

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
Τομέας Βασικών Επιστημών

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 21 :**  
**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΕΙΩΤΙΚΟΥ**  
**ΧΑΡΤΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 21**

Δημήτρης Αβραμόπουλος  
Ιατρός

Διδακτορική Διατριβή

1995

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	Σελίδα 2
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	Σελίδα 3
<b>ABSTRACT</b>	Σελίδα 4
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 5
<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ : ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 21</b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 6
<b><u>Α' :ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ 3' ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΑΥΤΩΝ ΣΤΟ ΜΕΙΩΤΙΚΟ ΧΑΡΤΗ.</u></b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 11
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	Σελίδα 15
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	Σελίδα 21
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	Σελίδα 27
<b><u>Β' :ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΣΤΟ ΧΑΡΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΒΡΑΧΕΩΝ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.</u></b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 29
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	Σελίδα 30
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	Σελίδα 33
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	Σελίδα 37
<b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 21</b>	
<b><u>Α' :ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΕΩΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΑΡΙΘΜΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΤΡΙΣΩΜΙΑ 21 (ΣΥΝΔΡΟΜΟ DOWN).</u></b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 39
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	Σελίδα 40
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	Σελίδα 42
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	Σελίδα 50
<b><u>Β' :ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 21.</u></b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	Σελίδα 52
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	Σελίδα 53
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	Σελίδα 54
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	Σελίδα 57
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	Σελίδα 60
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	Σελίδα 68
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b>	
Σελίδα 68	
<b>ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</b>	Σελίδα 79

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Περιγράφουμε εδώ τη μελέτη του χρωμοσώματος 21 χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής γενετικής. Η μελέτη επικεντρώνεται σε δύο βασικούς τομείς, στην κατασκευή μειωτικού χάρτη του χρωμοσώματος και στην μελέτη της τρισωμίας 21.

Οι μειωτικοί χάρτες είναι ένα πολύ σημαντικό βοήθημα στην μελέτη του γενετικού υλικού, κυρίως γιατί επιτρέπουν τον εντοπισμό γονιδίων υπεύθυνων για γενετικά νοσήματα ή προδιαθέσεις. Για την κατασκευή τους χρησιμοποιούνται πολυμορφισμοί οι οποίοι παλαιότερα αφορούσαν κυρίως φαινοτύπους και πρωτεΐνες ενώ σήμερα αφορούν κυρίως την αλληλουχία του DNA.

Αναζητήσαμε πολυμορφισμούς στην αλληλουχία του DNA συνδεδεμένους με γονίδια του χρωμοσώματος 21 με τη μέθοδο SSCP. Ανιχνεύθηκαν πολυμορφισμοί σε 7 από τα 17 γονίδια που μελετήθηκαν και έγινε η χαρτογράφησή τους στο μειωτικό χάρτη του χρωμοσώματος μετά από γονοτύπηση μεγάλων οικογενειών (CEPH). Ακόμα κάναμε την γονοτύπηση και χαρτογράφηση για δύο πολυμορφισμούς βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών (δινουκλεοτιδίων) (SSR) με στόχο την κατασκευή ενός αναλυτικού μειωτικού χάρτη του χρωμοσώματος. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, τόσο των πολυμορφισμών σε γονίδια όσο και των βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών και σε συνδυασμό με αποτελέσματα άλλων ερευνητών, δημιουργήθηκε ένας μειωτικός χάρτης του χρωμοσώματος 21 που περιλαμβάνει 43 πολυμορφικούς δείκτες οι οποίοι αναλύονται με την αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης.

Το δεύτερο σκέλος των εργασιών αφορούσε την τρισωμία 21. Με τη χρήση πολυμορφισμών SSR μπορέσαμε να βρούμε την προέλευση του υπεράριθμου χρωμοσώματος σε οικογένειες με τρισωμικούς απογόνους. Η μελέτη αυτή αφενός προσέθεσε πληροφορίες στα υπάρχοντα δεδομένα για την παραγωγή τρισωμίας 21 από μειωτικά λάθη στους γονείς, αφετέρου, εξαιτίας της χρήσης πολλών πολυμορφικών δεικτών κατά μήκος του χρωμοσώματος, ανιχνεύθηκε και ένας νέος μηχανισμός παραγωγής τρισωμίας λόγω λάθους σε μιτωτική διαίρεση που είναι υπεύθυνος για ένα ποσοστό 4.6% των τρισωμιών 21. Η μελέτη της τρισωμίας 21 με SSR επεκτάθηκε ακόμη σε περιπτώσεις μωσαϊκισμού για τρισωμία. Και σε αυτές τις περιπτώσεις μπορέσαμε να προσδιορίσουμε την προέλευση της τρισωμίας καθώς και τον μηχανισμό παραγωγής του μωσαϊκού. Σε ένα ποσοστό 59% η τρισωμία ξεκίνησε από μειωτικό λάθος στους γονείς με απώλεια ενός χρωμοσώματος στη συνέχεια στο έμβρυο ενώ στο υπόλοιπο 41% η τρισωμική σειρά ξεκίνησε από μιτωτικό λάθος στο έμβρυο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες προβλέψεις, ενώ δεν βρήκαμε στη βιβλιογραφία προηγούμενη ανάλογη μελέτη.

## ABSTRACT

The present work is a study of chromosome 21 at the molecular level. We are focusing in two fields, the construction of a high resolution linkage map using markers that can be typed with the polymerase chain reaction (PCR) and the study of the origins and mechanisms of full and mosaic trisomy 21 using polymorphic markers.

Linkage maps are a very useful tool for the study of the genome, especially for the localization of genes that cause genetic diseases or predispositions. They are constructed using polymorphisms, that today are mostly at the DNA level. We searched for polymorphisms in genes that are located on human chromosome 21. We identified 7 polymorphisms in 17 genes studied and put those on the linkage map of the chromosome after genotyping the families of the Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH). We also genotyped and put on the linkage map two highly polymorphic short sequence repeats (SSRs). Our data combined with data from other researchers were used for the construction of a linkage map of chromosome 21 that includes 43 markers typeable by PCR.

We also used the above and other polymorphic markers in order to find the origin of the supernumerary chromosome in individuals with trisomy 21. This study provided additional data on the origin of non disjunction in parental meiotic errors, and also showed the existence of mitotic errors leading to trisomy 21 in 4.6% of cases. This was done by showing reduction to homozygosity for all markers studied, which were densely located along the entire long arm of chromosome 21. Polymorphic markers were also used for determining the origins of mosaicism for trisomy 21. In our sample of 18 families we found that in 59% of cases there was meiotic non-disjunction in the parents followed by mitotic chromosome loss in the embryo while in the remaining 41% the mosaicism was due to formation of a trisomic cell line due to mitotic nondisjunction in the originally euploid embryo. Our results are in accordance with speculations expressed in the past based on maternal age differences, while we found no similar study in the literature.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το χρωμόσωμα 21 αποτελεί το 1.6% του ανθρώπινου γονιδιακού υλικού και υπολογίζεται ότι περιέχει περίπου 50 εκατομμύρια νουκλεοτίδια<sup>1</sup>. Είναι το μικρότερο ανθρώπινο χρωμόσωμα αλλά και από τα πιο συστηματικά μελετώμενα εξ' αιτίας κυρίως του συνδρόμου DOWN (τρισωμία 21), που είναι η πιο συχνή βιώσιμη τρισωμία και η πιο συχνή χρωμοσωμιακή ανωμαλία με πνευματική καθυστέρηση. Ακόμα, στο χρωμόσωμα 21 εντοπίζονται σημαντικά γονίδια όπως το APP (Amyloid Precursor Protein) που πιθανώς σχετίζεται με την προγεροντική άνοια (Alzheimers Disease)<sup>2,3,4,5,6</sup> το CBS (Cystathionine Beta Synthase) που όταν μεταλλάσσεται οδηγεί σε ομοκυστινουρία<sup>7</sup>, καθώς και τα υπεύθυνα γονίδια για την προοδευτική μυοκλωνική επιληψία (Progressive Myoclonic Epilepsy PME)<sup>8</sup> και την μυατροφική πλάγια σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis ALS)<sup>9</sup>.

Για την μελέτη του χρωμοσώματος ασχοληθήκαμε κυρίως με τη μελέτη και ανίχνευση πολυμορφισμών στο DNA. Η σύγχρονη μοριακή γενετική διαθέτει εργαλεία και γνώσεις που επιτρέπουν τη γρήγορη ανίχνευση πολυμορφισμών, καθώς και την ανεύρεση πολυμορφισμών με πολλά αλληλία και υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας. Η ανάλυση τέτοιων πολυμορφισμών οδηγεί στην κατασκευή μειωτικών χαρτών με πυκνά τοποθετημένους δείκτες και μεγάλους βαθμούς στατιστικής βεβαιότητας. Αυτοί είναι πολύ χρήσιμοι για τον εντοπισμό περιοχών που συνδέονται με φαινοτύπους, καθώς και για την χαρτογράφηση άλλων λιγότερο πολυμορφικών δεικτών. Η σημασία τους γίνεται ακόμα πιο φανερή όταν προσπαθούμε να εντοπίσουμε πολυγονιδιακές παθήσεις είτε παθήσεις με άγνωστη διεισδυτικότητα, όπως για παράδειγμα η σχιζοφρένεια που βρίσκεται σήμερα υπό μελέτη<sup>10,11</sup>. Η ύπαρξη αυτών των πολυμορφισμών έκανε ακόμα δυνατή την ανίχνευση της προελεύσεως του υπεράριθμου χρωμοσώματος στην τρισωμία 21 όπως θα περιγραφεί εδώ.

Στην παρούσα εργασία θα περιγραφεί η αναζήτηση πολυμορφισμών στην 3' αμετάφραστη περιοχή γονιδίων του χρωμοσώματος 21 και η τοποθέτηση αυτών στον μειωτικό χάρτη<sup>12</sup>, η ανάλυση πολυμορφισμών βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών (SSRs, Short Sequence Repeats) με σκοπό τη δημιουργία βελτιωμένου μειωτικού χάρτη<sup>13</sup> του χρωμοσώματος και η χρήση των SSRs για την ανίχνευση της προέλευσης του υπεράριθμου χρωμοσώματος στο σύνδρομο DOWN<sup>14</sup> και την ανεύρεση του μηχανισμού δημιουργίας μωσαϊκού τρισωμίας 21<sup>15</sup>.

Το εργαστηριακό μέρος της παρούσης διδακτορικής διατριβής έγινε στο εργαστήριο του καθηγητή κ. Στυλιανού Αντωνιάκη, στο Johns Hopkins University, Βαλτιμόρη, Η.Π.Α.

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ : ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 21

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Τι είναι οι μειωτικοί χάρτες και ποια η σημασία τους;

Όταν ο Mendel έκανε τις παρατηρήσεις του σχετικά με την ανεξάρτητη μεταβίβαση των χαρακτηριστικών από τη μία γενεά στην επόμενη, μελετούσε περιορισμένο αριθμό χαρακτήρων. Οι μελέτες του Morgan στη δροσόφιλα έδειξαν ότι ορισμένοι χαρακτήρες συγκληρονομούνται, δεν εμφανίζουν δηλαδή την κατανομή που θα προέβλεπε μία ανεξάρτητη μεταβίβαση τους στην πρώτη θυγατρική γενεά. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε σύνδεση και συμφωνούσε με τη νέα τότε θεωρία των χρωμοσωμάτων σαν φορείς του κληρονομικού υλικού. Η σύνδεση αποδόθηκε στην συγκατοίκηση των αντιστοιχών γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα, και οι περιπτώσεις όπου συνδεδεμένοι χαρακτήρες δεν συγκληρονομούνται αποδόθηκαν στα χιάσματα των χρωμοσωμάτων στην πρώτη μειωτική διαίρεση.

Με αφετηρία τις παραπάνω ανακαλύψεις άρχισε η μελέτη της μειωτικής συνδέσεως με σκοπό την ανίχνευση υπέρξεως συνδέσεως μεταξύ φαινοτύπων και τον προσδιορισμό του αριθμού χιασμάτων ανά μείωση που ορίζει την απόσταση στους μειωτικούς χάρτες. Μια θεωρητική μονάδα μέτρησης εισήχθη: 1 Morgan = 100 χιάσματα ανά 100 μειώσεις<sup>16</sup>, και αργότερα από τη μελέτη πολυμορφισμών του φαινοτύπου η μοριακή γενετική προχώρησε και στη μελέτη πολυμορφισμών γονότυπου που σήμερα μεταφράζεται σε πολυμορφισμό στην αλληλουχία του DNA. Οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές διευκόλυναν την ανάλυση της σύνδεσης για μεγάλους αριθμούς μειώσεων άρα και καλύτερη στατιστική βεβαιότητα και την ανάλυση πολλών δεικτών ταυτόχρονα για τον προσδιορισμό της πιο πιθανής σχετικής τους θέσεως. Οι μειωτικοί χάρτες έγιναν όλο και πυκνότεροι με την συνεχή ανακάλυψη νέων πολυμορφικών θέσεων.

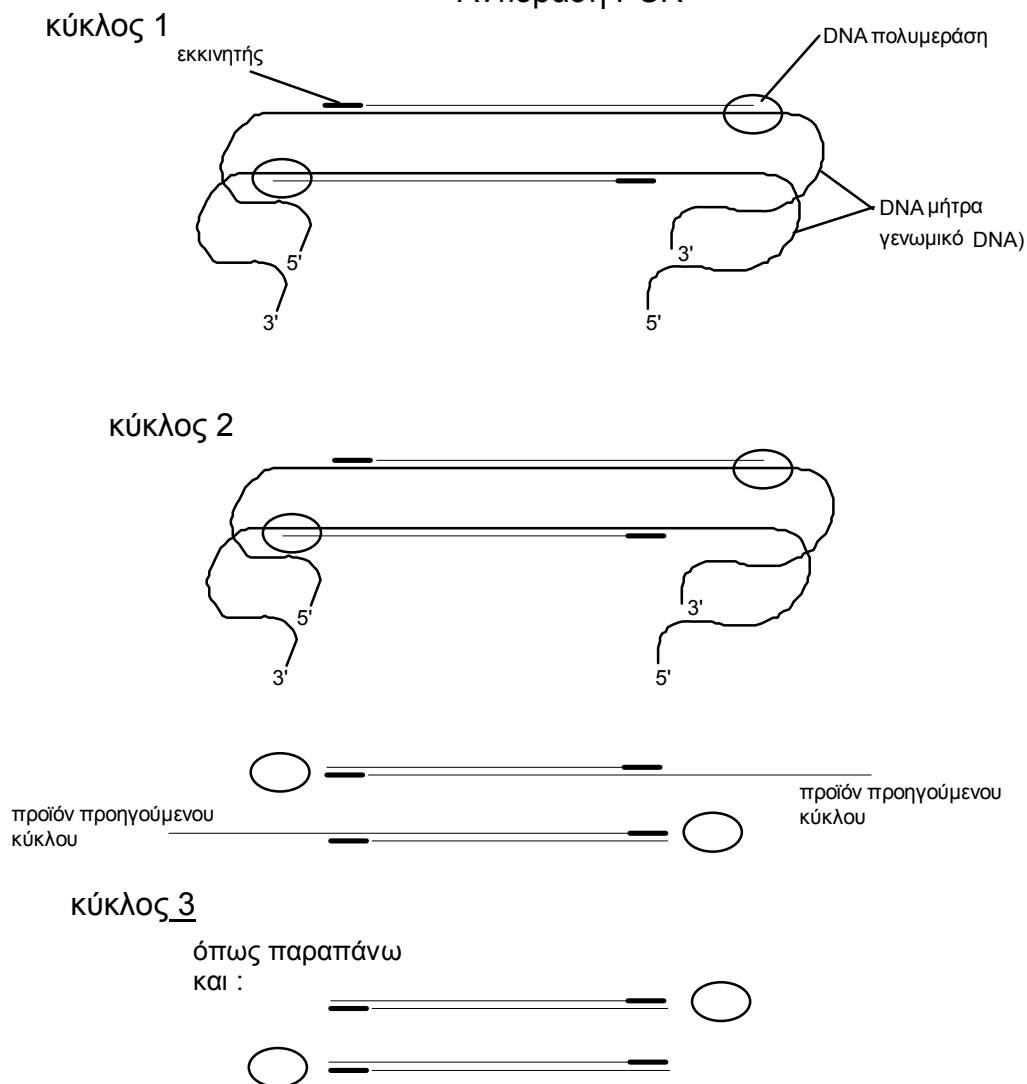
Οι μειωτικοί χάρτες των χρωμοσωμάτων είναι συλλογές από πολυμορφικούς δείκτες οι οποίοι με βάση τη μειωτική τους σύνδεση τοποθετούνται σε ορισμένες αποστάσεις και σχετικές θέσεις πάνω στο χρωμόσωμα. Οι αποστάσεις μεταξύ τους μετρούνται σε cM ( 1cM = χιάσματα σε 1% των μειώσεων) που δεν αντιστοιχεί απόλυτα σε κάποια φυσική απόσταση, δίνει όμως μια καλή εκτίμηση. Οι αποστάσεις, καθώς και οι σχετικές θέσεις, δεν είναι απόλυτες και υπόκεινται στους νόμους των πιθανοτήτων, αλλά δεν τοποθετούμε ένα δείκτη στο χάρτη χωρίς τουλάχιστον ένα βαθμό βεβαιότητας 1000:1. Με βάση τους μειωτικούς χάρτες μπορεί κάθε φαινότυπος ή ασθένεια που έχει τη δυνατότητα να εκφραστεί σε αλληλία (π.χ. *πάσχων* και *μη πάσχων* ) να τοποθετηθεί με αρκετή ακρίβεια πάνω στο χρωμόσωμα, ώστε στη συνέχεια η αναζήτηση του υπευθύνου γονιδίου να γίνει σε μια πολύ στενότερη περιοχή, με καλές πιθανότητες επιτυχίας<sup>17,18</sup>. Ακόμα, η ανεύρεση της σχετικής θέσης των δεικτών και η χρήση τους ως μοναδικά σημεία που ορίζονται από την αλληλουχία τους, μπορεί να βοηθήσει στη δημιουργία διατεταγμένων συλλογών κλώνων που περιέχουν το σύνολο του χρωμοσώματος<sup>19,20</sup>. Οι πληροφορίες από τους μειωτικούς χάρτες μπορούν να χρησιμεύσουν σαν πυξίδα για την αναγνώριση της θέσης και κατεύθυνσης των κλώνων στο χρωμόσωμα, καθώς και για τον έλεγχο της ορθότητας των αποτελεσμάτων άλλων μεθόδων διατάξεως.

Σήμερα για τη δημιουργία μειωτικών χαρτών χρησιμοποιούμε τους

πολυμορφισμούς στην αλληλουχία του DNA, οι οποίοι μπορούν να διαιρεθούν στους ίδιους τύπους που κλασικά διαιρούνται οι μεταλλάξεις. Έτσι, έχουμε πολυμορφισμούς από μεταβολή μιας βάσεως στην αλληλουχία, και πολυμορφισμούς από την προσθήκη ή εξάλειψη μίας ή περισσοτέρων βάσεων. Από αυτές τις βασικές ομάδες προκύπτουν κατηγορίες που σχετίζονται με τον τρόπο ανίχνευσης του πολυμορφισμού. Μια κατηγορία είναι οι πολυμορφισμοί στο σημείο τομής των ενζύμων περιορισμού (restriction fragment length polymorphisms, RFLP)<sup>21</sup>. Σε αυτή την περίπτωση, κάποια διαφορά στην αλληλουχία του DNA οδηγεί σε τεμάχια με ανιχνεύσιμη διαφορά μήκους μετά από τεμαχισμό του DNA με κάποιο ένζυμο περιορισμού<sup>22</sup>. Κάθε τεμάχιο διαφορετικού μήκους εκτιμάται ως διαφορετικό αλληλίο και προσδιορίζει το γονότυπο. Αυτή η κατηγορία είναι από τις παλαιότερες υπό μελέτη και την χαρακτηρίζει αποκλειστικά ο τρόπος με τον οποίο ανιχνεύεται. Μια συγγενής κατηγορία είναι οι πολυμορφισμοί αριθμού παρακειμένων επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs). Ανιχνεύεται με τον ίδιο τρόπο με την προηγούμενη, αλλά η παρατηρούμενη διαφορά στο μήκος των τεμαχίων που προκύπτουν από τον τεμαχισμό του DNA οφείλεται στην ύπαρξη σε αυτά επαναλήψεων αλληλουχιών με ποικίλο αριθμό μονάδων. Μια ειδική κατηγορία αποτελούν οι πολυμορφισμοί βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών (SSRs : Short Sequence Repeats)<sup>23</sup>. Στο ανθρώπινο DNA καθώς και σε άλλους οργανισμούς, βρίσκουμε συχνά επαναλήψεις βάσεων του τύπου .....GTGTGTGTGTGT....., είτε .....TAAATAAATAAATAAA.... κ.λ.π. . Οι επαναλήψεις αυτές συχνά δεν έχουν σταθερό αριθμό μονάδων στα διάφορα άτομα, εμφανίζουν δηλαδή πολυμορφισμό μήκους. Το ξεχωριστό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι επαναλήψεις αυτές οφείλεται στα πολλά αλληλίο και τους υψηλούς βαθμούς ετεροζυγωτίας που συχνά παρουσιάζουν τα οποία, σε συνδυασμό με την ταχύτητα και ευκολία στη γονοτύπησή τους, τις καθιστούν άριστους δείκτες για την κατασκευή μειωτικών χαρτών. Οι παραπάνω πολυμορφισμοί μοιάζουν πολύ με τους πολυμορφισμούς VNTR με βασική διαφορά το μήκος της μονάδας αλληλουχίας που επαναλαμβάνεται. Οι πολυμορφισμοί SSR, λόγω του βραχύτερου ολικού μήκους τους, επιτρέπουν την ανίχνευση τους με αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (PCR)<sup>24</sup> , γεγονός που καθιστά τη γονοτύπησή τους πολύ ταχύτερη (βλέπε εικόνες 1 και 2).

## ΕΙΚΟΝΑ 1

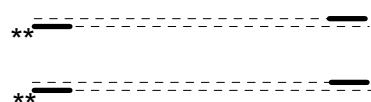
## Αντίδραση PCR



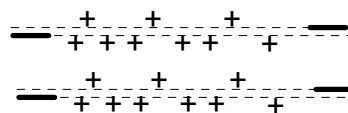
Αυτά τα τεμάχια που βρίσκονται μεταξύ των εκκινητών θα εξακολουθήσουν να αντιγράφονται και έτσι να διπλασιάζονται σε όλους τους υπόλοιπους κύκλους (σύνολο συνήθως 30)

## Σήμανση του προϊόντος

Προϊόν με σήμανση του εκκινητή αντίδρασης:



Προϊόν με σήμανση της



\*\* :  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  στο τελευταίο νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο του εκκινητή.

++ :  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  σε τυχαίες θέσεις κυτοσίνης στο προϊόν λόγω προσθήκης  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP στην αντίδραση.



### Εικόνα 1 :Αντίδραση PCR

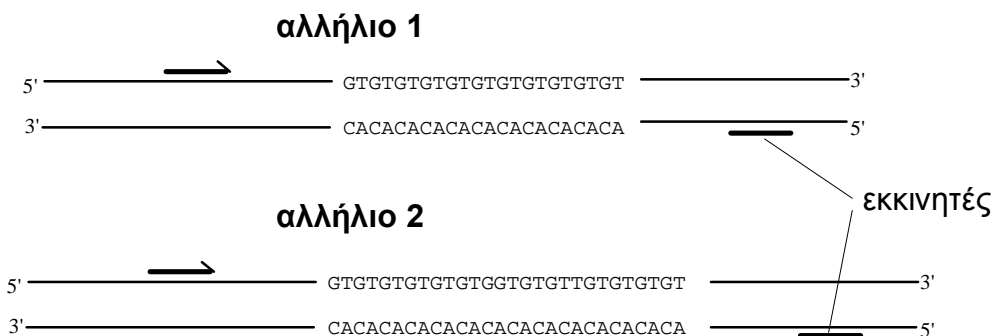
Κατά την αντίδραση PCR το διάλυμα περιέχει DNA, εκκινητές, πολυμεράση, νουκλεοτίδια και τα απαραίτητα ιόντα. Το πρώτο βήμα είναι η μετουσίωση του DNA στους 94°C. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται τόσο, ώστε οι εκκινητές να υβριδίσουν με το DNA. Στο επόμενο στάδιο στους 72°C η πολυμεράση αντιγράφει ξεκινώντας από τον εκκινητή, συνεχίζοντας προς το 3' άκρο του μορίου του DNA. Στον επόμενο κύκλο οι εκκινητές εκτός από το αρχικό DNA (μήτρα αντιγραφής), υβριδίζουν και στα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου, τα οποία έχουν ημιπεπερασμένο μήκος αρχίζοντας από τον εκκινητή, παράγοντας τεμάχια DNA μήκους όση είναι η απόσταση μεταξύ των εκκινητών. Τα τελευταία αυτά τεμάχια καθορισμένου μήκους αποτελούν μήτρα και για τους επόμενους κύκλους, διπλασιάζονται σε αριθμό σε κάθε κύκλο και αποτελούν το τελικό προεξάρχον προϊόν της αντίδρασης.

### Σήμανση του προϊόντος

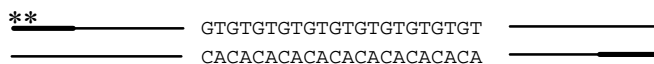
Παρουσιάζονται εδώ δύο τρόποι σήμανσης του προϊόντος με  $^{32}\text{P}$ . Στην πρώτη περίπτωση πριν την αντίδραση PCR ο ένας εκκινητής σημαίνεται με  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  dATP και έτσι σημαίνει το προϊόν καθώς αποτελεί μέρος αυτού. Στην δεύτερη περίπτωση ένα από τα προστιθέμενα νουκλεοτίδια (dCTP) φέρει  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  και καθώς αυτό ενσωματώνεται στο προϊόν του PCR οδηγεί στη σήμανσή του.

## Εικόνα 2 : Πολυμορφισμοί βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών.

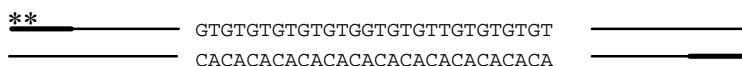
Τα δύο αντίγραφα στο γενωμικό DNA ενός ετεροζυγώτη και η θέση των εκκινητών.



Το προϊόν της αντίδρασης PCR



**και**



(\*\* : εκκινητής σεσημασμένος με  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  dATP)

Ηλεκτροφόρηση μέσω πολυακρυλαμίδης αποκαλύπτει τη διαφορά στο μήκος του προϊόντος λόγω της διαφοράς στην κινητικότητα

Βλέπουμε εδώ τι είναι και πώς ανιχνεύονται οι πολυμορφισμοί SSR. Τα δύο χρωμοσώματα φέρουν σε κάποιες θέσεις επαναλήψεις της αλληλουχίας GT σε διαφορετικούς αριθμούς όπως φαίνεται στην εικόνα. Η ενίσχυση της περιοχής με PCR με παρακείμενους στην επανάληψη εκκινητές δίνει δύο προϊόντα διαφορετικού μήκους που αντιπροσωπεύουν τα δύο αλληλία του πολυμορφισμού. Όταν τα δύο αυτά προϊόντα ηλεκτροφορηθούν μέσω πολυακρυλαμίδης κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και καταλήγουν σε διαφορετικές θέσεις. Έτσι φαίνονται στο φιλμ της αυτοραδιογραφίας σαν ξεχωριστές ζώνες αμαύρωσης (βλέπε και εικόνες 8, 14).

## A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ 3' ΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

### Σχετικές δημοσιεύσεις :

Avramopoulos, D., Cox, T., Forrest, G.L., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1992). Linkage mapping of the carbonyl reductase (CBR) gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. **Genomics** **13:447-448**.

