Seq. Αποδίδει έτσι ουσιαστικά, με έμμεσο τρόπο, τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης (raw data).

```
$ pip install htseq-count
```

VIII.1.2 Λήψη και εγκατάσταση επιπρόσθετων ΠΒΑ μέσω Homebrew

Ακολουθεί η εντολή για την εγκατάσταση του ΠΒΑ tophat2/bowtie2, για την χαρτογράφηση των διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος hg19:

```
$ brew install tophat
```

VIII.1.3 Προετοιμασία περιβάλλοντος R- Λήψη και εγκατάσταση ΠΒΑ μέσω R

Για τις αναλύσεις σε γλώσσα προγραμματισμού R εγκαταστάθηκε τοπικά η γλώσσα R (εκδοχή 3.5.2) σε συνδυασμό με το λογισμικό Rstudio (εκδοχή 1.1.463).

Ακολουθούν οι κατάλληλες εντολές σε περιβάλλον R:

```
> if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
>   install.packages("BiocManager")
> BiocManager::install("DESeq2", version = "3.8")
> BiocManager::install("edgeR", version = "3.8")
> BiocManager::install("limma", version = "3.8")
```

VIII.2 Προετοιμασία πρότυπων αρχείων (reference files)

VIII.2.1 Πρότυπο γονιδίωμα hg19

Το πρότυπο αρχείο με δεδομένα του μεταγραφώματος προετοιμάζεται κατάλληλα, πριν από ενσωμάτωσή του σε διάφορα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας.

```
bowtie2-build /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Transcriptome/bowtie2/hg19.fasta
/Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Transcriptome/bowtie2/hg19/
```

VIII.2.2 Πρότυπο μεταγράφημα hg19

Η διαδικτυακή εκδοχή, του αρχείου όπου περιλαμβάνεται το ανθρώπινο μεταγράφημα hg19, που παρέχεται από το Ινστιτούτο UCSC.

```
ftp://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/
```

Το αρχείο αποθηκεύεται τοπικά προκειμένου να ενσωματωθεί σε διάφορα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας.

```
$ cd /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Transcriptome/gtf/hg19.gtf
```

VIII.3 Προσδιορισμός της ποιότητας των διαβασμάτων (quality control)

Όπως η αντίστοιχη ανάλυση στο Κεφ. VII.5

VIII.4 Επεξεργασία των διαβασμάτων

VIII.4.1 Απομάκρυνση νουκλεοτιδίων χαμηλής ποιότητας (*trimming of low quality nucleotides*)

Τα νουκλεοτίδια χαμηλής ποιότητας συνήθως εντοπίζονται στα άκρα των διαβασμάτων, συνήθως 5-10 νουκλεοτίδια στην αρχή κάθε διαβάσματος, για τα δεδομένα RNA-Seq.

VIII.5 Αντιπαραβολή των επεξεργασμένων διαβασμάτων επί του πρότυπου γονιδιώματος (*alignment to reference*)

Ο αλγόριθμος tophat2/bowtie2 έχει παρατηρηθεί πως αποδίδει τα βέλτιστα αποτελέσματα, όσον αφορά στην αντιπαραβολή των διαβασμάτων RNA-Seq επί ενός πρότυπου γονιδιώματος. Το αρχείο που προκύπτει περιέχει διαβάσματα αντιπαραβεβλημένα επί ενός πρότυπου γονιδιώματος (SAM alignment file).

```
$ tophat --num-threads 20 --rg-id s02 --rg-sample sample01 --rg-library Batch01 --rg-center BRFAA --rg-platform HiSeq2000 --no-convert-bam --keep-fasta-order --no-coverage-search --b2-sensitive -G /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Trnascriptome/gtf/hg19.gtf -o /Users/andreasgi/NGS/RNASeq/Batch01 /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Transcriptome/bowtie2/hg19.fasta /Users/andreasgi/NGS/RNASeq/Batch01/sample01.fastq
```

VIII.6 Καταμέτρηση των διαβασμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε γονίδιο

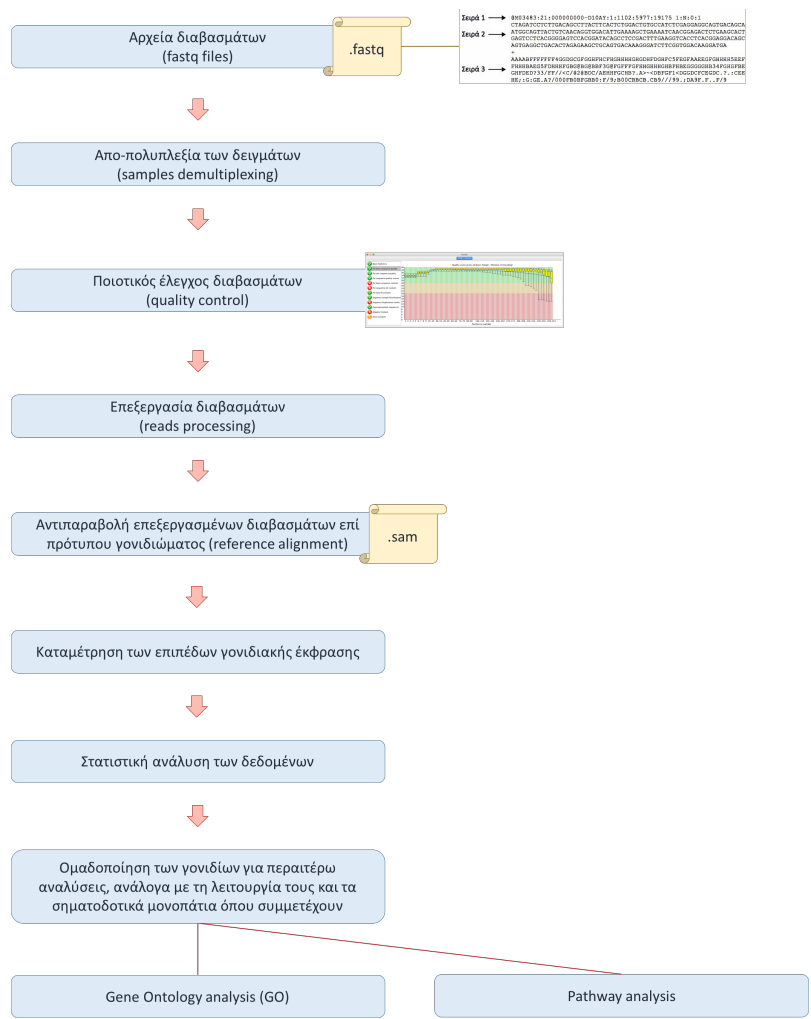
Με τη διαδικασία αυτή ουσιαστικά προσμετράται η έκφραση κάθε γονιδίου. Η εντολή για τη συγκεκριμένη διεργασία είναι η εξής:

```
$ htseq-count --mode=intersection-nonempty --stranded=no /Users/andreasgi/NGS/RNASeq/Batch01/sample01.sam /Users/andreasgi/NGS/REF/hg19/Trnascriptome/gtf/hg19.gtf > /Users/andreasgi/NGS/RNASeq/Batch01/sample01.txt
```

