



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ HUNTINGTON ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

***ΕΛΕΟΝΩΡΑ ΚΑΡΤΣΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ***

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, στο εργαστήριο Νευρολογίας και αισθητηρίων οργάνων του τμήματος Ιατρικής.

Επιβλέπων Καθηγητής: Ανδρέας Πλαϊτάκης (Καθηγητής)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή: Ανδρέας Πλαϊτάκης(Καθηγητής)
Νικόλαος Μοσχονάς (Καθηγητής)
Νικόλαος Ανάγνου(Καθηγητής)

Επταμελής εξεταστική επιτροπή: Ανδρέας Πλαϊτάκης(Καθηγητής)
Νικόλαος Μοσχονάς (Καθηγητής)
Νικόλαος Ανάγνου(Καθηγητής)
Χρήστος Λιονής (Αναπληρωτής καθηγητής)
Βάνα Ζαχαρίου (Επίκουρος Καθηγήτρια)
Γιώργος Γουλιέλμος (Επίκουρος Καθηγητής)



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ HUNTINGTON ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

Ανάλυση σε ασθενείς από την Κρήτη, με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη των συμπτωμάτων καθώς και με την τυπική μορφή της νόσου

***ΕΛΕΟΝΩΡΑ ΚΑΡΤΣΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ***



*ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ HUNTINGTON ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΡΗΤΗ ΜΕ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΜΕΝΗ
ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΝΑΡΞΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ**

**ΕΛΕΟΝΩΡΑ ΚΑΡΤΣΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

Αντί αφιέρωσης...

*Η ζωή μάς προσφέρει εμπειρίες και ευκαιρίες
να μάθουμε τον εαυτό μας, τους γύρω μας
και τον κόσμο που μας περιβάλλει.
Μακάρι να έχουμε πάντα ανοιχτά τα μάτια,
τα αυτιά μας και όλες τις αισθήσεις μας,
για να παίρνουμε τα μαθήματα της ζωής
και να γινόμαστε καλύτεροι άνθρωποι.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πολύχρονη παρουσία μου στο χώρο του Πανεπιστημίου Κρήτης με έφερε σε επαφή με πολλούς και αξιόλογους ανθρώπους, οι οποίοι στάθηκαν στο πλευρό μου, κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τόσο ως συνεργάτες όσο και ως φίλοι. Το ελάχιστο που μπορώ να κάνω για τους ανθρώπους που μου συμπαραστάθηκαν σε δύσκολες, αλλά και σε ευχάριστες στιγμές είναι να τους ευχαριστήσω έναν προς έναν.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Ανδρέα Πλαϊτάκη για την συνεργασία μας, την αστείρευτη έμπνευση του, την επιμονή του για το τέλειο αποτέλεσμα. Σε ότι κάνω στο μέλλον θα με ακολουθεί το παράδειγμα του για μεθοδική δουλειά και μαχητικότητα. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον δεύτερο υπεύθυνο καθηγητή μου, γιατί έτσι τον θεωρώ, Νικόλαο Μοσχονά που είχα την τύχη τα πρώτα χρόνια της εργασίας μου να συνεργαστώ μαζί του. Ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη στο πρόσωπο μου, αλλά κυρίως για τις γνώσεις που μου προσέφερε, τη μεθοδικότητα στη δουλειά και την εμβάθυνση σε ό,τι κάνω. Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή Νικόλαο Ανάγνου, για τις σωστές παρατηρήσεις και συμβουλές του πάνω στην εργασία μου.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις συμβουλές τους και το χρόνο που μου διέθεσαν.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να δώσω στους ανθρώπους του εργαστηρίου Γενετικής του Ανθρώπου στο Βιολογικό τμήμα του Πανεπιστημίου Κρήτης που με φιλοξένησε τα πρώτα χρόνια της διατριβής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Ιωάννα Κονταράκη, με την οποία έκανα τα πρώτα μου βήματα στη Μοριακή Βιολογία και έμαθα όχι μόνο να αναπαραγάγω ένα πρωτόκολλο, αλλά να καταλαβαίνω τα βήματα και το σκοπό του πειράματος. Ευχαριστώ την Εμμανουέλα Καψετάκη για την καθοδήγηση της στην εκμάθηση τεχνικών. Ευχαριστώ πρώτα τη φίλη και μετά τη συνεργάτιδα Αγγέλα Πασπαράκη για τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, για την κουβέντα και τη συμπαράσταση της. Ευχαριστώ τον Δρ. Δημήτρη Στραβοπόδη για τις συμβουλές του και την συμπαράσταση σε δύσκολες στιγμές και την Δρ. Μαρία Κοκκινάκη για την συνεργασία, την υπομονή της και την παρέα της. Τέλος ευχαριστώ θερμά τον Άνθρωπο και καθηγητή Αλέξανδρο

Αργυροκαστρίτη για την πολύτιμη βοήθεια του στα πάντα, την οποία έδινε απλόχερα οποιαδήποτε στιγμή και το αστείρευτο χιούμορ του. Αλέξανδρε είμαι σίγουρη ότι μας ακούς και μας βλέπεις από εκεί που είσαι. Είμαι τυχερή που σε γνώρισα.

Από το εργαστήριο Νευρολογίας που έγινε το δεύτερο σπίτι μου, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο συνεργάτη νευρολόγο Μηνά Τζαγκουρνισάκη, για την βοήθεια του στην κλινική μελέτη των ασθενών, στη συλλογή στοιχείων και στην καταγραφή των γενεαλογικών δέντρων. Ευχαριστώ θερμά τον φίλο και συνεργάτη Δρ. Ιωάννη Ζαγανά για τις επιστημονικές μας αναλύσεις και προσεγγίσεις, την Ειρήνη Σκουλά για την πολύτιμη βοήθεια της, ιδιαίτερα στα τελικά πειράματα, την Δρ. Κλεάνθη Σπανάκη για την βοήθεια της στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καθώς και την Αφροδίτη Πετσάκου για την συμβολή της στην ανάλυση της αλληλουχίας της 5' περιοχής του HD γονιδίου. Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Βασίλειο Μαστοροδήμο για την συμπαράσταση όταν την είχα ανάγκη.

Σε όλη αυτή την πορεία μου στον χώρο της έρευνας αρκετοί φίλοι με βοήθησαν είτε με τα λόγια τους, πολλά ή λίγα, είτε με την φυσική τους παρουσία. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Έλσα που βοήθησε να μην εγκαταλείπω τη μάχη, την Ιωάννα που μοιραστήκαμε πολλά, τον Μανώλη για την αμέριστη συμπαράσταση και εμπύχωση, τον Ηλία Κραμποβίτη για τις συμβουλές του και τον καθηγητή Βασίλειο Γαλανόπουλο που με έβαλε στο θαυμαστό χώρο της έρευνας και με δίδαξε επιστήμη και ανθρωπιά. Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου για τη βοήθεια της.

..... Πολλοί λένε ότι σημασία έχει το ταξίδι και όχι ο προορισμός. Εγώ νομίζω ότι είναι ισάξια και τα δύο, γιατί όταν φτάσεις στον προορισμό είσαι έτοιμος να ξεκινήσεις νέο ταξίδι!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Summary	9
Περίληψη – Σκοπός.....	10
Εισαγωγή.....	12
1. Γενικά χαρακτηριστικά και κλινικά συμπτώματα της HD.....	12
2. Νευροεκφυλιστικές ασθένειες με επεκτάσεις αλληλουχιών και ειδικότερα τριπλετών.....	19
3. Οι επαναλήψεις CAG στο ανθρώπινο γονιδίωμα (γενικά) και σε άλλους οργανισμούς.....	27
4. Επέκταση της CAG επανάληψης στη HD για τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς	31
5. Συσχέτιση επανάληψης με την ηλικία έναρξης της νόσου.....	32
5.1 Σχέση αυξημένων επαναλήψεων με τον HD φαινότυπο και τον χρόνο έναρξης της ασθένειας.....	33
5.1.1 Νεανικές περιπτώσεις.....	36
5.1.2 Late-onset περιπτώσεις.....	37
5.1.3 Σποραδικές περιπτώσεις.....	39
6. Έκφραση του HD γονιδίου.....	43
6.1 Προσδιορισμός και τοπολογία του HD mRNA	44
6.2 Προσδιορισμός και τοπολογία της HD πρωτεΐνης.....	47
7. Παθογένεια πρωτεΐνης.....	53
7.1 Η Huntingtin και η συνεργασία της με άλλες πρωτεΐνες.....	60
7.1.1 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την GADPH.....	60
7.1.2 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την HAP.....	62
7.1.3 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την CAM	64
7.1.4 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την HIP	65
7.2 Συσχέτιση νευρικού θανάτου με μιτοχόνδρια.....	67
8. Επέκταση της τριπλέτας (CAG) _n στην HD.....	69
8.1 Υποθέσεις για τον σχηματισμό της επέκτασης (μηχανισμοί).....	70
8.2 Υποθέσεις για το μπλοκάρισμα της αντιγραφής	74
8.3 Τροποποιητικοί παράγοντες.....	76

8.4 Μηχανισμοί μετάλλαξης (γειτονικές αλληλουχίες) 5'-end περιοχή και cis-acting modifiers.....	76
9. Μοριακή ανάλυση της γενετικής θέσης της HD. Ανάπτυξη χαρτών σε σχέση με πολυμορφικούς δείκτες.....	80
10. Ομολογίες στο γονίδιο της HD μεταξύ ανθρώπου και άλλων οργανισμών.....	84
11. Διαγονιδιακά μοντέλα ζώων για την HD.....	89
12. Linkage analysis - Γενετική σύνδεση.....	92
12.1 Χαρτογράφηση γονιδίων ασθενειών με ανάλυση γενετικής σύνδεσης.....	93
12.2 Πλεονεκτήματα των DNA δεικτών	94
12.3 Χρήση των SNPs στη ανάλυση του γονιδιώματος.....	95
12.4 Περιγραφή πολυμορφικών δεικτών (STRs και SNPs) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	98
Υλικά και μέθοδοι.....	99
1. Κλινικές μελέτες.....	99
2. Βιολογικό υλικό.....	99
3. Επιλογή πολυμορφικών δεικτών.....	101
4. Απομόνωση DNA.....	102
4.1 Προετοιμασία λευκοκυττάρων από περιφερικό αίμα.....	102
4.2 Εξαγωγή DNA από λευκοκύτταρα.....	103
4.3 Παρασκευή διαλυμάτων.....	104
5. Ποσοτικοποίηση του DNA.....	105
5.1 Με τη βοήθεια του σπεκτροφωτόμετρου	106
5.2 Με τη βοήθεια πηκτώματος αγαρόζης.....	107
6. Αναπαραγωγή τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) –Polymerase Chain Reaction.....	107
6.1 Ραδιενεργή σήμανση ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών με T ₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση.....	107
6.2 Κατασκευή κολώνας χρωματογραφίας sephandex-G-25.....	108
6.3 Μέτρηση ραδιενεργής ενεργότητας των ιχνηθετημένων μορίων DNA.....	109
6.4 Υπολογισμός θερμοκρασίας λιώσιματος (melting) των εκκινητών.....	109

7.	Συνθήκες PCR.....	110
7.1.	Συνθήκες PCR για την CAG επανάληψη.....	110
7.2.	Συνθήκες PCR για τους πολυμορφικούς δείκτες (STRs).....	112
7.2.1	D4S3038.....	112
7.2.2	D4S43.....	112
7.2.3	D4S136.....	113
7.2.4	D4S182.....	114
7.2.5	D4S127.....	115
7.2.6	D4S95.....	115
7.2.7	Δ2642.....	116
7.2.8	D4S1337.....	117
7.2.9	D4S180.....	117
7.2.10	D4S3034.....	118
7.2.11	D4S126.....	119
7.2.12	ADRA2C.....	120
7.2.13	D4S2925.....	120
7.2.14	D4S431.....	121
8.	Επεξεργασία και ανάλυση προϊόντων PCR.....	122
8.1	Προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης 2%.....	122
8.1.1	Επεξεργασία πηκτώματος αгарόζης 2%.....	123
8.2	Προετοιμασία πηκτώματος ακρυλαμίδης 6%.....	123
8.2.1	Επεξεργασία πηκτώματος ακρυλαμίδης 6%.....	125
8.3	Προετοιμασία του LI-COR IR ² (gel documentation system) για ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων	125
8.3.1	Προετοιμασία πηκτώματος ακρυλαμίδης για το LI-COR IR ²	126
8.4	Παρασκευή διαλυμάτων.....	127
9.	Συνθήκες PCR για τα SNPs.....	128
10.	Sequencing του φάγου M13mp18.....	129
10.1	Annealing του DNA και του εκκινητή.....	129
10.2	Αντίδραση ραδιενεργής σήμανσης.....	130
10.3	Αντίδραση τερματισμού.....	130
10.4	Διαλύματα.....	131
11.	Συχνότητες των STRs αλληλομόρφων στο γενικό πληθυσμό.....	132

12. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing).....	138
12.1 Ανάλυση αλληλουχίας του 5' άκρου του HD γονιδίου που περιέχει την επανάληψη CAG	138
12.2 Ανάλυση αλληλουχιών ανοδικά της 5' περιοχής του HD γονιδίου.....	138
12.2.1 Παρασκευή και ανάλυση αντιδράσεων για sequencing.....	140
13. Βάσεις δεδομένων.....	143
14. Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης.....	144
14.1 Ανάλυση σύνδεσης ανισορροπίας και συνεργασία αλληλομόρφων.....	144
14.2 Κλάσμα ανασυνδιασμού (θ).....	145
14.3 Υπολογισμός ηλικίας.....	145
Αποτελέσματα.....	150
1. Περιγραφική επιδημιολογική μελέτη των HD οικογενειών στην Κρήτη.....	150
1.1 Late-onset οικογένειες.....	152
1.2 Typical onset οικογένειες.....	154
2. Μελέτη της επέκτασης της CAG επανάληψης.....	156
2.1 Σε Late-onset HD γενεαλογικά δέντρα.....	156
2.2 Σε typical-onset HD γενεαλογικά δέντρα.....	170
3. Γενετική ανάλυση.....	172
4. Ανάλυση σύνδεσης ανισορροπίας και εκτίμηση ηλικίας.....	194
5. Υπολογισμός των CAG τριπλετών στο 5' άκρο του HD γονιδίου.....	196
6. DNA πολυμορφισμοί στις αλληλουχίες ανοδικά του 5' άκρου του HD γονιδίου....	198
Συζήτηση.....	204
Βιβλιογραφία.....	217

SUMMARY

HD families in which late onset occurs consistently in affected members are rare. The objectives of this work were to study such late-onset HD families encountered on Crete, and to trace their genetic origin. Nine late-onset HD kindreds (61 affected members) were studied along with two typical HD families (17 affected members). We genotyped 33 late-onset Cretan HD chromosomes, 9 Cretan typical HD chromosomes and 114 Cretan control chromosomes using 14 STR markers and 20 SNPs that map to 4p16.3.

In contrast to the typical HD pedigrees, the late-onset HD families lacked anticipation and juvenile cases. The expanded CAG repeat (36-42 units) in these families remained either stable or it showed small increment instability, even when transmitted through the father. All late-onset HD chromosomes shared a conserved haplotype defined by the markers D4S95:1090-D4S127:157-rs362277:A-rs3025814:G-rs2530596:A that span a 0.277 Mb segment on 4p16.3.

Coalescence analysis traced this haplotype to a founder who lived about 1,000 years ago. In contrast, each of the two typical HD disease pedigrees derived from a different founder. Sequencing of a 5-Kb DNA segment immediately upstream of the HD gene revealed a novel single nucleotide polymorphism at -1757 bp relative to translation start site, which was more prevalent in Cretan than in North American chromosomes.

All late-onset HD families on Crete arose from a common founder with the disease's mutation evolving over the centuries via small-increment instability. These findings suggest that cis-acting factors may be operational.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - ΣΚΟΠΟΣ

Οικογένειες με την νόσο Huntington, τα μέλη των οποίων εμφανίζουν τα συμπτώματα σε μεγάλη ηλικία (άνω των 50) είναι σπάνιες. Τέτοιες οικογένειες με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη της νόσου (late-onset) έχουν ανιχνευθεί σε μεγάλο ποσοστό στο νησί της Κρήτης. Με αυτή την εργασία προσπαθήσαμε να μελετήσουμε αυτές τις οικογένειες και να καθορίσουμε τη γενετική απαρχή της νόσου στο νησί. 9 late-onset HD οικογένειες (61 προσβεβλημένα μέλη) μελετήθηκαν, καθώς και 2 οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου (typical-onset) με 17 προσβεβλημένα μέλη.

Στις late-onset οικογένειες από την Κρήτη, σε αντίθεση με άλλα περιστατικά της HD σε άλλα μέρη της Κρήτης, της Ελλάδας, αλλά και του υπόλοιπου κόσμου, δεν παρατηρούνται περιστατικά με εφηβική ή και νεανική έναρξη της ασθένειας, αλλά ούτε και το φαινόμενο «anticipation». Το φαινόμενο “anticipation”, αναφέρεται στην μετακίνηση προς νεώτερα άτομα του παθολογικού γονιδίου με μεγάλο μήκος τριπλετών (μεγαλύτερο από του γονέα) και τη χειρότερη εκδήλωση της ασθένειας. Αυτές οι μοναδικές κλινικές μορφές σχετίζονται με σταθερή μεταβίβαση της CAG επανάληψης (36-42 τριπλέτες), το μέγεθος της οποίας παρέμενε σταθερό ή παρουσίαζε σε κάποιες περιπτώσεις μια μικρή σταδιακή αστάθεια, ακόμα και όταν η μεταφορά ήταν μέσω του πατέρα, σε αντίθεση με την ασταθή επέκταση που διακρίνεται στην κλασική μορφή της νόσου.

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι να διερευνηθεί κατά πόσον η σταθερότητα της (CAG) επανάληψης στον ειδικό πληθυσμό της Κρήτης σχετίζεται με συγκεκριμένη δομή του DNA των ασθενών. Τα αποτελέσματα ίσως βοηθήσουν στην κατανόηση του μηχανισμού της αστάθειας στους υπόλοιπους πληθυσμούς, μια και η αστάθεια της επεκτεινόμενης περιοχής του γονιδίου είναι ο κύριος λόγος ανάπτυξης της γονιδιακής μετάλλαξης.

Έγινε απλοτυπική ανάλυση σε 33 late-onset HD χρωμοσώματα, 9 typical-onset HD χρωμοσώματα και σε 114 χρωμοσώματα ελέγχου από τον Κρητικό πληθυσμό, χρησιμοποιώντας 14 STR δείκτες και 20 SNPs που χαρτογραφούνται στην περιοχή 4p16.3

Όλα τα late-onset HD χρωμοσώματα μοιράζονται ένα συντηρημένο απλότυπο που καθορίζεται από τους δείκτες: D4S95:1090, D4S127:157, rs362277:A,

rs3025814:G, rs2530596:A. Το μήκος αυτής της συντηρημένης περιοχής είναι 0.277 Mb. Η Coalescence ανάλυση συνέδεσε αυτό τον απλότυπο με ένα αρχικό ιδρυτή (founder) της νόσου που έζησε περίπου πριν 1000 χρόνια. Αντίθετα, οι typical-onset HD οικογένειες παρουσίασαν ένα διαφορετικό απλότυπο, (D4S95:1090, D4S127:159/155, rs362277:G/A, rs3025814:C, rs2530596:G), που υποδηλώνει ότι οι δύο οικογένειες αυτές προέρχονται από διαφορετικό πρόγονο. Ανάλυση αλληλουχίας ενός τμήματος DNA 5Kb ανοδικά του HD γονιδίου έδειξε ένα πολυμορφισμό σε ένα νουκλεοτίδιο στη θέση -1757, σχετικά με την θέση έναρξης της μετάφρασης, ο οποίος είναι πιο επικρατής στα χρωμοσώματα από τον Κρητικό πληθυσμό σε σχέση με αυτά από τη Βόρειο Αμερική.

Όλες οι late-onset HD οικογένειες της Κρήτης προήλθαν από ένα κοινό πρόγονο που έφερε την μετάλλαξη της ασθένειας, η οποία κατά τη διάρκεια των αιώνων εξελίχθηκε μέσω μικρής και σταδιακής αστάθειας. Τα ευρήματά μας συνηγορούν ότι πλευρικές αλληλουχίες πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου στην ιδιαίτερη μορφή (late-onset) που εμφανίζεται στο νησί της Κρήτης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά χαρακτηριστικά και κλινικά συμπτώματα της HD

Η νόσος του Huntington είναι μια αυτοσωμική επικρατής νευροεκφυλιστική διαταραχή του ανθρώπου. Είναι μια χρόνια εκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Κ.Ν.Σ.), χωρίς να εξαιρούνται και περιοχές του Περιφερικού Νευρικού Συστήματος (Π.Ν.Σ) (Conneally P.M. 1984, Hayden M.R. et al 1982). Αν και κληρονομείται σαν μια αυτοσωμική επικρατής μετάλλαξη, με 100% διεισδυτικότητα υπάρχει μια απόκλιση στο φαινότυπο και στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα αφορούν διανοητικές, συναισθηματικές και κινητικές διαταραχές. Οι σποραδικές περιπτώσεις είναι σπάνιες, αλλά υπαρκτές.

Ιστορικά στοιχεία

Η συγκεκριμένη νευροεκφυλιστική νόσος πήρε το όνομα της από τον George Huntington το 1872, ο οποίος δημοσίευσε το πρώτο επιστημονικό κείμενο με τίτλο "On Chorea". Ο όρος χορεία βασίζεται στην ελληνική λέξη χορός, και αφορά τυχαίες χορευτικές κινήσεις. Αν και δεν ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την ασθένεια, ήταν αυτός που έκανε την πρώτη πλήρη περιγραφή της ασθένειας, η οποία και θεωρείται έκτοτε ως κλασική, βασιζόμενος σε προγενέστερες παρατηρήσεις του πατέρα του και του παππού του (Conneally P.M. 1984). Οι πρόγονοι των HD ασθενών τοποθετούνται από τον G. Huntington στην Αγγλία, αλλά η πληθώρα των ασθενών περιγράφηκε στη Βενεζουέλα το 1955 από τον γιατρό Amerigo Negrette σε ένα μικρό ψαροχώρι (San Luis) έξω από το Maracaibo. Ο Negrette παρατήρησε πολλούς από τους κατοίκους του χωριού να περπατούν σαν μεθυσμένοι και γρήγορα ανακάλυψε ότι είχαν μια οικογενειακή διαταραχή, επονομαζόμενη από τους ντόπιους ως El Mal de San Vito (St. Vito dance). Σύντομα κατάλαβε ότι η ασθένεια αυτή ήταν η νόσος του Huntington.

Κλινική εικόνα

Κλινικά η ασθένεια εκφράζεται με δύο μορφές, την κλασική μορφή της χορείας και την άκαμπτη (rigid).

Στην κλασική μορφή η νόσος εμφανίζεται ξαφνικά και προοδευτικά συνήθως στην τρίτη με τέταρτη δεκαετία της ζωής (38-40 χρόνια). Η κλινική εικόνα συνοδεύεται από ανώμαλες ακούσιες κινήσεις (χορεία), πνευματική καθυστέρηση και ένα ευρύ φάσμα από ψυχιατρικές διαταραχές. Αν και μπορεί να υπάρχουν ψυχιατρικές διαταραχές και πριν την εκδήλωση της νόσου, δεν είναι δυνατή η διάγνωση πριν την εμφανή εκδήλωση των χορειακών κινήσεων. Αρχικά εκδηλώνεται προοδευτική διανοητική καθυστέρηση που ξεκινά με ήπιες, αλλά χαρακτηριστικές μη-ελεγχόμενες κινήσεις κυρίως στα μάτια. Τα συμπτώματα χειροτερεύουν μέσα σε διάστημα 10-20 χρόνια ως το θάνατο. Επειδή τα συμπτώματα της νόσου ξεκινούν μετά την αναπαραγωγική ηλικία, οι ασθενείς έχουν ήδη δώσει το παθολογικό γονίδιο στους απογόνους τους (Goodfellow P.N. 1993).

Συγκεκριμένα οι υπερκινησίες ξεκινούν από τους μυς του προσώπου και των χεριών και σταδιακά επεκτείνονται σε όλο το σώμα με χαρακτηριστική επικράτηση στα κεντρικά τμήματα των άκρων. Η ομιλία είναι άνιση και διακεκομμένη και η δυσαρθρία είναι προφανώς συνδεδεμένη με τις χορειακές κινήσεις της γλώσσας, του στόματος και της σιαγόνας. Η βάδιση επηρεάζεται τόσο, όσο φαίνεται ότι το άτομο "χορεύει", χωρίς ο ασθενής να πέφτει. Δεν παρουσιάζονται παραλύσεις ή αισθητικές διαταραχές και το πυραμιδικό σύστημα είναι ακέραιο. Διαταραχή του μυϊκού τόνου εκδηλώνεται σαν υποτονία ή υπερτονία ή και ποικιλοτονία του κορμού και των άκρων. Υπάρχει απώλεια βάρους, πιθανόν λόγω της παραπάνω ενέργειας που χρειάζονται για τις επιπλέον κινήσεις, αλλά και για να αυξήσουν την παραπάνω ενέργεια στα βασικά γάγγλια. (Hayden M.R. et al 1981, Connealy P.M. 1984, Folstein et al 1989). Όσον αφορά τις ψυχιατρικές διαταραχές προηγούνται της εκδήλωσης των χορειακών κινήσεων με ευερεθιστότητα, συναισθηματική αστάθεια, μείωση της ικανότητας προσοχής και συγκέντρωσης, μελαγχολία με έντονη τάση για αυτοκτονία, ακόμα και σχιζοφρενική ψύχωση. Με το πέρασμα του χρόνου παρουσιάζεται έντονα πνευματική ύφεση, διαταραχές της μνήμης και της κρίσεως.

Η άκαμπτη (rigid) μορφή, συχνά αναφέρεται ως Δυτική παρέκκλιση και εμφανίζεται κυρίως σε μικρές ηλικίες (juvenile onset). Το 10%-16% των περιπτώσεων έχουν έναρξη σε νεανική ηλικία (πριν τα 20). Τα κλινικά συμπτώματα είναι πιο σοβαρά στις νεανικές περιπτώσεις και περιλαμβάνουν μυϊκή δυσκαμψία (rigidity), αργές κινήσεις, τρέμουλο και κυρτή θέση του σώματος προς τα μπρος, που συνήθως βλέπουμε στην Parkinson, αλλά όχι στην χορειακή μορφή. Η πνευματική

καθυστέρηση είναι παρόμοια και στους δύο τύπους. (Connealy P.M. 1984, Folstein et al 1989).

Επιδημιολογία

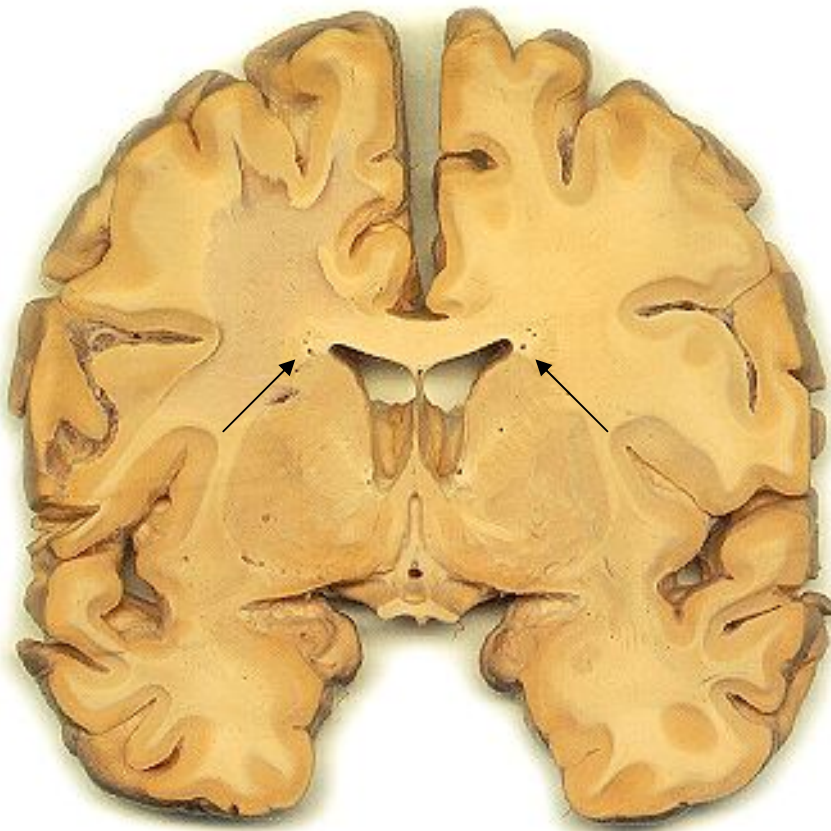
Η νόσος του Huntington εμφανίζεται σε 50 –100 άτομα ανά εκατομμύριο στο γενικό πληθυσμό. Η αρχική μετάλλαξη πιθανολογείται ότι συνέβη στη Β.Δ. Ευρώπη και έπειτα εξαπλώθηκε στον υπόλοιπο κόσμο παράλληλα με τη δημιουργία και μετανάστευση των διαφόρων φυλών. Τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου ανά τον κόσμο φαίνονται στον **πίνακα 1**. Στην Αφρική εικάζεται ότι η νόσος έχει διαφορετική προέλευση από την Ευρώπη, ενώ στην Ιαπωνία διαφορετική προέλευση από Ευρώπη και Αφρική.

Πίνακας 1.	
Πληθυσμός	Συχνότητα HD ασθενών ανά εκατομμύριο
Νότια Αφρική (μαύροι)	<0.6
Κίνα	2-4
Ιαπωνία	1-4
Χογκ Κονγκ	3.7
Φιλανδία	6.0
Βόρεια Ιρλανδία	64
Σκωτία	99.4
Νότια Ουαλία	76.1
Ευρώπη	40-100
Ηνωμένες πολιτείες	100

Παθοφυσιολογία

Παθολογοανατομικά εντοπίζονται εκφυλιστικές αλλοιώσεις που κυριαρχούν στο νεοραβδωτό σώμα και τον μετωπιαίο λοβό. Η HD συσχετίζεται με προοδευτική αποδιάταξη των νευρών σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και την παρουσία αστροκυττάρων που συσσωρεύονται από την καταστροφή γειτονικών νευρώνων (γλοίωση). Σε προχωρημένες καταστάσεις, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου σε νεαρή ηλικία, το βάρος του εγκεφάλου μπορεί να μειωθεί έως και 20%-30%. Οι νευροεκφυλιστικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα αρχικά στον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος υποδομές των βασικών γαγγλίων, γνωστά ως νεοραβδωτό σώμα. (Τα βασικά γάγγλια αποτελούνται από εξειδικευμένες ομάδες νευρώνων στα ημισφαίρια, βαθιά στον εγκέφαλο, όπου οργανώνουν τη κινητική συμπεριφορά). Δομές όπως ο κερκοφόρος πυρήνας, το κέλυφος η ωχρή σφαίρα, η

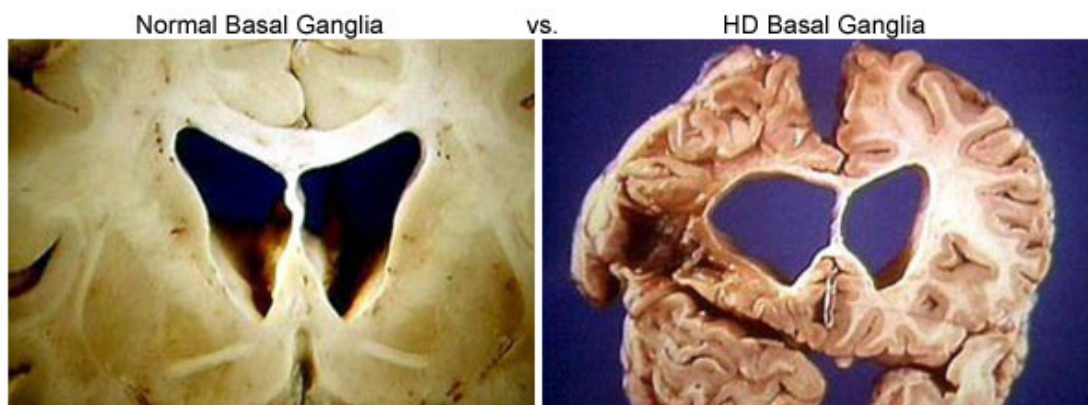
μέλαινα ουσία όπως και ο υποθαλάμιος πυρήνας βρίσκονται σε λειτουργική σύνδεση με τα βασικά γάγγλια (**Εικόνες 1, 2, 3**). Η νόσος επίσης σχετίζεται με νευρική εκφύλιση στον κροταφικό και μετωπιαίο λοβό του εγκεφαλικού φλοιού, όπου επηρεάζονται κυρίως οι νευρώνες της VI στοιβάδας ενώ στις στοιβάδες III και V πολύ λιγότερο. Αυτό το τμήμα του εγκεφάλου είναι υπεύθυνο για ολοκληρωμένες εγκεφαλικές λειτουργίες, κινήσεις και αισθήσεις. Επίσης παρατηρείται εκφύλιση νευρώνων στο θάλαμο, τη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας, στην ωχρά σφαίρα, τον υποθαλάμιο πυρήνα και την παρεγκεφαλίδα (Reddy P.H. et al 1999, Tobin A. J. et al 2000).



Εικόνα 1. Τομή εγκεφάλου από φυσιολογικό άτομο. Φαίνεται η συμπαγής δομή του εγκεφάλου. Στο κεντρικό τμήμα υπάρχουν τα βασικά γάγγλια και είναι χαρακτηριστικές οι μικρές οπές (βλ. βέλη).

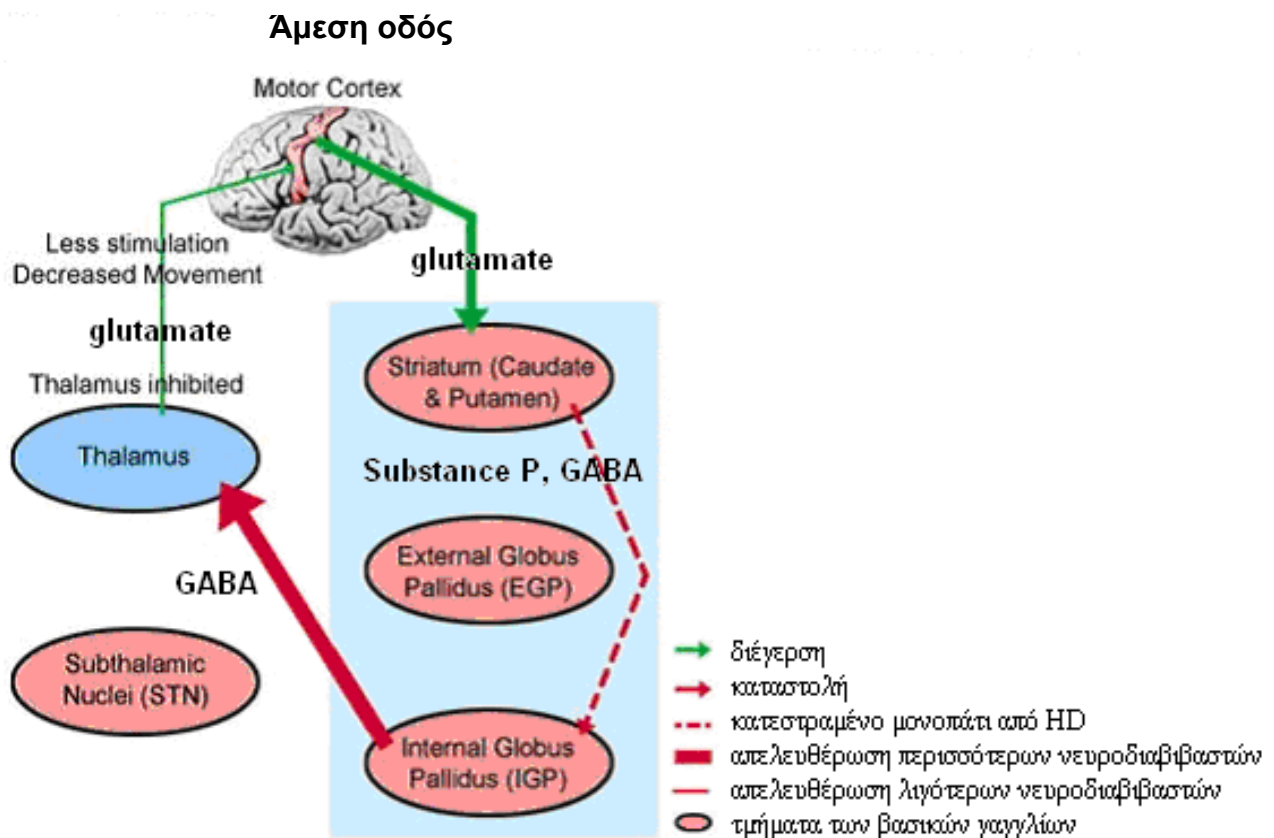


Εικόνα 2. Η εκτεταμένη διεύρυνση των πλάγιων κοιλιών που φαίνεται εδώ οφείλεται στην ατροφία της κεφαλής του κερκοφόρου πυρήνα από απώλεια νευρώνων στην Huntington Disease. Η HD φαίνεται χονδρικά σ' αυτή την στεφανιαία τομή του εγκεφάλου. Η εικόνα επιδεικνύει χαρακτηριστικά την ατροφία του κερκοφόρου πυρήνα με επακόλουθη αύξηση στο μέγεθος των πλάγιων κοιλιών.



Εικόνα 3. Τα βασικά γάγγλια του ανθρώπινου εγκεφάλου. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η συμπαγής δομή σ' αυτή την περιοχή (κεντρική). Στη δεξιά εικόνα HD ατόμου παρουσιάζονται μεγαλύτερα ανοίγματα, που οφείλονται στον προοδευτικό θάνατο των νευρικών κυττάρων.

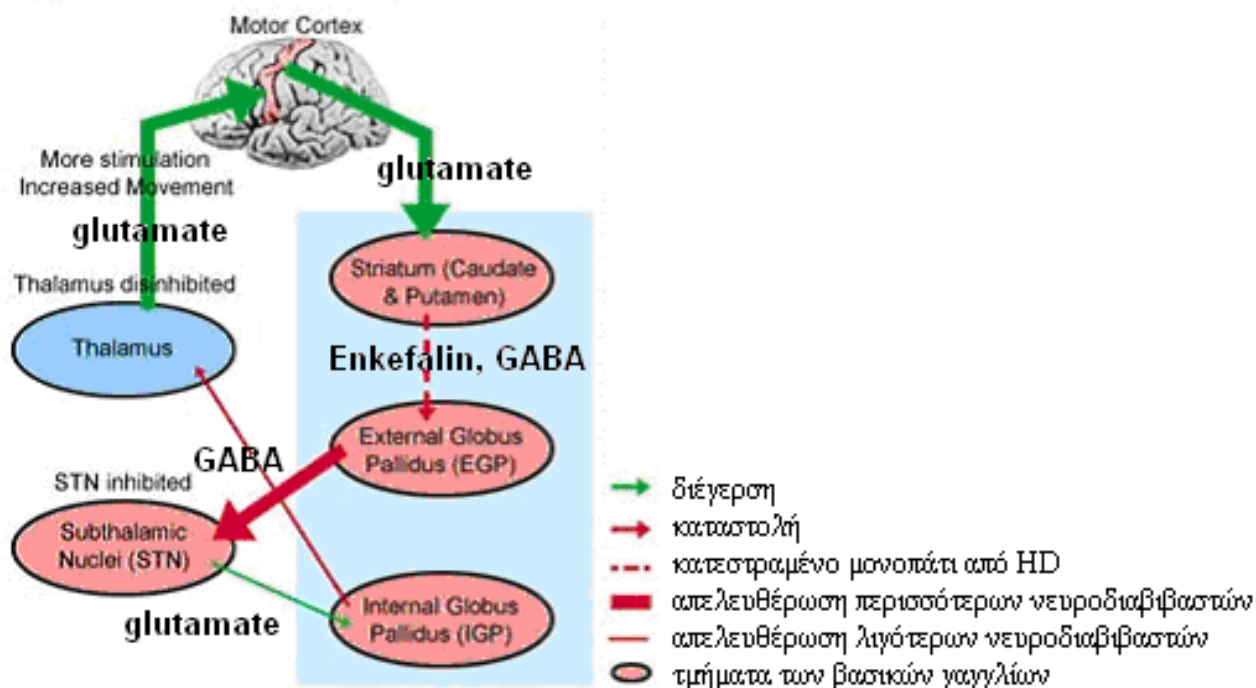
Οι εκφυλιστικές αλλαγές στην έναρξη της HD επηρεάζουν ορισμένους νευρώνες στο νεοραβδωτό σώμα, αυτά που νευρώνουν την ωχρά σφαίρα και την μέλαινα ουσία, γνωστά ως ακανθώδης νευρώνες μεσαίου μεγέθους. Αυτοί οι νευρώνες εκκρίνουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), ένα νευροδιαβιβαστή που αναστέλλει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από άλλους νευρώνες, την εγκεφαλίνη και την ουσία P. Μια θεωρία προτείνει ότι η επιλεκτική απώλεια αυτών των ειδικών νευρώνων, λόγω μείωσης των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών, προκαλεί μειωμένη αναστολή (αυξημένη δραστηριότητα) του θαλάμου. Έτσι ο θάλαμος αυξάνει την επίδραση σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, κάτι που μπορεί να οδηγήσει στις αποδιοργανωμένες και υπερβολικές κινήσεις της χορείας (Εικόνα 4,5).



Εικόνα 4. Όταν πεθαίνουν οι νευρώνες στην HD, η έσω μοίρα της ωχρής σφαίρας (IGP) λαμβάνει λιγότερους νευροδιαβιβαστές από ότι λάμβανε πιο πριν. Η IGP ερμηνεύει τη χαμηλή ποσότητα των νευροδιαβιβαστών σαν λιγότερη αναστολή, το οποίο σημαίνει ότι θα απελευθερώσει περισσότερους νευροδιαβιβαστές από ότι συνήθως. Καθοδικά από την IGP, ο θάλαμος μετέπειτα λαμβάνει ένα ασυνήθιστο αριθμό νευροδιαβιβαστών, κάνοντας τον να αναστέλλεται περισσότερο. Η μεγαλύτερη αναστολή του θαλάμου, οδηγεί σε απελευθέρωση λιγότερων μορίων νευροδιαβιβαστών προς τον κινητικό φλοιό. Το αποτέλεσμα της άμεσης οδού είναι να διεγείρει τον κινητικό φλοιό, οδηγώντας σε ασυνήθιστη κινητικότητα στους HD ασθενείς.

Motor cortex: κινητικός φλοιός, caudate nucleus: κερκοφόρος πυρήνας, putamen: κέλυφος, EGP: έξω μοίρα της ωχράς σφαίρας, IGP: έσω μοίρα της ωχράς σφαίρας, STN: υποθαλάμιος πυρήνας, thalamus: θάλαμος, glutamate: γλουταμικό οξύ.

Έμμεση οδός



Εικόνα 4. Στην πορεία της HD το έμμεσο μονοπάτι είναι το εξής: Αρχικά όταν πεθαίνει ένας νευρώνας στο νεοραβδωτό σώμα η έξω μοίρα της ωχράς σφαίρας (EGP) δεν λαμβάνει τόσους νευροδιαβιβαστές όσους σε φυσιολογική κατάσταση. Η EGP ερμηνεύει αυτή τη μείωση των νευροδιαβιβαστών σαν λιγότερη καταστολή και έτσι απελευθερώνει περισσότερους νευροδιαβιβαστές απ' ότι φυσιολογικά. Ένα άλλο τμήμα του εγκεφάλου, ο υποθαλαμικός πυρήνας (STN) λαμβάνει αυτήν την αύξηση των νευροδιαβιβαστών από την EGP. Ο υποθαλαμικός πυρήνας καταστέλλεται ακόμα περισσότερο και έτσι απελευθερώνει λιγότερους νευροδιαβιβαστές. Επειδή το φυσιολογικό αποτέλεσμα των σημάτων από τον υποθαλαμικό πυρήνα είναι να διεγείρει την IGP, η IGP τερματίζει σχετικά καταστέλει και απελευθερώνει λιγότερους νευροδιαβιβαστές. Ο θάλαμος με το να δέχεται λιγότερους νευροδιαβιβαστές από την IGP αντιλαμβάνεται αυτό το σήμα σαν μικρότερη καταστολή. Ο θάλαμος έπειτα απελευθερώνει περισσότερους νευροδιαβιβαστές στον κινητικό φλοιό, το οποίο οδηγεί σε υπερδιέγερση. Το net effect του κυτταρικού θανάτου στο ραβδωτό σώμα, σύμφωνα με αυτό το μονοπάτι έπειτα υπερδιεγείρεται από τον κινητικό φλοιό.

Το πράσινο βέλος υποδηλώνει ενεργοποίηση και το κόκκινο καταστολή των αντίστοιχων δομών. Το πάχος του βέλους δείχνει το μέγεθος της ενεργοποίησης ή της καταστολής. Motor cortex: κινητικός φλοιός, caudate nucleus: κερκοφόρος πυρήνας, putamen: κέλυφος, EGP: έξω μοίρα της ωχράς σφαίρας, IGP: έσω μοίρα της ωχράς σφαίρας, STN: υποθαλάμιος πυρήνας, thalamus: θάλαμος, glutamate: γλουταμικό οξύ.

Έχει παρατηρηθεί επίσης μειωμένη είσοδος (uptake) της ντοπαμίνης μέσα στο νεοραβδωτό σώμα και μπορεί να παίζει πιθανά ένα ρόλο στις χορειακές κινήσεις. Άλλες έρευνες δείχνουν ότι η χειροτέρευση στα ενεργειακά μονοπάτια (δυσλειτουργία μιτοχονδρίων) μπορεί να προκαλέσει μια υπερβολική ενεργοποίηση (εξωτοξικότητα) από νευροδιαβιβαστές, όπως ο N-methyl-D-aspartate (NMDA). Αυτό μπορεί να προκαλέσει καταστροφή ή και απώλεια των νευρώνων (απόπτωση). Τέλος η παρουσία τοξικών συστατικών (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) που έχουν ανιχνευθεί στα νευρικά κύτταρα φαίνεται να εμπλέκεται στην καταστροφή των

κυττάρων του νεοραβδωτού σώματος. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στην απώλεια νευρώνων που εμφανίζεται σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

2. Νευροεκφυλιστικές ασθένειες με επεκτάσεις αλληλουχιών και ειδικότερα τριπλετών.

Περισσότερες από 12 νευροεκφυλιστικές διαταραχές αποδίδονται σε πολυμορφισμούς απλών DNA επαναλήψεων μέσα σε διαφορετικά γονίδια. Αυτές οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις είναι του τύπου: (CGG) n (CCG) n , (CTG) n (CAG) n και (CAA) n (TTC) n και ο φυσιολογικός τους αριθμός είναι περίπου 30. Άτομα με αριθμό επαναλήψεων πάνω από 30 μπορούν να μεταφέρουν τις αυξημένες επαναλήψεις στους απογόνους τους. Στις επόμενες γενιές η επέκταση γίνεται πιο συχνή και κάθε επακόλουθη επέκταση είναι μεγαλύτερη από τις προηγούμενες. (Anticipation) (Samadashwily G. M. et al 1997).

Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις εντός των γονιδίων που δείχνουν επέκταση στις επόμενες γενιές, συμμετέχουν στο μηχανισμό μετάλλαξης σε τουλάχιστον 9 ανθρώπινες ασθένειες (**Πίνακας 2**). Μικρή επέκταση των τρινουκλεοτιδίων πέραν του φυσιολογικού ορίου δίνει ενδιάμεσα αλληλόμορφα, τα οποία στην επόμενη γενιά μπορεί να αποκτήσουν περισσότερες τριπλέτες και να οδηγήσουν σε μεταλλαγμένο φαινότυπο. Αυξανόμενες επαναλήψεις σχετίζονται με μεγάλη μειωτική αστάθεια και υψηλά ποσοστά μετάλλαξης.

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η σχέση αυτού του τύπου τριπλετών με την παθογένεια αυτών των ασθενειών, διάφορα ερωτήματα έχουν προκύψει, όπως: α) γιατί οι επεκτάσεις είναι πιο συχνές απ' ό,τι οι συστολές; β) γιατί λαμβάνουν χώρα κατά την μητρική μεταφορά, όπως στο σύνδρομο του εύθραυστου X ή κατά την πατρική μεταφορά, όπως στην περίπτωση της χορείας του HD, SCA1, SBMA και DRPLA; γ) πως αυτές οι μεταλλάξεις επιδρούν στην έκφραση ή τη λειτουργία του γονιδίου ή της πρωτεΐνης; και δ) πως αυτές οι μεταλλάξεις αυξάνονται και διασπείρονται στους ανθρώπινους πληθυσμούς και αυξάνονται οι συχνότητές τους, ενώ δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο σε άλλα είδη;

Πίνακας 2				
ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ				
ΤΡΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ				
Νόσος	Χρωμοσωμική θέση	Τρινουκλεοτιδική επανάληψη	Φυσιολογικό μέγεθος	Παθολογικό μέγεθος
Spinobulbar muscular Atrophy (SBMA)	Xq21.3	CAG repeat of androgen receptor gene	13-30	30 - 62
Fragile X Syndrome (FRAXA)	Xq27.3	CGG repeat of FMR - 1 gene	6-54	50 - 1500
Myotonic Dystrophy (MD)	19q13.3	CTG repeat of cAMP-dependent Muscle Protein kinase	5-37	44 - 3000
Huntington's Disease (HD)	4p16.3	CAG repeat of HD gene	9-37	37 - 121
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	6p24	CAG repeat of unknown gene function	25-36	43 - 81
Dentatorubropallidoluysian atrophy (DRPLA)	12p	CAG repeat of CTG-B37 gene for protein atrofina-1	6-35	>49
Haw River Syndrome (HRS)	Close to DRPLA locus	CAG repeat		
Machado Joseph Disease (MJD ή SCA3)	14q24.3	CAG repeat of MJD-1	3-40	62-82
Fragile site associated with wild mental retardation (FRAXE)		CCG repeat		

Γενικά συμπτώματα

Οι ασθένειες που σχετίζονται με τους κινητικούς νευρώνες έχουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα, όπως παράλυση, μυϊκή ατροφία, σπαστικότητα, που είναι αποτελέσματα επιλεκτικής εκφύλισης διαφόρων υποομάδων νευρώνων. Η αδυναμία και η ατροφία φανερώνεται σε ασθένειες των μεγάλων α-κινητικών νευρώνων του στελέχους και του νωτιαίου μυελού, ενώ η σπαστικότητα σχετίζεται με αλλοιώσεις των ανώτερων κινητικών νευρώνων.

Οι νόσοι SCA1, (SCA3-MJD), HD, SBMA, DRPLA οφείλονται σε ασταθή, αλλά μικρή επέκταση του CAG μέσα στην κωδική περιοχή και το γονιδιακό προϊόν ενώ υπάρχει παντού επηρεάζει μόνο ειδικές περιοχές στο Κ.Ν.Σ. Σε όλες τις ασθένειες που σχετίζονται με γλουταμίνη έχουμε χάσιμο των νευρών με γλοίωση, αλλά όμως δεν παρατηρείται εναπόθεση εξωκυττάριου υλικού ή ενδοκυτταρικά

έγκλειστα. Συμπτώματα των ασθενειών εκδηλώνονται παντού (widespread expression), αλλά οι ασθένειες έχουν να κάνουν με χάσιμο νευρώνων σε ειδικές περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Ίσως η πολυγλουταμινική περιοχή έχει να κάνει μ' αυτές τις ασθένειες με ένα κοινό μηχανισμό παθογένεσης (**πίνακας 3**), (Ross C.A. 1995). Οι υπόλοιπες νόσοι οφείλονται σε άλλες τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε μη-κωδικές περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων και χαρακτηρίζονται από τεράστιες επεκτάσεις που επηρεάζουν άλλους ιστούς εκτός του Κ.Ν.Σ. (Frontali M. et al 1996).

Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA 1)

Στην SCA1 παρουσιάζεται προοδευτική αταξία, προβλήματα στη βάδιση, δυσαρθρία, νυσταγμός, θαμπή όραση και οφθαλμοκινητικές διαταραχές. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας το περπάτημα γίνεται όλο και πιο δύσκολο, ενώ αργότερα παρουσιάζεται περιφερική πολυνευροπάθεια, που εμφανίζεται με απώλεια μέρους των γενικών αισθήσεων και ορισμένων αντανακλαστικών. Το υπεύθυνο γονίδιο εντοπίζεται στην περιοχή 6p22.23 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη αταξίνη-1 (810 καταλοίπων), η οποία έχει κυτταροπλασματική ή πυρηνική τοποθέτηση. Σε μη νευρικούς ιστούς η πρωτεΐνη έχει αποκλειστικά κυτταροπλασματική τοποθέτηση. Το υπεύθυνο πολυμορφικό τρινουκλεοτίδιο είναι το (CAG)_n. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο περιλαμβάνει 19 έως 36 CAG τριπλέτες, ενώ τα παθολογικά αλληλόμορφα αποτελούνται από μεγάλο αριθμό συνεχόμενων CAG τριπλετών από 43 έως 81. Στα περισσότερα φυσιολογικά αλληλόμορφα οι τριπλέτες (CAG) διακόπτονται από το κωδικόνιο CAA της ιστιδίνης (Perutz M. F.1996).

Machado Joseph Disease (MJD ή SCA3).

Η MJD είναι μια αυτοσωμική επικρατής νευροεκφυλιστική νόσος και σχετίζεται με απώλεια κυττάρων στο νεοραβδωτό σώμα, την παρεγκεφαλίδα και τη μέλαινα ουσία που οδηγεί σε παράλυση, ενώ διατηρείται η διανοητική επαφή. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν αδυναμία στα άκρα, γενική απώλεια του κινητικού ελέγχου, δυσκολία στην ομιλία και την κατάποση καθώς και ακούσιες κινήσεις των ματιών. Τα συμπτώματα εκδηλώνονται στην 2^η δεκαετία έως την 5^η δεκαετία της ζωής. Η ασθένεια οδηγεί προοδευτικά στο θάνατο μετά από 6 έως 29 χρόνια μετά την έναρξη. Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις έναρξης της νόσου σε

μεγάλη ηλικία (πάνω από 70), όπου τα άτομα αυτά χαρακτηρίζονται από αταξικό βάδισμα και απώλεια των μυών των άκρων (Gaspar C. et al 2001).

Έχουν παρατηρηθεί τρεις τύποι της νόσου ανάλογα με την ηλικία έναρξης και τα συμπτώματα. Ο **Τύπος I** παρουσιάζει μικρή ηλικία έναρξης της ασθένειας με αξιοσημείωτα πυραμιδικά και εξωπυραμιδικά σημεία επιπρόσθετα με αυτά του τύπου II και δυστονία. Ο **Τύπος II** προοδευτική αταξία, πυραμιδικά σημάδια, οφθαλμοπληγία και ηλικία έναρξης στα 40 χρόνια. Ο **Τύπος III** συνδέεται με ατροφίες, απώλεια αισθήσεων και ηλικία έναρξης της νόσου ανάμεσα στα 40 με 60 χρόνια. Η ετερογένεια των φαινοτύπων, αλλά και της ηλικίας έναρξης αποδίδεται από πολλούς, σε περιβαλλοντικούς ή γενετικούς τροποποιητές που επηρεάζουν την έκφραση του κυρίως γενετικού ελαττώματος. Αν και δεν είναι σίγουρο αν πρόκειται για διαφορετικούς τύπους της ίδιας ασθένειας ή για τρεις διαφορετικές ασθένειες.

Το γονίδιο έχει χαρτογραφηθεί στην χρωμοσωμική περιοχή 14q32.1 και η μετάλλαξη οφείλεται σε επέκταση της τριπλέτας CAG. Το παθολογικό αλληλόμορφο περιλαμβάνει 62-82 τριπλέτες και προκαλεί ποικιλία κλινικών και νευροπαθολογικών φαινοτύπων. Το γονίδιο της SCA3 εκφράζεται παντού, ενώ η πρωτεΐνη δεν έχει ταυτοποιηθεί (Schols L. et al 1995).

Η ηλικία έναρξης δείχνει αρνητική σχέση με τον αριθμό των CAG επαναλήψεων. Ο αριθμός των CAG επαναλήψεων δεν εξηγεί σε όλες τις περιπτώσεις την ηλικία έναρξης. Το φύλο του γονέα-μεταφορέα παρουσιάζεται να έχει μια δυνατή συσχέτιση με την ηλικία έναρξης πιο πολύ στη HD παρά στη MJD. (DeStefano A. L et al 1996).

Πίνακας 3.				
ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ				
Νόσος	Παθολογική πρωτεΐνη	Επαναλήψεις γλουταμίνης		Νευρικές περιοχές που καταστρέφονται
		φυσιολογικές	παθολογικές	
Huntington's disease (HD)	Huntingtin	11-34	37 - 121	Βασικά γάγγλια, εγκεφαλικός φλοιός
Spinobulbar muscular atrophy (SBMA)		11-33	40 - 62	Νωτιαίος μυελός, στέλεχος αισθητικά νεύρα
DRPLA	Atrophin	7-23	49 - 75	Παρεγκεφαλίδα, στέλεχος, βασικά γάγγλια, εγκεφαλικός φλοιός, νωτιαίος μυελός
Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA-1)	Ataxin-1	19-36	40 - 82	Παρεγκεφαλίδα, spinocerebellar system inferior olive
Spinocerebellar ataxia type 3 (MJD I)		3-40	68 - 79	Πολλαπλές κινητικές περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού

Dentatorubropallidolusian atrophy (DRPLA)

Η DRPLA είναι αυτοσωμική επικρατής νευροεκφυλιστική διαταραχή. Οι ασθενείς παρουσιάζουν επιληψία, εγκεφαλική αταξία, τρέλα και οι νευροπαθολογικές αλλαγές συνίστανται από εκφύλιση του dentarubral και pallidolusian συστημάτων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα κλινικά συμπτώματα σε ενήλικους είναι περίπου όμοια με της HD. Η ηλικία έναρξης ποικίλει από τα 10 έως τα 70 χρόνια. Η εκδήλωση της νόσου σε νεαρή ηλικία παρατηρείται σε μεταγενέστερες γενεές (anticipation) και ειδικά όταν μεταφέρεται από τον πατέρα. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν ραγδαία εξέλιξη της νόσου σε σχέση με τις όψιμες μορφές. Είναι δύσκολο πολλές φορές να ξεχωρίσει κανείς την DRPLA από την HD βάσει μόνο κλινικών συμπτωμάτων.

Το υπεύθυνο γονίδιο είναι το CTG-B37 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ατροφίνη-1 και εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 12p. Η τριπλέτα CAG βρίσκεται στο πέμπτο εξώνιο και το φυσιολογικό μέγεθος είναι 6-35, ενώ το παθολογικό χρωμόσωμα φέρει περισσότερα από 49 επαναλήψεις. Δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη στο εύρος των επαναλήψεων του CAG μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού χρωμοσώματος. Η πρωτεΐνη έχει μέγεθος 190KDa και περιέχει επαναλήψεις

γλουταμίνης, προλίνης και εναλλασσόμενα όξινα και βασικά αμινοξέα. Εντοπίζεται γύρω από την περιπυρηνική περιοχή, αλλά και στους εγγύς δενδρίτες των νευρώνων.

Νωτιοπρομηκική μυϊκή ατροφία (Spinobulbar muscular atrophy (SBMA))

Η SBMA ή ασθένεια Kennedy είναι μια φυλοσύνδετη υπολειπόμενη νόσος των κινητικών νευρώνων με έναρξη στη μέση ηλικία. Είναι μια σπάνια ασθένεια που προκαλεί αδυναμία στα άκρα, στην ομιλία και στην κατάποση. Παρουσιάζει ελαττωμένη ευαισθησία στα ανδρογόνα, γυκαικομαστία και ατροφία των όρχεων. Το υπεύθυνο τρινουκλεοτίδιο είναι το (CAG)*n* στην κωδική περιοχή του γονιδίου του υποδοχέα του ανδρογόνου, που εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή Xq21.3. Από μελέτες σε σπέρμα φαίνεται ότι οι επεκτάσεις και οι συστολές συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την μείωση, αλλά ειδικά οι τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις μάλλον πλειοψηφούν, όταν αυξηθούν πάνω από ένα συγκεκριμένο αριθμό. Η πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των ενδοκυτταρικών στεροειδών υποδοχέων που προσδένονται σε ειδικές θέσεις του DNA. Εισέρχεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την γονιδιακή μεταγραφή μέσω μιας zing-finger DNA-binding περιοχής (Martin J. B. 1993, Neri C. et al 1996).

Σύνδρομο του εύθραυστου X

Το σύνδρομο του εύθραυστου X ήταν η πρώτη ασθένεια στην οποία περιγράφηκαν οι ασταθείς τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Είναι το πιο κοινό σύνδρομο που προκαλεί κληρονομική διανοητική καθυστέρηση και παρατηρείται σε 1 στα 1200 αρσενικά άτομα και σε 1 στα 2500 θηλυκά άτομα. Τα προσβεβλημένα αρσενικά άτομα έχουν διανοητική καθυστέρηση, αλλά με φυσιολογική συμπεριφορά. Τα προσβεβλημένα θηλυκά άτομα παρουσιάζουν ποικιλία συμπτωμάτων, το 1/3 έχουν φυσιολογική νοημοσύνη, το 1/3 παρουσιάζει διανοητική καθυστέρηση και το υπόλοιπο 1/3 βρίσκεται σε μια ενδιάμεση κατάσταση.

Το γονίδιο ανιχνεύθηκε στη θέση Xq27.3 με επέκταση της τριπλέτας (CGG)*n*. Το CGG τρινουκλεοτίδιο επεκτείνεται στην 5' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του πρώτου εξωνίου του FMR1 γονιδίου και οδηγεί σε υπερμεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή, μεταγραφική σιωπή του γονιδίου οδηγώντας στο φαινόμενο του εύθραυστου X. Η διεισδυτικότητα αυξάνει σε διαδοχικές γενιές, αλλάζοντας τις Μεντελικές αναλογίες, συχνά αναφερόμενο σαν παράδοξο Sherman. Παρόμοιο φαινόμενο με αυτό του anticipation. Η επέκταση της τριπλέτας λαμβάνει χώρα νωρίς

κατά την εμβρυογένεση και παρουσιάζεται ετερογένεια στο μέγεθος των αλληλομόρφων σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Το μέγεθος της τριπλέτας στα φυσιολογικά αλληλόμορφα είναι από 6-54 (M.O.=29), ενώ στα παθολογικά κοντά στα 200. Έχουν παρατηρηθεί επίσης αλληλόμορφα με 50 έως 200 επαναλήψεις και χαρακτηρίζονται ως προμεταλλαγμένα (ενδιάμεσα), τα οποία θα οδηγήσουν σε πλήρεις μεταλλάξεις. Δεν υπάρχει διακριτό όριο μεταξύ του ανώτατου φυσιολογικού αριθμού επαναλήψεων και του κατώτατου ορίου του της προμεταλλαγής. Έτσι τα αλληλόμορφα με 45-55 επαναλήψεις βρίσκονται όπως λέγεται στην «γκρι ζώνη». Τα προμεταλλαγμένα αλληλόμορφα τείνουν να επεκταθούν μέσω της μείωσης του θηλυκού ατόμου. Τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα που φέρουν τα προμεταλλαγμένα (ενδιάμεσα) αλληλόμορφα είναι υγιή.

Παρουσιάζεται σύνδεση γενετικής ανισορροπίας στα fragile-X χρωμοσώματα με συγκεκριμένους απλότυπους στη Νότια Ευρώπη, που προτείνει ότι η προδιάθεση για αστάθεια οφείλεται ίσως σε *cis-acting* παράγοντες που εντοπίζονται κοντά ή μέσα στην επανάληψη. Οι τριπλέτες μεταξύ 35-55 φαίνεται να είναι άλλοτε σταθερές και άλλοτε ασταθείς. Η παρουσία σταθερών και ασταθών αλληλομόρφων με παρόμοια μεγέθη δηλώνει ότι άλλοι παράγοντες και όχι το μήκος εμπλέκονται στη σταθερότητα. Όταν τα CGG είναι περισσότερα από 33 και δεν διακόπτονται τότε αυξάνεται η αστάθεια. Το μήκος που παρέχει αστάθεια στα fragile-X αλληλόμορφα είναι μεταξύ 34-37 καθαρά CGG, αριθμός παρόμοιος με την MD, Kennedy disease, HD, SCA1, DRPLA. Πιθανόν η σταθερότητα της CGG επανάληψης να οφείλεται σε διακοπές της, από το AGG κάθε 8-12 CGGs στα περισσότερα φυσιολογικά αλληλόμορφα.

Εικάζεται ότι για την ασθένεια ευθύνεται η απουσία της πρωτεΐνης και αυτό φαίνεται από ασθενείς με σύνδρομο του εύθραυστου-X οι οποίοι έχουν ελλείψεις του γονιδίου. Η λειτουργία της FMR1 πρωτεΐνης είναι άγνωστη, παρουσιάζει όμως RNA-binding ιδιότητες και φαίνεται ότι προσδένεται σε ένα περιορισμένο αριθμό mRNAs που περιλαμβάνουν περιοχές με υψηλά κανονικά και χαμηλά προμεταλλαγμένα αλληλόμορφα.

Το φύλο του γονιού, όσο και ο αριθμός των επαναλήψεων που φέρει επηρεάζει την κληρονόμηση της νόσου. Επέκταση σε πλήρη μετάλλαξη παρατηρείται μόνο όταν η προμετάλλαξη (ενδιάμεσο αλληλόμορφο) περνά από το θηλυκό άτομο στους απογόνους και όχι από το αρσενικό. Θηλυκά με πλήρη μετάλλαξη περνούν στην επόμενη γενιά μόνο πλήρεις μεταλλάξεις, ενώ αρσενικά με πλήρεις μεταλλάξεις

ή προμεταλλάξεις περνούν στους απογόνους-κόρες μόνο τα αλληλόμορφα της προμετάλλαξης. Όταν οι κόρες κληρονομήσουν από τον πατέρα τα αλληλόμορφα (με περισσότερες από 80 επαναλήψεις) τότε συνήθως κληρονομούν μικρότερα αλληλόμορφα (Nolin S. L. et al 1996).

Μυϊκή δυστροφία (Myotonic dystrophy (MD))

Η Μυοτονική δυστροφία (MD) είναι μια σπάνια ασθένεια με συχνότητα 1 στα 8000 άτομα. Υπάρχει η συγγενής μορφή που είναι και η πιο σπάνια (1/ 100000 άτομα) αναφερόμενη και ως MD2, η νεανική μορφή στα νεανικά χρόνια, η ενήλικη μορφή με εμφάνιση από τα 20 έως τα 40 και η late-onset μορφή που εμφανίζεται μετά τα 40. Η MD είναι μια επικρατής αυτοσωμική διαταραχή με έντονη μυϊκή αδυναμία που εμφανίζεται στα μάτια, στην καρδιά και τους μύες νωρίς στην ώριμη ηλικία. Οι ασθενείς παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα ενέργειας, μπορεί να εμφανίσουν κατάθλιψη και προβλήματα στην πέψη. Όσο πιο νωρίς εμφανίζεται η νόσος τόσο πιο βαριά είναι τα συμπτώματα.

Το υπεύθυνο γονίδιο εδράζεται στην περιοχή 19q13.3. Το υπεύθυνο πολυμορφικό τρινουκλεοτίδιο είναι το (CTG)*n* στην 3' - μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της πρωτεϊνικής κινάσης μυοτονίνης. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο περιέχει 5-38 τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ενώ το παθολογικό πάνω από 38. Στις εκ γενετής περιπτώσεις ο αριθμός μπορεί να φτάσει έως και 3000. Η αστάθεια της τριπλέτας παρατηρείται και στα δύο φύλα.

Haw River Syndrome (HRS)

Η HRS είναι επίσης μια επικρατής αυτοσωμική νευροεκφυλιστική διαταραχή, που έχει παρατηρηθεί σε 5 γενεές μιας αγροτικής αφρικανοαμερικάνικης οικογένειας της Βόρειας Καρολίνας. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν αταξία, χορεία, επιληπτικές κρίσεις, κατάθλιψη, διαταραχές στη συμπεριφορά, ενώ υπάρχουν πολλές κλινικές και νευρολογικές ομοιότητες με την HD, SCA1, DRPLA. Είναι ισχυρά συνδεδεμένη με την περιοχή της DRPLA και οφείλεται στην επέκταση της ίδιας CAG τριπλέτας, όπως και στην DRPLA.

Huntington Disease

Η χορεία του Huntington είναι μια αυτοσωμική επικρατής διαταραχή, όπου το υπεύθυνο γονίδιο εδράζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 4, στην

περιοχή 4p16.3. Η πολυμορφική CAG τριπλέτα βρίσκεται στην 5' κωδική περιοχή του HD γονιδίου. Ο φυσιολογικός αριθμός τριπλετών είναι 9-35, ενώ σε ασθενείς ο αριθμός αυξάνεται από 37-121 επαναλήψεις. Άτομα με 36-39 επαναλήψεις (ενδιάμεσα αλληλόμορφα IA) μπορεί να μην εμφανίσουν ποτέ συμπτώματα ακόμα και σε πολύ μεγάλες ηλικίες. Υπάρχει όμως η πιθανότητα κατά τη διάρκεια της μειωτικής μεταβίβασης του χρωμοσώματος να συμβεί αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων των ενδιάμεσων αλληλομόρφων στο παθολογικό μέγεθος, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση της νόσου (*de novo* περιπτώσεις) (Rubinsztein D. C et al 1996).

3. Οι επαναλήψεις CAG στο ανθρώπινο γονιδίωμα (γενικά) και σε άλλους οργανισμούς.

Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες έχουν εμπλακεί σαν αιτία αρκετών ανθρώπινων ασθενειών και ειδικότερα σε διαταραχές που ακολουθούν επικρατή κληρονομηση. Πολλά ερωτήματα μένουν ακόμα αδιευκρίνιστα, όσον αφορά τον μηχανισμό που προκαλεί την μετάλλαξη, το γεγονός ότι κάποιες επαναλήψεις είναι ασταθείς και άλλες όχι, τη φυσιολογική λειτουργία τους καθώς και το μοριακό μονοπάτι, αν υπάρχει, από τον γονότυπο στο φαινότυπο στις δυναμικές μεταλλάξεις.