Avramopoulos, D., Cox, T., Blaschak, J., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1992). Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. **Genomics** **14:506-507**.

Avramopoulos, D., Cox, T., Kraus, J.P., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1993). Linkage mapping of the cystathionine beta synthase (CBS) gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. **Hum.Genet.** **90:566-568**.

Avramopoulos, D., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1993). DNA polymorphisms in the 3' untranslated region of genes on human chromosome 21. **Genomics** **15:98-102**.

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ :**

Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η ανεύρεση πολυμορφισμών συνδεδεμένων με γονίδια, με σκοπό την τοποθέτηση των γονιδίων στο μειωτικό χάρτη του χρωμοσώματος. Για την επίτευξη αυτού δοκιμάσαμε την ανίχνευση πολυμορφισμών αναδίπλωσης μονής έλικας DNA (SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism). Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε πρώτα από τους Orita et al. το 1989<sup>25,26</sup>. Μια μονόκλωνη αλυσίδα DNA, όταν δεν βρίσκεται σε συνθήκες μετουσίωσης και δεν βρίσκει την συμπληρωματική της, αναδιπλώνεται σχηματίζοντας φουρκέτες και παίρνει τρισδιάστατες μορφές άμεσα εξαρτώμενες από την αλληλουχία των βάσεων. Αλλαγή ακόμα και σε μία βάση επηρεάζει την αναδίπλωση οδηγώντας σε διαφορετικές τρισδιάστατες μορφές. Αυτή η διαφορά μπορεί να ανιχνευτεί λόγω της διαφορετικής κινητικότητας μέσα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (βλέπε εικόνα 3). Για τον πολλαπλασιασμό του τεμαχίου του DNA που θα αναλυθεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι κλωνοποίησης ή η αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction : PCR)<sup>24</sup> (βλέπε εικόνα 1). Ποικίλες συχνότητες αναγνωρίσεως μεταλλάξεων έχουν αναφερθεί σχετικά με την ευαισθησία της μεθόδου, από 60 μέχρι 80%<sup>27,28,29</sup>. Πολύ σημαντικό πλεονέκτημα είναι η ταχύτητα και ευκολία της μεθόδου, κυρίως όταν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με PCR.

Η πιο συνηθισμένη μορφή στην οποία είναι διαθέσιμα τα γονίδια είναι της αλληλουχίας cDNA. Το cDNA προέρχεται κυρίως από mRNA, δηλαδή προηγείται απομάκρυνση των ιντρονίων και έτσι συνήθως η αλληλουχία και θέση αυτών δεν είναι γνωστή. Αυτό δυσκολεύει τη χρήση του PCR γιατί υπάρχει πάντα η πιθανότητα να περιλαμβάνεται ιντρόνιο ανάμεσα στα ολιγονουκλεοτίδια που επιλέγονται για εκκινητές, γεγονός που θα μπορούσε να αναστείλει την πρόοδο της αντίδρασης. Ακόμα τα ιντρόνια, που θα ήταν μία καλή πηγή πολυμορφισμών, δεν μπορούν να διερευνηθούν. Η περιοχή του γονιδίου που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη δεν έχει μεγάλη πιθανότητα να περιέχει πολυμορφισμούς γιατί η λειτουργία της απαιτεί υψηλό βαθμό διατήρησης της αλληλουχίας. Για τους παραπάνω λόγους διαλέξαμε να ψάξουμε για πολυμορφισμούς στην 3' αμετάφραστη περιοχή των γονιδίων. Η περιοχή αυτή συνήθως δεν περιέχει ιντρόνια. Ακόμα, παρόλο που μεταγράφεται και περιέχεται στο cDNA δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και έτσι

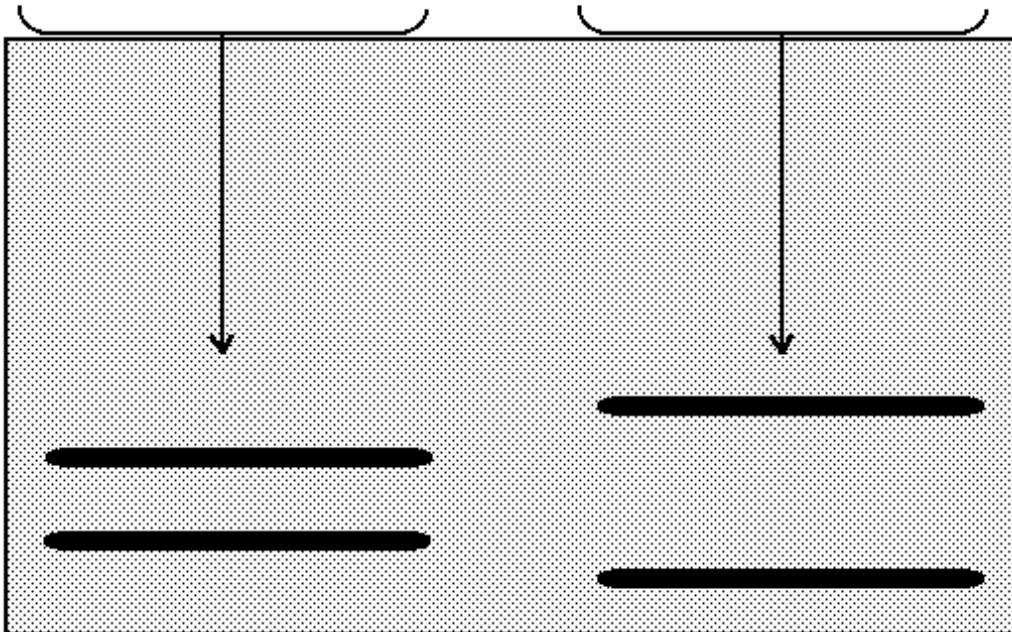
ανέχεται περισσότερες μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς. Διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην 3' αμετάφραστη περιοχή<sup>30,31,32,33,34,35,36,37,38,39</sup> ωστόσο δεν απαιτούν το βαθμό συντήρησης που απαιτείται στις μεταφραζόμενες περιοχές. Επιπρόσθετα, επειδή συχνά οι βιβλιοθήκες cDNA παρασκευάζονται με χρήση πολυαδενίνης σαν εκκινήτη (primer) για την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA, η 3' αμετάφραστη περιοχή συνήθως περιλαμβάνεται ακόμα και σε ατελείς κλώνους cDNA<sup>40</sup>. Μια σχηματική περιγραφή της περιοχής που επιλέχθηκε για ανάλυση φαίνεται στην εικόνα 4.

**ΕΙΚΟΝΑ 3****Ανίχνευση Πολυμορφισμών αναδίπλωσης μονής αλυσίδας DNA (SSCP)**

πολλαπλασιασμός του τεμαχίου DNA με PCR  
μετουσίωση του DNA με θέρμανση



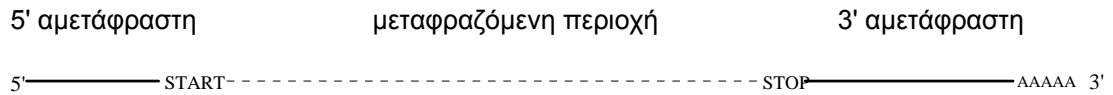
ταχεία ψύξη ευνοεί την αναδίπλωση των μονών αλυσίδων



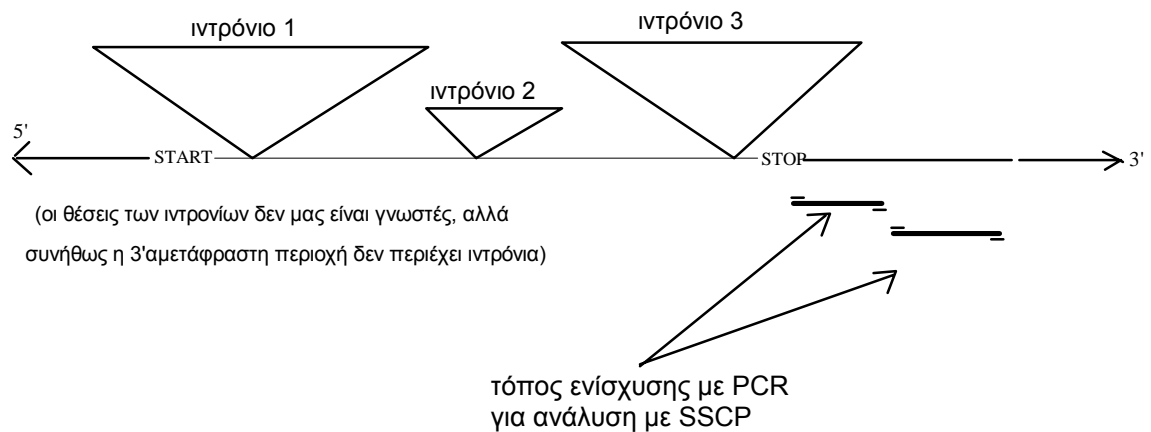
Ηλεκτροφόρηση μέσω πολυακρυλαμίδης αποκαλύπτει την διαφορά στην αναδίπλωση και συνεπώς τη διαφορά στην αλληλουχία λόγω της διαφορετικής κινητικότητας.

## ΕΙΚΟΝΑ 4 Η περιοχή των γονιδίων που αναλύθηκε

### Αναπαράσταση ενός μορίου cDNA



### Το ίδιο γονίδιο στο γενωμικό DNA



Το cDNA (όπως το mRNA από το οποίο προέρχεται με αντίστροφη μεταγραφή) περιέχει την μεταφραζόμενη σε πρωτεΐνη περιοχή καθώς και περιοχές που δεν μεταφράζονται στο 5' και 3' άκρο τελειώνοντας σε μία σειρά από αδενίνες. Στο DNA η μεταφραζόμενη περιοχή διακόπτεται από ιντρόνια τα οποία αφαιρούνται μετά την μεταγραφή. Η 3' αμετάφραστη περιοχή κατά κανόνα δεν περιέχει ιντρόνια. Σε αυτή την περιοχή επιλέξαμε να κάνουμε την αναζήτηση των πολυμορφισμών.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (PCR).

Αναζητήσαμε και βρήκαμε πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA στην 3' αμετάφραστη περιοχή των γονιδίων του χρωμοσώματος 21 από την GenBank (Accession numbers: SOD1: X01784, X01662; ERG2: M17254; ETS2: J04102; PFKL: X15573; GART: M32082; APP: X06989, Y00297; IFNAR: J03171; S100B: M59486, J05600; CD18: M15395; BCE1: X00474; HMG14: M21339; AML1 D90525; MX1: M33882; CBR: J04056, X51818) είτε από τις δημοσιεύσεις στα περιοδικά<sup>41</sup> και από αδημοσίευτα δεδομένα (CBS: Kraus, J.P.). Στη συνέχεια διαλέξαμε εκκινητές για την ενίσχυση τμημάτων DNA μήκους μεταξύ 200 και 300 ζευγών βάσεων, τους οποίους συνέθεσαν για μας στο εργαστήριο Genetics Core Facility στο Johns Hopkins University με τον oligonucleotide synthesizer της ABI. Οι εκκινητές επιλέχθηκαν ώστε να έχουν περίπου 50%-50% γουανίνη+κυτοσίνη προς αδενίνη+θυμίνη και να σταματούν σε κυτοσίνη ή γουανίνη στο 3' άκρο τους. Το DNA μήτρα για την ενίσχυση ήταν από τις οικογένειες του κέντρου CEPH (Centre de Etude du Polymorphisme Humain)<sup>42</sup>. Το παραπάνω ίδρυμα διαθέτει σε ερευνητές DNA από έναν αριθμό οικογενειών που χαρακτηρίζονται από τα πολλά τους μέλη, ώστε να επιτρέπουν την μελέτη πολλών μειώσεων σε κάθε ανάλυση των γονότυπων. Οι οικογένειες αυτές είναι ποικίλων εθνικοτήτων και περιλαμβάνουν από 8 έως 21 μέλη μεταξύ των οποίων πάντοτε περιλαμβάνονται οι δύο γονείς και συχνά και οι γονείς αυτών και φυσικά η πρώτη θυγατρική γενεά. Πρόσθετο πλεονέκτημα των οικογενειών αυτών αποτελεί η ευρεία χρήση τους από ερευνητές που ασχολούνται με μειωτική σύνδεση που επιτρέπει άμεση συνεργασία μεταξύ εργαστηρίων.

Η ραδιοσήμανση των εκκινητών έγινε σε αντίδραση που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις:

- 50 mM Tris pH 9.00, 10 mM DTT, 10 mM MgCl, 50 mg/ml BSA
- Εκκινητή 4μM
- T<sub>4</sub> κινάση 100 μονάδες/ml
- γ-<sup>32</sup>P dATP 1,5 μCi/μl

Το μίγμα επωάστηκε στους 37°C για 1 ώρα<sup>43</sup>.

Κατά την αντίδραση αυτή η T<sub>4</sub> κινάση καταλύει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ρίζας από γ-<sup>32</sup>P dATP στο 5' άκρο του εκκινητή και έτσι αυτός καθίσταται ραδιενεργός, εκπέμπων β ακτινοβολία. Αυτή μπορεί να ανιχνευτεί με μετρητές ακτινοβολίας καθώς και με έκθεση ακτινολογικού φιλμ.

Το μίγμα της αντίδρασης PCR περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις:

- Tris HCl 10mM, MgCl 1.5 mM, KCl 50mM, gelatin 100mg/ml
- Δεοξυνουκλεοτίδια ( A,C,G,T ) 200 μM έκαστο.
- Εκκινητές 400 nM έκαστος.
- Εκκινητή σεσημασμένο με γ-<sup>32</sup>P (T<sub>4</sub> κινάση) 160 nM είτε 2 μCi/λ α-<sup>32</sup>P dCTP
- Taq DNA πολυμεράση (Thermus Aquaticus) 120 μονάδες ανά ml.
- DNA πρότυπο, 500 ng σε αντίδραση 25 μl

Η αντίδραση έγινε σε 30 κύκλους μετουσίωσης στους 94°C για 30 sec επανασυνδυασμού στους 55°C για 30 sec και αντιγραφής στους 72°C για 30 sec. Περιπτώσεις στις οποίες οι συνθήκες ήταν διαφορετικές σημειώνονται στον πίνακα 1.

Κατά την αλυσιδωτή αυτή αντίδραση, η DNA πολυμεράση, ξεκινώντας από κάποιο σημείο όπου το DNA είναι διπλή αλυσίδα (όπως συμβαίνει στο σημείο υβριδισμού του εκκινητή κατά το δεύτερο βήμα κάθε κύκλου της αντίδρασης) σχηματίζει την υπόλοιπη συμπληρωματική έλικα του DNA για όσο μήκος αυτό είναι μονόκλωνο κατά την κατεύθυνση 5'-3' (αυτό συμβαίνει βέλτιστα στους 72°C για την πολυμεράση του *Thermus Aquaticus*, στο τρίτο βήμα κάθε κύκλου). Έτσι σχηματίζονται μονόκλιωνα μόρια τα οποία ξεκινούν από τον ένα εκκινητή και επεκτείνονται. Αυτά, όταν στο επόμενο βήμα συνδεθούν με τον δεύτερο εκκινητή, η αντιγραφή τους θα προχωρήσει μέχρι εκεί που συνδέθηκε ο πρώτος (άκρο του μορίου) σχηματίζοντας μόρια DNA μήκους όση η απόσταση μεταξύ των εκκινητών στο DNA πρότυπο. Αυτά θα συνεχίσουν να αντιγράφονται σε κάθε κύκλο και έτσι ο αριθμός τους σχεδόν διπλασιάζεται ανά κύκλο και το προϊόν της αντίδρασης είναι πολλά μόρια DNA με ίδιο μήκος, αντίγραφα της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ των εκκινητών. Για μια σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης PCR και του τρόπου σημάνσεως του προϊόντος βλέπε εικόνα 1.

#### Ανίχνευση πολυμορφισμών αναδιπλώσεως μονής αλυσίδας (SSCP).

Τα προϊόντα του PCR από 20 γονείς των οικογενειών CEPH αραιώθηκαν 2.75 φορές σε 0.1% SDS, 18 mM EDTA, 43% Formamide (τελικές συγκεντρώσεις, χωρίς συνυπολογισμό των ηλεκτρολυτών που περιέχονται στο προϊόν PCR). Στη συνέχεια, τα δίκλιωνα προϊόντα της αντίδρασης μετουσιώθηκαν με θέρμανση στους 95°C για 2 λεπτά και εψύχθησαν γρήγορα σε πάγο για το σχηματισμό μονών αναδιπλωμένων αλυσίδων. Ακολούθως ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% με 5 είτε 10% γλυκερόλη. Η ηλεκτροφόρηση έγινε μέσα σε 1X TBE (EDTA 1.86%) υπό 10 - 20 Watts αναλόγως του μεγέθους του προϊόντος, για 17 ώρες (πρωτόκολλο 1). Σε άλλες περιπτώσεις (βλέπε πίνακα 1) η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 0.5X TBE (EDTA 1.86%) υπό 5 - 10 Watts για 17 ώρες (πρωτόκολλο 2). Ακολούθως, το πήκτωμα αποξηράνθηκε και υπεβλήθη σε αυτοραδιογραφία. Σε μερικές περιπτώσεις δοκιμάσαμε τον πολλαπλασιασμό με PCR μεγαλύτερων τμημάτων DNA έως 1Kβ. Τότε πριν την ανάλυση SSCP εφαρμόσαμε ένζυμο περιορισμού για τον τεμαχισμό του προϊόντος σε τεμάχια 200 -300 βάσεις. Η αντίδραση έγινε με προσθήκη 1 μονάδας ενζύμου για κάθε μl προϊόντος χωρίς προσθήκη ηλεκτρολυτών. Η υπόλοιπη διαδικασία έγινε όπως παραπάνω. Για επεξήγηση του τρόπου με τον οποίο η παραπάνω διαδικασία ανιχνεύει πολυμορφισμούς βλέπε εικόνα 5.





## ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Γονίδιο	εκκινητές	(5' προς 3')	προϊόν PCR (bp)	Σήμανση@	SSCP # πρωτόκολλο	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (θέση)	Ένζυμο Περιορισμού							
CBR	GAGAA	GAGAG	TTGAA	CAGTGC	CTCCT	GCATC	AGAGG	AAATC	235		5	1	+	TGT/TAT (1060)	Rsa I
SOD1	TCCTT	TGGAT	GTAGT	CTGAG	CAGGG	TTTTC	ATTCA	CAGGC	300	5	a	1,2			
''	GCCTG	TGAAT	AAAAA	CCCTG	GGACA	GCCTA	TTTGT	CTAAG	240	5	a	1,2			
ERG2	AAAGG	GAGT	AGTAG	AATTC	AACTC	GTAGT	GTATA	AATGC	327	5	a	1,2			
''	GGAGG	CTTTC	CCCAT	CAGCG	CCTTA	AGACT	TCATG	CTTC	270	5	a	1,2			
''	GAAGC	ATGAA	GTCTT	AAGG	GACAG	CTGTC	CATCA	AACGG	315	5	a	1,2			
''	AGCTT	TCCTA	AACATG	TGAAG	CCATT	ACGCT	GTGTC	CTTTC	305	5	a	1,2			
''	CATTT	ATACA	CTACG	AGTTG	GTGCC	AAACA	TCCTA	TTTCC	326	5	a	1,2			
ETS2	GCACA	GCTAA	TTCTA	CTCAC	TGTTA	AGGGA	TTCTG	AGAAC	309		5	1	+	CG/CA ( 1948)	Msp I
S100B	GCCTG	CATCA	TTCTT	TCTGC	GCATT	TAAAG	AACAG	CAGTG	255	5	a	1			
''	GGCCT	GCCTT	CAATA	AAAAG	CGCCT	GGATC	GCTGT	TGCTG	280	5	a	1			
''	GGCCT	GCCTT	CAATA	AAAAG	CGCCT	GGATC	GCTGT	TGCTG	304		5	1	+(3'FS)	GTC/GCC (938)	Hae III
HMG14	GGAGA	GAAAG	AAGCC	AAGTC	TCACC	ATGTT	GGCCA	GGCTC	889	**					
									286	a		2			
									324	a		2	+		
									279	a		2	+		
PFKL	GCCTC	TGAGG	CCAGC	CATGC	CCTGG	CGCAG	AAGGT	GGATG	261		5	1			
GART	CTGCA	GCCTT	TCAGC	TGGTG	AAAAA	TAGAT	GAAGT	AAGGG	223	5	3	1			
APP	CAGAT	GCAGA	ACTAG	ACCCG	GGAGA	GAATC	TATTC	ATGCA	308	5	a	1,2			
''	TGCAAT	GAATA	GATTC	TCTCC	GCAGA	AGCAG	CAATC	TGTAC	280	5	a	1,2			
MX1	GTATA	CCACA	CTCTG	TCCAG	GATTC	TGAGG	GCTGA	AAATC	271	5	a	1,2			
''	GGATG	CTGTC	TTCGT	ACTGG	GGCTA	GAAAT	GAGTT	TATTAC	210	5	a	1,2			
CD18	GAGCA	CTTGG	TGAAG	ACAAG	GGATG	TCATT	TTATA	CCCTG	338		5	1	+	CG/CA (2511)	Aci I
IFNAR	GACCA	GAAAT	GAATC	GTGTC	CTCGA	TCTCT	TGACC	TCATG	268	5	a	1,2			
''	CATGA	GGTCA	AGAGA	TCCAG	GAATG	TAGGA	AACCT	TTCTC	262	5	a	1,2			
''	GACCA	ACGTT	TCCTA	CATTG	ACAGA	ATGTT	AGGAA	TGGCG	242	5	a	1,2			
BCFI	GCCTC	TATCC	TAATA	CCATC	TAGCC	CAATT	TTGAG	TAGTC	-1Kb		##		++++(τελευταίο νιτρόνιο)		
									147		3	1			
									323		5	1	+	CG/TG (549)	Msp I
									292	a		2	+	GAG/GGG (3341)	Dde I
									320	a		1			
									345	a		2	+	GAC/GGC (1615)	Fnu4H I

@ : 5=σήμανση του 5' εκκινητή, 3=σήμανση του 3'εκκινητή, a=σήμανση του προϊόντος με α-32P dCTP  
# : Βλέπε υλικό και μέθοδος για περιγραφή των πρωτοκόλων 1 και 2  
\* : Οι παραπάνω εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν ως φωλιασμένοι στους ACCAA ACCCT GTCCCT CCCAC και CAGCA ACATG GATAT GGTTG  
\*\* : Το προϊόν των 889 bp τεμαχίσθηκε με Hae III και Ava I και τα τεμάχια χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση SSCP  
## : Το τελευταίο νιτρόνιο του γονιδίου περιελήφθη συμπτωματικά στο προϊόν PCR το οποίο είχε μήκος 1Kb. Σήμανση με α-32P και τεμαχισμός με MSP I πριν το SSCP αποκάλυψε 4 πολυμορφισμούς στο προϊόν. Στη συνέχεια σήμανση του 3' εκκινητή και τεμαχισμός του προϊόντος με Fok I δεν αποκάλυψε πολυμορφισμό στα τελευταία 147 bp της 3'αμετάφραστης περιοχής του γονιδίου

### Πίνακας 1 :

Αποτελέσματα της αναζήτησης πολυμορφισμών στην 3'αμετάφραστη περιοχή γονιδίων. Στην πρώτη στήλη φαίνονται τα γονίδια που μελετήθηκαν. Στην δεύτερη στήλη δίδεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε περιοχή και στην τρίτη το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων. Στην τέταρτη στήλη φαίνεται ο τρόπος σήμανσης : 5=σήμανση του εκκινητή στο 5' άκρο της αλληλουχίας και 3=σήμανση του εκκινητή στο 3' άκρο της αλληλουχίας με  $\gamma$ - $^{32}P$ . a= σήμανση του προϊόντος με προσθήκη dCTP σεσημασμένου με  $\alpha$ - $^{32}P$ . Στην πέμπτη στήλη φαίνεται ποιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για το SSCP (βλέπε υλικό και μέθοδος). Στην έκτη στήλη σημειώνονται οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν και στην έβδομη η διαφορά στην αλληλουχία του DNA μεταξύ των δύο αλληλίων. Στην όγδοη στήλη φαίνεται το ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει την διαφορά αυτή τεμαχίζοντας σε διαφορετικές θέσεις το προϊόν του PCR για κάθε αλληλίο. Τέλος στην ένατη στήλη φαίνεται το παρατηρούμενο ποσοστό ετεροζυγωτών στους γονείς των οικογενειών CEPH.

Ανεύρεση της διαφοράς στην νουκλεοτιδική αλληλουχία των πολυμορφικών αλληλίων που ανιχνεύθηκαν.

Στις περιπτώσεις που ανιχνεύθηκε πολυμορφισμός με το SSCP έγινε ανάλυση αρκετών ατόμων ώστε να βρεθούν ομοζυγώτες για τα αλλήλια. Τότε, προϊόν PCR μη σεσημασμένο ραδιενεργά χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της διαφοράς στην αλληλουχία του DNA με τη χρήση T7 DNA πολυμεράσης (Sequenase, United States Biochemicals, Cleveland OH) όπως έχει προηγούμενα περιγραφεί<sup>44,45</sup>. Ο ένας εκκινητής ραδιοσημάνθηκε με τελική προσθήκη  $\gamma$ -<sup>32</sup>P με T4 κινάση και χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. 10 ng σεσημασμένου εκκινητή μετουσιώθηκαν με θέρμανση και αφέθηκαν να συνδεθούν ως αφετηρία συνθέσεως με περίπου 80 ng προϊόν PCR σε όγκο 11  $\mu$ l. Από αυτά 2.5  $\mu$ l αναμίχθηκαν με 3  $\mu$ l μίγματος που περιείχε δεοξυνουκλεοτίδια (62  $\mu$ M έκαστο) διδεοξυνουκλεοτίδιο (6.2  $\mu$ M) A, C, G ή T χωριστά σε 4 αντιδράσεις και δύο μονάδες T7 DNA πολυμεράσης μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα (25mM tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 70mM NaCl και 7mM dithiothreitol). Μετά από επώαση για 10 min στους 37°C τα δείγματα αναμίχθηκαν με 3ml stop solution (95% Formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% Xylene Cyanol), θερμάνθηκαν στους 94°C για 2 min και ηλεκτροφορήθηκαν μέσω πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 6% με 50% ουρία. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε 60 Watts για 2 - 3 ώρες το πήκτωμα ξηράνθηκε και υπεβλήθη σε αυτοραδιογραφία.

Η παραπάνω αντίδραση βασίζεται στο γεγονός ότι τα διδεοξυνουκλεοτίδια δεν διαθέτουν το απαραίτητο υδροξύλιο για σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Η DNA πολυμεράση συνδέεται στο σημείο όπου ο εκκινητής υβριδίζει στο υπόστρωμα και ξεκινάει την αντιγραφή, αλλά όταν κάποιο διδεοξυνουκλεοτίδιο χρησιμοποιηθεί για την επιμήκυνση, η αντίδραση υποχρεωτικά σταματά. Έτσι, όπου έχουμε προσθέσει ddATP η αντίδραση σταματά σε σημεία όπου υπάρχει αδερίνη, για την ddCTP σταματά σε κυτοσίνες και ούτω καθεξής. Με πρόσθεση των τεσσάρων νουκλεοτιδίων ξεχωριστά σε 4 αντιδράσεις και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μέσω πηκτώματος με ικανότητα διαχωρισμού διαφορών μήκους μιας βάσης (πολυακρυλαμίδη), μπορούμε να "διαβάσουμε" κατά μήκος του πηκτώματος μία προς μία τις βάσεις που συνθέτουν το μόριο του DNA μήτρας. Αυτό που ουσιαστικά βλέπουμε είναι το μήκος των προϊόντων που σταμάτησαν σε A, C, G ή T και σε κάθε μήκος από την αρχή του εκκινητή αντιστοιχεί μια και μόνη βάση, αδερίνη, γουανίνη, κυτοσίνη ή θυμίνη.