VIII.7 Καταμέτρηση των διαβασμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε γονίδιο

Ακολουθεί στατιστική ανάλυση των διαβασμάτων μέσω των ΠΒΑ DESeq2, edgeR και Limma-voom.

Τα δεδομένα που προέρχονται από αυτές τις αναλύσεις, αποθηκεύονται σε αρχεία που μπορούν να αξιολογηθούν μέσω απλών υπολογιστικών προγραμμάτων, όπως φυλλομετρητές. Η αναλυτική πορεία περιγράφεται συνοπτικά στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 126. Βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων RNA-Seq. Συνοπτική περιγραφή της διαδικασίας βιοπληροφορικής ανάλυσης, των δεδομένων μεταγραφώματος που προκύπτουν από πειράματα RNA-Seq, με τεχνολογία NGS.

- Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R et al. *ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression*. *Cancer Cell*. 2012;22(2):180-93.
- Abdel-Wahab O, Levine R. The spliceosome as an indicted conspirator in myeloid malignancies. *Cancer Cell*. 2011;20(4):420-422.
- Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, et al. *ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression*. *Cancer Cell*. 2012;22(2):180-193.
- Akutagawa J, Huang TQ, Epstein I, Chang T, Quirindongo-Crespo M, Cottonham CL, Dail M, Slusher BS, Friedman LS, Sampath D, et al. Targeting the PI3K/Akt pathway in murine MDS/MPN driven by hyperactive Ras. *Leukemia*. 2016;30(6):1335-43.
- Al-Kali A, Quintás-Cardama A, Luthra R, Bueso-Ramos C, Pierce S, Kadia T, Borthakur G, Estrov Z, Jabbour E, Faderl S et al. Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 2013;88(5):365-9.
- Alfonso A, Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Current management of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2017;29(1):79-87.
- Alvarez Argote J, Dasanu CA. *ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival*. *Curr Med Res Opin*. 2018;34(5):757-763.
- Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y, Kan S, Shirane S, Edahiro Y, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;10;127(10):1307-16
- Aranda S, Mas G, Di Croce L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv*. 2015;1(11):e1500737.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
- Aujla A, Linder K, Iragavarapu C, Karass M, Liu D. *SRSF2 mutations in myelodysplasia/myeloproliferative neoplasms*. *Biomark Res*. 2018;6:29.
- d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F. Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4. *Hum Genet*. 1988;78(4):374-6.
- Babaei MA, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2443-59.
- Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lähdesmäki H, Rao A. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat Commun*. 2015;6:7307.
- Balasubramanian SK, Aly M, Nagata Y, Bat T, Przychodzen BP, Hirsch CM, Adema V, Visconte V, Kuzmanovic T, Radivoyevitch T, et al. Distinct clinical and biological implications of various DNMT3A mutations in myeloid neoplasms. *Leukemia*. 2018;32(2):550-553.

- Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
- Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Vinciguerra M, Agodi A. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(10):e109478. doi: 10.1371/journal.pone.0109478. eCollection 2014.
- Bartels S, Lehmann U, Büsche G, Schlue J, Mozer M, Stadler J, Trivai I, Alchalby H, Kröger N, Kreipe H. SRSF2 and U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently reoccur after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2015 Jan; 29(1): 253–255.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054-1061.
- Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature.* 1986;320(6061):415-21.
- Bilbao-Sieyro C, Santana G, Moreno M, Torres L, Santana-Lopez G, Rodriguez-Medina C, Perera M, Bellosillo B, de la Iglesia S, Molero T, et al. High Resolution Melting Analysis: A Rapid and Accurate Method to Detect CALR Mutations. *PLoS one.* 2014;9(7): e103511.
- Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL, Ito S, Cooper S, Kondo K, Koseki Y et al. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell.* 2014;157(6):1445-59.
- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood.* 1998;92(9):3362-7.
- Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, Olivier M. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat.* 2016;37(9):865-76
- Boulwood J, Perry J, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, Fernandez-Santamaria C, Calasanz MJ, Larrayoz MJ, Garcia-Delgado M, Giagounidis A, Malcovati L, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2010;24(5):1062-1065.
- Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adélaide J, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Chaffanet M, Mozziconacci MJ et al. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica* 2014;99(1):37-45.
- Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, Florensa Brichs L, Jeromin S, Lippert E, Rozman M, Lifermann F, Grossmann V, Haferlach T et al. Age, JAK2(V617F) and SF3B1 mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia.* 2013;27(9):1826-31.
- Cai X, Hayashi Y, Wunderlich M, Speck NA, Mulloy JC, Huang G, Zheng Y. Loss of Function RUNX1 Mutations Restrict Protein Biosynthesis during Pre-Leukemia and MDS Transition but Not after Leukemic Transformation. *Blood* 2016 128:3860.

- Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(3):153-9.
- Cazzola M, Rossi M, Malcovati L; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(2):260-269.
- Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(24):3714-3719.
- Cazzola M. Mutant calreticulin: when a chaperone becomes intrusive. *Blood*. 2016;127(10):1219-1220.
- Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011;44(1):23-31.
- Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*. 2003;23(16): 5594-5605.
- Chesnais V, Kosmider O, Damm F, Itzykson R, Bernard OA, Solary E, Fontenay M. Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*. 2012;3(11):1284-1293.
- Clara JA, Sallman DA, Padron E. Clinical management of myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm overlap syndromes. *Cancer Biol Med*. 2016;13(3):360-372.
- Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:208-214.
- Cui Y, Li B, Gale RP, Jiang Q, Xu Z, Qin T, Zhang P, Zhang Y, Xiao Z. CSF3R, SETBP1 and CALR mutations in chronic neutrophilic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2014;7:77.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372-375.
- Dao KH, Tyner JW. What's different about atypical CML and chronic neutrophilic leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:264-71.
- Dao KT, Tyner JW, Gotlib J. Recent Progress in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical Chronic Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(5):432-441.
- DiNardo CD, Cortes JE. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):348-355.
- Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):a011601.
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009 Feb 3;10:48. doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
- Elliott MA, Pardanani A, Hanson CA, Lasho TL, Finke CM, Belachew AA, Tefferi A. ASXL1 mutations are frequent and prognostically detrimental in CSF3R-mutated chronic neutrophilic leukemia. *Am J Hematol*. 2015;90(7):653-6.

- Elliott MA, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia 2016: Update on diagnosis, molecular genetics, prognosis, and management. *Am J Hematol.* 2016;91(3):341-9.
- Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010;42(8):722-726.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(3):164-72.
- Feng H, Qin Z, Zhang X. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. *Cancer Lett.* 2013;340(2):179-91.
- Figueira MI, Cardoso HJ, Correia S, Maia CJ, Socorro S. Hormonal regulation of c-KIT receptor and its ligand: implications for human infertility? *Prog Histochem Cytochem.* 2014;49(1-3):1-19.
- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18(6):553-567.
- Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne CH, Germing U, von Lilienfeld-Toal M, Held G, Horst HA, Haase D, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol.* 2012;30(12):1350-1357.
- Gajendra S, Gupta R, Chandgothia M, Kumar L, Gupta R, Motilal Chavan S. Chronic Neutrophilic Leukemia with V617F JAK2 Mutation. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2014;30(2):139–142.
- Gambacorti-Passerini CB, Donadoni C, Parmiani A, Pirola A, Redaelli S, Signore G, Piazza V, Malcovati L, Fontana D, Spinelli R et al. Recurrent ETNK1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2015 Jan 15;125(3):499-503.
- Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016;769:47-62.
- Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Methods Mol Biol.* 2009;578:415-424.
- Geisler SJ, Paro R. Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development.* 2015;142(17):2876-2887.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009;145(6):788-800.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol.* 2012;5:12.
- Giannopoulos A, Rougkala N, Loupis T, Mantzourani M, Viniou NA, Variami E, Vassilakopoulos T, Dryllis G, Kotsianidis I, Gougopoulou T, Politou M, Konstantopoulos K, Vassilopoulos G. Detection of CALR mutations using High Resolution Melting Curve

- Analysis (HRM-A); Application on a large Cohort of Greek ET and MF patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1).
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
 - Graubert TA, Shen D, Ding L, Okeyo-Owuor T, Lunn CL, Shao J, Krysiak K, Harris CC, Koboldt DC, Larson DE, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2012;44(1):53-57.
 - Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, et al. Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(7):838-874.
 - Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*. 2014;28(7):1396-406.
 - Griffin HG, Griffin AM. DNA sequencing. Recent innovations and future trends. *Appl Biochem Biotechnol*. 1993;38(1-2):147-159.
 - Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, Fanelli T, Ernst T, Winkelmann N, Jones AV, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118(19):5227-5234.
 - Guo Y, Yang H, Chen S, Zhang P, Li R, Nimer SD, Harbour JW, Xu M, Yang FC. Reduced BAP1 activity prevents ASXL1 truncation-driven myeloid malignancy in vivo. *Leukemia*. 2018. doi: 10.1038/s41375-018-0126-9. [Epub ahead of print]
 - Harada H, Harada Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Sci*. 2015;106(4):329-336.
 - Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(9):1296-303.
 - Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as Inflammatory Diseases: The Evidence, Consequences, and Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:102476.
 - He X, Chen Z, Jiang Y, Qiu X, Zhao X. Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J Hematol Oncol*. 2013;6:11.
 - Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8.
 - Heuser M, Panagiota V, Koenecke C, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Shahswar R, Stadler M, Eder M, Göhring G, et al. Low frequency of calreticulin mutations in MDS patients. *Leukemia*. 2014;28(9):1933-1934.
 - Hong JY, Seo JY, Kim SH, Jung HA, Park S, Kim K, Jung CW, Kim JS, Park JS, Kim HJ et al. Mutations in the Spliceosomal Machinery Genes SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 and Response to Decitabine in Myelodysplastic Syndrome. *Anticancer Res*. 2015;35(5):3081-9.
 - Hughes S, Jones JL. The use of multiple displacement amplified DNA as a control for methylation specific PCR, pyrosequencing, bisulfite sequencing and methylation-sensitive restriction enzyme PCR. *BMC Mol Biol*. 2007;8:91.
 - Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988;174(2):423-36.

- Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia* 2014; 28(9):1774-1783.
- Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B, Kiladjian JJ, Varkonyi J, Antunovic P, Westwood NB, et al. The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*. 2006;20(7):1319-1321.
- Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4627-4440.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Adès L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013;31(19):2428-36.
- Itzykson R, Duchmann M, Lucas N, Solary E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int J Hematol*. 2017;105(6):711-719.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:245-254.
- Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Meggendorfer M, Pffirmann M, Sotlar K, Horny HP, Metzgeroth G, Kluger S, Naumann N. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-43.
- Jawhar M, Schwaab J, Meggendorfer M, Naumann N, Horny HP, Sotlar K, Haferlach T, Schmitt K, Fabarius A, Valent P et al. The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica*. 2017;102(6):1035-1043.
- Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C, Kern W and Schnittger S. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2013;98(2): e15-e17.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(6):2162-2168.
- Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, Keating MJ, Walters RS, Talpaz M, Hester JP, Bligham G, Gehan E, Freireich EJ. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*. 1985;66(6):1326-35.
- Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giral S, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000;90-109.
- Katoh M. Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br J Cancer*. 2013;109(2):299-306.

- Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC, Ramakrishnan A, Li Y, Chung YR, Micol JB, Murphy ME, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*. 2015;27(5):617-30.
- Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenetics*. 2011;2(2):315-330.
- Kitamura T, Inoue D, Okochi-Watanabe N, Kato N, Komeno Y, Lu Y, Enomoto Y, Doki N, Uchida T, Kagiya Y, et al. The molecular basis of myeloid malignancies. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2014;90(10):389–404.
- Kitamura T. ASXL1 mutations gain a function. *Blood*. 2018;131(3):274-275.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390.
- Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):37–46.
- Kosmider O. Mutations of ETNK1 in aCML and CMML. *Blood*. 2015 Jan 15;125(3):422-3.
- Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, Kobayashi H, Narukawa K, Miyoshi H, Shirahige K et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nat Commun*. 2016;7:10924.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790.
- Kuo MC, Liang DC, Huang CF, Shih YS, Wu JH, Lin TL, Shih LY. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*. 2009;23(8):1426-31.
- Laborde RR, Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Pardanani A, and Tefferi A. SETBP1 mutations in 415 patients with primary myelofibrosis or chronic myelomonocytic leukemia: independent prognostic impact in CMML. *Leukemia* 2013;27(10):2100–2102.
- Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, Bellosillo B, Carillo S, Haslam K, Kjaer L, Lippert E, Mansier O, Oppliger Leibundgut E. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. 2015;95(4):270-9.
- Larsson CA, Cote G, Quintás-Cardama A. The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Mol Cancer Res*. 2013;11(8):815-827.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 1993;2(4):275-287.
- Leggett RM, Ramirez-Gonzalez RH, Clavijo BJ, Waite D, Davey RP. Sequencing Quality Assessment Tools to Enable Data-driven Informatics for High Throughput Genomics. *Front Genet*. 2013; 4: 288.

- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397.
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):673-83.
- Li B, Gale RP, Xiao Z. Molecular genetics of chronic neutrophilic leukemia, chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2014;7:93.
- Li Y, Jorge A. DEApp: an interactive web interface for differential expression analysis of next generation sequence data. *Source Code Biol Med*. 2017; 12: 2. Published online 2017 Feb 3. doi: 10.1186/s13029-017-0063-4
- Li Z, Zhang P, Yan A, Guo Z, Ban Y, Li J, Chen S, Yang H, He Y, Li J et al. ASXL1 interacts with the cohesin complex to maintain chromatid separation and gene expression for normal hematopoiesis. *Sci Adv*. 2017;3(1):e1601602.
- Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(5):435-43.
- Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol*. 2017; 13(5): e1005457. Published online 2017 May 18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005457
- Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S, Singh RR. Next-Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers* 2015;7:2023–2036.
- Madan V, Kanojia D, Li J, Okamoto R, Sato-Otsubo A, Kohlmann A, Sanada M, Grossmann V, Sundaresan J, Shiraishi Y et al. Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nat Commun*. 2015;6:6042.
- Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, Abu Kar S, Jerez A, Przychodzen B, Bupathi M, Guinta K, Aftable MG, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(14):3203-3210.
- Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013;45(8):942-6.
- Makishima H. Somatic SETBP1 mutations in myeloid neoplasms. *Int J Hematol*. 2017;105(6):732-742
- Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2013;6:287-303.
- Mason CC, Khorashad JS, Tantravahi SK, Kelley TW, Zabriskie MS, Yan D, Pomictier AD, Reynolds KR, Eiring AM, Kronenberg Z et al. Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):906-13.
- Mastoraki S, Chimonidou M, Dimitrakopoulos L, Kounelis S, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou E. A rapid and accurate closed-tube Methylation-Sensitive High Resolution Melting Analysis assay for the semi-quantitative determination of SOX17 promoter methylation in clinical samples. *Clin Chim Acta*. 2015;444:303-9.

- Maxson J, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, Bottomly D, Wilmot B, McWeeney SK, Tognon CE. Oncogenic CSF3R Mutations in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical CML. *Engl J Med*. 2013;368(19):1781–1790.
- Maxson JE, Tyner JW. Genomics of chronic neutrophilic leukemia. *Blood*. 2017;129(6):715-722.
- Mc Lornan DP, Percy MJ, Jones AV, Cross NC, Mc Mullin MF. Chronic neutrophilic leukemia with an associated V617F JAK2 tyrosine kinase mutation. *Haematologica*. 2005;90(12):1696-7.
- Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2017;31(2):272-281.
- Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120(15):3080-8.
- Meggendorfer M, Haferlach T, Alpermann T, Jeromin S, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(12):e244–e246.
- Meggendorfer M, Jeromin S, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. The mutational landscape of 18 investigated genes clearly separates four subtypes of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2018;103(5):e192-e195.
- Meldrum D. Automation for genomics, part one: preparation for sequencing. *Genome Res*. 2000;10(8):1081-1092.
- Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Levenson Chernokhvostov VV. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(10):e93.
- Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(1):31-46.
- Migheli F, Stoccoro A, Coppedè F, Wan Omar WA, Failli A, Consolini R, Seccia M, Spisni R, Miccoli P, Mathers JC, Migliore L. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS One*. 2013;8(1):e52501.
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
- Mughal TI, Cortes J, Cross NC, Donato N, Hantschel O, Jabbour E, Kantarjian H, Melo JV, Skorski T, Silver RT, et al. Chronic myeloid leukemia-some topical issues. *Leukemia*. 2007;21(7):1347-1352.
- Mughal TI, Cross NC, Padron E, Tiu RV, Savona M, Malcovati L, Tibes R, Komrokji RS, Kiladjan JJ, Garcia-Manero G et al. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(9):1117-1130.