Μια χαρακτηριστική ομάδα επαναλαμβανόμενων τμημάτων DNA στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα είναι τα Short Tandem Repeats (STRs). Έχουν μέσο μέγεθος 2-6 ζεύγη βάσεων (bp) και υπάρχουν κάθε 30000 ζεύγη βάσεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα STRs παρουσιάζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού, στους πληθυσμούς. Εξαιτίας αυτής της μεταβολής, τα STRs (δι- και τρι- νουκλεοτίδια) έχουν χρησιμοποιηθεί σαν δείκτες για γενετική χαρτογράφηση και σαν εργαλεία για τη μελέτη γενετικών σχέσεων μεταξύ πληθυσμών. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα τρινουκλεοτίδια, λόγω των επεκτάσεων που παθαίνουν και της συσχέτισης τους με ανθρώπινες ασθένειες. Οι τριπλέτες CGG και CAG είναι οι πιο συχνές και πιο πιθανές (2 από τις 10) επαναλήψεις που θεωρούνται ότι εμπλέκονται σε ανώμαλες επεκτάσεις.

Τα CBCR, GST1, N-cadherin, Na⁺/K⁺ ATPase γονίδια είναι τα πρώτα που ανιχνεύθηκαν με τέτοιου είδους τριπλέτες και έμοιαζαν πολύ με το γονίδιο FMR1 καθώς περιείχαν πολυμορφικά CGG στην 5'μη-μεταφραζόμενη περιοχή. Ένας πέμπτος γενετικός τόπος έχει στην κωδική περιοχή μια πολυλευκίνη και μοιάζει με

τον υποδοχέα του ανδρογόνου (SBMA ή Kennedy disease). Περιοχές πλούσιες σε γλουταμίνες υπάρχουν στις περιοχές μεταγραφικών παραγόντων στο τμήμα αλληλεπίδρασης του παράγοντα. Ένα παράδειγμα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας TATA-binding protein (TBP) με 38 γλουταμίνες. Επίσης έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ο μεταγραφικός παράγοντας IID με υψηλό πολυμορφικό CAG και το ανθρώπινο 28S ριβοσωμικό RNA γονίδιο με την CGG τριπλέτα. Η συσχέτιση αυτών των γενετικών τόπων με ασθένειες ήταν δύσκολη, γιατί καμιά από αυτές τις τριπλέτες δεν παρουσίαζε επέκταση.

Οι επαναλήψεις των γλουταμινών έχουν βρεθεί και στη Δροσόφιλα (homeodomain πρωτεΐνες). Αρκετά γονίδια με τέτοιες επαναλήψεις εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και ιδιαίτερα του Νευρικού συστήματος. Οι επαναλήψεις γλουταμίνης είναι πιο συχνές από επαναλήψεις άλλων αμινοξέων. Πρωτεΐνες που δεν εμπλέκονται με νευροεκφυλιστικά γεγονότα έχουν επίσης πολυγλουταμινικές περιοχές, αλλά δεν επεκτείνονται (Bates G. et al 1996). Δεν γνωρίζουμε αν οι αυξημένες επαναλήψεις γλουταμίνης δρουν σαν Glu-rich περιοχές, αν και στον υποδοχέα του ανδρογόνου η επανάληψη είναι σε περιοχή που είναι σπουδαία για την αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που εξαρτώνται από τον τύπο των κυττάρων. Το μήκος των επαναλήψεων ίσως επιτρέπει την transactivation. Έτσι οι πολυγλουταμίνες μπορεί να λειτουργούν σαν μοτίβα αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών (Ross C. A. 1995).

Ο πολυμορφισμός των τρινουκλεοτιδίων μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο ομάδες: α) Τάξη I: μεγάλη αύξηση των επαναλήψεων (10-74), β) Τάξη II: μικρές αλλαγές (περίπου 4 επαναλήψεις) προσθήκες ή ελλείψεις. Στην τάξη I ανήκουν οι HD, Fragile X syndrome, MD, SBMA, SCA1, DRPLA. Η πιθανότητα επέκτασης γίνεται μόνο όταν υπάρχει ένα κρίσιμο μέγεθος των επαναλήψεων προς το ανώτατο όριο του φυσιολογικού (Rubinsztein C. D. et al 1995).

Οι διαταραχές που οφείλονται σε επεκτάσεις τρινουκλεοτιδίων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: Ο 1^{ος} τύπος περιλαμβάνει διαταραχές που εμπλέκουν επέκταση της CAG επανάληψης που κωδικοποιεί για πολυγλουταμίνες. Το φυσιολογικό μέγεθος κυμαίνεται από 6-30, ενώ το παθολογικό είναι από 35-40 και περισσότερα. Από τις 5 νευρολογικές ασθένειες με επέκταση της CAG τριπλέτα, μόνο το γονίδιο της SBMA (υποδοχέας του ανδρογόνου) έχει γνωστή λειτουργία. Κανένα από τα άλλα γονίδια δεν έχει γνωστή λειτουργία ή ομολογία με άλλα γνωστά γονίδια (εικόνα 1). Ο 2^{ος} τύπος αφορά διαταραχές που εμπλέκουν άλλες τριπλέτες όπως οι CTG/CCG και

παρουσιάζονται στο mRNA έξω όμως από το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος (εικόνα 6), (Ross C. A. 1995).

Συσχέτιση των τρινουκλεοτιδικών επεκτάσεων με τις μεταλλάξεις υψηλής τάσης.

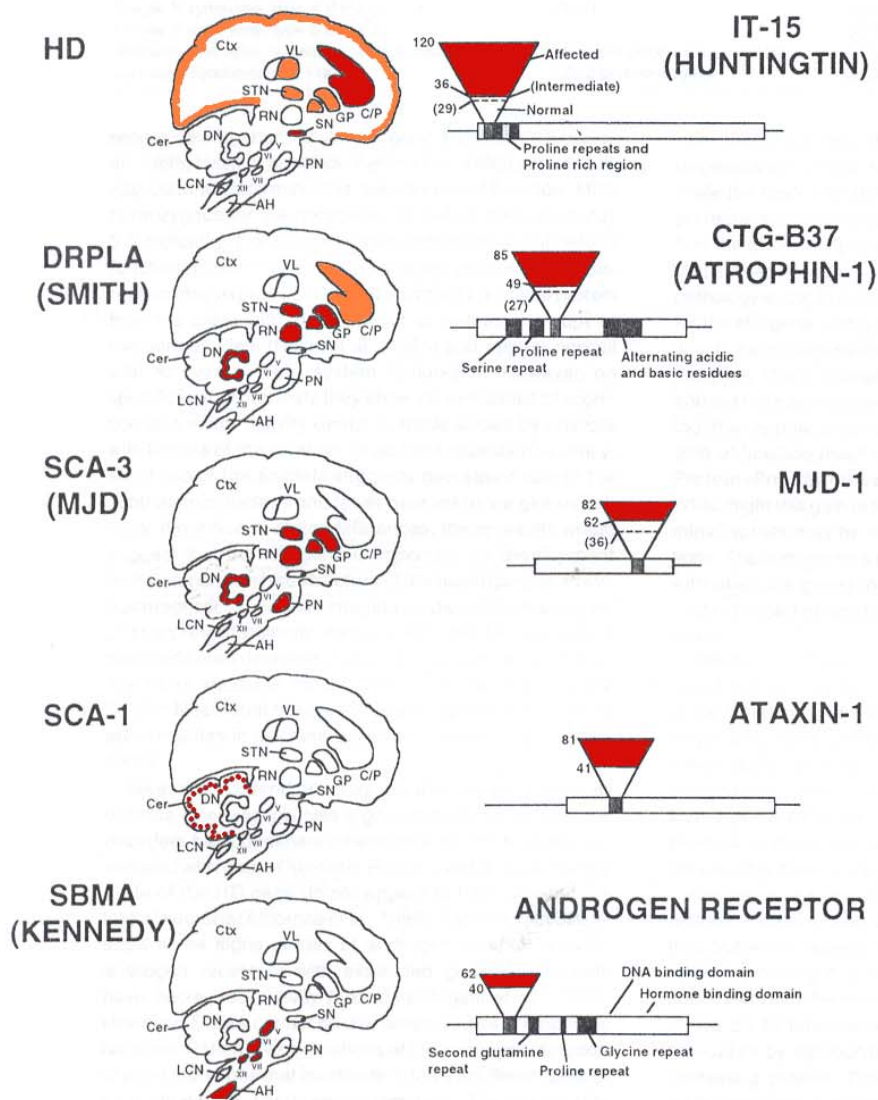
Τα *involucrin* γονίδια (εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων στα επιδερμικά κύτταρα) παρουσιάζουν ένα εξαιρετικά μεγάλο αριθμό CAGs. Ίσως το πρώτο βήμα της γένεσης της κωδικής περιοχής ήταν ο σχηματισμός του poly(CAG). Το poly(CAG) έπειτα τροποποιήθηκε με νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις. Η προσθήκη CAGs στα *involucrin* γονίδια δεν σταμάτησε σε όλες τις εξελικτικές γραμμές, αφού υπάρχει μια περιοχή με πολλά προστιθέμενα CAGs στο αντίστοιχο γονίδιο του ποντικίου. Η CAG επέκταση / αντικατάσταση ίσως είναι το αποτέλεσμα ενός μηχανισμού που χρησιμοποιείται από πολλά γονίδια για την παραγωγή νέων κωδικών περιοχών, αλλά αυτός ο μηχανισμός φαίνεται σε γονίδια συνεργαζόμενα με νευρολογικές ασθένειες. Το poly(CAG) αποκλείεται από τα ιντρόνια εξαιτίας της ομοιότητας του με τα splice signals. Τα περισσότερα 5' CAGs φαίνονται και τα πιο συντηρημένα κομμάτια από μια ιντρονιακή 3'- splice θέση, ενώ τα περισσότερα 3' CAG εξασφαλίζουν το AG δινουκλεοτίδιο των 5' splice θέσεων.

Υπάρχει πιθανότητα τα εκτεταμένα poly(CAG) σε μη κωδική περιοχή να οδηγήσουν σε γένεση ενός εξωνίου. Επειδή οι περισσότερες κοινές επαναλήψεις που βρίσκονται σε κωδικές περιοχές των γονιδίων είναι poly(CAG) ακόμα και εκτός πλαισίου ανάγνωσης, ίσως είναι πιθανόν κάποια ειδικά σήματα αλυσίδας να προδιαθέτουν για CAG επανάληψη. Φαίνεται ότι υπάρχουν ομάδες μεταλλάξεων που περιβάλλουν τα poly(CAG) στα γονίδια και τα σταθεροποιούν. Στις poly(CAG) περιοχές στην HD, στη MJD και στην SBMA οι μεταλλάξεις συμβαίνουν μόνο στον άκρο του poly(CAG). Ίσως αυτά τα άκρα να είναι τα παλιότερα τμήματα της επανάληψης ή τα άκρα εκείνα που έχουν στοχευθεί για μετάλλαξη (Djian P. et al 1996).

Η σύγκριση πρωτεϊνών από γονίδια που περιέχουν πάνω από 200 τριπλέτες μεταξύ οργανισμών έδειξε ότι στη δροσόφιλα είναι ρυθμιστικές ομάδες πρωτεϊνών κυρίως κατά την ανάπτυξη και η πλειοψηφία τους είναι ενεργές στο K.N.Σ. ή στο Π.N.Σ. και έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από τις ανθρώπινες (Karlin S. et al 1996). Ενώ οι ανθρώπινες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε αρκετές νευρολογικές ασθένειες.

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

ΓΟΝΙΔΙΑ



AH	anterior horn	παρεγκεφαλικός φλοιός
Cer	cerebellar cortex	κερκοφόρος πυρήνας/έξω κάψα φακοειδούς πυρήνας
C/P	caudate/putamen	εγκεφαλικός φλοιός
Ctx	cerebral cortex	οδοντωτός πυρήνας
DN	dentate nucleus	ωχρή σφαίρα
GP	globus pallidus	έξω σφηγοειδής πυρήνας
LCN	lateral cuneate nucleus	έξω δικτυωτός πυρήνας
PN	pontine nucleus	
RN	red nucleus	
SN	substantia nigra	μέλανα ουσία
STN	subthalamic nucleus	υποθαλαμικός πυρήνας
VL	ventrolateral thalamic nucleus	κοιλιακός πυρήνας θαλάμου
V,VI,VII and XII	cranial motor nuclei	κρνιακοί κινητικοί πυρήνες

Εικόνα 6: Αριστερά φαίνονται σχηματικά οι μεγαλύτερες περιοχές νευρικού θανάτου σε κάθε ασθένεια. Το κόκκινο δείχνει το νευρικό θάνατο, ενώ το πορτοκαλί δείχνει μετριασμένο κυτταρικό χάσιμο. Οι κύκλοι στον εγκεφαλικό φλοιό αναπαριστούν τα κύτταρα Purkinje. Στα δεξιά απεικονίζεται σχηματικά το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος του κάθε γονιδίου. Η πολυμορφική γλουταμινική επανάληψη φαίνεται με κόκκινο, καθώς και αριθμός των τριπλετών σε άτομα ελέγχου και ασθενείς.

4. Επέκταση της CAG επανάληψης στη HD για τους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Ανάλυση από 358 ασθενείς και 100 υγιή άτομα από τη Γερμανία έδειξε ότι οι 184 ασθενείς ήταν σποραδικές περιπτώσεις, ενώ οι 174 προέρχονται από προσβεβλημένες οικογένειες. Ο αριθμός των CAG επαναλήψεων ποικίλει από 40 σε 75. Το 60% των ασθενών περιείχε 42-47 τρινουκλεοτίδια (σε άλλους πληθυσμούς τόσα τρινουκλεοτίδια έχουμε στο 40% των ατόμων). Το 23% των HD χρωμοσωμάτων περιέχουν περισσότερες από 47 επαναλήψεις και το 16% περιέχουν 40 ή 41 τρινουκλεοτίδια. Έτσι η επέκταση παραπάνω από 39 τρινουκλεοτίδια οδηγεί τελικά σε HD φαινότυπο. Από άλλες δημοσιεύσεις το μικρότερο μέγεθος σε επαναλήψεις στα HD χρωμοσώματα είναι 42. Άρα στους Γερμανικούς πληθυσμούς το κατώφλι του μεγέθους της τριπλέτας είναι χαμηλότερο. Στα χρωμοσώματα ελέγχου δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές και το κανονικό μέγεθος των τρινουκλεοτιδίων είναι 11-35 (Zuhlke C. et al 1993).

Σε πληθυσμούς από τη Δανία, σε 40 φυσιολογικά χρωμοσώματα, ο αριθμός των CAG είναι 9-29. Στα 71 προσβεβλημένα άτομα το ένα αλληλόμορφο περιείχε 39-70 CAG επαναλήψεις. Σε 52 ασθενείς ελέγχθηκε η σχέση της ηλικίας έναρξης και του μήκους της επανάληψης. Ηλικίες από 16-63 χρονών έδειξαν τα εξής: 9 άτομα είχαν ηλικία έναρξης μετά τα 51 χρόνια, 1 άτομο είχε 41 επαναλήψεις και 4 άτομα είχαν περισσότερες από 55 επαναλήψεις και είχαν ηλικία έναρξης πριν τα 30 τους χρόνια. Υπήρξε μια ενδιάμεση ομάδα με ηλικία έναρξης από 22-55 με μέγεθος επανάληψης από 40-52. Η μικρότερη επέκταση της τριπλέτας που σχετίζεται με τον φαινότυπο της HD ήταν 39 CAGs, που συμφωνεί στο μέγεθος με τους Γερμανικούς πληθυσμούς αλλά είναι μικρότερη από 42 όπως είχε δημοσιευτεί για άλλους πληθυσμούς κυρίως από την Βενεζουέλα (MacDonald). Το μεγαλύτερο φυσιολογικό μήκος της επανάληψης ήταν 34. Άρα έχει μια διαφορά από το παθολογικό που είναι 39 (διαφορά 5 τριπλετών) (Norremole A. et al 1993).

Ανάλυση σε ιταλικές οικογένειες κατέδειξε ότι σε 150 προσβεβλημένα άτομα το μέγεθος της CAG επανάληψης στο κανονικό χρωμόσωμα είναι 18 και στο HD χρωμόσωμα είναι 43. Παρουσιάζεται αστάθεια της επανάληψης και εμφανίζεται αλληλοεπικάλυψη του φυσιολογικού αριθμού τρινουκλεοτιδίων με τον αντίστοιχο αριθμό για τους HD ασθενείς. Σε 2 άτομα HD βρέθηκε χρωμόσωμα με 32

επαναλήψεις, ένα μέγεθος που συναντιέται στα φυσιολογικά χρωμοσώματα. (Novelletto A. et al 1994).

Έχει προταθεί ότι η HD ασθένεια προέρχεται από μόνο μία ή ίσως μερικές μεταλλάξεις στο προγονικό γονίδιο. Αυτό δείχνει τον εξαιρετικά χαμηλό ρυθμό μετάλλαξης. Στις περιπτώσεις που ο HD φαινότυπος δεν συνοδεύεται από επέκταση της επανάληψης, πιστεύουν ότι μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την HD. Στους πληθυσμούς από τη Σουηδία η επέκταση του τρινουκλεοτιδίου στους HD ασθενείς είναι μεταξύ 35-85. Εξαιρούνται δύο ασθενείς όπου είχαν 16/19 και 17/20 επαναλήψεις. Η ηλικία έναρξης της ασθένειας ήταν 23-41 χρόνια (Almqvist E. et al 1994).

Από τους Ελληνικούς πληθυσμούς έχουν ελεγχθεί 29 HD οικογένειες από διαφορετικά μέρη της Ελλάδος. 44 HD ασθενείς έχουν 39-95 τρινουκλεοτίδια. 24 από τα 59 ασυμπτωματικά μέλη των οικογενειών ανέπτυξαν HD φαινότυπο με CAG επαναλήψεις πάνω από 39, ενώ 3 άτομα είχαν ενδιάμεσα αλληλόμορφα (36-37). Το μήκος της επανάληψης στο 70% των Ελλήνων HD ασθενών ήταν μεταξύ 42-47. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με αυτά από Δανία, Γερμανία, Ολλανδία, Ιταλία, ενώ διαφέρει από αυτά από άλλους πληθυσμούς από Αμερική. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα υπάρχει μια υπόθεση ότι οι Ευρωπαϊκοί πληθυσμοί είχαν κατά την εξέλιξη της ασθένειας μια κοινή αρχή (Yarizakis, 1995). Σε όλους τους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα για την χορεία του HD ανά τον κόσμο, παρατηρείται η αστάθεια της τριπλέτας (CAG) σε διαδοχικές γενεές που την οδηγεί σε επέκταση (φαινόμενο anticipation).

5. Συσχέτιση επανάληψης με ηλικία έναρξης της νόσου

Ως ηλικία έναρξης της ασθένειας δηλώνουμε το χρονικό διάστημα που εμφανίζονται καθαρά τα εξής χαρακτηριστικά: ακούσιες κινήσεις ψυχιατρικές ή νοητικές ανωμαλίες, αδυναμία να κάνουν πολύπλοκες κινήσεις και παρουσιάζουν αδεξιότητα.

Παρουσιάζεται αντίστροφη σχέση μεταξύ της ηλικίας έναρξης της ασθένειας και της επέκτασης του μεγέθους της CAG επανάληψης, γεγονός που οδηγεί σε μια ποικιλία φαινοτύπων όσον αφορά την έναρξη των HD συμπτωμάτων. Έτσι εκτός την τυπική μορφή με ηλικία έναρξης στα 38-40 χρόνια (typical onset) έχουν ανιχνευθεί

και ασθενείς με ηλικία έναρξης σε νεαρή ηλικία (5%) (early onset), αλλά και σε ηλικία πάνω από τα 50 χρόνια (10%-25%), (late onset). Όσο πιο νωρίς εμφανίζονται τα συμπτώματα, τόσο πιο μεγάλο είναι το μέγεθος της CAG επανάληψης.

5.1 Σχέση αυξημένων CAG επαναλήψεων με τον HD φαινότυπο και τον χρόνο έναρξης της ασθένειας.

Μελέτη 114 ατόμων από 73 δέντρα που είχαν 36-82 τριπλέτες έδειξε ότι σε άτομα με μικρή επέκταση, ο αριθμός των επαναλήψεων δεν είναι καλό προγνωστικό στοιχείο για την ηλικία έναρξης της νόσου. Π.χ. άτομα με 39 CAG επαναλήψεις, διέφεραν από ηλικίες 30 έως 68 χρονών. Στις περιπτώσεις με λιγότερες από 50 επαναλήψεις φαίνεται ότι ο αριθμός των επαναλήψεων εξηγεί μόνο το 7% των περιπτώσεων για την απόκλιση στην ηλικία έναρξης (Stine O.C. et al 1993).

Από πειράματα σε ασθενείς και υγιείς από τον Καναδά βρέθηκε αντίστροφη σχέση του μήκους της επανάληψης και της ηλικίας έναρξης των κλινικών συμπτωμάτων. Στα αδέρφια υπήρχαν διαφορές 4-12 επαναλήψεις, αλλά δεν είχαν διαφορές στην ηλικία έναρξης της ασθένειας. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι αλλαγές στο μήκος της επανάληψης δεν σχετίζονται πάντα με αλλαγές στην ηλικία έναρξης. Οι μεγαλύτερες επαναλήψεις φαίνεται να βρίσκονται σε περιπτώσεις HD με έναρξη της ασθένειας σε νεανική ηλικία. Αλλά έχει παρατηρηθεί ότι σε μερικές οικογένειες το μήκος της επανάληψης είναι ίδιο στους γονείς και τα παιδιά, που σημαίνει ότι το μέγεθος της επανάληψης δεν είναι και ο καθοριστικός παράγοντας για την ηλικία έναρξης. Η μεγάλη ποικιλία στις ηλικίες έναρξης της ασθένειας φαίνεται ότι σχετίζεται με τα πολλά μεγέθη της CAG επανάληψης (Andrew S.E. et al 1993).

Άλλη μελέτη σε 425 HD χρωμοσώματα 150 διαφορετικών οικογενειών από τη Βενεζουέλα έδειξε ότι η κατανομή των επαναλήψεων είναι ευρεία και μη-επικαλυπτόμενη συγκρινόμενη με την αντίστοιχη κατανομή σε κανονικά χρωμοσώματα. Φαίνεται τελικά ότι τα HD χρωμοσώματα μοιράζονται πολύ διαφορετικά μεγέθη στις επαναλήψεις. Δεν γνωρίζουμε αν αυτό οφείλεται στον αριθμό των γενεών από τη στιγμή της εισαγωγής του HD χρωμοσώματος στην οικογένεια, ή αν τα χρωμοσώματα από διαφορετικούς απλότυπους προδιαθέτουν σε μια περιορισμένη κλίμακα του μήκους των επαναλήψεων (Duyao M et al 1993).

Αστάθεια της (CAG)n επανάληψης

Η αύξηση του αριθμού των CAG τριπλετών οφείλεται στην αστάθεια που εμφανίζει η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία κατά τη μείωση. Μελέτες έδειξαν ότι σε 20 από τα 25 μητρικά χρωμοσώματα το CAG άλλαξε κατά την μεταφορά του στην επόμενη γενιά και παρατηρήθηκαν 13 επεκτάσεις και 7 συστολές (οι αλλαγές ήταν της τάξης των 5 τριπλετών). Ο μέσος όρος αλλαγής της τριπλέτας στις 25 μητρικές μεταφορές ήταν 0,4 τριπλέτες. Αντίστοιχα σε 31 από τις 37 μεταφορές χρωμοσωμάτων από τον πατέρα παρατηρήθηκαν 26 επεκτάσεις και 5 συστολές του CAG (οι αλλαγές ήταν της τάξης των 1-3 τριπλετών). Ο μέσος όρος αλλαγής της τριπλέτας σε 37 πατρικές μεταφορές ήταν 9 τριπλέτες. Οι μειωτικές μεταβιβάσεις των HD χρωμοσωμάτων δείχνουν ότι υπάρχει μεγάλη αύξηση της επανάληψης μέσω της πατρικής μεταφοράς σε σύγκριση με τη μητρική. Η μεγαλύτερη αύξηση φαίνεται κατά την πατρική μεταφορά λόγω της αστάθειας του CAG στην αρσενική γαμετογένεση (επιμήκυνση της επανάληψης στο DNA σπέρματος). Δεν γνωρίζουμε αν αυτή η αστάθεια οφείλεται στο μέγεθος ή την αλληλουχία της επανάληψης, στην ηλικία του πατέρα, ή σε περιβαλλοντικές επιρροές. Και κατά την θηλυκή γαμετογένεση η επανάληψη είναι ασταθής, αλλά οι μεγαλύτερες επεκτάσεις δεν είναι συμβατές με τη βιωσιμότητα του ωαρίου (Duyao M. et al 1993).

Παράλληλες μετρήσεις έχουν καταγραφεί σε 440 άτομα από 269 δέντρα από την Ουαλλία και την Αγγλία. Σε περιπτώσεις ατόμων που έχουν κληρονομήσει το HD χρωμόσωμα από τον πατέρα δείχνουν έναρξη της ασθένειας ~ 9 χρόνια πριν από αυτή του πατέρα, ενώ σε άτομα που έχουν κληρονομήσει το HD χρωμόσωμα από τη μητέρα η διαφορά είναι περίπου 2,75 χρόνια. Σε μελέτες μεταξύ 71 ζευγών από αδέρφια φάνηκε μια σχέση μεταξύ τους και για τις επαναλήψεις και για την ηλικία έναρξης. Μεταξύ αδελφών μέσω πατρικής μεταφοράς φαίνεται σχέση μεταξύ αριθμού επαναλήψεων και ηλικίας έναρξης. Για αδέρφια από μητρική προέλευση υπάρχει ισχυρότερη σχέση για τον αριθμό των επαναλήψεων, παρά την ηλικία έναρξης.

Η επεκτεινόμενη αλληλουχία της επανάληψης, αλλά και η αντίστροφη σχέση μεταξύ του αριθμού των επαναλήψεων και της ηλικίας έναρξης, μας δείχνει ότι τελικά η αστάθεια της μετάλλαξης είναι ο λόγος- η αιτία για ένα μέρος τουλάχιστον της μεταβλητότητας στην HD απ' ότι η ποικιλία των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων (Snell R.G. et al 1993).

Η σχέση μεταξύ του μήκους της επανάληψης και της ηλικίας έναρξης της ασθένειας φαίνεται αν δούμε χωριστά τον χρόνο έναρξης α) των συμπτωμάτων (χορειακές κινήσεις, αδεξιότητα ψυχιατρικά συμπτώματα ή άνοια), β) της διάγνωσης και γ) του θανάτου. Είναι δύσκολο να ανιχνευθεί το μήκος εκείνο του HD χρωμοσώματος που να είναι και διαγνωστικό για την ασθένεια, γιατί δεν έχουν ερευνηθεί πλήρως: α) η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των κανονικών και των HD χρωμοσωμάτων, η οποία διαφέρει μεταξύ πληθυσμών, β) η έκταση της επέκτασης των ατόμων σε διαφορετικές γενιές, γ) η συχνότητα του κλινικού φαινοτύπου, χωρίς τρινουκλεοτιδική επέκταση.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι είναι δύσκολο να προβλέψει κανείς την ηλικία έναρξης της ασθένειας βασιζόμενος στο μήκος των επαναλήψεων. Ίσως η HD να οφείλεται τελικά όχι μόνο στην παθολογική CAG επέκταση, αλλά και σε ένα τροποποιητικό αποτέλεσμα του φύλου συνεργαζόμενο με το μέγεθος της επανάληψης μέσα στα κανονικά όρια. Πιθανώς να υπάρχουν χρωμοσώματα που να οδηγούν σε προμεταλλάξεις και να οδηγούν τελικά σε πλήρης μεταλλάξεις. Άτομα με επαναλαμβανόμενες CAG αλληλουχίες στα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα (29-35 τριπλέτες) εξαιτίας της αστάθειας αυτής, αποκτούν απογόνους με 40 και περισσότερες CAG επαναλήψεις (Snell R. G. et al 1993). Ίσως να μπορεί να προβλεφθεί η ηλικία έναρξης, αλλά σε μια μεγάλη κλίμακα και αυτό θα είναι δυνατό σε άτομα του 1,4% που είναι υποψήφια για HD αν έχουν περισσότερες από 60 επαναλήψεις (Andrew S.E. et al 1993). Η κρίσιμη πληροφορία για την πρόβλεψη της νόσου θα είναι ο καθορισμός του κατώτερου ορίου των επαναλήψεων που σχετίζονται με την HD και το ανώτατο όριο του φυσιολογικού μεγέθους της επανάληψης (Rubinsztein D.C. et al 1996).

Σε άλλες ασθένειες που σχετίζονται με επέκταση τρινουκλεοτιδίων (Fragile-X, MD, SBMA) έχει δειχθεί η συσχέτιση του μήκους της επέκτασης και της απόκλισης του φαινοτύπου της ασθένειας. Στο σύνδρομο του εύθραυστου X υπάρχει ένα κατώφλι του μήκους της επανάληψης πάνω από το οποίο ο φαινότυπος της ασθένειας είναι διεισδυτικός. Στις MD και SBMA η σοβαρότητα στις μικρές ηλικίες έναρξης αυξάνει όσο αυξάνει το μήκος της τριπλέτας. Οι επαναλήψεις στην HD φαίνονται πιο ασταθείς απ' ότι στα SBMA χρωμοσώματα.(Duyao M. et al 1993).

Γενικά όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της επανάληψης τόσο μικρότερη είναι και η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων. Αν και η συσχέτιση είναι υψηλή, το μέγεθος της επανάληψης εξηγεί μόνο τις μισές περιπτώσεις. Το ότι κατά την πατρική

μεταφορά του χρωμοσώματος αυξάνει το μήκος της επανάληψης δηλώνει την αύξηση της αστάθειας μέσω πατρικής μεταφοράς. Πάντως η αύξηση των επαναλήψεων στην HD (36-86) είναι σαφώς μικρότερη σε σχέση με αυτή στη MD (50-100). Άρα οι μηχανισμοί μπορεί να είναι διαφορετικοί. Στην HD σε αντίθεση με το fragile-X και την MD η τριπλέτα βρίσκεται στο ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος και κωδικοποιεί για γλουταμίνες, όπως και στην SBMA και μάλλον υπάρχει αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (Stine O.C. et al 1993).

5.1.1 Νεανικές περιπτώσεις

Υπάρχουν περιπτώσεις ατόμων που εκδηλώνουν τη νόσο σε μικρή ηλικία (<20 χρόνια) (early-onset). Τα συμπτώματά τους είναι λίγο διαφορετικά από αυτά της κλασικής μορφής της HD. Κυρίως παρουσιάζουν σχολικές αποτυχίες και διαταραχές στη συμπεριφορά τους. Επίσης σπαστικότητα, δυσκαμψία, σημαντική διανοητική καθυστέρηση και τα συμπτώματα επιδεινώνονται πιο γρήγορα. Καμιά φορά οι νεανικές περιπτώσεις παρουσιάζουν τα συμπτώματα πριν τα εμφανίσουν οι γονείς τους και φαίνεται σαν να προσπερνά η ασθένεια μια γενιά. Οι νεανικές περιπτώσεις ασθενών κληρονομούν το HD γονίδιο στο 70%-90% των περιπτώσεων από τον πατέρα. Παιδιά που εκδήλωσαν την ασθένεια στα 10 τους χρόνια (childhood onset) κληρονομούν επίσης το γονίδιο από τον πατέρα (90% των περιπτώσεων), ενώ το ίδιο συμβαίνει και όταν εκδηλωθεί η ασθένεια σε ηλικίες 11-20 χρόνια (75%). Στις νεανικές περιπτώσεις HD το μεγαλύτερο αλληλόμορφο είχε 44-121 επαναλήψεις (M.O.= 42), ενώ το μικρότερο αλληλόμορφο είχε 12-33 επαναλήψεις. (M.O.=19). Αύξηση της CAG τριπλέτας συνδέεται με μικρότερη ηλικία έναρξης. Υπήρξαν όμως περιπτώσεις ασθενών με παρόμοιες επαναλήψεις, αλλά με διαφορετικές ηλικίες έναρξης (~10 χρόνια). Ο μεγαλύτερος παράγοντας που επηρεάζει την ηλικία είναι το μέγεθος της επανάληψης. Άτομα με νεανική HD παρουσιάζουν μικρότερη διάρκεια των συμπτωμάτων μέχρι το θάνατο σε σύγκριση με άτομα που εμφανίζουν την νόσο από 20 έως τα 40 χρόνια τους (Foroud T. et al 1999).

Σε συγκρίσεις ζευγαριών αλληλομόρφων γονιών-παιδιών, φάνηκε το εξής: στις περιπτώσεις που το αλληλόμορφο του παιδιού είχε διαφορά μεγαλύτερη από 20 CAGs, τότε το κληρονομούσε από τον πατέρα. Όταν το γονίδιο κληρονομούταν από τη μητέρα η διαφορά στο μέγεθος του CAG ήταν 0-7 επαναλήψεις. Όταν λοιπόν το γονίδιο περνάει μέσα από την πατρική γαμετική σειρά υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα επέκτασης του CAG. Έχουν καταγραφεί όμως δύο νεανικές περιπτώσεις,

με 108 και 250 CAG επαναλήψεις, όπου τα άτομα αυτά έχουν κληρονομήσει το παθολογικό αλληλόμορφο από την μητέρα. Στη δεύτερη περίπτωση το μητρικό αλληλόμορφο έφερε 60 CAG επαναλήψεις (Paparetropoulos S.et.al. unpublished data, Nance M.A. 1999).

Η υπερίσχυση της πατρικής κληρονόμησης στη νεανική HD δεν ακολουθεί την κλασική Μεντελική Γενετική και μέχρι τώρα υπάρχει σαν στατιστικό αποτέλεσμα και όχι σαν βιολογική εξήγηση. Ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει το μέγεθος της επέκτασης της επανάληψης κατά την μεταφορά του αλληλομόρφου από τους γονείς στα παιδιά, είναι το φύλο του γονέα που μεταφέρει το αλληλόμορφο. Το CAG είναι περισσότερο ασταθές και οδηγεί στην επέκταση, όταν μεταβιβάζεται από την αρσενική γαμετική σειρά.

Το ότι υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει μεγάλη επέκταση του CAG στο παιδί, όταν το κληρονομεί από τον πατέρα, σημαίνει ότι υπάρχουν ή εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες εκτός του φύλου του γονέα μεταφορέα, οι οποίοι συνεργάζονται και οδηγούν τελικά στην αστάθεια του CAG. Το μέγεθος της επανάληψης τελικά είναι μη-επαρκές από μόνο του να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση. Παράγοντες σχετικοί με το φύλο που οδηγούν σε επέκταση στα θηλυκά με παρόμοιες επαναλήψεις, δεν πρέπει να οδηγούν σε σημαντική αύξηση στο μέγεθος της επανάληψης κατά τη μεταφορά του από τις γαμετικές σειρές απ' ότι στα αρσενικά.

Η παρουσία νεανικών περιπτώσεων σε πολλαπλά αδέρφια που έχουν επέκταση της επανάληψης είναι απόδειξη ότι δεν υπάρχει μια πρόσθετη μετάλλαξη που συμβαίνει κατά την γαμετική σειρά του γονέα-μεταφορέα, που οδηγεί σ' αυτό το φαινόμενο. Στη HD παρατηρούμε μια σημαντική αύξηση της επανάληψης στα παιδιά, όταν το κληρονομούν από τον πατέρα, ενώ αυτό παρατηρείται σε παιδιά στην MD και το fragile-X σύνδρομο, όταν το κληρονομούν από τη μητέρα. Η SBMA έχει παρόμοια συμπεριφορά όπως και η HD (Telenius H. et al 1993).

5.1.2 Late onset περιπτώσεις

Ένα σχετικά μικρό ποσοστό HD ασθενών (10%-25%) ανά τον κόσμο εμφανίζει τα πρώτα συμπτώματα μετά τα 50 χρόνια (Late onset). Στους ασθενείς αυτούς τα συμπτώματα εξελίσσονται ηπιότερα και οι χοριακές εκδηλώσεις δεν είναι τόσο έντονες. Το μήκος της CAG επανάληψης κυμαίνεται από 38-48 με μέση τιμή στα 42, που είναι από τα χαμηλότερα παθολογικά μεγέθη (Britton J.W. et al 1995,

Kremer B. et al 1993). Εικάζεται ότι σ' αυτές τις περιπτώσεις δεν επιδρά μόνο το μέγεθος, αλλά ίσως το περιβάλλον ή /και γενετικοί τροποποιητές. Από την συγκεκριμένη μελέτη 133 ασθενών από 107 διαφορετικές οικογένειες φάνηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μήκους των CAG επαναλήψεων και της ηλικίας έναρξης της ασθένειας στους late onset ασθενείς (7%). Βέβαια αυτή η συσχέτιση είναι πιο ασθενής από αυτή που παρατηρείται σε άτομα με HD συμπτώματα σε μικρή ηλικία, ενώ φαίνεται να χάνεται όταν η ηλικία έναρξης είναι πάνω από τα 60 χρόνια. Μια πιθανή εξήγηση για τις παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσε να είναι η απευθείας επίδραση του μήκους του CAG στο γονιδιακό προϊόν. Οπότε η ποικιλία στο μήκος των επαναλήψεων, να οδηγεί τελικά σε ποικιλία φαινοτύπων.

Δεν έχει αποδειχθεί στις late onset περιπτώσεις επικράτηση στη μητρική μεταβίβαση της επανάληψης. Αυτό φαίνεται και σε οικογένειες που περιλαμβάνουν HD ασθενείς με εμφάνιση των συμπτωμάτων σε νεανική ηλικία (early onset), αλλά και σε προχωρημένη (late onset). Αυτές οι παρατηρήσεις μας υποδηλώνουν την παρουσία οικογενειακών παραγόντων, εκτός του μήκους της CAG επανάληψης, που επιδρούν και στη ηλικία έναρξης, αλλά και στην ποικιλία των φαινοτύπων (Kremer B. et al 1993).

Σε 7 περιπτώσεις με κλινική διάγνωση για HD ανιχνεύθηκαν 36 CAG επαναλήψεις. 6 άτομα με 36-39 (μικρή επέκταση) επιβίωσαν μεταξύ 75-90 ετών Δεν παρατηρήθηκαν περιπτώσεις HD με λιγότερα από 35 επαναλήψεις. Άρα το μέγεθος της επανάληψης που οδηγεί σε HD κυμαίνεται μεταξύ 30-40 επαναλήψεις.

Η επιβίωση ατόμων HD σε μεγάλη ηλικία με 36-39 επαναλήψεις μπορεί να σημαίνει ότι η HD μετάλλαξη μπορεί να μην έχει πλήρη διεισδυτικότητα σ' αυτές τις σπάνιες περιπτώσεις. Παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την διεισδυτικότητα και την ηλικία έναρξης της HD μπορεί να σχετίζονται με το περιβάλλον ή /και το γενετικό υπόβαθρο (Rubinsztein D.C. et al 1996).

Στο νησί της Κρήτης (πληθυσμός περίπου 500.000) έχουν ανιχνευθεί επίσης HD ασθενείς με μεγάλη ηλικία έναρξης της ασθένειας. Και στους πληθυσμούς της Κρήτης το μέσο μέγεθος της CAG επανάληψης είναι 42, κάτι που συμφωνεί με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη σκέψη ότι το μήκος του επεκτεινόμενου (CAG) δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερότητα κατά τη μεταφορά που παρατηρείται στη μορφή της HD στην Κρήτη.

Επίσης φαίνεται ότι σε διαδοχικές γενεές χάνεται το φαινόμενο της επέκτασης της τριπλέτας (anticipation) και μάλιστα οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από

σταθερότητα ή ακόμα και συρρίκνωση της (CAG) τριπλέτας κατά τη διάρκεια των μειωτικών μεταφορών. Η σταθερότητα του (CAG) κατά τη διάρκεια της πατρικής μεταφοράς στις περιπτώσεις της Κρήτης με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται σε οικογένειες από άλλα μέρη της Ελλάδας ή από τον υπόλοιπο κόσμο.

Η σταθερότητα στη μορφή του (CAG) σε οικογένειες της Κρήτης προτείνει ότι συμβαίνει ένας μοναδικός μοριακός μηχανισμός. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει cis- ή trans- acting DNA τμήματα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σήμερα είναι γνωστό ότι η σταθερότητα του DNA μπορεί να επηρεάζεται από τη χρωμοσωμική τοποθεσία, την σχετική με τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής και της δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA (Tsagkourissakis M. et al 1995).

5.1.3 Σποραδικές περιπτώσεις

Έχουν ανιχνευθεί παγκοσμίως άτομα με HD φαινότυπο, χωρίς όμως οικογενειακό ιστορικό (ποσοστό 3%). Από 116 σποραδικές περιπτώσεις (πληθυσμός από Καναδά), χωρίς οικογενειακό ιστορικό για HD, 21 άτομα τελικά είχαν τα τυπικά χαρακτηριστικά της HD, με κλινικά υγιείς γονείς, οι οποίοι μετέφεραν το γονίδιο στην επόμενη γενιά.. Στους γονείς αυτούς εντοπίστηκαν ενδιάμεσα αλληλόμορφα (IA) που οδηγούσαν σε HD φαινότυπο στην επόμενη γενιά και το μέγεθος της CAG επανάληψης ήταν 30-38. Ήταν μειωτικά ασταθή. Άρα το ενδιάμεσο αλληλόμορφο πιθανόν να είναι μια προμετάλλαξη, το οποίο μόνο του δεν οδηγεί σε HD, αλλά προδιαθέτει σε παραπέρα επέκταση του CAG και η οποία τελικά να οδηγήσει σε HD. Το χαμηλότερο φυσιολογικό αλληλόμορφο έχει μέγεθος κάτω από 30 επαναλήψεις και ήταν σταθερό. Φάνηκε ότι το ενδιάμεσο αλληλόμορφο (IA) περνάει τελικά στα παιδιά που εκδηλώνουν HD, από τον πατέρα και όχι από τη μητέρα (Goldberg Y. P. et al 1993, Goldberg Y. P. et al 1993). Τα ενδιάμεσα αλληλόμορφα (IAs :29-35 CAG) έχουν συσχετιστεί με ορισμένες περιπτώσεις HD και φαίνονται ασταθή μέσω της αρσενικής γαμετικής σειράς. Σε μια περίπτωση το άτομο που εμφάνισε HD φαινότυπο είχε 38 CAG επαναλήψεις. (Πίνακας 4). Στο γενικό πληθυσμό φαίνονται σταθερά. Περιστασιακά τα IA αλληλόμορφα παρουσιάζουν ήπια αστάθεια. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει κατά προτίμηση σε χρωμοσώματα με παρόμοιο απλότυπο γύρω από το HD γονίδιο με αυτόν που φαίνεται σε νέα μεταλλαγμένα χρωμοσώματα. Κάτι που υποστηρίζει ότι γενομικές αλληλουχίες μπορεί να έχουν ένα σημαντικό

ρόλο στην αστάθεια της τριπλέτας. Πιθανόν να υπάρχουν ειδοειδικοί παράγοντες που ενέχονται σ' αυτά τα ευρήματα σε ανθρώπους και ποντίκια (Goldberg Y.P. et al 1996).

Πίνακας 4. Σποραδικές περιπτώσεις HD ασθενών				
Εθνικότητα	Ηλικία έναρξης	(CAG)n	Μεταφορέας γονιός	Ενδιάμεσο αλληλόμορφο
Αμερικάνοι	;	44	;	36
	29	50	;	34
	35	52	;	37
	58	42	;	38
	57	45	;	35
	43	43	;	35
Βρετανοί	;	49	;	33
	;	HD range	Πατέρας	35
Γερμανοί	;	46	Πατέρας	32
	;	46	Πατέρας	34
Καναδοί	36	43	;	33
	36	44	Πατέρας	32
	32	49	Πατέρας	35
	32	43	Πατέρας	30
	35	53	Πατέρας	37
	28	52	Πατέρας	38
	45	41	;	38
	26	58	Πατέρας	33
20	52	Πατέρας	38	
	>20	53	Πατέρας	37
	39	41	;	;
Ιάπωνες	45	43	Πατέρας	35
Ισπανοί	35	43	Μητέρα	37
	17	66	Μητέρα	36
	23	57	Μητέρα	36

Παρόμοια ανάλυση σε 8 οικογένειες από την Αμερική έδειξε ότι τα άτομα που εμφανίζουν για πρώτη φορά HD φαινότυπο έχουν 42 και περισσότερες CAG επαναλήψεις. Σε 4 οικογένειες τα υγιή άτομα φέρουν 34-38 CAG επαναλήψεις, ένα μέγεθος που επικαλύπτει τα ανώτερα φυσιολογικά όρια και τα κατώτερα παθολογικά. Σε 2 οικογένειες οι γονείς των HD ασθενών είχαν 33-35 επαναλήψεις. Παρουσιάζεται μια μεγαλύτερη τάση στα ενδιάμεσα αλληλόμορφα απ' ότι στα φυσιολογικά να επεκταθούν στις επόμενες γενιές. Αλλά ακόμα και να συνεργάζονται τα ενδιάμεσα αλληλόμορφα με late-onset HD φαινότυπο κάτι όμως που μπορεί να επηρεάζεται και από γενετικούς ή και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Myers R.H. et al 1993).

Σε 2 γερμανικές οικογένειες έχουν καταγραφεί επίσης 2 σποραδικές περιπτώσεις HD με 46 CAG επαναλήψεις, όπου φαίνεται ότι έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα. Ο πατέρας έφερε 32 και 34 CAG επαναλήψεις στην κάθε περίπτωση αντίστοιχα. Στα ζεύγη γονιών-παιδιών τα μητρικά αλληλόμορφα δείχνουν μια μέτρια αστάθεια με μικρή υπεροχή στην επέκταση παρά στην μείωση του μεγέθους. Τα πατρικά αλληλόμορφα σε ένα ποσοστό 69% δείχνουν μια παρόμοια τάση με τα μητρικά, ενώ το 31% δείχνει μια δραματική επέκταση, κάτι που επιβεβαιώνεται και σε νεανικές HD περιπτώσεις που έχουν παρατηρηθεί (De Rooij K.E. et al 1993). Παρόμοιο πρότυπο έχει παρουσιαστεί και σε ένα σποραδικό ασθενή από την Ιαπωνία, με 43 CAG επαναλήψεις (Watanabe M. et al 2000).

Τρεις σποραδικές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί, όπου το παθολογικό αλληλόμορφο προήλθε από επέκταση του μητρικού. Μία περίπτωση έχει καταγραφεί στον Ισπανικό πληθυσμό με 43 CAG επαναλήψεις, όπου η μητέρα του ατόμου έφερε ενδιάμεσο αλληλόμορφο με 37 CAGs (Sanchez A. et al 1997). Άλλες δύο περιπτώσεις αδελφών έχουν καταγραφεί σε μία οικογένεια με 66 και 57 CAG επαναλήψεις στο κάθε άτομο, τα οποία κληρονόμησαν το παθολογικό αλληλόμορφο από την μητέρα που φέρει 36 CAGs και προφανώς επεκτάθηκε δραματικά στην επόμενη γενιά. Η περίπτωση αυτή μπορεί να εξηγηθεί με μωσαϊκισμό στις γονάδες. (Laccone F. et al 2000).

Υπάρχει το ενδεχόμενο της παρουσίας μιας αρχαίας προμετάλλαξης για την HD στην οποία να οφείλονται όλοι οι HD πολυμορφισμοί της περιοχής και οι οποίοι σε διαφορετικές στιγμές και σε ποικίλους πληθυσμούς έχουν κάποια επέκταση. Εναλλακτικά πολλαπλές προμεταλλάξεις να συμβαίνουν σε διαφορετικά χρωμοσωμικά υπόβαθρα και να οδηγούν σε HD φαινότυπο.

Ενδιάμεσα αλληλόμορφα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες νευρολογικές διαταραχές. Στο σύνδρομο του εύθραυστου X, το ενδιάμεσο αλληλόμορφο έχει 52-100 επαναλήψεις και είναι μειωτικά ασταθές. Η προμετάλλαξη αυτή μεταφέρεται από τη μητέρα. Στη Μυοτονική δυστροφία (MD) το ενδιάμεσο αλληλόμορφο έχει 50-100 επαναλήψεις και είναι επίσης μειωτικά ασταθές. Η προμετάλλαξη κληρονομείται και από τους δύο γονείς (Goldberg Y.P. et al 1993, Goldberg Y.P. et al 1993).

Επεκτάσεις και συστολές του CAG μπορεί να συμβούν και στα δύο φύλα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα πρώιμα ωοκύτταρα σταματούν στην πρώτη μειωτική διαίρεση (πρόφαση) μέχρι την ωρίμανση. Σε ασθενείς όπου η HD πρωτεΐνη εκφράζεται στα ωάρια, τα πρόδρομα ωάρια πιθανόν πεθαίνουν πρόωρα και έτσι

αυξάνεται η πιθανότητα να μεταφερθούν στους απογόνους τα ωάρια με μικρές CAG επαναλήψεις (Laccone F. et al 2000).

Η επιλεκτική επέκταση του CAG στους απογόνους των αρσενικών στη HD, αντανακλά μια υψηλή τάση για μετάλλαξη στην αρσενική απ' ό τι στη θηλυκή γαμετική σειρά. Λάθη στην αντιγραφή (επέκταση τριπλετών) κατά την γαμετογένεση μπορεί να είναι πιο συχνά στα αρσενικά άτομα, αφού ο αριθμός των γαμετικών διαιρέσεων είναι μεγαλύτερος στα αρσενικά απ' ό τι στα θηλυκά άτομα. Είναι αξιοσημείωτο ό τι οι γονείς που έχουν το ενδιάμεσο αλληλόμορφο με μεταλλάξεις κατά την γαμετογένεση οδηγούν σε αυξημένα αλληλόμορφα ό ταν τεκνοποιήσουν σε προχωρημένη ηλικία. (M.O.=36,7), αν και υπάρχει περίπτωση ατόμου που τεκνοποίησε στα 30 και μετέφερε αλληλόμορφο με επέκταση του CAG (Watanable 2000). Αυτό είναι παρόμοιο με τον μέσο όρο ηλικίας γονέων για την αχονδροπλασία, Marfan's syndrome (αυτοσωμική επικρατής διαταραχή), ό που η υψηλή τάση για μετάλλαξη συνεργάζεται με αυξημένη ηλικία των γονέων (Goldberg Y.P. et al 1993, Goldberg Y.P. et al 1993).

Στη μελέτη της κληρονόμησης νευρολογικών ασθενειών που σχετίζονται με αύξηση του αριθμού κάποιας τριπλέτας μια σπουδαία παράμετρος είναι η καθαρότητα της επανάληψης, δηλαδή κατά πόσο διακόπτεται από άλλες αλληλουχίες. Για τον γενετικό τόπο SCA1 έχει φανεί ό τι στο 98% των κανονικών αλληλομόρφων η αλληλουχία των CAG επαναλήψεων διακόπτεται από CAT τριπλέτες, ενώ τα παθολογικά αλληλόμορφα αποτελούνται από αμιγής CAG επαναλήψεις. Αυτό το γεγονός μπορεί να μετράει για την σπανιότητα της ασθένειας, αφού σε μια πληθώρα κανονικών αλληλομόρφων η πιθανότητα για επέκταση είναι πολύ χαμηλή (predisposed).

Στην περίπτωση του συνδρόμου του εύθραυστου X (FRAXA) επίσης ο γενετικός τόπος διακόπτεται τουλάχιστον στα κανονικά αλληλόμορφα από 1 ή 2 AGGs. Οι Kunst και Warren (1994) μετά από ανάλυση αλληλουχίας σε 82 κανονικά αλληλόμορφα τα οποία μοιράζονταν 3 απλοτύπους, παρατήρησαν ό τι η περιοχή που περιείχε τα AGGs ήταν αρκετά σταθερή. Τα παθολογικά αλληλόμορφα παράγονται από επέκταση αμιγών CGG τριπλετών στο 3' άκρο.

Στα fragile-X χρωμοσώματα οι τριπλέτες μεταξύ 35-55 φαίνεται να είναι άλλοτε σταθερές και άλλοτε ασταθείς. Ό ταν τα CGG είναι περισσότερα από 33 και δεν διακόπτονται τότε αυξάνεται η αστάθεια. Το μήκος που παρέχει αστάθεια στα fragile-X αλληλόμορφα είναι μεταξύ 34-37 καθαρά CGG, αριθμός παρόμοιος με την

MD, Kennedy disease, HD, SCA1, DRPLA. Πιθανόν η σταθερότητα της CGG επανάληψης να οφείλεται σε διακοπές της, από το AGG κάθε 8-12 CGGs στα περισσότερα φυσιολογικά αλληλόμορφα.

6. Έκφραση του HD γονιδίου

Αρχικά απομονώθηκαν 2 cDNAs, τα HD12 και HD14 με υβριδοποιήσεις, restriction mapping, sequencing σε cDNA βιβλιοθήκες από πρόσθιο φλοιό, αμφιβληστροειδή χιτώνα, εμβρυϊκό εγκέφαλο, caudate (κερκοφόρο πυρήνα) και μυϊκούς ιστούς. Τα δύο cDNAs δείχνουν ίδιες κωδικές αλληλουχίες, αλλά διαφέρουν στις 3' αμετάφραστες περιοχές.

Τα δύο cDNAs, HD12 και HD14 έχουν μια αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή που αποκαλύπτει μια μοναδική πρωτεϊνική αλληλουχία. Το HD12 έχει μήκος 4164 bp, ενώ το HD14 5710bp (3360bp παραπάνω από το HD12, μια επιπρόσθετη μη-κωδική αλληλουχία). Στο HD12 υπάρχει μια ουρά από 18As, ενώ στο HD14 40As. Το HD14 έχει δύο διακριτές αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης, οι οποίες μας δίδουν αντίστοιχα και δύο μετάγραφα, ένα 10326 bp (AGTAAA) και ένα 13645bp (ATTAAA). Ενώ το HD12 δίδει ένα μετάγραφο 10306bp. Το HD14 έχει 3 επιπλέον δυνητικά σινιάλα πολυαδενυλίωσης και το 3' μη-μεταφραζόμενο τμήμα (UTR) έχει μήκος 3921bp, που αποτελεί και την μεγαλύτερη αλληλουχία στην Genbank (Stine O.C. et al 1995). Τα 2 είδη mRNA 10,5 Kb και 13,5Kb διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στο μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής και κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη, 3140 αμινοξέων, (350 KDa). Το mRNA και η πρωτεΐνη έχουν μια ευρεία έκφραση σε κύτταρα και ιστούς νευρικούς και μη (MacDonald M. E. et al 1996).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία διαφορετικών προϊόντων mRNAs, όπως: διαφορικό μάτισμα (splicing), εναλλακτική χρήση των θέσεων έναρξης της μεταγραφής ή επιλογή διαφορετικών θέσεων πολυαδενυλίωσης. Μ' αυτούς τους τρόπους μπορούμε να πάρουμε πολλαπλά είδη mRNAs από την ίδια γενομική περιοχή. Το πιο πιθανό στην περίπτωση μας είναι να συμβαίνουν διαφορετικά γεγονότα πολυαδενυλίωσης σε ένα μεγάλο μετάγραφο (Lin B. et al 1993).

Η πλειονότητα των ευκαρυωτικών mRNAs έχουν polyA ουρά στο 3' άκρο. Η προσθήκη επιπλέον polyAs συμβαίνει μετα-μεταγραφικά στον πυρήνα και εμπλέκει

κόψιμο του πρωτογενούς μεταγράφου και ακολούθως προσθήκη polyA στο νέο 3' άκρο. Η cis- ενεργή αλληλουχία συνήθως AATAAA, τοπογραφείται 15-25 νουκλεοτίδια παραπάνω του polyA και είναι υψηλά συντηρημένη και κρίσιμη για την πολυαδενυλίωση. Τροποποιήσεις μέσα σ' αυτήν την αλληλουχία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ή κατάργηση της 3'-processing. Και στα δύο είδη mRNA τα εξανουκλεοτίδια που συναντούμε υπάρχουν μέσα στην consensus αλληλουχία το οποίο θα μπορούσε να προβλέψει κανείς ότι μειώνει το σχίσιμο του πρωτογενούς μεταγράφου και ακολούθως γίνεται προσθήκη polyA στο νεοσχηματιζόμενο 3' άκρο (Lin B. et al 1993).

6.1 Προσδιορισμός και τοπολογία του HD mRNA

Με Northern blot ανάλυση κάποιων από τα αρχικά cDNA που χρησιμοποιήθηκαν στις υβριδοποιήσεις ανιχνεύθηκαν τα 2 mRNA μετάγραφα σε όλους τους ιστούς που περιείχαν ολικό mRNA ή/και poly A⁺ RNA. Ανιχνεύθηκαν σε λεμφοβλαστοειδή ιστό, πρόσθιο φλοιό, έντερο, συκώτι και πνεύμονα καθώς και στις κυτταρικές σειρές: lymphoblast, CaCo-2, Hep G2, HL60, 293S κύτταρα.

Το μεγαλύτερο mRNA μετάγραφο είναι επικρατές στον ανθρώπινο εγκέφαλο (από ενήλικο άτομο και από έμβρυο) σε σύγκριση με τους λεμφοβλάστες και τις κυτταρικές σειρές (CaCo-2, Hep G2,) όπου τα μικρότερα σε μέγεθος μετάγραφα είναι περισσότερα. Στο έντερο, συκώτι και πνεύμονα το μεγάλο μετάγραφο είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό. Η αιτία αυτής της διαφοροποίησης είναι άγνωστη, αλλά εικάζεται ιστοειδική επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης ή εναλλακτικά, ιστοειδικά αποτελέσματα στην σταθερότητα κάθε είδους mRNA. Το μικρό μετάγραφο οφείλεται σε διαφορετικό σήμα πολυαδενυλίωσης (Stine O.C. et al 1995).

Στον εγκέφαλο η έκφραση του mRNA παρατηρείται στα: hippocambal formation, cerebellar cortex, neocortex, striatum και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης είναι στα: Dentate gyrus cells, hippocambal pyramidal neurons, cerebellar Purkinje cells, cerebellar granule cells, ενώ η χαμηλότερη στη white matter (Strong T.V. et al 1993).

Επίσης το HD γονίδιο έχει υψηλή έκφραση στα σπερματογόνια στους ώριμους όρχεις, αλλά στην μορφή του μικρού μεταγράφου. Δεν έχει περιγραφεί όμως ελάττωση των σπερματοκυττάρων ή μείωση της γονιμότητας (fertility) των HD ασθενών. Εφόσον το 10Kb μετάγραφο βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα στους

περισσότερους μη-νευρικούς ιστούς γεννιέται το ερώτημα αν η απουσία κυτταρικής αποδιάταξης σε μη-νευρικούς ιστούς στην HD συμβαδίζει με τα χαμηλά επίπεδα του mRNA. Το 13Kb μετάγραφο μπορεί από μόνο του να είναι υπεύθυνο για την αποδιάταξη του νευρικού κυττάρου. Ίσως να υπάρχουν διαφορές μεταξύ του βαθμού έκφρασης του hd mRNA ή/και της huntingtin ή της ενδοκυτταρικής της τοποθέτησης (Schmitt G. et al 1995).

Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι παρών σε ολικό RNA από το φλοιό και το νεοραβδωτό σώμα από HD ασθενείς και συγκρίσιμο με το φυσιολογικό. Το HD γονίδιο εκφράζεται ευρέως στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, αλλά και σε άλλους ιστούς σε φυσιολογικούς αρουραίους και στον άνθρωπο. Στον εγκέφαλο έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα βασικά γάγγλια σε σχέση με άλλες περιοχές. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με το φυσιολογικό, πράγμα που προτείνει ότι το αυξημένο CAG είναι παρών στο HD mRNA σε HD ασθενείς. (Stine O.C. et al 1995).

Η υψηλή έκφραση του HD mRNA στα νεύρα εκτός εγκεφάλου μπορεί να σημαίνει ότι το HD γονίδιο είναι υπεύθυνο για την φυσιολογική λειτουργία των νεύρων. Η κατανομή του πάντως δεν σχετίζεται με το πρότυπο της νευροπαθολογίας της HD. Επίσης παρόλο που εκφράζεται έστω και σε χαμηλά επίπεδα σε μη νευρικούς ιστούς, δεν είναι γνωστή κάποια εξωνευρική παθολογία της HD (Strong T.V. et al 1993). Άρα το πρότυπο της παθολογίας της HD δεν μπορεί να είναι απλά μια λειτουργία του προτύπου έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου (Strong T. V. et al 1993).

Τα δύο μετάγραφα απαντώνται στον άνθρωπο, ποντίκι και στον αρουραίο. Στο ποντίκι συναντούμε και ένα τρίτο mRNA. Η παρουσία αυτής της τρίτης μορφής δεν έχει επιβεβαιωθεί με Northern blot ανάλυση. Εναλλακτικό splicing συμβαίνει μόνο στο μεγάλο μετάγραφο παρουσιάζοντας έτσι ένα επιπλέον 12Kb mRNA στους ποντικίσιους νευρικούς ιστούς (Schmitt G. et al 1995).

Κατά την ανάπτυξη, η έκφραση του rHD γονιδίου ρυθμίζεται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Οι πιο δημοφιλείς περιοχές του εγκεφάλου είναι η οδοντωτή έλικα και τα πυραμιδικά κύτταρα, μια περιοχή που σχετίζεται με πνευματικές λειτουργίες. Έτσι ζημιιά στην περιοχή του ιππόκαμπου περιλαμβάνει χάσιμο μνήμης, έλλειψη δυνατότητας μάθησης και λεκτικής δεξιότητας, γεγονότα που σχετίζονται με τα συμπτώματα στα μεταγενέστερα στάδια της HD. Το HD mRNA περιλαμβάνεται και στην παρεγκεφαλίδα μια περιοχή που σχετίζεται με ρύθμιση κινήσεων και με την

μάθηση και μνήμη βασικών κινήσεων. Ίσως αυτή η περιοχή να σχετίζεται και με μη-κινητικές γλωσσικές διαδικασίες. Άρα μια δυσλειτουργία σ' αυτή την περιοχή θα μπορούσε να σχετίζεται με διανοητική εξασθένηση στη νόσο του HD. Η δυσλειτουργία των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και των βασικών γαγγλίων προκαλεί μη-ισορροπημένες κινήσεις που συμβαδίζουν με ανωμαλίες κατά την έναρξη της ασθένειας, τον βαθμό και την ένταση της συστολής των συνεργιστικών μυϊκών ομάδων (Schmitt G. et al 1995).

Ερώτηση: Ποια είναι τελικά η μοριακή βάση του επιλεκτικού νευρικού θανάτου. Πώς ένα γονίδιο με ευρεία έκφραση έχει τόσο ιστοειδικά αποτελέσματα;

Πιθανές απαντήσεις:

A) Ίσως η παρουσία του μεγάλου μεταγράφου στον ανθρώπινο εγκέφαλο μπορεί να παρέχει συμπεράσματα για τον μηχανισμό με τον οποίο το γονίδιο εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, αλλά προκαλεί επιλεκτικό νευρικό θάνατο. Ένα σχετικό παράδειγμα είναι αυτό της amyloid precursor protein (APP) στην Alzheimer disease. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της πρωτεΐνης στην ασθένεια και έχει δειχθεί ότι το μεγαλύτερο από τα δύο μετάγραφα (από εναλλακτική πολυαδενυλίωση) αυξάνει την μετάφραση της πρωτεΐνης και μπορεί να προωθήσει την εναπόθεση αμυλοειδούς.

B) Μια δεύτερη υπόθεση αναφέρεται στην ιστοειδική πολυαδενυλίωση που μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης του μεγαλύτερου μεταγράφου που υπερέχει στον εγκέφαλο.

Γ) Επίσης το 3' UTR των mRNAs έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη μετάφραση και τη σταθερότητα τους. Έτσι το 3' UTR των ευκαρυωτικών mRNAs επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργία του mRNA, τον καθορισμό της κυτταροπλασματικής τοποθέτησης του mRNA και την έναρξη της μετάφρασης ειδικά των mRNAs που μεταφραστικά ρυθμίζονται σε κύτταρα γαμετικής σειράς. Επίσης οι 3' UTR περιοχές επηρεάζουν όχι μόνο τα γονίδια στα οποία ανήκουν, αλλά και άλλα εξίσου καλά, πράγμα που αποδεικνύει την άποψη για τον ρόλο του 3' UTR στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Lin B. et al 1993).

Στον αρουραίο παρατηρείται υψηλή έκφραση του mRNA σε νευρικές περιοχές, ενώ χαμηλότερη σε περιοχές με μορφολογία glial cells. Στους μη-νευρικούς ιστούς η έκφραση του hd γονιδίου επίσης μειώνεται. Υπάρχει χαμηλή έκφραση στα κύτταρα του Langerhans στο πάγκρεας, στο επιθήλιο, στους λείους μύες του κόλον, στα ηπατοκύτταρα και στους χοληδόχους αγωγούς και τους συνδετικούς ιστούς του συκωτιού. Στους ενήλικες το επίπεδο έκφρασης του hd γονιδίου φαίνεται στους

όργχεις. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στα ανώριμα σπερματογόνια, ενώ χαμηλότερη στις ώριμες σπερματίδες, όπως και στον άνθρωπο (Strong T.V. et al 1993).

Αφού στον αρουραίο και τους ανθρώπους το HD γονίδιο εκφράζεται ήδη στον εμβρυϊκό εγκέφαλο, η ερώτηση που προκύπτει είναι: αν ο θάνατος των νευρικών κυττάρων στους HD ασθενείς είναι ήδη προδιαγραμμαμένος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αν συμβαίνει αυτό δεν υπάρχει τότε ενδεχόμενο μετέπειτα θεραπείας. Πρόσφατες παθολογοανατομικές μελέτες σε εγκεφαλικούς ιστούς υγιών ατόμων που φέρουν αυξημένα CAG δεν δείχνουν κυτταρικούς θανάτους νωρίτερα από συμπτώματα (Schmitt G. et al 1995).

6.2 Προσδιορισμός και τοπολογία της HD πρωτεΐνης

Αρχικά απομονώθηκαν πρωτεΐνες από ασθενείς με 5 διαταραχές που σχετίζονται με επαναλήψεις (HD, SBMA, SCA1, DRPLA, SCA3). Για αυτές τις πρωτεΐνες ανέπτυξαν κατάλληλα αντισώματα.. Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες πρωτεϊνών με παρουσία πολυγλουταμινικής περιοχής. Τέτοιες είναι μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες, χωρίς όμως να παρουσιάζουν επέκταση, π.χ. η TATA-binding πρωτεΐνη με 38 gln. Με το αντίσωμα 1C2, που αναπτύχθηκε βάσει αυτής της πρωτεΐνης και αναγνωρίζει την πολυγλουταμινική περιοχή, προσπάθησαν να ανιχνεύσουν πολυγλουταμινικές περιοχές και σε άλλες πρωτεΐνες σε κυτταρικές σειρές. Π.χ. λεμφοβλαστοειδείς σειρές (LCL) από κανονικά και από άρρωστα άτομα. Τα αντισώματα anti-HDPmAbs αναγνώριζαν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη και την κανονική από κανονικά άτομα, ενώ το 1C2 αναγνώριζε μόνο την HD πρωτεΐνη από το HD άτομο. Η δυνατότητα του 1C2 αντισώματος να αναγνωρίζει την HDP εξαρτάται από το μήκος των πολυγλουταμινών, που είναι 60-85 στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, δίνοντας έτσι ένα ισχυρότερο σήμα στο Western blot (2-4 φορές πιο ισχυρό στις 85 γλουταμίνες απ' ότι στις 60. Ενώ στις 60 γλουταμίνες ήταν 10-20 φορές ισχυρότερο από τις 39. Την ίδια διαφορά σήματος παίρνουμε και στην ανίχνευση της TBP πρωτεΐνης από το 1C2 αντίσωμα. Δηλαδή ισχυρότερο στις 38-42 γλουταμίνες, μικρότερο στις 32 ή 33 και ακόμη ασθενέστερο στις 29-30 γλουταμίνες.

Και στην TBP πρωτεΐνη, αλλά και στην HDP φαίνεται ότι ο επίτοπος που αναγνωρίζει το μονοκλωνικό αντίσωμα 1C2 είναι πλούσιος σε πολυγλουταμίνες και

εξαρτάται από το μήκος. Συναφή αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για την SCA1 (αταξίνη) και την SCA3 πρωτεΐνη με το 1C2 αντίσωμα. Το σήμα στην αταξίνη-1 με ίδιο αριθμό γλουταμινών με την HD πρωτεΐνη είναι μικρότερο από την HDP. Ίσως το επίπεδο έκφρασης της αταξίνης-1 είναι μικρότερο από αυτό της HDP (Bates G. 1996).

Η φυσιολογική HD πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 348KDa, ενώ η παθολογική 354 KDa. Η διαφορά των 6 KDa, εξαρτάται από τη διαφορά των επαναλήψεων που υπάρχουν στο DNA (Gln). Αυτή η διαφορά, αλλά και η διαφορά στην κινητικότητα των δύο πρωτεϊνών και σε gel πολυακρυλαμίδης αντανακλά την διαφορά φορτίου μεταξύ των δύο ή κάποια δομική διαφορά σύμφωνα με το μήκος των πολυγλουταμινών, αλλά δεν αποκλείεται και το γεγονός της μεταμεταφραστικής τροποποίησης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και στην TATA-binding πρωτεΐνη (TBP) (Trottier Y. et al 1995). Επίσης τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιείς φαίνονται τα ίδια ποσά πρωτεΐνης σε ιστούς σε μελέτες με χρήση αντισωμάτων (Stine O.C. et al 1995).

Το μέγεθος της πρωτεΐνης είναι ίδιο σε όλους τους ιστούς (350KDa) εκτός από τους σκελετικούς μύες, οι οποίοι δείχνουν ένα μικρότερο πρωτεϊνικό προϊόν, στα 150KDa (ανίχνευση με probe που είναι ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη). Ίσως η μικρότερη πρωτεΐνη να είναι προϊόν εναλλακτικού splicing, διαφορετικό μεταφραστικό σημείο έναρξης ή ιστοειδική πρωτεολυτική διαδικασία. Η HD πρωτεΐνη και στα ανθρώπινα και στα ποντικίσια κύτταρα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Η πρωτεΐνη υπάρχει σε νευρικούς και σε περιφερικούς ιστούς με κοινή λειτουργία στους ιστούς αυτούς. Είναι κυτταροπλασματική και κάποια τμήματα της συνεργάζονται με μεμβρανικά ή κυτταροσκελετικά συστατικά, όπως είναι οι μικροσωληνίσκοι ή τα συναπτικά κυστίδια. Η συνεργασία αυτή εξαρτάται από τις συνθήκες διαχωρισμού της πρωτεΐνης.