Ανεύρεση ενζύμου περιορισμού που αναγνωρίζει τον πολυμορφισμό.

Όταν η διαφορά στην αλληλουχία ήταν πλέον γνωστή, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή MacVector για να βρούμε αν η αλλαγή επιφέρει μεταβολή στην αλληλουχία αναγνωρίσεως κάποιου ενζύμου περιορισμού. Το παραπάνω πρόγραμμα μπορεί να εντοπίσει όλες τις θέσεις αναγνωρίσεως των περισσοτέρων γνωστών ενζύμων περιορισμού όταν το τροφοδοτήσουμε με μια αλληλουχία DNA. Εισαγάγαμε στο πρόγραμμα αρχικά την δημοσιευμένη αλληλουχία και κατόπιν αυτή του νέου αλληλίου που ανιχνεύσαμε. Κατόπιν συγκρίναμε τα αποτελέσματα για να βρούμε διαφορές στις θέσεις των ενζύμων που μας έδωσε ο υπολογιστής. Όποτε είδαμε διαφορές, χρησιμοποιήσαμε το

αντίστοιχο ένζυμο για τεμαχισμό του προϊόντος του PCR (χωρίς ραδιοσήμανση) και στη συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και βαφή με βρωμιούχο εθίδιο ανιχνεύσαμε τα διαφορετικά τεμάχια που προέκυπταν και έτσι προσδιορίσαμε τον γονότυπο. Αυτή η προσέγγιση κατέστησε την γονοτύπηση γρηγορότερη, οικονομικότερη και ασφαλέστερη λόγω αποφυγής της χρήσεως ραδιενεργού ισότοπου.

#### Ανάλυση της μειωτικής συνδέσεως του πολυμορφισμού με άλλους δείκτες του χρωμοσώματος 21.

Από τους πολυμορφισμούς που βρήκαμε, 4 αφορούσαν γονίδια για τα οποία δεν υπήρχε γνωστός πολυμορφισμός. Σε αυτές τις περιπτώσεις αναλύσαμε τους γονότυπους όλων των οικογενειών CEPH που θα έδιναν πληροφορίες για μειωτική σύνδεση. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο του Δρα. Aravinda Chakravarti για μειωτική σύνδεση κατά ζεύγη και πολλαπλών σημείων (ανεύρεση σχετικής θέσης) και τοποθέτηση στο μειωτικό χάρτη του χρωμοσώματος 21 με το πρόγραμμα CRIMAP<sup>46</sup>. Για πολυμορφισμούς σε ήδη χαρτογραφημένα γονίδια, αρκεστήκαμε στην ανάλυση της αλληλουχίας και ανεύρεση ενζύμου περιορισμού για αναγνώριση. Στο γονίδιο HMG14 η ανάλυση της αλληλουχίας στάθηκε αδύνατη λόγω πολλών μη ειδικών ενισχύσεων από το PCR. Στην περίπτωση αυτή, προκειμένου να δείξουμε ότι ο πολυμορφισμός αφορούσε πράγματι το γονίδιο το οποίο μελετούσαμε, κάναμε ανάλυση των γονότυπων μερικών οικογενειών CEPH και χρησιμοποιήσαμε τα αποτελέσματα για να δείξουμε την απόλυτη μειωτική σύνδεση (κανένα χιάσμα) με πολυμορφισμούς που προϋπήρχαν στο γονίδιο αυτό. Την ανάλυση κάναμε στο εργαστήριό μας χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή LINKAGE V547. Το πρόγραμμα LINKAGE αναλύει τα δεδομένα με βάση τη μέθοδο της πλέον πιθανής γενετικής αποστάσεως για το δείγμα, χωρίς άμεσα να ανιχνεύει τα χιάσματα. Έτσι για επιβεβαίωση ότι δεν υπάρχει χιάσμα αναλύσαμε επίσης κάθε οικογένεια ξεχωριστά, χωρίς τη βοήθεια του υπολογιστή.

Η ανεύρεση του κλάσματος ανασυνδυασμού ( $\Theta$ ) από τα γονοτυπικά δεδομένα γίνεται με την ανάλυση των πιθανών απλοτύπων. Όταν έχουμε γονοτυπικά δεδομένα για δύο πληροφοριακούς πολυμορφικούς δείκτες και η οικογένεια αποτελείται από τρεις γενεές (P, F1, F2) μπορούμε να βρούμε την φάση, δηλαδή ποια αλληλία από κάθε δείκτη προέρχονται από τον ίδιο γονέα (P). Με αυτό το δεδομένο μπορούμε στη συνέχεια να δούμε σε τι ποσοστό της F2 αυτά παύουν να βρίσκονται μαζί (χιάσμα ή ανεξάρτητη μεταβίβαση) και αυτό είναι το κλάσμα ανασυνδυασμού για την συγκεκριμένη οικογένεια. Όσο περισσότερες οικογένειες αναλύουμε τόσο καλύτερα υπολογίζουμε το κλάσμα αυτό στο γενικό πληθυσμό. Το LOD score (Z) είναι ένα μέγεθος που μας δίνει το βαθμό βεβαιότητας του αποτελέσματος. Ισούται με τον δεκαδικό λογάριθμο του λόγου της πιθανότητας (likelihood) να προκύπτει το συγκεκριμένο οικογενειακό δένδρο εάν υπάρχει πράγματι γενετική σύνδεση με  $\Theta$  κλάσμα ανασυνδυασμού, προς την πιθανότητα να προκύπτει το ίδιο δένδρο χωρίς να υπάρχει σύνδεση ( $\Theta=0.5$ ). Θεωρούμε ότι υπάρχει τεκμηριωμένα σύνδεση όταν το Z υπερβαίνει την τιμή 3 (πιθανότητες 1000:1).

Το πρόγραμμα LINKAGE που εμείς χρησιμοποιήσαμε χρησιμοποιεί για την ανάλυση τον αλγόριθμο Elston-Stewart. Για κάθε μέλος της κάθε οικογένειας υπολογίζεται η πιθανότητα του γονότυπου του για το επιλεγμένο κλάσμα ανασυνδυασμού  $\Theta$ . Στη συνέχεια υπολογίζεται από αυτά η

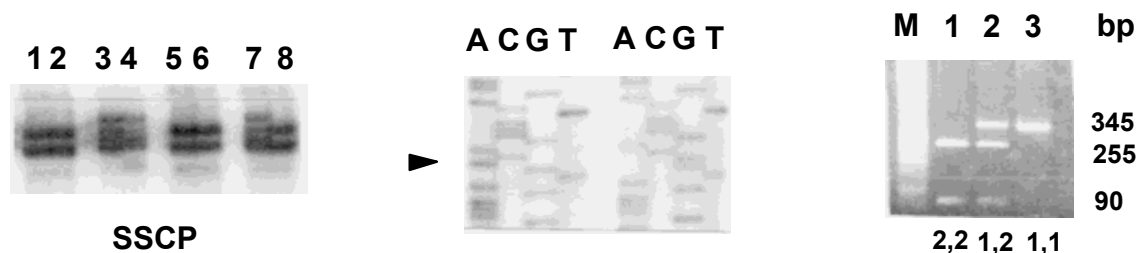
συνδυασμένη πιθανότητα της οικογένειας και διαιρείται προς την πιθανότητα για κλάσμα ανασυνδυασμού  $\Theta=0.5$  για τον υπολογισμό του Z. Το άθροισμα των Z όλων των οικογενειών αποτελεί το τελικό lod score για αυτό το  $\Theta$ . Ο υπολογισμός του  $\Theta$  που δίνει το μεγαλύτερο lod score γίνεται μετά από πολλαπλές επαναλήψεις για πολλές θέσεις. Στους υπολογισμούς για ανάλυση πολλών σημείων η θέση κάποιων δεικτών θεωρείται δεδομένη και ένας νέος δείκτης αναλύεται κάθε φορά για την πιο πιθανή θέση του σε σχέση με τους άλλους. Αντί για το lod score χρησιμοποιούνται συνήθως άμεσα οι πιθανότητες μίας θέσης έναντι κάθε άλλης, με ελάχιστη τιμή για βέβαιη τοποθέτηση το 1000:1. Το πρόγραμμα LINKAGE είναι ένα πακέτο προγραμμάτων που επιτρέπουν τη μελέτη σύνδεσης τόσο για δύο όσο και για πολλαπλούς πολυμορφικούς δείκτες, τόσο για επιλεγμένες όσο και για πολλαπλές θέσεις. Ακόμα περιέχει προγράμματα υποστήριξης για την εισαγωγή τόσο των δεδομένων όσο και των επιθυμητών παραμέτρων. Διατίθεται στη γλώσσα προγραμματισμού PASCAL ώστε ο χρήστης να μπορεί να μεταβάλει ορισμένες παραμέτρους εάν χρειάζεται.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

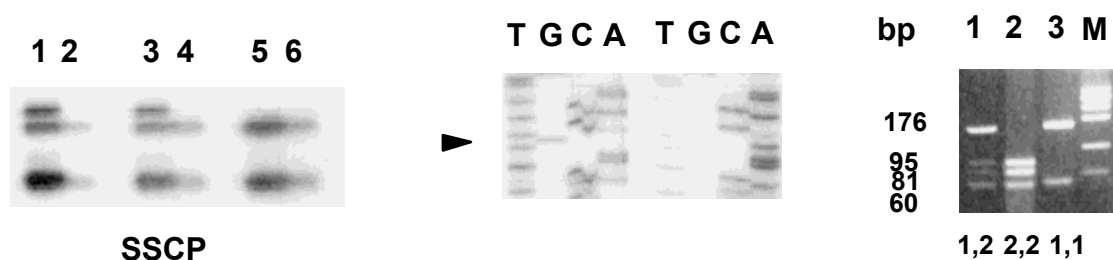
Συνολικά η μελέτη επεκτάθηκε σε 8144 ζεύγη βάσεων από την 3' αμετάφραστη περιοχή 17 γονιδίων του χρωμοσώματος 21 για τα οποία έγινε ανάλυση SSCP. Βρήκαμε 8 πολυμορφισμούς, από έναν για τα γονίδια CBR, ETS2, CD18, CBS, COL6A1, AML1, και δύο στο γονίδιο HMG14. Τα ποσοστά ετεροζυγωτίας κυμαίνονται μεταξύ 7 και 50%. Στα υπόλοιπα γονίδια που μελετήθηκαν: SOD1, ERG2, S100B, PFKL, GART, APP, MX1, IFNAR, BCEI, COL6A2, το SSCP δεν ανίχνευσε διαφορές στην κινητικότητα των μονών αλυσίδων των προϊόντων PCR από την 3' αμετάφραστη περιοχή. Βρήκαμε όμως επιπλέον πολυμορφισμούς επεκτείνοντας τη μελέτη εκτός 3' αμετάφραστης περιοχής για τα γονίδια S100B και BCEI. Για τους πολυμορφισμούς στην 3' αμετάφραστη περιοχή κάναμε ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων και βρήκαμε ότι οφείλονταν σε όλες τις περιπτώσεις σε μεταβολή μίας βάσεως. Εξαιρέση αποτελούν οι δύο πολυμορφισμοί στο γονίδιο HMG14 όπου δεν κατορθώσαμε να έχουμε ικανοποιητική ανάλυση της αλληλουχίας επειδή το προϊόν του PCR περιείχε πολλά μη ειδικά προϊόντα. Σε μεταβολή μιας βάσεως οφειλόταν και ο πολυμορφισμός που ανιχνεύθηκε λίγο μετά το τέλος του γονιδίου S100B. Για τους 4 πολυμορφισμούς που ανιχνεύθηκαν στο τελευταίο ιντρόνιο του γονιδίου BCEI δεν έγινε περαιτέρω ανάλυση γιατί αυτοί ήταν εκτός 3' αμετάφραστης περιοχής και υπάρχει ήδη άλλος πολυμορφισμός για τη χαρτογράφηση αυτού του γονιδίου<sup>48</sup>. Σε όλες τις περιπτώσεις που κάναμε την ανάλυση της αλληλουχίας βρήκαμε κάποιο ένζυμο περιορισμού που αναγνώριζε τη διαφορά λόγω μεταβολής σε αλληλουχία που αναγνωρίζει, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση του πολυμορφισμού. Η εικόνα 6 δείχνει μερικά παραδείγματα από τα αποτελέσματα, περιλαμβάνοντας την μελέτη της αλληλουχίας και τη χρήση του ενζύμου περιορισμού για ανεύρεση του γονότυπου.

## EΙΚΟΝΑ 6

### Πολυμορφισμός στο γονίδιο AML1 στην 3'αμετάφραστη περιοχή



### Πολυμορφισμός στο γονίδιο CBR στην 3'αμετάφραστη περιοχή



Πολυμορφισμοί στην 3'αμετάφραστη περιοχή γονιδίων. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι αυτοραδιογραφίες από την ανάλυση SSCP. Όπως φαίνεται ορισμένα δείγματα παρουσιάζουν ζώνες σε διαφορετικές θέσεις δηλαδή περιέχουν διαφορετικά αλληλία του πολυμορφισμού. Στην δεύτερη στήλη φαίνεται η ανάλυση της αλληλουχίας σε ομοζυγώτες για τα διαφορετικά αλληλία. Η διαφορά στην αλληλουχία σημειώνεται με βέλος. Στην τρίτη στήλη βλέπουμε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε αгарόζη μετά από τεμαχισμό με το ένζυμο περιορισμού που αναγνωρίζει τον πολυμορφισμό (Fnu4HI για το AML1 και RsaI για το CBR). Φαίνονται οι διαφορές στα τεμάχια ανάλογα με το γονότυπο. M= marker.

Όλοι οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη μειωτικής συνδέσεως. Για τα γονίδια CBR, CBS, AML1 και S100B δεν υπήρχαν προηγούμενα περιγεγραμμένοι πολυμορφισμοί. Ανιχνεύσαμε τους γονότυπους όλων των μελών των οικογενειών CEPH που θα έδιναν πληροφορίες και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο του Δρα. Aravinda Chakravarti όπου έγινε εκτεταμένη μελέτη της μειωτικής συνδέσεως κατά ζεύγη και πολλών σημείων με άλλους πολυμορφικούς δείκτες του χρωμοσώματος 21 και τοποθέτηση αυτών στο μειωτικό χάρτη<sup>49,50,51,12</sup>. Για την ανάλυση κατά ζεύγη βλέπε πίνακα 2. Η ανάλυση πολλών σημείων τοποθέτησε το γονίδιο CBR στο χάρτη APP - D21S82 - D21S58 - IFNAR - D21S55 - D21S56 μεταξύ IFNAR και D21S55 με πιθανότητες 650 : 1. Το γονίδιο CBS τοποθετήθηκε εντός του χάρτη HMG14 - MX1 - CRYA1 - D21S113 - D21S112 - COL6A1 με πιθανότητες περισσότερες από 1000 : 1. Οι πιο πιθανές θέσεις ήταν μεταξύ D21S113 - D21S112 ή μεταξύ MX1 - CRYA1. Το γονίδιο AML1 τοποθετήθηκε στο χάρτη cen - D21S213 - IFNAR - D21S216 - D21S65 - D21S211 - CBR - D21S167 - D21S156 - HMG14 - D21S231 - D21S212 - qter μεταξύ D21S216 - D21S211 από οποιαδήποτε μεριά του D21S65 με το οποίο εμφανίζει πλήρη σύνδεση, με πιθανότητες πάνω από 1000 : 1. Τέλος, το γονίδιο S100B τοποθετήθηκε κάτωθεν του D21S112, αλλά, λόγω του μικρού αριθμού πληροφοριακών οικογενειών, δεν μπορέσαμε να τον τοποθετήσουμε στα μεσοδιαστήματα του

χάρτη cen - D21S212 - CBS - D21S171 - COL6A1 - qter. Για το γονίδιο CD18 υπήρχε προηγούμενος πολυμορφισμός<sup>52</sup> αλλά ο νέος πολυμορφισμός που ανιχνεύθηκε επέτρεψε την προσθήκη πληροφοριών για οικογένειες CEPH οι οποίες δεν έδιναν πληροφορίες για την μεταβίβαση αλληλίων με τον προηγούμενο πολυμορφισμό, και έτσι ενισχύσαμε τα προηγούμενα αποτελέσματα.

Για τους πολυμορφισμούς σε γονίδιο που ήταν ήδη τοποθετημένοι στο μειωτικό χάρτη (ETS2, HMG14, COL6A1 CD18), κάναμε ανάλυση στο εργαστήριο μας για να δείξουμε ότι δεν εμφανίζουν χιάσματα με τους γνωστούς πολυμορφισμούς στο ίδιο γονίδιο και συνεπώς βρίσκονται πράγματι σε αυτή την περιοχή. Για την ανάλυση χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα LINKAGE και κάναμε ακόμα κλασική ανάλυση χωρίς χρήση υπολογιστή για τον αποκλεισμό χιασμάτων.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2**  
Σύνδεση μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια και επιλεγμένων δεικτών του χρωμοσώματος 21

<b>S100B</b>	Q	Z			
S100B - D21S171	0.00	10.54			
S100B - COL6A1	0.02	11.75			
S100B - D21S112	0.03	8.56			
<b>CBS</b>	Q	Z	Qm	Qf	Zm,f
CBS-D21S112	0.03	25.32	0.00	0.06	26.34
CBS-COL6A1	0.05	25.93	0.07	0.03	26.17
CBS-PFKL	0.03	20.39	0.04	0.02	20.45
CBS-CD18	0.02	16.69	0.04	0.02	16.74
CBS-D21S113	0.01	37.71	0.00	0.01	37.92
CBS-MX1	0.11	16.56	0.17	0.06	17.53
CBS-D21S42	0.00	15.65	0.00	0.00	15.65
CBS-CRYA1	0.01	27.60	0.00	0.02	27.91
CBS-HMG14	0.14	12.12	0.23	0.05	14.09
CBS-D21S156	0.11	16.70	0.13	0.09	16.79
CBS-D21S171	0.06	35.86	0.06	0.05	35.86
CBS-D21S212	0.05	41.51	0.06	0.04	41.60
<b>CBR</b>	Q	Z	Qm	Qf	Zm,f
CBR - D21S156	0.05	13.23	0.05	0.04	13.24
CBR - IFNAR	0.03	15.98	0.00	0.06	16.11
CBR - D21S55	0.04	4.84	0.00	0.06	4.42
CBR - D21S82	0.06	8.08	0.07	0.06	8.08
CBR - D21S58	0.00	6.02	0.00	0.00	6.02
<b>AML1</b>	Q	Z	Qm	Qf	Zm,f
AML1 - D21S213	0.05	8.53	0.00	0.11	9.27
AML1 - IFNAR	0.07	6.63	0.12	0.00	7.15
AML1 - D21S216	0.02	14.33	0.00	0.04	14.41
AML1 - D21S65	0.00	19.57	0.00	0.00	19.57
AML1 - D21S211	0.02	13.15	0.02	0.00	13.29
AML1 - D21S167	0.04	12.19	0.05	0.00	12.58
AML1 - D21S156	0.10	8.74	0.14	0.04	9.20
AML1 - HMG14	0.03	6.24	0.05	0.00	6.43
AML1 - D21S231	0.14	3.87	0.15	0.09	3.93
AML1 - D21S212	0.21	4.97	0.29	0.00	7.52

Q = ποσοστό χιασμάτων , Z = Lod score

Δεδομένα μειωτικής σύνδεσης μεταξύ των γονιδίων S100B, CBS, CBR και AML1 και επιλεγμένων πολυμορφικών δεικτών από το χρωμόσωμα 21. Θ=ποσοστό ανασυνδυασμών, Qm και Qf = ποσοστό ανασυνδυασμών για μειώσεις αρρένων και θηλέων αντίστοιχα. Z και Zm,f = τιμές LOD score για τις παραπάνω τιμές ανασυνδυασμών.



### Ειδικές περιπτώσεις.

Γονίδιο BCEI : Στην περίπτωση αυτή το PCR αντί του αναμενόμενου έδωσε προϊόν μήκους περίπου 1 Κβ. Όπως ανακαλύψαμε αναλύοντας την αλληλουχία του προϊόντος, το τελευταίο ιντρόνιο του γονιδίου περιλαμβανόταν στο προϊόν (ο 5' εκκινήτης βρισκόταν πριν το τερματικό κωδικόνιο του γονιδίου). Στη συνέχεια δοκιμάσαμε διάφορα ένζυμα περιορισμού και βρήκαμε ότι το Msp I διασπούσε το προϊόν σε τεμάχια μεταξύ 200 και 300 ζεύγη βάσεων. Ανάλυση SSCP στα τεμάχια αυτά απεκάλυψε 4 πολυμορφισμούς, ένα για το κάθε τεμάχιο (εικόνα 7). Προκειμένου να δούμε αν κάποιος από τους παραπάνω πολυμορφισμούς βρισκόταν στην 3' αμετάφραστη περιοχή, ραδιοσημάναμε το 3' άκρο του προϊόντος (ραδιοσημαίνοντας τον 3' εκκινήτη με  $\gamma$ - $^{32}P$ ) και το τεμαχίσαμε με το ένζυμο Fok I. Το ένζυμο αυτό απέσπασε από το προϊόν 147 ζεύγη βάσεων από την 3' αμετάφραστη περιοχή, μαζί με τον σεσημασμένο εκκινήτη. Το τεμάχιο αυτό δεν έδειξε πολυμορφισμό ανιχνεύσιμο με SSCP.

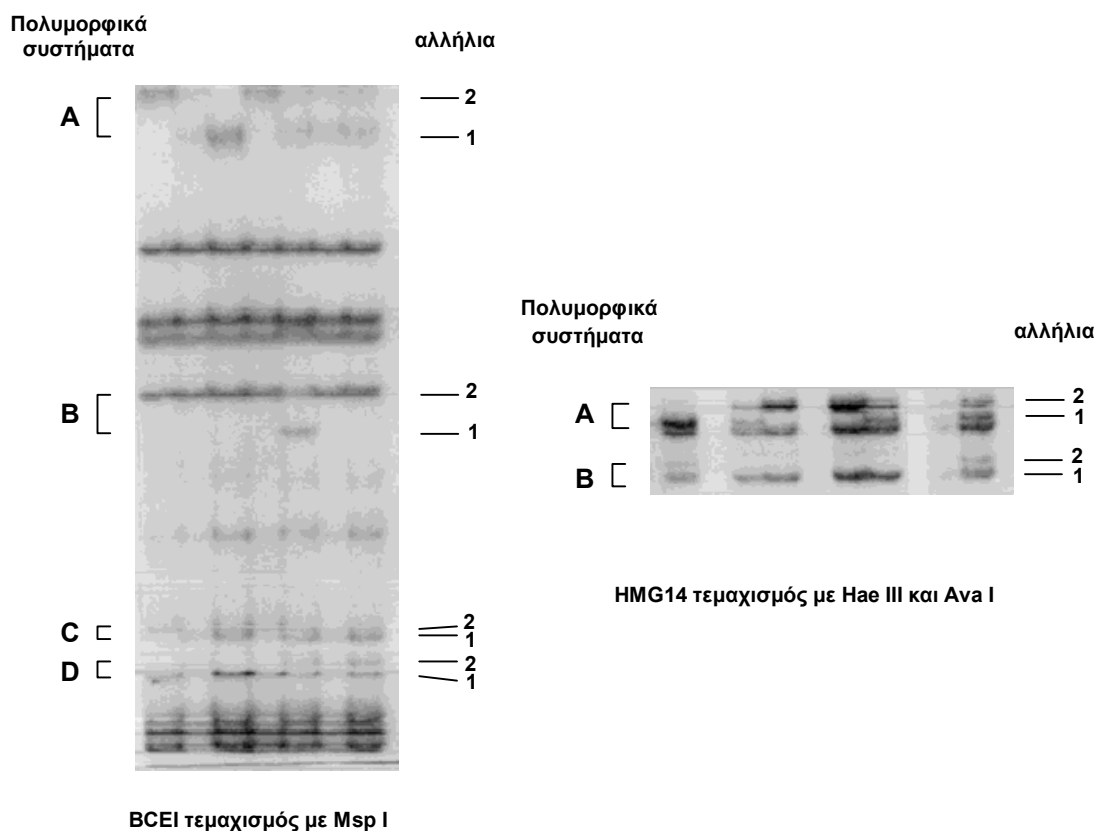
Γονίδιο HMG14 : Στην περίπτωση αυτή το PCR μας έδινε μη ειδική ενίσχυση σε πολλαπλές προσπάθειες. Το καλύτερο αποτέλεσμα επιτύχαμε ενισχύοντας τεμάχιο 889 ζευγών βάσεων από την 3' αμετάφραστη περιοχή. Το προϊόν αυτό το διασπάσαμε με τα ένζυμα περιορισμού Hae II και Ava I σε τρία τεμάχια 286, 324 και 279 bp και εφαρμόσαμε SSCP. Δύο από τις ζώνες που διακρίνονταν στην αυτοραδιογραφία εμφάνιζαν πολυμορφισμούς. Ανάλυση μειωτικής συνδέσεως απέδειξε ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί ήταν πράγματι συνδεδεμένοι με τον γονίδιο. Στη συνέχεια οι δύο εκκινήτες ραδιοσημάνθηκαν ανεξάρτητα και έγινε ανάλυση με SSCP. Τότε, μόνο το 3' τεμάχιο εμφάνιζε πολυμορφισμό, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα πολυμορφικά τεμάχια ήταν το δεύτερο και τρίτο (5' προς 3').

Γονίδιο COL6A1 : Το προϊόν του PCR έδινε και σε αυτή την περίπτωση μη ειδική ενίσχυση. Από τα αποτελέσματα που είχαμε μπορέσαμε να διακρίνουμε έναν πολυμορφισμό και προχωρήσαμε στην ανάλυση της αλληλουχίας. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης ήταν επίσης φτωχό σε ποιότητα αλλά υπεδείκνυε μια διαφορά ανιχνεύσιμη από το ένζυμο περιορισμού Dde I. Τα τεμάχια από την εφαρμογή αυτού του ενζύμου ήταν της τάξεως των 30 ζευγών βάσεων γι' αυτό κάναμε ηλεκτροφόρηση των τεμαχίων (μη σεσημασμένων) μέσω πηκτώματος πολυακρυλαμίδης μεταβαλλόμενης πυκνότητας 5%-20% για την ανίχνευση των διαφορών. Χρησιμοποιήσαμε τους γονότυπους που προέκυψαν από αυτή την ανάλυση για να δείξουμε ότι ο πολυμορφισμός ήταν πράγματι συνδεδεμένος με το γονίδιο αυτό.

Για μια ολοκληρωμένη περιγραφή των αποτελεσμάτων βλέπε τον πίνακα 1.

## ΕΙΚΟΝΑ 7

SSCP μετά από τεμαχισμό με ένζυμο περιορισμού.