- Mughal TI, Abdel-Wahab O, Rampal R, Mesa R, Koschmieder S, Levine R, Hehlmann R, Saglio G, Barbui T, Van Etten RA. Contemporary insights into the pathogenesis and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(7):1517-26.
- Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP. Chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: novel pathogenetic lesions. *Semin Oncol*. 2012;39(1):67-73.
- Nagarajan N, Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):157-67.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405.
- Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, Godfrey AL, Grinfeld J, Thakker C, Massie CE, Baxter J, Sewell D, Silber Y. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica*. 2015;100(11):e438-42.
- Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood* 2017;130:2475-2483.
- Newman M, Blyth BJ, Hussey DJ, Jardine D, Sykes PJ, Ormsby RJ. Sensitive quantitative analysis of murine LINE1 DNA methylation using high resolution melt analysis. *Epigenetics*. 2012;7(1):92-105.
- Nowell PC and Hungerford DA. A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
- Nyrén P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Anal Biochem*. 1987;167(2):235-8.
- Onida F. Models of Prognostication in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(6):513-521.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
- Oshima K, Khiabani H, da Silva-Almeida AC, Tzoneva G, Abate F, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Carpenter Z, Penson A, Perez-Garcia A, et al. Mutational landscape, clonal evolution patterns, and role of RAS mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):11306-11311.
- Padron E. Surveying the landscape of MDS/MPN research: overlap among the overlap syndromes? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:349-54.
- Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, et al. Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476.

- Pardanani A, Lasho TL, Laborde RR, Elliott M, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Maxson JE, Tyner JW, Tefferi A. CSF3RT618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(9):1870-1873.
- Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2017 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol* 2016;91(11):1146-1159.
- Park ST, Kim J. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J*. 2016;20(Suppl 2):S76-83.
- Patel AA, Steitz JA. Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(12):960-970.
- Patnaik MM, Tefferi A. Refractory anemia with ring sideroblasts and RARS with thrombocytosis. *Am J Hematol*. 2015;90(6):549–559.
- Patnaik MM, Tefferi A. Chronic Myelomonocytic Leukemia: Focus on Clinical Practice.
- Patnaik MM, Tefferi A. Refractory Anemia with Ring Sideroblasts (RARS) and RARS with Thrombocytosis (RARS-T) – “2017 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management”. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(2):259-72.
- Patnaik MM, Vallapureddy R, Lasho TL, Hoversten KP, Finke CM, Ketterling R, Hanson C, Gangat N, Tefferi A. EZH2 mutations in chronic myelomonocytic leukemia cluster with ASXL1 mutations and their co-occurrence is prognostically detrimental. *Blood Cancer J*. 2018;8(1):12.
- Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, Antolini L, Mologni L, Donadoni C, Papaemmanuil E, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(1):18-24.
- Przychodzen B, Jerez A, Guinta K, Sekeres MA, Padgett R, Maciejewski JP, Makishima H. Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood*. 2013;122(6):999-1006.
- Qiu J, Zhou B, Thol F, Zhou Y, Chen L, Shao C, DeBoever C, Hou J, Li H, Chaturvedi A, et al. Distinct splicing signatures affect converged pathways in myelodysplastic syndrome patients carrying mutations in different splicing regulators. *RNA*. 2016;22(10):1535-49.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J, Verstovsek S. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(2):127-40.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007;8(6):597-608.
- Reinig E, Yang F, Traer E, Arora R, Brown S, Rattray R, Braziel R, Fan G, Press R, Dunlap J. Targeted Next-Generation Sequencing in Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia Aids Diagnosis in Challenging Cases and Identifies Frequent Spliceosome Mutations in Transformed Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2016;145(4):497-506.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

- Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12):a008250.
- Rinke J, Müller JP, Blaess MF, Chase A, Meggendorfer M, Schäfer V, Winkelmann N, Haferlach C, Cross NCP, Hochhaus A et al. Molecular characterization of EZH2 mutant patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2017;31(9):1936-1943.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24–26.
- Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Salvanés R, Muro M, Martínez-Cambor P, Colado E, Sánchez MA, Díaz MG, Fernandez AF, Fraga MF et al. DNA Methylation Dynamics in Blood after Hematopoietic Cell Transplant. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56931. Published online 2013 Feb 22. doi: 10.1371/journal.pone.0056931
- Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, Edwards BK, List AF. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood.* 2008;112(1):45-52.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290-3.
- Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, Meyer MR, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Wilson RK, et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits WT DNMT3A by Blocking its Ability to Form Active Tetramers. *Cancer Cell.* 2014;25(4):442-454.
- Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol.* 2007;402:35-60.
- Saez B, Walter MJ, Graubert TA. Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood.* 2017;129(10):1260-1269.
- Sahtoe DD, van Dijk WJ, Ekkebus R, Ovaa H, Sixma TK. BAP1/ASXL1 recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun.* 2016;7:10292.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74(12):5463-5467.
- Sansom OJ, Maddison K, Clarke AR. Mechanisms of disease: methylbinding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4(5):305-315.
- Santini V, Melnick A, Maciejewski JP, Duprez E, Nervi C, Cocco L, Ford KG, Mufti G. Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88(2):231-245.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;340(17):1330-40.
- Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, Zoi K, Ernst T, Stegelmann F, Döhner K, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2012;119(5):1208-1213.

- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468.
- Scott AJ, Lieu CH and Messersmith WA. Therapeutic Approaches to RAS Mutation. *Cancer J*. 2016; 22(3): 165–174.
- Seita J, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640–653.
- Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017;550(7676):345-353.
- Shou LH, Cao D, Dong XH, Fang Q, Wu Y, Zhang Y, Fei JP, Xu BL. Prognostic significance of SETBP1 mutations in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and chronic neutrophilic leukemia: A meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(2): e0171608.
- Silver RT. Chronic myeloid leukemia. A perspective of the clinical and biologic issues of the chronic phase. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990;4(2):319-35.
- Skov V, Riley CH, Thomassen M, Larsen TS, Jensen MK, Bjerrum OW, Kruse TA, Hasselbalch HC. Whole blood transcriptional profiling reveals significant down-regulation of human leukocyte antigen class I and II genes in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(10):2269-73.
- Smith CW, Valcárcel J. Alternative pre-mRNAsplicing: The logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(8):381-388.
- Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28(3):485-96.
- Song J, Hussaini M, Zhang H, Shao H, Qin D, Zhang X, Ma Z, Hussain Naqvi SM, Zhang L, Moscinski LC. Comparison of the Mutational Profiles of Primary Myelofibrosis, Polycythemia Vera, and Essential Thrombocytosis. *Am J Clin Pathol*. 2017;15.
- Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017;129(15):2070-2082.
- Soucie E, Hanssens K, Mercher T, Georgin-Lavialle S, Damaj G, Livideanu C, Chandesris MO, Acin Y, Létard S, de Sepulveda P, Hermine O, Bernard OA, Dubreuil P. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-9.
- Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5-19.
- Sterky F, Lundeberg J. Sequence analysis of genes and genomes. *J Biotechnol*. 2000;76(1):1-31.
- Sun YG, Gracias NG, Drobish JK, Vasko MR, Gereau RW, Chen ZF. The c-kit signaling pathway is involved in the development of persistent pain. *Pain*. 2009;144(1-2):178-86.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. 2011;6(7):e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800. Epub 2011 Jul 18.

- Szuber N, Finke CM, Lasho TL, Elliott MA, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. CSF3R-mutated chronic neutrophilic leukemia: long-term outcome in 19 consecutive patients and risk model for survival. *Blood Cancer J.* 2018 Feb 15;8(2):21.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930-935.
- Talati C, Padron E. An Exercise in Extrapolation: Clinical Management of Atypical CML, MDS/MPN-Unclassifiable, and MDS/MPN-RS-T. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(6):425-433.
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2018 Oct 29. doi: 10.1093/nar/gky1015. [Epub ahead of print]
- Tremblay D, Sokol K, Bhalla S, Rampal R, Mascarenhas JO. Implications of Mutation Profiling in Myeloid Malignancies-PART 1: Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. *Oncology (Williston Park).* 2018;32(4):e38-e44.
- Tsai SC, Shih LY, Liang ST, Huang YJ, Kuo MC, Huang CF, Shih YS, Lin TH, Chiu MC, Liang DC. Biological Activities of RUNX1 Mutants Predict Secondary Acute Leukemia Transformation from Chronic Myelomonocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res.* 2015;21(15):3541-51.
- Tse MY, Ashbury JE, Zwingerman N, King WD, Taylor SA, Pang SC. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Res Notes.* 2011;4:565.
- Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn.* 2010;12(4):425-432.
- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22(1):14-22.
- Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Finke CM, Mullally A, Li CY, Pardanani A et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia.* 2009;23(5):900-4.
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia.* 2010;24(7):1302-9.
- Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, McClure RF, Pardanani A. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia.* 2012;26(3):475–480.

- Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014;28(7):1407-13.
- Tefferi A, Wassie EA, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A, Gangat N, Wolanskyj AP. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2014;28(12):2300-2303.
- Tefferi A, Elliott M, Pardanani A. Chronic neutrophilic leukemia: novel mutations and their impact on clinical practice. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(2):171-6.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Advances*. 2016;1(2):105-111.
- Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia*. 2018. doi: 10.1038/s41375-018-0078-0. [Epub ahead of print]
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):178-92

- van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34.
- Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
- Varghese LN, Defour JP, Pecquet C, Constantinescu SN. The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:59.
- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158.
- Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(23):4627-4634.
- Wang J, Vasaiyar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res*. 2017 3;45(W1):W130-W137.
- Wang JC, Sindhu H, Chen C, Kundra A, Kafeel MI, Wong C, Lichter S. Immune derangements in patients with myelofibrosis: the role of Treg, Th17, and sIL2R α . *PLoS One*. 2015 20;10(3):e0116723.
- Wang M, He N, Tian T, Liu L, Yu S, Ma D. Mutation Analysis of JAK2V617F, FLT3-ITD, NPM1, and DNMT3A in Chinese Patients with Myeloproliferative Neoplasms. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 485645.
- Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, Weinzierl E, Hatem J, Jaso J, Kanagal-Shamanna R et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(17):2645-51.
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, 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*. 2010;17(3):225-234.
- Ward AF, Braun BS, Shannon KM. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*. 2012;120(17):3397-406.
- White HE, Hall VJ, Cross NC. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clin Chem*. 2007;53(11):1960-2.