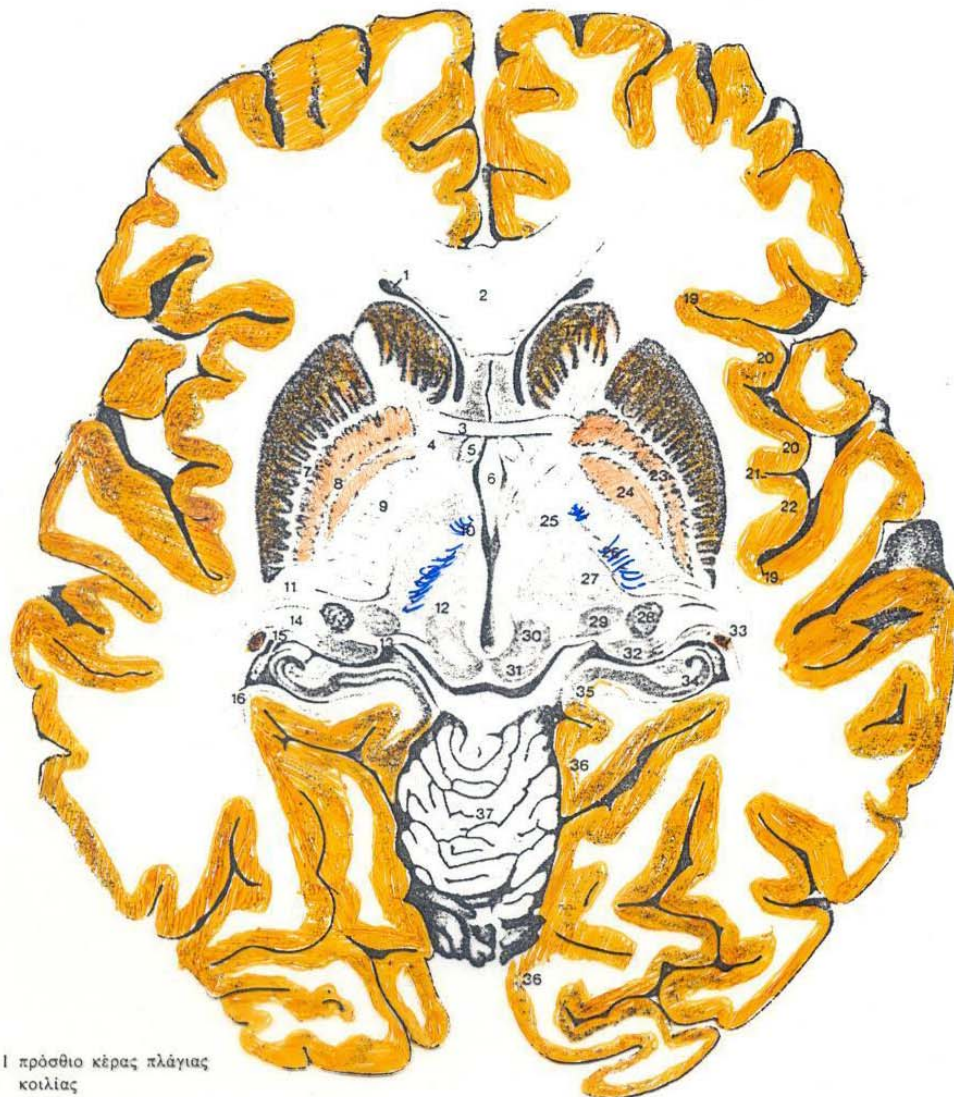
Μελέτη διαφόρων οργάνων στο ποντίκι έδειξε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται: σε νεύρα του εγκεφαλικού φλοιού, στην παρεγκεφαλίδα (πυρήνας και κυτταρόπλασμα των κυττάρων Purkinje), στα νευρικά κύτταρα στα κοκκώδη κύτταρα (στο κυτταρόπλασμα), στη μέλαινα ουσία (στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα), στα κύτταρα γλοίας, δεν βρέθηκε στον πυρήνα. Παρόμοια κατανομή με παρουσία της πρωτεΐνης στον πυρήνα νευρικών κυττάρων και απουσία στα κύτταρα της γλοίας έχουμε και στον κερκοφόρο πυρήνα. Το ισχυρότερο σήμα της πρωτεΐνης φαίνεται

στη μέλαινα ουσία. Κυτταροπλασματική παρουσία της πρωτεΐνης φαίνεται επίσης στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων, στους όρχεις, στο συκώτι στο σπλήνα, στην καρδιά και στους νεφρούς. Στα σπερματογόνια των όρχεων φαίνεται ποικίλη έκφραση στην πυρηνική τοποθέτηση των σπερματοκυττάρων προτείνοντας μια διαφορετική έκφραση της huntingtin σε διάφορα στάδια της σπερματογένεσης.

Σε τομές από τον πρόσθιο φλοιό HD ασθενών και φυσιολογικών ατόμων η έκφραση και τοποθέτηση της πρωτεΐνης είναι συγκρίσιμη με αυτήν του ποντικίου. Πιο συγκεκριμένα με χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων φαίνεται ότι η huntingtin υπάρχει σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου και κυρίως στον φλοιό, στις περιοχές της φαιάς ουσίας με περισσότερη ένταση στη μέλαινα ουσία, στα στρώματα IV και VI του φλοιού καθώς και στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας και στο νεοραβδωτό σώμα. Επίσης εντοπίζεται στα σώματα των νευρικών κυττάρων, στους δενδρίτες, άξονες και στα τελικά κομβία, αλλά όχι στον πυρήνα. Σε περιφερικούς ιστούς υπάρχει μια διακύμανση στην έκφραση της. Υψηλή έκφραση υπάρχει στους όρχεις, ενδιάμεση στην καρδιά, συκώτι, και πνεύμονες, ενώ χαμηλότερη στο έντερο, στο σπλήνα και στους νεφρούς. Η έκφραση είναι κυρίως σε νευρικές ίνες και varicosities **(Εικόνες 7, 8)**, (Trottier Y. et al 1995). Η HD έχει παθολογία σε επιλεγμένες περιοχές, επιλεκτική νευρική ευπάθεια στις ακανθώδεις προεκβολές των νeurών στον κερκοφόρο πυρήνα (caudate) και στο κέλυφος (putamen), ενώ εμπλέκονται και περιοχές όπως ο πρόσθιος φλοιός. Αυτό που συμβαίνει είναι χάσιμο μικρών νeurών και ενεργή αστρογλοίωση **(Εικόνες 7, 8)**, (Ross C. A.1995).

Οι ερευνητές συμφωνούν ότι η έκφραση του HD γονιδίου και εκτός του εγκεφάλου δεν σχετίζεται με το χάσιμο των νeurών στη HD. Το πρότυπο έκφρασης του HD γονιδίου σε κύτταρα του εγκεφάλου από HD και φυσιολογικά άτομα δεν διαφέρει, γεγονός που δεν εξηγεί την νευροπαθολογία και δεν μας δείχνει ένα τρόπο που να αναγνωρίζουμε τον μηχανισμό της νόσου, γιατί δεν είναι φανερά τροποποιημένος στη HD, εκτός από το γεγονός ότι ακολουθεί νευρικός θάνατος. Αυτό το πρότυπο έκφρασης της huntingtin δείχνει ότι η λειτουργία της είναι κοινή σε νευρικά και μη-νευρικά κύτταρα. Το ερώτημα επομένως: " Γιατί υπάρχει ειδικός κυτταρικός θάνατος στα νευρικά κύτταρα στην HD;" παραμένει. Το σίγουρο στο gain of function μοντέλο είναι ότι το επεκτεινόμενο CAG τμήμα δεν δρα ή ότι αλληλεπιδρά με τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης. Άρα η γνώση του

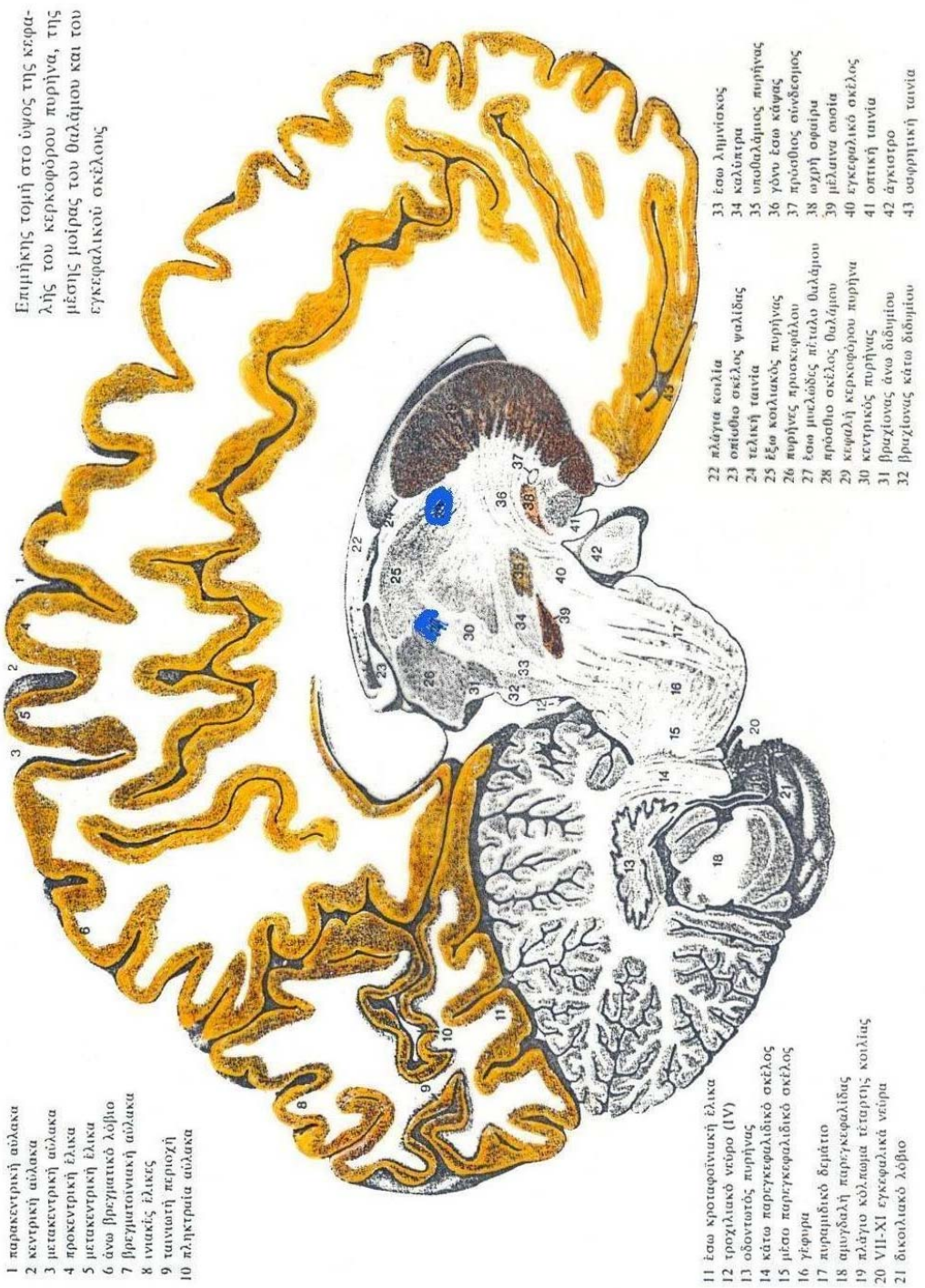
φυσιολογικού ρόλου της HD θα βοηθήσει να μάθουμε την παθογένεια της HD (Gusella J. et al 1995).



- | | | |
|--|------------------------------|-----------------------------------|
| 1 πρόσθιο κέρασ πλάγιας κοιλίας | 17 κεφαλή κερκοφόρου πυρήνα | 27 έξω-οπίσθιος κοιλιακός πυρήνας |
| 2 γόνυ μεσολοβίου | 18 κέλυφος | 28 έξω γονατώδες σώμα |
| 3 πρόσθιος σύνδεσμος | 19 κυκλοτερής αύλακα νήσου | 29 έσω γονατώδες σώμα |
| 4 πρόσθιο σκέλος θαλάμου | 20 βραχείες έλικες νήσου | 30 προτετραδύμικη περιοχή |
| 5 πρόσθιο σκέλος ψαλίδας | 21 κεντρική αύλακα νήσου | 31 άνω διδύμιο |
| 6 τρίτη κοιλία | 22 επιμήκης έλικα νήσου | 32 πυρήνες προσκεφάλου |
| 7 έξω μυελώδες πέταλο ραβδωτού σώματος | 23 έξω μοίρα ωχρής σφαίρας | 33 ουρά κερκοφόρου πυρήνα |
| 8 έσω μυελώδες πέταλο ραβδωτού σώματος | 24 έσω μοίρα ωχρής σφαίρας | 34 ιππόκαμπος |
| 9 οπίσθιο σκέλος έσω κάνας | 25 αβέβαιη ζώνη | 35 παραίποκάμπεια έλικα |
| 10 μαστιοθαλαμική δεσμίδα | 26 δικτυωτός πυρήνας θαλάμου | 36 έσω κροταφοεινική έλικα |
| 11 μεταφακοειδής μοίρα έσω κάνας | | 37 πρόσθιος λοβός παρεγκεφαλίδας |
| 12 οπίσθιος σύνδεσμος | | |
| 13 βραχίονας άνω διδύμιου | | |
| 14 οπτική ακτινοβολία | | |
| 15 τελική ταινία | | |
| 16 κάτω κέρασ πλάγιας κοιλίας | | |

Οριζόντια τομή στο ύψος του ραβδωτού σώματος, του πρόσθιου συνδέσμου και του άνω διδύμιου

Εικόνα 7



Επιμήκης τομή στο ύψος της κερφα-
λης του κερκοφόρου πυρήνα, της
μέσης μοίρας του θαλάμου και του
εγκεφαλικού στέλεχος

- 1 παρακεντρική αύλακα
- 2 κεντρική αύλακα
- 3 μετακεντρική αύλακα
- 4 προκεντρική έλικα
- 5 μετακεντρική έλικα
- 6 άνω βρεχλιατικό λοβίο
- 7 βρεχλιατοειδική αύλακα
- 8 ινιακός έλικας
- 9 ταινιοτή περιοχή
- 10 πληκτραία αύλακα

- 11 έσω κροταφοειδική έλικα
- 12 τροχλιακό νεύρο (IV)
- 13 οδοντωτός πυρήνας
- 14 κάτω παρεγκεφαλικό στέλεχος
- 15 μέσο παρεγκεφαλικό στέλεχος
- 16 γέφυρα
- 17 πυραμειδικό δερμάτιο
- 18 αμυγδαλή παρεγκεφαλίδας
- 19 πλάγιο κόλπωμα τέταρτης κοιλίας
- 20 VII-XI εγκεφαλικά νεύρα
- 21 δικουλικό λοβίο

- 22 πλάγια κοιλία
- 23 σπείσθιο στέλεχος ψαλίδας
- 24 τελική ταινία
- 25 έξω κοιλιακός πυρήνας
- 26 πυρήνες προακεφαίου
- 27 έσω μετακώδης πίταλο θαλάμου
- 28 πρόσθιο στέλεχος θαλάμου
- 29 κρηβάλη κερκοφόρου πυρήνα
- 30 κεντρικός πυρήνας
- 31 βρεχλιατός άνω διδύμιου
- 32 βρεχλιατός κάτω διδύμιου
- 33 έσω ληνίασος
- 34 κελόκερα
- 35 υποθαλάμιος πυρήνας
- 36 γόνυ έσω κάψας
- 37 πρόσθιος σπείσθιος
- 38 ωχρή σφαίρα
- 39 μέλαινα ουσία
- 40 εγκεφαλικό στέλεχος
- 41 οπτική ταινία
- 42 άγκιστρο
- 43 σφαιρητική ταινία

Εικόνα 8

Πώς το αυξημένο CAG ενεργεί με τέτοιο τρόπο ώστε να πεθαίνουν επιλεγμένα νεύρα; Η τοπολογία της φυσιολογικής πρωτεΐνης πάντως στα κυτταρικά σώματα, τους δενδρίτες, τους άξονες και τα τελικά κομβία ίσως να βοηθά α) στην αγκυροβόληση των κυστιδίων και των οργανιδίων στο κυτταρόπλασμα, β) στην κυκλοφορία των κυστιδίων, γ) σε κυτταρικές λειτουργίες άλλων οργανιδίων, όπως μιτοχόνδρια, Golgi, λυσοσώματα, πυρήνας, χωρίς να είναι εσωτερικό στοιχείο αυτών (MacDonald M. et al 1996).

Η huntingtin δεν παρουσιάζει ομολογίες με καμιά από τις γνωστές πρωτεΐνες. Οι περιοχές με πολλές γλουταμίνες βρίσκονται σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Sp1 και ο IID. Επίσης στον υποδοχέα του ανδρογόνου στην SBMA εκφράζεται στο νωτιαίο μυελό και πιστεύεται ότι προστατεύει τα νεύρα από αποδιάταξη. Ο ρόλος όμως της huntingtin είναι άγνωστος. Η huntingtin έχει πολλές δυναμικές θέσεις φωσφορυλίωσης (Hoogeveen A. T. et al 1993).

Σε HD και φυσιολογικούς ανθρώπινους εγκεφάλους ανιχνεύεται huntingtin με την synaptophysin και υπάρχει και ποσοστιαία σχέση. Φαίνεται ότι η huntingtin εντοπίζεται και στην μεμβράνη. Η ποντικίσια ομόλογη πρωτεΐνη είναι κυτταροπλασματική, σε αντίθεση με την ανθρώπινη και αυτήν του αρουραίου. Η huntingtin του ανθρώπου και του αρουραίου παρουσιάζουν διαφορές στο μήκος των πολυγλουταμινών. Όμως και στα τρία είδη ,άνθρωπος, αρουραίος και ποντίκι η παρουσία της πρωτεΐνης στον εγκεφαλικό φλοιό παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο.

Η μεμβρανική ή κυτταροπλασματική τοποθέτηση μάλλον έχει να κάνει με ανταπόκριση της πρωτεΐνης σε ειδικούς μηχανισμούς σηματοδότησης. Η huntingtin ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μεμβράνη και /ή στην πρωτεϊνική κυκλοφορία αν βασιστούμε στο γεγονός ότι: α) εκφράζεται σε νευρικούς και μη-νευρικούς ιστούς, β) έχει κυτταροπλασματική τοποθέτηση, γ) συνεργάζεται με μεμβράνες και δ) παρατηρείται θνησιμότητα στα ομόζυγα ποντίκια αν αφαιρέσουμε το γονίδιο Hdh (**Πίνακας 5**).

Με immunostaining σε εγκεφαλικούς ιστούς από ποντίκι, φάνηκε αύξηση της συγκέντρωσης στα προσυναπτικά κομβία. Η huntingtin στα συναπτοσώματα παρουσιάζει χαλαρή σύνδεση με μεμβράνες. Γενικά έχει δείξει κυτταροπλασματική και πυρηνική παρουσία. Πάντως οι περισσότερες πρωτεΐνες που έχουν γλουταμίνες είναι μεταγραφικοί παράγοντες και μια πυρηνική παρουσία της huntingtin θα μπορούσε να μας πει ότι δρα σαν transcriptional factor- associated protein, αν και της λείπει μια φανερή nucleic acid binding site.

Πίνακας 5. Εντοπισμός της HD πρωτεΐνης σε ιστούς από διάφορα όργανα		
Όργανο	Κυτταρόπλασμα	Πυρήνας
Συκώτι	+	+/-
Σκελετικοί μύες	+	-
Καρδιά	+	-
Σπλήνα	+	-
Έντερο	+	-
Θύμος αδένας	+	-
Όρχεις	+	+/-
Νεφρό	+	-
Πάγκρεας	+	-
Λεμφοβλαστοειδείς σειρές	+	+
<u>Εγκέφαλος:</u>		
- Πρόσθιος φλοιός (νεύρα)	+	+
- Κερκοφόρος πυρήνας	+	+
- Κέλυφος	+	+
- Ωχρά σφαίρα	+	+
- Μέλαινα ουσία	+	+
-Υποθαλαμικός πυρήνας	+	+
- Παρεγκεφαλίδα		
- Κοκκοειδή κύτταρα layer	+	-
- Κύτταρα Purkinje	+	+
- Πυρήνας παρεγκεφαλίδας	+	+
- Κύτταρα γλοίας	+	-

7. Παθογένεια πρωτεΐνης

Η Huntingtin υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του σώματος και όχι μόνο στα νεύρα. Παρόλα αυτά στη HD δεν καταστρέφονται όλα τα κύτταρα, αλλά επιλεκτικά τα νευρικά. Δεν είναι γνωστή ακριβώς η φυσιολογική λειτουργία της στον οργανισμό, αλλά ξέρουμε ότι είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη. Η ζωτική λειτουργία της huntingtin φαίνεται σε knockout ποντίκια που δεν έχουν το HD γονίδιο και πεθαίνουν στην 8,5-10,5 ημέρα της εμβρυογένεσης, που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη μάλλον εμπλέκεται σε μηχανισμούς ελέγχου της ανάπτυξης. Αυτή η λειτουργία πρέπει να διασώζεται, αφού ασθενείς με αυξημένες επαναλήψεις ομόζυγοι, μεγαλώνουν κανονικά και εκδηλώνουν την ασθένεια αργότερα όπως και οι ετεροζυγότες. Ίσως

όμως και η γλουταμινική επανάληψη να μην έχει λειτουργία, αφού τα ποντίκια έχουν μόνο 7 CAGs και το puffer fish μόλις 4 CAGs (Djian P. et al 1996).

Πως η HD μετάλλαξη με την επέκταση της τριπλέτας CAG οδηγεί σε φαινότυπο θανάτου; Και γιατί επηρεάζεται περισσότερο το νεοραβδωτό σώμα; Ίσως η επέκταση των γλουταμινών να προκαλεί δομικές αλλαγές και έτσι να αλλάζει και τις δυνατότητες πρόσδεσης της huntingtin για μερικά πρωτεϊνικά συστατικά από κυστίδια ή μικροσωληνίσκους. Είναι πιθανόν να διαταράσσεται η ισορροπία της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών και της πρόσληψής τους από τα νεύρα και έτσι οδηγούμαστε στην παθολογία της HD. Έτσι υπερβολική συσσώρευση φυσιολογικών διεγερτικών χημικών που εμπλέκονται στο νευρικό σήμα να οδηγεί στην κυτταρική καταστροφή. Ένας νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται από τα βασικά γάγγλια είναι το γλουταμικό οξύ που είναι διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο. Ένεση γλουταμικού σε αρουραίους στα βασικά γάγγλια δημιούργησε HD συμπτώματα, επειδή το γλουταμικό οξύ δρα σαν εξωτοξίνη όταν είναι σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι τα βασικά γάγγλια μάλλον δέχονται από άλλα νεύρα μεγάλες ποσότητες νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμικό οξύ και οδηγούνται στον θάνατο. Η υπερβολική ποσότητα του γλουταμικού οξέος μάλλον επηρεάζει τα μιτοχόνδρια και οδηγεί τα αντίστοιχα κύτταρα σε παραγωγή μειωμένης ενέργειας, οπότε γίνονται ευαίσθητα στις κανονικές ποσότητες του γλουταμικού οξέος. Μπορεί τα κύτταρα να αυτοκτονούν σε απάντηση των χημικών αλλαγών που συμβαίνουν στην HD (απόπτωση). Μια άλλη πιθανότητα είναι κάποιες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες να αναγνωρίζουν τις τριπλέτες, να αλληλεπιδρούν με την huntingtin και να οδηγούν σε παθογένεση (Bates G. 1996). Δεν είναι όμως καθαρό αν η μεμβρανική ή η διαλυτή μορφή είναι αυτή που σχετίζεται με την παθολογία όταν επεκταθούν οι γλουταμίνες ή συμμετέχουν και οι δύο μορφές (Wood J. D. et al 1996).

Η παθογένεια της HD και της SCA1 εξηγείται μάλλον με μηχανισμούς gain-of-function, κάτι που επιβεβαιώνεται και από δύο μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών. Διαγονιδιακά ποντίκια για το HD γονίδιο έφεραν μια μετάλλαξη εντός του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου. Αυτά τα ζώα εκφράζουν mRNA, αλλά όχι την πρωτεΐνη και δεν έχουν νευρική εκφύλιση. Μια δεύτερη κατηγορία διαγονιδιακών ποντικών (Burright E.N. et al 1995), για το SCA1 γονίδιο, εκφράζουν το mRNA και όχι την πρωτεΐνη και παρουσίασαν αταξία και χάσιμο των Purkinje κυττάρων (5 από τα 6). Ένας μηχανισμός gain-of-function μπορεί να σημαίνει μια δυνατότερη συνεργασία

με μια πρωτεΐνη με την οποία το γονιδιακό προϊόν να συνεργάζεται φυσιολογικά, μπορεί όμως να εμπλέκει καμιά φορά και μια νέα αλληλεπίδραση.

Με χρήση του aHD1Ab σε λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές από δύο άρρωστα άτομα (ομόζυγο και ετερόζυγο) ανιχνεύεται η πρωτεΐνη στο αναμενόμενο μέγεθος. Τα ίδια αποτελέσματα παίρνουμε και από τον εγκέφαλο. Το ποσό της HD πρωτεΐνης στον εγκέφαλο του άρρωστου ατόμου ήταν λιγότερο από το αντίστοιχο σε φυσιολογικά άτομα. Αυτό συμβαίνει λόγω του εκτεταμένου θανάτου των νευρικών κυττάρων που συμβαίνει στον κερκοφόρο πυρήνα και στον φλοιό κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Άλλη πιθανή εξήγηση είναι η μη-ειδική αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους ιστούς μετά τον κυτταρικό θάνατο. Η ανίχνευση μικρότερων πρωτεϊνών μπορεί να οφείλεται σε αποδιάταξη της HD πρωτεΐνης από τα λυσοσώματα ή από την ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών με παρόμοιους επίτοπους. Έχουν ανιχνευθεί συσσωματώματα πρωτεϊνών στα νευρικά κύτταρα HD ασθενών. Τα συσσωματώματα αυτά περιέχουν ένα μέρος της huntingtin. Πιθανώς η huntingtin να κόβεται σε κομμάτια και μερικά από αυτά να συσσωματώνονται στον πυρήνα. Λόγω αυτών των χημικών αλλαγών κατά την διάρκεια της HD τα κύτταρα μπορεί να «αυτοκτονούν». Όμως φυσιολογικά ένα κύτταρο καταστρέφει τις πρωτεΐνες με κατασκευαστικά λάθη (mis-fold), που δεν χρειάζεται πια, ή αυτές που είναι διαταραγμένες. Η huntingtin για κάποιο λόγο φαίνεται να μην σπάει τελείως. Τα αποτελέσματα αυτά, αλλά και το γεγονός της ύπαρξης ατόμου με διακοπτόμενο γονίδιο και καθόλου συμπτώματα της ασθένειας, ενισχύει το γεγονός ότι η HD δεν προκαλείται από loss of expression της πρωτεΐνης, αλλά από νέα «λειτουργία» λόγω των πολλών γλουταμινών (Zeittin S. et al 1995).

Ο πολλαπλασιασμός των γλουταμινών πέρα από ένα ορισμένο αριθμό μπορεί να αυξάνει την συγγένεια της huntingtin, σαν υπόστρωμα για δράση τρανσγλουταμινάσης. Τα προϊόντα από την ένωση πολλών πολυγλουταμινών με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, μπορεί να αποδιατάσσονται. Μπορεί όμως και να παραμένουν στα κύτταρα σαν κατάλοιπα ισοπεπτιδίων, τα οποία συσσωρεύονται με τα χρόνια και τελικά προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο. Έτσι η πρόληψη ή η θεραπεία της HD ίσως να πρέπει να αρχίζει πριν τα πρώτα συμπτώματα της αποδιάταξης του νευρικού κυττάρου, ίσως με μεταγραφική ή μεταφραστική παρεμπόδιση του HD mRNA. Δύο υποθέσεις κυριαρχούν κατά τις οποίες ίσως να σχηματίζεται ένα ένζυμο με ενεργότητα τρανσγλουταμινάσης ή να υπάρχει ανωμαλία σε αλληλεπιδράσεις

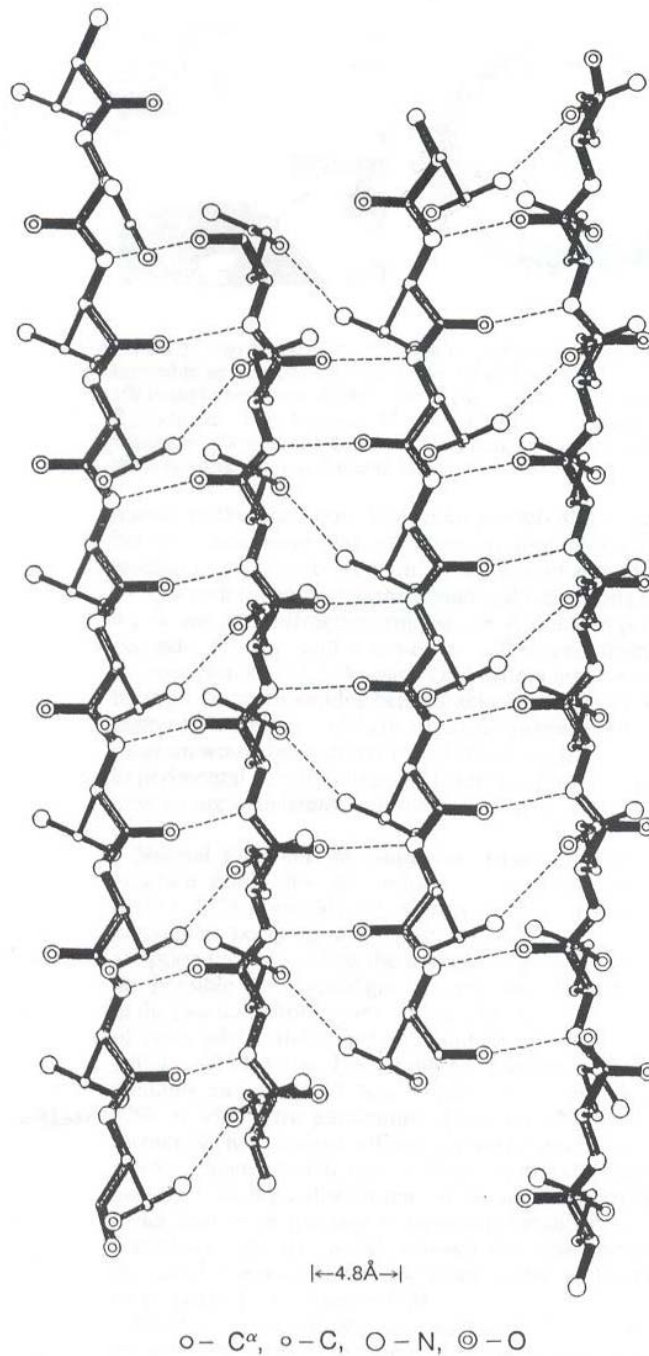
μεταξύ της HD πρωτεΐνης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως συμβαίνει στον androgen υποδοχέα στην SBMA (Stine O.C. et al 1995).

Δύο παράγοντες επηρεάζουν τη συχνότητα της ανάπτυξης αυτών των συσσωματωμάτων: 1) Το μέγεθος του πολυγλουταμινικού τμήματος και 2) το μήκος της πρωτεΐνης που εκφράζεται. Τα συσσωματώματα αναπτύσσονται με υψηλή συχνότητα σε κύτταρα με την κολοβή πρωτεΐνη που περιέχει αυξημένα πολυγλουταμινικά τμήματα. Με περιπυρηνική χρώση της huntingtin, φαίνεται στα νεύρα που έχουν σημάδια αποδιάταξης. Επίσης εντοπίζεται σε νευρικά ενδοπυρηνικά κυστίδια, όσο και σε περιπυρηνικά στους HD ασθενείς.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το αρχικό βήμα στην παθογένεση της HD περιλαμβάνει κόψιμο της πρωτεΐνης το οποίο ακολουθείται από ανάπτυξη περιπυρηνικών συσσωματωμάτων. Οι κολοβές πρωτεΐνες της huntingtin, ataxin-1, atrophin και του androgen receptor συνεργάζονται όλες με άλλα πρωτεϊνικά τμήματα και δημιουργούνται συσσωματώματα, πράγμα που προτείνει την υπόθεση του «τοξικού τμήματος» η οποία προβλέπει ότι το πρωτεολυτικό κόψιμο της πρωτεΐνης με πολυγλουταμίνες και η ανάπτυξη συσσωματωμάτων είναι σπουδαία για την παθογένεση αυτής της κατηγορίας ασθενειών (Martindale D. et al 1998).

Για τις γλουταμινικές επαναλήψεις δεν έχει αναφερθεί μοριακή λειτουργία, καθώς δεν φαίνεται να έχουν επιπτώσεις στην μεταγραφή και στην μετάφραση του HD γονιδίου. Το πολυγλουταμινικό τμήμα μπορεί να προκαλεί ασυνήθιστους σχηματισμούς ή και τροποποιήσεις των γειτονικών περιοχών της πρωτεΐνης δημιουργώντας ισχυρές δομές β-βαρελιών (β-sheets) που δρουν σαν polar zippers. Οι δομές αυτές πιθανόν να ενώνουν και άλλες πρωτεΐνες μαζί, όπως γίνεται και στα leucine zipper που ενώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες c-jun και c-fos (Trottier L. et al 1995).

Ο Perutz μελέτησε μερικές πρωτεΐνες που περιείχαν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες από πολικά κατάλοιπα. Το μοριακό μοντέλο δείχνει ότι αυτή η δομή συνδέει β-αλυσίδες μαζί σε φύλλα ή βαρέλια μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ αμινομάδων της κύριας αλυσίδας και των polar zipper αλυσίδων (**Εικόνα 9**). Αυτές οι αλληλουχίες ονομάστηκαν polar zippers. Υπάρχουν πολύ εκτεταμένες γλουταμινικές περιοχές σε πολλές πρωτεΐνες, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες των homeobox πρωτεϊνών της Δροσόφιλας. Από αυτές τις δύο κατηγορίες πρωτεϊνών η μία περιέχει ένα επιπλέον N-τμήμα με 224 κατάλοιπα, από τα οποία το 32% είναι γλουταμίνες (Perutz M. F. et al 1994).



Εικόνα 9. Δομή από δύο ζευγάρια αντιπαράλληλων β-δομών poly (L-glutamine) συνδεδεμένες μαζί με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της κύριας αλυσίδας και της πλευρικής ομάδας.

Αν κοπεί ένα μέρος από αυτές τις γλουταμίνες δεν μειώνεται η συγγένεια για το δέσιμο με το DNA, αλλά μειώνεται στο μισό η μεταγραφική ικανότητα. Αντίθετα αν κοπεί μέρος της πρωτεΐνης μακριά από την περιοχή με τις πολλές γλουταμίνες (κοντά στο C-τμήμα), τότε διατηρείται η μεταγραφική δραστηριότητα. Άρα ίσως η πλούσια

σε γλουταμίνες περιοχή έχει ένα σοβαρό ρόλο στην αντίστοιχη λειτουργία, αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις για τον πιθανό μηχανισμό.

Υπάρχουν δύο πιθανότητες: 1) Οι γλουταμίνες δένουν σε ειδικές συμπληρωματικές πρωτεΐνες σαν μέρος ενός φυσιολογικού μεταγραφικού ελέγχου, που συμβαίνει με υψηλή συγγένεια μεταξύ των μορίων ή με μη-συγγένεια για άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. 2) οι πολλές γλουταμινικές επαναλήψεις μπορεί να οδηγούν τις προσβεβλημένες πρωτεΐνες να συσσωματώνονται και να κατακρημνίζονται στα νεύρα, πράγμα που μπορεί να εξηγεί, γιατί τα συμπτώματα είναι πιο σοβαρά και σε πιο μικρή ηλικία όταν οι γλουταμινικές επαναλήψεις είναι πολύ μεγαλύτερες και γιατί τα συμπτώματα της HD είναι κυρίως νευρικά. Από την άλλη, χρώση με αντισώματα για την HD πρωτεΐνη στα Purkinje κύτταρα και σε κύτταρα από τον πρόσθιο φλοιό δεν δείχνει καμιά διαφορά μεταξύ υγιούς και ασθενούς ατόμου (Perutz M. F. et al 1994).

Η απουσία εμβρυϊκού θανάτου στη HD επικρατή μετάλλαξη και η επιλεκτικότητα της επιρροής της μετάλλαξης για μια υποομάδα νευρικών ιστών μπορεί να σημαίνει ότι η μεταλλαγμένη huntingtin με εκτεταμένη πολυγλουταμινική περιοχή μπορεί να λειτουργήσει φυσιολογικά σε μη-προσβεβλημένους ιστούς.

Έτσι η μεταλλαγμένη huntingtin ενώ παίζει φυσιολογικό ρόλο στα προσβεβλημένα νεύρα, μπορεί να αλληλεπιδρά παθολογικά με ένα «ξένο» μακρομόριο, που εκφράζεται με ιστοειδικότητα στο νεοραβδωτό σώμα. Μέσω αυτής της συνεργασίας, μια τροποποιημένη λειτουργία της huntingtin μπορεί να οδηγεί γρηγορότερα σε απόπτωση των κυττάρων. Όμως η θεωρούμενη ανώμαλη αλληλεπίδραση της huntingtin με άλλα μόρια, που εξαρτάται από την πολυγλουταμινική περιοχή, είναι πιθανώς ασθενής και έτσι η νευρική βιωσιμότητα δεν επηρεάζεται έντονα. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να αφήνει κάποια κενά στο παθολογικό μονοπάτι και να επιτρέπει μόνο αθροιστική αύξηση ενός αποπτωτικού σήματος στα νευρικά κύτταρα, που δυνητικά εξηγεί την καθυστερημένη εκδήλωση και την αργή πρόοδο της ασθένειας στην πλειονότητα των HD περιπτώσεων. Μια πιο ισχυρή παθολογική συνεργασία, όταν οι τριπλέτες είναι αυξημένες, θα μπορούσε να εξηγήσει πρώιμη και περισσότερο σοβαρή εκδήλωση της ασθένειας στις νεανικές περιπτώσεις. Η επικράτηση του φαινοτύπου οφείλεται απλά στο γεγονός ότι το φυσιολογικό αλληλόμοφο δεν μπορεί να σώσει το φαινότυπο σε ετεροζυγότες, αφού δεν μπορεί να εμποδιστεί η άθροιση ενός αποπτωτικού σήματος (Zeitlin S. et al 1995).

Έτσι υπάρχουν οι ακόλουθες υποθέσεις:

A) Οι πολυγλουταμίνες στην huntingtin ίσως να γίνονται υποστρώματα για δράση τρανσγλουταμινάσης που θα έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται μικρότερα τμήματα, τα οποία δεν αποικοδομούνται και έχουν τοξική δράση στα κύτταρα.

B) Μπορεί να δημιουργούνται μη-ομοιοπολικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Τα πολυγλουταμινικά τμήματα σχηματίζουν polar-zipper δομές που να έχουν β -sheets συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της κύριας αλυσίδας και των αμινομάδων της πλευρικής αλυσίδας. Αυτή η μορφή μπορεί να γίνει μεταξύ δύο πρωτεϊνών με πολυγλουταμινικά τμήματα ή μιας πρωτεΐνης με τέτοια δομή. Πιθανώς η επέκταση στην huntingtin να αυξάνει τη σταθερότητα αυτής της συνεργασίας.

Γ) Μια άλλη υπόθεση είναι ότι η HD πρωτεΐνη αλληλεπιδρά κανονικά με πρωτεΐνες που φυσιολογικά βρίσκονται μόνο στον εγκέφαλο και έτσι η τροποποιημένη μορφή της huntingtin διασπά αυτή την αλληλεπίδραση οδηγώντας το νευρικό κύτταρο σε θάνατο. Δύο από αυτές είναι η HIP-1 (huntingtin interactor protein) και η HAP-1 (huntingtin associated protein), οι οποίες βρίσκονται μόνο στον εγκέφαλο. Όσο αυξάνονται τα CAGs η huntingtin προσδένεται λιγότερο στην HIP-1 και περισσότερο στην HAP-1 πιθανόν με δημιουργία polar zipper δεσμών.

Σε σχετικές ασθένειες με επεκτεινόμενο πολυγλουταμινικό τμήμα, όπως η SBMA, SCA1, MJD, DRPLA, φαίνεται ότι το τμήμα αυτό προκαλεί επιλεκτικό νευρικό θάνατο. Άρα μάλλον η παθογένεια τους σχετίζεται με αυτή της HD. Η ομοιότητα των συμπτωμάτων στα ετερόζυγα και ομόζυγα HD άτομα υποδηλώνει ότι ο τυπικός HD μηχανισμός εξαρτάται από το ποσό της παθολογικής huntingtin που παράγεται από ένα μόνο αλληλόμορφο. Έτσι υπερέκφραση της huntingtin μπορεί να μην είναι ο κρίσιμος παράγοντας που προκαλεί HD και πράγματι σε νεανικές περιπτώσεις τα αλληλόμορφα εκδηλώνουν μειωμένη σχετική έκφραση, αντίθετα με τα πιο σοβαρά συμπτώματα που παρουσιάζουν. Στη MJD και την DRPLA ο φαινότυπος των ομόζυγων ατόμων είναι πιο βαρύς από τους ετερόζυγους.

Τελικά η πολυγλουταμινική περιοχή έχει πολλά πρότυπα με τα οποία προκαλεί τοξικότητα στους ανθρώπους. Για τη μελέτη του μηχανισμού της παθογένειας της HD ο καλύτερος τρόπος είναι ένα πολύ καλό animal-model που να πλησιάζει όσο το δυνατόν τον τρόπο έκφρασης του ανθρώπινου γονιδίου (MacDonald M.E. et al 1996).

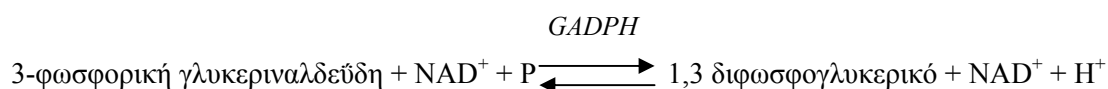
Ο Young το 2003 πρότεινε ένα πιθανό μηχανισμό παθολογίας της HD. Τα CAGs στην HD οδηγούν σε μια τροποποιημένη πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με

άλλες πρωτεΐνες. Παρουσία αυτού του συμπλόκου τα νεύρα γίνονται ευαίσθητα στην παρουσία του γλουταμικού και ενεργοποιούνται άλλες πρωτεΐνες (π.χ. caspases) που κόβουν την huntingtin σε μικρότερα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά γλιστρούν στον πυρήνα επιδρούν στην παραγωγή άλλων πρωτεϊνών. Αυτή η παρέμβαση οδηγεί σε κυτταρικό stress που οδηγεί σε περαιτέρω κόψιμο της huntingtin και συνεχίζεται έτσι ένας κύκλος που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Το ένζυμο caspases-1 (ενέχεται στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου) λέγεται ότι ενεργοποιείται στον εγκέφαλο των ασθενών. Ένεση ενός καταστολέα του caspases-1 στον εγκέφαλο διαγονιδιακών ποντικών καθυστερεί την εξέλιξη της ασθένειας, καθώς παρατηρείται καθυστέρηση στη ζημιά των νεύρων και στην έναρξη των συμπτωμάτων με εκτεταμένη διάρκεια ζωής.

7.1 Η Huntingtin και η συνεργασία της με άλλες πρωτεΐνες

7.1.1. Αλληλεπίδραση της huntingtin με την GADPH

Έχει βρεθεί αλληλεπίδραση της GADPH και με την SCA1 πρωτεΐνη του υποδοχέα του ανδρογόνου in vitro. Διαπιστώθηκε ότι η GADPH δένει σε πρωτεΐνες του εγκεφάλου, οι οποίες εντοπίστηκαν στα 190 KDa και 100KDa και οι οποίες φαίνονται ίδιες με τη φυσική DRPLA πρωτεΐνη. Για να διαπιστωθεί αν το δέσιμο της GADPH με την DRPLA είναι μοναδικό εξετάστηκε αν η GADPH δένει και με την huntingtin. Πράγματι η huntingtin (347KDa) δένει με την GADPH. Μικρά τμήματα της huntingtin φαίνεται να δένουν καλύτερα από ολόκληρη την πρωτεΐνη (ίσως να παρεμποδίζεται το δέσιμο από το C-άκρο της). Αυτά τα τμήματα δεν γνωρίζουμε κατά πόσο προέρχονται από πρωτεόλυση της huntingtin ή από εναλλακτικό splicing (Burke J. R. et al 1996). Η GADPH, είναι και η πρώτη πρωτεΐνη που γνωρίζουμε την λειτουργία της. Είναι ένα ένζυμο της γλυκόλυσης και έχει δειχθεί ότι και άλλες πρωτεΐνες που οδηγούν σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες αλληλεπιδρούν με αυτό το ένζυμο.



Απ' αυτά τα αποτελέσματα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η HD και οι άλλες σχετικές ασθένειες μπορεί να εμπλέκονται σε μεταβολικό stress μαζί με την εμπλοκή της GADPH. Ασθένειες που προκαλούνται από επέκταση τριπλετών ίσως

να μοιράζονται τον ίδιο μηχανισμό, αφού έχουν ίδια ηλικία έναρξης, ίδια παθολογία, εκφύλιση διαφόρων νευρικών περιοχών. Δεν έχειδειχθεί αν η ένωση huntingtin-GADPH πράγματι βλάπτει την παραγωγή ενέργειας στον προσβεβλημένο εγκέφαλο και στα νεύρα του νωτιαίου μυελού. Άλλοι ιστοί μπορούν να πάρουν ενέργεια και από τα λιπαρά οξέα, αλλά ο εγκέφαλος παίρνει αποκλειστικά ενέργεια από την γλυκόζη. Άρα παρεμπόδιση κάποιου ενζύμου της γλυκόλυσης π.χ. της GADPH βλάπτει την γλυκόλυση, άρα την παραγωγή ενέργειας, άρα καταστρέφει τα νεύρα. Περιοχές με περισσότερες από 60 γλουταμίνες εμποδίζουν την ενεργότητα του ενζύμου στον δοκιμαστικό σωλήνα, ενώ με μικρότερες επαναλήψεις δεν επιδρούν. Επίσης έχει φανεί ότι η ένεση σε ποντίκια ενός ναρκωτικού που εμποδίζει την παραγωγή ενέργειας οδηγεί σε HD-like φαινότυπο. Ίσως λοιπόν η διαταραχή στην παραγωγή ενέργειας να οδηγεί σε νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η HD (Barinaga M. 1996).

Εικάζονται δύο μηχανισμοί για την αλληλεπίδραση της huntingtin με την GADPH: 1^{ος} μηχανισμός: Το πολυγλουταμινικό τμήμα θα μπορούσε να ρυθμίζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η GADPH θα μπορούσε να είναι μια καλή υποψήφια πρωτεΐνη για την νευροεκφυλιστική διαδικασία, γιατί έχει πολλαπλές λειτουργίες. α) βασικό ρόλο στη γλυκόλυση, β) μια uracil DNA glycosylase, γ) δέσιμο στο RNA, ATP, calyculin, actin, tubulin (πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων) και την amyloid precursor protein. Τα πολυγλουταμινικά πεπτιδία δένουν σε πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα με υδρογονοδεσμούς σε β-sheets σαν polar zippers, 2^{ος} μηχανισμός: Το μήκος του πολυγλουταμινικού τμήματος μπορεί να καθορίζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις ποσοτικά. Διαφορές στο δέσιμο της μεταλλαγμένης και της φυσιολογικής πρωτεΐνης με την GADPH μπορεί να επιδρούν στις ενζυματικές ή δομικές λειτουργίες της GADPH.

Θα πρέπει η πρωτεΐνη με την επέκταση του τρινουκλεοτιδίου και η GADPH να συνεντοπίζονται στο κύτταρο για να είναι αυτές οι in vitro πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εφικτές και in vivo. Η huntingtin και η DRPLA πρωτεΐνη είναι κυτταροπλασματικές και η huntingtin συνεργάζεται με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Η GADPH βρίσκεται παντού στο κύτταρο με το μεγαλύτερο ποσό να είναι στο κυτταρόπλασμα και να συνεργάζεται με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και μεμβράνες του, και μικρά ποσά της βρίσκονται και στον πυρήνα.

Αν και αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες μοιράζονται ένα κοινό γενετικό μηχανισμό, του επεκτεινόμενου CAG, η κάθε νόσος συνεργάζεται και με ένα

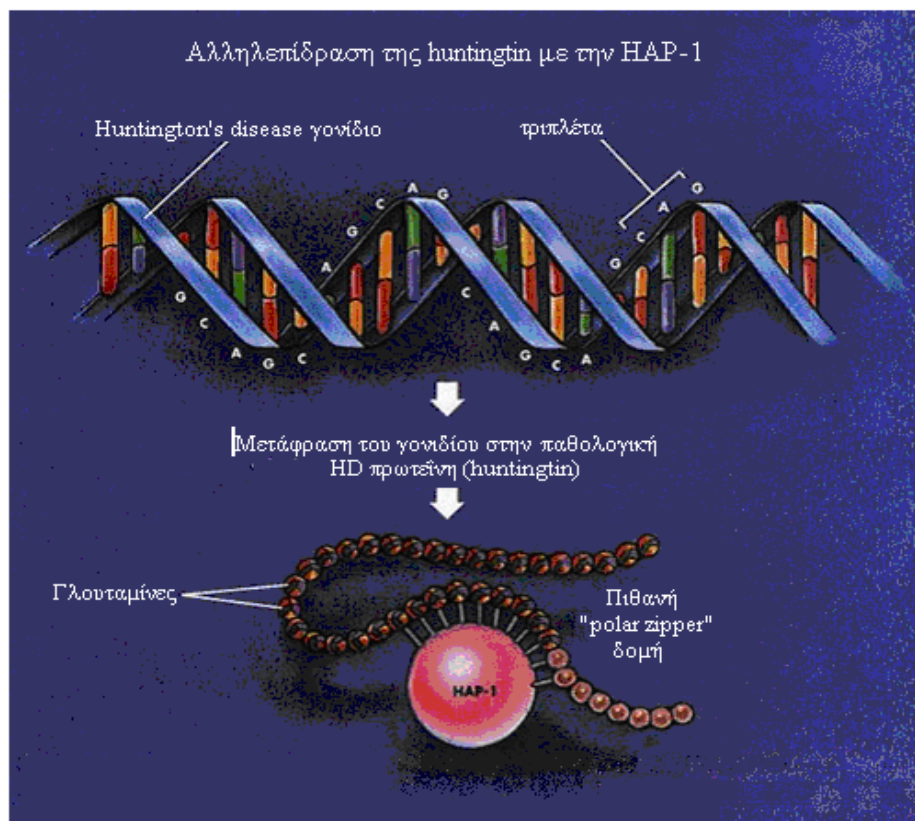
μοναδικό γονίδιο και έχει ένα ειδικό πρότυπο στην αποδιάταξη των νευρών και τον κλινικό φαινότυπο. Η νευρική εκφύλιση γι' αυτές τις ασθένειες δεν μπορεί να εξηγηθεί από την κυτταρική κατανομή αυτών των πρωτεϊνών, αφού οι κανονικές και οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες εκφράζονται σε όλη την έκταση του Κ.Ν.Σ.. Αλλά και η GADPH υπάρχει σε κάθε κύτταρο. Άλλοι παράγοντες όπως: εναλλακτικό splicing, μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και η παρουσία άλλων πρωτεϊνών κυτταροειδικών που να αλληλεπιδρούν με τις gln-πρωτεΐνες και να ενισχύουν την αλληλεπίδραση με την GADPH μπορεί να καθορίζουν την ειδική αποδιάταξη. Μια τέτοια πρωτεΐνη ίσως να είναι η HAP-1 (Barinaga M. 1996). Οι CAG νευροεκφυλιστικές νόσοι μπορεί να μοιράζονται τελικά ένα κοινό τρόπο κληρονόμησης και μια μεταβολική παθογένεση που εμπλέκει την GADPH σαν λειτουργικό συστατικό (Burke J. R. et al 1996).

7.1.2 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την HAP

Με ένα cDNA που κωδικοποιεί για τα πρώτα 230 αμινοξέα της huntingtin (44gln) ανιχνεύθηκε σε δύο cDNA βιβλιοθήκες από εγκέφαλο αρουραίου η πρωτεΐνη η rHAP-1 (rat huntingtin associated protein). Ανοσοκατακρήμνιση από rHAP-1 transfected κύτταρα και ολόκληρου του εγκεφάλου του ποντικίου με συγγενικά αντισώματα για την huntingtin δείχνει ότι η πλήρης rHAP-1 αλληλεπιδρά με την huntingtin in vitro και η αλληλεπίδραση γίνεται εντονότερη όταν αυξάνει το μήκος του πολυγλουταμινικού τμήματος. Bioassays 18 (Li X. J. et al 1995).

Την rHAP1 τη χρησιμοποίησαν για απομόνωση ολόκληρης της rHAP1 με screening rat brain cDNA βιβλιοθηκών. Απομονώθηκαν δύο υδροφιλικές πρωτεΐνες, η rHAP-1-A και η rHAP-1-B. Με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (RT-PCR) απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ανθρώπινη HAP-1 που δείχνει 70% νουκλεοτιδική ομοιότητα με την rHAP-1 και 96% σε αμινοξικό επίπεδο. Το σχετικά χαμηλό ποσοστό οφείλεται στο ότι στην rHAP-1 λείπει ένα μεσαίο τμήμα. Με εκκινήτες γι' αυτό το τμήμα απομονώθηκε cDNA από τον κερκοφόρο πυρήνα με 94% ομοιότητα σε επίπεδο νουκλεϊκών οξέων με την hHAP1. Η rHAP1 και η hHAP1 ανιχνεύονται σε εγκεφαλικούς νευρικούς ιστούς, αλλά όχι σε περιφερικούς ιστούς και πιθανώς αυτό να σχετίζεται με την παθολογία της HD μόνο στα νεύρα. Το δέσιμο της HAP1 με την huntingtin ενισχύεται όσο αυξάνονται οι επαναλήψεις και το δέσιμο μπορεί να οφείλεται σε πλευρικές αλληλουχίες της huntingtin, αφού η HAP1 δεν προσδέεται στην ατροφίνη-1 η οποία έχει τον ίδιο αριθμό γλουταμινών (21) με την

huntingtin. Μπορεί μετά από μια πολυγλουταμινική επέκταση να αλλάζει το σχήμα της πρωτεΐνης (Li X. J. et al 1995).



Εικόνα 10. Αλληλεπίδραση της huntingtin με την HAP-1. Η παθολογική huntingtin προσδένεται πιο ισχυρά στην HAP-1, απ' ό τι η φυσιολογική. Η αλληλεπίδραση αυτή πιστεύεται ότι οδηγεί στο θάνατο των νευρικών κυττάρων στη HD.

Η νευρική καταστροφή περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς όπως, εξωτοξικότητα που εκμαιεύεται από καταστροφή λόγω γλουταμικού οξέος ή από ελεύθερες ρίζες. Η HAP-1 εντοπίζεται στον ιππόκαμπο και τον κερκοφόρο πυρήνα με δυνατότερο σήμα, ενώ πιο αμυδρό φαίνεται στην παρεγκεφαλίδα. Η υποκυτταρική τοπολογία σε νευρικά κύτταρα και σε fibers extensions δείχνει ότι η HAP1 συνεργάζεται με κοκκώδεις δομές (granular) του κυτταροπλάσματος ή με συναπτικά κυστίδια ή με τον κυτταροσκελετό. Αλλά και η huntingtin εικάζεται ότι συνεργάζεται με συναπτικά κυστίδια και τον κυτταροσκελετό.

Η HD παρουσιάζει μαζικό χάσιμο νευρών σε επιλεγμένες νευρικές περιοχές. Περισσότερο από το 90% των νευρών καταστρέφονται στο νεοραβδωτό σώμα , ενώ όσα έχουν βαφεί με NADPH diaphorase εμποδίζονται από την καταστροφή. Η χρώση με NADPH diaphorase αντανακλά τη συνθάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (nNOS) και δείχνει ότι κάποια νεύρα με nNOS προστατεύονται έναντι

των νευροτοξικών μηχανισμών της HD. Η κιτροουλίνη εντοπίζεται στα ίδια σημεία και είναι τελικό προϊόν της ενεργότητας της nNOS.

Μια προσέγγιση της νευρικής καταστροφής έγινε με εξωτοξική δράση τοξινών. Ενέσεις τοξινών στα νεύρα, όπως μαλονικό οξύ, 3-νιτροπροπιονικό οξύ (3-NP) οδήγησαν σε βλάβες στο νεοραβδωτό σώμα που θυμίζουν την HD. Τα αποτελέσματα αυτών των τοξινών περιορίζονται κατά πολύ αν κάνουμε targeted disruption του nNOS γονιδίου ή τα μεταχειριστούμε με 7-νιτροιδαζόλη, που είναι αναστολέας της nNOS. Οι πιθανότητες συνεργασίας της HAP1 με την nNOS είναι μειωμένες. Από πιλοτικά πειράματα που έγιναν έδειξαν ότι η nNOS συνεργάζεται με την δυστροφίνη. Η δυστροφίνη είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη και είναι υπεύθυνη για την τμηματική τοποθέτηση της nNOS στους μυς. Χάσιμο της δυστροφίνης σε ποντίκια δείχνει ότι η nNOS είναι πλήρως διαλυτή. Οι μεταλλάξεις της δυστροφίνης συνδέονται με τη νόσο Duschene muscular dystrophy. Ίσως τελικά να υπάρχει μια σχέση της Huntingtin-HAP1-nNOS στον εγκέφαλο. Η nNOS παρουσιάζεται σε υποπληθυσμούς των νευρών που παρουσιάζεται η HAP1 και η HAP1 παρουσιάζεται σε υποπληθυσμούς νευρών που ανιχνεύεται η huntingtin. Στην όλη συνεργασία πιθανώς να σχετίζεται και η καλμοδουλίνη (CAM) που εμπλέκεται και αυτή στη ρύθμιση της nNOS. Ίσως όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών να επιδρούν σε αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) ή το NO να επεκτείνεται σε ενδοκυτταρικές θέσεις διευκολύνοντας έτσι τη νευρική καταστροφή (Li X. J. et al 1996).

7.1.3 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την καλμοδουλίνη (CAM)

Φαίνεται ότι η huntingtin δένεται έμμεσα με την καλμοδουλίνη (CAM) και ίσως να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που μερικές από αυτές να δένουν άμεσα με την καλμοδουλίνη. Η huntingtin προσδένεται έμμεσα στην καλμοδουλίνη και η σύνδεση αυτή εξαρτάται από το Ca^{++} . Το ότι η HD πρωτεΐνη δεν δένει σε ^{125}I -CAM δείχνει ότι η πρόσδεση της είναι έμμεση. Πιθανώς η HD πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες δένουν στην καλμοδουλίνη άμεσα με μηχανισμό που εξαρτάται από το ασβέστιο ή ότι το Ca^{++} ωθεί την HD πρωτεΐνη να κάνει δικά της σύμπλοκα που να έχουν τέτοιες δυνατότητες.

Η μεταλλαγμένη HD πρωτεΐνη δένει πιο δυνατά σε CAM-sepharose, αλλά απουσία Ca^{++} η πρόσδεση συνεχίζεται σε αντίθεση με την φυσιολογική HD πρωτεΐνη. Η πιθανή παρουσία της huntingtin στο σχηματισμό κυστιδίων και στους

μικροσωληνίσκους μπορεί να σημαίνει ότι η huntingtin μπορεί να εμπλέκεται σε διαδικασίες μεταφοράς ή λειτουργίας ή και ανακύκλωσης κυστιδίων. Πολλές από αυτές τις διαδικασίες είναι εξαρτώμενες από την παρουσία ασβεστίου.

Το μοντέλο του Perutz ότι οι polar zipper δομές οδηγούν σε αύξηση της συγγένειας αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών, συμφωνεί πρώτον με το ότι η μεταλλαγμένη HD πρωτεΐνη δένει πιο δυνατά σε CAM-sepharose και παρουσία και απουσία του Ca^{++} . Ένα δεύτερο συμπέρασμα είναι ότι δεν ξέρουμε αν η επέκταση της γλουταμίνης επιτρέπει την αλληλεπίδραση με CAM-sepharose. Ίσως αλληλεπιδρά έμμεσα με Ca^{++} / CAM-binding πρωτεΐνες ή με άλλη πρωτεΐνη πρόσδεσης μέσα στο σύμπλοκο Ca^{++} / CAM-huntingtin (Bao J. et al 1996).

7.1.4 Αλληλεπίδραση της huntingtin με την HIP

Με το two-hybrid system απομονώθηκε μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το N-άκρο της huntingtin και εξαρτάται από το πολυγλουταμινικό τμήμα.. Η πρωτεΐνη αυτή είναι η HIP-1 (huntingtin interacting protein). Όμως αύξηση της πολυγλουταμινικής περιοχής της huntingtin εξασθενεί την αλληλεπίδραση, που σημαίνει ότι οι σημαντικές αλληλουχίες για την πρόσδεση είναι καθοδικά της πολυγλουταμινικής περιοχής και είναι κάποια heat repeats. Αυτές οι επαναλήψεις εντοπίζονται σε διάφορες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική μεταφορά. Τα heat repeats έχουν προταθεί σαν σπουδαία τμήματα για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Το C-άκρο της HIP-1 περιέχει leucine zipper δομές που θα μπορούσαν να μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση με την huntingtin, αλλά έχει φανεί ότι μόνο το N-άκρο είναι ειδικό για την αλληλεπίδραση, αφού με έλλειψη του C-άκρου δεν φαίνεται καμιά διαφορά στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Άρα το leucine zipper μοτίβο της HIP δεν φαίνεται να είναι κρίσιμο για την αλληλεπίδραση HIP-1-huntingtin (Wanker E. E. et al 1997).

Η HIP-1 (huntingtin interacting protein) παρουσιάζει ομολογία: α) με την πρωτεΐνη του γονιδίου SLA-2 του σακχαρομύκητα *cerevisiae*, που είναι απαραίτητη για την οργάνωση και τη λειτουργία του κυτταροσκελετού του φλοιού, β) με την πρωτεΐνη του γονιδίου ZK370.3 του *Caenorhabditis elegans*, αγνώστου λειτουργίας. Το HIP-1 mRNA εντοπίζεται στο Κ.Ν.Σ. και συνεντοπίζεται με την huntingtin σε μεμβρανικά κλάσματα από ανθρώπινα εγκεφαλικά κύτταρα.. Η αλληλεπίδραση HIP1-huntingtin καθώς και ο συνεντοπισμός τους στο Κ.Ν.Σ. και η ομολογία της HIP-1 με την Sla2p μπορεί να είναι σημαντικά για την φυσιολογική λειτουργία του

μεμβρανικού κυτταροσκελετού των νευρών. Έτσι στην HD χάσιμο της κανονικής σύνδεσης HIP-1-huntingtin σε ασθενείς με CAG επέκταση, μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του μεμβρανικού σκελετού, η οποία να οδηγεί σε πρόωρο και επιλεκτικό κυτταρικό θάνατο.

Οι πρωτεΐνες HIP-1, Sla2p, ZK370.3 είναι παρόμοιες στο μοριακό βάρος και στο C-άκρο και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την μεμβρανική κυτταροσκελετική πρωτεΐνη ταλίνη, που βοηθά στην ένωση κυτταροσκελετικών δομών στην πλασματική μεμβράνη. Επίσης υπάρχει απόδειξη ότι η huntingtin συνεργάζεται με την μεμβράνη, με μικροσωληνίσκους και ίσως να σχετίζεται με την κυκλοφορία των κυστιδίων. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι η huntingtin αλληλεπιδρά με την HIP-1. Το ότι η HIP-1 είναι ισχυρά συνδεμένη με εσωτερικές κυτταρικές μεμβράνες, ένα σημείο που βρίσκεται επίσης η huntingtin, προτείνει ότι η μεταξύ τους αλληλεπίδραση μάλλον γίνεται πάνω στις μεμβράνες (πλασματική ή εσωτερικές) Την αλληλεπίδραση αυτή την ενισχύει και το γεγονός ότι η HIP-1 έχει ισχυρή ομολογία με την ταλίνη (Kalchman M.A. et al 1997).

Η νευροπαθολογία της HD θα μπορούσε να εξηγηθεί αν ένα ειδικό σύμπλεγμα από πρωτεΐνες εντοπισμένες σε ειδικούς τύπους κυττάρων, παρέχουν μια ειδική ευαισθησία στα αποτελέσματα της μεταλλαγμένης HD πρωτεΐνης. Μια τροποποιημένη αλληλεπίδραση μεταξύ μεταλλαγμένης huntingtin και μιας ειδικής πρωτεΐνης σε συγκεκριμένα κύτταρα θα μπορούσε να αλλάξει τη λειτουργία της huntingtin και /ή των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μαζί της και να κάνουν αυτά τα κύτταρα ευπαθή (τρωτά) σε πρόωμο θάνατο.

Γνωρίζουμε επίσης και την αλληλεπίδραση της huntingtin με την HAP-1 και αυτή η αλληλεπίδραση αυξάνεται με την επέκταση της πολυγλουταμινικής περιοχής. Η HIP-1 είναι ένα ευρέως διαδεδομένο συζευγμένο ένζυμο και ίσως είναι η βάση για τον καταβολισμό της huntingtin, αφού η τελευταία βρίσκεται επίσης παντού. Μια αλληλεπίδραση που είναι ανεξάρτητη από το μήκος της πολυγλουταμινικής περιοχής, και μάλλον μειώνεται όσο αυξάνεται το μήκος της πολυγλουταμινικής περιοχής. Αν παρεμποδιστεί η φυσιολογική αλληλεπίδραση της HIP-1 με την huntingtin, τότε πιθανώς να μεταβάλλονται κάποια βιοχημικά γεγονότα στη μεμβράνη προκαλώντας πρόωρο κυτταρικό θάνατο και τις περαιτέρω κλινικές εκδηλώσεις της HD (Kalchman M.A. et al, 1997).

Με μεθόδους όπως, non-denaturing conditions, gel-filtration, polyacrylamide electrophoresis έδειξαν ότι η huntingtin συνδέεται με 3 πρωτεΐνες, την CHAMP,

HAP-1 και GADPH. Η CHAMP δεν έχει απομονωθεί ακόμα. Εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση huntingtin με καλμοδουλίνη που εξαρτάται από την παρουσία ασβεστίου. Εκτός την περίπτωση της GADPH δεν μπορούμε να πούμε ότι η αλληλεπίδραση της huntingtin επιδρά στις δραστηριότητες των πρωτεϊνών. Αλλά η εμπλοκή αυτών των πρωτεϊνών με την nitric oxide synthase (nNOS) ή τον ενεργειακό μεταβολισμό, μπορεί να μας δώσει ένα καλόπιστο κρίκο με εξωτοξικά ή αποπτωτικά μονοπάτια του νευρικού θανάτου και των παθογόνων μηχανισμών της HD.

7.2 Συσχέτιση νευρικού θανάτου με μιτοχόνδρια

Η παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια μπορεί να εμπλέκεται σε νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η Alzheimer disease (AD), Parkinson, HD, amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Στην AD και HD ίσως να οφείλονται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Μελέτη σε κυτταρική σειρά ελλιπή από μιτοχόνδρια έδειξε ότι η έλλειψη λειτουργίας των μιτοχονδρίων οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Τα πιο κοινά είναι οι superoxide/hydroxyl ελεύθερες ρίζες, που παράγονται σαν ενδιάμεσα προϊόντα του οξειδωτικού μεταβολισμού. Το superoxide (CO_2^-) μπορεί να αντιδράσει με μονοξείδιο του αζώτου (NO) και παράγεται peroxynitrite (ONOO^-), το οποίο προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) επίσης είναι ένα κρίσιμο προϊόν για οξειδωτική καταστροφή.

Στα νεύρα μπορεί να συμβούν τα ακόλουθα γεγονότα:

- α) Μείωση της ενέργειας μπορεί να προκαλέσει εκπόλωση και ενεργοποίηση διεγερτικών αμινοξικών υποδοχέων από αύξηση της συγκέντρωσης των γλουταμινών.
- β) Κατεστραμμένη μιτοχονδριακή λειτουργία μπορεί να προκαλέσει ανωμαλία στις συγκεντρώσεις του Ca^{++} . Πρόσφατα δείχτηκε ότι τα μιτοχόνδρια είναι το ενδοκυτταρικό οργανίδιο που έχει τα μεγαλύτερα ποσά Ca^{++} .
- γ) Ανωμαλίες στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων οδηγεί σε ελεύθερες ρίζες. Αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{++} προκαλεί αύξηση και στην ενεργοποίηση της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) που εξαρτάται από την καλμοδουλίνη. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά πολύ γρήγορα με την ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου O_2^- προς σχηματισμό ONOO^- (peroxynitrite). Το peroxynitrite υπάρχει σαν ενεργή ενδιάμεση δομή που δρα όπως τα ιόντα υδροξυλίου (OH^-). Έχει χρόνο ημίσειας ζωής 0,9 δευτερόλεπτα και έτσι

διαχέεται σε μερικά κύτταρα και προκαλεί κυτταρική καταστροφή με οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και του DNA.

δ) Το ONOO^- (peroxynitrite) αντιδρά με το CO_2 και δίνει ένα ασταθές προϊόν.



Το προϊόν αυτό οδηγεί στο σχηματισμό nitrocarbonate anion ($\text{O}_2 \text{N} - \text{OOCO}^{2-}$), που είναι το πιο κοντινό οξειδωτικό στα βιολογικά συστήματα.

ε) Αντιδράσεις νιτροποίησης που καταλύονται από SOD-1 (Cu/Zn superoxide dismutase 1) ή με αντίδραση με το CO_2 . Έτσι παράγεται 3'- nitrotyrosine (ένας ειδικός βιοχημικός δείκτης για ανίχνευση peroxynitrite (ONOO^-) in vivo). Η νιτροποίηση των κατάλοιπων τυροσίνης εμποδίζει την ενεργότητα της συνθάσης της γλουταμίνης και η τυροσίνη-κινάση δεν φωσφορυλιώνει τις τυροσίνες. Αυτό το γεγονός είναι κρίσιμο σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Beal M. F.1996).