SSCP μετά από τεμαχισμό του προϊόντος με ένζυμο περιορισμού για έλεγχο μεγαλύτερων προϊόντων (βλέπε και εικόνα 5). Στη επάνω εικόνα προϊόν από την 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου BCE1 μαζί με το τελευταίο ιντρόνιο, μετά από τεμαχισμό με Msp I. Διακρίνονται τέσσερα πολυμορφικά συστήματα (A, B, C, D) με τα αλληλία σημειωμένα στα δεξιά. Κάτω προϊόν από την 3'αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου HMG14 μετά από τεμαχισμό με Hae III και Ava I. Διακρίνονται δύο πολυμορφικά συστήματα (A, B).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην αναζήτηση αυτή πολυμορφισμών στην 3' αμετάφραστη περιοχή γονιδίων του χρωμοσώματος 21, το SSCP ανίχνευσε πολυμορφισμούς στο 41% (7/17) των υπό μελέτη γονιδίων. Σε όλες τις περιπτώσεις που αναζητήθηκε, βρέθηκε κάποιο ένζυμο περιορισμού για την εύκολη και γρήγορη ανίχνευση των πολυμορφισμών αυτών. Οι πολυμορφισμοί σε γονίδια επιτρέπουν τη χρήση τους για μελέτη της μειωτικής συνδέσεως τους με άλλους δείκτες και την τοποθέτηση τους στους μειωτικούς χάρτες. Ακόμα, μας δίνουν την δυνατότητα να πιθανολογήσουμε η να αποκλείσουμε την αιτιολογική σύνδεση των γονιδίων με κληρονομικά μεταβιβαζόμενες παθήσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προγεννητική διάγνωση. Η συχνότητα ετεροζυγωτίας των πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν κυμαίνεται μεταξύ 7 και 50% που είναι σχετικά χαμηλό ποσοστό συγκρινόμενο με τους πολυμορφισμούς επαναλήψεων (VNTR,SSR), αλλά η σύνδεσή τους με γονίδια τους δίνει ιδιαίτερη σημασία. Η συχνότητα πολυμορφισμών στην 3' αμετάφραστη περιοχή βρέθηκε στο επίπεδο 1:1018 ζεύγη βάσεων με SSCP, που δεν διαφέρει από την προηγούμενα υπολογιζόμενη συχνότητα για την πολυμορφικότητα του ανθρώπινου γονιδιόματος συνολικά, με βάση δεδομένα από πολυμορφισμούς διαφοράς μήκους τεμαχίων ενζύμων περιορισμού - RFLP<sup>53,54</sup>. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την θεώρηση ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή αποτελεί μία καλή επιλογή για την αναζήτηση πολυμορφισμών συνδεδεμένων με γονίδια, ειδικά εφόσον συνήθως περιλαμβάνεται στα κλωνοποιημένα cDNA.

Το SSCP είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τον Orita et al. το 1989<sup>25,26</sup> για την ανίχνευση διαφορών στην αλληλουχία του DNA. Δεν ανιχνεύει όλες τις διαφορές, αλλά ποικίλες μελέτες δίνουν τιμές ευαισθησίας μεταξύ 60 και 80%<sup>27,28,29</sup>. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, παρόλο που δεν έχουμε δεδομένα για τον υπολογισμό της ευαισθησίας. Η μέθοδος γίνεται ακόμα ταχύτερη όταν εφαρμόζεται σε μεγαλύτερα τεμάχια DNA σε συνδυασμό με τεμαχισμό του προϊόντος με ένζυμα περιορισμού, όπως κάναμε στα γονίδια HMG14 και BCE1.

Στην παρούσα μελέτη τοποθετήσαμε στο χάρτη του χρωμοσώματος 4 γονίδια (CBR, CBS, AML1, S100B) και βελτιώσαμε την τοποθέτηση του CD18. Η ανεύρεση πολυμορφισμού στο CBS παρουσιάζει ξεχωριστό ενδιαφέρον γιατί το γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοκυστινουρία, μια συχνή κληρονομούμενη πάθηση. Ο πολυμορφισμός αυτός μπορεί να φανεί χρήσιμος για την προγεννητική διάγνωση στην πάθηση αυτή. Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο AML1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί το γονίδιο αυτό αποτελεί το σημείο θραύσεως του χρωμοσώματος στην μετατόπιση t(8;21)(q22;q22.3) που παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία<sup>55</sup>. Έτσι ο πολυμορφισμός είναι συνδεδεμένος με ένα σημείο αναφοράς και συνδέει το μειωτικό με το φυσικό χάρτη. Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο S100B έχει επίσης ιδιαίτερη σημασία γιατί, όπως έχει δειχθεί από δεδομένα φυσικής χαρτογραφήσεως, είναι τοποθετημένο στο τελομερίδιο του χρωμοσώματος. Έτσι αποτελεί το κατώτερο τέλος του μειωτικού χάρτη.

Συνοψίζοντας, πιστεύουμε πως η ανάλυση της 3' αμετάφραστης περιοχής γονιδίων για πολυμορφισμούς με SSCP αποτελεί μια πολλά

υποσχόμενη μέθοδο για την ανάλυση του ανθρωπίνου γονιδιόματος.

## **B. ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΣΤΟ ΧΑΡΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΒΡΑΧΕΩΝ ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ**

### Σχετική δημοσίευση :

McInnis, M.G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M.B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J.L., Konig, U., Brahe, C., Cox, T., Warren, A.C., Talbot, C.T., Van Broeckhoven, C., Litt, M. and Antonarakis, S.E. (1993). A linkage map of human chromosome 21 : 43 PCR Markers at Average Intervals of 2.5 cM. **Genomics** **16:562-571**.

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ :**

Τα αποτελέσματα που θα περιγραφούν εδώ αποτελούν μέρος μιας ευρύτερης προσπάθειας του εργαστηρίου για την δημιουργία ενός αναλυτικού και εύχρηστου μειωτικού χάρτη του χρωμοσώματος 21, αποτελούμενου από δείκτες που μπορούν να ανιχνευθούν με την αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (PCR).

Η χρησιμότητα των μειωτικών χαρτών για τη μελέτη παθήσεων και την προώθηση της μελέτης του ανθρωπίνου γονιδιόματος αναλύθηκε στην εισαγωγή του πρώτου μέρους. Στο πρώτο κεφάλαιο του πρώτου μέρους αναλύθηκε επίσης η προσπάθεια για την ανεύρεση πολυμορφισμών συνδεδεμένων με γονίδια και η τοποθέτηση αυτών στο μειωτικό χάρτη. Εδώ θα περιγράψουμε την ανάλυση πολυμορφικών βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών (για μια σύντομη περιγραφή αυτού του τύπου πολυμορφισμών βλέπε την εισαγωγή του πρώτου μέρους και την εικόνα 2). Αυτού του τύπου οι πολυμορφισμοί αποτέλεσαν το σκελετό του χάρτη των πολυμορφισμών που ανιχνεύονται με PCR. Ακόμα εδώ θα κάνουμε μια βραχεία περιγραφή του μειωτικού χάρτη που κατασκευάστηκε για το χρωμόσωμα 21, περιλαμβάνοντας τους παραπάνω δείκτες<sup>13</sup>. Η ανεύρεση των πολυμορφισμών που περιγράφονται έγινε στο παρελθόν από άλλους ερευνητές<sup>56,57,58</sup> και βρίσκονται κατατεθειμένοι στην GDB (Genome DataBase, Johns Hopkins University). Εδώ θα μιλήσουμε για την ανεύρεση των γονότυπων στις οικογένειες CEPH και την κατασκευή του μειωτικού χάρτη.

Η προσπάθεια για δημιουργία μειωτικού χάρτη που να αποτελείται αποκλειστικά από δείκτες που να ανιχνεύονται με PCR έγινε γιατί αυτός ο τρόπος ανεύρεσης γονότυπων προσφέρει πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα από τις παλιότερες τεχνικές, όπως το Southern blotting που ήταν η βασική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των παλαιότερων χαρτών. Ο χάρτης PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες συνδέσεως φαινοτύπων ή άλλων πολυμορφικών δεικτών με πολύ ταχύτερη ανίχνευση των γονότυπων στα άτομα που μελετώνται και με πολύ μικρότερη δαπάνη DNA. Ακόμα οι πολυμορφισμοί βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών νουκλεοτιδίων (SSRs), όπως αυτοί που μελετούνται εδώ, έχουν συνήθως υψηλούς βαθμούς ετεροζυγωτίας και πολλά διαφορετικά αλληλία που τους καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμους για μελέτες μειωτικής συνδέσεως μονογονιδιακών διαταραχών.

### **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ :**

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη διατέθηκε από το κέντρο CEPH όπως περιγράφηκε στο μέρος A (βλέπε υλικό και μέθοδος).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης και η ραδιοσήμανση των εκκινητών με  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  έγινε επίσης όπως στο μέρος A. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε συντέθηκαν στο εργαστήριο genetics core facility, στο Johns Hopkins University με τον ABI oligonucleotide synthesizer. Οι αλληλουχίες για όλους τους δείκτες και οι συνθήκες για το PCR βρίσκονται κατατεθειμένοι στην GDB.

Το ραδιοσημασμένο προϊόν της αντίδρασης αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 με διάλυμα Stop Solution (95% Formamide, 20 $\mu\text{M}$  EDTA, 0.05% bromophenol Blue, 0.05% Xylene Cyanol), μετουσιώθηκε με θέρμανση στους 94 $^{\circ}\text{C}$  για 3 λεπτά, εψύχθει σε πάγο για αποφυγή επανασυνδέσεως των ελίκων και στη συνέχεια υπεβλήθη σε ηλεκτροφόρηση μέσω μετουσιωτικού πηκτώματος πολυακρυλαμίδης (πολυακρυλαμίδη 6%, ουρία 50%) υπό σταθερή ισχύ ρεύματος 60 Watts σε 1X TBE για δύο ώρες. Το πήκτωμα στη συνέχεια αποξηράνθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση ακτινολογικού φιλμ για 2 έως 24 ώρες, ώστε να γίνουν ορατές οι ζώνες του σεσημασμένου προϊόντος.

Το μετουσιωμένο προϊόν κινήθηκε μέσω του πηκτώματος με ταχύτητα αντίστροφα ανάλογη του μήκους του και έτσι τα αλλήλια αναγνωρίζονταν ως ζώνες προϊόντος σε διαφορετικές θέσεις. Στο αλλήλιο με το μικρότερο μέγεθος (χαμηλότερη θέση) δώσαμε τον αριθμό 1 ως κώδικα του γονότυπου και συνεχίσαμε προς τα πάνω αυξάνοντας τον αριθμό (2,3 κλπ). Επαναλάβαμε την ανάγνωση των γονότυπων δύο φορές για την αποφυγή λαθών. Με τον τρόπο αυτό βρήκαμε τους γονότυπους για τις 40 οικογένειες CEPH και τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μειωτικής σύνδεσης μεταξύ των δεικτών.

Η μελέτη της μειωτικής σύνδεσεως έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο του καθηγητού Δρα. Aravinda Chakravarti χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Cox et al. <sup>59</sup> και το πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή CRI-MAP<sup>46</sup>, Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με το πρόγραμμα LINKAGE<sup>47</sup>. Η μέθοδος συνίσταται στην ανίχνευση των πλέον πληροφοριακών ζευγών δεικτών με βάση την ετεροζυγωτία τους ή την τιμή joint-PIC<sup>60</sup> και την επιλογή για ανάλυση του πλέον πληροφοριακού ζεύγους για μια απόσταση 15 cM. Στη συνέχεια, άλλοι δείκτες τοποθετούνται σε αυτό τον άξονα με πιθανότητες που να ξεπερνούν το 1:1000. Έτσι δημιουργείται ένας αρχικός σκελετός του χάρτη από ιδιαίτερα πληροφοριακούς δείκτες σε αποστάσεις που δεν ξεπερνούν τα 20 cM, ο οποίος στη συνέχεια εμπλουτίζεται με όλους τους δείκτες οι οποίοι μπορούν να τοποθετηθούν σε αυτόν με πιθανότητες λάθους μικρότερες του 1:1000. Κάθε χάρτης που κατασκευάζεται στην πορεία αυτή, ελέγχεται με όλες τις αντίστοιχες αναλύσεις τριών σημείων, ώστε τελικά να βρεθεί η σειρά με τις καλύτερες πιθανότητες. Τέλος όλοι οι δείκτες χρησιμοποιούνται στο υποπρόγραμμα του CRI-MAP CHROM-PIC που ανιχνεύει περιοχές με πολλά χιάσματα σε μικρή απόσταση, οπότε τίθεται η υποψία λάθους. Τότε τα αποτελέσματα της γονοτύπησης επανελέγχονται, ακόμα και με επανάληψη των αντιδράσεων αν χρειάζεται, και αν βρεθεί λάθος η ανάλυση επαναλαμβάνεται.

Στο χάρτη δεικτών PCR που κατασκευάστηκε περιλήφθηκαν οι 5 πολυμορφισμοί σε γονίδια που περιγράφηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι δύο πολυμορφισμοί σε επαναλήψεις GT που περιγράφονται εδώ, καθώς και

άλλοι 28 πολυμορφισμοί σε επαναλήψεις GT, 4 σε επαναλήψεις ATTT, 1 σε επανάληψη TCTA και 3 σε σύνθετες επαναλήψεις (  $(GA)_n(GT)_n$ ,  $(CA)_n(GA)_n$ , και  $(AT)_n(GT)_n$  ) που αναλύθηκαν από διάφορους ερευνητές. Ο πίνακας 3 περιγράφει τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν και τον αριθμό των πληροφοριακών μειώσεων στις οικογένειες CEPH για κάθε δείκτη.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Δείκτης	επανάληψη	αριθμός αλληλίων	συχνότητα ετεροζυγωτών	αριθμός μειώσεων
D21S11	(TCTA)n	12	0.90	535
D21S13	(GT)n	5	0.60	382
D21S16	(GT)n	8	0.68	421
D21S65	(GT)n	12	0.86	467
D21S120	(GT)n	7	0.72	446
D21S145	(GT)n	6	0.65	436
D21S156	(GT)n	12	0.76	458
D21S167	(GT)n	13	0.80	371
D21S168	(GT)n	8	0.73	483
D21S171	(GT)n	10	0.66	430
D21S172	(GT)n	8	0.65	416
D21S192	(GT)n	7	0.54	339
D21S198	(GT)n	9	0.81	322
D21S210	(AT)n(GT)n	14	0.86	312
D21S211	(GT)n	8	0.53	334
D21S212	(GT)n	11	0.86	559
D21S213	(CA)n(GA)n	7	0.69	356
D21S214	(GT)n	9	0.84	398
D21S215	(GT)n	6	0.65	435
D21S216	(GT)n	3	0.54	326
D21S217	(GT)n	6	0.72	401
D21S218	(GT)n	4	0.52	180
D21S221	(ATTT)n	7	0.45	303
D21S222	(GT)n	9	0.88	531
D21S225	(ATTT)n	3	0.16	94
D21S226	(ATTT)n	4	0.59	335
D21S228	(GT)n	4	0.64	101
D21S230	(GT)n	3	0.40	129
D21S231	(GT)n	6	0.65	332
D21S232	(GT)n	4	0.68	359
D21S236	(GT)n	7	0.71	366
D21S258	(GT)n	12	0.87	510
D21S273	(GT)n	2	0.17	136
APPivs1	(GA)n(GT)n	5	0.67	415
HMG14	(GT)n	10	0.74	326
IFNAR	(ATTT)n	6	0.83	213
GART	(GT)n	5	0.74	406
PFKL	(GT)n	7	0.70	307
CBR	Rsal	2	0.20	120
S100B	HaeIII	2	0.07	53
CBS	MspI	2	0.50	295
AML1	Fnu4HI	2	0.17	105
CD18	Acil	2	0.43	359



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :

Οι δείκτες που μελετήθηκαν είναι οι : D21S222 και GART, καθώς και αυτοί που προαναφέρθηκαν στην 3' αμετάφραστη περιοχή γονιδίων. Ο δείκτης **D21S222** παρουσιάζει πολυμορφισμό σε μια επανάληψη της αλληλουχίας GT. Ο παρατηρούμενος βαθμός ετεροζυγωτίας στο δείγμα μας ήταν 88%. Από τις 40 οικογένειες CEPH σε 39 ο ένας ή και οι δύο γονείς ήταν ετεροζυγώτες, άρα οι οικογένειες αυτές ήταν χρήσιμες για τη μελέτη της μειωτικής συνδέσεως. Σε αυτές τις οικογένειες έγινε ανάλυση των γονότυπων όλων των μελών. Η εικόνα 8 δίνει παράδειγμα της γονοτύπησης από τις οικογένειες και παραπλεύρως τον τρόπο ονομασίας των αλληλίων με αριθμούς. Στη συνέχεια έγινε η μελέτη της μειωτικής σύνδεσης. Η θέση του βρέθηκε να είναι μεταξύ των δεικτών D21S232 και D21S217 με βεβαιότητα που ξεπερνάει το 1000:1 .

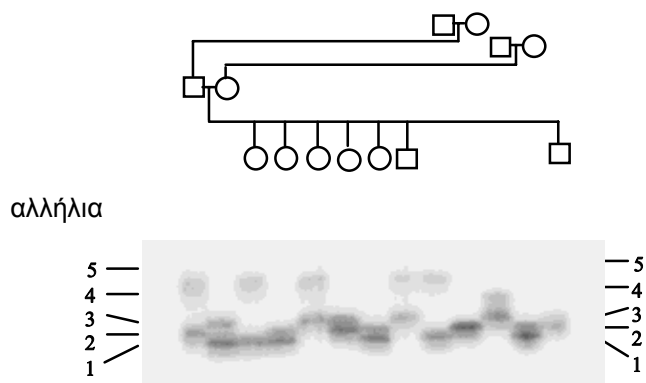
Ο δείκτης **GART** βρίσκεται στην περιοχή του ομώνυμου γονιδίου και είναι επίσης μια επανάληψη της αλληλουχίας GT. Ο βαθμός ετεροζυγωτίας στο δείγμα μας ήταν 74%. Παράδειγμα από τη γονοτύπηση των οικογενειών φαίνεται στην εικόνα 8. Η θέση του στο χρωμόσωμα 21 είναι μεταξύ D21S213 και D21S65 με πιθανότητες που ξεπερνούν το 1000:1.

### Κατασκευή του χάρτη

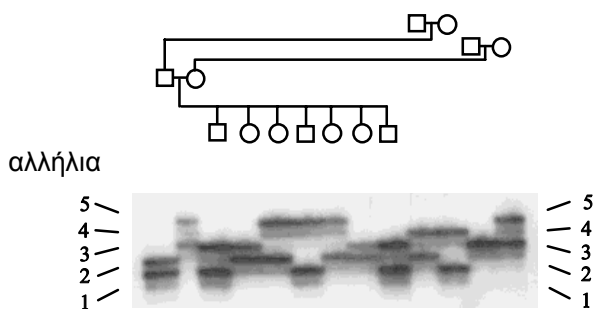
Με τη χρήση των δεδομένων από τους παραπάνω πολυμορφισμούς και τους πολυμορφισμούς στην 3' αμετάφραστη περιοχή γονιδίων που περιγράφηκαν προηγούμενα, καθώς και με τα δεδομένα άλλων ερευνητών, κατασκευάστηκε μειωτικός χάρτης του χρωμοσώματος 21 με μέση απόσταση μεταξύ αλληλοδιαδόχων δεικτών 2.4 cM και κάλυψη σχεδόν ολόκληρου του χρωμοσώματος (εικόνα 9). Το σύνολο των περιλαμβανομένων δεικτών είναι 31, οι οποίοι ορίζουν 27 σημεία στο χρωμόσωμα διότι οι δείκτες D21S210/D21S221/APP D21S65/AML1 και IFNAR/GART δεν εμφανίζουν χιάσματα μεταξύ τους με τα παρόντα δεδομένα και συνεπώς αποτελούν μόνον 3 και όχι 7 σημεία στο χάρτη. Ακόμα 12 δείκτες δεν μπόρεσαν να τοποθετηθούν στο χάρτη με πιθανότητες 1000:1. Η πιο πιθανή θέση τους φαίνεται δεξιά από το χάρτη ανεξάρτητα φύλου στην εικόνα 9. Το συνολικό μήκος του χάρτη είναι για τις πατρικές μειώσεις 47.7 cM και για τις μητρικές μειώσεις 83.3 cM (μήκος ανεξάρτητα φύλου = 65.5 cM). Οι διαφορές στα χιάσματα μεταξύ των δύο φύλων είναι φαινόμενο που είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενους χάρτες του χρωμοσώματος. Ο συνολικός αριθμός χιασμάτων είναι μεγαλύτερος για τις μητρικές μειώσεις, αλλά αυτό δεν είναι κανόνας για κάθε ζεύγος δεικτών, όπως φαίνεται στους χάρτες για τα δύο φύλα που παρατίθενται δίπλα στον χάρτη ανεξάρτητα φύλου (εικόνα 9). Οι δείκτες D21S215 και D21S171 έχουν τοποθετηθεί με φυσική χαρτογράφηση στην περικεντρομεριδιακή (εγγύς 21q11.1) και προτελομεριδιακή (άπω 21q22.3) περιοχή του χρωμοσώματος αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει ότι ο χάρτης καλύπτει σχεδόν ολόκληρο το μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 21. Με την προσθήκη του δείκτη COL6A1 (ο οποίος δεν ανιχνεύεται με PCR αλλά έχει δειχθεί με μεθόδους φυσικής χαρτογράφησης πως βρίσκεται στο τελομερίδιο του χρωμοσώματος) θα είχαμε πλήρη κάλυψη. Η απόσταση μεταξύ D21S171 και COL6A1 έχει βρεθεί ίση με 4.3 cM (άρρενες 11.7, θήλεια 0.00) και θα πρέπει να προστεθεί στο συνολικό μήκος του παραπάνω χάρτη για τον

**ΕΙΚΟΝΑ 8**

Παραδείγματα από τη γονοτύπηση των οικογενειών CEPH



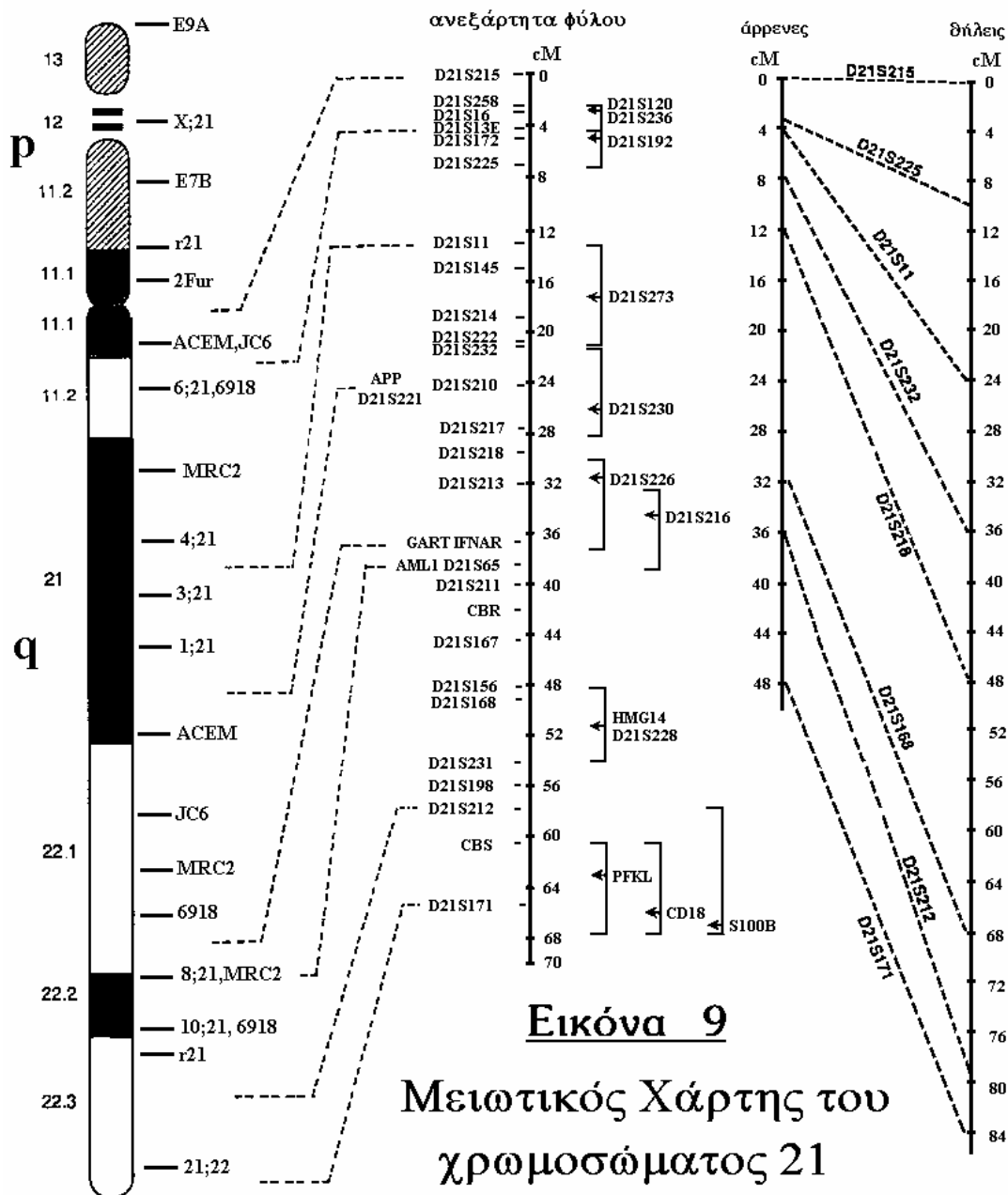
**D21S222 οικογένεια CEPH # 1420**



**GART οικογένεια CEPH # 66**

Παραδείγματα από την γονοτύπηση των οικογενειών CEPH. Σημειώνονται το όνομα του πολυμορφικού δείκτη και ο κωδικός αριθμός της οικογένειας καθώς και το οικογενειακό δέντρο. Τα αλληλία έχουν ονομαστεί με αριθμούς αρχίζοντας από το μικρότερο σε μέγεθος. Το μικρότερο αλληλίο είναι εκείνο που έχει προχωρήσει περισσότερο στην ακρυλαμίδα και περιέχει τις λιγότερες επαναλήψεις δινοκλεοτιδίου. Φαίνεται η μεταβίβαση των αλληλίων στις τρεις γενιές.

υπολογισμό του συνολικού μήκους του χρωμοσώματος. Τα δεδομένα από την ανάλυση του χάρτη έδειξαν ακόμα στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αναμενόμενων και παρατηρούμενων διπλών και τριπλών χιασμάτων στο χρωμόσωμα, υποδεικνύοντας την ελαττωμένη πιθανότητα για περισσότερα του ενός χιάσματα στο ίδιο χρωμόσωμα (interference : παρέμβαση). Για πιο λεπτομερειακή ανάλυση των δεδομένων του χάρτη, παραπέμπουμε στη σχετική δημοσίευση<sup>13</sup>. Τα δεδομένα μας από την γονοτύπηση των παραπάνω δεικτών χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την κατασκευή μειωτικών χαρτών ολοκλήρου του ανθρωπίνου γονιδιόματος από το ινστιτούτο CEPH<sup>61</sup>.



Παρουσιάζεται το χρωμόσωμα 21 με τις ζώνες που αυτό εμφανίζει και τα σημεία που με διάφορους τρόπους είναι γνωστή η φυσική θέση τους. Δίπλα φαίνεται ο μειωτικός χάρτης ανεξάρτητα φύλου και δίπλα οι αντιστοιχίες του για μειώσεις αρρένων και

θηλαίων. Οι δείκτες για τους οποίους είναι γνωστή η φυσική τους θέση συνδέονται με το χρωμόσωμα με διακεκομμένες γραμμές όπως π.χ. η μετατόπιση 8;21 στο γονίδιο AML1. Οι δείκτες για τους οποίους η ανάλυση τριών σημείων δεν έδωσε επαρκή βεβαιότητα είναι τοποθετημένοι στα δεξιά του μειωτικού χάρτη με τις πιο πιθανές θέσεις σημειωμένες.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ :

Η δυναμικότητα και χρησιμότητα των βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών, όπως αυτές που περιγράφηκαν πιο πάνω, είναι εμφανής όταν συγκρίνει κανείς το χάρτη του χρωμοσώματος 21 που παρουσιάστηκε με τους προϋπάρχοντες<sup>62,63,64,65</sup> σχετικά κυρίως με τους βαθμούς βεβαιότητας, την πυκνότητα, καθώς και την μεγάλη διαφορά στην ταχύτητα αναλύσεως των δεικτών PCR από τους προηγούμενα χρησιμοποιούμενους πολυμορφισμούς. Η μεγάλη χρησιμότητα αυτού του τύπου πολυμορφισμών θα φανεί ακόμα καλύτερα στο δεύτερο μέρος όπου θα περιγραφεί η χρήση τους για την ανάλυση της προελεύσεως των υπεράριθμων χρωμοσωμάτων στην τρισωμία 21.