- Will CL, Lührmann R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):pii:a003707.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41.
- Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1903-1908.
- Wu S, Romfo CM, Nilsen TW, Green MR. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature.* 1999;402(6763):832-835.
- Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene.* 2010;29(25):3723-3731.
- Yang AS, Estéicio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa J-PJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):e38.
- Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, Li Z, Al-Ali H, Li L, Chen Z. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood.* 2018;131(3):328-341.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(17):E88-8
- Yohe S and Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(11):1544-1557.
- Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* 2011;478(7367):64-69.
- Yoshimi A, Abdel-Wahab O. Splicing factor mutations in MDS RARS and MDS/MPN-RS-T. *Int J Hematol.* 2017;105(6):720-731
- You JS, Jones PA. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell.* 2012;22(1):9-20.
- Zhang H, Maxson JE, Watanabe-Smith KM, Coblenz C and Tyner JW. Distinct Mechanisms of Receptor Activation Are Associated with CSF3R Gain-of-Function Mutations. *Blood* 2017 130:4985.
- Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem.* 2005;280(24):22788-22792.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
- Zoi K, Cross NC. Molecular pathogenesis of atypical CML, CMML and MDS/MPN-unclassifiable. *Int J Hematol.* 2015;101(3):229-242.
- Zoi K, Cross NCP. Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *Clin Oncol.* 2017;35:947-954.
- Zuo P, Maniatis T. The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev.* 1996;10(11):1356-1368.

Δημοσιεύσεις σε έγκριτα ελληνικά Επιστημονικά περιοδικά, Βιβλία και Κεφάλαια βιβλίων

- Papaioannou M, Mpampali S, Karamarias G. History and Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes, *Haema*. 2011;2(2):136-143
- Χατζημιχαήλ Ε, Δοντσιίδου Χ, Παπαθανασίου Κ. Διαταραχές Μεταγραφικών Παραγόντων, Σηματοδοτικών και Μεταβολικών Οδών στα ΜΔΣ, Θεραπευτική παρέμβαση. *Haema*. 2015;6(4):21-25

Δημοσιεύσεις σε διεθνή Βιβλία

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York (US): Garland Science. 2002;Ed:4.
- Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. In: Shaw AC (ed.) *Methods in Molecular Biology; Immunosenescence Methods and Protocols*. New York (US): Humana Press. 2015;Vol:1343;pp:249-264.
- Hu P, Hegde M, Lennon PA (eds). *Modern Clinical Molecular Techniques*. New York (US): Springer-Verlag. 2012;Ed:1.
- Kaushansky K, Lichtman M, Prchal J, Levi MM, Press O, Burns L, Caligiuri M (eds.). *Williams Hematology*. New York (US): McGraw-Hill Education. 2016;Ed:9
- Landsverk ML, Wong L-JC. Clinical Molecular Diagnostic Techniques: A Brief Review. In: Wong L-JC (ed). *Next Generation Sequencing; Translation to Clinical Diagnostics*. New York (US): Springer. 2013;Ed:1;pp:23
- Men AE, Wilson P, Siemering K, Forrest S. Sanger DNA Sequencing. In: Janitz M (ed). *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. Weinheim (DE): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2008;Ch:1;pp:1-11
- Sambrook J, Russell D (eds). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001;Ed:3.
- Vardiman JW, Brunning RD, Harris NL. WHO histological classification of Chronic Myeloproliferative Diseases. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). *World Health Organization Classification of Tumors: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer (IARC). 2001;pp:17-44.
- Verma M (ed). *Cancer Epigenetics; Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*. In: *Methods in Molecular Biology*. New York (US): Humana Press. 2015;Vol:1238.
- Wartman LD, Mardis ER. Genomics. In: Kaushansky K, Lichtman M, Prchal J, Levi MM, Press O, Burns L, Caligiuri M (eds.). *Williams Hematology*. New York (US): McGraw-Hill Education. 2016;Ed:9;pp:155-164

Δημοσιεύσεις σε Ιστοσελίδες

- Abcam. [Internet]. A Guide to Epigenetics. [Accessed 2018 Jul 09]. Available from <http://docs.abcam.com/pdf/chromatin/a-guide-to-epigenetics.pdf>
- Difference Between.com [Internet]. Difference Between Maxam Gilbert and Sanger Sequencing. [Accessed 2017 Jul 02]. Available from <http://www.differencebetween.com/difference-between-maxam-gilbert-and-vs-sanger-sequencing/>
- Encyclopedia Britannica Online [Internet]. Gel electrophoresis. [Accessed 2017 Jul 02]. Available from <https://www.britannica.com/science/gel-electrophoresis>
- Illumina. [internet]. Cancer Research Review; An Overview of Recent Cancer Research Publications Featuring Illumina Technology. [Accessed 2018 Jul 09]. Available from https://www.illumina.com/documents/products/research_reviews/cancer_research_review.pdf
- Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). [Accessed 2017 February 04]. Available from: www.genome.gov/sequencingcostsdata.
- Yirka B. Oxford Nanopore unveils portable genome sequencer - MinION. [Published 2017 Jul 02]. Available from: <https://phys.org/news/2014-02-oxford-nanopore-unveils-portable-genome.html>.

Τεχνικά φυλλάδια εταιρειών

- Bio-Rad Laboratories Inc. A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping. 2010. Tech note 6004 Rev A.
- Biotage AB. CpG Methylation Analysis by pyrosequencing - Benchmarks and Application. 2007. WP 010.
- New England Biolabs. Epigenetics; Understanding Histone & DNA Modifications. 2015. Ver:5.0; pp:17.
- Sigma-Aldrich. qPCR Technical Guide. 2008. 02503-504204/0038.

Doctoral Disertations and Master Theses

- González-Porta M. 2014. RNA sequencing for the study of splicing. Retrieved from Darwin College; University of Cambridge. Available at URL: https://www.repository.cam.ac.uk/bitstream/handle/1810/246596/my_thesis.pdf;sequence=1.
- Hunja CW. 2012. A feasibility study exploring the spatial distribution of Plasmodium falciparum. Retrieved from Biological Sciences thesis and dissertation collection. Available at URI: <http://hdl.handle.net/1842/9375>.

Summary

The chronic myeloproliferative neoplasms are made up of diverse disorders, some with proliferative features and others with dysplastic hematopoiesis. They arise from a pluripotent lymphoid-myeloid stem cell or in some cases a more committed myeloid progenitor. In an attempt to improve their classification, the World Health Organization (WHO) divided them into three distinct categories: myeloproliferative neoplasms (MPNs), myelodysplastic syndromes (MDS) and a category with overlapping characteristics of both MDS and MPNs, referred to as myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) or 'overlap MDS/MPN'.