Απόδειξη ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και η peroxynitrite παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον εξωτοξικό θάνατο, φαίνεται από παρατηρήσεις σε καλλιέργειες από εγκεφαλικό φλοιό από ποντίκια με έλλειψη σε νευρική NOS (nNOS). NOS παρεμποδιστές δεν έχουν κανένα αποτέλεσμα σ' αυτά τα νεύρα, αλλά προσφέρουν προστασία στις αγρίου τύπου καλλιέργειες. Έχει δειχθεί ότι η 7-nitroindazole (ένας αναστολέας- της NOS) προστατεύει τα νεύρα από ενεργοποίηση υποδοχέων NMDA (N-methyl-D-aspartate), αλλά όχι από αλλοιώσεις με kainate in vivo. Η προστασία έχει σχέση με σημαντική μείωση της παραγωγής ιόντων υδροξυλίων και 3-nitrotyrosine, καθώς και μπλοκάρισμα της παραγωγής peroxynitrite.

Στην amyotrophic lateral sclerosis (ALS) προτείνεται ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην οξειδωτική καταστροφή. Στις μεταλλάξεις αυτές παρατηρείται αυξημένη αλληλεπίδραση α) με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και παράγονται ιόντα υδροξυλίου ή β) με peroxynitrite για παραγωγή nitrate πρωτεΐνης. Στην Alzheimer disease φαίνεται μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση, μειωμένη δράση της οξειδάσης του κυτοχρώματος στον μεταθανάτιο εγκεφαλικό φλοιό και σε αιμοπετάλια. Στην νόσο του Parkinson μειωμένη δραστηριότητα του μιτοχονδριακού συμπλόκου I σε αιμοπετάλια, μύες και στη μέλαινα ουσία. Στη HD, η huntingtin παρεμποδίζει την GADPH ως αποτέλεσμα των πολυγλουταμινών, ένζυμο της γλυκόλυσης, που απουσία του παύει να παράγεται ενέργεια. Ταυτόχρονα έχει αναφερθεί και μειωμένη ενεργότητα στα σύμπλοκα II και III των μιτοχονδρίων στον κερκοφόρο πυρήνα HD ασθενών (Beal M.F.1996).

Παράλληλες μελέτες δείχνουν ότι υπερβολική συσσώρευση φυσιολογικών διεγερτικών χημικών που εμπλέκονται στο νευρικό σήμα οδηγεί στην κυτταρική καταστροφή (χαρακτηρίζονται εξωτοξίνες). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το γλουταμικό που απελευθερώνεται στα βασικά γάγγλια σε ζωντανούς αρουραίους και οδηγούν στην εκδήλωση συμπτωμάτων της HD. Γεγονός που σημαίνει ότι το γλουταμικό δρα σαν εξωτοξίνη. Όμως σε ορισμένους HD ασθενείς δεν έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα του γλουταμικού. Ίσως να εμπλέκονται τα μιτοχόνδρια, όπου η πιθανή καταστροφή τους οδηγεί σε αυξημένη ευπάθεια ακόμα και σε κανονικά επίπεδα του γλουταμικού, εφόσον το κύτταρο δεν μπορεί να παράγει την ενέργεια που χρειάζονται.

Η εξωτοξικότητα φαίνεται ένας πιθανός παθολογικός μηχανισμός για την HD που βασίζεται στην ομοιότητα του προτύπου «κυτταρικού χασίματος» στην HD και σε εξωτοξικές ελλείψεις του νεοραβδωτού σώματος. Τα μεταβολικώς εκτεθειμένα νεύρα ίσως είναι πιο ευαίσθητα σε εξωτοξικότητα ή άλλες μορφές τοξικότητας. Το οξειδωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες μορφές θανάτου ή να είναι ένα μονοπάτι σηματοδότησης για να ενεργοποιηθούν άλλα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Μπορεί τέλος μέσω απόπτωσης να γίνεται προγραμματισμένος θάνατος (Ross C. A. 1995).

8. Επέκταση της τριπλέτας (CAG)_n στην HD

Γιατί οι επεκτάσεις είναι πιο συχνές από τις συστολές και γιατί συμβαίνουν κατά την μητρική μεταβίβαση στο Fragile X σύνδρομο, αλλά κατά την πατρική στην HD, SCA1, SBMA και DRPLA; Στην HD έχει δειχθεί ότι η CAG τριπλέτα επεκτείνεται κατά την σπερματογένεση. Η επίδραση του μήκους της CAG τριπλέτας εξηγεί μόνο το 50% στην ποικιλία των φαινοτύπων όσον αφορά την ηλικία έναρξης της νόσου, ενώ σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (Νοτίου Αμερικής) εξηγεί το 75% (MacDonald). Ένα 25% HD περιστατικών φαίνεται να μην εξηγείται πλήρως από το μήκος της CAG τριπλέτας, αλλά από άλλους παράγοντες, όπως cis-acting στοιχεία, ή και άλλα γονίδια (Ashizawa T. et al 1999). Κατά τις μεταφορές των τριπλετών από τους γονείς στα παιδιά φαίνεται ότι τα αλληλόμορφα με πολλές επαναλήψεις (>46) είναι πιο ασταθή κατά την μεταφορά στην επόμενη γενιά (ιδιαίτερα κατά τις πατρικές μεταφορές) (Ranen N.G. et al 1995).

8.1 Υποθέσεις για τον σχηματισμό της επέκτασης (μηχανισμοί)

Στον *Saccharomyces cerevisiae* φάνηκε υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της μείωσης, οι οποίες συνεργάζονται με ανασυνδιασμό χρωμοσωμάτων. Ίσως σ' αυτό τον οργανισμό οι τυχαίες μεταλλάξεις να συνεργάζονται με προσθήκες ή ελλείψεις ακόμα και μιας βάσης και αυτό να είναι συνέπεια άνισης ανταλλαγής γονιδίων (crossing over) κατά τον μειωτικό ανασυνδιασμό. Στα κύτταρα των θηλαστικών μικρές τυχαίες επαναλήψεις (4-5 ζευγών βάσεων) έχουν εμπλακεί σαν "ενδιάμεσα" στον μειωτικό ανασυνδιασμό, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να συμβαίνει κακή ευθυγράμμιση μεταξύ μεγαλύτερων stretches αλληλουχιών. Η κακή ευθυγράμμιση αυτών των επαναλήψεων μεταξύ αλυσίδων μπορεί να οδηγήσει σε crossing-over και αθέμιτη ανταλλαγή του DNA. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν σαν αποτέλεσμα μοναδικού μειωτικού crossing-over έχουν περιγραφεί για πολλούς γενετικούς τύπους στο ανθρώπινο γονιδίωμα και προτείνονται σαν ένας σημαντικός παράγοντας σε de novo μεταλλάξεις, που οδηγούν σε κληρονομικές γενετικές ασθένειες (Weber B. et al 1992).

Μελέτες στο *Escherichia coli* δείχνουν ότι τα CAGs παρουσιάζουν επεκτάσεις και συστολές όταν μεταδοθούν σε βακτηριακά πλασμίδια. Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει γίνει καλή μελέτη λόγω της δομής της χρωματίνης και των ομοιοτήτων που παρουσιάζονται στην χρωμοσωμική αντιγραφή αυτού του απλού ευκαρυωτικού οργανισμού με τους μηχανισμούς των περισσότερων πολύπλοκων ευκαρυωτών. Η αστάθεια του CAG στον σακχαρομύκητα έχει αρκετές ομοιότητες με την αστάθεια σε άλλους οργανισμούς. Και εδώ η τριπλέτα είναι κληρονομικά ασταθής και οι επαναλήψεις μπορούν να επεκτείνονται, αλλά και να συστέλλονται. Μια βασική διαφορά όμως, είναι ότι η επικράτηση των μεγάλων ελλείψεων συνοδεύεται από σπάνιες μικρότερες επεκτάσεις. Αν και αυτές οι μεγάλες συστολές των επαναλήψεων παρατηρούνται και στο *Escherichia coli*, μεγάλες αυξήσεις δεν είναι τόσο σπάνιες στο *E.coli* όσο στον σακχαρομύκητα. Είναι πιθανόν η σταθερότητα μεταξύ του προσανατολισμού της επανάληψης και των γειτονικών αλληλουχιών να προκαλεί αστάθεια στην CAG επανάληψη. Κάτι τέτοιο έχει επιβεβαιωθεί στον *S. Cereviviae*, όπου οι ελλείψεις στο CTG είναι πιο συχνές από τις επεκτάσεις, όταν βρίσκεται κοντά στο σημείο έναρξης αντιγραφής στην ασυνεχή

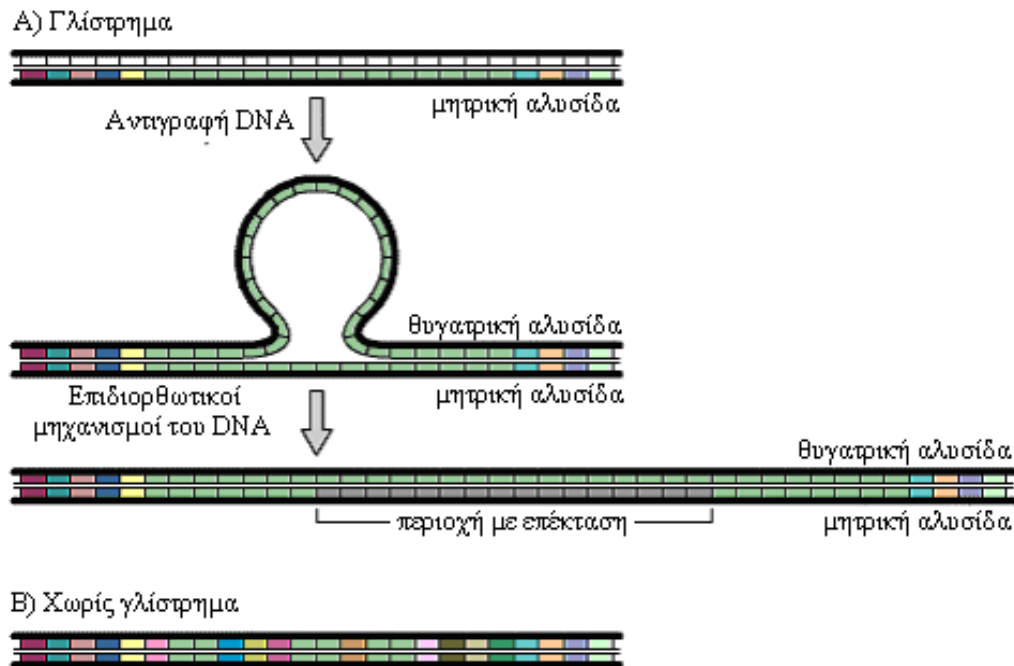
αλυσίδα, ενώ για την CAG επανάληψη οι μικρές επεκτάσεις είναι ποιο συχνές. (Maurer D. J. et al 1996).

Υπάρχει διαφορά μεταξύ τρινουκλεοτιδίων και δινουκλεοτιδίων στον σακχαρομόκητα. Τα δινουκλεοτίδια υφίστανται μικρότερες αλλαγές. Επίσης δεν παρατηρείται κανένα αποτέλεσμα από την αντιστροφή στην κατεύθυνση του CT. Η συχνότητα στις δινουκλεοτιδικές αλλαγές ανταποκρίνεται σε γονίδια που ελέγχουν την mismatch επιδιόρθωση. Επειδή ακριβώς συμβαίνει αυτή η διαφορά στη συμπεριφορά μεταξύ δι- και τρι- νουκλεοτιδίων είναι πιθανό ότι το mismatch repair system να μην είναι τόσο σπουδαίο στον έλεγχο της τύχης των τρινουκλεοτιδίων όσο των δινουκλεοτιδίων (Maurer D.J. et al 1996).

Η εξάρτηση της επέκτασης από το μήκος των επαναλήψεων μπορεί να σημαίνει την εμπλοκή ασυνήθιστων δευτεροταγών δομών του DNA. Ίσως να υπάρχει ένα κρίσιμο μήκος της επέκτασης το οποίο να αντανakλά στο κατώφλι της ενέργειας για το σχηματισμό φουρκέτας. Η ικανότητα να φτιάχνονται φουρκέτες σε συγκεκριμένο ενεργειακό κατώφλι μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες δομές του κληρονομούμενου ασταθούς DNA (εξαρτώμενο από το μήκος και την sequence selectivity). Οι δομές φουρκέτας μπορούν να εξηγήσουν τους σχηματισμούς επέκτασης που συνεργάζονται με anticipation της ασθένειας, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η αλληλουχία, τόσο σταθερή είναι η δομή φουρκέτας και πιο πιθανός ο σχηματισμός και άλλων δομών φουρκέτας.

Γλίστρημα της πολυμεράσης τυπικά δημιουργεί αλλαγές στο μέγεθος των αλληλομόρφων και προκαλεί προσθήσεις ή αφαιρέσεις. Οι μεγάλες αυξήσεις που παρατηρούνται σε ασθένειες δεν πρέπει να δημιουργούνται από ένα απλό μοντέλο, που περιλαμβάνει γλίστρημα της πολυμεράσης. Πιθανόν συμβαίνουν πολλαπλά βήματα για τη δημιουργία διαφορετικών μεγεθών των αυξημένων επαναλήψεων. Απλό γλίστρημα προκαλεί μικρές αυξήσεις στον αριθμό αντιγράφων. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των αντιγράφων τόσο ο σχηματισμός της φουρκέτας γίνεται πιο πιθανός και σταθεροποιείται δίνοντας δυνατότητα για μεγαλύτερης κλίμακας επέκταση. Δύο ιδιότητες των φουρκετών είναι χαρακτηριστικές, α) η ενδιάμεση σταθερότητα (intermediate stability) που οδηγεί τις αλληλουχίες κυρίως σε επέκταση παρά σε έλλειψη και β) alternating mispaired bases (**Εικόνα 11**), (Gacy A.M. et al 1995).

Γλίστρημα πολυμεράσης



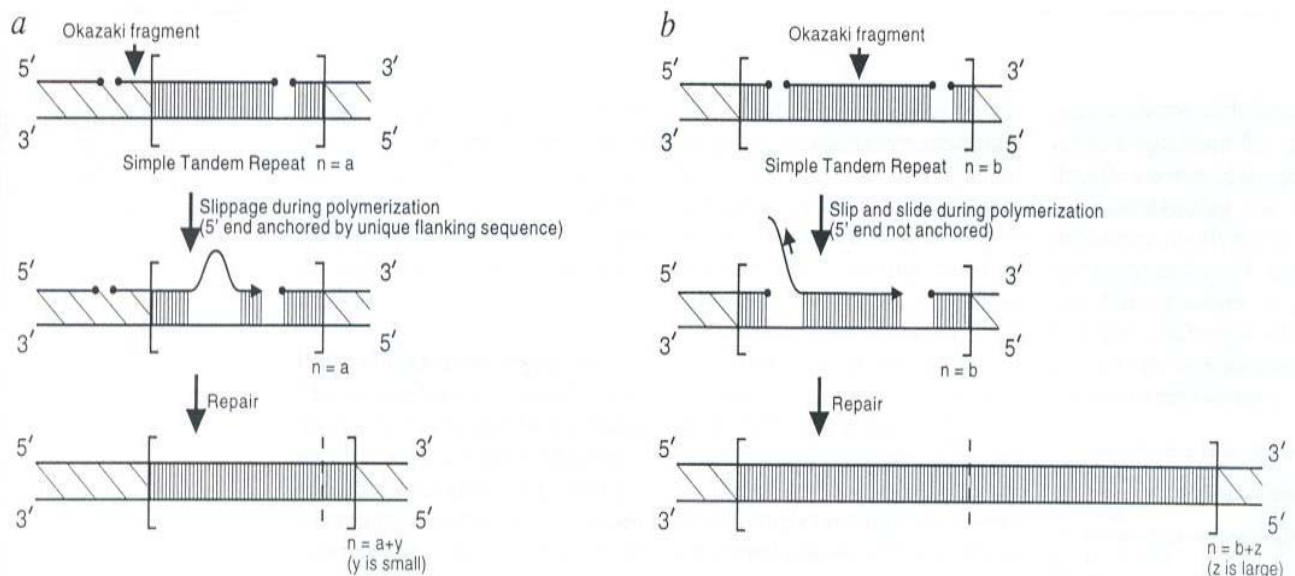
Εικόνα 11. Γλίστρημα πολυμεράσης. Α) Κατά τη διάρκεια της αντιγραφής η πολυμεράση γλιστράει και η επακόλουθη επαφή δημιουργεί μια λούπα στη νέα αλυσίδα. Το γλίστρημα συμβαίνει σε περιοχές του DNA με νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, (όπως το CAG). Έπειτα οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA ευθυγραμίζουν ξανά τη μητρική με την θυγατρική αλυσίδα και η λούπα ισιώνει. Το αποτέλεσμα στη διπλή έλικα είναι η επέκταση. Β) Το γλίστρημα της πολυμεράσης δεν μπορεί να γίνει σε DNA με κανονική αλληλουχία νουκλεοτιδίων, χωρίς επαναλήψεις.

Έχει βρεθεί ότι $(CTG)_{15-25}$ και $(CAG)_{15-25}$ όντως σχηματίζουν σταθερές φουρκέτες σε διάλυμα και είναι πιο σταθερές από φουρκέτες άλλων τριπλετών. Διακοπές των κανονικών επαναλήψεων μειώνουν τη σταθερότητα των φουρκετών (π.χ. Fragile -X σύνδρομο). Η διακοπή των επαναλήψεων από μία βάση ίσως εμποδίζει την επέκταση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στους ανθρώπους.

Οι επαναλήψεις που συνεργάζονται με την Μυϊκή Δυστροφία και το Σύνδρομο του Εύθραυστου Χ συχνά επεκτείνονται πολύ περισσότερο, όταν μεταβιβάζονται από γονιό με περισσότερα από 80 αντίγραφα. Αυτή η επέκταση σε πλήρη μετάλλαξη εμφανίζεται με ένα μηχανισμό διαφορετικό από σχετικές μικρές αλλαγές που παρατηρούνται σε προμεταλλάξεις. Γι' αυτή τη γρήγορη επέκταση ένας πιθανός μηχανισμός βασίζεται στην παρουσία 2 σπασιμάτων στη μια αλυσίδα, τα οποία λαμβάνουν χώρα μέσα στην επανάληψη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Όσο

μεγαλύτερη είναι η επανάληψη τόσο τα σπασίματα αυτά δημιουργούνται τυχαία μέσα σ' αυτή. Η αλυσίδα του DNA ανάμεσα σ' αυτά τα σπασίματα (Okazaki fragments) δεν αγκυροβολούν σε μια μοναδική αλληλουχία και είναι ικανά να γλιστρήσουν (slip) κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Επιδιόρθωση αυτού του προϊόντος μπορεί να οδηγήσει σε πολλά αντίγραφα της επανάληψης απ' ότι αν είχαμε την αρχική αλληλουχία. (εικόνα 12) (Richards R. I. et al 1994, Eichler E. E. et al 1994).

Ο προσανατολισμός των θέσεων έναρξης της αντιγραφής φαίνεται σημαντικός στην HD και την SCA-7, όπου η αλυσίδα με τα CAGs γίνεται υπόστρωμα για τη σύνθεση των Okazaki τμημάτων. Στην SBMA φαίνεται ότι η CAG αλυσίδα είναι άλλες φορές υπόστρωμα για την συνεχή αλυσίδα και άλλες για την ασυνεχή αλυσίδα. Αν η τοποθεσία των θέσεων έναρξης της αντιγραφής είναι ίδια στα εκτεταμένα αλληλόμορφα αυτό θα βοηθήσει να καταλάβουμε την χαμηλή αστάθεια στην SBMA σε σχέση με HD και την SCA-7.



Εικόνα 12. Μοντέλα για το slippage-mediated changes σε απλές τυχαίες επαναλήψεις. α) Για πολλές επαναλήψεις περίπου 80 ($n=a$) μόνο ένα σπάσιμο στη μία αλυσίδα συμβαίνει μέσα στην επανάληψη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Το γλίστρημα της επεκταμένης αλυσίδας κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού μπορεί να επιδράσει στην προσθήκη ή στην έλλειψη μερικών αντιγράφων (y) της επανάληψης. β) Για αριθμό αντιγράφων μεγαλύτερο του 80 ($n=b$) είναι δυνατόν να συμβούν δύο σπασίματα στην αλυσίδα εντός της επανάληψης κατά την αντιγραφή (consistent with the approximate length of an Okazaki fragment). Η αλυσίδα μεταξύ των δύο σπασιμάτων δεν προσδένεται (και στα δύο άκρα) από μια μοναδική αλληλουχία και έτσι είναι ελεύθερη να γλιστρήσει κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού επιτρέποντας την προσθήκη πολλών αντιγράφων (z), απ' ότι είναι παρόντα στην αρχική αλληλουχία (b) κατά τη διάρκεια των επιδιορθωτικών διαδικασιών.

8.2 Υποθέσεις για το μπλοκάρισμα της αντιγραφής

Η επέκταση των πολυγλουταμινών είναι πολυμορφική στις ασθένειες με αυξημένες τριπλέτες, και μέχρι ένα συγκεκριμένο μήκος είναι φυσιολογική. Η υπερμεθυλίωση έχει φανεί ότι είναι αποτέλεσμα της αντιγραφής του CGG. Παρόμοιες πολικές μεταβολές παρατηρούνται στην επέκταση του (CAG)_n, που μπορεί να οδηγούν σε ανώμαλη αντιγραφή της επανάληψης από μια γειτονική θέσης έναρξης αντιγραφής, που οδηγεί σε διαφορετική πιστότητα στη σύνθεση της συνεχούς και ασυνεχούς αλυσίδας. Συνέπεια της υπερέκτασης αυτών των τριπλετών (CTG και CAG) περιλαμβάνει χάσιμο ή μετατροπή α) του βαθμού της μεταγραφής ή της μετάφρασης, β) της αστάθειας του mRNA, γ) κατασκευή DNA δομών φουρκέτας.

Σε *in vitro* πολυμερισμό του DNA παρατηρείται επίσης ανώμαλος πολυμερισμός της επανάληψης. Σε δίκλωνη και μονόκλωνη αλυσίδα, ο πολυμερισμός μπλοκάρεται μέσα στα τμήματα της επανάληψης, πιθανόν λόγω ασυνήθιστων δευτεροταγών δομών. Αυτό το μπλοκάρισμα μπορεί να διευκολύνει την κακή ευθυγράμμιση μεταξύ των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων και της πατρικής DNA αλυσίδας, που ίσως να οδηγεί σε επέκταση.

Μελέτες τρινουκλεοτιδίων σε βακτηριακά πλασμίδια υποστηρίζουν την υπόθεση της αντιγραφής, αφού οι μεγάλες (CTG)_n ή (CGG)_n επαναλήψεις κόβονται από το υπόστρωμα της ασυνεχούς αλυσίδας, αλλά επεκτείνονται στο υπόστρωμα της συνεχούς αλυσίδας, προτείνοντας τον σχηματισμό φουρκέτας από τις επαναλήψεις στο υπόστρωμα της ασυνεχούς αλυσίδας ή στη νεοσυντιθέμενη ασυνεχή αλυσίδα, προκαλώντας έτσι ελλείψεις ή επεκτάσεις κατ' ακολουθία.

Έτσι το μπλοκάρισμα της αντιγραφής μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: α) από το ισχυρό δέσιμο των πρωτεϊνών και του DNA που επαναλαμβάνεται. β) να σταματάει η RNA πολυμεράση στις μεγάλες επαναλήψεις, πράγμα λίγο απίθανο, αφού παρατηρούνται τα ίδια αποτελέσματα είτε οι επαναλήψεις βρίσκονται στη μεταγραφόμενη περιοχή είτε όχι, γ) η σταθερότητα της επανάληψης εξαρτάται από τη δράση του μηχανισμού επιδιόρθωσης της αντιγραφής σε βακτήρια και κύτταρα του σακχαρομύκητα. Έτσι είναι πιθανόν η μη-σωστή σύζευξη των θυγατρικών αλυσίδων με την πατρική κατά την αντιγραφή, αλλά αυτό δεν μπορεί να εξηγήσει την εξάρτηση του μπλοκαρίσματος της αντιγραφής από τον προσανατολισμό της επανάληψης, δ) τα τρινουκλεοτίδια (η δομή τους) είναι μάλλον απευθείας υπεύθυνα για το μπλοκάρισμα

της αντιγραφής του DNA. Αλυσίδες με αυξημένες τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις μπορούν να σχηματίσουν δομές όπως οι φουρκέτες, των οποίων η σταθερότητα εξαρτάται από το μήκος.

Η εξάρτηση από τον προσανατολισμό ίσως οδηγεί σε διαφορές στο σχηματισμό της leading και lagging αλυσίδας. Μη συνεχής σύνθεση της lagging αλυσίδας, υποδηλώνει ότι η αλληλουχία του lagging DNA πρέπει να είναι παροδικά μονόκλωνη, έτσι ώστε το τρινουκλεοτίδιο να έχει καλύτερη τύχη να σχηματίσει δευτεροταγής δομές, όταν είναι στο lagging DNA template. Αν ισχύει αυτό, τότε το κατασκευαστικό δυναμικό διαφορετικών τρινουκλεοτιδίων είναι το εξής in vivo: $d(\text{CGG})_n > d(\text{CCG})_n > d(\text{CTG})_n > d(\text{CAG})_n$, το οποίο συμφωνεί με τα στοιχεία, όπου σχηματίζονται φουρκέτες από τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις in vitro.

In vivo πειράματα που να μας δίδουν πληροφορίες για την αντιγραφή του DNA είναι σπάνια. Έχειδειχθεί πάντως ότι οι αλληλουχίες $(\text{CGG})_n, (\text{CCG})_n, (\text{CTG})_n, (\text{CAG})_n$ μπλοκάρουν την πρόοδο της φουρκέτας αντιγραφής και η αποδοτικότητα της εξαρτάται από α) το μήκος της επανάληψης, β) τον προσανατολισμό των επαναλήψεων σε σχέση με τη θέση έναρξης της αντιγραφής και γ) με την παρουσία του αναστολέα (χλωραμφαινικόλη) για τη πρωτεϊνοσύνθεση.

Κατά πόσο τα παραπάνω μπορεί να συμβαίνουν και στο ανθρώπινο γονιδίωμα όπως και στο βακτηριακό μπορούμε να το αντιληφθούμε μέσα από δύο παρατηρήσεις. Πρώτον: το κατώφλι του μήκους των επαναλήψεων $(\text{CGG})_n$. Τα $(\text{CCG})_n$ προκαλούν μπλοκάρισμα στην αντιγραφή ($n=30$) και είναι παρόμοιο με το κατώφλι του μήκους που απαιτείται στην in vivo επέκταση ($n=25$). Δεύτερον: Πιστεύεται ότι οι AGG διακοπές μέσα στην $(\text{CGG})_n$ επανάληψη στο FMR1 γονίδιο εμποδίζει την επέκταση και βοηθά το μπλοκάρισμα της αντιγραφής στο σύστημα μας. Το μοντέλο αυτό μας λέει ότι η φουρκέτα αντιγραφής πρώτα σταματά μέσα στο επαναλαμβανόμενο DNA, το οποίο μπορεί περιστασιακά να οδηγεί σε επέκταση ή συστολή. Είναι φανερό πως το μπλοκάρισμα της αντιγραφής μπορεί να προκαλέσει ελλείψεις, αλλά είναι λιγότερο φανερό πως το σταμάτημα της αντιγραφής μπορεί να οδηγήσει σε επέκταση.

Υπάρχουν όμως οι παρακάτω υποθέσεις για τη δημιουργία τελικά της επέκτασης:

- α) Το μπλοκάρισμα της αντιγραφής, μπορεί περιστασιακά να οδηγήσει σε σχηματισμό φουρκέτας στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, οδηγώντας έτσι σε επέκταση.
- β) Ο σχηματισμός της φουρκέτας στην ασυνεχή αλυσίδα να οδηγεί στην έναρξη ενός επιπλέον Okazaki τμήματος, προκαλώντας επέκταση

γ) το 5' unprocessed τμήμα του Okazaki τμήματος μέσα στις επαναλήψεις μπορεί να οδηγήσει σε επέκταση και

δ) η συσσώρευση παγιδευμένων ενδιάμεσων μπορεί να διεγείρει τον ανασυνδιασμό, οδηγώντας σε επέκταση (Samadashwily G.M. et al 1997).

8.3 Τροποποιητικοί παράγοντες

Πρόκειται για γονίδια που φαίνεται να επηρεάζουν την ηλικία έναρξης της HD, όπως προκύπτει από μελέτες συσχέτισης μετά από σάρωση ολόκληρου του γονιδιώματος. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το GluR6 (glutamate receptor gene) που βρίσκεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6. Μια TAA επαναλαμβανόμενη πολυμορφική αλληλουχία που εδράζεται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του GluR6 γονιδίου έχει συσχετιστεί μέχρι και με το 13% της μεταβλητότητας της έναρξης της ηλικίας της HD. Πιστεύεται ότι η TAA επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι σε κοντινή σύνδεση με κάποιο αλληλόμορφο του GluR6 γονιδίου που τροποποιεί την ηλικία έναρξης της HD. Η συσχέτιση του GluR6 με την ηλικία έναρξης της ασθένειας, εγείρει την πιθανότητα να συμμετέχει η διεγερτικοτοξικότητα (excitotoxicity) στην παθογένεια της απώλειας νευρώνων στην HD (MacDonald M. E. et al 1999).

Τροποποιητικός παράγοντας που φαίνεται να συσχετίζεται με την ηλικία έναρξης της HD έχει βρεθεί ακόμα και στο ίδιο το 4 χρωμόσωμα σε απόσταση 1,5 Mb από την 5' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του HD γονιδίου (Djousse L. et al 2003). Παρά την εύρεση διαφόρων πιθανών τροποποιητικών γονιδίων, ο μηχανισμός με τον οποίο αυτά τα γονίδια επηρεάζουν την ηλικία έναρξης της HD δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

8.4 Μηχανισμοί μετάλλαξης (γειτονικές αλληλουχίες) 5'-end περιοχή και cis-acting modifiers

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η σταθερότητα της (CAG) επανάληψης στην HD καθορίζεται από μοναδικές αλληλουχίες μέσα ή γειτονικά του HD γονιδίου, οι οποίες εμπλέκονται στην αντιγραφή και την μεταγραφή (cis-acting elements). Ο μηχανισμός αστάθειας της τρινουκλεοτιδικής επανάληψης αναφέρεται ως δυναμική μετάλλαξη, γιατί η πιθανότητα μετάλλαξης είναι μια λειτουργία που βασίζεται στον

αριθμό των αντιγράφων, τέτοια που το προϊόν της μετάλλαξης είναι πιο πιθανό να προκύψει σε ένα συγκεκριμένο άτομο, παρά στη μετάλλαξη του προηγούμενου ατόμου (προγονικού). Επίσης η δυναμική μετάλλαξη είναι μια διαδικασία κατά τα οποία γίνεται μετάβαση από φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων σε παθολογικό σε αρκετά στάδια και όχι απλά ένα τυχαίο μοναδικό γεγονός.

Στο FRAXA, DM, HD έχει μελετηθεί το αποτέλεσμα μιας αρχικής μετάλλαξης (founder effect) με γενετική διασύνδεση γειτονικών δεικτών. Δηλαδή γειτονικές DNA αλληλουχίες της επανάληψης (cis-acting elements) εμπλέκονται στο μηχανισμό μετάλλαξης. Μερικοί από τους απλότυπους υψηλού κινδύνου είναι σε linkage disequilibrium με επαναλήψεις που έχουν μέγεθος στα όρια του φυσιολογικού και έτσι έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μεταλλαχθούν. Στο Σύνδρομο του εύθραυστου X η επανάληψη σε φυσιολογικά άτομα διακόπτεται από μία βάση και δημιουργούνται έτσι μη-τέλειες επαναλήψεις. Ίσως η απλούστερη εξήγηση για την εμπλοκή των cis-acting συστατικών στην μετάλλαξη είναι μια επιστροφή σε μια τέλεια επανάληψη που οδηγεί την αλληλουχία σε αστάθεια. Στην SCA1 σε 126 αλληλόμορφα που δεν έχουν επεκταθεί φαίνεται ότι διακόπτονται. Ενώ σε 30 αυξημένα αλληλόμορφα υπήρχαν τέλειες επαναλήψεις (μη διακοπτόμενες). Έτσι για τις δυναμικές μεταλλάξεις εμπλέκονται και trans και cis στοιχεία. (Richards R. I. et al 1994).

Λειτουργική μελέτη του υποκινητή του ανθρώπινου HD γονιδίου αποκάλυψε ότι τα κύρια ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής βρίσκονται ανάμεσα στο -324 και το +20, έχοντας αλληλουχίες πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1, AP-2, AP-4 και NF-AT. Άμεσες επαναλήψεις έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς υποκινητές όπως στην LDL (Low density lipoprotein) που περιέχει ένα τμήμα 29ζ.β. και ένα 16ζ.β. απαραίτητα για την μεταγραφή. Στο HD γονίδιο στον άνθρωπο και στο ποντίκι απουσιάζουν επαναλαμβανόμενα στοιχεία από την 5' περιοχή που μπορεί να σημαίνει ότι η μεταγραφή αυτών των γονιδίων ελέγχεται πιθανόν από cis και trans παράγοντες. Το τμήμα των 16 ζ.β. είναι υψηλά συντηρημένο σε hamster, στο ποντίκι και στον άνθρωπο τόσο στην νουκλεοτιδική αλληλουχία όσο και στη σχετική του θέση. Η έλλειψη αυτών των επαναλήψεων στον υποκινητή του hdh και του HD γονιδίου ίσως δείχνει την εξέλιξη αυτών των γονιδίων σε διαφορετικά πρότυπα ρύθμισης (Lee J. et al 2002).

Στο HD γονίδιο από άνθρωπο και από ποντίκι παρουσιάζονται υψηλά επίπεδα GC και απουσία TATA και CCAAT cis-elements στην 5' αμετάφραστη περιοχή.

Επίσης έχουν ανιχνευθεί πολλαπλές θέσεις έναρξης μεταγραφής. Τέτοιες περιοχές είναι κοινές σε πολλά housekeeping γονίδια και πιθανόν και το HD γονίδιο να ανήκει σ' αυτή την κατηγορία γονιδίων. Για τη έκφραση του HD γονιδίου φαίνεται ότι είναι απαραίτητες αλληλουχίες που βρίσκονται 1Kb πριν το κωδικόνιο έναρξης. Και τα δύο εκφράζονται σε όλους τους ιστούς. Η παρουσία των υψηλά συντηρημένων περιοχών στο Hdh και στο HD από το -56 έως το -206 δηλώνει ότι αυτές οι περιοχές παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του HD γονιδίου (Lin B. et al 1995, Lee J et al 2002).

Η πιο ασταθής τριπλέτα έχει παρατηρηθεί στην SCA7 και ακολούθως στην DM ειδικά κατά την αρσενική γαμετική μεταβίβαση. Έχουν ανιχνευθεί ποικιλομορφίες μέσα στις επαναλήψεις που συνεργάζονται με πολυμορφισμούς σε πλευρικές αλληλουχίες. Ίσως τα GC να επηρεάζουν τη δομή του DNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα των πλευρικών αλληλουχιών είναι λιγότερο σαφή στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά, που σημαίνει ότι η διαδικασία της μετάλλαξης είναι λιγότερο ευαίσθητη στις πλευρικές αλληλουχίες στα θηλυκά άτομα. Άλλοι γενετικοί τόποι δεν δείχνουν συσχέτιση με CpG island που σημαίνει ότι αυτή η γειτνίαση με CpG islands είναι ένας σπουδαίος παράγοντας για την αντιγραφή, αλλά όχι ο μοναδικός. (Brock G. J. R. et al 1999).

Διαγονιδιακά ποντίκια με ολόκληρο το HD γονίδιο (με 44 CAGs) επιβίωσαν μετά από 1 χρόνο και δεν δείχνουν καμιά αλλαγή στη συμπεριφορά, ούτε στη μορφογενετική ανάλυση του εγκεφάλου. Παρά την υψηλή έκφραση του mRNA δεν υπήρχε γονιδιακό προϊόν σ' αυτά τα ποντίκια. In vitro πειράματα έδειξαν ότι η ενσωμάτωση ενός τμήματος 120 bp στην 5' UTR του cDNA και η παρουσία μιας μετάλλαξης στο νουκλεοτίδιο 2349 εμποδίζει την έκφραση του cDNA. Άρα η παρουσία του παθολογικού RNA μεταγράφου δεν είναι ικανή να οδηγήσει στην ασθένεια. Πιο κρίσιμη πρέπει να είναι η μετάφραση του CAG στην παθογένεση της HD. Αντίθετα με τον άνθρωπο στα διαγονιδιακά ποντίκια το CAG ήταν σταθερό σε 97 μειώσεις, γεγονός που δηλώνει ότι γενομικές αλληλουχίες μπορεί να παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στην αστάθεια του CAG. Ίσως τα ποντίκια δεν είναι το καλύτερο μοντέλο για την μελέτη της HD, αφού είναι μια late-onset ασθένεια και τα ποντίκια είναι πολύ νέα για να εκδηλώσουν την ασθένεια. Μετά από 1 χρόνο τα ποντίκια είναι φυσιολογικά και η ηλικία αυτή αντιστοιχεί στη μέση ηλικία του ανθρώπου στην οποία αναμένονται και τα πρώτα συμπτώματα της HD. Η απουσία της πρωτεΐνης δικαιολογείται με την ένθεση του τμήματος των 120 bp στο 5' UTR. Στα αγρίου

τύπου constructs όταν αφαιρεθούν αυτές οι αλληλουχίες έχουμε υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης *in vitro*, πράγμα που προτείνει ότι οι DNA αλληλουχίες που παρεμποδίζουν την έκφραση μάλλον βρίσκονται στο τμήμα των 120ζ.β. πριν το 5' UTR. Δεν αποκλείεται και η περίπτωση να φτιάχεται μια κολοβή πρωτεΐνη, η οποία αποικοδομείται γρήγορα και έτσι δεν ανιχνεύεται. Μια τέτοια υπόθεση υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι στο γονίδιο του ανθρώπου και του ποντικίου υπάρχει μια υψηλά συντηρημένη περιοχή στο 5' άκρο του AUG από -56 έως το -206 (Goldberg Y. P. et al 1996).

Μια άλλη υπόθεση δηλώνει ότι η γεινίαση των επαναλήψεων με τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής είναι πιο σημαντική για την αστάθεια από τον προσανατολισμό. Αυτό έχει αποδειχθεί και σε ποντικίσια κύτταρα, όπου με χρήση πλασμιδίου με (CAG/CTG)₇₉ σε SV40 σύστημα, οδηγούμαστε σε επέκταση, όταν ο SV40 ήταν 103bp μακριά από τις επαναλήψεις. Ενώ όταν ήταν σε απόσταση 234, 536 και 667 οδηγούμαστε σε συστολή. Η HD και η SCA-7 χαρακτηρίζονται από περισσότερες επεκτάσεις παρά συστολές. Αυτή η γενετική συμπεριφορά συμβαδίζει με τη θέση των επαναλήψεων στο γονίδιο 700-900bp ή ακόμα και 3,6Kb μακριά από τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής. Όμως η απλή υπόθεση ότι οι τριπλέτες 234bp μακριά από τις θέσεις έναρξης της αντιγραφής οδηγούν σε συστολές δεν επαληθεύεται στις ασθένειες. Επομένως τα αποτελέσματα από το SV40 σύστημα είναι μάλλον πρώιμα για να οδηγήσουν σε γενικευμένα συμπεράσματα και επίσης δεν έχουν ελεγχθεί αλληλουχίες πέρα από τα 667bp. Μάλλον απαιτείται περαιτέρω έρευνα της περιοχής πέραν των 3,6kb στα εκτεταμένα HD και SCA-7 αλληλόμορφα (Nenguke T. et al 2003).

Η τριπλέτα CAG ευθύνεται για το 50% των HD περιπτώσεων όσον αφορά την ποικιλία στην ηλικία έναρξης της ασθένειας, που σημαίνει ότι η HD μετάλλαξη δεν είναι πλήρως διεισδυτική. Η ποικιλία στην αλληλουχία του υποκινητή πιθανώς να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του HD mRNA. Έχει μελετηθεί ένα τμήμα αλληλουχίας 303bp ανοδικά της +1 θέσης έναρξης της μετάφρασης. Σ' αυτήν την περιοχή παρουσιάστηκαν πολυμορφισμοί, ενώ κανένας πολυμορφισμός δεν παρουσιάστηκε 500bp ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής. Ανιχνεύθηκαν 4 πολυμορφικές θέσεις (7 αλληλόμορφα) στο τμήμα 303bp ανοδικά του κωδικονίου έναρξης. Ένα από τα τέσσερα είναι μέσα στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Η νουκλεοτιδική σύσταση του υποκινητή δεν δημιουργεί ούτε καταργεί αλληλουχίες του DNA που θεωρούνται σημεία πρόσδεσης για πρωτεΐνες. Δύο πολυμορφικές

θέσεις εμπεριέχουν τέλειες επαναλήψεις των 6ζ.β. και 20ζ.β.. Καθεμιά επανάληψη των 20ζ.β. περιέχει δυνητικές cis-acting αλληλουχίες, οι οποίες περιλαμβάνονται στα Sp1, Ap2 και IRE μοτίβα. Είναι πιθανόν να αυξάνεται το δέσιμο για trans-acting παράγοντες όταν αυτό το stretch διπλασιάζεται ή τριπλασιάζεται. Στο τμήμα των 6ζ.β. δεν υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης μέσα ή γύρω από αυτό, αλλά όταν διπλασιάζεται εισάγεται μια δυνητική Sp1 και Ap2 θέση. Το πρότυπο των VNTR πολυμορφισμών των επαναλήψεων των 6ζ.β. και 20ζ.β. προτείνει ότι συμβαίνουν τυχαίοι διπλασιασμοί στην core αλληλουχία. Στους χιμπατζήδες και τους γορίλλες υπάρχει ένα αντίγραφο με 6ζ.β. και ένα με 20ζ.β., ενώ στον άνθρωπο έχει βρεθεί ένα αλληλόμορφο που περιέχει μοναδικά αντίγραφα από αυτά τα τμήματα.

Οι υποθέσεις που υπάρχουν είναι ότι αυτοί οι τόποι είναι στην διαδικασία της επέκτασης στους ανθρώπους ή βρίσκονται σε ένα στάδιο συστολής επιστρέφοντας σε μονά αντίγραφα. Η δεύτερη υπόθεση δεν είναι τόσο ισχυρή αφού αυτές οι αλληλουχίες ανιχνεύονται μόνο στους γορίλλες και τους χιμπατζήδες. Το πιο πιθανό επομένως είναι οι αλληλουχίες να τείνουν σε επέκταση κατά την ανθρώπινη εξελικτική γραμμή, οδηγώντας τους ανθρώπους να είναι πολυμορφικοί γι' αυτούς τους γενετικούς τόπους (Coles R. et al 1997, Clearly J. D. et al 2002).

9. Μοριακή ανάλυση της γενετικής θέσης της HD. Ανάπτυξη χαρτών σε σχέση με πολυμορφικούς δείκτες.

Για τον προσδιορισμό της χρωμοσωμικής θέσης του HD γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι τεχνικές της γενετικής σύνδεσης του linkage analysis και οι τεχνικές του ανασυνδιασμένου DNA, με τη χρήση γενετικών δεικτών που δείχνουν συχνό πολυμορφισμό σε μεγάλες HD οικογένειες και οι οποίοι σχετίζονται με την κληρονομία του γονιδίου.

Η αρχική τεχνική είχε ως εξής: Γίνεται πέψη γενομικού DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση, ένα τυπικό ένζυμο που κόβει το DNA σε περίπου 1.000.000 κομμάτια. Τους τυχόν πολυμορφισμούς του DNA τους ανιχνεύουμε σαν διαφορές στα μεγέθη τμημάτων, που έχουν προκύψει από το κόψιμο (RFLPs), από ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο. Τα τμήματα αυτά διαχωρίζονται σε gel αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται σε ειδικό φίλτρο και ανιχνεύονται με ειδικά μόρια

DNA- ανιχνευτές (probes). Η ανάλυση γίνεται με τη διαδικασία της υβριδοποίησης και της αυτοραδιογραφίας, οπότε και προσδιορίζουμε τις διαφορές στα μεγέθη πάνω στο φιλμ.

Με linkage analysis εντοπίστηκε το HD γονίδιο κοντά στον πολυμορφικό δείκτη D4S10, στο τελομερές του κοντού βραχίονα (p) του χρωμοσώματος 4. Με τη χρήση και άλλων υψηλά πολυμορφικών δεικτών στην ίδια περιοχή προσδιορίστηκε με περισσότερη ακρίβεια η θέση του HD γονιδίου. Με την τεχνική του PFGE (Pulse-field gel electrophoresis) μπόρεσαν να προσδιορίσουν την ακριβή φυσική θέση του γονιδίου, η οποία είναι στην περιοχή 4p16.3.

Έκτοτε χρησιμοποιήθηκαν 21 ανιχνευτές ειδικοί για C και G από την περιοχή 4p16.3, αφού η περιοχή είχε φανεί ότι περιέχει πολλά CpG islands. Η πηγή του DNA ήταν περιφερικά λεμφοκύτταρα και μια λεμφοβλαστοειδή κυτταρική σειρά (GM141.6B) που περιείχε 4 X χρωμοσώματα. Οι ανιχνευτές από την 4p16.3 περιοχή χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευάστηκε ένας φυσικός χάρτης 4Mb. Ένας τέτοιο χάρτης είναι ιδιαίτερα χρήσιμος αφού οι περιοχές κοντά στα τελομερή έχουν υψηλά ποσοστά ανασυνδιασμού (Bucan M. et al 1990).

Τα CpG islands έχει δειχτεί ότι συνεργάζονται με αλληλουχίες υποκινητών "housekeeping γονιδίων". Επίσης με GC-πλούσιες περιοχές συνεργάζονται ιστοειδικά γονίδια. Από 3 κοσμιδιακές βιβλιοθήκες απομονώθηκε από την περιοχή 4p16.3 ένα τμήμα 460Kb, κοντά στον δείκτη D4S111. Σ' αυτή την περιοχή χαρακτηρίστηκαν 15 CpG islands που πιθανώς προβλέπουν θέσεις για γονίδια σ' αυτή την περιοχή. Με τη χρήση διαφόρων probes και DNA δεικτών προσδιόρισαν στην 4p16.3 περιοχή 3 υποψήφιες περιοχές που πιθανώς να φιλοξενούσαν το HD γονίδιο. Η πρώτη ήταν στην περιοχή D4S95-D4S168 (D4S43-D4S98), η δεύτερη στην περιοχή D4S111-D4S90 και η τρίτη από τον δείκτη D4S90 και προς το τελομερές (Weber B. et al 1991).

Το 1983 με linkage analysis εντοπίστηκε η γενετική περιοχή που προκαλεί HD, στο χρωμόσωμα 4 σε ανθρώπινο γενετικό υλικό. (Gusella) με χρήση νέων πολυμορφικών δεικτών και νέων τεχνικών, όπως φυσικοί χάρτες της περιοχής, κλωνοποίηση του 4p τελομερούς του HD χρωμοσώματος σε YAC κλώνους, contigs της υποψήφιας περιοχής και ταυτοποίηση γονιδίων που βρίσκονται στην ίδια περιοχή. Ανάλυση γεγονότων ανασυνδιασμού σε HD γενεαλογικά δέντρα οδήγησε στον προσδιορισμό μιας 2,2Mb περιοχής μεταξύ του D4S10 και του D4S98 στην

περιοχή 4p16.3 σαν την πιο πιθανή θέση του HD γονιδίου (The HD collaborative research group, 1993)

Τελικά έγινε χαρακτηρισμός της περιοχής 2,2Mb ανάμεσα στον D4S10 και τον D4S98. Αυτή η περιοχή απομονώθηκε σαν ένα τελομερικό yeast artificial chromosome (YAC clone) MacDonald. Δείχθηκε τελικά ότι 500Kb ανάμεσα στον D4S180 και τον D4S182 ήταν η πιο κοινή περιοχή για το γονίδιο. Αυτή όμως η περιοχή (2,2Mb) είναι πλούσια σε GC βάσεις και πολλά CpG islands, γεγονός που την κάνει υποψήφια για πολλά γονίδια (Baxendale S. et al 1993, MacDonald M. E. et al 1992).

Με τη μέθοδο του exon trapping απομόνωσαν το IT-15A cDNA με screening μιας cDNA βιβλιοθήκης από κύτταρα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Επίσης απομονώθηκε το IT-16A με τον ίδιο τρόπο, αλλά από βιβλιοθήκη από εγκεφαλικό φλοιό ενηλίκου. Με Northern blot ανάλυση επιβεβαίωσαν ότι τα IT-15A και IT-16A ανιχνεύουν το ίδιο 10-11Kb μετάγραφο που σημαίνει ότι προέρχονται από το ίδιο mRNA. Αυτό συμβαίνει σε όλα τα mRNAs από διάφορους ιστούς (συκώτι, σπλήνας, νεφρός, μυς, και διάφορες περιοχές ενήλικου εγκεφάλου). Τα IT-15A και IT-16A χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες cDNA ιστοειδικές βιβλιοθήκες για τον εντοπισμό του πλήρους μεταγράφου. Με τη χρήση 5' cDNA φάνηκε το ολοκληρωμένο μετάγραφο, το οποίο περιέχει μια προβλεπόμενη κωδική αλληλουχία 10366 βάσεων, η οποία περιλαμβάνει μια ουρά 18A's. Το HD γονίδιο έχει μήκος 210 Kb, το ανοιχτό πλαίσιο διαβάσματος είναι 9432 βάσεις και ξεκινά με ένα δυνητικό κωδικόνιο έναρξης στη βάση 316. Υπάρχει ένα κωδικόνιο λήξης μέσα στο πλαίσιο διαβάσματος στη θέση 240 ανοδικά. Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου (huntigtin) προβλέπεται να έχει 348KDa και αποτελείται από 3144 αμινοξέα. Όμως δεν αποκλείουμε την πιθανότητα η μετάφραση να μην αρχίζει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης και να δίνει έτσι μια μικρότερη πρωτεΐνη. Το IT-15 cDNA εκτός της περιοχής του τρινουκλεοτιδίου δεν δείχνει σημαντικές ομοιότητες με κάποιο άλλο γονίδιο από την Genbank database (The HD collaborative research group, 1993).

Το HD γονίδιο περιέχει 67 εξώνια. Στο πρώτο εξώνιο υπάρχει επανάληψη της τριπλέτας CAG, 17 κωδικόνια ανοδικά από το πρώτο ATG. Κοντά στο 5' άκρο του IT-15 γονιδίου περιέχονται τουλάχιστον 17 αντίγραφα της τριπλέτας (CAG), η οποία κωδικοποιεί για γλουταμίνη. Η περιοχή αυτή είναι πολυμορφική και στον φυσιολογικό πληθυσμό είναι μεταξύ 11-34 αντίγραφα, σε ποσοστό 98% από 173 φυσιολογικά χρωμοσώματα που ελέγχθηκαν. Στα HD χρωμοσώματα το μέγεθος της

τρινουκλεοτιδικής επανάληψης είναι σημαντικά αυξημένο σε μια κλίμακα από 42 έως και περισσότερα από 62 και δείχνει μια συσχέτιση με την ηλικία έναρξης (οι μεγαλύτερες επαναλήψεις συναντώνται σε άτομα που εμφανίζουν τη νόσο σε μικρότερες ηλικίες). Η ετεροζυγωτία στα φυσιολογικά χρωμοσώματα είναι 80%. Υπάρχει όμως καθοδικά του CAG άλλη μία πολυμορφική τριπλέτα (CCG)₇, λιγότερο όμως σε σχέση με το CAG (The HD collaborative research group, 1993).

Το γεγονός αυτό, αλλά και ότι το ποσοστό νέων HD μεταλλάξεων είναι χαμηλό, μας λέει ότι τελικά η επέκταση της επανάληψης λαμβάνει χώρα σε περιορισμένο αριθμό χρωμοσωμάτων. Έχει φανεί ότι στο fragile-X σύνδρομο η επανάληψη συνεργάζεται άμεσα με απενεργοποίηση του FMR1 γονιδίου. Στην SBMA μάλλον παράγεται ένα ανενεργό γονιδιακό προϊόν. Στη Μυοτονική δυστροφία (MD) δεν γνωρίζουμε ακόμα τον μηχανισμό. Στην HD υπάρχουν πολλές πιθανότητες για την παθογένεια της CAG επανάληψης στο φαινότυπο της ασθένειας. Ο φαινότυπος σε ομοζυγότες και ετεροζυγότες είναι ο ίδιος, πράγμα που δηλώνει ότι ο φαινότυπος είναι ολοκληρωτικά επικρατής. Αυτό μας προτείνει επίσης ότι η HD προέρχεται τελικά από μια gain-of-function μετάλλαξη, όπου το mRNA ή η πρωτεΐνη έχουν καινούριες λειτουργίες ή εκφράζονται ακατάλληλα (The HD collaborative research group, 1993).

Οι πολλαπλοί απλότυποι μπορεί να εξηγηθούν ως εξής: α) Τα HD χρωμοσώματα μπορεί να συγγενεύουν, αν ο μηχανισμός που ξεκινάει την αλλαγή στον HD απλότυπο να μην είναι τελικά ένας απλός ανασυνδιασμός. Αν οι απλότυποι οφείλονται π.χ. σε μια γονιδιακή μετατροπή ή σε ένα διπλό ανασυνδιασμό, τότε ισχύει η πεποίθηση ότι τα HD χρωμοσώματα προήλθαν από ένα αρχικό (original) χρωμόσωμα. β) ίσως να έχουν συμβεί πολλαπλές διαφορετικές μεταλλάξεις, αλλά η συχνότητα της μετάλλαξης να οφείλεται στο χρωμοσωμικό απλότυπο. Π.χ. μπορεί η επιλεκτική επαναπαρουσίαση διαφόρων απλοτύπων να οφείλεται σε μια cis-acting προδιαθεσική αλληλουχία, η οποία να συνεργάζεται με συγκεκριμένα αλληλόμορφα για κάποιους δείκτες (MacDonald M.E. et al 1992).

10. Ομολογίες στο γονίδιο της HD μεταξύ ανθρώπου και άλλων οργανισμών

Πέντε ασθένειες έχουν ανιχνευθεί στον άνθρωπο που οφείλονται σε αυξημένο αριθμό της τριπλέτας CAG. SBMA, HD, SCA1, DRPLA και Machado – Joseph disease. Από έρευνες σε ανθρωποειδή φάνηκε ότι ο αριθμός των επαναλήψεων τριπλετών αυξάνεται κατά την εξέλιξη των ανθρωποειδών πρωτευόντων ειδικά κατά τη διάρκεια της εξελικτικής γραμμής του ανθρώπου. Τα είδη που ερευνήθηκαν είναι χιμπατζής, γορίλας, ποντίκι, αρουραίος, γίββων και Cercopithecines (Djian P. et al 1996).

ΧΟΡΕΙΑ ΤΟΥ HD

Έγινε αναπαραγωγή τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στο τμήμα μεταξύ των κωδικονίων 8-34 του γονιδίου της HD, το οποίο αποτελείται από 4 υποπεριοχές. Η πρώτη αντιπροσωπεύει την περιοχή με τον πολυμορφισμό του CAG, ενώ η δεύτερη το CCG που είναι κοντά στο CAG και είναι επίσης πολυμορφικό, ενώ η τρίτη και τέταρτη περιοχή περιέχουν απλά CCGs. Οι χιμπατζήδες και οι γορίλλες, όπως και ο άνθρωπος είναι πολυμορφικοί για τις CAG επαναλήψεις και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 7-9, αριθμός πολύ μικρότερος από αυτόν του ανθρώπου (11-35). Τα CCG απαντώνται στον άνθρωπο μεταξύ 7-10, ενώ στους αφρικανικούς πιθήκους μεταξύ 5 και 6. Φαίνεται ότι στα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα ο αριθμός των CAG είναι λίγο μεγαλύτερος από CCGs (7-9 / 5-6), ενώ στους ανθρώπους η διαφορά είναι αρκετά μεγαλύτερη. Είναι επομένως φανερό ότι κατά την εξέλιξη ο μηχανισμός της επέκτασης φάνηκε να εστιάζεται στο CAG παρά στο CCG. Όσον αφορά τις θέσεις 3 και 4 που έχουν CCGs, αλλά δεν είναι πολυμορφικά ο αριθμός τους είναι σε όλα τα είδη περίπου 3.

MACHADO – JOSEPH DISEASE

Στον άνθρωπο συναντούμε 16 CAGs με φυσιολογική κλίμακα μεταξύ 13-36. Στον αφρικανικό πίθηκο είναι 2-13, στον γορίλλα και στον gibbon είναι 2-7. Τα περισσότερα τρινουκλεοτίδια ανήκουν στο 3' άκρο του ιντρονίου και είναι μέρος του splice site.

SBMA

Στο γονίδιο του *antrogen receptor* υπάρχουν 2 θέσεις επέκτασης του CAG και μια τρίτη που περιέχει 5 CAGs στον άνθρωπο. Η ανοδική θέση 1 σχετίζεται με την ασθένεια και είναι πολυμορφική. Το φυσιολογικό ανθρώπινο αλληλόμορφο έχει 25 CAGs σε μια κλίμακα από 11-31. Στον αρουραίο και στο ποντίκι η CAG επανάληψη υπάρχει σε άλλη θέση στο γονίδιο. Τα Hominoïd πρωτεύοντα έχουν 4-17 CAG. Ο αριθμός των CAG στη θέση 1 είναι περίπου ίδιος σε όλα τα είδη, ίσως λίγο μικρότερος στα hominoïd.

SCA1

Στον άνθρωπο τα φυσιολογικά αλληλόμορφα περιέχουν 6 –39 / 19-36 (τυπικός αριθμός 28-30 σε 65% και 25-33 σε 95%). Ο μέσος όρος των επαναλήψεων για τους αφρικανικούς πιθήκους, γορίλλα, *hylobates*, *cercopithecines* είναι στα φυσιολογικά όρια του ανθρώπου, αλλά είναι μικρότερος ο αριθμός των επαναλήψεων για τους αριθμούς των επαναλήψεων που εκφράζονται.

Έτσι καταλήγουμε ότι κατά την εξέλιξη: α) υπήρξε μια τάση για επέκταση των CAG επαναλήψεων στα 4 γονίδια για ανώτερα πρωτεύοντα, β) στα 3 γονίδια που έχουν νουκλεοτιδική πληροφορία, φαίνεται ότι η νουκλεοτιδική αντικατάσταση είναι συχνή μέσα ή στα σύνορα των επεκτεινόμενων θέσεων. Και στα 4 γονίδια οι CAG επαναλήψεις είναι μικρότερες στα ποντίκια και στους πιθήκους απ' ό τι στον άνθρωπο. Υπάρχουν δύο υποθέσεις: 1) ή ότι συμβαίνει επέκταση στον άνθρωπο σε υψηλό βαθμό σε σχέση με τα άλλα πρωτεύοντα ή 2) ότι συμβαίνει συστολή στις επαναλήψεις στα μη ανθρώπινα πρωτεύοντα. Η πρώτη εκδοχή είναι πιο πιθανή μια και στις διάφορες ασθένειες παρατηρείται μια τάση για επέκταση. Η επέκταση κατά την εξέλιξη προχώρησε διαφορετικά για τα διαφορετικά γονίδια των ασθενειών, αλλά και για τις διαφορετικές θέσεις μέσα στα ίδια τα γονίδια.

Ποντίκι

Το ποντικίσιο ομόλογο για την HD έχει 7 CAG, αριθμός πολύ κοντινός με αυτόν των μη ανθρώπινων πρωτευόντων. Αυτό δείχνει ότι ο μεγάλος αριθμός CAGs στον άνθρωπο (>34) φάνηκε να ακολουθήσε την επέκταση μόνο κατά την ανθρώπινη εξελικτική γραμμή, μετά την αποκοπή (*diverge*) από τις άλλες (ανθρωποειδή) hominoïd εξελικτικές γραμμές των ανθρωποειδών (Djian P. et al 1996). Αυτός ο μικρός αριθμός των 7 CAGs στην κοντινή περιοχή του χρωμοσώματος 5 του

ποντικιού δεν περιέχει μεταλλάξεις που να αναπαριστούν το μοντέλο της HD (Grosson C. L. S. et al 1994). Η γειτονική περιοχή με τις προλίνες είναι πολυμορφική στον άνθρωπο (7-12) και στο ποντίκι (3-7).

Η περιοχή αυτή έχει συντηνική συντήρηση. Το Hdh γονίδιο διατηρεί τη συντηνική του σχέση με τους ίδιους πλευρικούς δείκτες στο ποντίκι και στον άνθρωπο. Γονίδια που παραμένουν γενετικά συνδεδεμένα με το HD γονίδιο φαίνεται να διατηρούν τη σύνδεση και με το Hdh, προτείνοντας ότι η περιοχή μεταξύ 2,5 –3,0 Mb HD έως το D4S115E έχει συντηρηθεί. Από παράλληλες μελέτες φαίνεται ότι η περιοχή από την κοντινή περιοχή του 4q έως το 4p16.3 έχει πράγματι συντηρηθεί και στο ποντίκι, εκτός μια περιοχή μικρότερη από 500 Kb μεταξύ του D4S115E – IDUA (Duyao M. et al 1995).

Το HD γονίδιο είναι αρκετά συντηρημένο στα σπονδυλωτά και η αλληλουχία του ποντικίσκου cDNA έχει 91% πεπτιδική ομοιότητα με το ανθρώπινο γονίδιο. Λόγω αυτής της μεγάλης ομοιότητας δεν είναι εύκολο να καθοριστούν συντηρημένες περιοχές μέσα στην πρωτεΐνη. Παρόλα αυτά η σύγκριση στην αλληλουχία με είδη μακρινά από τον άνθρωπο θα μπορούσε να είναι αρκετά πληροφοριακή.

Αρουραίος

Το πρώτο ATG κωδικόνιο στο ομόλογο HD γονίδιο από αρουραίο (rhd) διαφέρει με αυτό του ανθρώπου και του ποντικιού. Στον αρουραίο από 3 διαφορετικούς cDNA κλώνους φάνηκε το ATG σε μια θέση (+22) 30 ζ.β. ανοδικά της (CAG)_n επανάληψης, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν θέση έναρξης της μετάφρασης στον αρουραίο. Στο αμινοξικό επίπεδο υπάρχει υψηλή ομολογία με το ποντίκι (ταυτότητα 96%) και με τον άνθρωπο (ταυτότητα 90%). Σύγκριση της προβλεπόμενης αλληλουχίας της πρωτεΐνης μεταξύ των τριών ειδών υποδεικνύει ισχυρή συντήρηση σε κάποιες περιοχές. Συντηρημένα είναι και τα τμήματα των τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων, CAG και CCG. Ο αρουραίος έχει 8 CAG, το ποντίκι 7 CAG και ο άνθρωπος 18 CAG. Το CAG στο rhd διακόπτεται από μια CAA τριπλέτα που μπορεί να ευθύνεται για την μειωτική σταθερότητα. Αυτός μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο τα μοντέλα των ζώων δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την HD. Επειδή η Huntingtin είναι μια πρωτεΐνη, όπως και οι SCA1, MJD, DRPLA που δεν είναι γνωστές οι λειτουργίες τους, μια μελέτη σε διαγονιδιακά ζώα με την περιοχή του αυξημένου CAG θα ήταν πολύ καλή. Σε όλες

τις περιπτώσεις το CAG βρίσκεται μέσα στις κωδικές περιοχές, αν και αυτό έχει αποδειχθεί μόνο για την HD (Schmitt I. et al 1995).

Fugu

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση του HD γονιδίου μεταξύ του ανθρώπου και του fugu μια και οι μέχρι τώρα συγκρίσεις γίνονταν μεταξύ σπονδυλωτών με αλληλουχίες περίπου ίδιου μεγέθους. Αυτή η ανάλυση ίσως βοηθήσει να βρεθούν και τα ομόλογα γονίδια από κατώτερους οργανισμούς, όπως ο *Chenorabditis elegans* και η *Drosophila melanogaster*. Το *Fugu rubribes* (pufferfish) είναι ένα πολύ καλό μοντέλο σπονδυλωτού για γονιδιακή ανάλυση. Το γονιδίωμα του Fugu έχει μέγεθος 400Mb (7,5 φορές μικρότερο από το ανθρώπινο γονιδίωμα.) Αυτό το γονιδίωμα, λόγω της πυκνότητας του έχει περισσότερες ενδογονιδιακές αλληλουχίες και αλληλουχίες εσωνίων και λιγότερες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.

Η απομόνωση του αντίστοιχου γονιδίου στο fugu (FrHD) έγινε με υβριδοποίηση μιας κοσμιδιακής βιβλιοθήκης από τον ίδιο οργανισμό με probe ένα τμήμα από το ανθρώπινο HD cDNA, μεγέθους 1,8Kb. Το FrHD γονίδιο έχει μέγεθος 23Kb και είναι 7,5 φορές μικρότερο από το ανθρώπινο HD γονίδιο (170Kb). Η θέση των εξωνίων στο fugu γονίδιο μπορεί να προβλεφθεί από την ομολογία τους με τις ανθρώπινες HD αλληλουχίες. Τα ιντρόνια στο fugu (47bp-1476bp) είναι αρκετά μικρότερα από του ανθρώπου (131bp- 12286bp). Οι μόνες εξαιρέσεις είναι τα ιντρόνια 15, 43, 63, 65. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το FrHD γονίδιο περιέχει τον ίδιο αριθμό εξωνίων όπως το ανθρώπινο HD γονίδιο και τα όρια εξωνίων/ιντρονίων στα μετάγραφα είναι πλήρως συντηρημένα μεταξύ ανθρώπου και fugu ακόμη και στο μέγεθος των εξωνίων (εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις). Οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές στη Fugu αλληλουχία είναι λιγότερο συντηρημένες απ' ό,τι τα HD εξώνια.

Τα γονίδια ταξινομούνται ανάλογα με τις ομοιότητες στα όρια εξωνίων / ιντρονίων ακόμη και ελλείψη σημαντικής ομολογίας στην αλληλουχία. Έχουν ανιχνευθεί 66 κατηγορίες συνόρων που είναι 100% συντηρημένες μεταξύ ανθρώπου και fugu και με καμιά σημαντική ομολογία με άλλα γονίδια. Το μέγεθος των εξωνίων στο fugu είναι 48-383 bp, ενώ στον άνθρωπο είναι 48-341bp. Τα fugu μετάγραφα δείχνουν 69% ταυτότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η οποία είναι η ίδια με αυτήν μεταξύ fugu και ποντικίου. Η νουκλεοτιδική ταυτότητα μεταξύ fugu και ανθρώπου είναι 27%-84%. Από σύγκριση μεταξύ των πρωτεϊνών, φαίνεται ότι η περιοχή που

είναι περισσότερο συντηρημένη είναι αυτή προς το αμινοτελικό άκρο, που είναι και αυτή που εντοπίζεται η επέκταση των γλουταμινών. Ο βαθμός της συντήρησης στο αμινοτελικό άκρο ίσως να σχετίζεται με τη λειτουργική σημασία και αυτό να εξηγεί, γιατί η πρωτεΐνη είναι τόσο ευαίσθητη στην επέκταση.

Αν συγκρίνουμε το πρώτο εξώνιο, στο οποίο παρατηρείται και η CAG επέκταση, στους διάφορους οργανισμούς παρατηρούμε ότι:

Άνθρωπος φυσιολογικός αριθμός CAG 6-34, ενώ 37 – 100 στην ασθένεια

Ποντίκι 7 γλουταμίνες (CAG)₂CAA(CAG)₄, η οποία αλληλουχία δεν φαίνεται να είναι πολυμορφική σε 5 ποντικίσια στελέχη.

figu 4 γλουταμίνες (CAG)₂(CAA)₂

10 διαφορετικά πρωτεύοντα Τα CAG έχουν μικρότερο αριθμό και από τον μικρότερο ανθρώπινο φυσιολογικό αριθμό (7-12).

Άρα το προγονικό HD γονίδιο φαίνεται ότι είχε πολύ μικρότερο αριθμό γλουταμινικών επαναλήψεων.

ΑΜΙΝΟΞΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Εκτός του πρώτου εξωνίου υπάρχουν άλλες τρεις περιοχές που διαφέρουν στο figu στον άνθρωπο και στο ποντίκι. Εξώνιο 12: στο figu περιέχονται 2 περιοχές που δεν περιέχονται ούτε στον άνθρωπο ούτε στο ποντίκι. Εξώνιο 24: επιπλέον 93bp αλληλουχία, η οποία δεν συναντάται στο ανθρώπινο HD cDNA. Εξώνιο 26: Υπάρχουν 7 αμινοξέα παραπάνω στο figu απ' ότι στον άνθρωπο.

Επίσης υπάρχουν 2 προσθήκες στα εξώνια 39 και 41. Αυτές οι προσθήκες στη figu πρωτεΐνη συμβαίνουν στην ίδια θέση με τον άνθρωπο και το ποντίκι, πράγμα που προτείνει ότι το HD γονίδιο ακολούθησε αυτές τις αλλαγές στην εξελικτική γραμμή των ψαριών ή των θηλαστικών με προτεραιότητα στον αποχωρισμό του ανθρώπου από το ποντίκι, εδώ και 80 εκατομμύρια χρόνια. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν αυτές οι περιοχές στα ερπετά και τα πουλιά τα οποία αποχωρίστηκαν από τον άνθρωπο εδώ και 250 εκατομμύρια χρόνια, μετά τον αποχωρισμό του ανθρώπου από το figu.

Η μελέτη και η σύγκριση του HD γονιδίου στα δύο είδη σε κωδικές και μη περιοχές θα ήταν χρήσιμη για τον καθορισμό των περισσότερων σπουδαίων και λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης. Η figu αλληλουχία δεν περιέχει πολλές επαναλαμβανόμενες περιοχές και μόνο το 0,8% του 27,5 Kb καλύπτεται από απλές επαναλήψεις οι οποίες είναι λιγότερες από το υπολογισμένο 2,2% από τυχαία

ανάλυση αλληλουχίας του *fugu* DNA. Καμιά από τις απλές επαναλήψεις του *fugu* δεν βρίσκεται στην ανθρώπινη αλληλουχία σε ισότιμες θέσεις και φαίνεται ότι αυτές οι επαναλήψεις εμπλάκηκαν μετά το διαχωρισμό ανθρώπου – ψαριού (Baxendale S. et al 1995).