Περιγράψαμε εδώ την κατασκευή ενός χάρτη του χρωμοσώματος 21 ο οποίος καλύπτει το μακρό σκέλος σε αποστάσεις < 5cM, με μόνη εξαίρεση την απόσταση μεταξύ των δεικτών D21S225 - D21S11, όπου η απόσταση είναι 6.3 cM. Για τους παραπάνω 2 δείκτες παρατηρείται μια μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο φύλων : 0.00 cM για τους άρρενες έναντι 14.0 cM για τα θήλεια, γεγονός που υποδεικνύει ότι σε φυσικά μεγέθη ίσως η απόσταση δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, αλλά η θέση αυτή αποτελεί σημείο μεγάλης κινητικότητας στις μειώσεις των θηλέων. Ο χάρτης που κατασκευάστηκε έχει μικρότερο μήκος από όλους τους προηγούμενους που είχαν κατασκευασθεί σε αυτό το εργαστήριο. Αυτό οφείλεται στον πολλαπλό έλεγχο λαθών που έγινε με τη χρήση του υποπρογράμματος του CRI-MAP, CHROMPIC το οποίο δίνει παραστατικά όλα τα χιάσματα για κάθε χρωμόσωμα κάθε ατόμου που μελετάται. Έτσι, όποτε παρατηρήθηκε περισσότερο από ένα χιάσμα στο χρωμόσωμα σε σχετικά μικρή απόσταση, είτε τρία χιάσματα στο ίδιο χρωμόσωμα ανατρέξαμε στα αποτελέσματα γονοτύπησης για επανέλεγχο. Όταν στα προηγούμενα αποτελέσματα δεν βρέθηκε λάθος επαναλάβαμε τη γονοτύπηση για επιβεβαίωση. Ακόμα, ο υπολογισμός του μήκους του χάρτη έγινε πολλές φορές, αφαιρώντας κάθε φορά έναν δείκτη. Το μήκος σε αυτές τις αναλύσεις κυμάνθηκε από 65.1 cM έως 67.7 cM με μέση τιμή 65.5 cM ίση με το τελικό μήκος του χάρτη. Η ανάλυση αυτή μας επέτρεψε να εκτιμήσουμε την μέση τιμή πιθανού λάθους σε 0.04% με μέγιστη τιμή 0.1%. Αυτό, σε συνδυασμό με την συμφωνία των παραπάνω τιμών με αποτελέσματα βασισμένα στην άμεση παρατήρηση μειώσεων<sup>1</sup>, μας επιτρέπει να έχουμε μεγάλη βεβαιότητα για την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας.

Όλοι οι δείκτες του παραπάνω χάρτη αναλύονται με PCR και οι περισσότεροι έχουν μεγάλους βαθμούς ετεροζυγωτίας, είναι συνεπώς ιδιαίτερα χρήσιμοι για μελέτες εντόπισης με μειωτική σύνδεση ασθενειών (φαινοτύπων) όπου συχνά ο αριθμός των διαθέσιμων οικογενειών προς μελέτη είναι περιορισμένος και η κατοχύρωση ικανής βεβαιότητας δύσκολη. Ευελπιστούμε ότι ο παραπάνω χάρτης θα αποτελέσει πολύ χρήσιμο εργαλείο στον αγώνα για καλύτερη προγεννητική διάγνωση και θεραπεία των κληρονομικά μεταβιβαζόμενων ασθενειών και προδιαθέσεων.

Κάθε ένας από τους 31 δείκτες που περιελήφθησαν στο χάρτη αυτό αποτελεί και θέση οριζόμενη από τη μοναδικότητα της αλληλουχίας της (Sequence Taged Site, STS). Αυτό σημαίνει ότι όταν διαθέτουμε ένα τεμάχιο από το DNA του χρωμοσώματος 21 μπορούμε με μία αντίδραση PCR να διαπιστώσουμε ποιους δείκτες από τους παραπάνω περιέχει. Με αυτή τη μέθοδο οι ερευνητές που ασχολούνται με την φυσική χαρτογράφηση του

χρωμοσώματος 21, που προσπαθούν δηλαδή να βάλουν σε σειρά συλλογές κλώνων DNA από αυτό το χρωμόσωμα ανάλογα με τη φυσική τους θέση, μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους δείκτες σαν μέσο, και το μειωτικό χάρτη σαν οδηγό και ελεγκτή της ορθότητας των αποτελεσμάτων τους. Πράγματι πολλοί από τους παραπάνω δείκτες χρησιμοποιήθηκαν από τους Chumakov *et al.* για τη δημιουργία μιας συλλογής συνεχόμενων κλώνων DNA σε τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα (Yeast Artificial Chromosomes, YACS) που περιλαμβάνει ολόκληρο το μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 21<sup>66</sup>.

Η δημιουργία του μειωτικού χάρτη που παρουσιάστηκε εδώ αποτελεί αποτέλεσμα συλλογικής εργασίας πολλών ερευνητών. Για μια πιο λεπτομερειακή ανάλυση παραπέμπουμε τον αναγνώστη στην πρωτότυπη σχετική δημοσίευση<sup>13</sup>.

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ : ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 21

### **A. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΕΩΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΑΡΙΘΜΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΤΡΙΣΩΜΙΑ 21 (ΣΥΝΔΡΟΜΟ DOWN)**

#### Σχετική δημοσίευση :

Antonarakis, S.E., Avramopoulos, D., Blouin, J.L., Talbot, C.C. and Schinzel, A.A. (1993). Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. **Nature Genetics** 3 146-150.

#### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ :**

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της εκτεταμένης ερευνητικής εργασίας επί της τρισωμίας 21 του καθηγητή Στυλιανού Αντωναράκη, ο οποίος επιβλέπει και την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Η τρισωμία 21 είναι η πιο συχνή βιώσιμη τρισωμία στον άνθρωπο. Στην κλινική εικόνα προεξάρχουν η πνευματική καθυστέρηση, το χαρακτηριστικό προσώπείο με τον επίκανθο, το χαμηλό ρινικό εφίπτιο και τη χαμηλή πρόσφυση των αυτιών, η μονήρης παλαμιαία γραμμή και η ογκώδης γλώσσα. Ακόμα οι ασθενείς εμφανίζουν συγγενείς καρδιοπάθειες και παθολογοανατομικά εναποθέσεις αμυλοειδούς στην εγκεφαλική ουσία.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η τρισωμία του χρωμοσώματος 21 παράγει την παραπάνω εικόνα δεν είναι γνωστός. Προηγούμενες μελέτες επί ασθενών με μερική τρισωμία έχουν δείξει ότι ο τριπλασιασμός μιας συγκεκριμένης περιοχής του χρωμοσώματος αρκεί για την εμφάνιση του συνδρόμου, και διάφορες εκδηλώσεις του συνδρόμου έχουν τοποθετηθεί σε διάφορα σημεία στο χρωμόσωμα<sup>67,68</sup>. Επίσης δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός που παράγει την τρισωμία. Έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι ο μέσος όρος ηλικίας των γυναικών που γεννούν παιδιά με τρισωμία 21 είναι μεγαλύτερος από το μέσο όρο ηλικίας για όλους τους τοκετούς, και αντίστροφα, ότι η πιθανότητα γεννήσεως παιδιού με τρισωμία 21 αυξάνεται με την ηλικία της μητέρας<sup>69</sup>, δεν έχει όμως επαρκώς στηριχθεί κανένας μηχανισμός υπεύθυνος για το παραπάνω φαινόμενο. Πολλοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι. Μια άποψη είναι ότι ευθύνεται η αυξημένη ηλικία του γεννητικού κυττάρου όταν αυτό εισέρχεται στην 2η μειωτική διαίρεση. Αυτό θα εξηγούσε τα λάθη στη 2η μειωτική διαίρεση όπου πράγματι με βάση τα δεδομένα μας, παρατηρείται μεγαλύτερη μέση ηλικία της μητέρας από αυτά της 1ης μειωτικής διαίρεσης. Μια άλλη άποψη είναι ότι σε μεγαλύτερη μητρική ηλικία γίνεται δυσκολότερα αποβολή του πάσχοντος εμβρύου. Εκτεταμένες μελέτες σε αυτόματες εκτρώσεις απαιτούνται για την στήριξη αυτής της θεωρίας η οποία δίνει μια καλή εξήγηση και για τα λάθη της 1ης μειωτικής διαιρέσεως<sup>70</sup>. Ακόμα τα λάθη της 1ης μειωτικής διαιρέσεως πιθανόν να συνδέονται με την αυξημένη ηλικία γιατί ίσως τα τρισωμικά ωκύτταρα μένουν τελευταία στη σειρά ωρίμανσης των ωοθυλακίων<sup>71</sup>. Γεγονός είναι ότι ο μηχανισμός δεν είναι ξεκαθαρισμένος και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μια και η κατανόηση του θα βοηθήσει ίσως και στην πρόληψη.

Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να παραχθεί τρισωμία 21 είναι οι εξής: 1. Ένας από τους γαμέτες περιέχει δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος δίνοντας γένεση σε τρισωμικό ζυγώτη. 2. Ο ζυγώτης είναι φυσιολογικός και η τρισωμία παράγεται σε κάποια από τις επόμενες διαιρέσεις. Στην πρώτη

περίπτωση το λάθος μπορεί να έγινε σε κάποια από τις δύο μειωτικές διαιρέσεις. Ακόμα πιθανόν να υπάρχει μωσαϊκό τρισωμίας στον γονέα το οποίο επεκτείνεται στα γενετικά κύτταρα, καθιστώντας τους μισούς γαμέτες που προέρχονται από τρισωμικά κύτταρα διπλοειδείς για αυτό το χρωμόσωμα. Στην δεύτερη περίπτωση το λάθος μπορεί να οφείλεται σε μη διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων σε κάποια από τις μιτωτικές διαιρέσεις και επικράτηση της τρισωμικής σειράς. Η παρούσα μελέτη έγινε σε περιπτώσεις όπου υπήρχαν τρία ελεύθερα αντίγραφα ολοκλήρου του χρωμοσώματος 21, γι' αυτό δεν μας απασχολούν εδώ μηχανισμοί όπου γίνεται μερικός διπλασιασμός ή υπάρχει μετάθεση του χρωμοσώματος, είτε παρατηρείται μωσαϊκό.

Οι πολυμορφισμοί βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών που διαθέτουμε σήμερα αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη του συνδρόμου DOWN. Τα πολλά αλλήλια και η υψηλή ετεροζυγωτία που παρουσιάζουν επιτρέπουν τη χρήση τους για την ανίχνευση της γονικής προελεύσεως του υπεραριθμού χρωμοσώματος του ασθενή, καθώς και την αναγνώριση του σταδίου της μειωτικής διαιρέσεως στο οποίο δεν έγινε διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων. Ακόμα περισσότερο οι παραπάνω πολυμορφισμοί επιτρέπουν ουσιαστικά την αναγνώριση της ταυτότητας κάθε χρωμοσώματος με βάση την αλληλουχία του DNA (το αλλήλιο) που αυτό περιέχει. Η παρούσα εργασία προσθέτει στα προηγούμενα αποτελέσματα<sup>72,73,74</sup> πληροφορίες σχετικά με το στάδιο της μειώσεως όπου δεν έγινε διαχωρισμός. Ακόμα στην παρούσα μελέτη, λόγω του μεγάλου αριθμού δεικτών που αναλύθηκαν για κάθε οικογένεια κατά μήκος του χρωμοσώματος, εντοπίστηκαν μερικές περιπτώσεις στις οποίες το λάθος δεν έγινε στην γονική μείωση αλλά σε μεταζυγωτική μιτωτική διαίρεση.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η σήμανση της πορείας των χρωμοσωμάτων από τους γονείς στον τρισωμικό απόγονο, με απώτερο στόχο τη συμβολή στην κατανόηση του μηχανισμού παραγωγής της τρισωμίας.

## **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ :**

DNA : Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση διατέθηκε από διάφορα ιδρύματα και πρόκειται για οικογένειες που κατά πλειοψηφία έχουν προηγούμενα περιγραφεί<sup>72,74</sup>. 61 νέες οικογένειες προστέθηκαν στη μελέτη από το ινστιτούτο ιατρικής γενετικής της Ζυρίχης. Συνολικά μελετήθηκαν 261 οικογένειες, που περιλάμβαναν τους 2 γονείς και τον απόγονο με την τρισωμία 21. Η μέση ηλικία της μητέρας στο σύνολο των οικογενειών ήταν  $32.1 \pm 6.1$  έτη και του πατέρα  $35.2 \pm 6.6$  έτη, που δεν διαφέρει από προηγούμενες συλλογές οικογενειών με τρισωμικό απόγονο. Οικογένειες με περισσότερους του ενός απογόνους με τρισωμία 21 δεν περιλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Εξήγηση των αντιδράσεων : Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι πολυμορφισμοί βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών έχουν περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Η μέθοδος Southern Blotting είναι μια παλιότερη αλλά πολύ χρήσιμη τεχνική στη μοριακή γενετική<sup>75</sup>. Ο όρος Blotting αναφέρεται στη μεταφορά DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης είτε nylon, αλλά έχει επικρατήσει η αναφορά του για όλη την



περιγραφόμενη διαδικασία. Μετά από τεμαχισμό του DNA με κάποιο ένζυμο περιορισμού και ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτώματος αγαρόζης το μετουσιώνουμε και το μεταφέρουμε στο φίλτρο. Στη συνέχεια το φίλτρο βυθίζεται σε διάλυμα που περιέχει κάποιο ραδιοσημασμένο μετουσιωμένο τεμάχιο DNA το οποίο θα βρει μια συμπληρωματική αλληλουχία σε κάποιο σημείο του φίλτρου (υβριδισμός), του οποίου η θέση είναι ανάλογη με το μέγεθος του τεμαχίου που το περιέχει. Αυτοραδιογραφία του φίλτρου θα μας δείξει τη θέση αυτού του τεμαχίου και πιθανούς πολυμορφισμούς στο μέγεθός του.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR): Για την μελέτη των πολυμορφισμών βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών χρησιμοποιήσαμε εκκινητές που διαθέταμε στο εργαστήριό μας από προηγούμενες μελέτες, καθώς και άλλους για τους οποίους την αλληλουχία πήραμε από σχετικές δημοσιεύσεις. Η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων έγινε στο εργαστήριο Genetics Core Facility, στο Johns Hopkins University σε συσκευή ABI 392 oligonucleotide Synthesizer.

Η ραδιοσήμανση των εκκινητών έγινε σε αντίδραση που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις:

- 50 mM Tris pH 9.00, 10 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml BSA
- Εκκινητή 4µM
- T<sub>4</sub> κινάση 100 μονάδες/ml
- γ-<sup>32</sup>P dATP 1.5 µCi/µl

Το μίγμα επωάστηκε στους 37°C για 1 ώρα.

Το μίγμα της αντίδρασης PCR περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις:

- Tris HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50mM, gelatin 100µg/ml
- Δεοξυνουκλεοτίδια ( A,C,G,T ) 200 µM έκαστο.
- Εκκινητές 400 nM έκαστος.
- Εκκινητή σεσημασμένο με γ-<sup>32</sup>P (T<sub>4</sub> κινάση) 160 nM
- Taq DNA πολυμεράση 120 μονάδες ανά ml.
- DNA πρότυπο, 500 ng σε αντίδραση 25 µl

Η αντίδραση έγινε σε 30 κύκλους μετουσίωσης στους 94°C για 1 min, επανασυνδυασμού στους 50°C για 1 min και αντιγραφής στους 72°C για 1 min.

1µl από το προϊόν αναμίχθηκε με 3µl stop solution (95% Formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% Xylene Cyanol), θερμάνθηκε στους 94°C για 2 min, εψύχθει σε πάγο για 2 min και φορτώθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% με 50% ουρία. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε 60 Watts για 2 - 3 ώρες σε 1X TBE, το πήκτωμα ξηράνθηκε και υπεβλήθη σε αυτοραδιογραφία.

Για τον δείκτη COL6A1 που αποτελεί τον πλησιέστερο στο τελομερίδιο, ο καλύτερος διαθέσιμος πολυμορφισμός είναι ένας πολυμορφισμός αριθμού παρακειμένων επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) και ανιχνεύεται με Southern Blotting. Για την ανίχνευση των γονότυπων για τον πολυμορφισμό αυτό χρησιμοποιήσαμε 7-10µg DNA τα οποία υποβάλαμε στη δράση 30 μονάδων ενζύμου περιορισμού Taq I στους 65°C μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 100mM, 2Mercaptoethanol 1mM, (pH=8.0 στους 37°C). Στη συνέχεια κάναμε ηλεκτροφόρηση του τεμαχισμένου DNA μέσω πηκτώματος αγαρόζης 1% υπό 57 Watts για 48 ώρες. Το πήκτωμα κατόπιν βυθίστηκε σε διάλυμα 1.5 M NaCl 0.5 M NaOH υπό ανάδευση για 1 ώρα με αλλαγή του διαλύματος ανά

15λεπτο και μετά κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα 1 M Tris - HCl (pH 8.00) 1.5 M NaCl σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την μετουσίωση του DNA και την ουδετεροποίηση του πηκτώματος και στη συνέχεια έγινε μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη μετά από σύντομο ξέπλυμα σε 6 x SSC ( 20x = NaCl 3M, NaCitrate 0.3M, pH 7.0) αφέθηκε να στεγνώσει και ψήθηκε στους 80°C σε κενό αέρος για 2 ώρες. Κατόπιν βυθίστηκε σε διάλυμα που περιείχε 6x SSC, 0.5% Lauryl Sulfate, 5x Denhards Solution (100X = Ficoll 2%, polyvinyl pyrrolidone 2%, Bovine Serum Albumin 2%), 100 µg/ml μετουσιωμένο Salmon Sperm DNA για 24 ώρες στους 60°C για τον κορεσμό της μεμβράνης σε DNA (προϋβριδισμός) και στη συνέχεια σε διάλυμα με την ίδια σύνθεση και την προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 0.01M και μετουσιωμένου και σεσημασμένου DNA προερχομένου από τον κλώνο ml18 για 40 ώρες στους 60°C . Ο διερευνητής (probe) ήταν σεσημασμένος με τη χρήση τυχαίων εκκινητών και DNA πολυμεράσης (Klenows fragment. BRL Random primers labeling kit. Cat# 8187SA). Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλύθηκε σε 2x SSC, 0.5% SDS στους 25°C για 5 λεπτά, σε 2x SSC, 0.1% SDS στους 25°C για 15 λεπτά και κατόπιν σε 0.1x SSC, 0,1% SDS για 2 ώρες στους 65°C για την απομάκρυνση του ραδιενεργού διερευνητή που δεν ήταν ειδικά υβριδισμένος. Κατόπιν υπεβλήθη σε αυτοραδιογραφία.

#### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :**

Οι εικόνες 10 έως 13 επεξηγούν τον τρόπο με τον οποίο συνάγαμε τα αποτελέσματα μας από τα γονοτυπικά δεδομένα. Ο απόγονος με την τρισωμία 21 εμφανίζει τρία αλληλία (τρεις ζώνες) στην αυτοραδιογραφία του πηκτώματος. Όταν τα δύο από τα τρία έχουν το ίδιο μέγεθος μπορούμε να δούμε την διαφορά στην ένταση της διπλής ζώνης. Όταν οι δύο γονείς έχουν διαφορετικά αλληλία μπορούμε να αναγνωρίσουμε ποιος έχει μεταβιβάσει τα δύο και ποιος ένα χρωμόσωμα. Ακόμα όταν ο γονέας που μεταβίβασε τα δύο χρωμοσώματα είναι ετεροζυγώτης μπορούμε να δούμε αν μεταβίβασε και τα δύο του χρωμοσώματα (λάθος στην πρώτη μειωτική διαίρεση) η μόνο το ένα διπλασιασμένο (λάθος στη δεύτερη μειωτική διαίρεση η μιτωτικό λάθος) (βλέπε εικόνα 14 για παραδείγματα). Η ανάλυση των δεικτών κοντά στο κεντρομερίδιο μας δίνει την μειωτική προέλευση της τρισωμίας, ενώ η ανάλυση δεικτών στο μήκος του μακρού σκέλους αποκαλύπτει την ύπαρξη χιάσματος. Θεωρήσαμε τους δείκτες D21S215, D21S236, D21S258, D21S120, D21S13, D21S172, D21S192 ως ενδεικτικούς της γονικής προελεύσεως διότι χαρτογράφηση με ηλεκτροφόρηση μέσω παλλομένου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) έχει δείξει ότι βρίσκονται εντός 5Mb από το κεντρομερίδιο<sup>76</sup>, ενώ ανάλυση μειωτικής συνδέσεως με τον κεντρομεριδιακό δείκτη D21Z1 δεν αναγνώρισε χίασμα σε 16 μειώσεις με τον δείκτη D21S215 και μόνο ένα χίασμα με τον δείκτη D21S13<sup>77</sup>. Όταν δεν βρίσκουμε χίασμα στο μήκος του χρωμοσώματος σε τρισωμίες που προηγούμενα ταξινομούνταν σε λάθος της 2ης μειωτικής διαιρέσεως, θεωρούμε ότι το λάθος είναι μιτωτικό, γιατί με βάση τα δεδομένα από το μειωτικό χάρτη το χρωμόσωμα 21 εμφανίζει πάντοτε ένα τουλάχιστον χίασμα. Η κύρια προσθήκη της παρούσας εργασίας στα προϋπάρχοντα αποτελέσματα<sup>72,73,74</sup> είναι η ανάλυση πολλών δεικτών κατά μήκος του χρωμοσώματος για την ανίχνευση χιασμάτων και έτσι η ανακάλυψη περιπτώσεων που οφείλονταν σε μιτωτικό λάθος και είχαν προηγούμενα

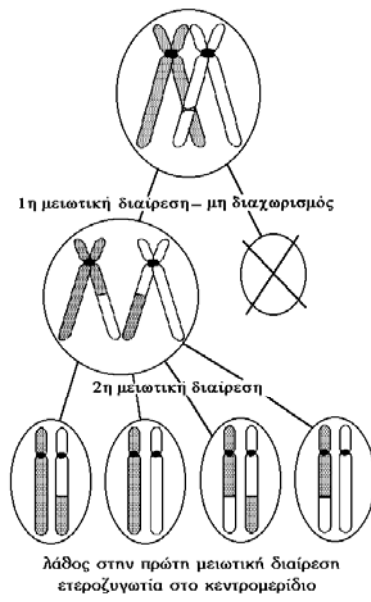
εσφαλμένα περιληφθεί στα λάθη της 2ης μειωτικής διαιρέσεως.

Συνολικά μελετήθηκαν 261 οικογένειες με ελεύθερη τρισωμία 21 για τις οποίες ανιχνεύθηκαν οι γονότυποι για σημαντικό αριθμό δεικτών κατά μήκος του χρωμοσώματος. Το υπεράριθμο χρωμόσωμα ήταν μητρικής προελεύσεως σε 246 περιπτώσεις (94.25%) και πατρικής σε 15 (5.75%) όπως έχει περιγραφεί<sup>72,73</sup>. Σε 238 από τις παραπάνω οικογένειες έγινε ανάλυση πολλών δεικτών κατά μήκος του χρωμοσώματος για την ανίχνευση χιασμάτων στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος από το δείκτη D21S215 στο κεντρομερίδιο μέχρι το δείκτη COL6A1 στο τελομερίδιο. Όλοι οι παραπάνω δείκτες είχαν προηγουμένα χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα. Αναλύθηκαν τουλάχιστον 11 δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος (συνολικό μήκος περίπου 70cM) και η μέση απόσταση μεταξύ παρακειμένων δεικτών ήταν λιγότερο από 10 centiMorgans.

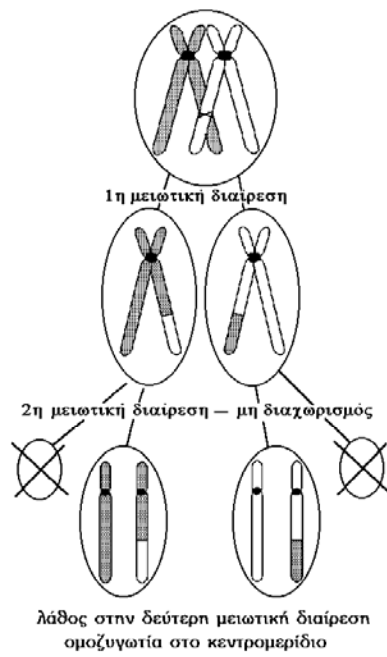
Ο πίνακας 4 συνοψίζει τα αποτελέσματα επί 238 οικογενειών. Ο πίνακας 5 αναφέρει τα αποτελέσματά μας στο επίπεδο της γονοτύπησης των οικογενειών με μιτωτικά λάθη για τους διάφορους δείκτες. Σε 11 από τις 238 περιπτώσεις το λάθος εντοπίστηκε σε μιτωτική διαίρεση (4.62%). Η μέση ηλικία της μητέρας κατά τον τοκετό στις περιπτώσεις αυτές ήταν  $28.5 \pm 4.6$  έτη που δεν διαφέρει από τη μέση ηλικία τοκετού στο γενικό πληθυσμό ενώ διαφέρει σημαντικά από την μέση ηλικία στις περιπτώσεις μειωτικού μητρικού λάθους.

Η ανίχνευση των μιτωτικών λαθών αφαίρεσε ένα ποσοστό από τα λάθη σε πατρική μείωση που τώρα περιορίζονται σε 4.2%. Η μελέτη των χιασμάτων έδωσε στις περιπτώσεις λάθους 1ης μειωτικής διαιρέσεως χίασμα σε 62 από τις 174 περιπτώσεις που είναι λιγότερο από το αναμενόμενο, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και παλαιότερα<sup>73</sup>. Τα περισσότερα από τα μητρικά λάθη συνέβησαν στην 1η μειωτική διαίρεση, ενώ τα περισσότερα πατρικά στην 2η μειωτική διαίρεση. Η μέση ηλικία της μητέρας στα λάθη 2ης μειωτικής διαιρέσεως ήταν  $34.1 \pm 5.7$  έτη, μεγαλύτερη από αυτή στα λάθη 1ης μειωτικής διαιρέσεως σε οριακά στατιστικά σημαντικό επίπεδο (t-test :  $p=0.055$ ).