Clonal hematopoiesis is a key feature of myeloproliferative neoplasms (MPN), a hematopoietic stem cell disorder comprising three disease entities: polycythemia vera (PV), essential thrombocytosis (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Although the clinical characteristics of these three diseases are quite distinct, they do share genetic mutations that drive clonal myeloproliferation, which is their common defining feature.

Chronic myeloid malignancies that share both myelodysplastic and myeloproliferative features define the myelodysplastic/myeloproliferative group, which includes chronic myelomonocytic leukemia (CMML), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), atypical chronic myeloid leukemia (aCML), MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis (MDS/MPN-RS-T), and myelodysplastic/myeloproliferative unclassified (uMDS/MPN). With the notable exception of refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis, there is much overlap among the various subtypes at the molecular and clinical levels, and a better definition of these entities, an understanding of their biology and an identification of subtype-specific molecular or cellular markers are needed.

Continual technological advances have led to the identification of increasing numbers of genetic defects in MPN and MDS/MPN patients. Thus, to address some of the above challenges, we designed and executed various diagnostic protocols, in order to study the molecular profile of MPNs and MDS/MPNs. To this purpose, we utilized both some of the most commonly used, well-established, molecular biology techniques, more specifically polymerase chain reaction (PCR), high resolution melt curve analysis (HRMA) and Sanger sequencing, and also most current next generation sequencing (NGS) protocols, like targeted sequencing (targeted NGS), which interprets multiple genomic loci of more than one patients simultaneously.

Later on, in an effort to better understand the biology behind complicated situations, such as PMF and MDS/MPNs, we sought to decipher the methylation and transcriptional profile of these two entities.

Results summarized further below:

- i. Using PCR, HRMA and Sanger sequencing we studied 266 patients presenting with MPNs. Specific genes were interpreted for mutations using the aforementioned techniques. These are subdivided into two categories, the ones considered as those bearing driver mutations, specifically *JAK2* (exons 12 και 14), *MPL* (exon 10) and *CALR* (exon 9), and the ones with modifier mutations, namely *ASXL1* (exon 12), *DNMT3A* (exon 23), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *SETBP1* (exon 4), *SF3B1* (exons 14 και 15), *SRSF2* (exon 1), *U2AF1* (exons 2 και 6), *CSF3R* (exon 14) και *KIT* (exon 17). In total, 241 patients (90.60%) harbored mutations. Of the 63 PV cases, 62 (98.41%) were tested positive for mutations, 85/98 (86.73%) in ET, 80/89 (89.89%) in MF, 6/6 (100.00%) in Chronic Neutrophilic Leukemia

- (CNL) and 8/10 (80.00%) in Systemic Mastocytosis (SM). In total 217 out of all MPN patients studied (81.58%), carried at least one driver mutation, whereas only 24 (9.02%) carried modifier mutations, while 44 (16.54%) carried both. However, MF presented the most complicated molecular profile since 42.70% of the respective cases harbored both types of molecular lesions (n=38/89). None of the genes studied were identified mutated in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) patients studied (n=0/29).
- ii. The same techniques and gene sets were tested for mutations within the 110 patients comprising the MDS/MPN cohort. In total, 91 (82.73%) bore at least one mutation. The subcohorts were found mutated as follows, 70.18% in CMML (n=40/57), 94.87% in aCML (n=37/39) and 100.00% in MDS/MPN-RS-T (n=14/14). In total, only 15 cases (13.64%) with driver mutations were identified, whereas 69.09% (n=76/110) of MDS/MPN cases presented with at least one modifier mutation. Finally, 11.82% (n=13/110) of MDS/MPN patients studied carried both types of mutations.
 - iii. We designed a custom targeted NGS panel, along with a custom bioinformatics pipeline, for the interpretation of multiple genomic loci across 26 different genes, of 25 patients. All of them have had their molecular profile checked before, with the utilization of PCR, HRMA and Sanger sequencing. 12 of them were previously found to be bearing at least one mutation, whereas 13 of them had no lesions, whatsoever, according to the aforementioned techniques. The first cohort represented the test group, in order to check the sensitivity and specificity of our NGS protocol. In all 13 patients, those mutations already known were identified during the interpretation of the results, while additional mutations were found in 5 of them. Mutations were spotted in 7 out of the 12 patients without previously undetermined molecular profile.
 - iv. LINEs (Long interspersed nucleotide elements) and SINEs (Short interspersed nucleotide elements), altogether comprise 40-50% of the human genome. Study of methylation of LINE-1 elements is commonly used for the estimation of global DNA methylation levels. The methylation profile of MF and MDS/MPN patients was analyzed for deviations from the respective levels of normal population. The relative methylation percentage of 15 cases of MDS/MPN and 15 cases of MF, compared to 6 people with normal phenotype and genotype was determined with the utilization of methylation specific HRMA (MS-HRMA). The results were further confirmed with methylation specific pyrosequencing (MSP). 8 patients with MDS/MPN, 28 with MF and 7 people of the general population were tested by using MSP. Data from both techniques coincide. MDS/MPN patients present statistically significant upregulated levels of methylation, whereas the methylation profile of MF patients and normal population is the same.
 - v. Finally, in order to better understand the biology of MF, we performed RNA-Seq in 6 patients presenting with MF and compared their transcription levels with 2 people with normal phenotype and genotype. The bioinformatics pipeline for the analysis of RNA-Seq data is custom and was designed during this study. Statistical analysis identified 2010 genes differentially expressed in MF. Of these 695 were down-regulated, whereas 1315 were up-regulated. The later, correspond to genes related to defence mechanisms against bacterial infections, implicating granulocytes as the main mechanism of action. The down-regulated genes, on the other hand, imply lymphocyte deactivation, still the mechanism implicated cannot be deciphered by this technique alone and needs to be further studied.