Άλλο παράδειγμα επέκτασης της CAG επανάληψης κατά την εξέλιξη φαίνεται στις TATA- binding πρωτεΐνες. Το μέγεθος αυξάνει από τον *Xenopus* στο κοτόπουλο και από εκεί στον άνθρωπο.

Αφού οι μικροδορυφόροι τείνουν να είναι μεγαλύτεροι στους ανθρώπους απ' ό τι στα πρωτεύοντα και το μέγεθος μιας απλής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας τείνει να αυξάνεται κατά την εξέλιξη, η τάση για αύξηση των μικροδορυφόρων ή απλών αλληλουχιών και η συνεργασία επαναλαμβανόμενων θέσεων με γενετικές ασθένειες ίσως να ελέγχονται από παρόμοια γονίδια (Djian P. et al 1996).

11. Διαγονιδιακά μοντέλα ζώων για την HD

Το μόνο πετυχημένο διαγονιδιακό μοντέλο για την επανάληψη της τριπλέτας της ασθένειας είναι από την SCA-1. Κατασκευάστηκαν ποντίκια με τον υποκινητή (*pcp2*) από τα Purkinje κύτταρα, ο οποίος οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης του αγρίου τύπου του γονιδίου της αταξίνης. Ζώα με Purkinje κύτταρα με κανονικό αριθμό επαναλήψεων δεν αναπτύσσουν κλινικά συμπτώματα ή εγκεφαλικές ανωμαλίες. Αλλά αρκετές σειρές ποντικίων με γονίδια που περιέχουν αυξημένες επαναλήψεις αναπτύσσουν αταξία και αποδιάταξη των κυττάρων Purkinje. Σε παρόμοια τρανσγενικά πειράματα με το androgen receptor construct με αυξημένους αριθμούς της επανάληψης, φαίνεται χαμηλή έκφραση και όχι δυνατή αναπαραγωγή ποντικίσου φαινότυπου για την SBMA (Lee J. et al 1996) .

Για τον έλεγχο της λειτουργίας της παθολογικής HD πρωτεΐνης έγιναν πειράματα σε ποντίκια. Ομόζυγα ποντίκια για το *disruption* του γονιδίου πεθαίνουν πριν την 8.5 εμβρυονική ημέρα. Ετερόζυγα για το *disruption* εκφράζουν μια 20 KDa κολοβή πρωτεΐνη (το αμινοτελικό άκρο της, τα 4 πρώτα HDh εξώνια) από το αλληλόμορφο με το *knockout* γονίδιο, τόσο καλά όσο και μια κόπια του κανονικού γονιδίου και δεν παρουσιάζουν καμιά φανερή νευρική δυσλειτουργία. Οι ετεροζυγότες έχουν αυξημένη κινητική δραστηριότητα και το διανοητικό έλλειμα

συνεργάζεται με χάσιμο των νεύρων του υποθαλαμικού πυρήνα των βασικών γαγγλίων. Άλλα δείχνουν ανωμαλίες νοητικές (cognition) και κινητικές, όπως τα ζώα με κακώσεις στο νεοραβδωτό σώμα. Επίσης φαίνονται μείωση του μεγέθους του υποθαλαμικού πυρήνα και λιγότερα νεύρα στην ωχρά σφαίρα. Άρα το HD γονίδιο φαίνεται να είναι σπουδαίο για την ομαλή εμβρυϊκή ανάπτυξη ή τη διατήρηση της δομής των βασικών γαγγλίων σε προσυμπτωματικούς ανθρώπους με HD. Επίσης υπήρξε άλλο ένα μοντέλο που δεν έδωσε την κολοβή πρωτεΐνη 20KDa και φαίνονται ανωμαλίες στα ετερόζυγα ζώα.

Στους HD ασθενείς δεν παρατηρείται εμβρυϊκός θάνατος και αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η λειτουργία της huntingtin δεν χάνεται, αλλά οδηγείται με μια gain of function ανωμαλία.. Η δύναμη της μετάλλαξης δεν είναι καθολική και μόνο μια μειονότητα των εμβρυϊκών κυττάρων εκφράζουν Hdh θάνατο αρχικά, πράγμα που δηλώνει ότι η huntingtin δεν είναι τελικά μια “housekeeping” πρωτεΐνη, αλλά ένας απαραίτητος παράγοντας που εμπλέκεται έστω και έμμεσα στην επιβίωση των κυττάρων που είναι επιρρεπή στο να υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD). Αν ισχύει αυτό, τότε η κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που συμβαίνουν στο PCD που παρατηρείται στα Hdh null έμβρυα και η παρόμοια αποπτωτική εξάλειψη των νεύρων του νεοραβδωτού σώματος σε HD ασθενείς που φέρουν επικρατή HD μετάλλαξη μπορεί να επιτευχθεί.

Τρανσγενικά ποντίκια (από cDNA) εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το μεταλλαγμένο ανθρώπινο HD cDNA, αλλά όχι την πρωτεΐνη και τα οποία δεν εκφράζουν HD φαινότυπο. Αυτό το γεγονός προτείνει ότι η νευροτοξικότητα δεν μεσολαβεί στα επίπεδα του DNA ή του mRNA, αλλά μάλλον στη μετάφραση της πρωτεΐνης. Η εμβρυϊκή θνησιμότητα σε ποντίκια με disruption και των δύο αλληλομόρφων μαζί και η ύπαρξη ενήλικων ομόζυγων ανθρώπων για την CAG επέκταση, προτείνει ότι η HD οφείλεται σε gain of function στο πρωτεϊνικό επίπεδο και δεν οφείλεται σε μια απλή ανεπάρκεια των αλληλομόρφων.

Αναλύσεις μετά τη γέννηση δείχνουν ότι κατά τα αναπτυξιακά στάδια του τρανσγενικού ποντικίσου φλοιού στις 3, 6 και 12 εβδομάδες φαίνεται ένα παρόμοιο πρότυπο έκφρασης της ανθρώπινης huntingtin που προέρχεται από YAC με την ενδογενή ποντικίσια πρωτεΐνη. Παλιότερα είχε αποδειχθεί ότι η ποντικίσια huntingtin είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη του μεσοδέρματος και όταν απουσιάζει επιδρά στην εμβρυϊκή θνησιμότητα στην 7,5 ημέρες.

Από αναπαραγωγή YAC διαγονιδιακών ποντικών με ποντίκια ετερόζυγα για targeted disruption στο HD ποντικίσιο γονίδιο, προέκυψαν 67 ποντίκια από τα οποία έζησαν 15, αλλά ήταν όλα ομόζυγα για το targeted disruption HD γονίδιο. Επίσης η ανθρώπινη huntingtin που πήραμε από YAC transgenes εκφράζεται πριν την ημέρα 7,5 της κυοφορίας και παραπέρα μπορεί να αναπληρώνει το χάσιμο της ποντικίσιας πρωτεΐνης κατά την ανάπτυξη. Αυτό προτείνει επίσης ότι η ανθρώπινη huntingtin μπορεί να παθαίνει μετα-μεταφραστική τροποποίηση και να μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες ποντικίσια πρωτεΐνες που μπορεί να είναι κρίσιμη για τη σωστή λειτουργία τους. Η YAC derived transgene έκφραση για την ανθρώπινη πρωτεΐνη φαίνεται ότι εκφράζεται κατά τη διάρκεια της προγενετικής και μετά τη γέννηση ανάπτυξης και ότι η ανθρώπινη πρωτεΐνη εντοπίζεται σε παρόμοια υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως και η ποντικίσια. (Hodgson J. G. et al 1996).

Στα HD ομόλογα του ποντικίου και του Puffer fish η πρωτεΐνη είναι σε μεγάλο ποσοστό παρόμοια με την ανθρώπινη, εκτός τα N-άκρα της πολυγλουταμινικής περιοχής και τα γειτονικά polyproline τμήματα. Πλήρης μείωση της huntingtin στο HD ποντικίσιο ομόλογο (Hdh) προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο στις ημέρες 7,5, 8,5-10,5 σε ομόζυγα knock-out έμβρυα. Ομόζυγα knockout Hdh εμβρυονικά stem κύτταρα (ES) δεν χρειάζονται την huntingtin για να πολλαπλασιαστούν σε καλλιέργεια. Αλλά δεν γνωρίζουμε αν ο οργανισμός μπορεί να περιέχει ενεργή huntingtin μετά το μπλοκάρισμα στην 7,5 ημέρα πριν και μετά τη γέννηση ή ακόμα και στο ενήλικο άτομο.

Αρκετά παραδείγματα μας αποδεικνύουν ότι η αυξημένη επανάληψη του CAG δεν προκαλεί νευρικό θάνατο με ένα απλό πλήρες χάσιμο της huntingtin. Γιατί 1) μείωση κατά 50% της πρωτεΐνης από ετερόζυγη απενεργοποίηση του Hdh με gene targeting στα ποντίκια ή σε ανθρώπους με translocations που διακόπτουν το HD γονίδιο, δεν προκαλούν ανώμαλο φαινότυπο, 2) Εν αντιθέσει με τα ομόζυγα Hdh knockout έμβρυα, άτομα ομόζυγα για το HD είναι βιώσιμα και η νόσος τους δεν διαφέρει από HD ετερόζυγα άτομα. Άρα τελικά ίσως οι μεταλλάξεις στις επαναλήψεις του CAG να εφοδιάζουν την huntingtin με μια παρεκκλινόμενη ιδιότητα που είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για τα νεύρα.

12. Linkage analysis – Γενετική σύνδεση

Αν ένας γονιδιακός τόπος που είναι υπεύθυνος για μια ασθένεια, βρίσκεται αρκετά κοντά σε ένα πολυμορφικό δείκτη, του οποίου ο τρόπος κληρονόμησης μπορεί να παρακολουθηθεί μέσα από οικογένειες που φέρουν την ασθένεια, είναι πιθανό να μπορεί να προβλεφθεί ποιο άτομο θα νοσήσει, ακολουθώντας τον τρόπο κληρονόμησης του δείκτη. Η αρχή αυτή είναι γνωστή ως γενετική σύνδεση και ουσιαστικά αναφέρεται στην τάση 2 κοντινών γενετικών τόπων (γονίδιο /δείκτης) να μεταφέρονται ως μια ακέραια μονάδα μέσα από τη μείωση.

Η πιο μεγάλη χρησιμότητα της ανάλυσης γενετικής σύνδεσης στον άνθρωπο και στην Ιατρική γενετική είναι η ανίχνευση, χαρτογράφηση και διάγνωση γονιδίων υπεύθυνων για κληρονομικές ασθένειες. Η χρωμοσωμική χαρτογράφηση με αυτήν την προσέγγιση παρέχει την δυνατότητα να μελετηθούν γονίδια των οποίων η βιοχημική και μοριακή ανάλυση έχει δώσει ανεπαρκή αποτελέσματα. Σε κατάλληλες οικογένειες λοιπόν μπορεί να ανιχνευθεί γενετικά η κληρονόμηση ενός συγκεκριμένου γονιδίου (υπεύθυνου για ασθένεια) του οποίου: α) η φαινοτυπική ανίχνευση μπορεί να είναι δύσκολη ή αδύνατη λόγω έλλειψης διεισδυτικότητας, β) τα κλινικά συμπτώματα να είναι σποραδικά ή δύσκολο να ανιχνευθούν παρακολουθώντας τον τρόπο μεταβίβασης ενός συνδεδεμένου πολυμορφικού δείκτη. Για την εφαρμογή της ανάλυσης γενετικής σύνδεσης απαιτούνται δύο πολύ σημαντικές προϋποθέσεις:

α) Οι οικογένειες πρέπει να είναι πληροφοριακές με τα αλληλόμορφα ενός τουλάχιστον από τους γονείς γνωστά ή υπολογίσιμα. Η ανίχνευση σύνδεσης απαιτεί ο γονέας να είναι ετερόζυγος τόσο στο γενετικό τόπο του γονιδίου όσο και του δείκτη. Αυτό σημαίνει ότι ο γενετικός τόπος του δείκτη πρέπει να είναι υψηλά πολυμορφικός με τη μεγαλύτερη δυνατή αναλογία των ατόμων να είναι ετερόζυγα γι' αυτόν.

β) Θα πρέπει να είναι γνωστή η φάση της γενετικής πληροφορίας για τους δύο τόπους που εξετάζονται. Να είναι γνωστό δηλαδή ποιο αλληλόμορφο του δείκτη βρίσκεται στο ίδιο χρωμόσωμα με το αλληλόμορφο του γονιδίου που προκαλεί την ασθένεια.

Η ανάλυση γενετικής σύνδεσης μπορεί να καθοριστεί από την τάση των αλληλομόρφων να μεταφέρονται μαζί σαν μια μονάδα κατά την μείωση. Το σθένος της σύνδεσης αυτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια μονάδα μέτρησης για να διευκρινισθεί πόσο κοντά βρίσκονται δύο γενετικοί τόποι που είναι γενετικά

διαφορετικοί. Αυτή η απόσταση είναι ουσιαστικά μια ένδειξη για την φυσική απόσταση των δύο τόπων. Η συχνότητα ανασυνδιασμού δεν είναι σταθερή κατά μήκος ενός χρωμοσώματος ή στο γονιδίωμα γενικότερα.

Οι μεγαλύτερες οικογένειες δίνουν περισσότερες πληροφορίες απ' ότι οι μικρές, αλλά δεν είναι πάντα διαθέσιμες για μια γενετική ασθένεια. Επίσης χρησιμότερες είναι οι οικογένειες που διαθέτουν 3 γενιές ατόμων. Σήμερα μπορούμε να κάνουμε 2 προσεγγίσεις γενετικής σύνδεσης στη γενετική του ανθρώπου.

Πρώτη: Ανάπτυξη με λεπτομέρεια ενός χάρτη γενετικής σύνδεσης για όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα χρησιμοποιώντας μεγάλες οικογένειες τριών γενεών. Έτσι καλούμαστε να μελετήσουμε την γενετική σύνδεση μεταξύ εκατοντάδων πληροφοριακών τόπων συνήθως DNA δεικτών, καθορίζοντας έτσι τις αποστάσεις μεταξύ τους. Οι οικογένειες είναι φυσιολογικές χωρίς γενετικές ασθένειες.

Δεύτερη: μέτρηση σύνδεσης με γενετικούς τόπους ασθενειών. Οικογένειες όμως με γενετικές ασθένειες τείνουν να είναι μικρές, γι' αυτό μας είναι πολύ χρήσιμος ένας φυσιολογικός λεπτομερειακός χάρτης προς σύγκριση.

12.1 Χαρτογράφηση γονιδίων ασθενειών με ανάλυση γενετικής σύνδεσης

Ο γενετικός χάρτης σύνδεσης μας δίνει διαγνωστικές πληροφορίες, όταν το γονίδιο της ασθένειας είναι ήδη γνωστό και είναι συνδεδεμένο με ένα ή περισσότερους δείκτες. Δύο στοιχεία είναι αναγκαία για την χαρτογράφηση γονιδίων ασθενειών: α) επαρκής αριθμός οικογενειών για πραγματοποίηση του linkage, β) κατάλληλοι πληροφοριακοί δείκτες.

Οι επιθυμητές και συμβατές οικογένειες είναι χρήσιμες για σπάνιες διαταραχές ή για διαταραχές στις οποίες τα μολυσμένα άτομα πέθαναν νέα (και έτσι δεν είναι διαθέσιμα για ανάλυση). Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα μικρό αριθμό μεγάλων οικογενειών και το DNA να αποκτηθεί από μέλη κάθε οικογένειας και να πιστοποιηθεί για DNA πολυμορφισμούς. Έτσι όλα τα προσβεβλημένα μέλη σ' ένα γενεαλογικό δέντρο είναι γνωστό ότι έχουν την ίδια γενετική ασθένεια, λόγω κάποιας μετάλλαξης σ' ένα μοναδικό γενετικό τόπο. Θα μπορούσαμε να έχουμε και πολλές μικρές οικογένειες, αλλά αυτό θα χρησίμευε για πιο κοινές ασθένειες (π.χ. κυστική ίνωση), αλλά έχει το ρίσκο ότι δεν θα έχουν όλες οι οικογένειες την ίδια γενετική μοναδική διαταραχή.

Συνήθως στη γενετική του Ανθρώπου ελπίζουμε να βρούμε σύνδεση σε αποστάσεις περίπου 20cM ή και μικρότερες, γιατί για μεγαλύτερες αποστάσεις συνήθως δεν μπορούμε να βρούμε επαρκείς οικογένειες για να πιστοποιήσουμε σημαντική σύνδεση. Έτσι ένας πολυμορφικός δείκτης γενικά πρέπει να είναι μέσα σε 20 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων του γονιδίου της ασθένειας, ώστε να ανιχνευθεί σύνδεση.

12.2 Πλεονεκτήματα των DNA δεικτών

Τα STRs (επαναλήψεις με δύο και τρία νουκλεοτίδια) δείχνουν μεγάλη ποικιλία στον αριθμό των επαναλήψεων, είναι διασπαρμένα σε όλο το γονιδίωμα και μπορούν να ανιχνευθούν με PCR. Τα STRs χρησιμοποιήθηκαν κυρίως στην linkage analysis για την ανίχνευση γονιδίων υπεύθυνων για μονογονιδιακές ασθένειες.

Έχει παρατηρηθεί σύνδεση ανισορροπίας ανάμεσα στις μεταλλάξεις που προκαλούν την ασθένεια και σε γειτονικούς πολυμορφισμούς (linkage disequilibrium Το Linkage disequilibrium (LD) είναι η μέτρηση του βαθμού συνεργασίας (co-segregation) δύο γενετικών δεικτών, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση περιοχών στο γονιδίωμα που σχετίζονται με ασθένειες. Η σύνδεση αυτή δηλώνει ότι αυτές οι μεταλλάξεις έχουν προκύψει από ένα περιορισμένο αριθμό "founder" αλληλομόρφων. Μπορεί να παρατηρηθούν και founder effects, όπου λαμβάνει χώρα ένα μοντέλο με πολλά στάδια, στο οποίο μεγάλα κανονικά αλληλόμορφα, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν σταθερά από γενιά σε γενιά, να είναι τελικά τα πρόδρομα ασταθή αλληλόμορφα τα οποία οδηγούν γρήγορα στις υπεύθυνες για τις ασθένειες μεταλλάξεις. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται πιο έντονα στην μυϊκή δυστροφία, σαν μια πλήρη συνεργασία της μετάλλαξης και ενός αλληλομόρφου από ένα γειτονικό πολυμορφισμό.

Η χρήση των πολυμορφικών δεικτών παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως: 1) Η αλληλουχία του DNA δεν χρειάζεται να εκφραστεί σαν πρωτεΐνη για να ελέγξουμε τον πολυμορφισμό της στα κύτταρα ή στους ιστούς. Οι περισσότεροι DNA δείκτες είναι πολυμορφικοί σε οποιοδήποτε τύπο αλληλουχίας.

2) Μπορούν να βρεθούν σε οποιαδήποτε περιοχή του γονιδιώματος, όπου υπάρχει μια μονή αλληλουχία του DNA.

3) Οποιαδήποτε διαδικασία με DNA δείκτες είναι επαναλήψιμη (το DNA υπάρχει πάνω σε φίλτρα και μπορεί να δοκιμαστεί ξανά με διαφορετικά probes, για

ανίχνευση νέων πολυμορφισμών ή να αναπαραχθεί το τμήμα του DNA δείκτη με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Τέτοιου είδους αναλύσεις πρέπει να γίνουν σε οικογένειες πολυμελείς, με πολλές γενιές και πολλά άτομα στην ίδια γενιά, όπου το γονίδιο της ασθένειας να υπάρχει σε υψηλό ποσοστό σε όλες τις γενιές (Gusella J. 1984).

12.3 Χρήση των SNPs στην ανάλυση του γονιδιώματος

Τα SNPs ενώ αρχικά (δεκαετία '80) χρησιμοποιήθηκαν για να αναγνωρίζουν διαφορές στο γονιδίωμα στις θέσεις που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες εγκαταλείφθηκαν μετά την χρήση των STRs. Οι ερευνητές όμως επανήλθαν στα SNPs χρησιμοποιώντας τα σαν εργαλεία στην ανάλυση πολυπαραγοντικών ασθενειών όπως η οστεοπόρωση, ο διαβήτης, καρδιακές διαταραχές, φλεγμονώδεις ασθένειες, ψυχιατρικές διαταραχές και πολλοί καρκίνοι, οι οποίες εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συχνότητες στον πληθυσμό, απ' ότι οι μονογονιδιακές ασθένειες.

Τα SNPs είναι άφθονα στο γονιδίωμα και είναι πιο σταθερά από τα STRs όταν ο ρυθμός της μετάλλαξης είναι χαμηλός. Οι STRs τόποι είναι αναπληρωματικοί δείκτες με την έννοια ότι χρησιμοποιούνται για να εντοπιστεί ένα γειτονικό λειτουργικό κομμάτι που συνεργάζεται με την ασθένεια. Η ποικιλία των STRs σπάνια συνεργάζεται με τον φαινότυπο. Όπως και οι STRs έτσι και οι SNPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αναπληρωματικοί δείκτες, αλλά πολλά SNPs έχουν και λειτουργικές συνέπειες αν εντοπίζονται σε κωδικές ή ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου. Για μια πλήρη περιγραφή scan του γονιδιώματος θα ήταν αρκετά 30000 SNPs (Gray I. C. et al 2000).

Τα SNPs είναι παρεκκλίσεις στην αλληλουχία του DNA και περιλαμβάνουν αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο. Για παράδειγμα ένα SNP μπορεί να αλλάξει την αλληλουχία του DNA AAGGCTAA σε ATGGCTAA. Ένα SNP πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον σε ποσοστό 1% στον πληθυσμό. Τα SNPs αντιπροσωπεύουν το 90% όλων των γενετικών παρεκκλίσεων (genetic variants) και λαμβάνουν χώρα κάθε 100 - 300 βάσεις στα $3 \cdot 10^9$ βάσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα SNPs περιλαμβάνουν 4 τύπους αλλαγών C→T (G→A), C→A (G→T), C→G (G→C) και T→A (A→T). Δύο στα τρία SNPs περιλαμβάνουν αντικατάσταση της C με T. Η τυπική συχνότητα που συναντούμε τα SNPs σε δύο ισοδύναμα χρωμοσώματα είναι 1/1000ζβ.

Μπορούν να λάβουν χώρα σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές. Περίπου τα μισά SNPs που είναι σε κωδικές περιοχές προκαλούν αλλαγές σε μη-συνώνυμα κωδικώνια. Άρα υπάρχουν εκατομμύρια αλλαγών σε μοναδικά νουκλεοτίδια μεταξύ δύο ατόμων και περίπου 100000 αλλαγές στα αμινοξέα των πρωτεϊνών τους. Πολλά SNPs δεν επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία, αλλά πιστεύεται ότι κάποια προδιαθέτουν τους ανθρώπους σε ασθένεια ή επηρεάζουν την αντίδραση τους στα φάρμακα. Αν και το 99% του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι το ίδιο στον πληθυσμό, παρεκκλίσεις στην αλληλουχία του DNA μπορούν να έχουν μεγάλη επίδραση στο πως αντιδρά ο άνθρωπος στην ασθένεια, σε περιβαλλοντικές επιρροές, όπως βακτήρια, ιοί, τοξίνες και χημικά και σε φάρμακα ή άλλες θεραπείες.

Τα SNPs είναι εξελικτικά σταθερά (δεν αλλάζουν ιδιαίτερα από γενιά σε γενιά) κανοντάς τα καλά εργαλεία σε πληθυσμιακές μελέτες. Οι επιστήμονες πιστεύουν ότι η χαρτογράφηση των SNPs θα βοηθήσει στον καθορισμό πολλαπλών γονιδίων που συνεργάζονται με πολύπλοκες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, ασθένειες αγγείων. Είναι δύσκολο να καθοριστούν αυτές οι ασθένειες με τις τυπικές μεθόδους gene-hunting γιατί το ένα γονίδιο έχει μικρή εμπλοκή στην ασθένεια.

Τα SNPs δεν προκαλούν τη ασθένεια, αλλά μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό της πιθανότητας να αναπτύξει κάποιος την ασθένεια. Ένα από τα γονίδια που συνεργάζεται με την Alzheimer's η απολιποπρωτεΐνη E ή *ApoE* είναι ένα καλό παράδειγμα για το πώς τα SNPs επηρεάζουν την ανάπτυξη της ασθένειας. Αυτό το γονίδιο περιέχει δύο SNPs που καταλήγουν σε τρία πιθανά αλληλόμορφα γι' αυτό το γονίδιο, το E2, E3 και E4. Κάθε αλληλόμορφο διαφέρει σε ένα νουκλεοτίδιο και η πρωτεΐνη κάθε γονιδίου διαφέρει σε ένα αμινοξύ. Κάθε άτομο κληρονομεί ένα μητρικό αντίγραφο του *ApoE* και ένα πατρικό. Απεδείχθη ότι το άτομο που φέρει ένα τουλάχιστον E4 αλληλόμορφο έχει μεγάλη πιθανότητα να αναπτύξει Alzheimer's. Η αλλαγή σε ένα αμινοξύ στην E4 πρωτεΐνη αλλάζει την δομή και την λειτουργία αρκετά, ώστε να αναπτυχθεί ο φαινότυπος της ασθένειας. Κληρονόμηση του E2 αλληλομόρφου δείχνει ότι το άτομο μάλλον δεν θα αναπτύξει την Alzheimer's.

Βέβαια τα SNPs δεν είναι οι απόλυτοι δείκτες για την ανάπτυξη μιας ασθένειας. Κάποιος που κληρονόμησε το E4 μπορεί να μην αναπτύξει ποτέ Alzheimer's, ενώ αντίθετα αυτός που κληρονόμησε το E2 να νοσήσει από Alzheimer's, γιατί το *ApoE* δεν είναι το μοναδικό γονίδιο που συνδέεται με την Alzheimer's. Η πολυγονιδιακή φύση αυτών των ασθενειών κάνει την γενετική ανάλυση τους τόσο πολύπλοκη.

Το HarMap (Haplotype mapping) πρόγραμμα έχει εντοπίσει 1 εκατομμύριο SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα (με δείγματα από 262 ανθρώπους) από 4 διαφορετικούς πληθυσμούς. Τα περισσότερα SNPs δεν επιδρούν στη λειτουργία των γονιδίων.

Υπάρχει η τεχνική MRS (medical resequencing), όπου τμήματα γονιδίων συγκρίνονται μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων για να ανιχνεύσουν γενετικές αποκλίσεις που μπορεί να συνεργάζονται με μια ασθένεια. Ο στόχος είναι η ανίχνευση γενετικών παρεκκλίσεων στο γενικό πληθυσμό που να μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την λειτουργία του γονιδίου απευθείας. Έτσι δεν θα χρειάζεται να γνωρίζουμε το γενετικό προφίλ των ατόμων που μελετάμε.

Οι πολλές γενετικές παρεκκλίσεις (genetic variants) θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν SNPs που αλλάζουν αμινοξέα στην πρωτεΐνη ή επηρεάζουν το splicing του γονιδίου ή τα επίπεδα έκφρασης. Μερικά από τα λειτουργικά genetic variants που προκαλούν ασθένειες έχουν καταγραφεί ήδη από μελέτες σε μεντελικές μονογονιδιακές ασθένειες (~1700). Αυτές οι ασθένειες είναι σπάνιες (1 στα 10000 ή στα 100000 άτομα) και η συχνότητα των genetic variants στον γενικό πληθυσμό είναι <0.05%). Το HarMap θα βοηθήσει στην ανακάλυψη λειτουργικών γενετικών παρεκκλίσεων που προκαλούν πιο κοινές ασθένειες, όπως καρκίνος, σχιζοφρένεια, καρδιακές παθήσεις. Αυτές οι διαταραχές είναι πολυγονιδιακές και το HarMap λειτουργεί καλύτερα όταν οι λειτουργικές παρεκκλίσεις εμπλέκονται στις ασθένειες αυτές με συχνότητα >5%. Τα σπάνια SNPs ανταποκρίνονται σε πιο συχνές μεντελικές διαταραχές, ενώ τα πιο κοινά SNPs εμπλέκονται σε διαταραχές λιγότερο κοινές (Gray I.C. et al 2000).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 10^6 πολυμορφισμοί και η λιγότερο συχνή μορφή του γονιδίου παρουσιάζεται μια φορά κάθε 100 μορφές. Η γενετική ποικιλία εξηγεί το 40% της ποικιλίας των γενετικών ασθενειών και το 70% για ορισμένες διαταραχές, όπως η σχιζοφρένεια. Η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι οι γενετικές παρεκκλίσεις μας προδιαθέτουν για τις περισσότερες κοινές ασθένειες και τις περισσότερες φορές αυτό γίνεται σε συνεργασία με άλλα γονίδια ή με το περιβάλλον.

Πως θα καθορίσουμε ποιος από τους 10^6 πολυμορφισμούς επηρεάζει την ασθένεια; Ο στόχος του HarMap είναι η ανακάλυψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γενετικών παρεκκλίσεων. Με τη γνώση των πολυμορφισμών μπορούμε να αναπτύξουμε bioinformatics και να κατατάξουμε τους πολυμορφισμούς ανάλογα με την λειτουργικότητα τους π.χ. αν επηρεάζουν την αμινοξική αλληλουχία ή αν

εντοπίζονται σε σπουδαίες χρωμοσωμικές θέσεις, ανάλογα με το βαθμό συντήρησης αυτών των περιοχών (Goldstein D.B. et al 2005).

12.4 Περιγραφή πολυμορφικών δεικτών (STRs και SNPs) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Μετά τον καθορισμό του HD γονιδίου, οι ερευνητές προχώρησαν και στην ταυτοποίηση και άλλων επιπρόσθετων τμημάτων του DNA εντός και εκτός του HD γονιδίου, τα οποία πιθανώς να εμπλέκονται στο μοριακό έλλειμα της νόσου του HD. Μελέτη αυτών των τμημάτων του DNA που χαρακτηρίζεται από πολυμορφισμό, μπορεί να μας δώσει στοιχεία για την απλοτυπική ταυτότητα ασθενών καθώς και φυσιολογικών ατόμων. Αυτά τα τμήματα είναι συνήθως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες βάσεων με μήκος 2-6bp, τα οποία μέσα στον πληθυσμό εμφανίζουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού. Τέτοιου είδους γενετικοί πολυμορφικοί δείκτες (STR: Short Tandem Repeats) είναι πολύ χρήσιμοι για γενετική χαρτογράφηση.

Με χρήση τέτοιων πολυμορφικών δεικτών μπορούμε να προσδιορίσουμε τον απλότυπο φυσιολογικών ατόμων και ασθενών και να βγάλουμε συμπεράσματα για το αν ο παθολογικός φαινότυπος σχετίζεται με τον απλότυπο. Συγκεκριμένα η 4p16.3 περιοχή στην οποία εντάσσεται και το HD γονίδιο είναι μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος. Συγκεκριμένοι απλότυποι φαίνεται ότι προδιαθέτουν στην ανεξήγητη μετάλλαξη της νόσου του Huntington.

Να αναφέρω τα νέα στοιχεία από την NCBI.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλινικές μελέτες

Τα ιστορικά των οικογενειών συλλέχθηκαν από άτομα που είχαν εκδηλώσει την νόσο και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα γενεαλογικά δέντρα. Τόσο τα προσβεβλημένα άτομα όσο και τα άτομα υψηλού κινδύνου για εκδήλωση της νόσου μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν προσωπικά από τον καθηγητή νευρολογίας Κ. Ανδρέα Πλαϊτάκη και τον νευρολόγο- επιμελητή του ΠΑΓΝΗ Κ. Μηνά Τσαγκουρнисάκη. Τα άτομα αυτά υποβλήθηκαν στις κλασικές νευρολογικές εξετάσεις, καθώς και σε αναλυτική εκτίμηση των κινήσεων των ματιών και της νοητικής τους κατάστασης. Η τελευταία εξέταση περιλαμβάνεται στο Mini-Mental State test. Σε μερικούς ασθενείς συλλέχθηκαν και παρατηρήθηκαν CT scans εγκεφάλου ή MRIs. Ο καθορισμός της ηλικίας έναρξης της ασθένειας έγινε μετά από αρκετές συνεντεύξεις με όλους τους συγγενείς πρώτου βαθμού (συζύγους, παιδιά, αδέρφια). Προτιμήθηκαν οι συγγενείς που ζουν την ίδια χρονική περίοδο με τον ασθενή. Ο χρόνος έναρξης της νόσου εκτιμάται όταν γίνονται αντιληπτές οι πρώτες χαρακτηριστικές χορειακές κινήσεις. Σε μερικές περιπτώσεις υπήρξαν δυσκολίες στον καθορισμό της ηλικίας έναρξης της νόσου, λόγω του ότι τα πρώτα συμπτώματα των ασθενών περιλάμβαναν αλλαγές στην προσωπικότητα, κάτι που έχει καταγραφεί και σε άλλες HD μελέτες.

2. Βιολογικό υλικό

Η συλλογή του DNA έγινε από περιφερικό αίμα ατόμων που φέρουν το γονίδιο της χορείας του Huntington, αλλά και από υγιή άτομα.

Αρχικά συλλέχθηκε DNA από μέλη 9 οικογενειών (60 άτομα). Στις οικογένειες αυτές υπάρχουν άτομα που έχουν τη νόσο, άτομα με υψηλό κίνδυνο να εκδηλώσουν την νόσο, αλλά και άτομα υγιή. Οι περισσότερες από τις οικογένειες είναι τριών γενεών. Οι 9 οικογένειες προέρχονται από χωριά με λιγότερους από 1.000 κατοίκους.

Η διάγνωση της νόσου έγινε σύμφωνα με τα κλινικά ευρήματα, αλλά και με ανάλυση του DNA ως προς τον αριθμό των τριπλετών (CAG)_n.

Η επιλογή και η ενασχόληση με αυτές τις οικογένειες έγινε λόγω της ύπαρξης μιας μοναδικής μορφής της νόσου του HD στην Κρήτη. Η ιδιαιτερότητα της έγκειται στο γεγονός ότι η έναρξη της ασθένειας στα άτομα αυτά είναι περί τα 60 χρόνια, δηλαδή περίπου δύο δεκαετίες παραπάνω από την ηλικία έναρξης στην κλασική μορφή της νόσου. Μια σημαντική εστία της νόσου βρίσκεται στην επαρχία Μεραμβέλου του Νομού Λασιθίου (χνγία BP / AM) στο ανατολικότερο μέρος της Κρήτης (οικογένειες BRA, BRC, BRD, BRE, BRF, BRG, AMB). Μια οικογένεια έχει εντοπιστεί και στο χωριό MA (MAN), που βρίσκεται κοντά στο χωριό AM. Ενώ μια οικογένεια έχει εντοπιστεί ΝΔ του νομού Ηρακλείου στο χωριό PE (Sab). Επιπλέον έχουν εντοπιστεί 4 οικογένειες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έναρξη της νόσου στην 3^η ή 4^η δεκαετία της ζωής τους. Οι τρεις οικογένειες υπάρχουν σε γειτονικές γεωγραφικές περιοχές (χωριά AX / TY / KO) στο Νομό Ρεθύμνου, στην περιοχή του Ψηλορείτη (οικογένειες AXH, KOY, και LOU αντίστοιχα), ενώ η τέταρτη (DA) εντοπίζεται στο χωριό ΞΥ, που βρίσκεται γεωγραφικά κοντά με τις περιοχές απ' όπου προέρχονται οι οικογένειες με καθυστερημένη ηλικία έναρξης της νόσου. Αυτή η τελευταία μορφή χαρακτηρίζεται ως κλασική μορφή της νόσου.

Έτσι στην Κρήτη έχουμε: α) οικογένειες με μεγάλη ηλικία έναρξης της νόσου (late onset) (5^η -7^η δεκαετία της ζωής τους), β) οικογένειες με έναρξη της νόσου στην 3^η με 4^η δεκαετία (classic form).

Τα άτομα από τις HD οικογένειες με μεγάλη ηλικία έναρξης (late onset) παρουσιάζουν καλοήθη κλινική πορεία και πολλοί απ' αυτούς έχουν ζήσει μέχρι τα μέσα της 8^{ης} ή και της 9^{ης} δεκαετίας. Επίσης στις οικογένειες αυτές, σε αντίθεση με άλλα περιστατικά της νόσου του HD σε άλλα μέρη της Κρήτης, της Ελλάδας, αλλά και του υπόλοιπου κόσμου, δεν παρατηρούνται περιστατικά με εφηβική ή και νεανική έναρξη της νόσου, αλλά ούτε και το φαινόμενο του "anticipation".

Επίσης υπάρχουν (110) άτομα ελέγχου από τα οποία τα 50 είναι από διαφορετικά μέρη του κόσμου (εκτός Κρήτης) και τα υπόλοιπα 60 έχουν καταγωγή από διάφορες τοποθεσίες της Κρήτης, ώστε να μπορούμε να τα παραλληλίσουμε με τα late onset περιστατικά της νόσου του Huntington στην Κρήτη.

3. Επιλογή πολυμορφικών δεικτών

Επιλογή STRs και SNPs στη μελέτη μας

Η μελέτη μας εντοπίζεται στις περιοχές του γειτνιάζοντος τμήματος του HD γονιδίου (5' και 3' περιοχή), αφού υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η αστάθεια της (CAG)_n επανάληψης σχετίζεται με cis-element στοιχεία (δηλαδή στοιχεία που βρίσκονται στο ίδιο το χρωμόσωμα που φιλοξενεί τη μετάλλαξη). Εντοπισμός και ταυτοποίηση αυτών των ιδιαίτερων τμημάτων θα μας βοηθήσει στον καθορισμό των απλοτύπων τόσο των ασθενών, όσο και των φυσιολογικών ατόμων, δίνοντας παράλληλα φως στο γενετικό υπόβαθρο της ασθένειας.

Συγκεκριμένα στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε ορισμένους πολυμορφικούς δείκτες. Έχουν αναλυθεί 8 εξωγονιδιακοί πολυμορφικοί δείκτες (D4S43, D4S136, D4S127, D4S95, D4S182, D4S126, ADRA2C, D4S3034, D4S431) και 2 ενδογονιδιακοί (Δ2642 και ο D4S1337). Οι περισσότεροι από αυτούς τους δείκτες έχουν υψηλό βαθμό πολυμορφισμού μέσα στον πληθυσμό, πράγμα που επιβεβαιώνεται και στους πληθυσμούς της Κρήτης. Οι εξωγονιδιακοί δείκτες και ο ενδογονιδιακός D4S1337, είναι δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ο Δ2642 αναφέρεται σε μια έλλειψη της τριπλέτας GAG και ο πολυμορφισμός του CAG αναφέρεται στη συγκεκριμένη τρινουκλεοτιδική επανάληψη. Οι δείκτες αυτοί, όπως φαίνεται και από μελέτες και σε άλλους πληθυσμούς, δείχνουν σύνδεση γενετικής ανισορροπίας (ανισορροπία σύνδεσης Linkage disequilibrium) με τη HD νόσο.

Από τους εξωγονιδιακούς δείκτες: οι D4S127, D4S95, D4S182, D4S136, D4S43, βρίσκονται από την πλευρά του γονιδίου, προς το τελομερικό άκρο και με σειρά απόστασης από το γονίδιο. Δηλαδή ο πιο κοντινός είναι ο D4S127 και ο πιο μακρινός, προς την πλευρά του τελομερούς, ο D4S43. Ενώ οι D4S126, ADRA2C, D4S3034, D4S431 βρίσκονται από την πλευρά του γονιδίου προς την κεντρομερική περιοχή. Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, για κάθε STR δείκτη, καθώς και τα αλληλόμορφα που έχουν καταγραφεί στο γενικό πληθυσμό, αναφέρονται στο ίδιο κεφάλαιο στην παράγραφο 11. Η επιλογή των STRs και SNPs έγινε από τις βάσεις δεδομένων που αναφέρονται στην παράγραφο 13 του ίδιου κεφαλαίου, με βάση την παρατηρούμενη ετεροζυγωτία στον πληθυσμό.

4. Απομόνωση DNA

4.1 Προετοιμασία λευκοκυττάρων από περιφερικό αίμα

1. Συλλέγουμε 20ml περιφερικού αίματος από υγιή άτομα και από άτομα που φέρουν τη νόσο.

Το αίμα συλλέγεται με ειδικές σύριγγες. Τα εσωτερικά τοιχώματα κάθε σύριγγας έχουν επιστρωθεί με ηπαρίνη και ακόλουθα χρησιμοποιούνται για τη συλλογή του αίματος. Η ηπαρίνη χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό του αίματος.

2. Στα 20ml αίματος προσθέτουμε 5-6ml Δεξτράνη 6% σε φυσιολογικό ορό (Macrodex). Η αναλογία αίματος προς Δεξτράνη πρέπει να είναι 4 : 1. Αναδεύουμε τη σύριγγα και έπειτα την αφήνουμε ανάποδα περίπου για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να διαχωριστούν τα λευκοκύτταρα από τα ερυθροκύτταρα.

Κατά τον διαχωρισμό δημιουργούνται δύο φάσεις και μια πιθανή ενδιάμεση. Στην πάνω φάση υπάρχει το πλάσμα μαζί με λευκοκύτταρα. Στην ενδιάμεση φάση συσσωρεύονται κυρίως λευκοκύτταρα. (Όσο περισσότερη ώρα αφήσουμε τη σύριγγα με τη δεξτράνη, τόσο μεγαλύτερη γίνεται η ενδιάμεση φάση). Στην κατώτερη φάση υπάρχουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

3. Καθώς η σύριγγα είναι σε κάθετη θέση και ανάποδα λυγίζουμε προσεκτικά τη βελόνα ή ενώνουμε την κορυφή της σύριγγας με μια πεταλούδα και πιέζουμε τη σύριγγα σταδιακά. Έτσι μεταφέρουμε τα λευκοκύτταρα από την πάνω φάση και από την ενδιάμεση σε πλαστικό σωληνάριο των 50ml.

4. Φυγοκεντρούμε τα λευκοκύτταρα στις 2.000 στροφές x 10 λεπτά στους 4°C.

5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο διάλυμα και κρατάμε την πελλέτα των λευκοκυττάρων. Επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 2ml 0,87% χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl) με πιπέτα pasteur.

Το χλωριούχο αμμώνιο βοηθάει στη λύση των ερυθροκυττάρων που τυχόν έχουν αναμιχθεί με τα λευκοκύτταρα.

6. Αφήνουμε τα επαναδιαλυμένα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Φυγοκεντρούμε ξανά για 10 λεπτά x 2000 στροφές και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Τα λευκοκύτταρα μπορούν να φυλαχτούν σ' αυτό το στάδιο στους - 20°C.

4.2 Εξαγωγή DNA από λευκοκύτταρα

1. Επαναδιαλύουμε την πελλέτα των λευκοκυττάρων σε 5 ml διαλύματος TSE και προσθέτουμε SDS σε τελική συγκέντρωση 1% και πρωτεΐνωση K σε τελική συγκέντρωση 100μg /ml.

2. Το μίγμα μας επωάζεται σε υδατόλουτρο με 65°C για 30 λεπτά.

Το SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) είναι μία απορρυπαντική ουσία που βοηθάει στο σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ η πρωτεΐνωση K είναι μια πρωτεάση με υψηλή ενεργότητα, που απομονώνεται από το *Tritirachium album liber* (mold) και χρησιμοποιείται για την καταστροφή των πρωτεϊνών των κυττάρων. Μετά την επώαση θα έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα το γενωμικό DNA.

3. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και αναδεύουμε με αργές κινήσεις, ώστε να αποφύγουμε τα σπασίματα του γνομικού DNA για 5 λεπτά. Φυγοκεντρούμε σε 2.000 στροφές x 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά τη φυγοκέντρωση πρέπει να δούμε δύο φάσεις. Η κάτω φάση περιέχει τη φαινόλη, μαζί με πρωτεΐνες (οργανική φάση), ενώ η πάνω περιέχει το DNA. Επειδή η πάνω φάση που περιέχει το DNA έχει υψηλό ιξώδες, την αφαιρούμε προσεκτικά με πιπέτα pasteur, η οποία πριν έχει φτιαχτεί, έτσι ώστε το στόμιο της να είναι μεγάλο και λείο, για να αποφευχθούν σπασίματα στο DNA.

4. Προσθέτουμε πάλι ίσο όγκο από το μίγμα φαινόλης-χλωροφόρμιο-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία (25:24:1) και επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση και την αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος όπως και παραπάνω.

5. Προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης στο διάλυμα του DNA και επαναλαμβάνουμε όπως και πριν.

Το χλωροφόρμιο βοηθάει στην απομάκρυνση της φαινόλης από το διάλυμα του DNA.

6. Στο τελικό δάλυμα του DNA που έχει περάσει τον καθαρισμό από φαινόλη-χλωροφόρμιο προσθέτουμε, 2,5 όγκους παγωμένη αιθανόλη και 1/10 του όγκου 3M οξικό νάτριο (CH₃COONa), pH=5,4. Αναδεύουμε το διάλυμα για λίγα λεπτά.

7. Φυγοκεντρούμε στις 3000 στροφές x 30 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα προσεκτικά και ξεπλένουμε την πελλέτα μας με 70% αιθανόλη.

8. Επαναδιαλύουμε την πελλέτα του DNA σε 3-5 ml διαλύματος T.E., pH=8.00 και αφήνουμε το DNA να επαναδιαλυθεί 12-24 ώρες στους 4°C.

Η επαναδιάλυση μεγάλου μοριακού βάρους DNA, όπως είναι το γενωμικό, καθυστερεί λόγω του μεγάλου μεγέθους, της πολυπλοκότητας του και της πιθανής σύζευξής του με άλλα βιολογικά μόρια (πρωτεΐνες).

9. Στο επαναδιαλυμένο DNA προσθέτουμε παγκρεατική RNase σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και επωάζουμε το διάλυμα στους 37°C για 30 λεπτά..

10. Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο x 3 φορές, όπως τα προηγούμενα βήματα και τελική κατακρύμνιση του DNA με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH₃COONa. Αναδεύουμε ήπια, ώσπου να δούμε το DNA να συσσωματώνεται και να δημιουργεί τελικά ένα είδος σχοινιού. Η δημιουργία αυτού του σχοινιού σημαίνει ότι το DNA που απομονώσαμε είναι ενιαίο (intact) και δεν έχει σπασίματα.

11. Συλλέγουμε το « σχοινί » που έχει σχηματίσει το DNA με πιπέτα pasteur. Η πιπέτα φτιάχνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε στην άκρη της να σχηματιστεί ένα σχήμα (U) και έτσι να “ψαρέψουμε” το σχοινί του DNA, από το διάλυμα αιθανόλης-αλατιού.

12. Αφήνουμε το DNA να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου από την αιθανόλη και το επαναδιαλύουμε σε 1-3 ml διαλύματος T.E., pH=8.00. Η επαναδιάλυση πραγματοποιείται στους 4°C από 12-16 ώρες.

4.3 Παρασκευή διαλυμάτων:

Πρωτεΐνάση K

stock solution 20mg/ml σε νερό και φυλάσσεται στους -20°C.

Παγκρεατική RNase A

stock solution 10mg/ml σε 10mM TrisHCl (pH=7,5) και
15mM NaCl

και φυλάσσεται στους -20°C.

EDTA (Disodium ethylenediaminetetra acetate.2 H₂O)

0,5M, pH=8.00. Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν χρησιμοποιηθεί σε κλίβανο.

T.E. διάλυμα, pH=8.00

10mM TrisHCl, pH=8.00

1mM EDTA, pH=8.00

TSE διάλυμα

150mM NaCl

100mM EDTA, pH=8.00

20mM TrisHCl pH=8.00

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε κλίβανο.

Φαινόλη pH=7.00

1) Η φαινόλη είναι σε κρυσταλλική μορφή και την διαλυτοποιούμε βάζοντας το μπουκάλι στους 65 °C.

2) Όταν λιώσει, προσθέτουμε 1γρ. 8-υδροξυκινολίνη. Η ουσία αυτή δίνει το κίτρινο χρώμα στη φαινόλη και παρεμποδίζει την οξείδωση της. Επιπλέον είναι και μερικώς, αναστολέας της RNase. Αναδεύουμε καλά.

3) Προσθέτουμε 1lt TrisHCl 1M, pH=8.00. Αναδεύουμε καλά και αφήνουμε το μίγμα στους 4 °C, ώσπου να διαχωριστούν οι φάσεις.

4) Πετάμε την πάνω φάση και προσθέτουμε 1lt 100mM TrisHCl pH=8.00. Αναδεύουμε καλά και περιμένουμε να διαχωριστούν οι φάσεις. Αφαιρούμε την πάνω φάση. Η φαινόλη μας τώρα πρέπει να έχει pH=7.00.

5) Προσθέτουμε 200ml T.E. διάλυμα, pH=8.00 για να προστατέψουμε την φαινόλη από οξείδωση. Φυλάσσεται στους 4 °C.

Όλα τα βήματα που απαιτούνται για την παρασκευή της φαινόλης πρέπει να γίνονται προσεκτικά και με όλα τα προστατευτικά μέσα, γιατί η φαινόλη είναι μια πολύ τοξική οργανική ουσία..

5. Ποσοτικοποίηση του DNA

Για να υπολογίσουμε την ποσότητα του DNA που τελικά απομονώσαμε μπορούμε να ακολουθήσουμε δύο διαδικασίες.

5.1 Με τη βοήθεια του σπεκτροφωτόμετρου

Σε 995ml νερού προσθέτουμε 5ml DNA. Η μέτρηση του DNA στηρίζεται στην απορρόφηση της ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος από το διάλυμα μας. Έτσι μετράμε τελικά την οπτική πυκνότητα του εκάστοτε διαλύματος. Το DNA μετριέται σε μήκος κύματος 260 nm.

ι) Σε ειδική κυψελίδα του 1ml βάζουμε καθαρό νερό και μηδενίζουμε το φωτόμετρο.

ιι) Τοποθετούμε στην κυψελίδα το DNA μας και καταγράφουμε την O.D. στα 260 nm.

ιιι) Η μέτρηση επαναλαμβάνεται στα 280 nm, μήκος κύματος που απορροφάει το RNA.

Υπολογίζουμε την αναλογία των τιμών 260nm/280nm, η οποία πρέπει να κυμαίνεται κοντά στο 2. Αν αυτός ο λόγος είναι μεταξύ 1,8-2, τότε το δείγμα μας περιέχει καθαρό DNA. Αν ο λόγος έχει τιμή <1,7, τότε σημαίνει ότι το DNA έχει προσμίξεις από πρωτεΐνες, υπολείμματα φαινόλης ή άλλες ουσίες που απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία..

Συσχέτιση O.D. και συγκέντρωσης DNA

	Μήκος κύματος	1 O.D.αντιστοιχεί σε
DNA	260nm	Δίκλωνο 50μg/ml
		Μονόκλωνο 40μg/ml
RNA	280 nm	40μg/ml
Ολιγονουκλεοτίδια	260 nm	33μg/ml

5.2 Με τη βοήθεια πηκτώματος αγαρόζης.

Σε πήκτωμα αγαρόζης 1% τρέχουμε συγκεκριμένη ποσότητα από τα δείγματα DNA , παράλληλα με έναν γνωστό μεγαλομοριακό δείκτη DNA γνωστής συγκέντρωσης ή κάποιο άλλο γνωστό γενωμικό DNA.

Επειδή το ανθρώπινο γενωμικό DNA είναι μεγαλομοριακό, το αφήνουμε να τρέξει κατά τη διάρκεια της νύχτας σε χαμηλά Volts. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα τόσο για την ποσότητα, όσο και για την ποιότητα του DNA μας (αν δηλαδή είναι συνεχές ή αποδιαταγμένο), όπως επίσης και για τον βαθμό πρόσμιξης με RNA.

6. Αναπαραγωγή τμημάτων DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)-Polymerase Chain Reaction.

Για την αναπαραγωγή τμημάτων DNA από το ανθρώπινο γενωμικό DNA, χρησιμοποιούμε τη μέθοδο του PCR – αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού.

Η μέθοδος του PCR στηρίζεται α) στο σχηματισμό των κατάλληλων εκκινητών στην περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει – πολυμορφικού δείκτη -. β) Στον πολλαπλασιασμό-πολυμερισμό της περιοχής του DNA που μας ενδιαφέρει υπό κατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες σε ειδική PCR συσκευή (Θερμικός κυκλοποιητής).

Τύποι PCR συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν: PERKIN ELMER 9600 και UnoThermoblock- BIOMETRA.

Οι συνθήκες του PCR που ακολουθούμε, διαφέρουν, ανάλογα με τον πολυμορφικό δείκτη που μελετάμε κάθε φορά.

6.1 Ραδιενεργή σήμανση ολιγονουκλεοτιδίων - εκκινητών με T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση.

Η T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση, καταλύει τη μεταφορά του τελευταίου (γ) φωσφορικού οξέος (φωσφόρου) του ATP στο 5' ύδροξυ-άκρο του DNA ή του RNA. Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και αποτελεί και τη βασική μέθοδο για σήμανση του 5' άκρου ή για φωσφορυλίωση ολιγονουκλεοτιδίων.

50-100ng	DNA/ολιγονουκλεοτίδιο	
	1x	10x T ₄ polynucleotide kinase buffer
	20 units	kinase (10units/μl)
	2λ	[γ ³² P] ATP [800μCi/ml]
	+H ₂ O	
<hr/>		
	V _{τελ.} = 50λ	

Αφήνουμε την αντίδραση μας στους 37 °C για 45-60 λεπτά. Προσθέτουμε στην αντίδραση μας 50λ H₂O και την περνάμε από κολώνα χρωματογραφίας (Sephadex-G-25), ώστε να διαχωριστούν το σημασμένο DNA από τα μη-ενσωματωμένα ραδιενεργά ισότοπα.

Από την τελική αντίδραση παίρνουμε 1λ, το τοποθετούμε σε ειδικά φίλτρα Whatman (GF/C), (Glass Microfibre Filters) 21mm και μετράμε σε ειδικό μετρητή κρούσεων την ειδική ενεργότητα του σημασμένου DNA μας.

kinase: 10units/λ

10x polynucleotide kinase buffer, pH=7,6: 0,1 M MgCl₂

0,7 M TrisHCl (pH=7,4)

50mM DTT, (RNase free)

6.2 Κατασκευή κολώνας χρωματογραφίας SEPHANDEX-G-25

Διαλύουμε ~ 10gr G-25 σε 150ml H₂O και αναδεύουμε καλά. Όταν διαχωριστούν το νερό από την ρητίνη, το αφαιρούμε και επαναλαμβάνουμε τα ξέπλυμα 2-3 φορές. Στο τελευταίο ξέπλυμα προσθέτουμε αντί για νερό, διάλυμα T.E. pH = 7,6 και αποστειρώνουμε το διάλυμα. Το διάλυμα της ρητίνης φυλάσσεται στους 4 °C.

Ετοιμάζουμε μια σύριγγα ινσουλίνης (1ml) να δεχτεί την διαλυμένη ρητίνη ως εξής:

Στο κάτω μέρος της σύριγγας τοποθετούμε ένα στρώμα glass wool (1cm). Αναδεύουμε το διάλυμα της ρητίνης (G-25) και με πιπέτα pasteur βάζουμε σταδιακά το διάλυμα από την κορυφή της σύριγγας, με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα. Η σύριγγα είναι τοποθετημένη σε κάθετη θέση, ώστε να διαφεύγει η περίσσεια νερού από την κάτω πλευρά.

Φυγοκεντρούμε την κολώνα μας στις 2.000 στροφές x 5 λεπτά, ώστε η κολώνα μας να πακεταριστεί. Η κολώνα μας δεν πρέπει να πακεταριστεί ούτε πολύ γρήγορα (tightly) ούτε πολύ αργά (loosely).

Μετά τη φυγοκέντρηση έχει απομακρυνθεί η περίσσεια του νερού και η κολώνα μας είναι έτοιμη να δεχτεί τα σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια. Για τον καθαρισμό των ραδιενεργά σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων ακολουθούμε τις ίδιες συνθήκες φυγοκέντρησης με τις οποίες ξεκινήσαμε από την αρχή της κατασκευής της κολώνας.

Κατά την φυγοκέντρηση του ραδιενεργού μας δείγματος συλλέγουμε το σημασμένο DNA σε ειδικό σωληνάριο, που έχουμε τοποθετήσει στη βάση της κολώνας. Την κολώνα με όλα τα υπόλοιπα ραδιενεργά την πετάμε προσεκτικά στα ραδιενεργά απόβλητα.

6.3 Μέτρηση ραδιενεργής ενεργότητας των ιχνηθετημένων μορίων DNA

→ Σε ένα στρογγυλό φίλτρο GF/C τοποθετούμε 1 σταγόνα του σημασμένου προϊόντος (~ 1μλ) και 2μλ από ένα DNA φορέα (συνήθως Hyring sperm DNA).

→ Στεγνώνουμε το φίλτρο στον αέρα.

→ Τοποθετούμε το φίλτρο σε ειδικό δοχείο και το αφήνουμε μέσα σε 10% TCA (Trichloroacetic acid) για 5 λεπτά. Επαναλαμβάνουμε 2 φορές.

→ Ξεπλένουμε το φίλτρο μας 2 φορές x 5 λεπτά με ακετόνη.

→ Στεγνώνουμε το φίλτρο στον αέρα.

→ Το φίλτρο τοποθετείται σε ειδικά πλαστικά μπουκαλάκια σπινθηρισμού και τα μετράμε στο ειδικό μηχάνημα μέτρησης κρούσεων.

6.4 Υπολογισμός θερμοκρασίας λιώσιματος (melting) των εκκινητών

Σ' αυτή την θερμοκρασία ο εκκινητής μας ή οποιοδήποτε άλλο ολιγονουκλεοτίδιο είναι ικανό να υβριδοποιηθεί με το DNA που εμείς έχουμε επιλέξει και με το οποίο υπάρχει η απαραίτητη συμπληρωματικότητα. Η θερμοκρασία λιώσιματος των εκκινητών μας είναι απαραίτητη να την γνωρίζουμε, γιατί σ' αυτή, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με το αντίστοιχο DNA και μπορεί να παραχθεί τελικά το προϊόν στην αντίδραση PCR.

Η T_m υπολογίζεται ως εξής:

$$T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log [J^+]) + 0,41 (\text{fraction G+C}) - 600/L$$

$[J^+]$ → συγκέντρωση μονοσθενών κατιόντων

L → μήκος ολιγονουκλεοτιδίου (σε nts)

fraction G+C → ποσοστό των G+C του εκκινητή

Απλουστευμένος τύπος:

$$T_m = [4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{G+C})] + [2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{A+T})]$$

7. Συνθήκες PCR

7.1. Συνθήκες PCR για την CAG επανάληψη

Καθορισμός του μεγέθους της CAG επανάληψης

Τα χρωμοσώματα ελέγχθηκαν για την HD μετάλλαξη (CAG επανάληψη) με PCR amplification με τις συνθήκες που καθορίζονται από τους Riess et.al. (1993). PCR για την τρινουκλεοτιδική επανάληψη (CAG)n του γονιδίου της νόσου του Huntington.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

IT15p1: 5'-ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC-3' (30nts)

$$T_m = [4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{G+C})] + [2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{A+T})] = (4 \times 16) + (2 \times 14) = 92 \text{ }^\circ\text{C}$$

IT15p2: 5'-AAACTCACGGTCGGTGCAGCGGCTCCTCAG-3' (30nts)

$$T_m = [4 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{G+C})] + [2 \text{ }^\circ\text{C} \times (\text{A+T})] = (4 \times 19) + (2 \times 11) = 98 \text{ }^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

	94 °C	1,5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
40 κύκλοι	{	94 °C	1 λεπτό	αποδιάταξη
		60 °C	1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C	2 λεπτά	επιμήκυνση
		72 °C	10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 50ng-500ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 5μg, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,2mM, DMSO: 10%, Perfect match: 0,1λ(1units/μl), Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1,25 units και α³² P dCTP: 3.0μCi / αντίδραση.

Ενναλλακτικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε PCR για την τρινουκλεοτιδική επανάληψη (CAG)_n του γονιδίου της νόσου του Huntington.

Οι νέοι εκκινητές Hu1 και Hu2 που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση δίδουν μικρότερο PCR προϊόν από τους προηγούμενους

Hu3 (as): 5'- GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA - 3' (21nts)

$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 14) + (2 \times 7) = 70^{\circ}\text{C}$

Hu4 (s): 5' – ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAA – 3' (26nts)

$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 13) + (2 \times 13) = 78^{\circ}\text{C}$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

30 κύκλοι	{	94 °C 2 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		52 °C 1,5 λεπτά	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1,5 λεπτά	επιμήκυνση
		72 °C 5 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 100ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 250μM, από κάθε εκκινητή: (150ng) 20pmoles, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,8mM, DMSO: 5%, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0.8 units (5units/μl), και ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (Hu3(as)): 35ng (~ 130.000 κρούσεις α³² P dCTP: 1μCi / αντίδραση.

Όλοι οι HD ασθενείς ήταν ετερόζυγοι για την μετάλλαξη.

7.2 Συνθήκες PCR για τους πολυμορφικούς δείκτες (STRs)

Οι εκκινητές για όλους τους δείκτες φαίνονται στον **πίνακα 1**.

7.2.1 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S3038 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S3038/1: 5' – GAAGACCAGCATTCGG – 3'

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 9) + (2 \times 7) = 50^\circ\text{C}$$

D4S3038/2: 5' – GGTTTAATACACAGTAATTGTTCA – 3'

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 7) + (2 \times 17) = 62^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	{	94 °C 5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		55 °C 45 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C 10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 10 μ l και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200 μ M, από τον φθορίζων και τον μη-φθορίζων εκκινητή: 1pmole, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,5mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1unit (5units/ μ l).

7.2.2 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S43 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S43/1: 5' -CTTCCTTTTCTCTCTGGATGC- 3' (21nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 10) + (2 \times 11) = 62^\circ\text{C}$$

D4S43/2: 5' -ACATCACGCTTATCTTTGGGG-3' (21nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 10) + (2 \times 11) = 62^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

30 κύκλοι	94 °C	4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
	94 °C	30 δευτερόλεπτα	αποδιάταξη
	57 °C	30 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
	72 °C	1 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C	2 λεπτό	τελική επιμήκυνση
	4 °C	Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 100ng/αντίδραση, MgCl₂: 1,5mM, Taq polymerase buffer: 1x, BSA (Bovine Serum Albumin): 100μg/μl, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0,5 units και ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (D4S43/2): 65ng (~ 105.000 κρούσεις).

7.2.3 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S136 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S136/1: 5' -CTGACTTGATCCAATCCAAAGGAAAG- 3' (26nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 11) + (2 \times 15) = 74^{\circ}\text{C}$$

D4S136/2: 5' -TTGAACCTAGTAGGCGGAAGTTGCAC -3' (26nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 13) + (2 \times 13) = 78^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C	4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
	94 °C	1 λεπτό	αποδιάταξη
	60 °C	30 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
	72 °C	1 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C	2 λεπτό	τελική επιμήκυνση
	4 °C	Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 18pmoles (150ng), Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,5mM, BSA (Bovine Serum Albumin): 100μg/ml, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1 unit και τον ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (D4S136/1): 9pmoles (75ng) (~ 115.000 κρούσεις).

7.2.4 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S182 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S182/1: 5' -GGATCCAATCCAAAGGAAAGTTCC- 3' (24nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 11) + (2 \times 13) = 70^\circ\text{C}$$

D4S182/2: 5' -TTTTTCTCCCCCATGACACCATG -3' (24nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 12) + (2 \times 12) = 72^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C 4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
	94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
	58 °C 1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
	72 °C 1,5 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C 10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
	4 °C παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 250μM, από κάθε εκκινητή: 13pmoles (100ng), Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,2mM, Triton-X-100: 0,1%, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1,25 units και ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (D4S182/1): 35ng (~ 130.000 κρούσεις).

7.2.5 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S127 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S127/DI1 5' -CCTCTGTTTGCAATCCATTT- 3' (20nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 8) + (2 \times 12) = 56^\circ\text{C}$$

D4S127/DI2 5' -GTCCCTTGCATGCCCTGGCT- 3' (20nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 13) + (2 \times 7) = 66^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C 4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
	94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
	55 °C 30 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
	72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C 2 λεπτά	τελική επιμήκυνση
	4 °C Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 250μM, από κάθε εκκινητή: 10pmoles (66ng), TrisHCl pH=8,9: 67mM, MgCl₂: 2mM, (NH₄)₂SO₄: 16,6mM, β-mercaptoethanol: 10mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0,25 units και ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (D4S127/1): 15pmoles (~ 110.000 κρούσεις).

7.2.6 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S95

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S95 (1): 5' -GCATAAAATGGGGATAACAGTAC- 3' (23nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 9) + (2 \times 14) = 64^\circ\text{C}$$

D4S95 (2): 5' -GACATTGCTTTATAGCTGTGCCTCAGTTT- 3' (29nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 12) + (2 \times 17) = 82^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C	5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
	{	94 °C	1 λεπτό	αποδιάταξη
		60 °C	1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C	2 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C	10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 1μg, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 20pmoles (~150ng), Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1,5mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0,25 units.

Τα προϊόντα του PCR αναλύθηκαν σε gel αγαρόζης 1.5%.

7.2.7 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη Δ2642 (Τρινουκλεοτιδική έλλειψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

Δ1: 5' -GCTGGGGAACAGCATCACACCC- 3' (22nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 14) + (2 \times 8) = 72^{\circ}\text{C}$$

Δ2: 5' -CCTGGAGTTGACTGGAGACGTG -3' (22nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 13) + (2 \times 9) = 70^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C	4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
	{	94 °C	1 λεπτό	αποδιάταξη
		58 °C	1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C	1 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C	2 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 250μM, από κάθε εκκινητή: 10pmoles (~75ng), Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 2mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0,25 units και τον ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή Δ1: 7,5pmoles (~ 117.000 κρούσεις).

7.2.8 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S1337

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S1337-F: 5' -ATGTGGCAGAAGTGCTCTTTGTG- 3' (23nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 12) + (2 \times 11) = 70^{\circ}\text{C}$$

D4S1337-R: 5' - AACAACCAGCAGGTGACTATCAG -3' (23nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 12) + (2 \times 11) = 70^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C	5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
	{	94 °C	1 λεπτό	αποδιάταξη
		62 °C	40 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C	1 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C	3,5 λεπτά	τελική επιμήκυνση	
	4 °C	Παύση		

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από τον φθορίζων και τον μη-φθορίζων εκκινητή: 1pmole, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 2,5mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 0,25.

7.2.9 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S180

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S180/1: 5' - CACATCTTCCTGTTTCTTTGAACATC - 3' (26nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 10) + (2 \times 16) = 72^{\circ}\text{C}$$

D4S180/2: 5' - GAGAGACCCCAGAGTCCAGCAG -3' (21nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 14) + (2 \times 7) = 70^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C 4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
	{	94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		58 °C 1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
	72 °C 2 λεπτά	τελική επιμήκυνση	
	4 °C Παύση		

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 250μM, από κάθε εκκινητή: 10pmoles, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 1.5mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1,25 units και τον ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή D4S180/1: 8pmoles (~ 120.000 κρούσεις).

7.2.10 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S3034 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S3034/F: 5' – CTGCCAATAAACTGGGT – 3' (17nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 8) + (2 \times 9) = 50^{\circ}\text{C}$$

D4S3034/R: 5' – TTGCTCACCAAAGAGGTT – 3'

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 8) + (2 \times 10) = 52^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	94 °C 5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη	
	{	94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		55 °C 45 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση

72 °C	10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
4 °C	παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 10λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από τον φθορίζων και τον μη-φθορίζων εκκινητή: 1pmole, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 2mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1unit (5units/μl).

7.2.11 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S126 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S126/1: 5' -GGATCCTGTCACCTGTACTCCAGCC- 3' (24nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 14) + (2 \times 10) = 76^\circ\text{C}$$

D4S126/2: 5' -TGCTTAACCAGTTTGACCATGAGG -3' (24nts)

$$T_m = [4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 11) + (2 \times 13) = 70^\circ\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	{	94 °C	5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C	30 δευτερόλεπτα	αποδιάταξη
		57 °C	30 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C	1,5 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C	3 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	Παύση	

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 150ng, TrisHCl pH=8,9: 10mM, MgCl₂: 1,5mM, KCl: 50mM, Triton-X-100: 0,1%, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1,25 units και τον ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (D4S126/1): 30ng (~ 130.000 κρούσεις/αντίδραση).

7.2.12 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη ADRA2C

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

ADRA2C PCR1: 5' – CGCTGCCTCCCTTCCACCTGTTG – 3' (23nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 159) + (2 \times 8) = 76^{\circ}\text{C}$$

ADRA2C PCR2: 5' – AGTGGGCAGGGCGGGGCAGGT– 3' (21nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 16) + (2 \times 5) = 74^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	{	94 °C 4 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		68 °C 1 λεπτό	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C 5 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 25λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από κάθε εκκινητή: 150ng, MgCl₂: 1,5mM, Taq polymerase buffer: 1x, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1 unit και τον ραδιενεργά σημασμένο εκκινητή (ADRA2C/PCR1): 30λ (~ 120.000 κρούσεις/αντίδραση).

7.2.13 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S2925

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S2925/F: 5' – TCAGAAACCCCTACAGGAAA – 3' (20nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 9) + (2 \times 11) = 58^{\circ}\text{C}$$

D4S2925/R: 5' – TTTGATGAGTTATTCGGAGG – 3' (17nts)

$$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 8) + (2 \times 12) = 56^{\circ}\text{C}$$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	{	94 °C 5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		55 °C 45 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C 10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 10λ και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200μM, από τον φθορίζων και τον μη-φθορίζων εκκινητή: 1pmole, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 2mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1unit (5units/μl).

7.2.14 PCR για τον πολυμορφικό δείκτη D4S431 (Δινουκλεοτιδική επανάληψη)

Εκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση:

D4S431/F: 5' – AGGCATACTAGGCCGTATT – 3' (19nts)

$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 9) + (2 \times 10) = 56^{\circ}\text{C}$

D4S431/R: 5' – TTCCCATCAGCGTCTTC – 3' (17nts)

$T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})] + [2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})] = (4 \times 9) + (2 \times 8) = 54^{\circ}\text{C}$

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

35 κύκλοι	{	94 °C 5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		55 °C 45 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1 λεπτό	επιμήκυνση
		72 °C 10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 10 μ l και περιέχει:

DNA: 20ng, από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 200 μ M, από τον φθορίζων και τον μη-φθορίζων εκκινητή: 1pmole, Taq polymerase buffer: 1x, MgCl₂: 2mM, Taq polymerase (Amplitaq-Cetus): 1unit (5units/ μ l).