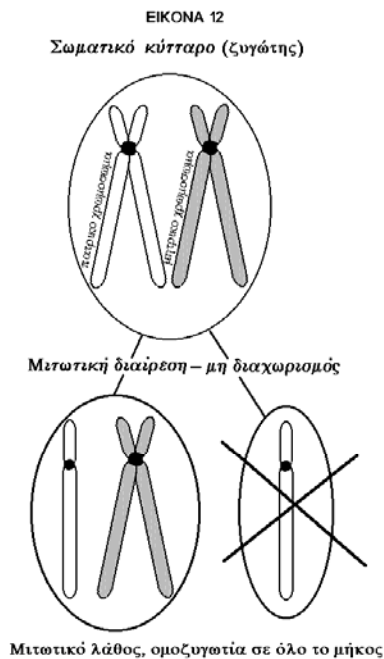
ΕΙΚΟΝΑ 10



ΕΙΚΟΝΑ 11

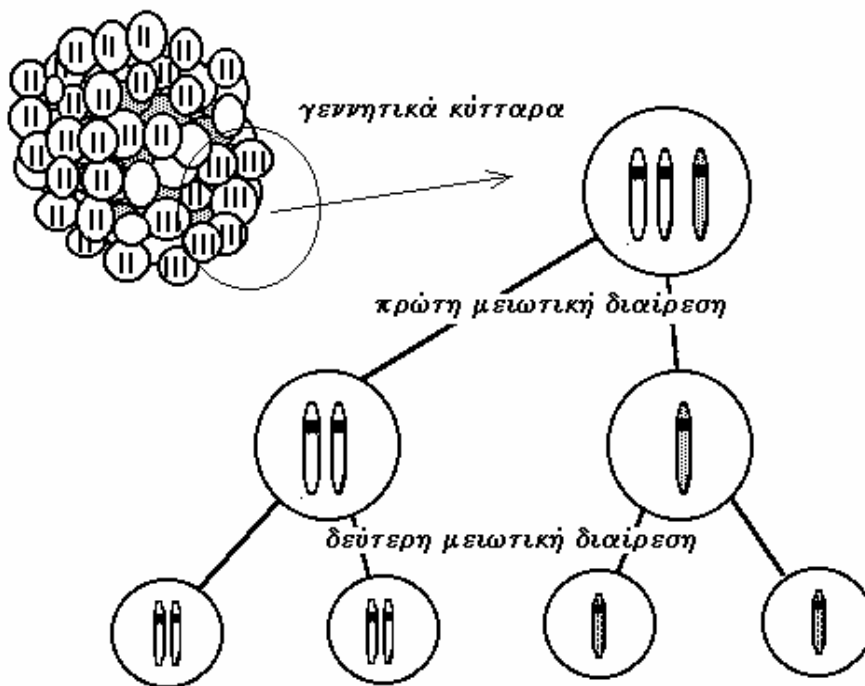


ΕΙΚΟΝΑ



13

μωσαϊκό στα κύτταρα του γονέα



**Εικόνες 10, 11, 12, 13**

Βλέπουμε εδώ διάφορους μηχανισμούς παραγωγής τρισωμίας 21.

**Εικόνα 10.** Λάθος στην 1η μειωτική διαίρεση ενός γονέα. Φαίνεται η πορεία του χρωμοσώματος κατά την μείωση. Επειδή στην 1η διαίρεση πάντοτε γίνεται χιάσμα κάθε μετέπειτα συνδυασμός χρωματίδων θα δώσει ετεροζυγωτία στο κεντρομερίδιο για τα χρωμοσώματα που μεταβιβάζονται και δίνουν μαζί με το χρωμόσωμα του άλλου γονέα τρισωμικό ζυγώτη.

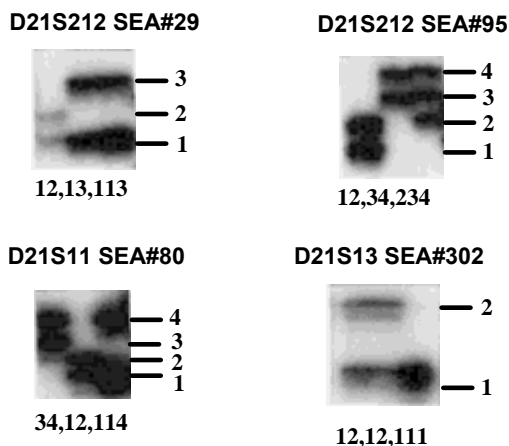
**Εικόνα 11.** Λάθος στην 2η μειωτική διαίρεση ενός γονέα. Επειδή τα δύο χρωμοσώματα του γαμέτη ουσιαστικά αποτελούν δύο αδελφές χρωματίδες υπάρχει ομοζυγωτία στο κεντρομερίδιο.

**Εικόνα 12.** Μιτωτικό λάθος α' περίπτωση. Εδώ δεν βλέπουμε μία μείωση αλλά μια μίτωση του ζυγώτη. Τα χιάσματα σε μιτώσεις είναι σπανιότατα γι' αυτό τα δύο από τα τρία χρωμοσώματα είναι πανομοιότυπα. Η μονοσωμική σειρά που προκύπτει πιθανώς εξαφανίζεται.

**Εικόνα 13.** Μιτωτικό λάθος β' περίπτωση. Προηγούμενο μιτωτικό λάθος στο γονέα έχει δημιουργήσει μωσαϊκό που επεκτείνεται στα γεννητικά κύτταρα. Μείωση ενός τρισωμικού κυττάρου οδηγεί σε τρισωμικούς γαμέτες. Στην περίπτωση που τα δύο όμοια χρωμοσώματα καταλήξουν μαζί (1 στις τρεις περιπτώσεις) και με την προϋπόθεση ότι δεν συμβαίνει χιάσμα, ο γαμέτης θα περιέχει δύο πανομοιότυπα χρωμοσώματα. Οι παραπάνω προϋποθέσεις καθιστούν την πιθανότητα τέτοιου τύπου λαθών μικρή.

## ΕΙΚΟΝΑ 14

Πως φαίνονται οι γονότυποι στην αυτοραδιογραφία - εκτίμηση των αποτελεσμάτων.



Φαίνονται εδώ μερικά παραδείγματα από την γονοτύπηση των οικογενειών με απόγονο με σύνδρομο DOWN. Η σειρά είναι σε όλες τις περιπτώσεις : πατέρας, μητέρα, τρισωμικός απόγονος.

Επεξήγηση :

Στο πρώτο φιλμ έχουμε μια οικογένεια με γονότυπους : 12,13,113. Εφόσον ο πατέρας έχει αλληλία 1 και 2 έχει μεταβιβάσει στον απόγονο το αλληλίο 1. Εφόσον η μητέρα έχει αλληλία 1 και 3 έχει μεταβιβάσει στον απόγονο το αλληλίο 3. Το τρίτο χρωμόσωμα στην συγκεκριμένη περίπτωση ξέρουμε ότι προέρχεται από τη μητέρα από ανάλυση άλλων δεικτών άρα η μητέρα έχει μεταβιβάσει και τα δύο της αλληλία (1 και 3) για αυτό το δείκτη (M1 χωρίς χιάσμα ή M2 με χιάσμα μεταξύ D21S212 και κεντρομεριδίου). Σημειώνουμε, ότι στην περίπτωση που το λάθος ήταν πατρικό θα είχε μεταβιβαστεί μόνο ένα αλληλίο δύο φορές, το αλληλίο 1 (Π2 χωρίς χιάσμα ή Π1 με χιάσμα μεταξύ του D21S212 και του κεντρομεριδίου).

Στο δεύτερο φιλμ οι γονείς έχουν τέσσερα διαφορετικά αλληλία γεγονός που κάνει τις πληροφορίες πολύ πιο σαφείς. Ο απόγονος πήρε δύο αλληλία από τη μητέρα και ένα από τον πατέρα (M1 ή M2 με χιάσμα).

Στο τρίτο φιλμ έχουμε εξίσου καλές πληροφορίες αλλά τώρα η μητέρα μεταβίβασε μόνο ένα αλληλίο διπλασιασμένο.

Στο τέταρτο φιλμ δεν έχουμε πληροφορίες για την γονική προέλευση του χρωμοσώματος, βλέπουμε όμως ότι έχει μεταβιβαστεί το ίδιο αλληλίο 1 δύο φορές από κάποιο γονέα (εφόσον ο απόγονος έχει γονότυπο 111) άρα πρόκειται για λάθος στη δεύτερη μειωτική διαίρεση ή χιάσμα του D21S13 με το κεντρομερίδιο.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 4

ΛΑΘΟΣ μητέρας	περιπτώσεις	ποσοστό %	μέση ηλικία
<b>M1</b>	<b>174</b>	<b>73.11</b>	<b>32.1</b>
χίασμα (-)	112	47.06	
χίασμα (+)	62	26.05	
<b>M2</b>	<b>43</b>	<b>18.07</b>	<b>34.1</b>
<b>Π1</b>	<b>4</b>	<b>1.68</b>	<b>26.3</b>
χίασμα (-)	3	1.26	
χίασμα (+)	1	0.42	
<b>Π2</b>	<b>6</b>	<b>2.52</b>	<b>27.5</b>
<b>ΜΙΤΩΣΗ</b>	<b>11</b>	<b>4.62</b>	<b>28.5</b>
διπλ. Πατρικού χρ.	6		
διπλ. Μητρικού χρ.	5		

**M1**=μητρική μείωση I, **M2**=μητρική μείωση 2, **Π1**=πατρική μείωση I, **Π2**=πατρική μείωση II.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 5

	SEA008	SEA037	SEA047	SEA071	SEA080	SEA117	SEA169	SEA172	SEA218	SEA241	SEA289
	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS	Πατ-Μητ-DS
D21S215	12-12-122	24-13-334 R μ	12-23-133 R μ	22-12-122	22-12-222 R	12-34-114 R π	13-24-114 R π	12-22-222 R	12-34-233 R μ	12-12-122	12-12-222 R
D21S236	23-12-233 R π	11-11-111								11-11-111	
D21S258		24-13-334 R μ				13-12-112R	22-13-122 π	12-12-112	13-12-223 R μ	23-11-112 μ	11-23-113 π
D21S120	23-12-233 R π		23-12-112 R μ	13-12-111 R	13-22-122 μ	12-23-112 R π	22-11-122 π	12-12-122	13-24-344 R μ	12-11-111	12-23-113 R π
D21S13	11-11-111	22-12-222 R	11-12-111 R	22-12-112 R μ	12-12-222 R	12-11-122 R π	12-22-112 R π	12-22-112 R π			
D21S172					13-12-223 R μ					11-23-122 R μ	23-14-334 R π
D21S192										12-23-122 R	11-11-111
D21S110	12-12-122		11-12-122 R μ	11-11-111	11-12-122 R μ	11-12-112	11-11-111	22-22-222			
D21S1S11	12-13-223 R π	12-33-233 μ	12-12-122	12-11-112	12-11-112	11-12-112	11-12-112				
D21S11 πορ	13-22-233 R π	14-23-334 R μ	(17)-23-133 R	11-11-111	34-12-114 R μ	34-12-233 R π	12-33-223 R π	34-12-133 R π	13-12-111 R	12-34-144 R μ	23-14-122 R π
D21S8		11-12-111 R	11-12-122 R μ	11-22-122 μ	11-11-111						
D21S210	13-23-113 R π	23-12-223 R	13-23-333 R	14-23-133 R μ	24-13-334 R μ	12-23-222 R	12-34-113 R π	12-23-223 R	22-11-112 μ	22-12-112 R μ	14-23-344 R π
APP		12-11-111	11-12-111 R	12-11-111	12-12-122						
D21S111	11-12-112	22-11-112 μ	22-22-222	11-12-111 R	12-12-122						
D21S82		22-12-222 R	12-12-112	12-22-222	22-22-222	23-12-122 R	22-33-223 π				
IFNAR		22-12-112 R μ	(27)-11-112	23-12-113 R μ	23-14-122 R π	11-12-111	13-23-333 R	11-11-111	34-12-113 R μ	23-13-133 R	
GART	12-23-112 R π	12-12-111 R	12-12-111 R	22-11-112 μ	12-23-133 R μ	23-13-333 R	(37)-12-133 π		13-12-113 R		23-12-222 R
D21S85					13-24-344 R μ						
D21S3	11-12-111	11-12-122 R μ	22-12-112 R μ	11-12-111 R	12-12-112						
D21S23	11-12-111					12-12-122					
D21S156	12-13-111 R						12-33-113 R π	24-13-144 R π	12-34-133 R μ		
D21S167	24-13-233 R π		12-11-112	12-13-133 R μ			23-14-224 R π	12-13-111 R			24-13-144 R π
HMG14	12-23-113 R π	24-13-233 R μ	23-11-113 μ		12-23-222 R	23-14-133 R π	12-13-113 R	33-12-133 π	33-13-333 R	13-12-122 R μ	
MK1	12-22-112 R π			22-22-222	11-22-122 μ	11-12-111	12-22-222 R	22-12-122			
D21S212	23-13-122 R π		33-12-223 R μ	11-23-133 R μ	12-23-144 R μ	13-12-112 R	23-13-333 R	24-13-122 R π	23-14-113 R μ	12-13-111 R	14-23-244 R π
D21S113							12-12-122	22-22-222			
PFKL	11-22-112 π	11-11-111	11-12-122 R μ	11-12-122 R μ	22-12-112 R μ	12-11-122 R π		24-13-144 R π	12-33-133 μ	13-23-122 R μ	11-11-111
D21S112	12-33-113 R π	12-34-244 R μ	12-33-233 μ	12-33-233 μ	12-33-233 μ	11-23-113 π	34-11-144 R π	34-12-144 R π			
D21S171	11-11-111	12-34-144 R μ						23-14-224 R π		34-12-224 R μ	11-11-111
COL6A1	12-11-111	12-22-222	12-23-113 R μ	11-23-133 R μ	12-34-144 R μ	12-13-122 R π	23-11-122 R π	22-13-122 π	34-12-224 R μ	13-22-122 μ	



## Πίνακας 5

Αποτελέσματα γονοτύπησης για τις τρισωμίες 21 που φαίνονται πως είναι μιτωτικής προέλευσης. Στην πρώτη σειρά φαίνονται οι κωδικοί αριθμοί των οικογενειών. Στην πρώτη στήλη φαίνονται οι πολυμορφικοί δείκτες τοποθετημένοι όπως βρίσκονται πάνω στο χρωμόσωμα, από το κεντρομερίδιο προς το τελομερίδιο. Οι γονότυποι αντιστοιχούν κατά σειρά στο πατρικό το μητρικό και το DNA του τρισωμικού παιδιού. R= reduction to homozygosity = ομοζυγωτία για τα δύο χρωμοσώματα που μεταβιβάστηκαν από γονέα ετεροζυγώτη. μ= τρισωμία με δύο μητρικά και π= τρισωμία με δύο πατρικά χρωμοσώματα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βασικότερη προσφορά της παρούσας εργασίας είναι ο εντοπισμός ενός ποσοστού (4.6%) τρισωμιών 21 που δεν οφείλονται σε λάθος σε κάποια από τις μειωτικές διαιρέσεις των γονέων αλλά σε λάθος σε μιτωτική διαίρεση. Το λάθος αυτό μπορεί να έγινε σε μιτωτική διαίρεση στο ζυγώτη, είτε σε κάποιο κύτταρο του γονέα που δημιούργησε μωσαϊκό επεκτεινόμενο στα γεννητικά του κύτταρα και μέσω αυτών στη συνέχεια το διπλασιασμένο χρωμόσωμα μεταβιβάστηκε στον τρισωμικό απόγονο (η δεύτερη περίπτωση όμως προϋποθέτει συγκεκριμένους συνδυασμούς και απουσία χιάσματος στη μείωση). Όποιος όμως και αν είναι ο μηχανισμός, τα λάθη στις μιτωτικές διαιρέσεις φαίνεται πως ευθύνονται για μερικές τρισωμίες, και δείχνουν να είναι ανεξάρτητα από το φύλο και την ηλικία του γονέα που μεταβιβάζει το υπεράριθμο χρωμόσωμα.

Τα μιτωτικά λάθη, ιδιαίτερα εάν οφείλονται σε λάθος μίτωσης του ζυγώτη δεν θα πρέπει να καταταχθούν στα μητρικά ή πατρικά κατά την γενική ταξινόμηση των τρισωμιών γιατί αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία. Το γεγονός ότι στο δείγμα των μιτωτικών λαθών τα δύο φύλα είναι μοιρασμένα και οι μητρικές ηλικίες σε χαμηλά επίπεδα, αποτελεί επιπρόσθετη ένδειξη ότι πρέπει να τα αφαιρέσουμε από τις ομάδες που δημιουργούμε ανάλογα με την γονική προέλευση του υπεράριθμου χρωμοσώματος. Έτσι, η ανίχνευση των λαθών σε μιτωτικές διαιρέσεις μας οδήγησε σε επαναπροσδιορισμό των ποσοστών πατρικών και μητρικών λαθών, μια και τα λάθη που τώρα δείχθηκε ότι είναι μιτωτικά είχαν προηγούμενα καταταχθεί ως λάθη της 2ης μειωτικής διαιρέσεως κάποιου γονέα. Από τα λάθη σε πατρικές μειώσεις αφαιρέθηκε ένα σημαντικό ποσοστό που δείχθηκε ότι οφειλόταν σε μιτωτικά λάθη αφήνοντας τον πατέρα υπεύθυνο για 4.2% των περιπτώσεων. Ακόμα επειδή μερικές μητέρες νεαρής ηλικίας αφαιρέθηκαν με τον ίδιο τρόπο από την κατηγορία των λαθών της 2ης μειωτικής διαίρεσης, μια διαφορά μητρικής ηλικίας μεταξύ λαθών 1ης και 2ης μειωτικής διαιρέσεως αναδύθηκε που δείχνει ότι τα λάθη στη δεύτερη περίπτωση γίνονται σε μεγαλύτερη κατά μέσο όρο ηλικία ( $34.1 \pm 5.7$  έτη). Η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ της ηλικίας αυτής και της μέσης ηλικίας για τα λάθη της 1ης μειωτικής διαίρεσης ( $32.1 \pm 6.2$  έτη) βρίσκεται στο επίπεδο του 5.5% (τιμή του  $p$  στο  $t$ -test = 0.055) που οριακά δεν κατοχυρώνει την βεβαιότητα της υποθέσεως, ίσως γιατί το δείγμα μιτωτικών λαθών που διαθέτουμε προς ανάλυση είναι μικρό.

Υπάρχουν ορισμένα σημεία στον τρόπο με τον οποίο εκτιμούμε τα αποτελέσματα μας που είναι ευαίσθητα σε κριτική και θα πρέπει να συζητηθούν.

Το πρώτο αφορά τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των χρωμοσωμάτων και θεωρήθηκαν κεντρομεριδιακοί. Ο δείκτης D21S215 ο οποίος έδωσε πληροφορίες στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρουσιάζει κανένα χιάσμα με τον δείκτη D21Z1 (κεντρομεριδιακή αλφοειδής αλληλουχία) σε 16 μειώσεις, γεγονός που μας δίνει ένα καλό βαθμό βεβαιότητας ότι αντιπροσωπεύει το κεντρομερίδιο. Ακόμα η φυσική χαρτογράφηση και των υπολοίπων επιλεγμένων γι' αυτό δεικτών εντός 5 μεγαβάσεων από το κεντρομερίδιο μας επιτρέπει να νιώθουμε σχετική ασφάλεια ότι και στις περιπτώσεις όπου ο D21S215 δεν έδωσε πληροφορίες οι υπόλοιποι δείκτες μας έδειξαν την ορθή ταυτότητα του χρωμοσώματος. Πλέον του ενός κεντρομεριδιακοί δείκτες αναλύθηκαν για

κάθε περίπτωση για πληρέστερη επιβεβαίωση αυτού.

Ένα δεύτερο σημείο αποτελεί η θεώρηση μας ότι στις μιτώσεις είναι αμελητέα τα χιάσματα. Αυτό πηγάζει από μελέτη που έχει γίνει σε ζυμομύκητες και κύτταρα ποντικού σε καλλιέργεια που δείχνει ότι τα χιάσματα σε μιτώσεις είναι  $10^3$  φορές πιο σπάνια από αυτά σε μειωτικές διαιρέσεις<sup>78,79</sup>. Αν το ίδιο μοντέλο ισχύει και στον άνθρωπο τότε το πιθανό λάθος εξαιτίας μιτωτικών χιασμάτων είναι πράγματι αμελητέο.

Άλλο ένα σημείο άξιο προσοχής είναι η πιθανότητα δύο χιασμάτων στο ίδιο χρωμόσωμα, τα οποία αν συμβούν μεταξύ δύο παρακειμένων μελετώμενων δεικτών "αλληλοαναιρούνται" και δεν ανιχνεύεται κανένα χιάσμα. Προκειμένου να αποφύγουμε τέτοια λάθη αναλύσαμε αρκετούς δείκτες μέσα στα 70cM του χρωμοσώματος 21 ώστε η μέση απόσταση μεταξύ των δεικτών να είναι αρκετά μικρή (<10cM) και να καθιστά τέτοιου τύπου λάθος πολύ σπάνιο ιδίως αν λάβουμε υπόψιν το φαινόμενο της παρεμβάσεως (interference).

Τέλος πήραμε ως δεδομένη την ύπαρξη χιάσματος στην πρώτη μειωτική διαίρεση. Η μελέτη του μειωτικού χάρτη του χρωμοσώματος 21 μας επιτρέπει μια τέτοια παραδοχή<sup>13,64</sup>. Ακόμα, αν η παραδοχή μας ήταν λάθος και τα λάθη που ανιχνεύσαμε ήταν στην 2η μειωτική διαίρεση χωρίς χιάσμα, τότε θα περίμενε κανείς τα υπεράριθμα χρωμοσώματα να είναι μητρικής προέλευσης και η μέση ηλικία της μητέρας να είναι μεγάλη σύμφωνα με τα αποτελέσματα των άλλων κατηγοριών, πράγμα που δεν συμβαίνει.

Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ένα ποσοστό 4-5% των τρισωμιών 21 οφείλεται σε μιτωτικά λάθη, τα οποία δεν δείχνουν να σχετίζονται με την ηλικία της μητέρας και το υπεράριθμο χρωμόσωμα προέρχεται με ίδια συχνότητα από τον πατέρα ή τη μητέρα. Κατόπιν αυτού τα λάθη της μητρικής μειώσεως II δείχνουν να έχουν τη μεγαλύτερη μέση μητρική ηλικία, ενώ τα λάθη από πατρικές μειώσεις περιορίζονται σε 4.2%.

## B. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΜΩΣΑΪΚΟΥ ΤΡΙΣΩΜΙΑΣ 21.

### Σχετική δημοσίευση :

Pangalos, C., Avramopoulos, D. (*published note : the first two authors contributed equally to this project, Am. J. Hum. Genet. 55:217-errata*), Blouin, J.L., Raoul, O., deBlois, M.C., Prieur, M., Schinzel, A.A., Gika, M., Abazis, D., Antonarakis, S.E. (1994). Understanding the mechanism(s) of mosaic for trisomy 21 using DNA polymorphism analysis. **Am. J. Hum. Genet. 54:473-481.**

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τις περιπτώσεις κλινικά διαγνωσμένου συνδρόμου DOWN ένα ποσοστό 2-4% αποδίδεται κυτταρογενετικά σε μωσαϊκό τρισωμίας 21, σε παρουσία δηλαδή μιας σειράς τρισωμικών κυττάρων ταυτόχρονα με μια σειρά δισωμικών (ευπλοειδικών) κυττάρων<sup>80</sup>. Παρουσία ποσοστού τρισωμικών κυττάρων μέχρι και μόνον 6% αρκεί για την εκδήλωση του συνδρόμου. Η παρουσία σε αυτούς τους ασθενείς δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών υποδηλώνει κάποια ανωμαλία σε κάποια από τις μιτώσεις που οδήγησαν από τον ζυγώτη στον πολυκύτταρο οργανισμό, δεν είναι γνωστό όμως αν η ανωμαλία στη μίτωση είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία της τρισωμικής ή της δισωμικής σειράς.

Είναι γνωστό πως η ηλικία της μητέρας είναι κατά μέσο όρο αυξημένη στους ασθενείς με πλήρη τρισωμία 21. Στην περίπτωση των μωσαϊκών, αν αυτά οφείλονταν σε μιτωτική απώλεια ενός από τα τρία χρωμοσώματα ενός τρισωμικού ζυγώτη θα περιμέναμε εξίσου αυξημένη μητρική ηλικία. Αντίθετα, αν οφείλονταν σε μη διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων σε κάποια μίτωση ενός φυσιολογικού ζυγώτη, δεν θα περιμέναμε απόκλιση της μητρικής ηλικίας από το μέσο όρο του γενικού πληθυσμού. Με βάση τα παραπάνω και βρίσκοντας τη μέση μητρική ηλικία στη μωσαϊκή τρισωμία αυξημένη αλλά ελαφρά μικρότερη από αυτή στην πλήρη τρισωμία ο Richards το 1968 και 1974<sup>81,82</sup> πρότεινε ότι το μωσαϊκό οφείλεται και στους δύο παραπάνω μηχανισμούς. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται λίγες περιπτώσεις πειραματικής μελέτης που να αναζητά το μηχανισμό, και χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές χρωμοσωματικοί ετερομορφισμοί. Σε σύνολο 5 περιπτώσεων αποκαλύφθηκε ότι το λάθος που οδήγησε στην τρισωμική σειρά ήταν στην 1η μειωτική διαίρεση σε 3, ενώ οι υπόλοιπες 2 φαίνεται πως προέρχονταν από λάθος σε μιτωτική διαίρεση. Μια μελέτη περιγράφει την ανάλυση 343 οικογενειών με σύνδρομο DOWN όπου περιλαμβάνονται 24 περιπτώσεις μωσαϊκού τρισωμίας 21 και χρησιμοποιούνται χρωμοσωματικοί ετερομορφισμοί καθώς και πολυμορφισμοί DNA<sup>83</sup>. Δυστυχώς η μελέτη δεν δίνει αναλυτικά αποτελέσματα ξεχωριστά για τα μωσαϊκά.

Προηγούμενη πειραματική εμπειρία με πολυμορφισμούς ανιχνεύσιμους με την αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης σε μια περίπτωση μωσαϊκού<sup>84</sup> μας έδειξε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλίων που προέρχονται από την ελάχιστο κυτταρική σειρά και άρα βρίσκονται σε σχετικά μικρό αριθμό αντιγράφων στο DNA. Έτσι αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε πολυμορφισμούς SSR επί του χρωμοσώματος 21 σε περιπτώσεις τρισωμίας σε μωσαϊκό για να μελετήσουμε το μηχανισμό γένεσης αυτής με περισσότερη βεβαιότητα από ότι έχει γίνει στο παρελθόν. Σύμφωνα με την προηγούμενη εμπειρία μας, εάν στην τρισωμική σειρά υπήρχε κάποιο αλληλίο διαφορετικό από αυτά της δισωμικής σειράς, όπως θα

συνέβαινε στην περίπτωση που ο ζυγώτης ήταν τρισωμικός και στη συνέχεια χάθηκε κάποιο χρωμόσωμα μαζί με το αλληλίο που αυτό έφερε, τότε θα μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε την παρουσία αυτού του αλληλίου και άρα να αποδείξουμε ότι αυτός ήταν ο μηχανισμός γένεσης του μωσαϊκού.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το δείγμα μας αποτελείται από 18 οικογένειες με απογόνους με μωσαϊκό τρισωμίας 21. Δείγμα αίματος ελήφθη από τον πάσχοντα και τους δύο γονείς. Η καρυοτύπηση για την ανίχνευση του μωσαϊκού και τον προσδιορισμό του ποσοστού τρισωμικών κυττάρων έγινε από το ίδιο δείγμα αίματος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή DNA εκτός από την περίπτωση DSmos#18. Στην περίπτωση DSmos#17 το δείγμα ήταν καλλιεργημένο αμνιακό υγρό. Η ανάλυση των καρυοτύπων έγινε από το εργαστήριο του καθηγητή κ. Κ. Πάγκαλου στην Αθήνα, και από άλλα εργαστήρια.

Η ραδιοσήμανση του προϊόντος, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και η ηλεκτροφόρηση - αυτοραδιογραφία έγινε όπως περιγράφηκε στο Α μέρος. Οι εκκινητές ήταν επίσης οι ίδιοι με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του μειωτικού χάρτη καθώς και άλλοι για πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένους δείκτες οι οποίοι συντέθηκαν στο εργαστήριο Genetics Core Facility, στο Johns Hopkins University σε συσκευή ABI 392 oligonucleotide Synthesizer. Χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες D21S215, D21S258, D21S236, D21S120, D21S13, D21S172, D21S11, D21S145, D21S214, D21S1244, D21S222, D21S232, D21S210, APP, D21S217, D21S1239, D21S213, D21S216, IFNAR, GART, D21S65, D21S167, D21S156, D21S231, HMG14, D21S212, D21S170 και PFKL. Ακόμα για αποκλεισμό επιμολύνσεων αλλά και επιβεβαίωση πατρότητας χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες D8S89, D8S262, D8S264 από το χρωμόσωμα 8, UT975 από το χρωμόσωμα 5 και UT658 από το χρωμόσωμα 10 (οι δείκτες με πρόθεμα UT είναι από αδημοσίευτα στοιχεία από τους S Gerken και R White. Βλέπε επίσης την βιβλιογραφική αναφορά<sup>85</sup>).

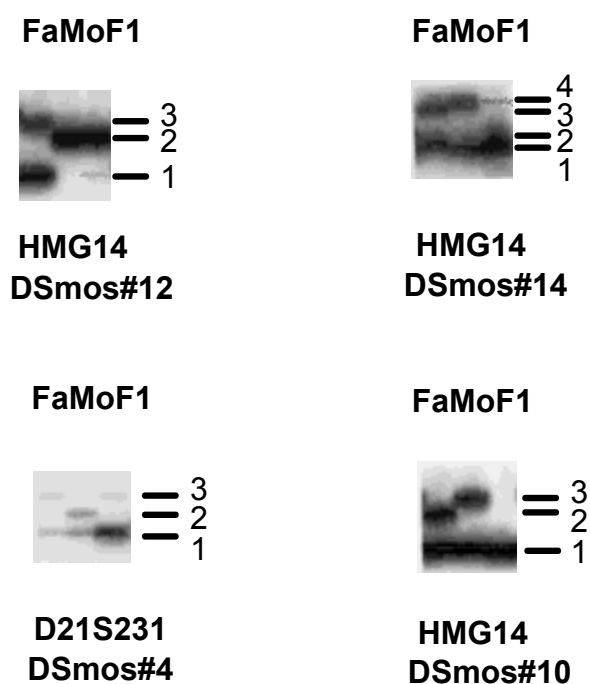
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε στις περισσότερες περιπτώσεις σε 28 κύκλους. Δοκιμάστηκε ακόμα η επανάληψη της αντίδρασης σε 35 κύκλους που οδήγησε σε μικρή μόνο βελτίωση της σχετικής έντασης των ζωνών που αντιστοιχούσαν στο αλληλίο σε μωσαϊκό. Η αυτοραδιογραφία έγινε για 3 και 16 ώρες (δύο εκθέσεις) για όλα τα πηκτώματα, και στην περίπτωση που το αποτέλεσμα δεν είχε ικανοποιητική ένταση επαναλήφθηκε για 72 ώρες.

Η κυτταρογενετική ανάλυση έγινε από καλλιέργειες λεμφοκυττάρων 72 ωρών. Οι ζώνες έγιναν με τις τεχνικές RGB και GTG. Αναλύθηκαν τουλάχιστον 100 μειώσεις για κάθε δείγμα συμπεριλαμβανομένων των γονέων. Όποτε βρέθηκε μόνο ένα τρισωμικό κύτταρο εξετάστηκαν 200 μεταφάσεις. Θεωρήσαμε μωσαϊκισμό την ύπαρξη τουλάχιστον 2 τρισωμικών κυττάρων σε 200 μεταφάσεις.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν συνολικά 18 περιπτώσεις (DSmos#1 έως #18) με ποσοστά τρισωμικών κυττάρων από 6% (DSmos#1) έως 94% (DSmos#17). Σε κανέναν από τους γονείς δεν βρέθηκε μωσαϊκό τρισωμίας 21 ή άλλη χρωμοσωματική ανωμαλία εκτός από τον πατέρα της οικογένειας DSmos#11 που περιείχε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές : 46,XY/47,XY+21/45,XY-21 (98.25%/0.75%/1% αντίστοιχα σε 400 μεταφάσεις). Αναλύθηκαν 28 πολυμορφικοί δείκτες κατά μήκος του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 21. Ακόμα μελετήθηκαν δείκτες εκτός του χρωμοσώματος 21 για έλεγχο του πειράματος και επιβεβαίωση πατρότητας. Στην οικογένεια DSmos#7 βρέθηκε μη πατρότητα και για αυτό η οικογένεια αυτή εξαλείφθηκε από περαιτέρω μελέτη. Ο πίνακας 6 περιγράφει λεπτομερώς τα αποτελέσματα της γονοτύπησης. Παραδείγματα από τη γονοτύπηση φαίνονται στην εικόνα 15.

**ΕΙΚΟΝΑ 15**



Παραδείγματα από την ανίχνευση του χρωμοσώματος σε μωσαϊκό με PCR. Στις δύο περιπτώσεις της επάνω σειράς καθώς και στην πρώτη της κάτω σειράς διακρίνονται επιπρόσθετες μειωμένης εντάσεως ζώνες που αντιστοιχούν στο χαμένο χρωμόσωμα 21 (η ζώνη που αντιστοιχεί στο αλληλίο 1 για το DSmos#12/HMG14, η ζώνη που αντιστοιχεί στο αλληλίο 4 για το DSmos#14/HMG14 και η ζώνη που αντιστοιχεί στο αλληλίο 3 για το DSmos#4/D21S231). Στο DSmos#10/HMG14 βλέπουμε ότι παρά την μεγάλη ένταση των ζωνών δεν διακρίνεται το αλληλίο 2 ή 3. Τέτοια αποτελέσματα έλλειψης ανίχνευσης χαμένων αλληλίων σε όλο το μήκος του χρωμοσώματος μας κάνουν να θεωρούμε το λάθος μιτωτικό.



## Πίνακας 6

Αποτελέσματα γονοτύπησης για τα μωσαϊκά τρισωμίας 21. Αναφέρονται οι ηλικίες των γονέων και το ποσοστό μωσαϊκισμού όπως προέκυψε από τη μελέτη του καρυοτύπου. Φαίνονται ακόμα τα συμπεράσματα για την προέλευση της τρισωμίας, την προέλευση του αλληλίου που χάθηκε και την ύπαρξη χιασμάτων.

M(1 ή 2) = Τρισωμία από μητρικό λάθος (στην 1η ή 2η μειωτική διαίρεση).

Π(1 ή 2) = Τρισωμία από πατρικό λάθος (στην 1η ή 2η μειωτική διαίρεση).

μ = Απώλεια χρωμοσώματος μητρικής προέλευσης

π = Απώλεια χρωμοσώματος πατρικής προέλευσης

\* = Πιθανώς δεν φαίνεται το χαμένο αλληλίο διότι υπάρχει φαινόμενο "stuttering"

e = Πιθανώς δεν φαίνεται το χαμένο αλληλίο λόγω ανεπαρκούς εντάσεως των ζωνών.

R = (reduction) Ομοζυγωτία σε χρωμοσώματα που σε άλλους δείκτες εμφάνιζαν ετεροζυγωτία όταν ο γονέας ήταν ετεροζυγώτης (ένδειξη χιάσματος).

## Σημειώσεις :

-Σε όλες τις περιπτώσεις η σειρά των γονότυπων είναι πατέρας, μητέρα, τρισωμικό (μωσαϊκό) παιδί.

-Σε παρένθεση είναι τα αλληλία που φαίνονται σε μειωμένη ένταση γιατί αντιπροσωπεύουν το χαμένο χρωμόσωμα.

-Για το DSmos#17 το μωσαϊκό προσδιορίστηκε σε κύτταρα αμνιακού υγρού.

-Για το DSmos#18 το μωσαϊκό βρέθηκε σε δείγμα του 1976 ενώ το DNA εκχειρίστηκε από δείγμα του 1990 και το ποσοστό μωσαϊκού σε αυτό το δείγμα είναι άγνωστο.

-Οι ηλικίες των γονέων αναφέρονται στην ημερομηνία γέννησης του τρισωμικού παιδιού.



Τα αποτελέσματα μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες :

1. Περιπτώσεις όπου διακρινόταν ένα τρίτο αλληλίο σε κάποιους πληροφορικούς δείκτες, με ένταση συνήθως πολύ χαμηλότερη από τα υπόλοιπα 2 υποδηλώνοντας ότι αντιπροσωπεύει το τρίτο χρωμόσωμα που είναι παρόν στην τρισωμική σειρά (σε παρένθεση στον πίνακα 6). Η παρουσία αυτού μας δείχνει ότι η τρισωμική σειρά είναι αποτέλεσμα μη διαχωρισμού σε κάποια από τις μειώσεις των γονέων, ενώ ο μωσαϊκισμός είναι αποτέλεσμα μεταγενέστερης μιτωτικής απώλειας του χρωμοσώματος (μηχανισμός 1). Ακόμα σε αυτή την κατηγορία μπορούμε να αποφανθούμε για την γονική προέλευση του υπεράριθμου χρωμοσώματος.

2. Περιπτώσεις όπου δεν διακρίναμε τρίτο αλληλίο παρά την ανάλυση πολλών πληροφοριακών δεικτών (κατηγορία 2). Σε αυτή την περίπτωση συμπεραίνουμε ότι το τρίτο χρωμόσωμα ήταν πάντοτε σε ομοζυγωτία με ένα από τα άλλα δύο. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε μικρά ποσοστά μωσαϊκισμού δεν ήταν δυνατή η διάκριση διαφορών στην ένταση των αλληλίων όταν τα δύο από τα τρία ήταν σε ομοζυγωτία. Αυτό ήταν δυνατό μόνο για τα DSmos#13 και #17 με ποσοστά μωσαϊκού 88 και 94% και για το DSmos#18 με άγνωστο ποσοστό. Θεωρούμε ότι αυτές οι περιπτώσεις (κατηγορία 2) οφείλονται είτε σε μιτωτικά λάθη που οδήγησαν στην τρισωμική σειρά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (κατηγορία 2A) είτε, σπανιότερα, σε μιτωτικά λάθη πριν τη μείωση στο γονέα με μεταγενέστερη απώλεια στο έμβρυο (κατηγορία 2B).

Οι 10 από τις 17 περιπτώσεις (58.8%) ανήκαν στην κατηγορία 1, δηλαδή ήταν αποτέλεσμα ενός μειωτικού λάθους στον γονέα ακολουθούμενου από μιτωτική απώλεια του χρωμοσώματος 21 σε μία κυτταρική σειρά. Οι υπόλοιπες 7 (41.2%) ανήκαν στην κατηγορία 2A ή 2B δηλαδή η τρισωμική σειρά ήταν αποτέλεσμα μιτωτικού λάθους στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (κατηγορία 2A) ή μιτωτικού λάθους σε κάποιο γονέα που ακολουθήθηκε από δεύτερο λάθος στο έμβρυο προς δημιουργία της ευπλοειδούς σειράς (κατηγορία 2B). Στην τελευταία κατηγορία πιθανώς ανήκει η οικογένεια στην οποία ο πατέρας βρέθηκε να έχει μωσαϊκισμό. Στην κατηγορία 1 η τρισωμία οφειλόταν σε 6 περιπτώσεις σε λάθος στην μητρική μείωση 1, σε 3 στην μητρική μείωση 2 και σε 1 στην πατρική μείωση 1. Τα χρωμοσώματα που χάθηκαν στη συνέχεια στις μιτωτικές διαιρέσεις ήταν μητρικά σε 5 περιπτώσεις και πατρικά σε 4. Η μέση ηλικία της μητέρας στα λάθη της πρώτης κατηγορίας (εξαιρουμένου του πατρικού λάθους) ήταν 31.4 χρόνια ενώ στη δεύτερη κατηγορία ήταν 27.4 χρόνια. Το μέσο ποσοστό τρισωμικών κυττάρων ήταν στην πρώτη κατηγορία 30.2% και στην δεύτερη κατηγορία 13.1%.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Χρησιμοποιήθηκαν εδώ πολυμορφισμοί SSR και ανάλυση με PCR για τη διερεύνηση του μηχανισμού δημιουργίας μωσαϊκού για τρισωμία 21. Η προηγούμενη εμπειρία με χρήση τέτοιου τύπου πολυμορφισμών για ανάλυση της τρισωμίας 21, καθώς και η εμπειρία ανίχνευσης μωσαϊκού με πολυμορφισμούς ανιχνεύσιμους με PCR<sup>84</sup>, μας οδήγησε σε αυτή την προσέγγιση, και πράγματι αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε ότι μπορεί να

ανιχνεύσει μωσαϊκά στο επίπεδο του 6% τουλάχιστον.

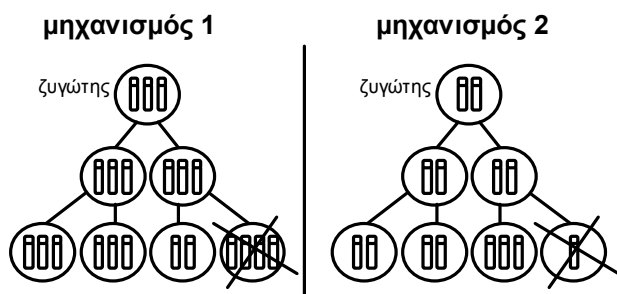
Τα αποτελέσματά μας οδήγησαν στην υπόθεση υπάρξεως δύο μηχανισμών παραγωγής μωσαϊκού, όπως άλλωστε έχει λεχθεί και στο παρελθόν. Στον πρώτο μηχανισμό (κατηγορία 1) θεωρούμε ότι το μωσαϊκό προέρχεται από απώλεια ενός χρωμοσώματος 21, από έναν τρισωμικό ζυγώτη. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά έγινε ένα λάθος σε κάποια μείωση των γονέων (M1, M2, Π1 ή Π2) και στη συνέχεια κάποιο από τα τρία χρωμοσώματα του ζυγώτη χάθηκε σε κάποια μίτωση οδηγώντας σε μία δισωμική (ευπλοειδή) σειρά. Η απώλεια ενός χρωμοσώματος οδήγησε και σε απώλεια του πολυμορφικού αλληλίου που αυτό έφερε, το οποίο παρέμεινε πλέον μόνο στο ποσοστό των κυττάρων της υπολειπόμενης τρισωμικής σειράς. Έτσι δικαιολογείται η εικόνα που είχαμε στην αυτοραδιογραφία με τα δύο έντονα αλληλία και ένα τρίτο σε χαμηλότερη ένταση. Το τελευταίο αντιστοιχεί στο χαμένο χρωμόσωμα. Η εικόνα αυτή που είδαμε όχι μόνο δικαιολογείται, αλλά και είναι η αναμενόμενη σε αυτή την κατηγορία. Σε περίπτωση που το χαμένο αλληλίο βρίσκεται σε ομοζυγωτία με ένα από τα άλλα δύο δεν θα δούμε βέβαια αυτή την εικόνα λόγω επικάλυψης, αλλά επειδή το χρωμόσωμα 21 πάντοτε παρουσιάζει ένα χιάσμα θα πρέπει να δούμε την εικόνα αυτή σε κάποιο από τους πολλούς πληροφοριακούς δείκτες που αναλύσαμε σε όλο το μήκος του, όπως εξηγήθηκε και στο πρώτο μέρος όπου θεωρήσαμε ότι ομοζυγωτία σε όλο το μήκος θα πρέπει να οφείλεται σε μιτωτικό λάθος.

Στις περιπτώσεις που δεν είδαμε την παραπάνω εικόνα παρά την ανάλυση πολλών δεικτών συμπεράναμε ότι τα τρισωμικά κύτταρα φέρουν ένα ακριβές αντίγραφο του ενός από τα άλλα δύο χρωμοσώματα, γεγονός που πρέπει να οφείλεται σε λάθος σε κάποια μιτωτική διαίρεση. Ο πιο πιθανός μηχανισμός για να συμβεί αυτό είναι η έναρξη με ένα ευπλοειδή ζυγώτη και στη συνέχεια ο μη διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων σε κάποια μιτωτική διαίρεση με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας τρισωμικής σειράς, όπου τα δύο χρωμοσώματα είναι πανομοιότυπα μια και προέρχονται από αδελφές χρωματίδες. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός θα ήταν η έναρξη με έναν τρισωμικό ζυγώτη όπως περιγράφηκε στα αποτελέσματα (μηχανισμός 2B) και στη συνέχεια απώλεια του τρίτου χρωμοσώματος. Αυτός ο μηχανισμός όμως δεν μπορεί να ξεπερνάει το 5%, συχνότητα με την οποία παρατηρήθηκαν μιτωτικά λάθη ως αιτία πλήρους τρισωμίας στο A' μέρος, δηλαδή λιγότερο από μία από τις περιπτώσεις που μελετήσαμε. Μάλιστα επειδή ο μηχανισμός αυτός προϋποθέτει τα δύο όμοια χρωμοσώματα να κινηθούν μαζί στη μείωση και να μην συμμετάσχουν σε χιάσματα, είναι μάλλον απίθανος.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε εδώ έχει πολύ καλή βεβαιότητα όσον αφορά τα μωσαϊκά που ταξινομούμε στην κατηγορία 1, κυρίως εφόσον γίνεται και έλεγχος επιμολύνσεως με δείκτες εκτός του χρωμοσώματος 21. Όσον αφορά τις περιπτώσεις της κατηγορίας 2 το αποτέλεσμα είναι πιο ευαίσθητο σε κριτική γιατί βασίζεται στην "έλλειψη παρατήρησης" τρίτου αλληλίου. Για να είμαστε όσο το δυνατό πιο βέβαιοι κάναμε μακροχρόνιες αυτοραδιογραφίες και αξιολογήσαμε μόνο αποτελέσματα με πολύ έντονες τις ζώνες των άλλων αλληλίων. Ο χαμηλότερος μέσος όρος μητρικής ηλικίας σε αυτή την ομάδα (όπου το λάθος δεν έγινε στους γονείς αλλά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο), καθώς και ο χαμηλότερος μέσος όρος ποσοστού μωσαϊκισμού, είναι παρατηρήσεις που ενισχύουν την πεποίθησή μας για την ορθότητα των συμπερασμάτων. Η χαμηλή μητρική ηλικία είναι αναμενόμενη γιατί η γένεση

της τρισωμίας δεν σχετίζεται με λειτουργίες της μητέρας, αλλά συμβαίνει αυτόνομα στο έμβρυο. Το ίδιο είχαμε δει και στις πλήρεις τρισωμίες που οφείλονται σε μιτωτικό λάθος. Ο χαμηλότερος μέσος όρος μωσαϊκού είναι αναμενόμενος για τον παρακάτω λόγο: Εάν η απώλεια ή ο μη διαχωρισμός γίνει στην δεύτερη μιτωτική διαίρεση, το αρχικό ποσοστό τρισωμικών κυττάρων είναι 66% (2/3) για τον μηχανισμό 1 και 33% (1/3) για τον μηχανισμό 2 (εικόνα 16). Αυτή η υπεροχή τρισωμικών κυττάρων σε αρχικά ποσοστά για τον μηχανισμό 1 γίνεται ακόμα πιο έντονη εάν το λάθος γίνει σε μετέπειτα διαιρέσεις. Πιθανή επιλογή σειρών στη συνέχεια επηρεάζει βέβαια τα ποσοστά, αλλά είναι λογικό να περιμένουμε κατά μέσο όρο μεγαλύτερα ποσοστά στην κατηγορία 1 όπως και παρατηρήσαμε. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες τις περιπτώσεις με υψηλά ποσοστά (>50%) τρισωμικών κυττάρων κατατάχθηκαν στην κατηγορία 1.

**ΕΙΚΟΝΑ 16**



**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Morton, N.E. (1991). Parameters of the human genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:7474-7476.
2. Tanzi, R.E. and Hyman, B.T. (1991). Alzheimer's mutation [letter]. *Nature* 350:564.
3. Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P. and Hardy, J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846.
4. VanDuin, C.M., Hendriks, L., Cruts, M., Hardy, J.A., Hofman, A. and Van Broeckhoven, C. (1991). Amyloid precursor protein gene mutation in early-onset Alzheimer's disease [letter]. *Lancet* 337:978.
5. Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
6. St.George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Meyers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D., Drachman, D., Growden, J., Bruni, A., Foncin, J.F., Salmon, D., Frommelt, P., Amaducci, L., Sorbi, S., Placentini, S., Stewart, G.D., Hobbs, W.J., Conneally, P.M. and Gussella, J.F. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235:885-890.
7. Munke, M., Kraus, J.P., Ohura, T. and Francke, U. (1988). The gene for cystathionine beta synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am.J.Hum.Genet.* 42:550-559.
8. Lehesjoki, A.E., Koskiniemi, M., Sistonen, P., Miao, J., Hastbacka, J., Norio, R. and de la Chapelle, A. (1991). Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:3696-3699.
9. Siddique, T., Figlewicz, D.A., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Rouleau, G., Jeffers, A.J., Sapp, P., Hung, W.Y., Bebout, J. and McKenna-Yasek, D. (1991). Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N.Engl.J.Med.* 324:1381-1384.
10. Byerley, W., Mellon, C., O'Connell, P., Lalouel, J.M., Nakamura, Y., Leppert, M. and White, R. (1989). Mapping genes for manic-depression and schizophrenia with DNA markers. *Trends.Neurosci.* 12:46-48.
11. Detera-Wadleigh, S.D., Goldin, L.R., Sherrington, R., Encio, I., de Miguel,

- C., Berrettini, W., Gurling, H. and Gershon, E.S. (1989). Exclusion of linkage to 5q11-13 in families with schizophrenia and other psychiatric disorders. *Nature* 340:391-393.
12. Avramopoulos, D., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1993). DNA polymorphisms in the 3' untranslated region of genes on human chromosome 21. *Genomics* 15:98-102.
  13. McInnis, M.G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M.B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J.L., Konig, U., Brahe, C., Cox, T., Warren, A.C., Talbot, C.T., Van Broeckhoven, C., Litt, M. and Antonarakis, S.E. (1993). A linkage map of human chromosome 21 : 43 PCR Markers at Average Intervals of 2.5 cM. *Genomics* 16:562-571.
  14. Antonarakis, S.E., Avramopoulos, D., Blouin, J.L., Talbot, C.C. and Schinzel, A.A. (1993). Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nature Genetics* 3 146-150.
  15. Pangalos, C., Avramopoulos, D. (*published note : the first two authors have made comparable contributions to this project, Am. J. Hum. Genet. 55:217-errata*), Blouin, J.L., Raoul, O., deBlois, M.C., Prieur, M., Schinzel, A.A., Gika, M., Abazis, D., Antonarakis, S.E. (1994). Understanding the mechanism(s) of mosaic for trisomy 21 using DNA polymorphism analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 54:473-481.
  16. Haldane, J.B.S. (1919). The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J.Genet.* 8:229-309.
  17. Antonarakis, S.E. (1989). The diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N.Engl.J.Med.* 320:153-163.
  18. Collins, F.S. (1992). Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genetics* 1:3-6.
  19. Smith, C.L. and Cantor, C.R. (1989). Evolving strategies for making physical maps of mammalian chromosomes. *Genome* 31:1055-1058.
  20. Billings, P.R., Smith, C.L. and Cantor, C.R. (1991). New techniques for physical mapping of the human genome. *FASEB Journal* 5:28-34.
  21. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M.H. and Davies, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 3:81-95.
  22. Smith, H.O. (1979). Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205:455-462.
  23. Weber, J.L. and May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA

- polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am.J.Hum.Genet.* 44:388-396.
24. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
  25. Orita, M., Iwahana, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 86:2766-2770.
  26. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879.
  27. Brody, L., Steel, G., Martin, L., Mitchell, G., Fontain, G., Michaud, J. and Vale, D. (1990). Rapid and efficient detection of mutations at the ornithine aminotransferase (OAT) locus. *Am.J.Hum.Genet.* 47:A204.
  28. Dimink, L.S., Fraser, G.M., Poon, M.C. and Hoar, D.I. (1990). Molecular diagnosis of single strand DNA conformational polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 47(suppl):A214.
  29. Economou, E.P., Kazazian, H.H.Jr and Antonarakis, S.E. (1992). Detection of mutations in the factor VIII gene using single strand conformational polymorphism. *Genomics* 13:909-911.
  30. Jackson, R.J. and Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62:15-24.
  31. Ratnasabapathy, R., Hwang, S.P. and Williams, D.L. (1990). The 3'-untranslated region of apolipoprotein II mRNA contains two independent domains that bind distinct cytosolic factors. *J.Biol.Chem.* 265:14050-14055.
  32. Hepler, J.E., Van Wyk, J.J. and Lund, P.K. (1990). Different half-lives of insulin-like growth factor I mRNAs that differ in length of 3' untranslated sequence. *Endocrinology* 127:1550-1552.
  33. Tonouchi, N., Miwa, K., Karasuyama, H. and Matsui, H. (1989). Deletion of 3' untranslated region of human BSF-2 mRNA causes stabilization of the mRNA and high-level expression in mouse NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research communications* 163:1056-1062.
  34. Casey, J.L., Koeller, D.M., Ramin, V.C., Klausner, R.D. and Harford, J.B. (1989). Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO.J.* 8:3693-3699.

35. Cheng, J.L., Shoemaker, D.L., Schimmel, P. and Holmes, E.W. (1990). Reversal of creatine kinase translational repression by 3' untranslated sequences. *Science* 248:1003-1006.
36. Peppel, K., Vinci, J.M. and Baglioni, C. (1991). The AU-rich sequences in the 3' untranslated region mediate the increased turnover of interferon mRNA induced by glucocorticoids. *Journal of Experimental Medicine* 173:349-355.
37. Maatta, A., Bornstein, P. and Penttinen, R.P. (1991). Highly conserved sequences in the 3'-untranslated region of the COL1A1 gene bind cell-specific nuclear proteins. *FEBS Letters*. 279:9-13.
38. Kwon, Y.K. and Hecht, N.B. (1991). Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:3584-3588.
39. Ikonen, E., Ulmanen, I. and Peltonen, L. (1992). Deletion of the 3'-untranslated region of aspartylglucosaminidase mRNA results in a lysosomal accumulation disease. *J.Biol.Chem.* 267:8715-8718.
40. Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A., Moreno, R., Kelley, J., Utterback, T., Nagle, J., Fields, C. and Venter, C. (1992). Sequence identification of 2,375 human brain Genes. *Nature* 335:632-634.
41. Francomano, C.A., Cutting, G.R., McCormick, M.K., Chu, M.L., Timpl, R., Hong, H.K. and Antonarakis, S.E. (1991). The COL6A1 and COL6A2 genes exist as a gene cluster and detect highly informative DNA polymorphisms in the telomeric region of human chromosome 21q. *Hum.Genet.* 87:162-166.
42. Dausset, J., Cann, H, Cohen, D., Lathrop, M., Lalouel, J.M. and White, R. (1990). Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH): Collaborative genetic mapping of the human genome. *Genomics* 6:575-577.
43. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Ed. 2nd
44. Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A. and Kazazian, H.H.Jr. (1987). Characterization of beta thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330:384-386.
45. Higuchi, R., Kochhan, L. and Olek, K. (1988). A somatic mosaic for hemophilia A detected at the DNA level. *Bol.Biol.Med* 5:23-27.
46. Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S., Botstein, D., Akots, G., Rediker, K.S., Gravius, T., Brown, V.A., Rising,

- M.B., Parker, C., Powers, J.A., Watt, D.E., Kauffman, E.R., Bricker, A., Phipps, P., Muller-Kahle, H., Fulton, T.R., Ng, S., Schumm, J.W., Braman, J.C., Knowlton, R.G., Barker, D.F., Crooks, S.M., Lincoln, S.E., Daly, M.J. and Abrahamson, J. (1987). A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51:319-337.
47. Lathrop, G.M., Lalouel, J.M., Julier, C. and Ott, J. (1984). Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:3443-3446.
  48. Masiakowski, P., Breathnach, R., Block, J., Gannon, F., Krust, A. and Chambon, P. (1982). Cloning of cDNA encoding sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic.Acids.Res.* 10:7895-7903.
  49. Avramopoulos, D., Cox, T., Blaschak, J., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1992). Linkage mapping of the AML1 gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' Untranslated region. *Genomics* 14:506-507.
  50. Avramopoulos, D., Cox, T., Forrest, G.L., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1992). Linkage mapping of the carbonyl reductase (CBR) gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3' untranslated region. *Genomics* 13:447-448.
  51. Avramopoulos, D., Cox, T., Kraus, J.P., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1993). Linkage mapping of the cystathionine beta synthase (CBS) gene on human chromosome 21 using a DNA polymorphism in the 3'untranslated region. *Hum.Genet.* 90:566-568.
  52. Stewart, G.D., Tanzi, R.E., Kishimoto, T.K., Biracrynska, M., Haines, M., Drabkin, H., Gusella, J.F., Springer, T.A., Kurnit, D.M. and VanKeuren, M. (1988). The CD18 gene maps to distal chromosome 21q22.3 : RFLPs create a highly informative terminal haplotype. *Am.J.Hum.Genet.* 43:A160.
  53. Antonarakis, S.E., Oettgen, P., Chakravarti, A., Halloran, S.L., Hudson, R.R., Feisee, L. and Karathanasis, S.K. (1988). DNA polymorphism haplotypes of the human APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster. *Hum.Genet.* 80:265-273.
  54. Chakravarti, A., Buetow, K.H., Antonarakis, S.E., Waber, P.G., Boehm, C.D. and Kazazian, H.H. (1984). Nonuniform recombination within the human beta-globin gene cluster. *Am.J.Hum.Genet.* 36:1239-1258.
  55. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y. and Ohki, M. (1991). Breakpoints on acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:10431-10434.