8. Επεξεργασία προϊόντων PCR

Τα προϊόντα μας μετά από την PCR αντίδραση μπορούν να αναλυθούν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για προσδιορισμό του μεγέθους του προϊόντος σε σύγκριση με γνωστό μεγαλομοριακό δείκτη.

Για πιο λεπτομερειακή μελέτη αναλύουμε τα προϊόντα μας σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% + 0,5X TBE. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος των αλληλομόρφων σε σύγκριση με τη γνωστή αλληλουχία του φάγου M13mp18. Η αντίδραση sequencing του φάγου M13mp18 ηλεκτροφορεύεται παράλληλα με τις PCR αντιδράσεις για περίπου 2,5 ώρες.

8.1 Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2%

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πλένεται και παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης σε ειδική θήκη

Πήκτωμα αγαρόζης όγκου 100ml και περιεκτικότητας 2% σε αγαρόζη χρειαζόμαστε:

2 gr αγαρόζης

100 ml TBE (1x)

3 λ EtBr (10mg/ml)

Το μίγμα της αγαρόζης τοποθετείται σε φούρνο, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται προσεκτικά σε ειδική συσκευή (καλούπι) με τα κατάλληλα χτενάκια και αφήνεται να πήξει. Όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο, τοποθετείται μαζί με το καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία πριν έχουμε βάλει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE). Προσεκτικά αφαιρούμε τα χτένια. Στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί τοποθετούμε τον όγκο του δείγματος μας. Τα δείγματα μας πριν αναλυθούν στο πήκτωμα αγαρόζης αναμιγνύονται με 1-2 λ loading buffer. Το loading buffer

χρησιμοποιείται για να παραμείνουν τα δείγματα μέσα στα πηγαδάκια και να μην διαχυθούν καθώς και για να είναι ορατά, όσο περνάει το ρεύμα. Τα δείγματα του DNA ηλεκτροφορούνται περίπου για 1 ώρα στα 100 volts.

8.1.1 Επεξεργασία πηκτώματος αгарόζης

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση παρατηρούμε το πήκτωμα σε ειδική φωτογραφική συσκευή (Gel documentation system). Το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε τζάμι από το οποίο εκπέμπεται υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Το βρωμιούχο αιθύδιο που υπάρχει στο πήκτωμα προσδένεται στο DNA και κάτω από τη δράση της UV ακτινοβολίας γίνονται ορατές σε ειδική οθόνη τα τμήματα του DNA. Η εικόνα του πηκτώματος με το DNA μπορεί να αποτυπωθεί σε ειδικό φωτογραφικό χαρτί.

8.2. Προετοιμασία πηκτώματος ακρυλαμίδης 6%

Αρχικά προετοιμάζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δύο τζάμια πλένονται πολύ καλά με απορρυπαντικό και νερό και ξεπλένονται επίσης πολύ καλά. Το ένα από τα δύο τζάμια καλύπτεται στην εσωτερική πλευρά με ένα στρώμα σιλικόνης (Repel-Selane-ES). Το σιλικοναρισμένο τζάμι είναι αυτό που έρχεται σε επαφή με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη, ώστε όταν απομονώσουμε το πήκτωμα στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, αυτό να απομονωθεί πλήρως από το σιλικοναρισμένο τζάμι και να μείνει στο δεύτερο.

Πριν συναρμολογήσουμε τη συσκευή πλένουμε τελικώς τα τζάμια με απεσταγμένο νερό και με αιθανόλη, ώστε η επιφάνεια τους να είναι απολύτως καθαρή και στιλπνή. Ανάμεσα στα δύο τζάμια, στα δύο τους άκρα, δεξιά και αριστερά τοποθετούμε (spacers) πάχους 0,4 mm. Κλείνουμε τα τζάμια και τα ακινητοποιούμε – τα περισφίγγουμε – με ειδικούς συσφιγκτήρες στα άκρα και στη βάση τους. Η συσκευή μας τώρα, είναι έτοιμη για να δεχτεί το πήκτωμα ακρυλαμίδης.

(Η προετοιμασία της ηλεκτροφορητικής συσκευής γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας (BIORAD).

Για 100ml 6% πηκτώματος ακρυλαμίδης χρειαζόμαστε:

22,5 ml διάλυμα ακρυλαμίδης (38:2)

7,5 ml TBE διάλυμα 10 x

..... ml ουρίας

ml H₂O

V_{τελ.} = 150ml

Το διάλυμα του πηκτώματος το φιλτράρουμε από φίλτρο Whatman : 125mm. Το φιλτραρισμένο διάλυμα το τοποθετούμε σε πάγο και προσθέτουμε τις πηκτικές ουσίες: 150λ TEMED (N,N,N,N – tetramethylethylen – diamin) και 240λ APS (20%) (Ammonium persulfate 98%).

Αναδεύουμε καλά το μίγμα και το ρίχνουμε με γυάλινη πιπέτα ή με σύριγγα ανάμεσα στα δύο τζάμια. Τα τζάμια πρέπει να είναι υπό γωνία 45° και να ρίχνουμε το πήκτωμα αργά, ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα, οι οποίες είναι δύσκολο να απομακρυνθούν. Σ' αυτό το σημείο οι κινήσεις μας πρέπει να είναι γρήγορες, γιατί το πήκτωμα μπορεί να πήξει πριν το ρίξουμε στη συσκευή. Μόλις ρίξουμε το πήκτωμα, τοποθετούμε στην πάνω πλευρά του, το χτένι ανάποδα (όχι με την πλευρά των δοντιών), ώστε όταν πήξει το πήκτωμα να σχηματιστεί ένα οριζόντιο μέτωπο.

Για συσκευή 21 x 50 cm απαιτείται περίπου 120 ml πηκτώματος. Το πήκτωμα ακρυλαμίδης αφήνεται από 2 ώρες έως O/N για να πήξει και να σχηματιστεί σωστά το πλέγμα της ακρυλαμίδης.

Όταν είμαστε έτοιμοι, τοποθετούμε τα τζάμια με το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Γεμίζουμε την πίσω πλευρά των τζαμιών και την κάτω με 2000ml 0,5 x TBE, ώστε να βρέχεται η πάνω και η κάτω πλευρά του πηκτώματος. Απομακρύνουμε τα χτένια από το πάνω μέτωπο του πηκτώματος και συνδέουμε τη συσκευή με κατάλληλη τροφοδοτική συσκευή ρεύματος. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται μόνο του, περίπου για 1 ώρα σε σταθερή ισχύ 80 watts, μέχρι να φτάσει σε μια θερμοκρασία 50°-55°C.

Τοποθετούμε στο πάνω οριζόντιο μέτωπο του πηκτώματος τα χτένια, ώστε να δημιουργηθούν τα κατάλληλα πηγαδάκια. Απομακρύνουμε την περίσσεια ουρίας, που τυχόν υπάρχει μέσα στα πηγαδάκια και τοποθετούμε τα δείγματα μας (PCR προϊόντα) ως εξής:

Παίρνουμε 7λ από την PCR αντίδραση τα αναμιγνύουμε με 7λ stop solution (loading buffer), και τα αφήνουμε για 20 λεπτά στους 80 °C -90 °C να αποδιαταχθούν

οι αλυσίδες του DNA και αμέσως τα τοποθετούμε σε πάγο. Στο πήκτωμα ακρυλαμίδης τρέχουμε 7λ από κάθε αντίδραση.

Το χρόνο ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων μας μπορούμε να τον ελέγξουμε, παρατηρώντας που έχουν φτάσει οι χρωστικές κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Ολιγονουκλεοτίδια 26 βάσεων μετακινούνται ταυτόχρονα με τον μάρτυρα Bromophenol Blue και ολιγονουκλεοτίδια 106 βάσεων πάνε μαζί με το μάρτυρα Xylene Cyanol. Και οι δύο μάρτυρες περιέχονται στο stop solution που βάζουμε στα δείγματα μας.

Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 2,5 ώρες σε ~ 1900 volts και 80 watts.

8.2.1 Επεξεργασία πηκτώματος ακρυλαμίδης

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% + 0,5 X TBE μεταφέρουμε το πήκτωμα από το τζάμι σε χρωματογραφικό χαρτί Whatman 3mm, το σκεπάζουμε με νάυλον μεμβράνη (saran) και τα στεγνώνουμε υπό κενό. Το πήκτωμα στεγνώνει στους 80 °C περίπου για 1 ώρα, ώσπου να απομακρυνθεί όλο το νερό που υπήρχε στο πήκτωμα.

Το ξηρό πήκτωμα εκτίθεται σε Kodak-X-OMAT AR φιλμ, μια νύχτα ή και λιγότερο, ανάλογα με τις κρούσεις που έχει το πήκτωμα με τα δείγματα μας, στους - 80 °C σε ειδική κασέτα έκθεσης. Το φιλμ εμφανίζεται σε ειδικό εμφανιστικό μηχάνημα.

8.3 Προετοιμασία του LI-COR IR² (gel docymentation system) για ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

Πριν τοποθετήσουμε τα δείγματα μας στο πήκτωμα ακρυλαμίδης πρέπει να προετοιμάσουμε το LI-COR IR² system, ώστε να μπορέσει να γίνει η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος, η σάρωση από το laser beam και η αποθήκευση της εικόνας και των πληροφοριών από τον υπολογιστή.

Δημιουργούμε ένα νέο αρχείο και καθορίζουμε τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης σε: 1.500V, 35mA, 40W και 45⁰C. Δίνουμε τις κατάλληλες εντολές (σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας του μηχανήματος), ώστε να ευθυγραμμιστεί το laser beam και να μπορεί να αναγνώσει σωστά τις φθορίζουσες ζώνες του DNA. Αποθηκεύουμε όλες τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος καθώς και το όνομα του.

8.3.1 Προετοιμασία πηκτώματος ακρυλαμίδης για το LI-COR IR² system

Πλένουμε τα τζάμια πολύ καλά με απεσταγμένο νερό και αιθανόλη (την πρώτη φορά, μια φορά το χρόνο ή αν είναι πολύ βρώμικα τα πλένουμε αρχικά με το απορυπαντικό SDS 10%). Ανάμεσα στα δύο τζάμια,, στα άκρα τους τοποθετούμε spacers πάχους 0,2mm ή 0,25mm, κλείνουμε τα τζάμια και τα ακινητοποιούμε με ειδικούς συσφιγκτήρες. Ακουμπάμε τη συσκευή με κλίση περιπού 30° στην ειδική θέση (gel casting stand).

Για 50ml 6% πηκτώματος ακρυλαμίδης χρειαζόμαστε:

21	gr	Ουρία
7,5	ml	Rapid gel XL Sol 40%
5	ml	TBE (10x)
28	ml	Απιονισμένο νερό
500	μl	DMSO

Όταν διαλυθούν καλά τα υλικά, φιλτράρουμε το μίγμα με φίλτρο 0,45mm που προσαρμόζεται σε σύριγγα. Αμέσως μετά προσθέτουμε τις πηκτικές ουσίες: 50μl TEMED και 350μl APS (10%). Αναδεύουμε καλά το μίγμα και το ρίχνουμε με σύριγγα των 20ml ανάμεσα στα τζάμια. Το μίγμα πρέπει να πέφτει στα τζάμια αργά και με σταθερή ροή, ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Μόλις φθάσει το πήκτωμα στο κάτω άκρο της συσκευής, την τοποθετούμε σε οριζόντια θέση και βάζουμε το χτένι (π.χ. 0,22mm, 48 wells) ανάποδα, για να δημιουργηθεί οριζόντιο μέτωπο. Τοποθετούμε το διαφανές gel casting plate και βιδώνουμε. Αφήνουμε το πήκτωμα να πολυμεριστεί για τουλάχιστον 1,5 ώρα και φτιάχνουμε 1lt TBE Long Run 1X.

Αφού πήξει βγάζουμε το χτένι, ξεπλένουμε το μέτωπο που έχει σχηματιστεί με σύριγγα με νερό και ξανατοποθετούμε το χτένι με τα δόντια προς το gel, ώστε να σχηματιστούν τα κατάλληλα πηγαδάκια..

Τοποθετούμε τη συσκευή με το gel στο LI-COR και ξεκινάμε την ηλεκτροφόρηση αρχικά χωρίς δείγματα στα 1.500V, 35mA, 40W και 45°C για 30 λεπτά περίπου (pregun).

Επειτα ετοιμάζουμε τα δείγματα μας ως εξής: Σε κάθε αντίδραση προσθέτουμε 2-3μl stop/loading buffer και αφήνουμε τις αντιδράσεις για 5 λεπτά

στους 95°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι αλυσίδες του DNA και αμέσως μετά τις τοποθετούμε σε πάγο. Ξεπλένουμε με 1xTBE τα πηγαδάκια, για να είναι καθαρά από οποιαδήποτε υπολείμματα υλικών και τοποθετούμε προσεκτικά 1-2 μl από το κάθε δείγμα μας. Τα δείγματα μας ηλεκτροφορούνται με τις ίδιες συνθήκες (pregun).

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να δούμε, αλλά και να επεξεργαστούμε τα αποτελέσματα του πειράματος μας, τα οποία έχουν αποθηκευθεί στη μνήμη του υπολογιστή.

8.4 Παρασκευή διαλυμάτων:

Διάλυμα Βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (10mg/ml)

Προσθέτουμε 1gr EtBr σε 100ml νερό και αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Το διαλυμένο EtBr καλύπτεται με αλουμινόχαρτο για να προστατευθεί από το φως και φυλάσσεται στους 4°C. Προσοχή: Η μεταχείριση και χρήση του EtBr πρέπει να γίνεται μόνο με γάντια, γιατί είναι τοξικό και μεταλλαξιογόνο.

Διάλυμα ακρυλαμίδης : bis-ακρυλαμίδη (38:2):

Διαλύουμε 38gr ακρυλαμίδης και 2gr bis-ακρυλαμίδης σε νερό, μέχρι τελικό όγκο 100ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Διάλυμα ουρίας:

Διαλύουμε 63gr ουρίας σε 65ml νερό σε υδατόλουτρο με 65 °C.

TBE διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

<u>10x διάλυμα αποθήκευσης</u> (1lt)	<u>1x διάλυμα τελικό</u> (1lt)
108 γρ Tris-base	89 mM
55 γρ Βορικό οξύ	89 mM
40 ml 0,5M EDTA (pH=8.00) ή 7,5γρ.	2 mM

10X TBE Long Run

Υλικά	250mL	500mL	1.000mL	Τελική συγκέντρωση
Tris Base	40,5gr	81gr	162gr	1.340mM
Βορικό οξύ	6,875gr	13,75gr	27,5gr	450mM
EDTA($\text{Na}_2 \cdot 2\text{xH}_2\text{O}$)	2,325gr	4,65gr	9,3gr	25mM
H_2O	Για 250mL	Για 500mL	Για 1lt	

Το pH πρέπει να είναι περίπου 8.3-8.7 στους 50 °C.

Stop Solution:

95% φορμαμίδη
20mM EDTA
0,05% Bromophenol blue
0,05% Xylene Cyanol FF

APS 20%:

Διαλύουμε 0,2γρ ammonium persulfate σε 1ml H_2O .

Ραδιενέργεια:

$[\gamma^{32} \text{P}] \text{ATP}$ (800 μCi ή 3.000 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$), για την αντίδραση κινάσης.
 $[\alpha^{35} \text{S}] \text{ATP}$ για τις sequencing αντιδράσεις.

9. Συνθήκες PCR για τα SNPs

Για την μελέτη των SNPs αναπαράγαμε με PCR τα τμήματα του DNA που περιέχουν την συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλλαγή. Τα προϊόντα του PCR κόβονται με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση στο σημείο που υπάρχει η SNP αλλαγή και έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε την παρουσία ή την απουσία του πολυμορφισμού. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε SNP καθώς και οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των προϊόντων φαίνονται στον πίνακα 2.

Συνθήκες αντίδρασης του PCR:

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 20μl και περιέχει: 60ng DNA, 10pmol από κάθε εκκινητή, 200μM από κάθε dNTPs, 2-2.5 mM MgCl₂, 1X AmpliTaq buffer και 0,5 unit Taq polymerase (5units/μl),(AmpliTaq Cetus).

Θερμοκρασιακές συνθήκες του PCR:

30-35 κύκλοι	{	94 °C 5 λεπτά	αρχική αποδιάταξη
		94 °C 1 λεπτό	αποδιάταξη
		55 °C 45 δευτερόλεπτα	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 1,5 λεπτά	επιμήκυνση
		72 °C 10 λεπτά	τελική επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Τα προϊόντα του PCR που περιέχουν την νουκλεοτιδική αλλαγή (SNP) είναι μεγέθους 200-400bp κόβονται με την αντίστοιχη περιοριστική ενδονουκλεάση (New England Biolabs). Η ενζυμική αντίδραση έγινε σε όγκο 15μl, από τα οποία τα 10μl είναι το PCR προϊόν.

Τα κομμένα PCR προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε 1,5% gel αγαρόζης και προσδιορίζεται το μέγεθος σε σύγκριση με κάποιον μικρομοριακό δείκτη, όπως Puc18/AluI, Puc19/HindIII, pBS/HinfI, φχ174/ HaeIII, λStyI.

10. Sequencing του φάγου M13mp18

10.1 Annealing του DNA και του εκκινητή:

- 1) -40 εκκινητής: 1μl (0,5pmoles)
Διάλυμα αντίδρασης: 2μl (reaction buffer)
M13 ssDNA: 5μl (1μg)
H₂O: 2μl

$$V_{\text{τελ.}} = 10\mu\text{l}$$

*Αν το DNA μας είναι δίκλωνο τότε πριν την αντίδραση του annealing πρέπει να αποδιαταχθεί και να κατακρημνιστεί.

2) Θερμαίνουμε την αντίδραση για 2 λεπτά στους 65°C.

3) Αφήνουμε την αντίδραση μας σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πέσει η θερμοκρασία αργά μέχρι τους 30°C -35°C. Σ' αυτή τη θερμοκρασία έχει ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση του DNA με τον εκκινητή.

10.2 Αντίδραση ραδιενεργής σήμανσης:

1) Την αντίδραση με τον annealed εκκινητή και το DNA μας την τοποθετούμε σε πάγο και ετοιμάζουμε τα διαλύματα που θα χρειαστούμε.

1λ μίγμα σήμανσης (Labelling mix) + 4λ H₂O, (αραίωση 1:5)

1λ ένζυμο (T₇ DNA polymerase) + 7λ διάλυμα αραίωσης ενζύμου,

(αραίωση 1:8)

2) Στο σωλήνα με τον annealed εκκινητή και το DNA (10λ) προσθέτουμε:

1μλ : DTT (Dithiothreitol διάλυμα)

2μλ : αραιωμένο labelling mix

0,5μλ : [³⁵S] dATP

2μλ : ένζυμο αραιωμένο

Ανακατεύουμε την αντίδραση ήπια, ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα.

* Το μίγμα σήμανσης το αραιώνουμε (1:5) όταν θέλουμε να διαβάσουμε αλληλουχία 500 βάσεις και πάνω, μακριά από τον εκκινητή. Για αλληλουχίες που να ξεκινούν από τον εκκινητή ή κοντά σ' αυτόν η αραίωση του labelling mix πρέπει να είναι περίπου 15-fold.

10.3 Αντίδραση τερματισμού:

3) Σε σωληνάρια του 1,5ml βάζουμε 2,5μλ από κάθε νουκλεοτίδιο ddNTP (dATP,dGTP,dCTP,dTTP).

4) Το μίγμα και τα σωληνάρια με τα 4 νουκλεοτίδια τα επωάζουμε στους 37 °C για 5 λεπτά.

5) Στο κάθε σωληνάριο με τα 4 νουκλεοτίδια προσθέτουμε 3,5λ από το μίγμα με το σημασμένο DNA. Ανακατεύουμε 1-2 φορές ήπια.

6) Αφήνουμε τα 4 σωληνάρια με τις αντιδράσεις 3-5 λεπτά στους 37°C ή 10-15 λεπτά στους 42°C -44°C.

7) Προσθέτουμε στις αντιδράσεις 4λ stop solution, ώστε να τερματιστούν. Αναδεύουμε ήπια.

Οι αντιδράσεις μπορούν να φυλαχτούν στους -20 °C μέχρι τη στιγμή που θα ηλεκτροφορηθούν.

10.4 Διαλύματα:

Εκκινητής (-40):

5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

Control DNA:

φάγος M13mp18 0,2μg/μl

Διάλυμα αντίδρασης (Reaction buffer or sequenase buffer) 5x:

200mM Tris HCl, pH = 7,5

100mM MgCl₂

250mM NaCl

Μίγμα σήμανσης (Labelling mix) 5x :

7,5mM dGTP/ 7,5mM dCTP/ 7,5mM dTTP

Ραδιενεργά σημασμένο ATP:

[α³⁵ S] dATP ή [α³² P] dATP

Μίγμα νουκλεοτιδίων:

ddA μίγμα τερματισμού: 80μM dGTP, 80μM dATP, 80μM dCTP

80μM dTTP, 8μM ddATP, 50mM NaCl

ddG μίγμα τερματισμού: 80μM dGTP, 80μM dATP, 80μM dCTP

80μM dTTP, 8μM ddGTP, 50mM NaCl

ddC μίγμα τερματισμού: 80μM dGTP, 80μM dATP, 80μM dCTP

80μM dTTP, 8μM ddCTP, 50mM NaCl

ddT μίγμα τερματισμού: 80μM dGTP, 80μM dATP, 80μM dCTP
80μM dTTP, 8μM ddTTP, 50mM NaCl

Διάλυμα επαναδιάλυσης ενζύμου (enzyme dilution buffer):

10mM TrisHCl, pH = 7,5
5 mM DTT
0,5 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin)

Ενζύμο (Sequenase Version 2.0):

T₇ DNA πολυμεράση 13 units/μl διαλυμένο σε: 20 mM KPO₄, pH =7,4
1 mM DTT
0,1 mM EDTA
50% Glycerol

Stop solution:

95% φορμαμίδη
20mM EDTA
0,05% Bromophenol blue
0,05% Xylene Cyanol FF

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για sequencing πρέπει να φυλάσσονται στους – 20°C και όταν χρησιμοποιούνται να παραμένουν σε πάγο.

11. Συχνότητες των STRs αλληλομόρφων στο γενικό πληθυσμό

D4S136 (Goold R.D. et al 1993, Pritchard C., et al 1990).

Ο πολυμορφικός δείκτης D4S136 είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη (GT) που εντοπίζεται στην περιοχή 4p16.3 και προς την τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος. Με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε γενωμικό DNA παίρνουμε τα παρακάτω αλληλόμορφα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων
1	225 (max)
2	202 (min)

D4S43 (Tangle A.D., et al 1992).

Ο πολυμορφικός δείκτης D4S43 είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη σε μια περιοχή με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (GT)₁₆CT(GT)₃. Η ετεροζυγωτία που έχει παρατηρηθεί από μελέτη του δείκτη σε 124 άτομα από CEPH οικογένειες είναι 0,745 (0,755) και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι τα ακόλουθα.

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
A ₁	188	0,004
A ₂	186	0,016
A ₃	184	0,210
A ₄	182	0,270
A ₅	180	0,343
A ₆	178	0,085
A ₇	176	0,073

D4S182 (Tangle A.D., et al 1993)

Ο πολυμορφικός δείκτης D4S182 είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη (CA) που εντοπίζεται στην 4p16.3 περιοχή με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (CA)₃CG(CA)₉ GCG(CA)₅ και προς την τελομερική περιοχή. Η ετεροζυγωτία μετά από μελέτη του δείκτη σε 100 άτομα από CEPH οικογένειες είναι 0,41 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
B ₁	135	0,015
B ₂	131	0,020
B ₃	127	0,025
B ₄	126	0,105
B ₅	125	0,760
B ₆	124	0,005
B ₇	123	0,015
B ₈	121	0,055

D4S127 (Taylor S.A.M., et al 1992)

Ο πολυμορφικός δείκτης *D4S217* είναι επαναλαμβανόμενη δινουκλεοτιδική επανάληψη σε μια περιοχή με αλληλουχία (GT)₁₈A(TG)₅TA(TG)₉ και χαρτογραφείται στην περιοχή 4p16.3. Από μελέτες σε πληθυσμούς της Βόρειας Αμερικής παρατηρήθηκε ετεροζυγωτία 0,71 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν ήταν τα ακόλουθα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
E ₁	159	0,008
E ₂	157	0,25
E ₃	155	0,11
E ₄	153	0,16
E ₅	151	0,43
E ₆	149	0,024
E ₇	147	0,008
E ₈	143	0,008

D4S95 (Allitto B.A. et al 1991, Norremolle A. et al 1992, Snell R.G. et al 1989, Theilman J. et al 1989).

Ο *D4S95* είναι ένας γενετικός τόπος που χαρτογραφείται στην περιοχή 4p16.3 πολύ κοντά στο HD γονίδιο. Ο γενετικός τόπος *D4S95* περιλαμβάνει μια ποικιλία πολυμορφισμών του τύπου VNTR (variable number of tandem repeat), όπου εμπεριέχει και μια περιοχή 39 ζευγών βάσεων πλούσια σε A/T, στο ένα άκρο του τμήματος αυτού. Από μελέτες σε γενομικό DNA από 41 μη-συγγενικά άτομα της Καυκάσιας φυλής παρατηρήθηκε ετεροζυγωτία 0,844 και τα αλληλόμορφα που εντοπίζονται είναι τα παρακάτω:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
1	1600	1%
2	1560	1%
3	1520	3%
4	1500	4%
5	1480	9%

6	1440	3%
7	1330	3%
8	1240	4%
9	1180	1%
10	1150	20%
11	1090	29%
12	1030	12%
13	990	5%

Δ2642 (Almqvist E. et al 1995, Lucotte G, et al 1996)

Ο *Δ2642* είναι ένας ενδογονιδιακός δείκτης που βρίσκεται στην περιοχή 4p16.3. Ουσιαστικά είναι μια έλλειψη της τριπλέτας GAG που εντοπίζεται στη θέση 2642-2645 του HD γονιδίου στο εξόνιο 58. Στα φυσιολογικά χρωμοσώματα η παρουσία της τριπλέτας είναι σε συχνότητα 0,93, ενώ η έλλειψη της σε συχνότητα 0,07. Ενώ στα HD χρωμοσώματα η έλλειψη της τριπλέτας παρουσιάζεται σε συχνότητα 0,38. Τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι το *A₁* (112)bp παρουσία της τριπλέτας και το *A₂* (109)bp έλλειψη της τριπλέτας και η ετεροζυγωτία που έχει παρατηρηθεί είναι 0,13.

D4S1337 (Goold R.D. et al 1993)

Ο *D4S1337* είναι ένας ενδογονιδιακός δείκτης που βρίσκεται στην περιοχή 4p16.3. Εντοπίζεται στο τελευταίο εξόνιο (67) του HD γονιδίου.

D4S3034 (Dib C. et al 1996)

Ο πολυμορφικός δείκτης *D4S3034* είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη (CA/GT) σε μια περιοχή με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Από μελέτες σε DNA ασθενών από 28 χρωμοσώματα δείχνει ετεροζυγωτία 0,624 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι τα ακόλουθα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
1	184	0,48
2	186	0,36
3	182	0,12
4	188	0,04

ADRA2C (Riess O. et al 1992)

Ο πολυμορφικός δείκτης *ADRA2C* είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη (CA)₁₀ στην περιοχή 4p16.3. Σε σχέση με το HD γονίδιο (IT-15) εντοπίζεται προς την κεντρομερική πλευρά του χρωμοσώματος. Από μελέτες σε 82 χρωμοσώματα από μη-συγγενικά άτομα παρατηρήθηκε ετεροζυγωτία 0,73 και τα παρακάτω αλληλόμορφα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
A ₁	193	0,05
A ₂	187	0,04
A ₃	185	0,18
A ₄	183	0,55
A ₅	181	0,17
A ₆	179	0,01

D4S126 (Tangle A.D. et al 1993)

Ο πολυμορφικός δείκτης *D4S126* είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη (CA)_n στην περιοχή 4p16.3 και επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (CA)₂₇. Σε σχέση με το HD γονίδιο (IT-15) εντοπίζεται προς την κεντρομερική πλευρά του χρωμοσώματος. Από μελέτες του δείκτη σε 108 άτομα από CEPH οικογένειες βρέθηκε ετεροζυγωτία 0,81 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
A ₁	177	0,01
A ₂	175	0,01
A ₃	173	0,02
A ₄	171	0,14
A ₅	169	0,16
A ₆	167	0,20
A ₇	165	0,24
A ₈	163	0,13
A ₉	161	0,06
A ₁₀	159	0,03
A ₁₁	155	0,01

D4S431 (Dib Nature 380 Weissenbach,, Nature 359)

Ο πολυμορφικός δείκτης *D4S431* είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη. Η ετεροζυγωτία που έχει παρατηρηθεί από μελέτη σε 56 χρωμοσώματα είναι 0,8407 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι τα ακόλουθα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
1	246	0,01
2	248	0,16
3	250	0,05
4	252	0,19
5	254	0,23
6	256	0,19
7	258	0,07
8	260	0,03
9	262	0,01
10	270	0,01

D4S3038 (Gyarpay G. et al 1996, Dib C. et al 1996)

Ο πολυμορφικός δείκτης *D4S3038* είναι μια δινουκλεοτιδική επανάληψη στη τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος 4. Η ετεροζυγωτία που έχει παρατηρηθεί από μελέτη του δείκτη σε 27 χρωμοσώματα από διάφορες οικογένειες είναι 0,78 και τα αλληλόμορφα που εντοπίστηκαν είναι τα ακόλουθα:

Αλληλόμορφα	Ζεύγη βάσεων	Συχνότητα
1	223	0,17
2	221	0,37
3	225	0,11
4	209	0,17
5	229	0,02
6	207	0,06
7	219	0,06
8	227	0,06

12. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing)

12.1 Ανάλυση αλληλουχίας του 5' άκρου του HD γονιδίου που περιέχει την επανάληψη CAG

Έγινε ανάλυση αλληλουχίας για ένα τμήμα DNA μεγέθους 696bp από το 5' άκρο του HD γονιδίου (από -109bp έως το +587bp), το οποίο περιέχει την CAG επανάληψη.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

5' -CCAAACTCACGGTCGGTGCAGCGGCTCCTCAG- 3' (antisense) και

5' -ACACTTCACACACAGCTTCG- 3' (sense).

Τα προϊόντα του PCR κλωνοποιήθηκαν στον βακτηριακό φορέα TA (Invitrogen TA cloning kits) και ηλεκτροφορήθηκαν για την ανάλυση της αλληλουχίας.

Η ανάλυση της αλληλουχίας αυτού του τμήματος έδειξε ότι σε όλα τα HD χρωμοσώματα η CAG επανάληψη ήταν συνεχής και δεν διακοπτόταν από κάποιο νουκλεοτίδιο ή από ολόκληρη τριπλέτα.

12.2 Ανάλυση αλληλουχιών ανοδικά της 5' περιοχής του HD γονιδίου

Προκειμένου να ανακαλύψουμε cis-acting στοιχεία που πιθανόν να επηρεάζουν την σταθερότητα της CAG επανάληψης στις late-onset HD περιπτώσεις προχωρήσαμε σε ανάλυση αλληλουχίας ενός μεγαλύτερου τμήματος DNA, μεγέθους 5,5Kb, το οποίο εκτείνεται ανοδικά στο 5' άκρο αμέσως μετά την (+1) θέση έναρξης της μετάφρασης.

Η αλληλουχία των βάσεων του DNA μπορεί να βρεθεί με τη δημιουργία θραυσμάτων, που προκύπτουν με τη ρυθμιζόμενη διακοπή της ενζυμικής αντιγραφής του, μια μέθοδο που ανέπτυξε ο Frederick Sanger και οι συνεργάτες του. Η DNA πολυμεράση I χρησιμοποιείται για να αντιγράψει μια συγκεκριμένη αλληλουχία σε ένα μονόκλωνο DNA. Η σύνθεση απαιτεί ως εκκινητή ένα συμπληρωματικό τμήμα, που μπορεί να δημιουργηθεί από ενζυμική διάσπαση ή χημική σύνθεση. Εκτός από τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες, το μίγμα περιλαμβάνει 2',3'-διδέοξυ-ανάλογο (ddNTPs) του ενός από αυτά. Η ενσωμάτωση αυτού του αναλόγου παρεμποδίζει την συνέχιση της νέας αλυσίδας γιατί δεν υπάρχει το 3'-υδροξυλικό

άκρο που χρειάζεται για να σχηματιστεί ο επόμενος φωσφοδιεστερικός δεσμός. Επομένως θα παραχθούν τμήματα με διάφορα μήκη, στο 3' άκρο των οποίων θα βρίσκεται το διδέοξυ-ανάλογο. Τέσσερις τέτοιες ομάδες θραυσμάτων τερματισμένων αλυσίδων (μια για κάθε ένα από τα διδέοξυ-ανάλογα) διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και η αλληλουχία των βάσεων του DNA διαβάζεται από την αυτοραδιογραφία των τεσσάρων λωρίδων.

Πρόσφατα έχει εμφανιστεί μια παραλλαγή της μεθόδου διδέοξυ-αναλόγων. Συγκεκριμένα, μια φθορίζουσα ουσία τοποθετείται στο αρχικό ολιγονουκλεοτίδιο με διαφορετικό χρώμα για το καθένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια. Οι αντιδράσεις συνδυάζονται και ηλεκτροφορούνται μαζί. Οι διαφορετικές ζώνες DNA ανιχνεύονται από το φθορισμό τους καθώς περνούν έξω από την άκρη του σωλήνα ηλεκτροφόρησης και η σειρά των χρωμάτων δίνει αμέσως τη σειρά των βάσεων. Ένα σημαντικό στοιχείο αυτής της μεθόδου ανίχνευσης με φθορισμό είναι ότι μπορεί να αυτοματοποιηθεί εύκολα, με αποτέλεσμα πλέον να υπάρχουν μηχανήματα αλληλούχισης DNA που να βασίζονται σε αυτή την τεχνική. Ένα τέτοιο μηχάνημα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία, είναι το 3100 Sequencing Analyzer από την Applied Biosystem, το οποίο μπορεί να προσδιορίζει αλληλουχίες που περιέχουν 800-900bp.

16 εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουμε με PCR 8 συνεχή επικαλυπτόμενα DNA τμήματα τα οποία εκτείνονται από τη θέση +54 έως -5515 σε σχέση πάντα με την (+1) θέση έναρξης της μετάφρασης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, τα μεγέθη και οι θέσεις των 8 DNA τμημάτων φαίνονται στον πίνακα 3. Στα τμήματα DNA που παράχθηκαν από τις αντιδράσεις PCR, έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας τους με τα ίδια ζευγάρια εκκινητών.

50 με 100 χρωμοσώματα ελέγχου αναλύθηκαν για τρεις μονονουκλεοτιδικές αλλαγές που εντοπίστηκαν. Η παρουσία της αλλαγής G→A στη θέση -1757 ελέγχθηκε με πέψη του PCR προϊόντος (μεγέθους 1083bp) με την περιοριστική ενδονουκλεάση PvuII στους 37°C για 50 χρωμοσώματα ελέγχου. Τα DNA δείγματα που ήταν ομόζυγα για την G→A αλλαγή κόπηκαν από το ένζυμο σε τρεις ζώνες των 533, 350, 255bp, ενώ τα ετερόζυγα και τα ομόζυγα για το αναφερόμενο νουκλεοτίδιο κόπηκαν σε 790, 533, 350, 255bp και 790 και 350bp αντίστοιχα. Η προσθήκη της κυτοσίνης (C) μεταξύ των σημείων -662 και -663 μελετήθηκε με πέψη του PCR προϊόντος (μεγέθους 927bp) με την περιοριστική ενδονουκλεάση BsrBI. Τα ομόζυγα δείγματα για την προσθήκη της C κόπηκαν σε τρεις ζώνες, 382, 336 και 219bp. Για

την παρουσία της αλλαγής A→C στη θέση -694bp και για τις τέσσερις πολυμορφικές θέσεις της περιοχής του HD υποκινητή έγινε ανάλυση αλληλουχίας των PCR προϊόντων που περιέχουν αυτές τις τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας τα ίδια ζεύγη εκκινητών και παρατηρήθηκαν στο 3100 ABI Genetic Analyzer μηχανήμα.

12.2.1 Παρασκευή και ανάλυση αντιδράσεων για sequencing

Χρησιμοποιώντας ως μήτρα την περιοχή του γονιδιώματος που έχει ενισχυθεί, από τα προηγούμενα PCR, έχουμε ως στόχο να γίνει ενσωμάτωση των φοριζόντων διδέοξυ-νουκλεοτιδίων στο DNA. Τα τμήματα DNA με διάφορα μήκη που θα παραχθούν, στο 3' άκρο των οποίων θα βρίσκεται το διδέοξυ-ανάλογο, θα ηλεκτροφορηθούν στη συνέχεια στο ABI 3100 Genetic Analyzer.

Υλικά:

POP 6 Big Dye Kit της Applied biosystem

Συνθήκες αντίδρασης:

Με βάση το πρωτόκολλο που προτείνει η Applied biosystem για κάθε αντίδραση χρειάζεται:

DdH ₂ O	Buffer Big Dye Sequencing	Ready Reaction Premix	Primer (1.6pmol/μl)	DNA
8μl	2μl (1X)	4μl (0.5X)	2μl	4μl

Όμως εξαιτίας του κόστους των υλικών και πιο συγκεκριμένα του Premix ο όγκος της αντίδρασης μειώθηκε σε V=7.5μl και το Premix να χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0.33X, οπότε η αντίδραση τροποποιήθηκε ως εξής:

DdH ₂ O	Buffer Big Dye Sequencing	Ready Reaction Premix	Primer (3.2pmol/μl)	DNA
2μl	1,5μl (1X)	1μl (0,33X)	1μl	2μl

Συσκευές:

Eppendorf, Mastercycler gradient
PTC-100, Peltier Thermal Cycler Applied biosystems,
GeneAmp PCR System 2700,
Eppendorf Centrifuge 5804 R

Θερμοκρασιακές συνθήκες:

25 κύκλοι	{	96 °C 1 λεπτό	αρχική αποδιάταξη
		96 °C 10 λεπτά	αποδιάταξη
		50 °C 5 δευτερολεπτά	επαναδιάταξη DNA/primer
		72 °C 4 λεπτά	επιμήκυνση
		4 °C	παύση

Αιθανόλη/ EDTA καθαρισμός

Με τον καθαρισμό αυτό απομακρύνονται οι αχρησιμοποίητοι εκκινητές και τα υπολειπόμενα ddNTPs και dNTPs.

Διαδικασία:

1. Τοποθετούμε τα δείγματα σε ειδικό πιάτο sequencing
2. Προσθέτουμε 5μl EDTA σε κάθε δείγμα και ανεβοκατεβάζουμε την πιπέτα 102 φορές.
3. Προσθέτουμε 60μl αιθανόλη 100% (τη οποία διατηρούμε στους 4°C) σε κάθε δείγμα και ανακατεύουμε ξανά.
4. Τα κλείνουμε αεροστεγώς, τα καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
5. Φυγοκεντρούμε για 45' σε 1650G και σε 4°C.
6. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Κλείνουμε με ειδικό χαρτί εξεταστικής κλίνης με την απορροφητική πλευρά προς τα κάτω.
7. Γυρίζουμε ανάποδα το πιάτο και φυγοκεντρούμε μέχρι η φυγόκεντρος να φτάσει τα 185G.
8. Προσθέτουμε 60μl αιθανόλη 70% (στους 4°C).
9. Φυγοκεντρούμε για 15' σε 1650G.

10. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Κλείνουμε με ειδικό χαρτί εξεταστικής κλίνης με την απορροφητική πλευρά προς τα κάτω.
11. Γυρίζουμε ανάποδα το πιάτο και φυγοκεντρούμε μέχρι η φυγόκεντρος να φτάσει τα 185G.
12. Επαναδιαλύουμε το DNA σε 10μl φορμαμίδη (η φορμαμίδη βοηθαεί στην αποδιάταξη που θα γίνει στην συνέχεια). Ανακατεύουμε τα δείγματα ελαφρά με vortex και αν υπάρχουν σταγονίδια στα τοιχώματα φυγοκεντρούμε λίγο ώστε να φύγουν από τα τοιχώματα.

Αποδιάταξη:

Αποδιατάσσουμε τα δείγματα βάζοντας στο PCR μηχάνημα στο εξής πρόγραμμα:

1. 95°C για 5'
2. Διατήρηση στους 4°C

Στη συνέχεια κάνουμε μια μικρή φυγοκέντρωση ώστε να φύγουν ότα σταγονίδια υπάρχουν από τα τοιχώματα

Καλύπτουμε το πιάτο με ειδικό σκέπασμα που επιτρέπει στα τριχοειδή του 3100 μηχανήματος αλληλούχισης να το διαπερνούν

Τοποθετούμε το πιάτο σε ειδική βάση και το βάζουμε στο 3100 μηχάνημα αλληλούχισης.

Έλεγχος αποτελεσμάτων

Για την ευκολότερη σύγκριση των αποτελεσμάτων για την ύπαρξη γενετικών αλλαγών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό στην ιστοσελίδα <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> με το οποίο γίνεται σύγκριση δύο αλληλουχιών DNA.

Σε περίπτωση εύρεσης αλλαγών ψάχνουμε στη βάση δεδομένων του NCBI και συγκεκριμένα στα SNP, για να ανακαλύψουμε αν οι αλλαγές αυτές είναι αναγνωρισμένοι πολυμορφισμοί του γονιδιώματος.

13. Βάσεις δεδομένων

Η επιλογή των πολυμορφικών δεικτών έγινε από βάσεις δεδομένων σχετικών με: α) γονίδια υπεύθυνα για νευρολογικές ασθένειες, β) πολυμορφικούς δείκτες σχετικούς με γονίδια.

GDB (Genome Database):

<http://gdb.www.gdb.org/>

Περιέχει πληροφορίες για γενετικούς τόπους, πολυμορφισμούς, μεταλλαγές, probes, γενετικούς χάρτες, Genbank, δημοσιεύσεις.

Human SNP Database:

(Single nucleotide polymorphism in the Human Genome)

Περιλαμβάνει μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που έχουν αναπτυχθεί σαν γενετικοί δείκτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

CEPH - Genethon integrated map:

Περιλαμβάνει γενετικούς δείκτες οι οποίοι έχουν ελεγχθεί σε συγκεκριμένες οικογένειες για linkage mapping. Οι οικογένειες αυτές είναι πολυμελής και με άτομα τουλάχιστον από 3 γενιές.

CHLC (Cooperative Human Linkage Center):

<http://www.chlc.org/>

Περιέχει γενετικούς χάρτες που δείχνουν τους γενετικούς δείκτες. Περιλαμβάνει πληροφορίες για τη θέση (από τη γενοτυπική ανάλυση στις CEPH οικογένειες), τους εκκινήτες που χρησιμοποιούνται, τις συνθήκες των αντιδράσεων, linkage analysis.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Schuler/Unigene>

<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/phys-map>

14. Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης

14.1 Ανάλυση σύνδεσης ανισορροπίας και συνεργασία αλληλομόρφων

Μελετήσαμε 33 late-onset HD χρωμοσώματα (n_D) και 114 φυσιολογικά χρωμοσώματα (n_N). Μετρήθηκαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων απευθείας τόσο για τα HD όσο και για τα χρωμοσώματα ελέγχου για τους STRs δείκτες που περικλείουν τον συντηρημένο απλότυπο (D4S3038, D4S136, D4S182, D4S126, D4S3034 και D4S431). Οι διαφορές στις συχνότητες βρέθηκαν με την σχέση: $p(1-p)/n$, όπου p είναι οι παρατηρούμενες συχνότητες και n ο αριθμός των χρωμοσωμάτων που μελετήθηκαν. Έγινε στατιστική σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων μεταξύ των φυσιολογικών χρωμοσωμάτων και των HD χρωμοσωμάτων, η οποία βασίστηκε στο χ^2 τεστ καθώς και στο two-tailed Fischer's τεστ. Τα αλληλόμορφα ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες, η μία για το αλληλόμορφο που συνεργάζεται με τη κληρονόμηση της νόσου και η άλλη ομάδα για όλα τα υπόλοιπα αλληλόμορφα μαζί. Εφόσον είχαμε στη διάθεση μας πολλαπλά αλληλόμορφα για κάθε δείκτη προχωρήσαμε σε στατιστική συσχέτιση με πολλαπλά τεστ. Χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση Bonferroni με πολλαπλασιασμό (nominal significance level) του συγκεκριμένου επιπέδου σημασίας (p) με τον αριθμό των αλληλομόρφων που μελετήθηκαν. Οι διαφορές θεωρούνται σημαντικές όταν το προαναφερθέν προϊόν είναι $p < 0,05$.

Ο βαθμός γενετικής ανισορροπίας L.D μετρήθηκε με το δ μεταξύ κάθε δείκτη και του late-onset HD γενετικού τύπου και εκτιμήθηκε βασιζόμενοι στην σχέση $\delta = (p_D - p_N)/(1 - p_N)$, όπως περιγράφηκε από τους Bengtsson και Thomson (Bengtsson B. O. et al 1981), όπου p_D είναι η συχνότητα του συνεργαζόμενου με το HD χρωμόσωμα αλληλομόρφου και p_N η συχνότητα του συνεργαζόμενου αλληλομόρφου με τα χρωμοσώματα ελέγχου. Υποθέτουμε ότι οι όποιες διαφορές στο δ αναπαριστούν αποτελέσματα ανασυνδιασμού, αν και δεν πρέπει να αποκλείσουμε και μια πιθανή μετάλλαξη στον δείκτη (Rannala B. et al 2001).

14.2 Κλάσμα ανασυνδιασμού (θ)

Το κλάσμα ανασυνδιασμού (θ) μεταξύ του κάθε αλληλομόρφου για συγκεκριμένο δείκτη και του γενετικού τόπου της ασθένειας υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Marfan του Fastlink Software Package, το οποίο μετατρέπει τις γενετικές αποστάσεις σε κλάσματα ανασυνδιασμού σύμφωνα με το Haldane Map Function. Οι γενετικές αποστάσεις για τους πολυμορφικούς δείκτες που αναλύσαμε υπολογίστηκαν με βάση τις γνωστές αποστάσεις τους στο φυσικό χάρτη (στοιχεία από την National Center for Biotechnology Information), χρησιμοποιώντας παράγοντας μετατροπής το 1,6cM/1Mb. Αυτός ο παράγοντας αποκτήθηκε βασισμένοι σε 6 γενετικούς δείκτες (τους D4S43, D4S95, D4S127, D4S180, D4S125 και D4S126 οι οποίοι απλώνονται στην περιοχή που μας ενδιαφέρει). Για τους δείκτες αυτούς είναι γνωστές τόσο οι γενετικές, όσο και οι φυσικές αποστάσεις (Lonjou C. et al 1998). Για κάθε δείκτη υπολογίσαμε την αναλογία cM:Mb και η average value (1,6:1) χρησιμοποιήθηκε για να μετατρέψουμε τις φυσικές αποστάσεις (σε Mb) σε γενετικές (σε cM). Το τμήμα του HD χρωμοσώματος που εμπεριέχει τον συντηρημένο απλότυπο (D4S95: 2996Kb έως το SNP rs2530596: 3273 Kb περίπου από το τελομερικό άκρο του μικρού βραχίονα (4p) του χρωμοσώματος 4 για τα late-onset HD χρωμοσώματα θεωρήθηκε ένας γενετικός τόπος που περιλαμβάνει την HD μετάλλαξη. Το μέσον αυτού του τμήματος (3135 Kb) χρησιμοποιήθηκε σαν ένα σημείο αναφοράς για την εκτίμηση της φυσικής απόστασης μεταξύ κάθε δείκτη και του γενετικού τόπου της ασθένειας.

14.3 Υπολογισμός ηλικίας

Για τον υπολογισμό του αριθμού των γενεών (G) ως προς τον πιο κοινό πρόγονο των late-onset HD χρησιμοποιήσαμε τη σύνδεση γενετικής ανισορροπίας (linkage disequilibrium: LD) ανάμεσα στο γενετικό τόπο της ασθένειας και στους πολυμορφικούς δείκτες που περιβάλλουν τον τόπο αυτό. Ο υπολογισμός αυτός θα μας δείξει τη μετατροπή-φθορά της μετάλλαξης με το πέρασμα του χρόνου. Η μέθοδος αυτή περιγράφηκε αρχικά από τον Risch et.al. (Risch N. et al 1995), ο οποίος χρησιμοποίησε τον τύπο $G = \ln \delta / \ln(1 - \theta)$, όπου θ το κλάσμα ανασυνδιασμού

μεταξύ του γενετικού τύπου της ασθένειας και του δείκτη που αναλύουμε κάθε φορά και δ ο βαθμός γενετικής σύνδεσης ανισορροπίας (LD) των δεικτών που περιβάλουν τον συντηρημένο απλότυπο. Όπως προαναφέρθηκε, το δ υπολογίστηκε με βάση τη σχέση: $\delta = (p_D - p_N)/(1 - p_N)$, όπου το p_D είναι η συχνότητα του συνεργαζόμενου αλληλομόρφου με το HD χρωμόσωμα και p_N η συχνότητα του ίδιου αλληλομόρφου στα φυσιολογικά χρωμοσώματα. Το διάστημα εμπιστοσύνης για το δ υπολογίστηκε με την υπόθεση της ανεξαρτησίας των χρωμοσωμάτων που διαθέτουμε. Από τη στιγμή που γνωρίζουμε ότι $\delta = 1 - (1 - p_D)/(1 - p_N)$ είναι η λειτουργία της αναλογίας δύο ανεξάρτητων τυχαίων μεταβλητών, η διαφορά του δ εκτιμήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\text{var}(\delta) = \frac{1}{(1 - p_N)^4} \sigma^2_{pN} [\sigma^2_{pD} + (1 - p_D)^2] + \frac{\sigma^2_{pD}}{(1 - p_N)^2}, \text{ όπου}$$

$$\sigma^2_{pD} = \frac{[p_D(1 - p_D)]}{n_D} \quad \text{και} \quad \sigma^2_{pN} = \frac{[p_N(1 - p_N)]}{n_N}.$$

Ένα 90% διάστημα εμπιστοσύνης για το δ αποκτήθηκε ως $\delta \pm 1.64\sigma_\delta$, όπου $\sigma_\delta^2 = \text{Var}(\delta)$. Ένα 90% διάστημα εμπιστοσύνης για τις γενιές (G) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον παραπάνω τύπο για το διάστημα εμπιστοσύνης του δ .

Πίνακας 1.				
Αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την STS ανάλυση				
Δείκτης	Εκκινητής		Anneal.	Μέγεθος PCR
	Forward (5' -3')	Reverse (5' -3')	Temper. (°C)	Προϊόντος (bp)
D4S3038	GAAGACCAGCATTCGG	GGTTTAATACACAGTAATTGTTCA	55	209-227
D4S43	CTTCCTTTTCTCTCTGGATGC	ACATCACGCTTATCTTTGGGG	57	176-190
D4S136	CTGACTTGATCCAATCCAAAGGAAAG	TTGAACCTAGTAGGCGGAAGTTGCAC	60	225-249
D4S182	GGATCCAATCCAAAGGAAAGTTCC	TTTTTCTCCCCCATGACACCATG	58	114-138
D4S95	GCATAAAATGGGGATAACAGTAC	GACATTGCTTTATAGCTGTGCCTCAGTTT	60	990-1600
D4S127	CCTCTGTTTGCAATCCATTT	GTCCCTTGCAATGCCCTGGCT	55	145-161
Δ2642	GCTGGGGAACAGCATCACACCC	CCTGGAGTTGACTGGAGACGTG	58	109-112
D4S1337	ATGTGGCAGAAGTGCTCTTTGTG	AACAACCAGCAGGTGACTATCAG	62	156*
D4S180	CACATCTCCTGTTTCTTTGAACATC	GAGAGACCCAGAGTCCAGCAG	62	212*
D4S3034	CTGCCAATAAACTGGGT	TTGCTCACCAAAGAGGTT	55	182-196
D4S126	GGATCCTGTCACTGTACTCCAGCC	TGCTTAACCAGTTTGACCATGAGG	57	145-177
ADRA2C	CGCTGCCTCCCTTCCACCTGTTG	AGTGGGCAGGGCGGGGCAGGT	62	179-193
D4S2925	TCAGAAACCCCTACAGGAAA	TTTGATGAGTTATTCGGAGG	55	151-155*
D4S431	AGGCATACTAGGCCGTATT	TTCCCATCAGCGTCTTC	55	244-290

* STS δείκτες που δεν είναι πολυμορφικοί τόσο στα άτομα που νοσούν όσο και στα άτομα ελέγχου που μελετήσαμε.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην SNP ανάλυση			
	Εκκινητής		Ένζυμα
Ενδογονιδιακά	Forward	Reverse	
SNPs	(5' -3')	(5' -3')	
rs2024115	AAGCCCCTGGAGTAAATCTT	TGGAAGAGAAGGCTCCTATG	BsrI
rs1065745	TCATACACAGCACCAAGACC	AAGGAAGATGGAATGCAGAC	BsII
rs3025852	TGAAACCCATAGAGGAGAAAA	CCTCTCACCCAAAGAAAAAG	Tsp45I
rs3025843	TGAGTGACATGGGTTAGCTC	AATATCTTGAACCGCACCTG	BfaI
rs363099	CTAGATGAACTCAGCCCAGA	ATTTTCCAGTGCTGACAAC	BsrBI
rs363126	AGCAGCACTTTCTTTGTTCA	CTGCAGAGGCAATCTACTGA	HphI
rs363124	CTGCAGGGAGAAGACTTTTA	TACCTGGTCTTGCTTCACTT	Tsp45I
rs362277	TATGCCCAGTGTAGAAAGCA	GACACCATTCTGTGGATCTT	AvrII
rs3025814	CTGCTCTTGTTGACATGTGG	CACCTGCTATGTCCCAGAG	BsrI
rs82334	CTGAAAGCTCTCGACACCA	GGAACCTGGTGTAAATACCAA	BsajI
rs82332	CACGTGTCTCTGGGACATAG	ACTAGTTGCCTGCTCATTCC	BSERI
rs110501	CCTCCCAAACCTACATTTTA	CGTCAGCCTTCATTGCTAGA	Tsp45I
rs2530596	CTCATTCAAGTCCCTGGCTAC	CTAACTCAGCCTCCCCTGT	NspI
rs362310	GGAAAGTCAGAGCCTAAGCA	CACATAGGGATGTTTGTGGA	HhaI
rs2237008	ACTGAAGCGTGTTCCTTCC	CTCATCTCAGCTCCAAGAGG	HhaI

Πίνακας 3. Αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση αλληλουχίας του 5Kb DNA τμήματος ανοδικά του HD γονιδίου

Δείκτης	Εκκινητές		Θερμοκρασ. επαναδ. (°C)	Προϊόν	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		Μέγεθος (bp)	Θέση (+1 έναρξη μετάφρ.)
HD0	CCGCCTCGCCGCGACT	CTGGAAGGACTTGAGGGACTCGA	61	452	+54 με -398
HD1	TGCTTCTCGCTGCACTAATC	GTTCTGCCTCACACAGCAAG	56	968	+297 με -1264
HD2	GCCATCTTATGAGTCTGCCACTG AGGTAAC TAACAAC	GCCCCCATCGGTCCCAGCG	71-65	1142	-1151 με +2292
HD3	GGAACAAATCACCCCAGCAC	AAAATTAAGTTCCAGCGAGGTG	58-56	944	-1183 με -2826
HD4	ATGGGTTGGAATAATTTGGTTTG	GCGAGAAGTGGAGCTGGTTAAG	56	995	-2683 με -3677
HD5	GAGAGGGTTTCATCTTGTTGGTC	ACTGTGTGCAGTTGTCATTCCAG	58	805	-3546 με -4350
HD6	CCCTAGAACCTAAGGAAACAGG	AAACGAAGGAAACCCTGCAG	58	1000	-4168 με -5167
HD7	TAAAACACATGGCAATAATACCC	AAAAGAAGGAAACCCTGACG	51	975	-4874 με -5848

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Περιγραφική επιδημιολογική μελέτη των HD οικογενειών στην Κρήτη.

Στους επιμέρους πληθυσμούς στο νησί της Κρήτης (συνολικός πληθυσμός 601.159 κάτοικοι σύμφωνα με την απογραφή της ΕΣΥΕ του 2001, που αντιστοιχεί στο 5.5% του συνόλου του Ελληνικού πληθυσμού) έχει ανιχνευθεί μια ιδιαίτερη μορφή της HD που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ηλικία έναρξης της ασθένειας. Επίσης φαίνεται ότι σε διαδοχικές γενεές χάνεται το φαινόμενο της επέκτασης της τριπλέτας (anticipation) και μάλιστα οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από σταθερότητα ή ακόμα και συρρίκνωση της (CAG) τριπλέτας κατά τη διάρκεια των μειωτικών μεταφορών.

Συλλέχθηκε DNA από μέλη 9 οικογενειών που εμφανίζουν HD με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη των συμπτωμάτων (late-onset) και από μέλη 2 οικογενειών που. Οι 9 αυτές οικογένειες προέρχονται από χωριά με λιγότερους από 1000 κατοίκους. Το DNA συλλέχθηκε από λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος και ποσοτικοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο, καθώς και σε gel αγαρόζης.

Η μορφή της HD με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη των συμπτωμάτων εντοπίζεται σε τρεις τοποθεσίες της Κρήτης που είναι γεωγραφικά κοντά. Μια οικογένεια προέρχεται από το χωριό (AM) κοντά στη Δυτική άκρη του οροπεδίου του Λασιθίου. Επτά οικογένειες από το χωριό (BR) που είναι βόρεια του οροπεδίου του Λασιθίου. Μία οικογένεια από το χωριό (MA), νότια του οροπεδίου του Λασιθίου. Ενώ μια τελευταία οικογένεια έχει ανιχνευθεί στο χωριό (PE), νότια του Νομού Ηρακλείου και σε μεγαλύτερη απόσταση από τις προηγούμενες τοποθεσίες (**εικόνα 1 Κρήτης**). Ο μέσος όρος ηλικίας έναρξης της νόσου για την ιδιαίτερη μορφή της HD στην Κρήτη (late onset) είναι γύρω στα 60 χρόνια. Η ανάλυση έγινε σε 57 άτομα από τις HD οικογένειες και ο μέσος όρος μήκους της τριπλέτας (CAG) είναι 42 (39-44 τριπλέτες), ενώ στα υγιή άτομα ήταν 21 τριπλέτες (15-29 τριπλέτες). Τα αποτελέσματα από τα φυσιολογικά άτομα είναι συγκρίσιμα με αυτά των Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Επίσης σ' αυτές οι οικογένειες διαφαίνεται αντίστροφη σχέση μεταξύ του μήκους της τριπλέτας (CAG) και της ηλικίας έναρξης της ασθένειας.

Επίσης έχουν ανιχνευθεί και άλλες 3 οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου, που χαρακτηρίζεται από ηλικία έναρξης μετά την τέταρτη δεκαετία. Οι

οικογένειες αυτές προέρχονται από την Κεντρική Κρήτη (Νομός Ρεθύμνου) και από περιοχές κοντινές μεταξύ τους (χωριά (ΑΧ), (ΤΥ), (ΚΟ)) (εικόνα 1). Τέλος έχει βρεθεί και μια τέταρτη οικογένεια με την τυπική μορφή της νόσου, από περιοχή πιο απομακρυσμένη από τις υπόλοιπες τρεις (ΞΥ). Ο μέσος όρος μήκους της τριπλέτας (CAG) είναι 42 (37-54 τριπλέτες). (Tsangournisakis M. et al 1996).

Το πειραματικό μας υλικό, εμπλουτίστηκε με δείγματα DNA από 57 υγιή άτομα από το γενικό πληθυσμό, με καταγωγή από διάφορες τοποθεσίες της Κρήτης, ώστε να μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε ως άτομα ελέγχου. Τέλος χρησιμοποιήθηκε πειραματικό υλικό (δείγματα DNA) και από άλλα 44 υγιή άτομα από την Βόρεια Αμερική που όμως έχουν Ευρωπαϊκή καταγωγή.



Εικόνα 1. Χάρτης της Κρήτης. Οι μαύροι κύκλοι δείχνουν τα χωριά από τα οποία προέρχονται οι late-onset οικογένειες. Το BR και το MA βρίσκονται στο Ν. Λασιθίου, ενώ το AM και το PE στο Ν. Ηρακλείου. Οι λευκοί κύκλοι δείχνουν τα χωριά από τα οποία προέρχονται οι οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου. Το AX βρίσκεται στο Ν. Ρεθύμνου και το ΚΟ στο Ν. Ηρακλείου.

1.1 Late-onset HD οικογένειες

Έγινε μελέτη 9 γενεαλογικών δέντρων με καθυστερημένη έναρξη των συμπτωμάτων της HD (late-onset). Οκτώ από τις late-onset οικογένειες προέρχονται από τον νομό Λασιθίου. Έξι από αυτές τις οικογένειες (BR1-6) προέρχονται από το χωριό BR, που βρίσκεται βορειοδυτικά του Νομού Λασιθίου. Η οικογένεια AM προέρχεται από το χωριό AM, και η οικογένεια MA προέρχεται από το χωριό MA. Και τα τρία χωριά εδράζονται περιφερειακά από το οροπέδιο Λασιθίου, το BR στη βόρεια πλευρά, το AM στη δυτική, ενώ το MA στη νοτιοδυτική πλευρά του (**Εικόνα 1 Κρήτης**). Η ένατη οικογένεια (PE) προέρχεται από το χωριό PE, νοτιοδυτικά του νομού Ηρακλείου, στην πεδιάδα της μεσσαράς. Οι 9 late-onset οικογένειες περιλαμβάνουν 438 μέλη, από τα οποία τα 61 εμφανίζουν την HD. Η μέση ηλικία έναρξης της ασθένειας ήταν 56.1 ± 10.2 χρόνια. Η ηλικία έναρξης παρουσιάζεται σχεδόν η ίδια σε άτομα που έχουν πεθάνει ήδη από τη νόσο και σε άτομα προσβεβλημένα, που ζουν (**Πίνακας 1**). Το 82% (50/61) των HD ασθενών εκδηλώνουν τα πρώτα συμπτώματα της νόσου μετά τα 50 τους χρόνια, ενώ το 41% (25/61) μετά τα 60 χρόνια τους. Οι ηλικίες για κάθε οικογένεια απεικονίζονται στον **πίνακα 2**.

Μελέτη σε 39 μεταβιβάσεις της HD μεταξύ γονιών –παιδιών έδειξε ότι η ηλικία έναρξης της ασθένειας του γονέα και των απογόνων ήταν παρόμοια. Αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο για μεταβιβάσεις από τον πατέρα όσο και από τη μητέρα. **Πίνακας 3**. Επί του παρόντος έχουν πεθάνει 46 μέλη των οικογενειών που έφεραν τη νόσο, 12-14 χρόνια μετά τα πρώτα συμπτώματα. Ο μέσος όρος ηλικίας θανάτου ήταν 68.0 ± 10.5 χρόνια, ενώ δεν παρατηρούνται σημαντικές αποκλίσεις στη ηλικία θανάτου, αν συγκρίνουμε γονείς και παιδιά (**Πίνακας 4**).

Πίνακας 1		
	M.O. ηλικίας έναρξης \pm S.D.	M.O. ηλικίας θανάτου \pm S.D.
Προσβεβλημένοι αποθανόντες (45)	56,18 \pm 10,04	67,96 \pm 10,82
Προσβεβλημένοι ζώντες (16)	54,44 \pm 9,32	

Πίνακας 2. Ηλικίες ατόμων με τη late-onset μορφή της νόσου HD										
	Late onset HD οικογένειες									Σύνολο
	BR1	BR2	BRC3	BR4	BR5	BR6	AM	PE	MA	
Άτομα	61	106	53	52	9	22	60	22	54	439
Νοσούν	9	14	8	5	4	1	10	5	5	61
Νοσούν και ζουν	3	5	4	2	-	1	3	2	1	21
Έχουν πεθάνει	6	9	4	3	4	-	7	3	5	42
HD γονίδιο, χωρίς να νοσούν	4	4	-	-	-	2	3	2	3	18
M.O. ηλικίας έναρξης νόσου	55	47,7	54,6	65,5	56,5	58	54,5	51	66	57
M.O. ηλικίας ατόμων με το γονίδιο	42,3	42,6	-	-	-	55	45,3	39,5	69,3	49
M.O. ηλικίας πασχόντων	62	60,8	61,8	80,5	65	72	74,6	60	75	67
M.O. ηλικίας θανάτου	66,6	60,3	65	80,3	59,3	-	68	70,6	73,3	68

Πίνακας 3

Ηλικία έναρξης της νόσου για τα ζεύγη γονιού-παιδιού στις late-onset HD οικογένειες

	Μέση τιμή ηλικίας έναρξης ± S.E.M.	Άτομα με έναρξη ≥ 50 years	Άτομα με έναρξη ≥ 60 years
	Γονείς (N= 39)	55.8 ± 7.03	29/31 (94%)
Παιδιά (N= 39)	54.8 ± 8.46	31/39 (80%)	14/39 (36%)
Αλλαγή: γονιός-παιδί	0.97 ± 6.67		
Μητέρα (N = 18)	56.7 ± 5.06	13/14 (93%)	5/14 (36%)
Παιδιά (N = 18)	55.9 ± 6.78	15/18 (83%)	6/18 (33%)
Αλλαγή: γονιός-παιδί	0.83 ± 7.94		
Πατέρας (N= 21)	55.0 ± 8.71	11/13 (85%)	7/13 (54%)
Παιδιά (N = 21)	53.9 ± 9.9	15/21 (71%)	8/21 (38%)
Αλλαγή: γονιός-παιδί	1.1 ± 5.14		

Πίνακας 4. Ηλικία θανάτου σε γονείς και παιδιά σε late-onset HD οικογένειες

	M.O. ηλικίας θανάτου \pm S.D.
Γονείς: 24	68,21 \pm 8,47
Παιδιά: 24	66,63 \pm 12
Πατέρας: 12	67,5 \pm 9,49
Παιδιά: 14	65,71 \pm 12,99
Μητέρα: 12	68,92 \pm 7,67
Παιδιά: 10	68,3 \pm 12,02

1.2 Typical HD οικογένειες

Από τις 4 οικογένειες, που έχουν εντοπιστεί στην Κρήτη, με την τυπική μορφή της νόσου HD (έναρξη των συμπτωμάτων μετά τα 40 χρόνια), δύο οικογένειες (ΑΧ και ΚΟ) έχουν μελετηθεί. Η οικογένεια ΑΧ προέρχεται από το χωριό ΑΧ, ανατολικά του νομού Ρεθύμνης και η οικογένεια ΚΟ από το χωριό ΚΟ, δυτικά του νομού Ηρακλείου. Και τα δύο χωριά βρίσκονται στους πρόποδες του Ψηλορείτη, το ΑΧ στη βόρεια πλευρά και το ΚΟ στην ανατολική (**Εικόνα Κρήτης**). Οι δύο οικογένειες περιλαμβάνουν 106 μέλη, από τα οποία τα 17 εμφανίζουν την HD. Η μέση ηλικία έναρξης της ασθένειας είναι 41.06 ± 10.08 χρόνια. Η μέση ηλικία θανάτου από τη νόσο είναι $58 \pm 14,26$.

Η ηλικία έναρξης της νόσου είναι μικρότερη σε άτομα προσβεβλημένα που ζουν σε σχέση με την αντίστοιχη ηλικία ατόμων από προηγούμενες γενιές που έχουν πεθάνει. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με το φαινόμενο του anticipation που εμφανίζεται στις οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου (**Πίνακας 5**). Οι ηλικίες για κάθε οικογένεια απεικονίζονται στον **πίνακας 6**.

Πίνακας 5. Ηλικίες έναρξης των συμπτωμάτων και θανάτου σε άτομα που έχουν πεθάνει και ηλικίες έναρξης συμπτωμάτων ατόμων που ζουν

	M.O. ηλικίας έναρξης \pm S.D.	M.O. ηλικίας θανάτου \pm S.D.
Προσβεβλημένοι αποθανόντες (45)	44,10 \pm 8,91	58,00 \pm 14,26
Προσβεβλημένοι ζώντες (16)	36,00 \pm 12,57	

Η οικογένεια AX περιλαμβάνει 41 μέλη από τα οποία 11 νοσούν, 8 από αυτά έχουν πεθάνει και 3 νοσούν και βρίσκονται στη ζωή. Ένα άτομο φέρει το HD γονίδιο, αλλά δεν έχει εκδηλώσει τη νόσο ακόμα (τωρινή ηλικία 33 ετών). Η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι 44.5 ± 8 ενώ ο μέσος όρος ηλικίας θανάτου από τη νόσο είναι 55.14 ± 13.08 . Η οικογένεια KO περιλαμβάνει 65 άτομα, από τα οποία νοσούν 7, ενώ έχουν πεθάνει τα 3. Η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων είναι 35.3 ± 13.11 ενώ ο μέσος όρος ηλικίας θανάτου από τη νόσο είναι 64.67 ± 17.5 (Πίνακας 6).

Το φαινόμενο του anticipation εμφανίζεται και στις δύο οικογένειες. Στην οικογένεια AX έχουν καταγραφεί δύο ασθενείς με νεανική μορφή της HD, ενώ στην οικογένεια KO ένα τέτοιο άτομο.

Πίνακας 6. Ηλικίες ατόμων με την τυπική μορφή της νόσου HD			
	Typical onset HD οικογένειες		Σύνολο
	AX	KO	
Άτομα	41	65	106
Νοσούν	11	7	18
Νοσούν και ζουν	3	-	3
Έχουν πεθάνει	8	3	11
HD γονίδιο, χωρίς να νοσούν	1	-	1
M.O. ηλικίας έναρξης νόσου	43,5	35,3	40,6
M.O. ηλικίας ατόμων με το γονίδιο	30	-	30
M.O. ηλικίας πασχόντων	62	45	51
M.O. ηλικίας θανάτου	55,1	56	55,5

2. Μελέτη της επέκτασης της CAG επανάληψης

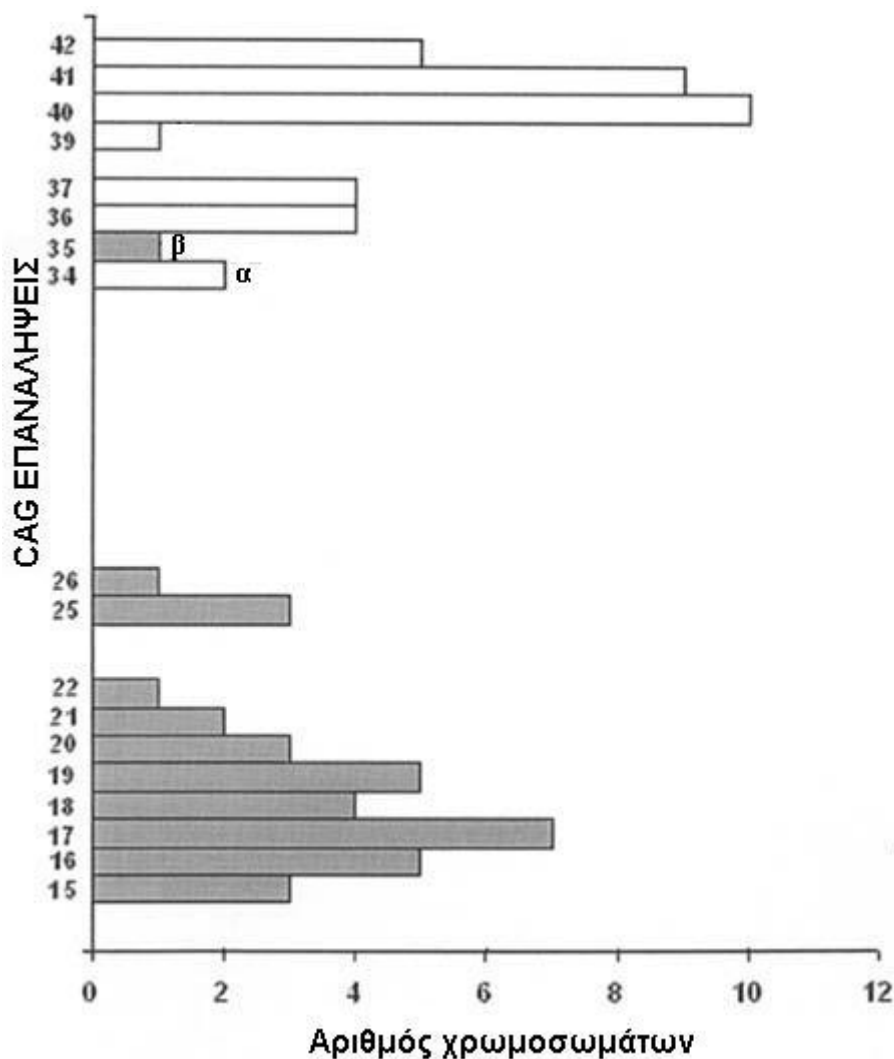
2.1 Late-onset HD γενεαλογικά δέντρα:

Το DNA των ασθενών με αντίδραση PCR, αναλύθηκε ως προς τον αριθμό των τριπλετών (CAG)_n σε 33 από τα 61 άτομα των οικογενειών (που νοσούν ή είναι σε υψηλό κίνδυνο για εκδήλωση της νόσου), καθώς και σε 19 υγιή άτομα από τις ίδιες οικογένειες. Η DNA ανάλυση έδειξε ότι 19 προσβεβλημένα άτομα είχαν επέκταση του (CAG)_n, ενώ 14 άτομα με υψηλό κίνδυνο για την εκδήλωση της νόσου, έδειξαν επίσης μια επιμήκυνση της (CAG)_n επανάληψης στα ίδια όρια με τα προσβεβλημένα άτομα.

Σε ένα αριθμό 33 HD late-onset χρωμοσωμάτων το μέγεθος της CAG επανάληψης κυμαίνεται από 36-42. Περισσότερα δε από τα 2/3 αυτών των αλληλομόρφων έχουν ≥ 40 CAG επαναλήψεις (**Εικόνα 2**). Το μέγεθος της επέκτασης της (CAG)_n επανάληψης δείχνει σταθερό, εκτός από μερικές εξαιρέσεις, μέσα στην κάθε οικογένεια και ήταν αντιστρόφως ανάλογο με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της ασθένειας. Αυτή η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του μήκους της CAG επανάληψης και της ηλικίας έναρξης της ασθένειας ($r=0.74$), φαίνεται στην **εικόνα 3**.

Στην οικογένεια MA παρατηρείται σε δύο άτομα υψηλού κινδύνου για εκδήλωση της νόσου (με ένα γονέα που έχει εκδηλώσει HD) να κληρονομούν αλληλόμορφο με 34 CAG επαναλήψεις, τα οποία προήλθαν από συστολή του πατρικού HD χρωμοσώματος που φέρει 36 CAG επαναλήψεις. Τα δύο άτομα αυτά μέχρι στιγμής (ηλικίας 84 και 51 ετών) δεν έχουν εκδηλώσει κανένα σύμπτωμα της νόσου. Το μήκος των φυσιολογικών αλληλομόρφων στα άτομα που έφεραν ένα HD χρωμόσωμα κυμαίνεται από 15 έως 25 επαναλήψεις (μέση τιμή:19). Ένας HD ασθενής (BRG-16) με 41 CAG επαναλήψεις είχε στο φυσιολογικό αλληλόμορφο 35 CAG επαναλήψεις (που χαρακτηρίζεται ενδιάμεσο μέγεθος). Η κατανομή των CAG επαναλήψεων στους HD ασθενείς καθώς και οι ηλικίες έναρξης της νόσου και θανάτου για όσους έχουν πεθάνει φαίνονται στις **εικόνες 4-12**.

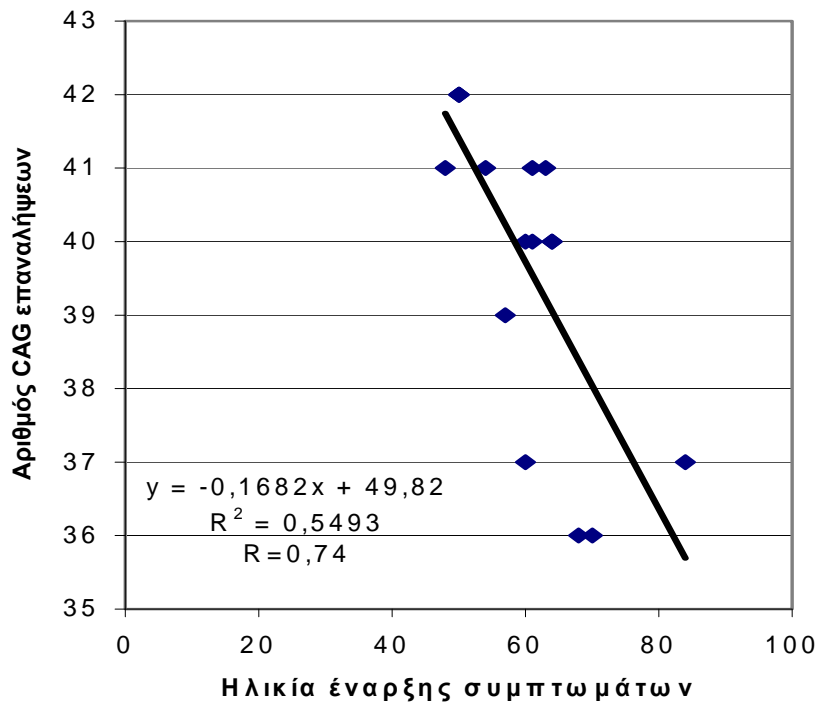
Σε 3 μεταβιβάσεις παρατηρείται μείωση του μεγέθους της CAG επανάληψης κατά μία τριπλέτα στα δέντρα BR1 και BR3 (**εικόνα 4 και 6**) και σε μία μεταβίβαση μείωση του μεγέθους κατά 2 τριπλέτες. Η τελευταία μεταβίβαση γίνεται από 36 CAGs από άτομο που νοσεί σε 34 CAGs σε άτομο που δεν έχει εκδηλώσει τη νόσο (ηλικία 51 ετών) (δέντρο MA, **εικόνα 12**).



Εικόνα 2: Κατανομή των CAG επαναλήψεων σε HD χρωμοσώματα και σε φυσιολογικά χρωμοσώματα από late-onset HD ασθενείς. α: προήλθε από συστολή από ένα αλληλόμορφο με 36 επαναλήψεις (βλ. γενεαλ. δέντρο MA). β: «φυσιολογικά» αλληλόμορφο από ένα HD ασθενή με 41 CAG επαναλήψεις στο παθολογικό αλληλόμορφο. Οι σκούρες μπάρες αναπαριστούν τον αριθμό των φυσιολογικών χρωμοσωμάτων, ενώ οι λευκές μπάρες αναπαριστούν τα HD χρωμοσώματα.

Σε μία μεταβίβαση παρατηρείται αύξηση του μεγέθους κατά 1 τριπλέτα και σε μία αύξηση κατά 2 τριπλέτες (δέντρο PE, **εικόνα 11**). Η απόκλιση του αριθμού του (CAG) ανάμεσα στις οικογένειες είναι μικρή.

Σε τρεις μεταβιβάσεις από γονέα σε παιδί και σε εγγόνι (οικογένειες BR 1 και BR3), η CAG επανάληψη δεν είχε αλλάξει μέσω τριών γενεών. Όμως σε μία από τις τρεις μεταβιβάσεις στην οικογένεια BR1, η επανάληψη μειώνονταν σε μέγεθος (από 37 σε 36 CAG επαναλήψεις) κατά τη μεταφορά του από την πρώτη στην δεύτερη γενιά και έπειτα περνούσε στην τρίτη χωρίς καμία αλλαγή (36 CAG επαναλήψεις). Αξίζει να σημειωθεί ότι το άτομο της πρώτης γενιάς εμφάνισε τη νόσο στα 84 χρόνια του.



Εικόνα 3: Σύγκριση του μήκους της CAG επανάληψης και ηλικίας έναρξης σε ασθενείς με την late-onset μορφή της HD στην Κρήτη.

Μελετήθηκαν 14 μειωτικές μεταβιβάσεις της CAG επανάληψης (εννέα πατρικές και πέντε μητρικές). Σε δώδεκα από αυτές, η μεταβίβαση της CAG επανάληψης έχει γίνει σε ασυμπτωματικά παιδιά (που φέρουν το HD γονίδιο), ενώ δύο σε παιδιά που έχουν εκδηλώσει τη νόσο (**Πίνακας 7**). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επανάληψη πέρασε χωρίς να τροποποιηθεί σε 8 από τις 14 μεταβιβάσεις (57%), ενώ στις υπόλοιπες 6 (43%) άλλαξε ελαφρώς (επέκταση ή συστολή κατά 1 με 2 επαναλήψεις) **Πίνακας 8**.

Μια άλλη παρατήρηση έδειξε ότι το μέγεθος της CAG επανάληψης μεταξύ αδελφών (siblings) δεν διαφέρει ή διαφέρει κατά μία τριπλέτα (**Πίνακας 9**). Μια παρατήρηση διαφορετική απ' αυτές σε άλλα περιστατικά από τον υπόλοιπο κόσμο, αλλά και από άλλες περιοχές της Ελλάδας.

Πίνακας 7.**Μειωτικές μεταβιβάσεις σε late-onset οικογένειες**

	Γονιός	μεταβίβαση	Ηλικία έναρξης	Ηλικία θανάτου	(CAG)n		Παιδί	Ηλικία έναρξης	(CAG)n
affected	BRA-1	M	84	92	37/17	unaffected	BRA-2		37/21
affected	BRA-1	M	84	92	37/17	unaffected	BRA-3		36/17
unaffected	BRA-2	P			37/21	unaffected	BRA-4		37/20
unaffected	BRA-3	P			36/17	unaffected	BRA-5		36/17
affected	AMB-1	P	65		41/25	unaffected	AMB-2		41/25
affected	AMB-1	P	65		41/25	unaffected	AMB-3		41/16
affected	AMB-1	P	65		41/25	unaffected	AMB-4		40/25
affected	BRC-1	P	64		40/20	affected	BRC-3	59	40/22
affected	BRC-3	M	59		40/22	affected	BRC-5	43	40/21
affected	BRG-1	P	50		42/16	unaffected	BRG-5		42/17
affected	BRG-2	M	50		42/16	unaffected	BRG-4		41/26
affected	SAB-4	P	57		39/18	unaffected	SAB-1		40/17
affected	SAB-4	P	57		39/18	normal	SAB-2		41/17
affected	MAN-1	M	68	80	36/18	normal	MAN-4		34/17

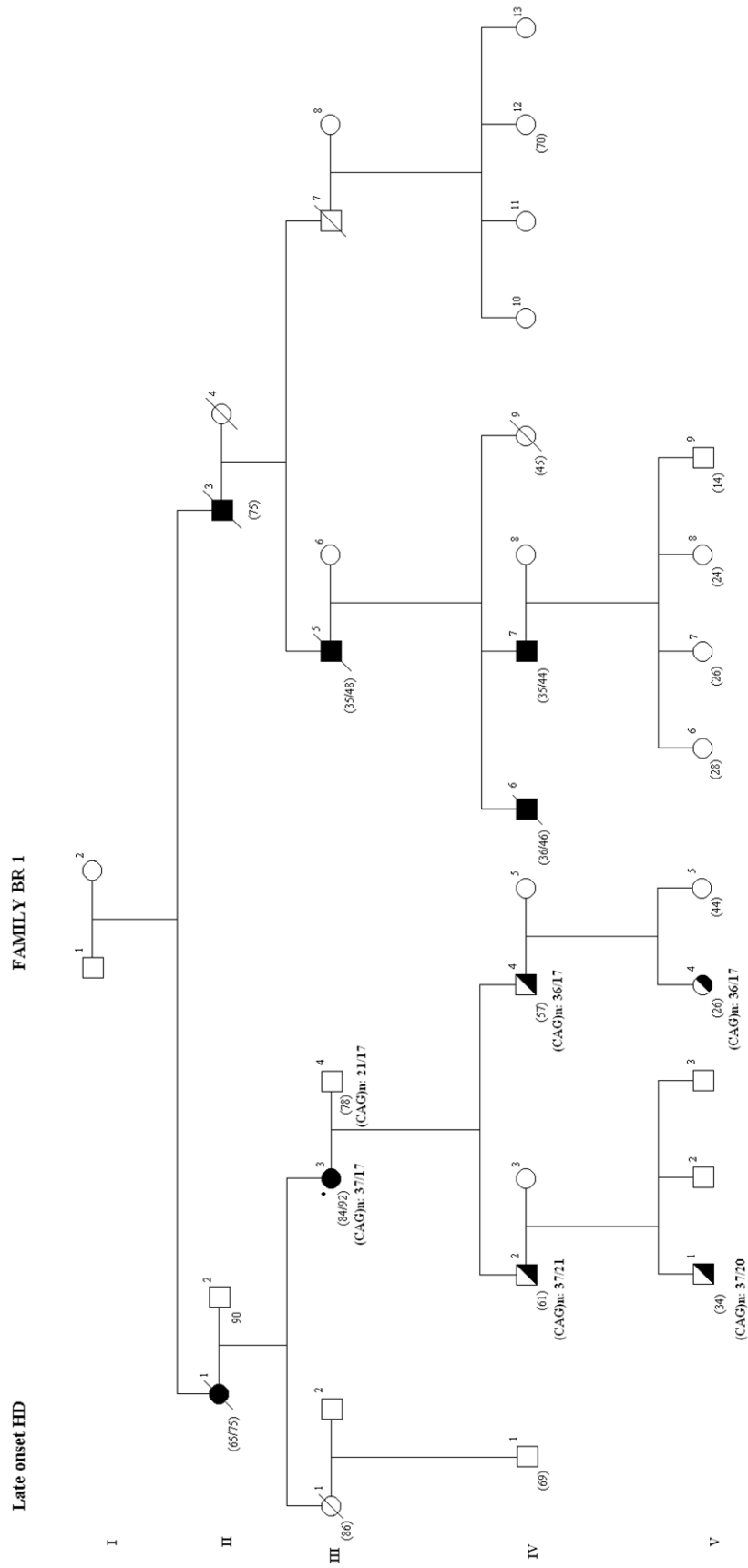
Πίνακας 8**Μειωτικές μεταβιβάσεις της αυξημένης CAG επανάληψης**

A. Οικογένειες με late-onset HD:	Πατρική	Μητρική	Σύνολο
Ίδιο μέγεθος (CAG)n	6	2	8
Συστολή κατά 1 CAG	1	2	3
Συστολή κατά 2 CAGs	-	1	1
Επέκταση κατά 1 CAG	1	-	1
Επέκταση κατά 2 CAGs	1	-	1
Σύνολο	9	5	14
B. Οικογένειες με τυπική μορφή HD:	Πατρική	Μητρική	Σύνολο
Επέκταση κατά 3 CAGs	1	-	1
Επέκταση κατά 13 CAGs	1	-	1
Σύνολο	2		2

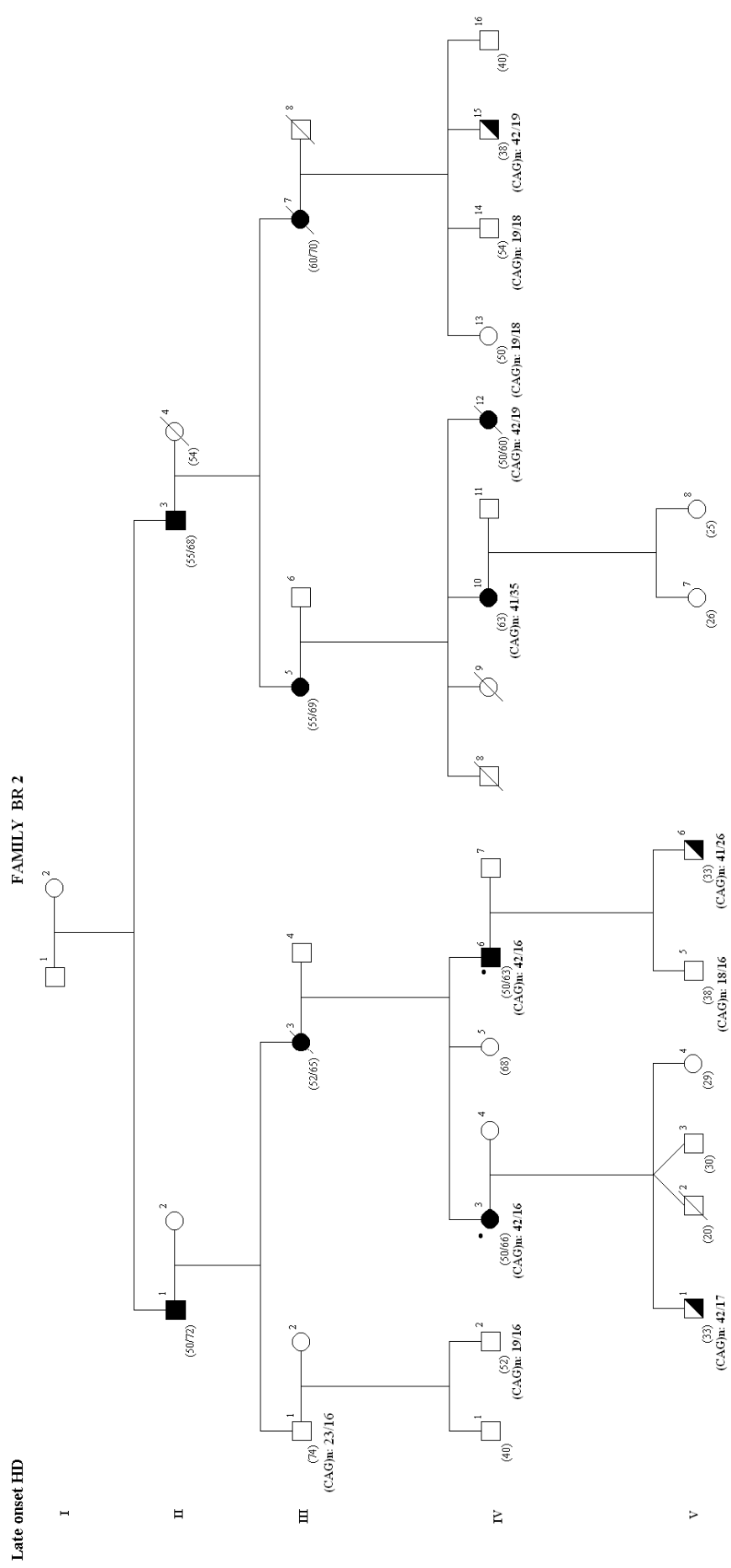
Πίνακας 9. CAGs ανάμεσα σε αδέρφια						
Late-onset οικογένειες						
Οικογένεια		Άτομο	Ηλικία έναρξης	Ηλικία θανάτου	Τωρινή ηλικία*	(CAG)n
BR-1	HD gene	BRA-2			61	37/21
	HD gene	BRA-3			57	36/17
BR-2 **	affected	BRG-1	50		66	42/16
	affected	BRG-2	50		63	42/16
	Normal	BRG-3			38	18/16
	HD gene	BRG-4			33	41/26
	Normal	BRG-12			54	19/18
	Normal	BRG-13			50	19/18
	HD gene	BRG-14			38	42/19
BR-3	Normal	BRC-2			66	22/18
	affected	BRC-3	59		63	40/22
	Normal	BRC-4			51	21/21
	affected	BRC-5	43		46	40/21
	Normal	BRC-6			34	22/18
BR-4	affected	BRD-1	61		77	40/18
	Normal	BRD-2			82	22/18
BR-6	Affected	BRF-1	58		74	40/18
	Normal	BRF-2			64	25/24
	HD gene	BRF-3			60	40/19
	HD gene	BRF-4			54	40/18
AM	HD gene	AMB-2			52	41/25
	HD gene	AMB-3			45	41/16
	HD gene	AMB-4			44	40/25
	Affected	AMB-6	63		78	41/19
	Affected	AMB-7	53		75	40/19
	Normal	AMB-9			64	19/19
PE	HD gene	SAB-1			38	40/17
	HD gene	SAB-3			43	41/17
MA	Affected	MAN-1	68	80		36/16
	Affected	MAN-5	70		75	36/15
	Affected	MAN-2	60	72		37/15

* Οι τωρινές ηλικίες αναφέρονται σε μέτρηση το 2005.

** Οι αγκύλες περιλαμβάνουν τα αδέρφια από την ίδια οικογένεια.



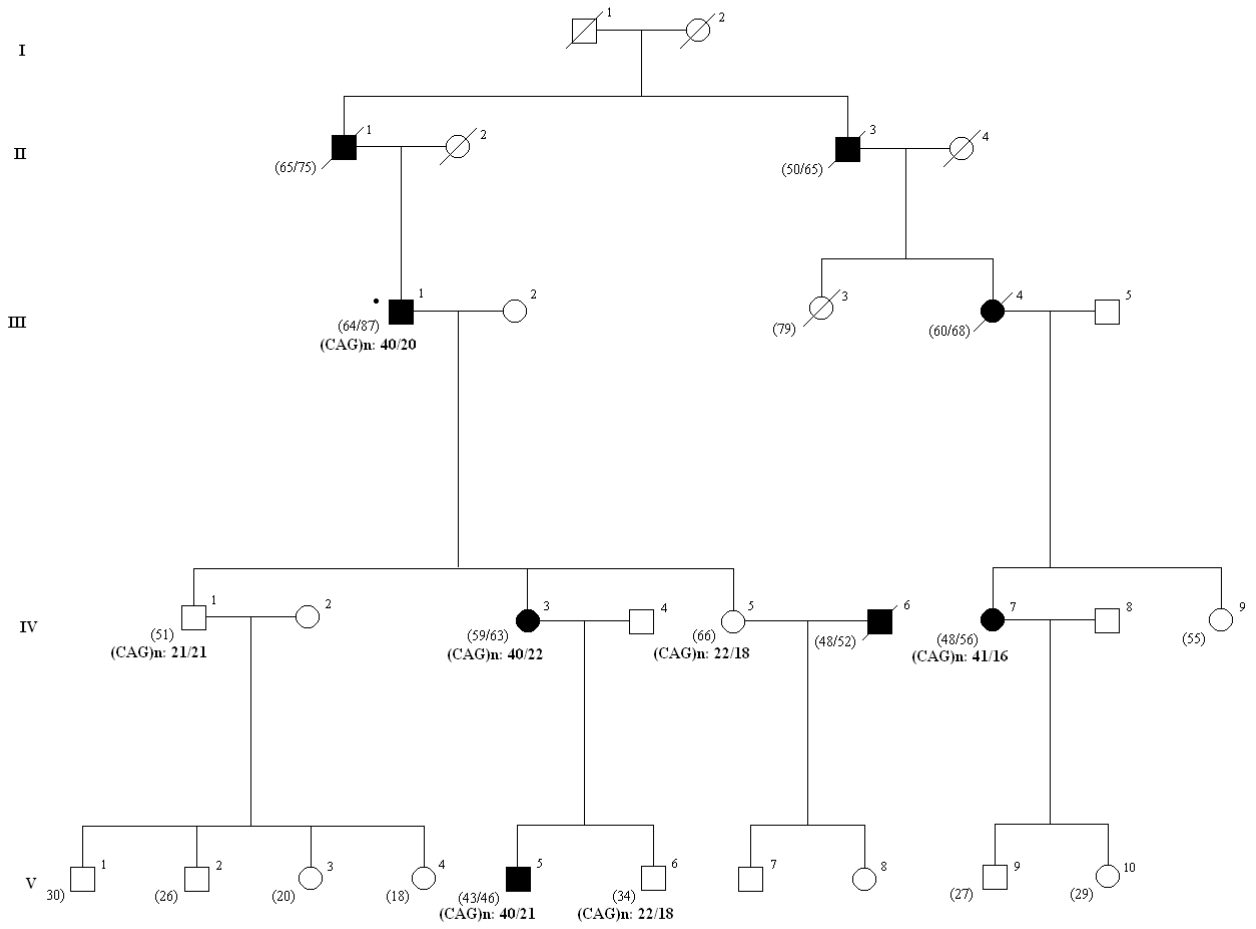
Εικόνα 4. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR1 με καταγωγή από το BR



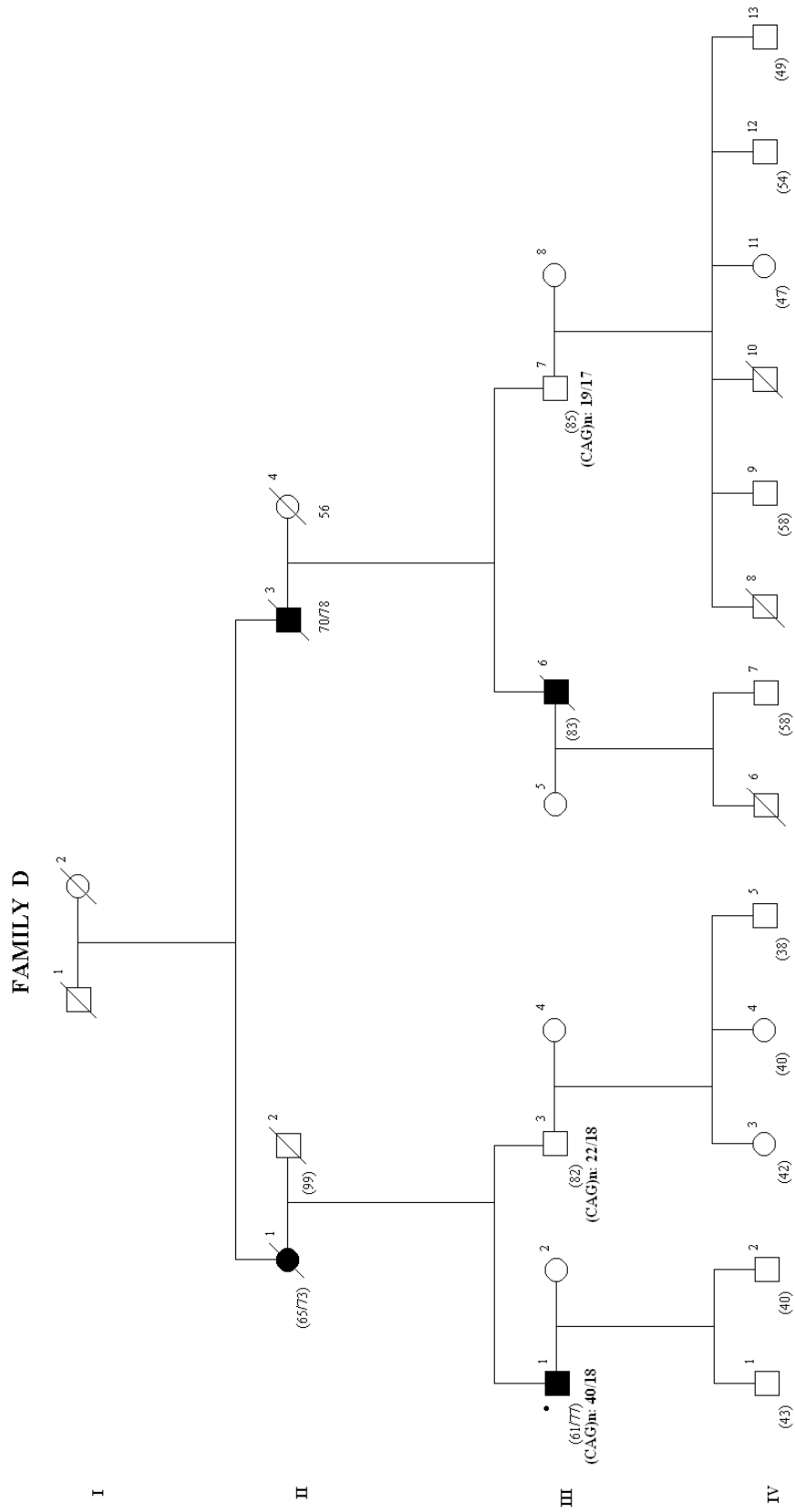
Εικόνα 5. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR2 με καταγωγή από το BR

Late onset HD

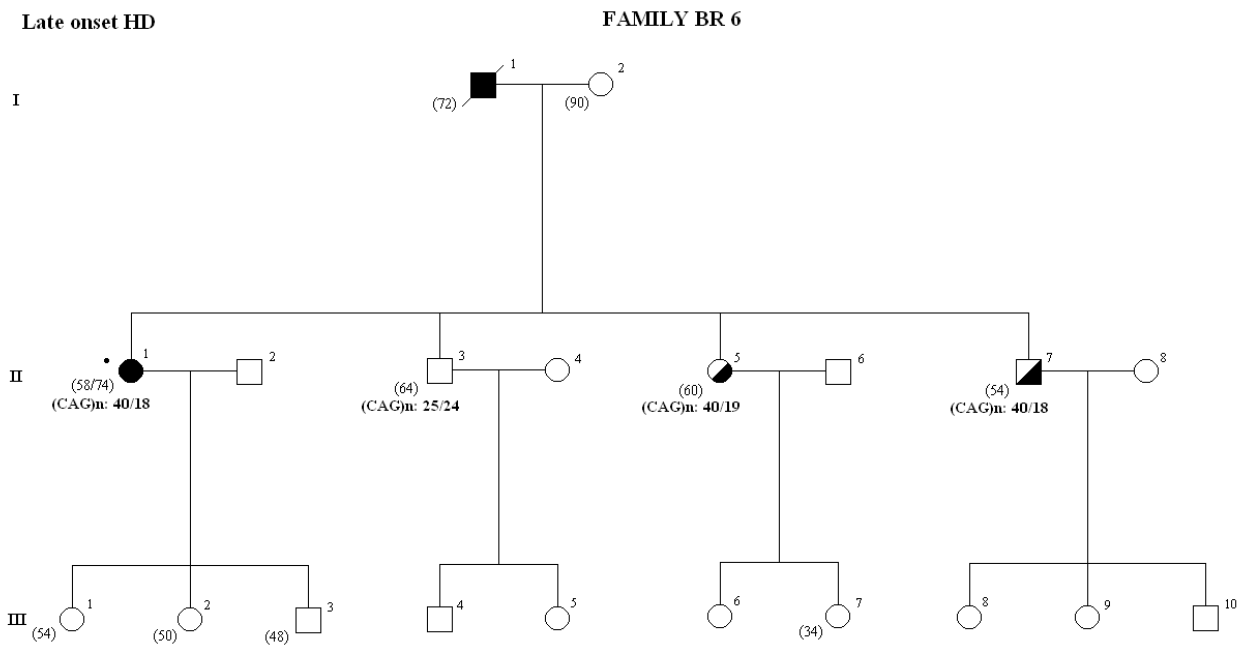
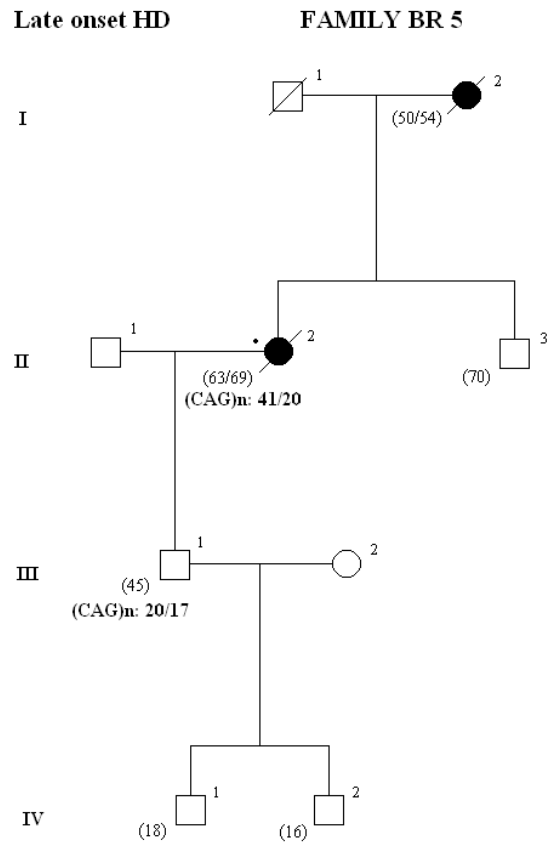
FAMILY BR 3



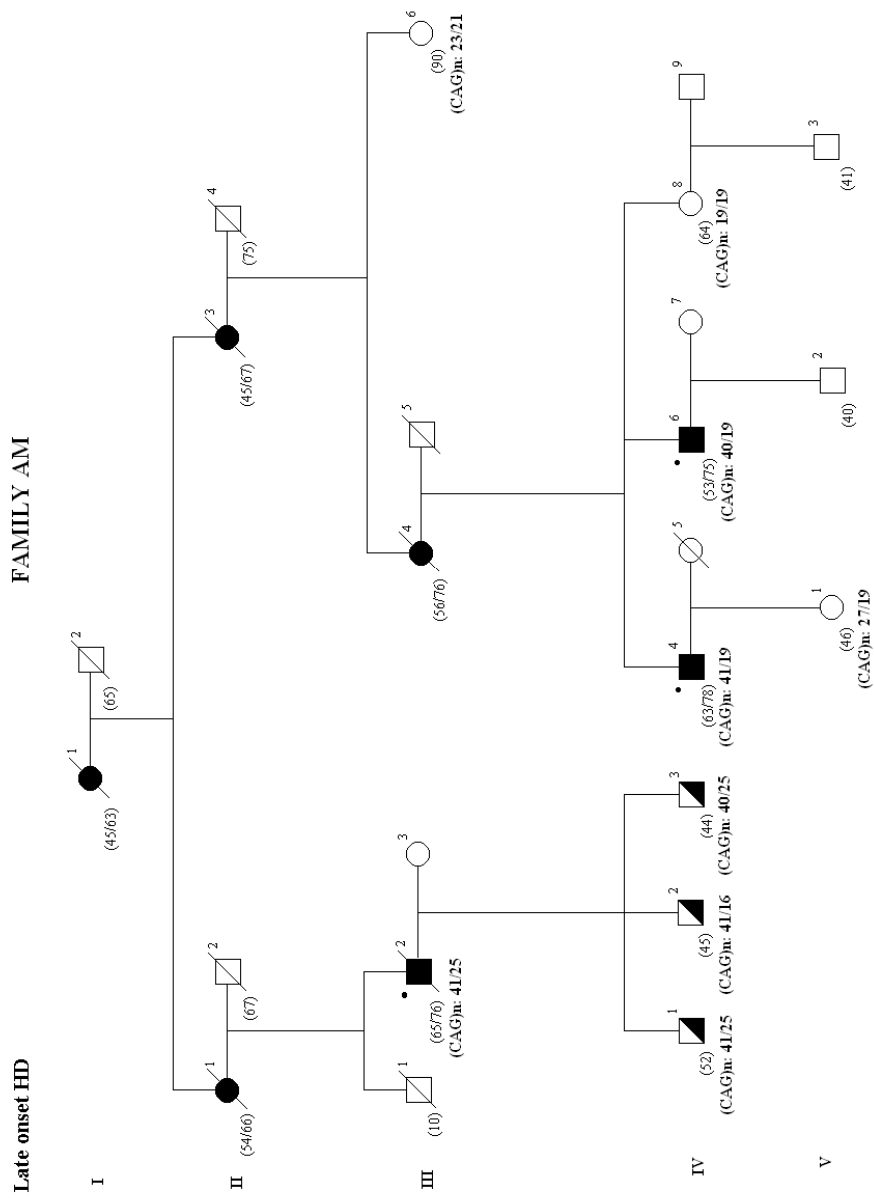
Εικόνα 6. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR3 με καταγωγή από το BR



Εικόνα 8. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR4 με καταγωγή από το BR



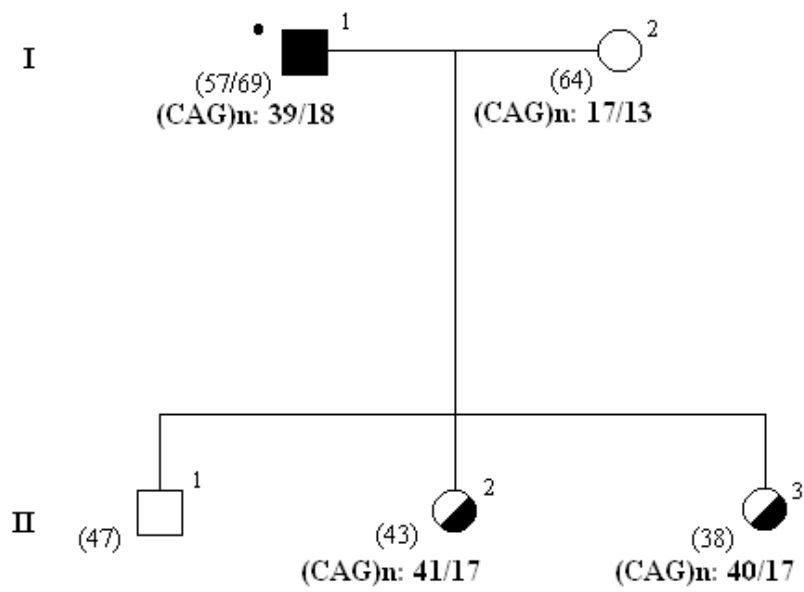
Εικόνα 9. Late-onset HD. Οικογενειακά δέντρα BR5 και BR 6 με καταγωγή από το BR



Εικόνα 10. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο AM με καταγωγή από το AM

Late onset HD

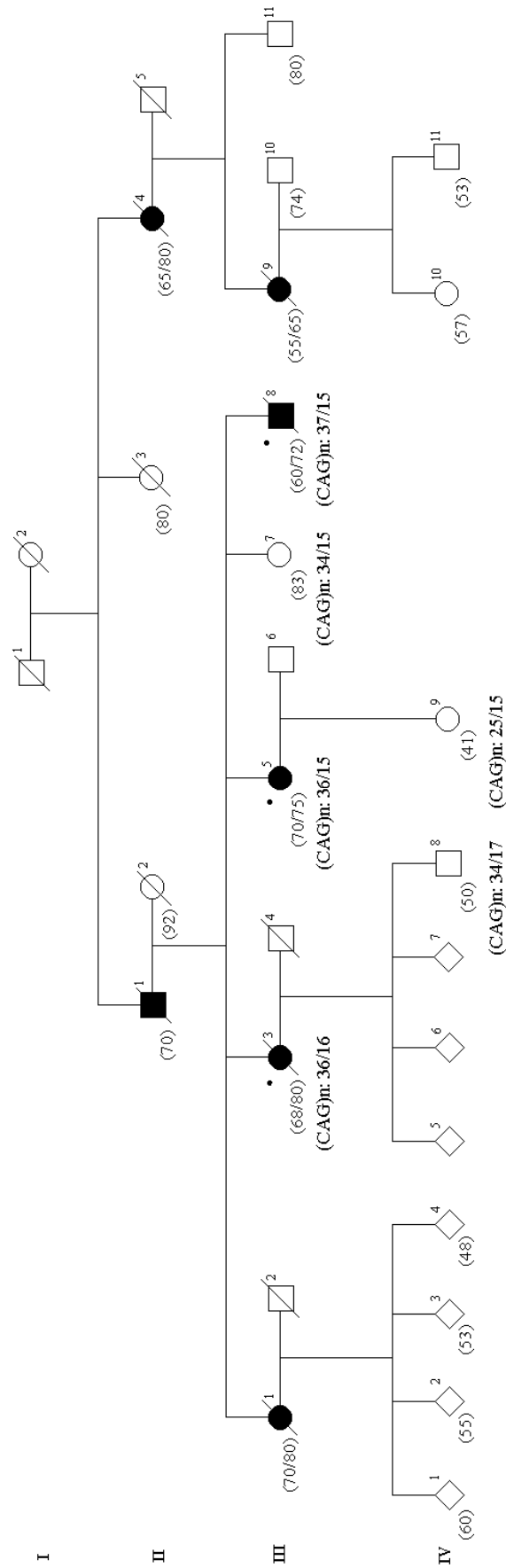
FAMILY PE



Εικόνα 11. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο PE με καταγωγή από το PE

FAMILY MA

Late onset HD



Εικόνα 12. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο MA με καταγωγή από τον MA

2.2 Typical HD γενεαλογικά δέντρα:

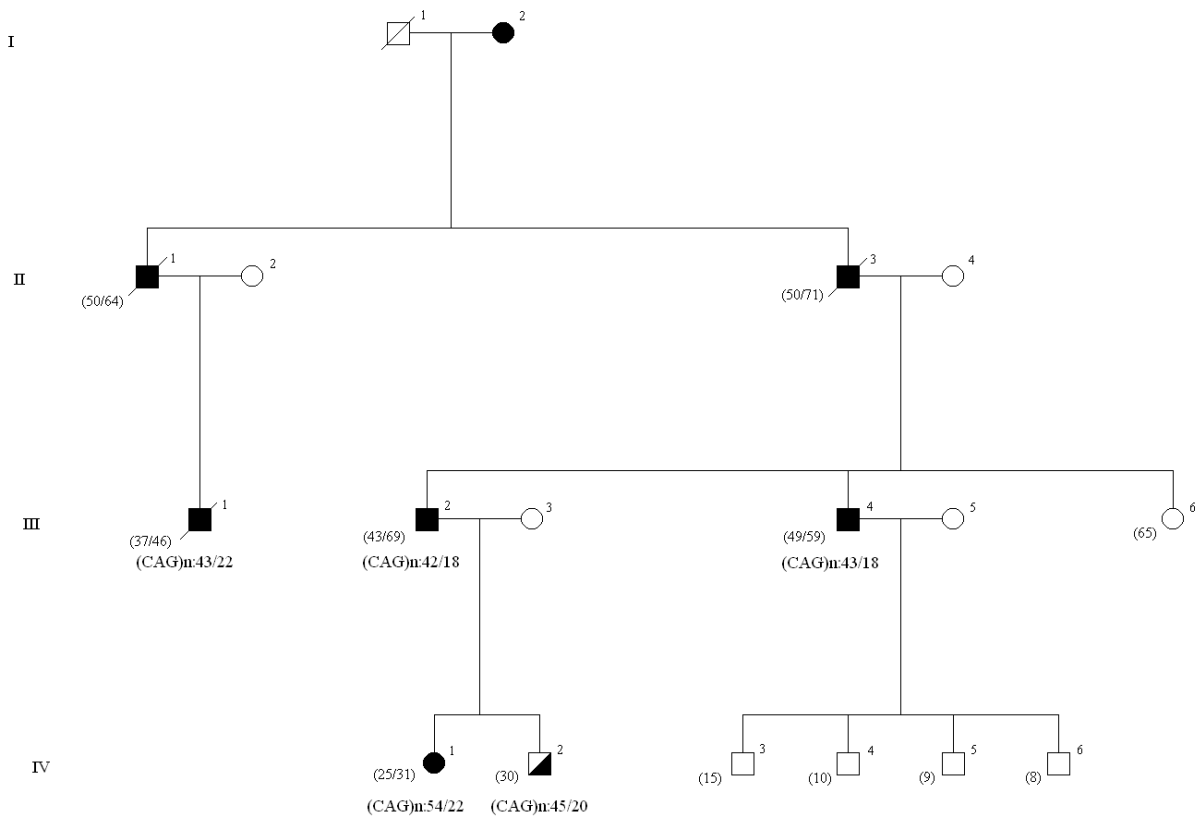
Σε ένα αριθμό 8 HD typical-onset χρωμοσωμάτων το μέγεθος της CAG επανάληψης κυμαίνεται από 37-54 (μέση τιμή: 42). Το μήκος των φυσιολογικών αλληλομόρφων στα άτομα που έφεραν ένα HD χρωμόσωμα κυμαίνεται από 14 έως 22 επαναλήψεις (μέση τιμή:18). Στις δύο οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου δεν παρατηρείται καμία συστολή της τριπλέτες κατά την μεταβίβαση από γονιό σε παιδί (πίνακας 8). Σε δύο μειωτικές μεταβιβάσεις που αναλύθηκαν, η CAG επανάληψη επεκτάθηκε κατά 3 επαναλήψεις στην μία μεταβίβαση και στη δεύτερη κατά 13 (Πίνακας 8, 10). Η επέκταση των 13 επαναλήψεων παρατηρήθηκε στο άτομο με την νεανική μορφή της νόσου. Επιπλέον δεν εμφανίζονται άτομα με ενδιάμεσα αλληλόμορφα (CAG=35), όπως στις late-onset οικογένειες. Η κατανομή των CAG επαναλήψεων στους HD ασθενείς καθώς και οι ηλικίες έναρξης της νόσου και θανάτου για όσους έχουν πεθάνει φαίνονται στην **εικόνα 13**. Αν συγκρίνουμε τις CAG επαναλήψεις μεταξύ αδελφών παρατηρούνται από μικρές (μία τριπλέτα) έως μεγάλες διαφορές (13 τριπλέτες) στην οικογένεια AX. Ενώ στην οικογένεια KO τα δύο αδέλφια που μελετήθηκαν και πάσχουν έχουν τον ίδιο αριθμό CAG επαναλήψεων (Πίνακας 11). Τα αποτελέσματα αυτά στις τυπικές HD οικογένειες της Κρήτης είναι παρόμοια με αυτά που έχουν δημοσιευθεί παγκοσμίως και είναι διαφορετικά από αυτά που καταγράφηκαν στις late-onset οικογένειες.

Πίνακας 10.									
Μειωτικές μεταβιβάσεις σε typical- onset οικογένειες									
	Γονιός					Παιδί			
		Μεταβί- βαση	Ηλικία έναρξης	Ηλικία θανάτου	(CAG)n		Ηλικία έναρξης	Ηλικία θανάτου	(CAG)n
affected	AXH-3	P	43		42/18	AXH-4	25	31	54/22
affected	AXH-3	P	43		42/18	AXH-5			45/20

Πίνακας 11. CAGs ανάμεσα σε αδέλφια							
Typical form							
Οικογένεια		Άτομο	Ηλικία έναρξης	Ηλικία θανάτου	Τωρινή ηλικία	(CAG)n	
AX	}	affected	AXH-3	43		70	42/18
		affected	AXH-1	49		61	43/18
		Affected	AXH-4	25	31		54/22
		HD gene	AXH-5			30	45/20
KO		Affected	B-84	21		25	42/17
		Affected	Sp12	21		24	42/17

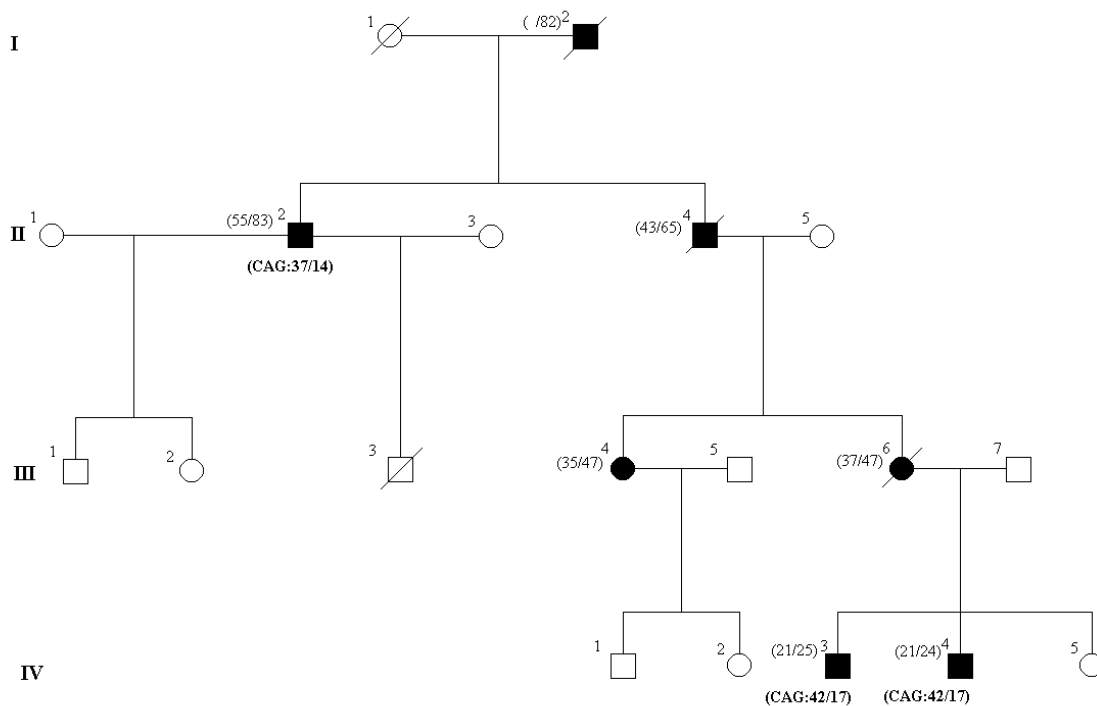
Typical onset HD

FAMILY AX



Typical onset HD

FAMILY KO



Εικόνα 13. Typical onset HD. Οικογένειες AX και KO με καταγωγή από τα χωριά AX και KO αντίστοιχα.

3. Γενετική ανάλυση (STRs και SNPs)

Κατ' αρχήν διερευνήσαμε κατά πόσον οι οικογένειες με καθυστερημένη ηλικιακή έναρξη της HD νόσου σχετίζονται με μια αρχική μετάλλαξη (founder effect) και για τον σκοπό αυτό καθορίσαμε τους απλότυπους των οικογενειών χρησιμοποιώντας πολυμορφικούς δείκτες. Οι μελέτες αυτές συμπεριλαμβάνουν και οικογένειες που έχουν την τυπική μορφή της HD νόσου.

Για την απλοτυπική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν STRs δείκτες που εδράζονται στην περιοχή 4p16.3 του 4^{ου} χρωμοσώματος, οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό στον γενικό πληθυσμό, κάτι που επιβεβαιώνεται και στους πληθυσμούς της Κρήτης (πίνακες 13,14,16,17). Η επιλογή τους έγινε με βάση τη θέση τους σε σχέση με το HD γονίδιο (upstream και downstream του γονιδίου, αλλά και εσωτερικά του γονιδίου), αλλά και βάση του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν στον γενικό πληθυσμό.

Δείκτες με υψηλό πολυμορφισμό σε ένα πληθυσμό μπορούν να μας βοηθήσουν στη δημιουργία πολλών και διαφορετικών απλοτύπων. Οι απλότυποι καταδεικνύουν τη συσχέτιση των δεικτών με το γονίδιο και κατά πόσο ένας δείκτης συνκληρονομείται με το γονίδιο. Για να προσδιοριστεί η ελάχιστη εκείνη περιοχή γύρω από το γονίδιο που είναι κρίσιμη για την εκδήλωση και κληρονόμηση της νόσου στους late-onset ασθενείς από την Κρήτη επιλέχθηκαν δείκτες που βρίσκονται σχετικά κοντά στο γονίδιο. Αν οι δείκτες μας βρίσκονταν μακριά από το HD γονίδιο, τότε αυξάνεται και η πιθανότητα του ανασυνδιασμού. Εκτός από τους STRs δείκτες χρησιμοποιήθηκαν και SNPs ενδογονιδιακά για τον έλεγχο πιθανών πολυμορφισμών εντός του γονιδίου.

Τα DNA από τους ασθενείς, αλλά και από φυσιολογικά άτομα αναλύθηκε με αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης όπου αναπαράγουμε το τμήμα εκείνο του DNA που εμπεριέχει τον πολυμορφικό δείκτη. Οι διαφορές στα προϊόντα του PCR για κάθε δείκτη μας επιτρέπει να διακρίνουμε τους πολυμορφισμούς μέσα στον πληθυσμό και να καταλήξουμε έτσι σε συγκεκριμένους απλότυπους. Στη μελέτη των SNPs τα PCR προϊόντα επεξεργάστηκαν ενζυμικά, με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση. Αν κοπεί ή όχι το προϊόν δηλώνει την παρουσία του ενός ή του άλλου αλληλομόρφου για το συγκεκριμένο SNP.

Πιο συγκεκριμένα έγινε έλεγχος σε 6 δείκτες (D4S3038, D4S43, D4S136, D4S182, D4S95, D4S127), upstream του HD γονιδίου (προς το τελομερές) 2 ενδογονιδιακούς (Δ2642, D4S1337) και 6 (D4S180, D4S3034, D4S126, ADRA2C, D4S2925, D4S431) downstream του γονιδίου (προς το κεντρομερές) καθώς και σε 21

SNPs. Από την μελέτη μας αποκλείστηκαν για περαιτέρω ανάλυση ο ενδογονιδιακός δείκτης D4S1337, οι δείκτες D4S180 και D4S2925 που βρίσκονται καθοδικά του HD γονιδίου και 9 από τα 21 SNPs, γιατί δεν παρουσίασαν υψηλό πολυμορφισμό στους HD ασθενείς μας και στα άτομα ελέγχου που μελετήσαμε.

Οι έξι 11 εξωγονιδιακοί πολυμορφικοί δείκτες είναι δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ενώ ο Δ2642 αναφέρεται σε μια έλλειψη της τριπλέτας (GAG) στο εξόνιο 58 και στη θέση 2642. Όλοι οι STR και SNP δείκτες, οι θέσεις τους στην 4p16.3 περιοχή, οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στους **πίνακες 1 και 2** στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι).

Η απλοτυπική ανάλυση έγινε στα άτομα των οικογενειών (late-onset και typical) και σε άτομα ελέγχου από τον γενικό πληθυσμό της Κρήτης και από άλλους πληθυσμούς. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν 57 άτομα από τον γενικό πληθυσμό της Κρήτης (114 χρωμοσώματα). Τα άτομα αυτά δεν έχουν συγγένεια μεταξύ τους και η επιλογή τους έγινε τυχαία. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης άλλα 44 άτομα από άλλους πληθυσμούς (88 χρωμοσώματα). Όλα τα άτομα ελέγχου δεν παρουσιάζουν νευρολογικά συμπτώματα. Από τις late-onset οικογένειες έγινε απλοτυπική ανάλυση σε 33 άτομα που έχουν εκδηλώσει την νόσο ή φέρουν το HD γονίδιο, αλλά είναι ασυμπτωματικοί (συνολικά 33 HD και 33 φυσιολογικά χρωμοσώματα), ενώ από τις typical onset οικογένειες ελέγχθηκαν 9 άτομα (9 HD και 9 φυσιολογικά χρωμοσώματα). Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα ποσοστά που καταγράφηκαν για τους συγκεκριμένους δείκτες. Τα αλληλόμορφα που έχουν καταγραφεί βιβλιογραφικά δεν συναντώνται όλα στις οικογένειες μας. Όσα αλληλόμορφα εμφανίζονται, διαφοροποιούνται μεταξύ των late-onset και typical onset οικογενειών, ενώ σε ορισμένους δείκτες φαίνονται διαφορές μεταξύ των ατόμων ελέγχου και των ατόμων που νοσούν.

Πίνακας 12						
Απόκλιση των ενδογονιδιακών SNPs στους HD ασθενείς και οι συχνότητες τους στα άτομα ελέγχου από την Κρήτη						
SNP	Θέση στο HD γονίδιο	Εντοπισμός στο HD γονίδιο (Kb)	Αλλαγή	Late-onset HD	Conventional HD	Συχνότητες (%) στα άτομα ελέγχου από την Κρήτη
rs2024115	ιντρόνιο 3	3141	C/T	T	T	T: 75.9 C: 24.1
rs1065745	εξώνιο 9	3159	C/T	C	C	C: 97.8 T: 2.2
rs363099	ιντρόνιο ^{N.P}		A/G	A	A	A: 83.6 G: 16.4
rs363124	εξώνιο 39	3226	A/G	A	A	A: 87.3 G: 12.7
rs362277	ιντρόνιο 51	3255	G/A	A	G	A: 39.2 G: 60.8
rs3025814	ιντρόνιο 55	3261	C/G	G	C	G: 64.8 C: 35.2
rs82334	ιντρόνιο 55	3262	A/C	A	A	A: 88.3 C: 11.7
rs82332	ιντρόνιο 55	3262	A/G	A	A	A: 89.3 G: 10.7
rs110501	ιντρόνιο 55	3262	A/G	A	A	A: 72.8 G: 27.2
rs2530596	ιντρόνιο 61	3273	A/G	A	G	A: 46.5 G: 53.5
rs362310	ιντρόνιο 64	3276	G/A	G	G	G: 13.5 A: 86.5
rs2237008	εξώνιο 67	3281	G/A	G	G	G: 97 A: 3

^{N.P} Not placed according to Sanger institute - Ensembl Genome Browser database.

Εννέα επιπλέον SNPs που χαρτογραφούνται σ' αυτή την περιοχή μελετήθηκαν. Αποκλείστηκαν όμως από την μελέτη μας, γιατί δεν είναι πολυμορφικά στα άτομα ελέγχου, αλλά και στους HD ασθενείς

Πίνακας13. SNPs που αποκλείστηκαν από την μελέτη μας, λόγω χαμηλής ετεροζυγωτίας στον HD ασθενείς μας.		
SNP	Θέση στο HD γονίδιο	
3025852	ιντρόνιο 16	
363150	ιντρόνιο 25	
3025843	εξώνιο 27	
363147	ιντρόνιο 28	
3025835	ιντρόνιο 31	
363126	ιντρόνιο 36	
363125	εξώνιο 39	
2858081	Ιντρόνιο 65	
362299	εκτός γονιδίου	

Στον **πίνακα 12** φαίνονται οι θέσεις των SNPs εντός του γονιδίου, τα αλληλόμορφα που συναντώνται στον πληθυσμό, (όπως έχουν καταγραφεί στις databases), τα αλληλόμορφα στους HD ασθενείς της Κρήτης, καθώς και οι συχνότητες τους στα άτομα ελέγχου από την Κρήτη. Για τα SNPs rs2024115, rs1065745, rs363099, rs363124, rs82334, rs82332, rs110501 και rs2237008 παρατηρούμε ότι τα αλληλόμορφα που εμφανίζονται στους HD ασθενείς από όλες τις οικογένειες είναι αυτά που παρουσιάζουν και την μέγιστη συχνότητα στα υγιή άτομα ελέγχου. Διαφοροποίηση παρατηρείται μόνο στο SNP rs362310, ενώ για τα rs362277, rs3025814 και rs2530596 το αλληλόμορφο που επικρατεί στο γενικό πληθυσμό εμφανίζεται άλλοτε στους late-onset HD ασθενείς και άλλοτε στους conventional onset ασθενείς. Τα τρία τελευταία άλλωστε SNPs είναι αυτά που διαφοροποιούνται μεταξύ των late-onset και των conventional οικογενειών.

Πίνακας 13. Παρατηρούμενες συχνότητες των αλληλομόρφων για τους STR δείκτες σε άτομα που νοσούν και σε φυσιολογικά. Από τα ασθενή άτομα ελέχθησαν τα HD και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα χωριστά.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟ-ΜΟΡΦΟ	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (57), (114 ΧΡΩΜ.)	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ (44)	LATE ONSET HD ΧΡΩΜ. (33)	LATE ONSET ΦΥΣΙΟΛΟΓ. ΧΡΩΜ. (33)	TYPICAL FORM HD ΧΡΩΜΟΣ.. (9)	TYPICAL FORM ΦΥΣΙΟΛ. ΧΡΩΜ. (9)
D4S3038	229bp		2%				
	227bp	2,1%	6%		6,06%		22,2%
	225bp	10,4%	11%		21,2%		11,1%
	223bp	10,4%	17%				11,1%
	221bp	35%	37%	90,9%	21,2%	55,5%	11,1%
	219bp		6%		9,09%	44,4%	
	215bp				6,06%		
	213bp	6,25%					
	209bp	20,8%	17%	9,09%	24,24%		33,3%
	207bp	14,5%	6%		12,12%		11,1%
D4S43	190bp	0,87%					
	188bp	1,75%					
	186bp	14,9%	10%	18,18%	27,27%		22,22%
	184bp	3,5%	2%		9,09%		
	182bp	39,5%	25,6%	9,09%	33,33%	44,44%	22,22%
	180bp	34,2%	43%		12,12%	55,55%	55,55%
	178bp		1,3%	63,63%	6,06%		
	176bp	5,26%	16%	9,09%	12,12%		
D4S136	249bp	1,78%					
	247bp						
	243bp				3,03%		
	241bp	0,9%	1,2%				
	239bp	0,9%	1,2%				(11,11%
	237bp	7,89%	22,6%		6,06%		
	235bp	37,7%	67,8%	63,63%	21,21%		33,33%
	233bp	39,4%		36,36%	57,57%	100%	33,33%
	229bp	0,9%	1,2%				22,22%
	227bp	5,26%	5,9%				
	225bp	5,26%			9,09%		
	191bp				3,03%		
σύνολο							

Πίνακας 14. Παρατηρούμενες συχνότητες των αλληλομόρφων για τους STR δείκτες σε άτομα που νοσούν και σε φυσιολογικά. Από τα ασθενή άτομα ελέγχθησαν τα HD και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα χωριστά.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟ-ΜΟΡΦΟ	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (57), (114 ΧΡΩΜ.)	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ (44)	LATE ONSET HD ΧΡΩΜ. (33)	LATE ONSET ΦΥΣΙΟΛΟΓ. ΧΡΩΜ. (33)	TYPICAL FORM HD ΧΡΩΜΟΣ. (9)	TYPICAL FORM ΦΥΣΙΟΛ. ΧΡΩΜ. (9)
D4S182	138bp	0,89%					
	136bp	0,89%	2,3%		3,03%		
	132bp	0,89%					
	130bp	1,78%	1,16%				11,11%
	128bp	1,78%			6,06%		
	126bp	11,6%	20,9%	72,72%	6,06%		22,22%
	124bp	44,6%	34,9%	18,18%	42,42%		44,44%
	122bp	24,1%	32,5%	9,09%	33,33%	55,55%	11,11%
	120bp	2,7%	2,3%		3,03%	44,44%	11,11%
	118bp	6,25%	1,16%		3,03%		
	116bp	2,7%	4,65%		3,03%		
	114bp	1,78%					
D4S95	1600bp	8,16%					
	1560bp	8,16%			18,18%		11,11%
	1520bp						
	1500bp						
	1480bp						
	1440bp						
	1330bp						
	1240bp	1,02%					
	1180bp	2,04%					
	1150bp	11,2%			3,03%		
	1090bp	25,5%		100%	63,63%	100%	88,88%
	1030bp	41,8%			15,15%		
	990bp	2,04%					
D4S127	145bp	0,8%					
	151bp	1,7%					
	153bp	26%	25%		18,18%		11,11%
	155bp	21%	14,7%		18,18%		55,55%
	157bp	23,7%	23,9%	100%	24,24%		33,3%
	159bp	25%	32%		39,39%	100%	
	161bp	0,8%	25%				

Πίνακας 15. Παρατηρούμενες συχνότητες των αλληλομόρφων για τα SNPs σε άτομα που νοσούν και σε φυσιολογικά. Από τα ασθενή άτομα ελέχθησαν τα HD και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα χωριστά.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟ-ΜΟΡΦΟ	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (57), (114 ΧΡΩΜ.)	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ (44)	LATE ONSET HD ΧΡΩΜ. (33)	LATE ONSET ΦΥΣΙΟΛΟΓ. ΧΡΩΜ. (33)	TYPICAL FORM HD ΧΡΩΜΟΣ. (9)	TYPICAL FORM ΦΥΣΙΟΛ. ΧΡΩΜ. (9)
rs362277	A	39%		100%	6,06%		88,88%
	G	60,80%			93,9%	100%	11,11%
rs3025814	C	35,20%		100%	48,48%	100%	11,11%
	G	64%			51,51%		88,88%
Δ2642	A: 112bp	99,1%	97,7%	100%	100%	100%	55,55%
	B: 109bp	0,9%	2,27%				44,44%
rs2530596	G	53,50%			15,15%	100%	22,22%
	A	46,50%		100%	84,84%		77,77%

Πίνακας 16. Παρατηρούμενες συχνότητες των αλληλομόρφων για τους STR δείκτες σε άτομα που νοσούν και σε φυσιολογικά. Από τα ασθενή άτομα ελέχθησαν τα HD και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα χωριστά.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟ-ΜΟΡΦΟ	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (57), (114 ΧΡΩΜ.)	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ (44)	LATE ONSET HD ΧΡΩΜ. (33)	LATE ONSET ΦΥΣΙΟΛΟΓ. ΧΡΩΜ. (33)	TYPICAL FORM HD ΧΡΩΜΟΣ.. (9)	TYPICAL FORM ΦΥΣΙΟΛ. ΧΡΩΜ. (9)
D4S126	177bp						
	175bp	0,9%					
	173bp	2,3%	25%		9,09%		
	171bp	16,78%	14,7%		21,21%		11,11%
	169bp	13,15%	23,9%	72,72%	18,18%	55,55%	11,11%
	167bp	14%	32%		3,03%		
	165bp	21,9%	25%	9,09%	18,18%		
	163bp	25%			21,21%		44,44%
	161bp	9,6%		18,18%	6,06%	44,44%	22,22%
	159bp	0,9%					
	155bp						11,11%
	153bp	1,75%					
	145bp	0,9%					
D4S3034	198bp				3,03%		
	196bp	1,2 %					
	194bp				6,06%		22,22%
	192bp	6,1 %			9,09%		11,11%
	190bp	25,6%		27,27%	51,51%	100%	55,5%
	188bp	48,8%		72,72%	30,3%		11,11%
	186bp	18,3 %					
	184bp						
	182bp						

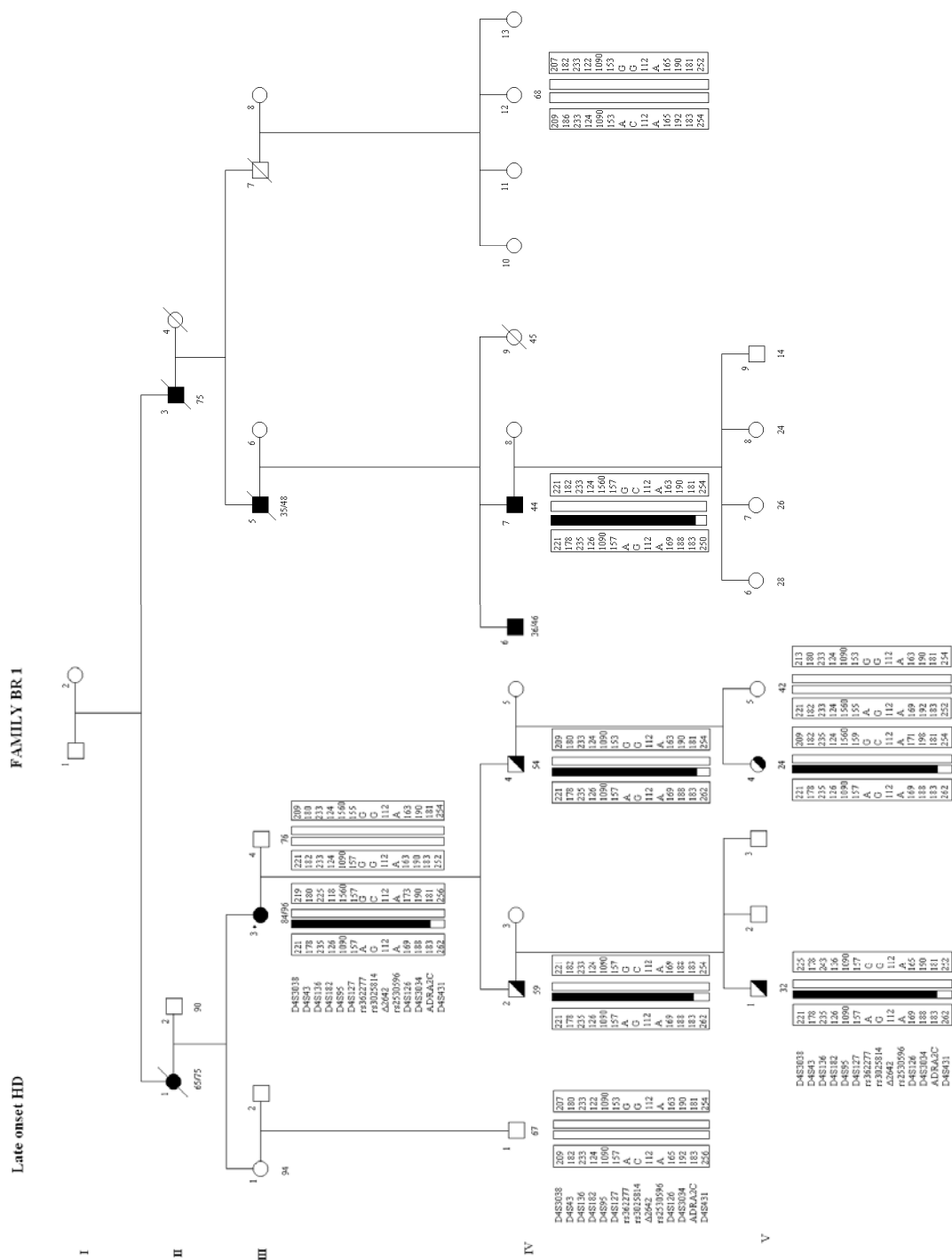
Πίνακας 17. Παρατηρούμενες συχνότητες των αλληλομόρφων για τους STR δείκτες σε άτομα που νοσούν και σε φυσιολογικά. Από τα ασθενή άτομα ελέχθησαν τα HD και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα χωριστά.							
ΔΕΙΚΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟ-ΜΟΡΦΟ	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΡΗΤΗΣ (57), (114 ΧΡΩΜ.)	ΑΤΟΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ (44)	LATE ONSET HD ΧΡΩΜ. (33)	LATE ONSET ΦΥΣΙΟΛΟΓ. ΧΡΩΜ. (33)	TYPICAL FORM HD ΧΡΩΜΟΣ.. (9)	TYPICAL FORM ΦΥΣΙΟΛ. ΧΡΩΜ. (9)
ADRA2C	193 bp		5%				
	187 bp	0,86%	4%				
	185 bp	6,03%	18%				
	183 bp	44,8%	55%	100%	12,12%	55,55%	22,22%
	181 bp	40,5%	17%		87,87%	44,44%	77,77%
	179 bp	7,76%	1%				
	177 bp						
D4S431	270bp						
	268bp	1%					
	266bp	1,9%					
	264bp	4,7%			12,12%		
	262bp	1%		15,15%			
	260bp	2,8%			3,03%	11,11%	44,44%
	258bp	18,8%			21,21%		22,22%
	256bp	20,7%		39,39%	6,06%		22,22%
	254bp	26,4%		18,18%	27,27%	44,44%	
	252bp	11,3%		18,18%	9,09%		
	250bp	9,4%		9,09%	12,12%	44,44%	11,11%
	248bp	1%			6,06%		
	246bp						
	244bp	1%			3,03%		

Και στα 33 late-onset HD χρωμοσώματα παρατηρείται ένας καλά συντηρημένος απλότυπος, οποίος περιλαμβάνει το HD γονίδιο, καθώς και περιοχές εξωγονδιακές, τόσο από την 5', όσο και από την 3' περιοχή. Συγκεκριμένα ο απλότυπος αυτός καταλαμβάνει μια περιοχή 0.277Mb στο 4p16.3 τμήμα του χρωμοσώματος και περιλαμβάνει με την ακόλουθη σειρά τους STRs δείκτες D4S95, D4S127, τα ενδογονδιακά SNPs 362277, 3025814 και 2530596, δίνοντας τον απλότυπο 1090-157-A-G-A. Το τμήμα αυτό περιβάλλεται από τους STRs δείκτες D4S95 και D4S3034 που καταλαμβάνουν μια περιοχή 0.336 Mb (εικόνες 14-22 και 25-26). Όπως φαίνεται και από την εικόνα 25 οι οικογένειες (BR1-BR6) που προέρχονται από το ίδιο χωριό BR έχουν κοινή μια μεγαλύτερη περιοχή του χρωμοσώματος, μήκους 2.7Mb μεταξύ των δεικτών D4S3038 και ADRA2C. Παρατηρούμε ότι οι 6 οικογένειες από το BR και η

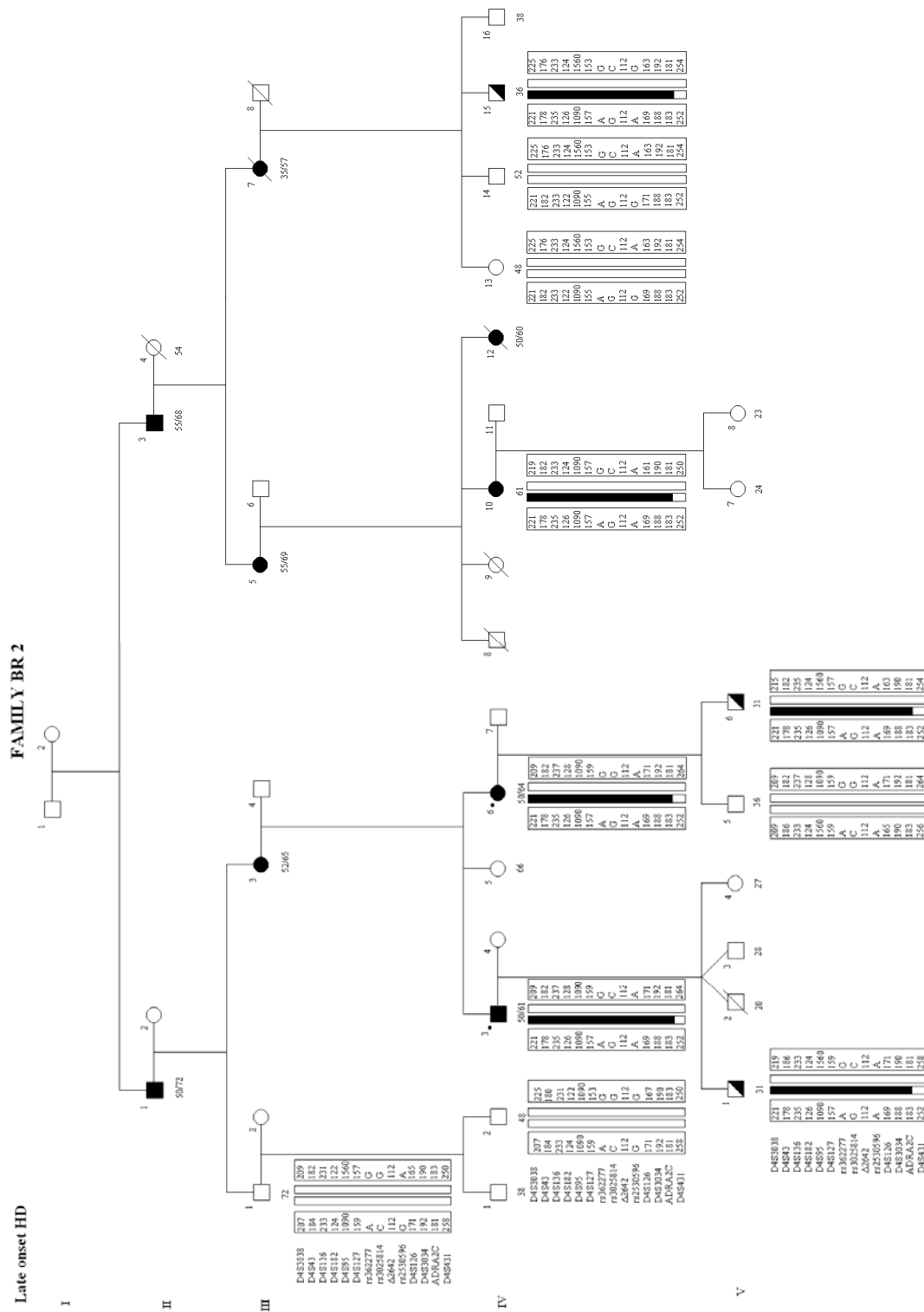
οικογένεια από το χωριό ΜΑ έχουν κοινή μια μεγαλύτερη περιοχή του χρωμοσώματος που περικλείεται από τους δείκτες D4S182 και ADRA2C. Το δεδομένο αυτό πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι οικογένειες αυτές προέρχονται από γειτονικές περιοχές.