56. Warren, A.C., McInnis, M.G., Blaschak, J., Kaliatsidaki, M., Petersen, M.B., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1992). Dinucleotide repeat (GT)<sub>n</sub> markers on chromosome 21. *Genomics* 14:818-819.
57. McInnis, M.G., Lutfalla, G., Slaugenhaupt, S., Petersen, M.B., Uze, G., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1991). Linkage mapping of highly informative DNA polymorphisms within the human interferon-alpha receptor gene on chromosome 21. *Genomics* 11:573-576.
58. Petersen, M.B., Weber, J.L., Slaugenhaupt, S.A., Kwitek, A.E., McInnis, M.G., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1991). Linkage mapping of D21S171 to the distal long arm of human chromosome 21 using a polymorphic (AC)<sub>n</sub> dinucleotide repeat. *Hum.Genet.* 87:401-404.
59. Cox, T.K., Perlin, M. and Chakravarti, A. (1992). Multimap: Automatic construction of linkage maps. *Am.J.Hum.Genet.* 51 (Supplement):A 120..
60. Cox-Matice, T., Perlin, M. and Chakravarti, A. (1994). Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (MULTIMAP): A human genome linkage map. *Nature Genetics* 6:384-390.
61. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, (1992). A Comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 285:67-86.
62. Warren, A.C., Slaugenhaupt, S.A., Lewis, J.G., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1989). A genetic linkage map of of 17 markers on human chromosome 21. *Genomics* 4:579-591.
63. Petersen, M.B., Slaugenhaupt, S.A., Lewis, J.G., Warren, A.C., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1991). A genetic linkage map of 27 markers on human chromosome 21. *Genomics* 9:407-419.
64. Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Stewart, G.D., Wexler, N.S., Gusella, J.F. and Haines, J.L. (1992). A genetic linkage map of human chromosome 21: analysis of recombination as a function of sex and age. *Am.J.Hum.Genet.* 50:551-558.
65. Tanzi, R.E., Haines, J.L., Watkins, P.C., Stewart, G.D., Wallace, M.R., Hallowell, R., Wong, C., Wexler, N.S., Conneally, P.M. and Gusella, J.F. (1988). Genetic linkage map of chromosome 21. *Genomics* 3:129-136.
66. Chumakov, A., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guascon, G., Gervy, P., LeGall, I., Soularue, P., Grinaa, L., Bougueleret, L., Bellane-Chantelot, C., Lacroix, B., Barot, E., Gesnouin, P., Pook, S., Vaysseix, G., Frelat, G., Schmitz, A., Sambucy, J.L., Bosch, A., Estivill, X., Weissenbach, J., Vignal, A., Reithman, H., Cox, D., Patterson, D., Gardiner, K., Hattori, M., Sakaki, Y., Ichikawa, H., Ohki, M., Le Paser, D., Heg, R., Antonarakis, S.E. and Cohen, D. (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* 359:380-387.

67. Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S.A., West, R., Allen, L., Magenis, E., Ikawa, K., Taniguchi, N. and Epstein, C.J. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am.J.Hum.Genet.* 47:236-246.
68. McCormick, M.K., Schinzel, A., Petersen, M.B., Stetten, G., Driscoll, D.J., Cantu, E.S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P.C. and Antonarakis, S.E. (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics* 5:325-331.
69. Penrose, L.S. (1933). The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J.Genet.* 27:219-224.
70. Epstein, C.J. Down syndrome (trisomy 21). In : Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, sixth edition. McGraw - Hill, Inc. 1989 : 306-307
71. Zheng, C.J. and Byers, B. (1992). Oocyte selection - A new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. *Hum.Genet.* 90(1-2):1-6.
72. Antonarakis, S.E. (1991). Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N.Engl.J.Med.* 324:872-876.
73. Sherman, S.L., Takaesu, N., Freeman, S.B., Grantham, M., Phillips, C., Blackston, R.D., Jacobs, P.A., Cockwell, A.E., Freeman, V. and Uchida, I. (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *Am.J.Hum.Genet.* 49:608-620.
74. Antonarakis, S.E., Petersen, M.B., McInnis, M.G., Adelsberger, P.A., Schinzel, A.A., Binkert, F., Pangalos, C., Raoul, O., Slaugenhaupt, S.A. and Hafez, M. (1992). The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 50:544-550.
75. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol* 98:503-517.
76. Van Hul, W., Van Camp, G., Stuyver, L., Delabar, J., McInnis, M.G., Warren, A.C., Antonarakis, S.E. and Van Broeckhoven, C. (1993). A contiguous physical map of the pericentromeric region of chromosome 21q between D21Z1 and D21S13E. *Genomics* 15:626-630.
77. Warren, A.C., Petersen, M.B., Van Hul, W., McInnis, M.G., Van Broeckhoven, C., Cox, T.K. and et al, (1992). D21S215 is a (GT)<sub>n</sub> polymorphic marker close to the centromeric alphoid sequences on chromosome 21. *Genomics* 13:1365-1367.

78. Roeder, G.S. and Stewart, S.E. (1988). Mitotic recombination in yeast. *Trends.Genet.* 4(9):263-267.
79. Henson, V., Palmer, L., Banks, S., Nadeau, J.H. and Carlson, G.A. (1991). Loss of heterozygosity and mitotic linkage maps in the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88(15):6486-6490.
80. Mikkelsen, M. (1977). Down's Syndrome : cytogenetic epidemiology. *Hereditas* 86:45-59.
81. Richards, B.W. (1969). Mosaic mongolism. *J.Ment.Defic.Res.* 13:66-83.
82. Richards, B.W. (1974). Investigation of 142 mosaic mongols and mosaic parents of mongols; cytogenetic analysis and maternal age at birth. *J.Ment.Defic.Res.* 18:199-208.
83. Dagna Bricarelli, F., Pierluigi, M., Grasso, M., Strigini, P. and Perroni, L. (1990). Origin of extra chromosome 21 in 343 families. Cytogenetic and molecular approaches. *Am.J.Med.Genet. suppl.* 7:129-132.
84. Antonarakis, S.E., Blouin, J.L., Maher, J., Avramopoulos, D., Thomas, G. and Talbot, C.C.Jr (1993). Maternal uniparental disomy for human chromosome, 14 due to loss of a chromosome 14 from somatic cells with t(13;14) trisomy 14. *Am.J.Hum.Genet.* 52:1145-1152.
85. Avramopoulos, D., Talbot, C.C., Gerken, S., Matsunami, N., Lalouel, J.M., White, R. and Antonarakis, S.E. (1993). Addition of 7 new highly polymorphic markers to the genetic linkage map of human chromosome 21. *Chr.21 Workshop #4 Paris, Abstracts* p.3

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη (adenosine diphosphate)
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
bp	Ζεύγη βάσεων (base pairs)
BSA	Λευκωματίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin)
cDNA	Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
CEPH	Κέντρο μελέτης πολυμορφισμών του ανθρώπου (Centre d' Etudie du Polymorphisme Humain)
dATP	Δεοξυτριφωσφορική αδενοσίνη (Deoxyadenosine triphosphate)
dCTP	Δεοξυτριφωσφορική κυτοσίνη (Deoxycytosine triphosphate)
ddATP	Διδεοξυτριφωσφορική αδενοσίνη (Dideoxyadenosine triphosphate)
ddCTP	Διδεοξυτριφωσφορική κυτοσίνη (Dideoxycytosine triphosphate)
ddGTP	Διδεοξυτριφωσφορική γουανοσίνη (Dideoxyguanosine triphosphate)
ddNTP	Διδεοξυτριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (Dideoxynucleotide triphosphate)
ddTTP triphosphate)	Διδεοξυτριφωσφορική θυμοσίνη (Dideoxythimosine triphosphate)
dGTP	Δεοξυτριφωσφορική γουανοσίνη (Deoxyguanosine triphosphate)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Deoxyribonucleic acid)
dNTP triphosphate)	Δεοξυτριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (Deoxynucleotide triphosphate)
dTTP	Δεοξυτριφωσφορική θυμοσίνη (Deoxythimosine triphosphate)
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
kb	Χιλιάδες βάσεις (Kilobases)
lod	Λογάριθμος πιθανοτήτων (logarithm of odds)
M1	Πρώτη μητρική μειωτική διαίρεση
M2	Δεύτερη μητρική μειωτική διαίρεση
Mb	Εκατομύρια βάσεις (megabases)
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA)
Π1	Πρώτη πατρική μειωτική διαίρεση
Π2	Δεύτερη πατρική μειωτική διαίρεση
PCR reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction)
RFLP	Πολυμορφισμός μήκους τεμαχίων περιορισμού (Restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleic acid)
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSC	Sodium chloride 175.3 g/l, Sodium citrate 88.2 g/l pH=7
SSCP	Πολυμορφισμοί αναδιπλώσεως μονής αλυσού (Single strand conformation polymorphism)
TBE	Trizma base 108 g/l, Boric acid 55 g/l, EDTA 9 g/l
VNTR	Ποικίλου αριθμού παρακείμενες επαναλήψεις (Variable number tandem repeats)

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΑΒΡΑΜΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Ιατρός

Ευριπίδου 43 Κηφισιά 145 63

Γεννημένος στην Αθήνα το 1966

Έγγαμος με ένα παιδί

#### Εκπαίδευση :

1971 - 1983 Δημοτικό - Γυμνάσιο - Λύκειο : Σχολής Μωραΐτη, Ψυχικό.  
Γνώσεις Αγγλικών (άπταιστα), Ιταλικών, Γερμανικών.

1984 - 1990 Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο  
Αθηνών.

1/1991 - 6/1993 Μεταδιδακτορικός Συνεργάτης Department of Pediatric  
Genetics, The Johns Hopkins University, School of  
Medicine.

1/1994 - σήμερα Επιστημονικός συνεργάτης, Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού,  
Αθήνα

#### Ερευνητική εμπειρία :

Μελέτη του χρωμοσώματος 21. Ανίχνευση πολυμορφισμών (SSCP -  
sequencing) και μειωτικής συνδέσεως (linkage). Χρήση του προγράμματος  
ηλεκτρονικού υπολογιστή LINKAGE για ανάλυση μειωτικής συνδέσεως.

Εκτεταμένη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης  
(PCR) για : ανάλυση βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών (SSRs) προς  
κατασκευή μειωτικού χάρτη, μελέτη του συνδρόμου DOWN και μελέτη της  
τρισωμίας 21 σε μωσαϊκό καθώς και της προέλευσης της τρισωμίας 8.

Αναζήτηση νέων γονιδίων για το χρωμόσωμα 21 με απευθείας επιλογή και  
ενίσχυση κλώνων από βιβλιοθήκη ανθρωπίνου cDNA που υβριδίζουν σε  
τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης (YAC) και δημιουργία ειδικά ενισχυμένης  
βιβλιοθήκης. Μελέτη μειωτικής σύνδεσης για το πρωτογενές γλαύκωμα  
ανοικτής γωνίας. Μελέτη αναδιαταγμένων χρωμοσωμάτων, τρισωμιών,

και συνδρόμων που οφείλονται σε αναγνωρισμένα ελλείμματα με τη χρήση πολυμορφικών δεικτών (πχ σύνδρομο Williams). Κλωνοποίηση προς αναζήτηση νέων πολυμορφισμών βραχέων επαναληπτικών αλληλουχιών για το χρωμόσωμα 21.

#### **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ :**

**Avramopoulos, D., Cox, T., Forrest, G.L., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E.** (1992). Linkage Mapping of the Carbonyl Reductase Gene on Human Chromosome 21 Using a DNA Polymorphism in the 3'Untranslated Region. **Genomics** 13, 447-448.

**Avramopoulos, D., Cox, T., Kraus, J.P., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E.** (1993). Linkage Mapping of the Cystathionine Beta Synthase Gene on Human Chromosome 21 Using a Polymorphism in the 3'Untranslated Region. **Human Genetics** 90(5):566-568.

**Avramopoulos, D., Cox, T., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E.** (1992). Linkage Mapping of the AML1 gene on Human Chromosome 21 Using a Polymorphism in the 3'Untranslated Region. **Genomics** 14, 506-507.

**Avramopoulos, D., Chakrawarti, A., and Antonarakis, S.E.** (1993). DNA Polymorphisms in the 3'Untranslated Region of Genes on Human Chromosome 21. **Genomics** 15, 98-102.

Pangalos, C., **Avramopoulos, D. (published note : the first two authors contributed equally to the study Am J Hum Genet 55:217 errata)**, Blouin, J.L., Raoul, O., deBlois, M.C., Prieur, M., Schinzel, A.A., Gika, M., Abazis, D., Antonarakis, S.E. (1994). Understanding the Mechanism(s) of Mosaic for Trisomy 21 Using DNA Polymorphism Analysis. **Am J Hum Genet** 54:473-481.

**Avramopoulos, D., Kitsos, G., Grigoriadou, M., Economou.Petersen,**

E., Vassilopoulos, D., Psilas, K., Petersen, M.B. Evidence for locus heterogeneity in autosomal dominant primary open angle glaucoma. **Acta Ophthalmologica Scandinavica** submitted.

Antonarakis, S.E., **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Talbot, C.C. and Schinzel, A.A. (1993). Mitotic Errors in Somatic Cells Cause Trisomy 21 in about 4.5% of Cases and are Not Associated with Advanced Maternal Age. **Nature Genetics** 3 146-150.

Blouin, J.L., **Avramopoulos**, D., Pangalos, C., Antonarakis, S.E. (1994). Normal Phenotype with Paternal Uniparental Isodisomy for Chromosome 21. **Am J Hum Genet** 53:1074-1078.

Chen, H., Lowther, W., **Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E. (1994). Homologous Loci DXYS156X and DXYS156Y, Contain a Polymorphic Pentanucleotide Repeat (TAAAA)<sub>n</sub> and Map to Human X and Y Chromosomes. **Human Mutation** 4:208-211.

Talbot, C.C. Jr., Warren, A.C., **Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E. (1993). Polymorphic Dinucleotide Repeats at the D3S1417, D3S1418 and D12S271 Loci. **Human Molecular Genetics** 2:1325

McInnis, M.G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M.B., Sharma, V., **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Konig, U., Brahe, C., Cox, T., Warren, A.C., Talbot, C.C., Van Broeckhoven, C., Litt, M., Antonarakis, S.E. (1993). A Linkage Map of Human Chromosome 21 : 43 PCR Markers at Average Intervals of 2.5 cM. **Genomics** 16 562-571.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992). A Comprehensive Linkage Map of the Human Genome. **Science**, 285:67-86. (contribution to chromosome 21).

Antonarakis, S.E., Blouin, J.L., Maher, J., **Avramopoulos**, D.,

Thomas, G., Talbot, C.C. (1992). Maternal Uniparental Disomy for Human Chromosome 14 Due to Loss of a Chromosome 14 from Somatic Cells with Trisomy 14. **Am J Hum Genet** 52 : 1145-1152

Petersen, M.B., Antonarakis, S.E., Hassold, T.J., Freeman, S.B., Sherman, S.L., **Avramopoulos**, D. and Mikkelsen, M. (1993). Paternal nondisjunction in trisomy 21; No maternal age effect and excess of male patients. **Hum Mol Genet** vol.2 no.10 pp 1691-1695.

Chen, H., Kalaitzidaki, M., Warren, A.C., **Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E., (1993). A Novel Zinc Finger cDNA with a Polymorphic Pentanucleotide Repeat (ATTTT)<sub>n</sub> Maps on Human Chromosome 19p. **Genomics** 15, 621 - 625

#### **Συμμετοχή με abstracts στα συνέδρια :**

8th World Congress of Psychiatry, Athens GR 1989

Human Gene Mapping 11, London UK 1991

American Society for Clinical Investigation, AAP/ASCI/AFCR national meeting, Baltimore MD 1992

APS-SPR Annual Meetings, Baltimore MD 1992

3rd International Workshop on Chromosome 21, Baltimore MD 1992

9th International Congress of Human Genetics, San Fransisco CA 1992

4th international workshop on chromosome 21, Paris FR 1993

American Society of Human Genetics meeting, New Orleans 1993

American Society of Human Genetics meeting, Montreal 1994

Hellenic Association of Medical Geneticists 1st Balkan meeting, Thessaloniki 1994

33ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Λήμνος 1995

European Society of Human Genetics meeting, Berlin 1995

Σύνδεσμος Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας, εαρινή συνάντηση, Ιωάννινα 1995

American Society of Human Genetics meeting, Mineapolis 1995



## Abstracts

Smyrnis, N., Mailis, A., **Avramopoulos**, D., Stefanis, C.

Microiontophoretic study on the mode of R-oxaprotiline and its inactive enantiomer (levoprotiline) on hippocampal neurons. 8th World Congress of Psychiatry, Athens 1989.

Warren, A.C., McInnis, M.G., **Avramopoulos**, D., Petersen, M.B., Kalaitsidaki, M., Adelsberger, P.A., Lewis, J.G., Cox, T., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E. (1991). Polymorphisms of GT Repeats and of the 3'Untranslated Region of Genes as Linkage Markers for Human Chromosome 21. Human Gene Mapping 11, London 1991.

McInnis, M.G., Warren, A.C., Cox, T., Petersen, M.B., Kalaitsidaki, M., **Avramopoulos**, D., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E. (1992). Genetic Linkage Map of Human Chromosome 21 Using Short Sequence Repeats. American Society for Clinical Investigation, AAP/ASCI/AFCR national meeting, Baltimore 1992.

**Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E. DNA Polymorphisms in the 3'Untranslated Region of 18 Genes on Human Chromosome 21. Oral presentation APS-SPR Annual Meetings, Baltimore 1992.

McInnis, M.G., Cox, T., Kalaitsidaki, M., Blouin, J.L., **Avramopoulos**, D., Petersen, M.B., Warren, A., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E. (1992). Linkage Map of Human Chromosome 21 Using SSRs and other PCR Typable Polymorphisms. 3rd International Workshop on Chromosome 21, Baltimore 1992

Antonarakis, S.E., **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Talbot, C.C., Schinzel, A.A. and the Down Syndrome Collaborative group (1992). Mitotic Errors Cause Trisomy 21 in about 6% of Cases and are Not Associated with

Advanced Maternal Age. 3rd International Workshop on Chromosome 21, Baltimore 1992

**Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E. DNA Polymorphisms in the 3'Untranslated Region of 18 Genes on Human Chromosome 21. 3rd International Workshop on Chromosome 21, Baltimore 1992

Antonarakis, S.E., Blouin, J.L., Maher, J., Talbot, C.C. and **Avramopoulos**, D. (1992). Maternal Uniparental Disomy for Human Chromosome 14 in De Novo Robertsonian Translocation 13;14. American Society of Human Genetics meeting, San Francisco 1992.

Chen, H., Kalaitzidaki, M., Warren, A.C., **Avramopoulos**, D. and Antonarakis, S.E. (1992) Mapping of a Zinc Finger cDNA on Human Chromosome 19p Using a Pentanucleotide Repeat (ATTTT) polymorphism. American Society of Human Genetics meeting, San Francisco 1992.

McInnis, M.G., Blaschak, J., Cox, T., **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Kalaitzidaki, M., Sharma, V., C. Petersen, M.B., Warren, A.C., Van Broeckhoven, C., Litt, M., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E. (1992). A Linkage Map of Human Chromosome 21 using DNA polymorphic markers genotyped by PCR. American Society of Human Genetics meeting, San Francisco 1992.

Chen, H., **Avramopoulos**, D., Polymeropoulos, M., Blouin, J.L., Chakravarti, A., Antonarakis, S.E. (1992). Characterization and Mapping of a Human Brain cDNA that Maps to Chromosome 21. American Society of Human Genetics meeting, San Francisco 1992.

**Avramopoulos**, D.A., Talbot, C.A.Jr., Gerken, S., Matsunami, M., Lalouel, L.M., White, R., Antonarakis, S.E. (1993). Addition of 7 new highly polymorphic markers to the genetic linkage map of human chromosome 21. 4th international workshop on chromosome 21, Paris 1993.

Blouin, J.L., **Avramopoulos**, D.A., Pangalos, C. and Antonarakis, S.E.(1993). Normal phenotype with paternal uniparental isodisomy for chromosome 21. 4th international workshop on chromosome 21, Paris 1993.

McInnis, M.G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M.B., Sharma, V. **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Konig, U., Brahe, C., Cox, T., Warren, A.C., Talbot, C.C., Van Broeckhoven, C., Litt, M., Antonarakis, S.E. (1993). A Linkage Map of Human Chromosome 21 : 43 PCR markers at average intervals of 2.5 cM. 4th international workshop on chromosome 21, Paris 1993.

Pangalos, C., **Avramopoulos**, D., Blouin, J.L., Raoul, O., de Blois, M.C., Prieur, M., Schinzel, A., Gika, M., Abazis, D., Antonarakis, S.E. (1993). Understanding the Mechanisms of Mosaic Trisomy 21 Using DNA Polymorphism Analysis. American Society of Human Genetics meeting, New Orleans 1993.

Chen, H., Lowther, W., **Avramopoulos**, D., Antonarakis, S.E. (1993). DXYS156 is a Polymorphic Locus due to Expansion of a (TAAA) Motif within a Line Repetitive Element. American Society of Human Genetics meeting, New Orleans 1993.

Blouin, J.L., **Avramopoulos**, D., Pangalos, C., Antonarakis, S.E. (1993). Normal Phenotype With Paternal Uniparental Isodisomy for Chromosome 21. American Society of Human Genetics meeting, New Orleans 1993.

Pangalos, C., **Avramopoulos**, D and Vary, C. (1994). Identification and quantification of mosaicism for trisomies using the polymerase chain reaction. American Society of Human Genetics meeting, Montreal 1994.

Girginoudis, P., **Avramopoulos**, D., Robert, E., Vary, C. and

Pangalos, C. Molecular analysis of a family with three cases of first cousins with free trisomy 21 excludes the existence of a familial predisposing factor for nondisjunction. American Society of Human Genetics meeting, Montreal 1994.

**Avramopoulos, D., Kitsos, G., Grigoriadou, M., Economou.Petersen, E., Vassilopoulos, D., Psilas, K., Petersen, M.B.** Linkage studies in primary open angle glaucoma. American Society of Human Genetics meeting, Montreal 1994.

**Avramopoulos, D., Kitsos, G., Grigoriadou, M., Economou.Petersen, E., Vassilopoulos, D., Psilas, K., Petersen, M.B.** Linkage studies in primary open angle glaucoma. Oral Presentation. Hellenic Association of Medical Geneticists 1st Balkan meeting, Thessaloniki 1994

**Avramopoulos, D., Vary, C., Pangalos, C.** Identification and quantification of mosaicism for trisomies using the polymerase chain reaction (PCR). Hellenic Association of Medical Geneticists 1st Balkan meeting, Thessaloniki 1994

**Avramopoulos, D., Girginoudis, P., Robert, E., Vary, C. and Pangalos, C.** Molecular analysis of a family with three cases of first cousins with free trisomy 21 excludes the existence of a familial predisposing factor for nondisjunction. Hellenic Association of Medical Geneticists 1st Balkan meeting, Thessaloniki 1994

Γυφτοδήμου-Καραγιώργη, Γ., Αβραμόπουλος, Δ., Petersen M.B. Ημιζυγωτία στη γονιδιακή θέση για την ελασίνη σε τρία από τέσσερα διερευνηθέντα παιδιά με σύνδρομο Williams ή Elfin Face. 33ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Λήμνος 1995.

**Avramopoulos, D., Kitsos, G., Grigoriadou, M., Economou.Petersen, E., Vassilopoulos, D., Psilas, K., Petersen, M.B.** Evidence for locus

heterogeneity in autosomal dominant primary open angle glaucoma.  
European Society of Human Genetics meeting, Berlin 1995.

Αβραμόπουλος, Δ., Γρηγοριάδου, Μ., Bugge, M., Brondum-Nielsen, K., Κίτσιου-Τζέλη, Σ., Τσέζου, Α., Γαλά-Βουμβουράκη, Α., Anneren, G., Hertz, J.M., Lacombe, D., Βασιλόπουλος, Δ., Petersen, M.B. Μελέτη μη αποχωρισμού χρωμοσωμάτων στην τρισωμία 8. Ομιλία. Σύνδεσμος Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας, εαρινή συνάντηση, Ιωάννινα 1995.

Γυφτοδήμου-Καραγιώργη, Γ., Αβραμόπουλος, Δ., Γρηγοριάδου, Μ., Petersen M.B. Ημιζυγωτία στη γονιδιακή θέση για την ελασίνη σε παιδιά με σύνδρομο Williams ή Elfin Face. Σύνδεσμος Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας, εαρινή συνάντηση, Ιωάννινα 1995.

Σαρρή, Κ., Γυφτοδήμου-Καραγιώργη, Γ., Αβραμόπουλος, Δ., Γρηγοριάδου, Μ., Παντελιά, Ε., Πάγκαλος, Κ., Αμπαζή, Δ., Κίτσος, Γ., Βασιλόπουλος, Δ., Brondum-Nielsen, K., Petersen, M.B. Μερική τρισωμία 17q22-qter και μερική μονοσωμία Xq27-qter σε ένα κορίτσι με μία ισόρροπη μετατόπιση de novo, αποτέλεσμα μεταζυγωτικής αναδιάταξης. Σύνδεσμος Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας, εαρινή συνάντηση, Ιωάννινα 1995.

**Avramopoulos**, D., Mikkelsen, M., Vassilopoulos, D., Grigoriadou, M., Petersen, M.B., Correlation between high frequency of apolipoprotein E ε4 allele and decreasing maternal age in mothers of children with Down syndrome. American Society of Human Genetics meeting, Mineapolis 1995.

Grigoriadou, M., M., Bugge, **Avramopoulos**, D., M., Kitsiou-Tzeli, S., Anneren, G., Hertz, J.M., Lacombe, D., Tsezou, A., Gala-Voumvouraki, A., Vassilopoulos, D., Brondum-Nielsen, K., Petersen, M.B. Nondisjunction studies in trisomy 8. American Society of Human Genetics meeting, Mineapolis 1995.

Sarri, K., Gyftodimou, J., **Avramopoulos**, D., Grigoriadou, M., Pandelia, E., Pangalos, C., Abazi, D., Kitsos, G., Vassilopoulos, D., Brondum-Nielsen, K., Petersen, M.B. Partial trisomy 17q22-qter and partial monosomy X27-qter in a girl with a de novo unbalanced translocation due to a postzygotic error. American Society of Human Genetics meeting, Mineapolis 1995.

## **ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**