Από την άλλη πλευρά οι οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου παρουσιάζουν ένα δικό τους απλότυπο, εντελώς διαφορετικό από αυτό των late-onset οικογενειών (εικόνες 23-26). Ο απλότυπος για την οικογένεια ΑΧ για τους δείκτες (D4S95, D4S127, rs362277, rs3025814, Δ2642, rs2530596) είναι 1090-159-G-C/G-109-C/A, ενώ για την οικογένεια ΚΟ είναι 1090-159/155-G/A-C-112-G.

Φαίνεται επομένως από τις παραπάνω μελέτες ότι όντως υπάρχει μια ελάχιστη χρωμοσωμική περιοχή όπως περιγράφεται από τους δείκτες που μελετήθηκαν, η οποία πιθανόν να προσδίδει σταθερότητα στην (CAG)*n* επανάληψη κατά την γενετική της μεταβίβαση στους late-onset HD ασθενείς της Κρήτης.



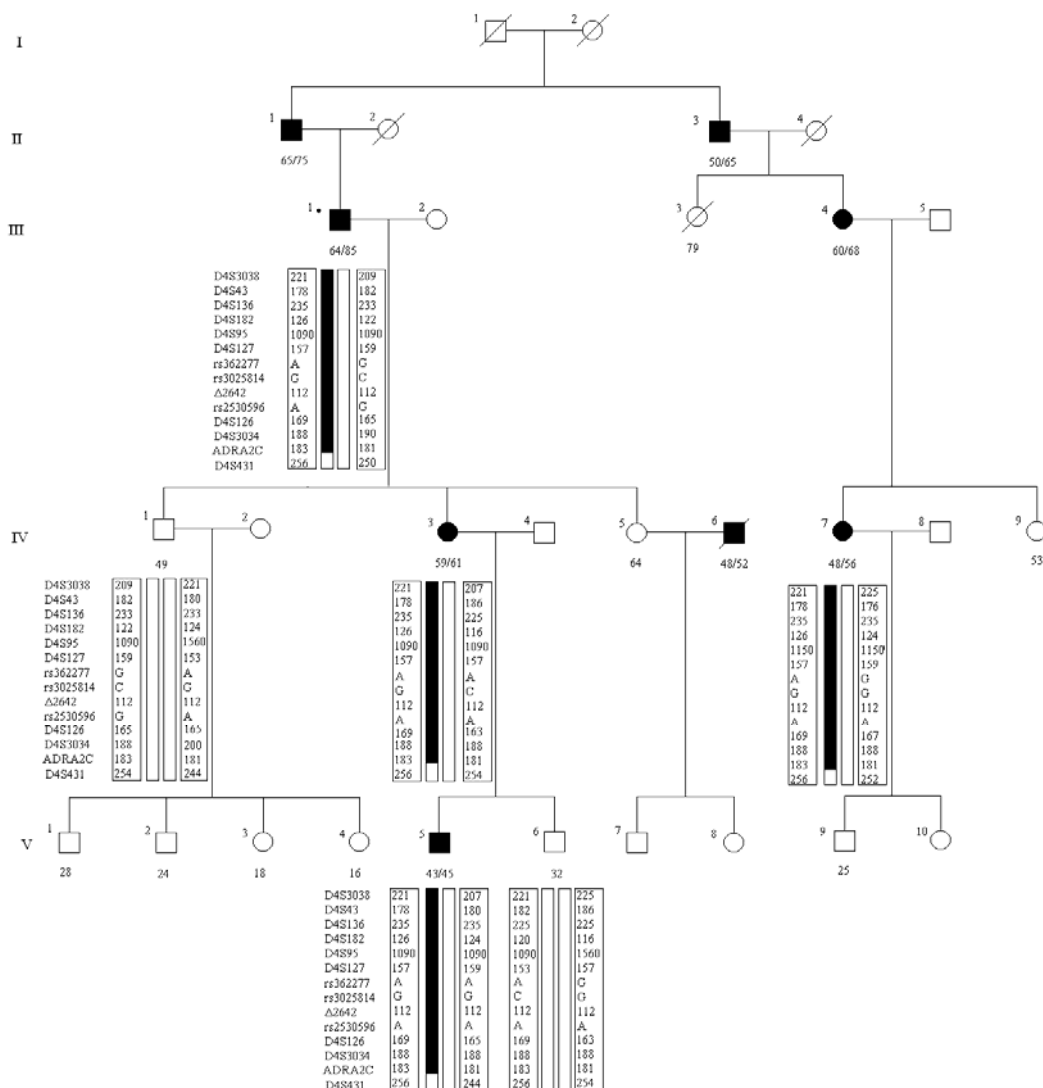
Εικόνα 14. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR1. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.



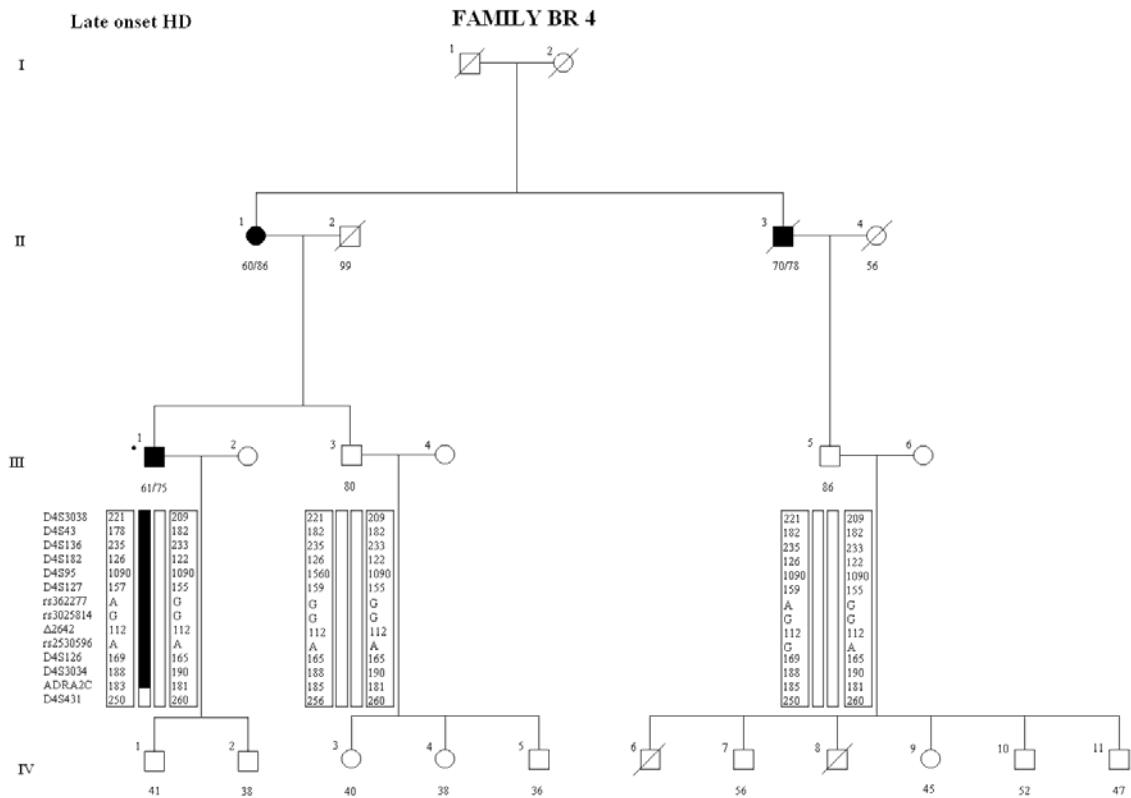
Εικόνα 15. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR 2. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

Late onset HD

FAMILY BR 3

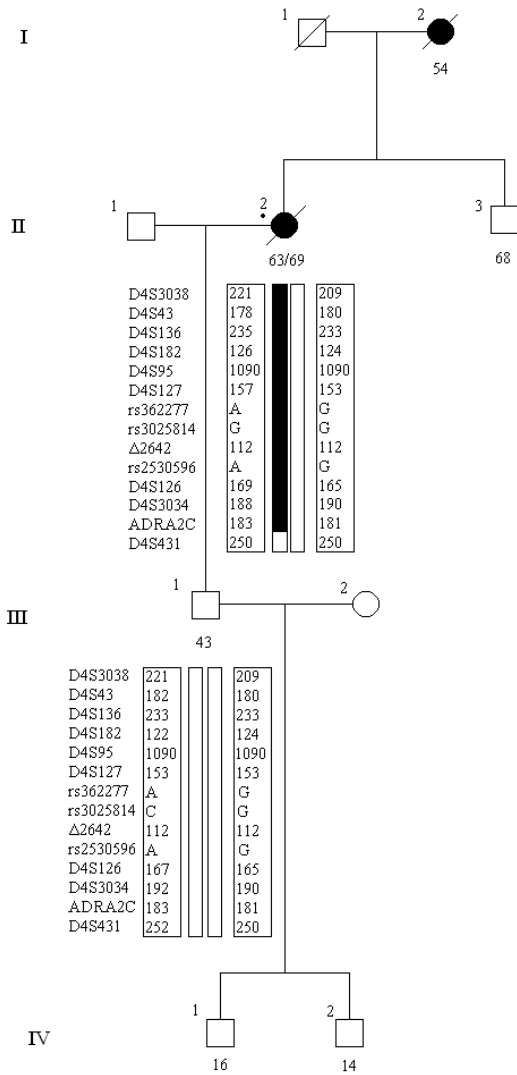


Εικόνα 16. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR 3. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

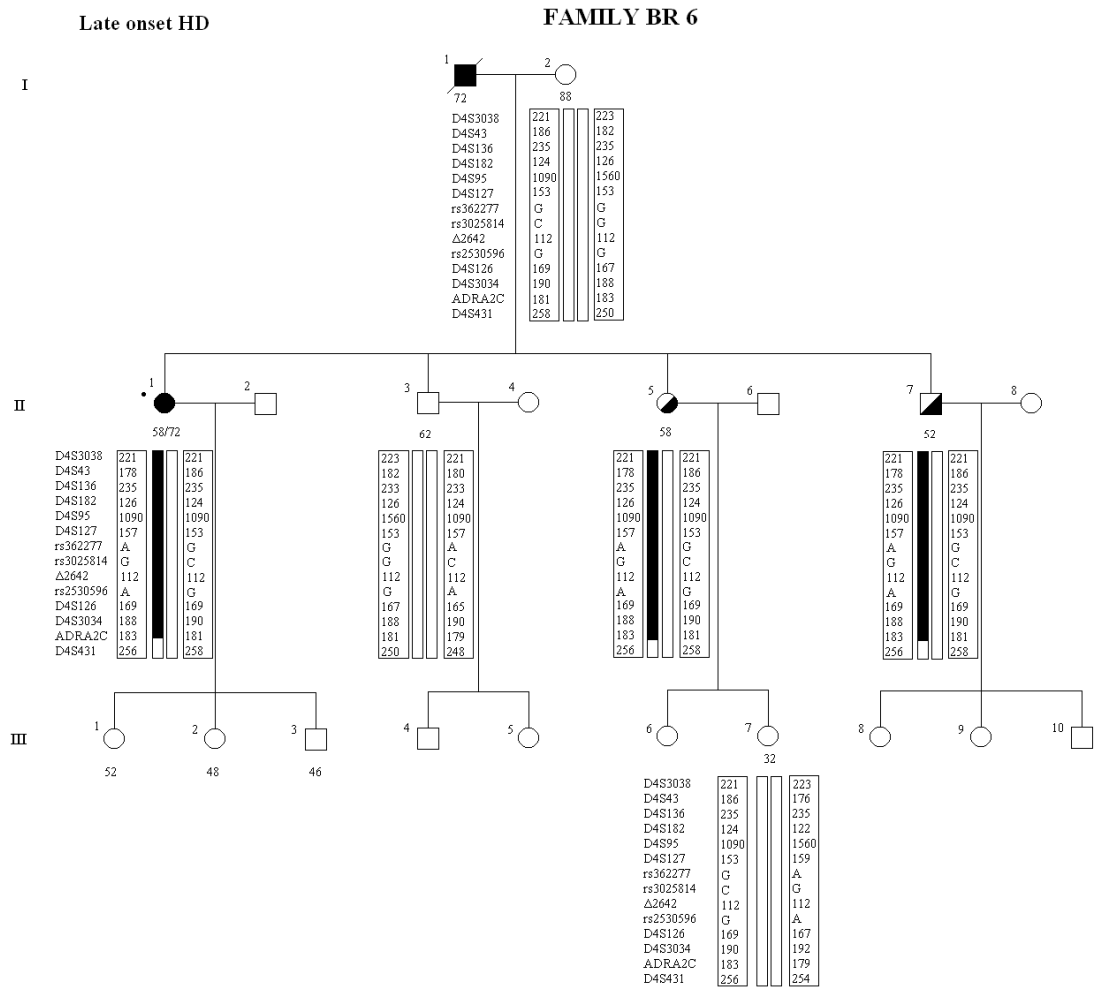


Εικόνα 17. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR 4. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

Late onset HD FAMILY BR 5



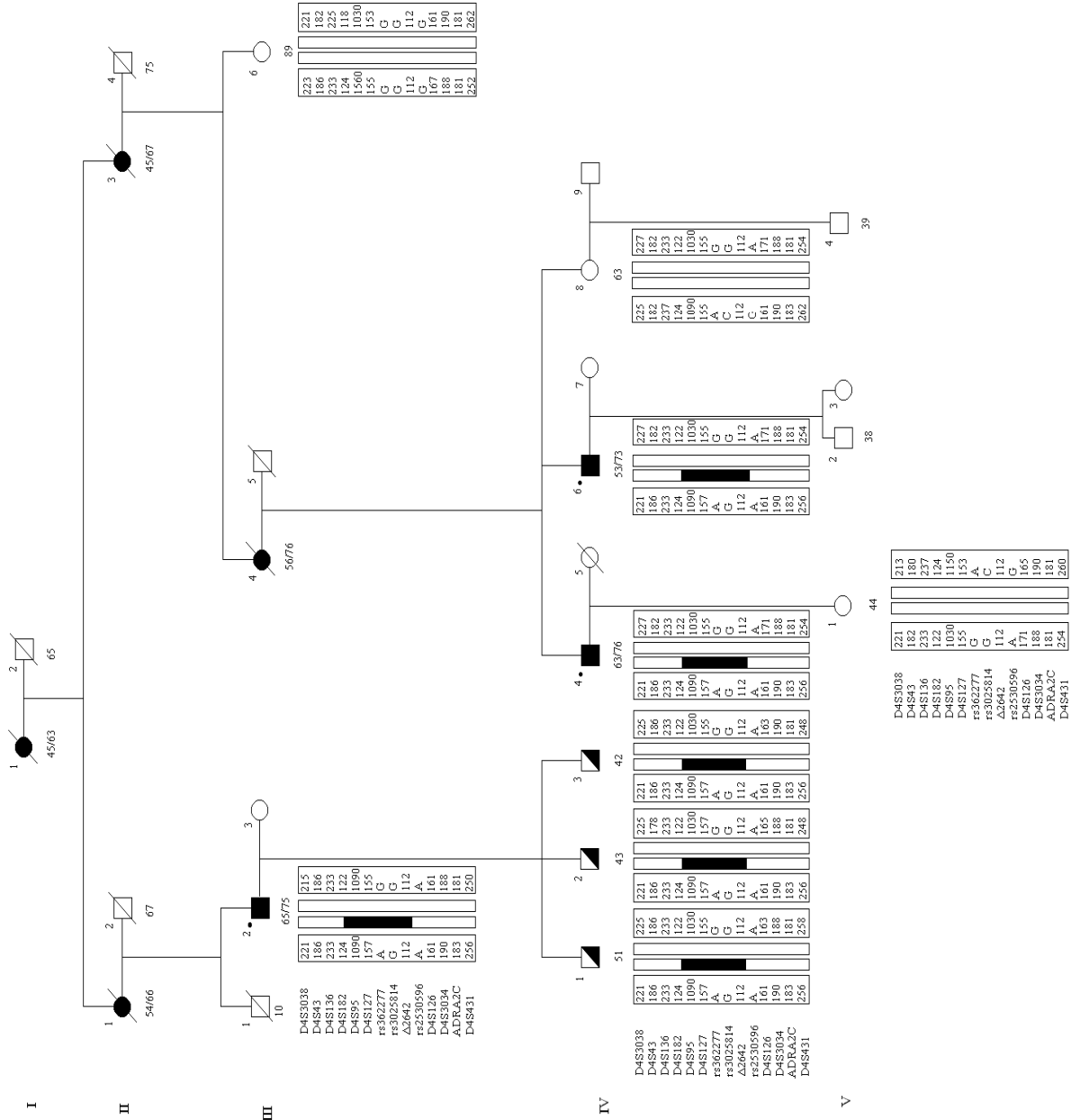
Εικόνα 18. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR 5. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.



Εικόνα 19. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο BR 6. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

FAMILY AM

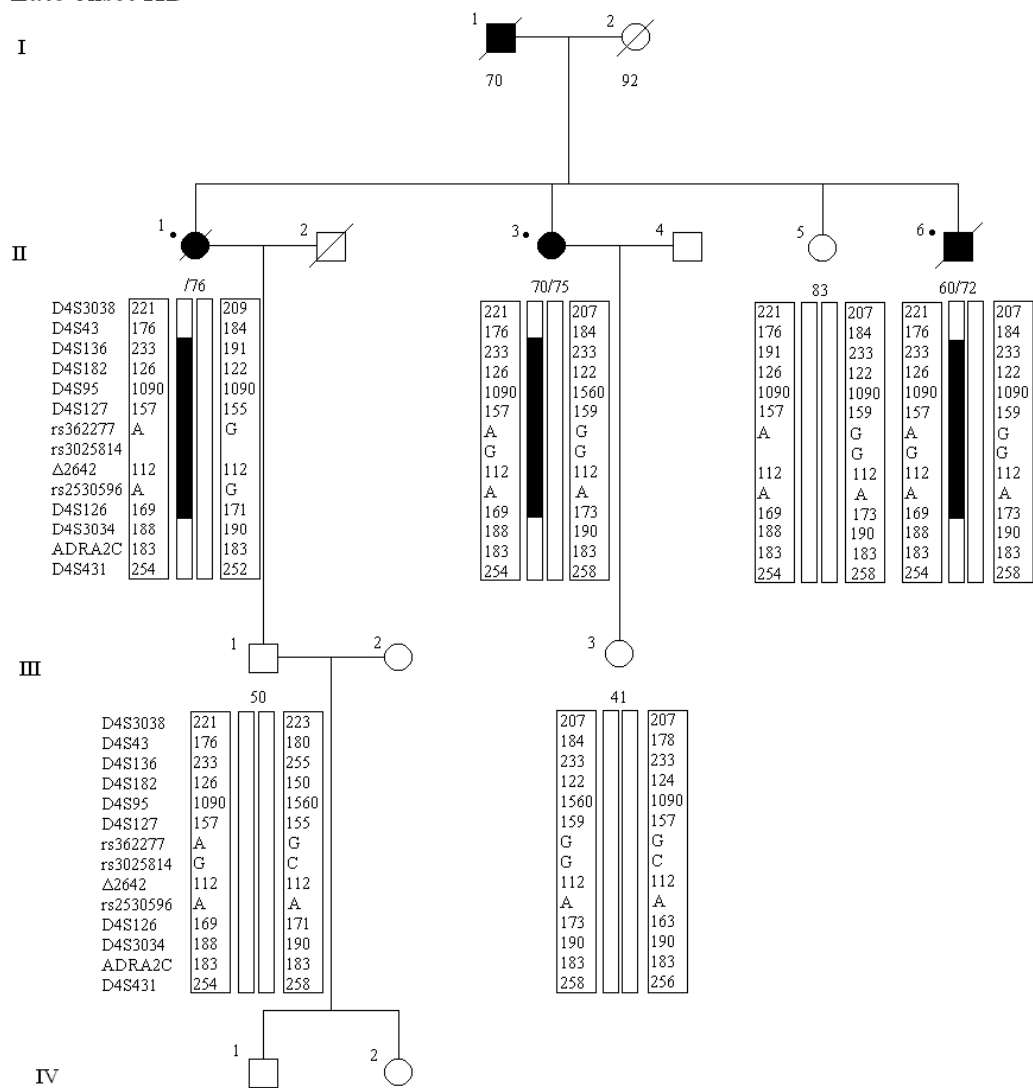
Late onset HD



Εικόνα 20. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο AM. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

Late onset HD

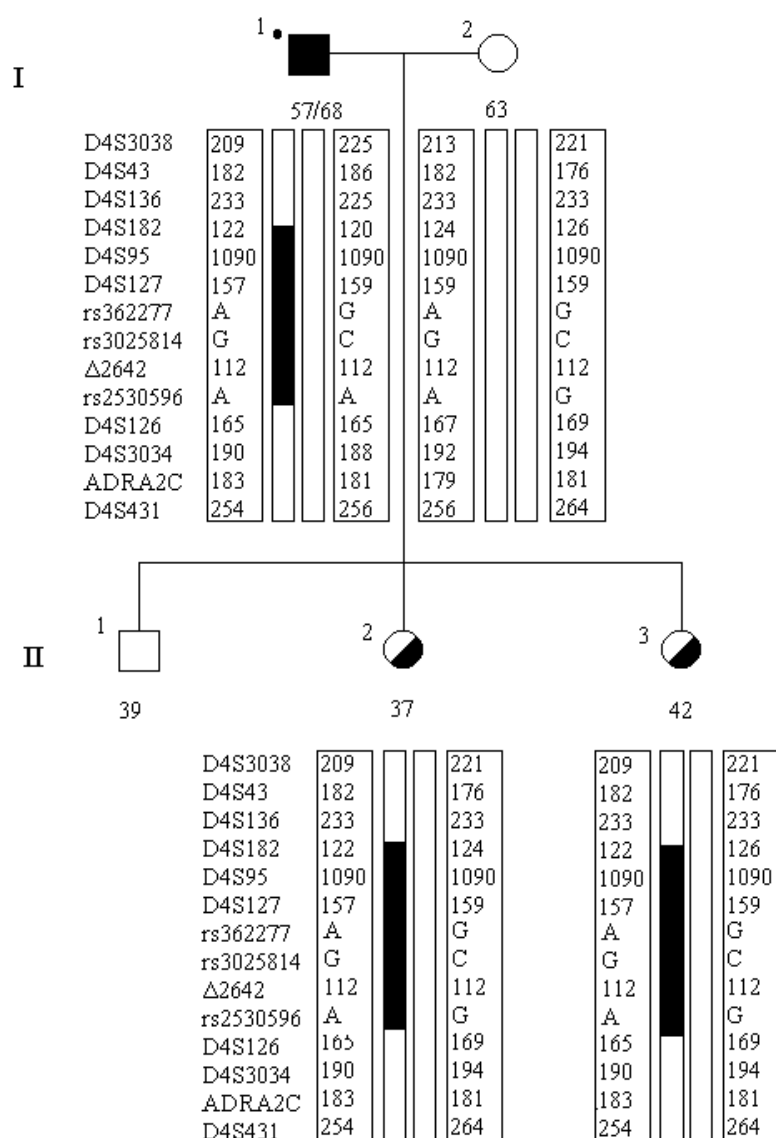
FAMILY MA



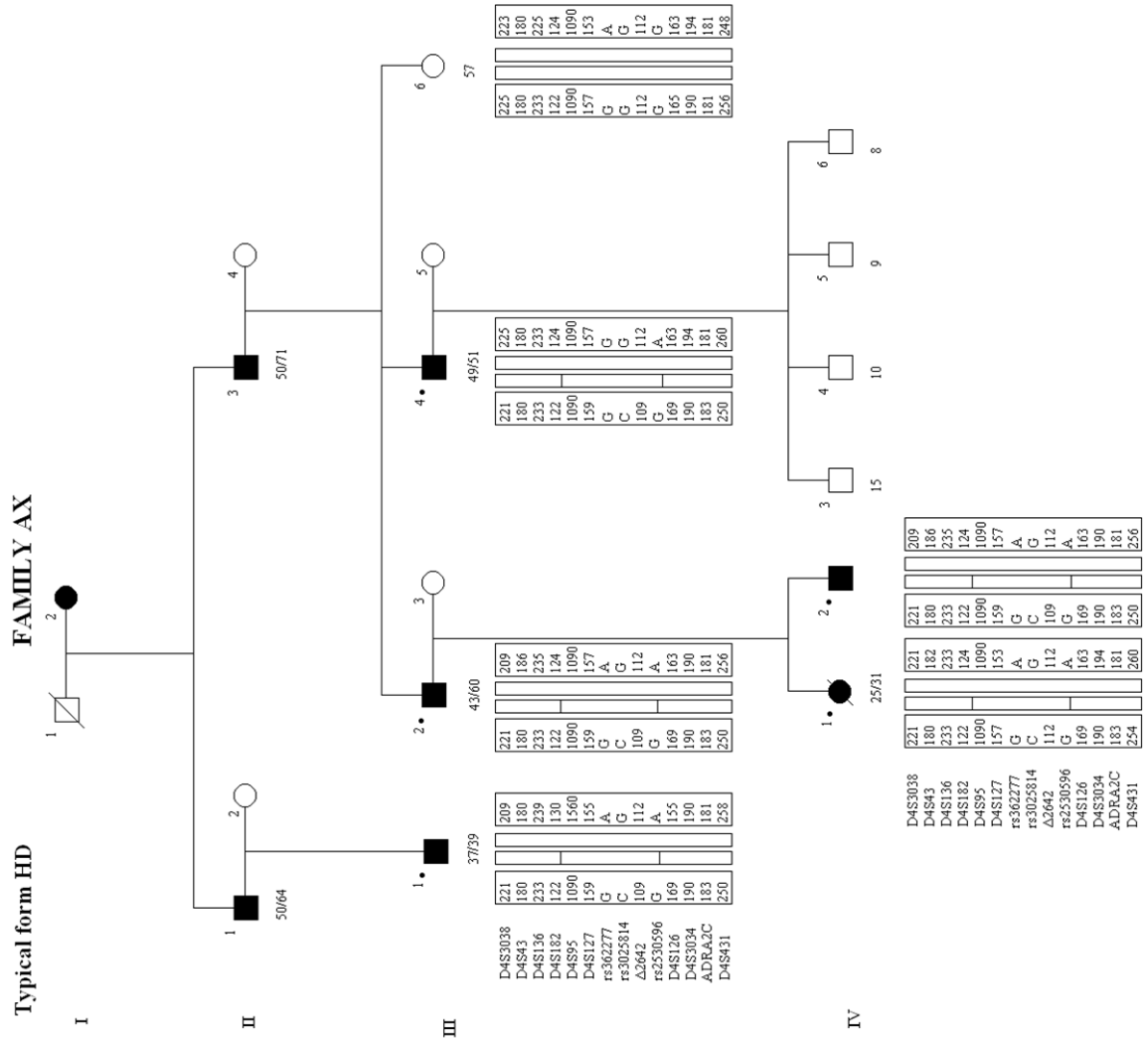
Εικόνα 21. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο MA. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

Late onset HD

FAMILY PE



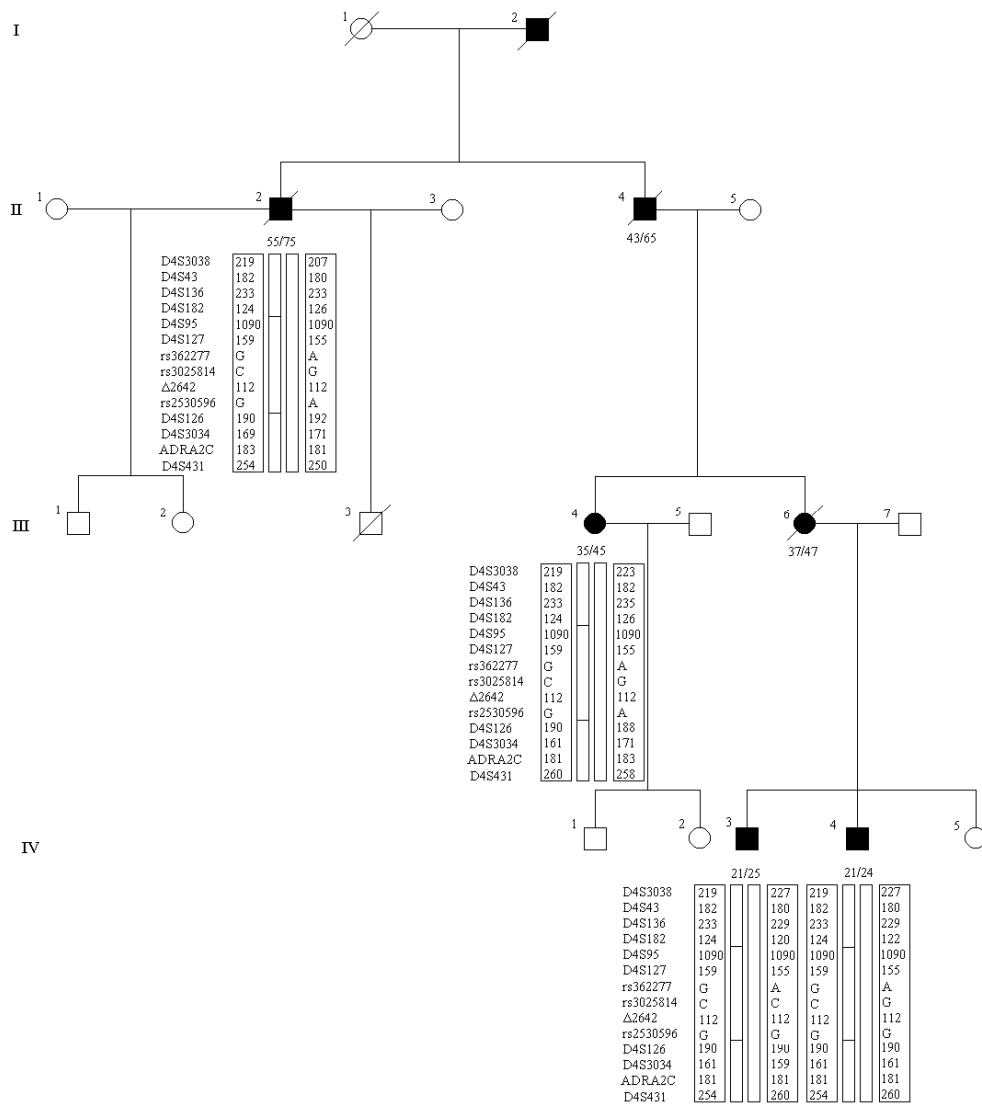
Εικόνα 22. Late-onset HD. Οικογενειακό δέντρο PE. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα φαίνεται μαύρη η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.



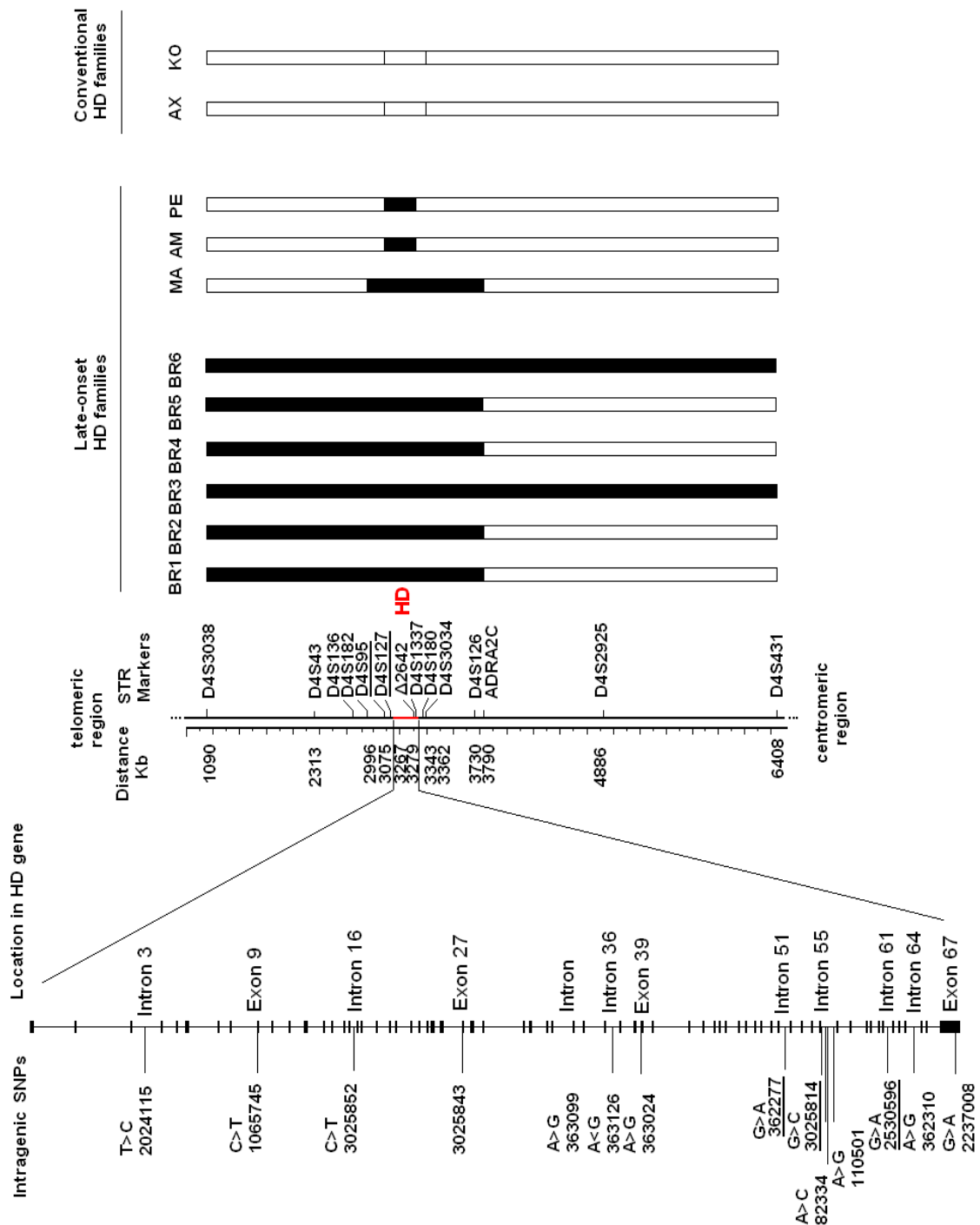
Εικόνα 23. Typical-onset HD. Οικογενειακό δέντρο AX. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα, η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν από τις typical-onset οικογένειες φαίνεται με ένα λευκό κουτί. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STR δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.

Typical form HD

FAMILY KO



Εικόνα 24. Typical-onset HD. Οικογενειακό δέντρο KO. Οι κάθετες μπάρες δείχνουν τα χρωμοσώματα του κάθε ατόμου. Στο παθολογικό χρωμόσωμα, η περιοχή που είναι κοινή στα άτομα που νοσούν από τις typical-onset οικογένειες φαίνεται με ένα λευκό κουτί. Αριστερά και δεξιά διακρίνονται σε κουτιά τα αλληλόμορφα για τους STRs δείκτες και τα ενδογονιδιακά SNPs που παρατηρούνται στα άτομα που μελετήσαμε.



Εικόνα 25. Φυσικός χάρτης της περιοχής του HD γονιδίου. Το σχήμα δείχνει την περιοχή 4p16.3 του ανθρωπίνου χρωμοσώματος 4 σαν μια κάθετη μπάρα. Οι 14 STRs δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μας είναι τοποθετημένοι κατά μήκος του χρωμοσώματος, ανάλογα με την απόστασή τους (σε Kb) από το γονίδιο. Στα αριστερά της 4p16.3 περιοχής, φαίνονται εσωτερικά του HD γονιδίου, οι θέσεις των 15 SNPs που μελετήθηκαν. Στα δεξιά της 4p16.3 περιοχής απεικονίζονται με κάθετες μπάρες περιοχές των HD χρωμοσωμάτων που είναι κοινές στις late-onset HD οικογένειες (μαύρα τμήματα). Οι περιοχές που είναι κοινές στις οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου φαίνονται με λευκά κουτιά. Οι late-onset οικογένειες από το χωριό BR (BR1-BR6) παρουσιάζουν ένα εκτεταμένο κοινό απλότυπο, που περικλείεται από τους δείκτες D4S3038 και ADRA2C, μήκους 2.7 Mb. Οι οικογένειες από το AM (AM), MA (MA) και PE (PE) μοιράζονται ένα μικρότερο απλότυπο, που καθορίζεται από τους STR δείκτες D4S95 και D4S127 και τα ενδογονιδιακά SNPs rs362277, rs3025814, rs2530596, και καταλαμβάνει μια περιοχή μήκους 0.336 Mb, που περικλείεται από τους STR δείκτες D4S95 και D4S3034. Ο D4S136 και D4S182 τοποθετούνται στην περιοχή 4p16.3, ανοδικά του HD γονιδίου, αλλά η ακριβής τους θέση δεν είναι καθορισμένη (National Center for Biotechnology Information).

Microsatellite Markers and intrinsic SNPs	Late-onset HD families						Conventional HD families				
	Brachasion village						Magoulas village	Amarianon village	Petrokefalon village	Axos village	Korfes village
	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	BR6	MA	AM	PE	AX	KO
D4S3038	221	221	221	221	221	221	221	221	209	221	219
D4S43	178	178	178	178	178	178	176	186	182	180	182
D4S136	235	235	235	235	235	235	233	233	233	233	233
D4S182	126	126	126	126	126	126	126	124	122	122	124
D4S95	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090
D4S127	157	157	157	157	157	157	157	157	157	159	159/155
rs362277	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G/A
rs3025814	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C/G	C
Δ2642	112	112	112	112	112	112	112	112	112	109	112
rs2530596	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G/A	G
D4S3034	188	188	188	188	188	188	188	190	190	190	190
D4S126	169	169	169	169	169	169	169	161	165	169	161
ADRA2C	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	181
D4S431	262	252	256	250	250	256	254	256	254	250	254

Markers and SNPs are listed from telomere (top) to centromere (bottom)

Εικόνα 26. Απλότυποι των late-onset και των conventional HD οικογενειών από την Κρήτη. Η ομάδα των late-onset HD οικογενειών από το χωριό BR (BR1-BR6) μοιράζονται ένα εκτεταμένο κοινό απλότυπο (κουτιά με διακεκομμένη γραμμή). Μία πιο περιορισμένη χρωμοσωμική περιοχή που περιλαμβάνει τους STR δείκτες D4S95, D4S127 και τα ενδογονιδιακά SNPs rs362277, rs3025814, rs2530596, είναι κοινή σε όλες τις late-onset οικογένειες (κουτιά με συνεχόμενη γραμμή). Αντίθετα, οι δύο οικογένειες με την τυπική μορφή της HD (AX και KO), μοιράζονται ένα διαφορετικό απλότυπο (κουτιά με συνεχόμενη γραμμή). Οι STR δείκτες και τα SNPs έχουν τοποθετηθεί από το τελομερές (πάνω) προς το κεντρομερές (κάτω).

4. Ανάλυση σύνδεσης ανισορροπίας και εκτίμηση ηλικίας

Για να εκτιμήσουμε κατά πόσο οι δείκτες μας σχετίζονται με την κληρονομηση του HD γονιδίου προχωρήσαμε σε ανάλυση σύνδεσης γενετικής ανισορροπίας. Στον **πίνακα 18** φαίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων για 5 STRs δείκτες που βρίσκονται γύρω από τον συντηρημένο απλότυπο για τα late-onset χρωμοσώματα (n=33), για τα φυσιολογικά χρωμοσώματα των late-onset ασθενών και των συγγενών τους (n=80) και για τα χρωμοσώματα ελέγχου (n=114) από υγιή άτομα από τον Κρητικό πληθυσμό. Ένα μοναδικό αλληλόμορφο για κάθε δείκτη σχετίζεται με την ασθένεια και φαίνεται να είναι σε μεγάλο ποσοστό στα late-onset HD χρωμοσώματα, αν τα συγκρίνουμε με τις δύο ομάδες των χρωμοσωμάτων ελέγχου. (D4S43: 178, $p < 0.001$, D4S136: 235, $p < 0.008$, D4S182: 126, $p < 0.001$, D4S126: 169, $p < 0.001$, D4S3034: 188, $p = 0.038$ και D4S431: 262, $p = 0.009$). Η έκταση της σύνδεσης ανισορροπίας για τους πολυμορφικούς δείκτες D4S43, D4S126 και D4S431 φαίνεται στους φυσικούς χάρτες (National Center of Biotechnology Information- August 2003) και χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσουμε τον αριθμό των γενεών από τον πιο κοινό πρόγονο για τους late-onset HD ασθενείς. Ο **πίνακας 19** δείχνει την τιμή δ και το κλάσμα ανασυνδιασμού που χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογίσουμε τον αριθμό των γενεών (G) από τον πιο κοινό πρόγονο για τους late-onset HD ασθενείς. Επίσης φαίνεται το ελάχιστο και το μέγιστο διάστημα εμπιστοσύνης για το G . Με τη χρήση τριών δεικτών η ηλικία φαίνεται σταθερή, με μέση τιμή 31.0 ± 2.1 γενιές (με 90% διάστημα (όριο) εμπιστοσύνης εκτιμώνται 29 με 35 γενιές). Έτσι φαίνεται ότι, ο συντηρημένος απλότυπος που αποκαλύφθηκε στις late-onset HD οικογένειες, εμφανίστηκε στον πληθυσμό της Κρήτης πριν από περίπου 31 γενιές.

Table 18. Συχνότητες αλληλομόρφων για τα HD (late onset και typical) και τα φυσιολογικά χρωμοσώματα

Δείκτες/ αλληλόμορφα	Χρωμοσώματα ελέγχου N:114	Φυσιολογικά χρω/τα των late-onset HD ασθενών και των συγγενών τους N: 80	Late-onset HD χρωμοσώματα N:33	Typical HD χρωμοσώματα N:9	
				Δ (90% CI)	δ (90% CI)
	Frequency	Frequency	Frequency	Frequency	
D4S43					
190	0.009	0	0	0	
188	0.017	0	0	0	
186	0.149	0.175	0.182	0	
184	0.035	0.0875	0	0	
182	0.395	0.4125	0.091	0.445	
180	0.342	0.1625	0	0.555	
178	0	0.0375	0.636*	0	0.636(0.498-0.774)
176	0.053	0.1125	0.091	0	
174	0	0.0125	0	0	
D4S136					
255	0	0.0123	0	0	
249	0.017	0	0	0	
247	0	0	0	0	
243	0	0.0123	0	0	
241	0.009	0	0	0	
239	0.009	0	0	0	
237	0.079	0.062	0	0	
235	0.377	0.160	0.636*	0	0.416
233	0.394	0.629	0.364	1	
229	0.009	0	0	0	
227	0.053	0	0	0	
225	0.053	0.074	0	0	
223	0	0.0247	0	0	
D4S182					
138	0.009	0	0	0	
136	0.009	0.0125	0	0	
132	0.009	0	0	0	
130	0.018	0	0	0	
128	0.018	0.0375	0	0	
126	0.116	0.1	0.727*	0	0.691
124	0.446	0.45	0.182	0.445*	0.43
122	0.241	0.325	0.091	0.555	
120	0.027	0.025	0	0	
118	0.062	0.025	0	0	
116	0.027	0.025	0	0	
114	0.018	0	0	0	
D4S126					
177	0	0	0	0	
175	0.009	0	0	0	
173	0.018	0.0617	0	0	
171	0.158	0.1728	0	0	
169	0.131	0.185	0.727*	0.555*	0.488
167	0.140	0.098	0	0	
165	0.219	0.247	0.091	0	
163	0.193	0.185	0	0	
161	0.096	0.05	0.182	0.445	
159	0.009	0	0	0	
155	0	0	0	0	
153	0.018	0	0	0	
145	0.009	0	0	0	
D4S431					
268	0.009	0	0	0	
266	0.019	0	0	0	
264	0.047	0.074	0	0	
262	0.009	0.0247	0.152*	0	0.144 (0,04-0.248)
260	0.028	0	0	0.112	
258	0.188	0.16	0	0	
256	0.207	0.111	0.394	0	
254	0.264	0.26	0.182	0.444	
252	0.113	0.123	0.182	0	
250	0.094	0.136	0.09	0.444*	0.49
248	0.009	0.037	0	0	
244	0.009	0.0246	0	0	

Υπολογισμός των συχνοτήτων των αλληλομόρφων για τα χρωμοσώματα που φέρουν την μετάλλαξη και για τα χρωμοσώματα ελέγχου για τους 5 δείκτες που περιβάλλουν τον συντηρημένο απλότυπο για τις Late-Onset και για τις Conventional HD οικογένειες * p (χ^2) <0.001 . Οι αριθμοί στις παρενθέσεις είναι τα κατώτατα και ανώτατα όρια του 90% διαστήματος εμπιστοσύνης για το δ .

Πίνακας 19. Εκτίμηση της ηλικίας για την late-onset HD						
Δείκτες/ αλληλόμορφα	Απόσταση από τον HD γενετικό τόπο			LD ^b δ	Estimated Age ^c -G (90% CI) ^d	Mean Age±SD (90% CI) ^d
	Megabases	Centimorgans	θ ^a			
D4S43 178	0.800	1.28	0.0126	0.636	29 (17-45)	31± 2.1 (29-35)
D4S126 169	0.725	1.16	0.0115	0.686	33 (16-55)	
D4S431 262	3.540	5.664	0.0535	0.144	32 (23-53)	

a. Έχει εκτιμηθεί με βάση τη φυσική απόσταση (σε Mb) με χρήση του παράγοντα μετατροπής 1.6 cM/Mb και του προγράμματος Haldane's map. Ο παράγοντας 1,6 εκτιμήθηκε με βάση 7 γενετικούς δείκτες (D4S43, D4S182, D4S95, D4S127, D4S180, D4S125, and D4S126), οι οποίοι εδράζονται στην περιοχή που μελετάμε, για τους οποίους είναι διαθέσιμες και οι φυσικές και γενετικές αποστάσεις. Δεν χρησιμοποιήσαμε τους δείκτες D4S136 και D4S182, επειδή δεν έχει εκτιμηθεί η ακριβής τους θέση στην περιοχή 4p16.3 σύμφωνα με τον επικρατέστερο φυσικό χάρτη (National Center for Biotechnology Information).

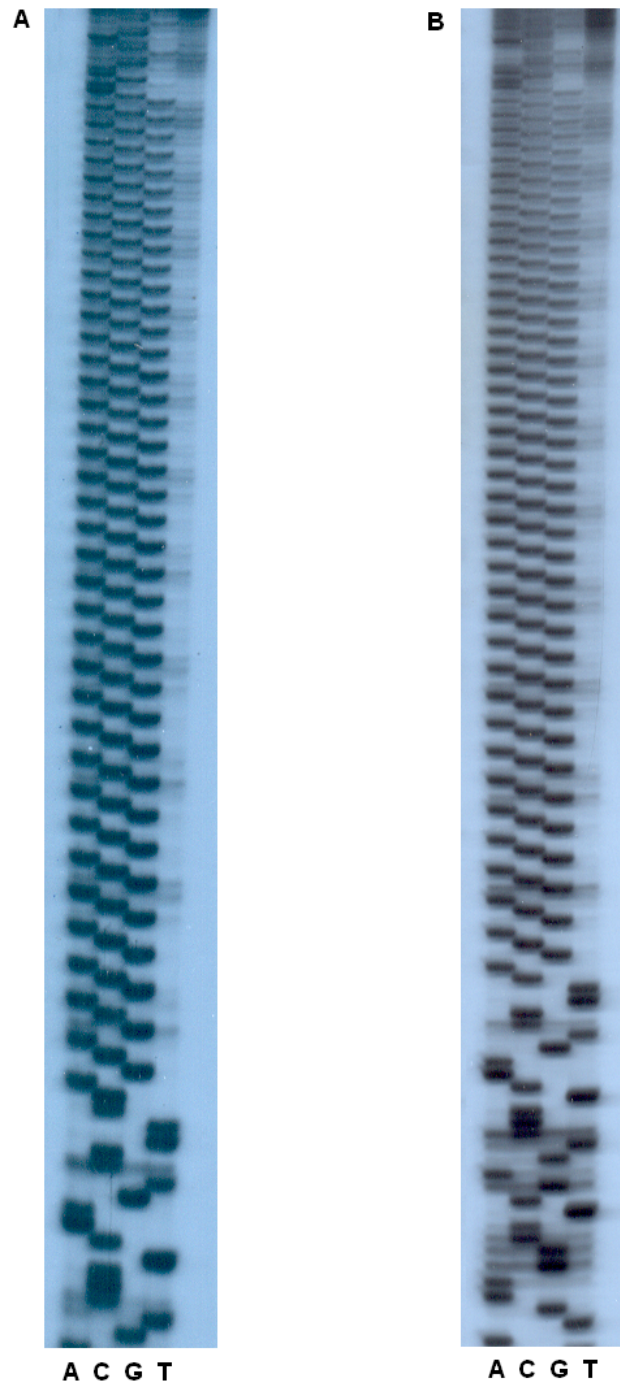
b. Υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Bengtsson και Thomson (1981): $\delta = (p_D - p_N) / (1 - p_N)$.

c. Το G είναι η ηλικία που υπολογίσαμε με χρήση της εξίσωσης $G = \ln \delta / (\ln(1 - \theta))$ (Risch et al 1995).

d. Ένα κατά προσέγγιση CI για το G υπολογίστηκε με τον παραπάνω τύπο, όταν χρησιμοποιήθηκε το κατώτατο όριο του CI για το δ. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν το 90% διάστημα εμπιστοσύνης για το G.

5. Υπολογισμός των CAG τριπλετών στο 5' άκρο του HD γονιδίου

Κάναμε ανάλυση του 5' άκρου του HD γονιδίου, για ελέγξουμε κατά πόσο είναι συνεχής η CAG επανάληψη στους late-onset HD ασθενείς μας. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση αλληλουχίας δείχνουν ότι η επέκταση της CAG τριπλέτας είναι συνεχής (**εικόνα 27**). Σε άλλους HD ασθενείς έχει παρατηρηθεί μια μετατροπή της τριπλέτας CAA σε CAG, όμως στους late-onset HD ασθενείς από την Κρήτη δεν παρατηρείται καμιά τέτοια μετατροπή. Επίσης δεν βρέθηκε καμία αλλαγή, ούτε μονονουκλεοτιδική στο τμήμα του DNA με έκταση από -109ζ.β έως +587 ζ.β. (μέγεθος 696 ζ.β.) του HD γονιδίου που περικλείει την CAG επανάληψη.



Εικόνα 27: Η CAG επανάληψη στα late-onset HD χρωμοσώματα. Μέρος του πρώτου εξωνίου από το HD γονίδιο ενσωματώθηκε σε TA φορέα κλωνοποίησης και έγινε ανάλυση αλληλουχίας. A. Late-onset HD χρωμόσωμα από την BR1 οικογένεια που περιέχει 38 CAGs. B. Late-onset HD χρωμόσωμα από την AM οικογένεια που περιέχει 40 CAGs. Όπως φαίνεται η CAG επανάληψη δεν διακόπτεται. Επίσης η αλληλουχία του 5' άκρου από το HD γονίδιο (από -109ζ.β. έως +587 ζ.β.) που περικλείει το CAG δεν δείχνει αλλαγές συγκρινόμενη με τη δημοσιευμένη αλληλουχία. (Kremer, Squit.1993).

6. DNA πολυμορφισμοί στις αλληλουχίες ανοδικά του 5' άκρου του HD γονιδίου

Στην αναζήτηση μας αλληλουχιών γειτονικών με το HD γονίδιο, που να προσδίδουν τη σταθερότητα στην CAG επανάληψη, προχωρήσαμε σε ανάλυση αλληλουχίας της 5' περιοχής ανοδικά του HD γονιδίου. Έτσι έγινε ανάλυση των ανοδικών 5' αλληλουχιών από τη θέση +54 στην -5515 από την +1 θέση έναρξης της μετάφρασης του HD γονιδίου και φάνηκαν τέσσερις, ήδη γνωστοί, σπάνιοι πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή. Για την ανάλυση αλληλουχίας από τη +1 βάση μέχρι την -5500 βάση, επιλέχθηκαν 7 ζεύγη εκκινητών. Κάθε ένα ζεύγος εκκινητών ορίζει και μια περιοχή. Οι περιοχές είναι: 1η περιοχή (-317 bp έως -1243 bp), 2η περιοχή (-1171 bp έως -2252 bp), 3η περιοχή (-1906 bp έως -2805 bp), 4η περιοχή (-2704 bp έως -3653 bp), 5η περιοχή (-3568 bp έως -4324 bp), 6η περιοχή (-4189 bp έως -5143 bp) και 7η περιοχή (-4894 bp έως -5825 bp). Στην **εικόνα 28** φαίνεται η αλληλουχία που μελετήθηκε (5500 bp ανοδικά του πρώτου εξωνίου της HD), οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και οι πολυμορφισμοί που παρατηρήθηκαν.

-5515
GGC | AATTTTTTTTTTTTTTAAATATTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTT
GAACTCCTGACCTCAGGCGATCTGCCTACCTCTGCCTCTCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCAT
CGCGCCCGGCCAACAGTGATCACTTTCAAACTAACAGAGGTTCAAAAATAAAAATCAGACTTAACCAAAA
ACCAGGTAACAGAGCTGGTAGGATATACAGAAAGACTGACCTCACGTATATCAACGATTACAGTTAATA
TTAATGAAGGAAATGCTCTAGTTTTAAAAACGAGGGTTGTCAAAGACCCACATAAGAAGCTCCTTACCA
CACCTAGAACCTAAGGAAACAGG: HD6 forward
GCGGTGCACCTAGAACCTAAGGAAACAGGACAGATGAAGGAGGACGCGCCCCCGCCGCTGTCCTGCGC
CTCAGCCATCCTATGAGACGGGAAAGGTTTCTGTCTGCAGCTGGGCCCGTGCTCTTACCAGCTCCTGGC
TTTCTTCTCTGGAAGGTTTCTGCCTGTTTTGCCCTCACACCTGCTCCTCCTCTCAGCCCTCTCAGGGGTG
GGGCTGGAGGCCACCAAAGAGCCTCCTCTGCTCTCCAGTTGCTCGACTGCTCCTCATTTCCCCCTGGGG
GCAGTCCCAAAGGAAGAAAA: HD7 reverse
TCTGCGTCAGGGTTTCTTTTCCAGCCCCACCCCGCGTGCATCCACCTGGTCTCGGGTCGGGGCT

GCTCCCGCTTACTGCCCCCTGCCAGGCTGGTGTGCACCCCTCTGGCTGCTTCAAGGCCTCTTCTCT
CTTCTCGGCAGGACAGGCACAGGCAGGTGGCCAGGTGTCATGCTTAGCTCCCCGCCAGTGAGATTCTT
TCATTTAACAATCTTCCCCTGAATAGTTCATGTTTCATTGCTGAAAATTTGAAAAATATGGAAAAGCACA
AAGATTAAGATATAAACCGCCCTCAATTCCCCTGCCAGAGAGAGTCACTGCTATGACTTGGTGACTAG
GAACCTTATTTCTCTCTCGCTCTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTCACCCAGGCTGGA
GTGCAGTGGCTCGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGC
CTTTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCTGCCACCATGCCCGCTAATTTTTGTATTTTAGTT**GAGAG**
AGGGTTTCATCTTGTGGTC
AGGGTTTCATCTTGTGGTCAGGCGGACTTGAACCTCTGACCTCAGGTGATCAGCCACCTCGGCCTCC
CAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTGCGCCTTCATCTCTTCTGTGTATGTGTACGCTGTTT
GCAATAGTCCGAGATGTACCAC: HD6 reverse
TTTCTTTAGAATGGGGGACGTTATCAGGCTCTACATGGTGTGTAGTCGGCTAGCATGTTGTAAGCCTTT
CCCTGTGTCACAAGTGCTCATCTGGAACAGGATTCTAATGACTGCCTGTGGCTATGTTGGGATTCCCTTT
AACTCAGCTCCTTCTGCCAGCATCTATCTTTTTTCCATCTTTTGTTCCTAAGTGTGCTATAATAAATC
ATTGATCACACATGCCTGACTGTTTGCATAGGATAAATTACGGGAAATGTTTTTGTGTTTCAGGGACTG
TGCCCATTTTTAGGCCTCAGAGACACCATGCCAGACTGCCAGTATTGATCTTTACTCTTTTTAGATGA
GATTCCTGTCAGGATGATAGTCAATTCTAGGCAGATGATGTTTTCTCAGCCATGGCTGAAGCAGTTGT
HD4: forward ATGGGTGGAATAATTTGGTTT
GATTTGTTGTGGCCATGTAAAGTCCCGATGATCCATTGCCTCCCTGGAT**GGGTGGAATAATTTGGTTT**
G
GGGAGCATATAACAGAATGACCTGGAGTCACAGCAGCTCAGACGGAAGTGTATTTCTCCCTTACAGATG
GACCTTACTGTTGACGTGTGTCA HD5: reverse
AAAGAATTCCAGGCCAGGCT**GGAATGACAACTGCACACAGT**CATCTGGGCCCCCTCCTTCCAGCTCCCA
TCACCCAGGATGTGGCTTTTATGCAGATGATCCAAAATGGCTGCTCAAGTCCAGCCAACACATCCCA
TTCCAGGGAGCAGGAAAAAGGTGTGTCTTTCCCTTCATTTTATGTGATTCTTTCTAGAAGTACTACTC
ATTACTTCTGCTTGCATCTCCCTGGCTAGCACTTACTTAGTTATATGGCCATAGCTAGCTGAAGGAAGG
ACAGGGACTGTCATACTAGCTAAGAGGCAAACCTGCTTAGATAAAAAGGTCTCTAAAGAAGGTCAGAG
CGGCTGCTAGGGTGCAACTCTATTACTTATTGTTATGGGACGAACTGTGTCCCTCATTGAGGTTGATGT

CCTAAGCCCCAGAACCTCAGAATGGGATTGTATTTGGAGACAGGTTCTTTAAGGAGGTAAGGAGGCTAA
AATGAGATCATTAGGGTGGGCCATAATCCGACTGATGTCTTACAAGAAGAGATTAGGACACGGACATGC
TCAGAGGGACGGCCACGTGAGGACACCAAGAAAGGCAGCTGTCTGCAAGTCAAGGACAGGGCTCAGGGG
AAACCAACCTTGCCAACACCTTCATCTCGGACTTCTAGCCTCTAGGACCATGAGAAGATAACATTTCTGT
TGTTTAAGCTGCCCCGGTCTGTGGTACTTTGTTATGGCAGCCCAAGTAAACAAATACAGTCATCTGCTGC
GGAACAATCACCCAGCAC : HD3 forward
TGGAACAATCACCCAGCACTGTGGCTTGGCAGCACACATGTCTAGTCATAGAGTTATATGTAGTTAC
HD4 reverse:**AATTGGTCGAGGTG**
GTGTAGAGCCATATGTATCGTCACACGTTCTGTGGGTGAGGAATTTGGACCCAGCTTAACCAGCTCCAC
AAGAGCG
TTCTCGCCAGGGTTCAGTCAAATAACCAGCTGCCTCCCACCTGAGAGCTCAGCCGGGAAGGGTCCCTTT
CCAATCTCACGTGGTGTGGCAGGATCCAGTTCCTCATGGCCTGCTGGACTGAGAACCTCAGTTCTCAC
TGCCTGTTGGCCAGAGGCCGCTTTATGTCCTGCCATGTGGGCCTCTCCAACATGGCAGCTGACTTCA
TCAGAGCATCCATGCCAAGAAGGCAACAGAGAGGGCCAGGGAGACTGAAGTCATAACCTTTTGGCACC
AGTCATGGGGTGACATTCCATCACCTTTGCCATTGGTTAGAAGCAGGCCACCAGGTACAGCCCAAGCT
HD2 forward: **GGCCATCTTATGAGTC**
CACGGGGAGGGGTGCATACAAGGGTGTCAATACCAGGAGGTGAGGGGTGCTGGGGCCATCTTATGAGTC
TGCCCACTGAGGTAACATAACAAC
TGCCCACTGAGGTAACATAACAACCTTGAGGCCTGACACAGTGGAGGACAAAGGCCTTATTAACAGCAG
AACTGGGAACCTTATTTATTTATTTATTTTGGAGACAGAGTCTCACTCTTGTACCCAGGCTGGAGTGCAA
G (-2118)
TGGCATGATCTTGGCTCACCTGCAACCTCCACCTCCCAGGTTCAAGCAATTCTGCCTCAGCCTCCGGAAT
AGCTGGGACTACAGGCATGCACCACTACACCCGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGGTTTCG
CCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCTGGTGATCTGCCTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGC
HD 3 reverse: **GTGGAGCACCTTGAATTAATAA**
TGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCTCGCTGGAACCTAATTTTTTTAGAGACAGTGTGCTCTATC
ACCCAAGCTGGAGTGCAGTGGTGCAATCCTAGCTCACTTGCAGCCTCAAATTCCTGGGTTTCAGGTGATC
A (-1757)
CTCCCACATCAGCCTCCCAAGAACTGGGAACATAACGGCTGTTTCTCTGCTGTCTTCTCAAGAAAAGGG
AGGCTACTGCTACCCCACTGGGGACAATGCTGGGTTTCCCTTTAGGACAGGCTCTGAGACAAGGCGGAG

GTGCTGTTTGTGGCCACAGAGCAGGGGACTCTGGGTTGCAGGTGTGGCCTGGCTAAAGTAGGCTTTACT
GGGCTCCTCTCTGCCTGCATCACCCCCGGCTGGGCGGTTGTCTCTGAGGCCAACCTTACTCCCTGCTG
GGCAGGCTGGACAGCTGCCCTCTCCGTTTGCCCTCTACCACCCAAAAGGCAGGAGGCTCTGGAGACCA
GGACCCTGCCCCGCCACGGCCTGTGTCCCAGGCGTGAGGGGGTGCCCCACAGACCTCTGCTGAGCTGCTG
CTGAATGACGCCCCTTGGGGGTCTGCCGGAAGGTTTCAGAGCAGGGGTGCACTCCATAAAGAAACGCC
HD 1 forward: **TGCTTCTCGCTGCACTAATC**
CCAGGTCGGGACTCATTCTGTGGGCGGCATCTTGTGGCCATAGCT**GCTTCTCGCTGCACTAATC**CAG
TGCCTCTGTGGGCAGCAGGCGCTGACCACCCAGGCTGCCCCAGACCCTCTCCTCCCTCCGGGGCGCT
CGCACCTGGCTACCCCCG: HD 2 reverse
GCGCTGGGACCGATGGGGGGCGCCAGGCTGTGGACACCGCCCTGCAGGGGCTCTCCAGCTCACTGG
GGGTGGGGTGGGGGTCACACTTGGGGTCTCAGGTCGTGCCGACCACGCGCATTCTCTGCGCTCTGCGCA
GGAGCTCGCCACCCTCTCCCCGTGCAGAGAGCCCCGAGCTGGCTCCCCGAGGGCTGTCCGGGTGAG
TATGGCTCTGGCCACGGGCCAGTGTGGCGGGAGGGCAAACCCCAAGGCCACCTCGGCTCAGAGTCCACG
GCCGGCTGTGCCCCGCTCCAGGCGTCGGCGGGGATCCTTCCGCATGGGCCTGCGCCCCGCGCTCGGC
GCCCCCTCCACGGCCCCGCCCCGTCCATGGGCCCCGTCTTCATGGGCGAGCCCCCTCCATGGCCCTGCC
(-694) C
CTCCGCGCCCCACCCCTCCCTCGCCCCACCTCTCACCTTCTGCCCCGCCCCAGCTCCCCA**A**CCCTC
GCT (-662)
ACCGCCAGTCCCCTCCCCTATCCC**G**TCCGCCCCCTAGCCGCCCCGCCCCCTAGCCGGCTGCCTAATG
TCCCCGTCCCCAGCATCGCCCCGCCCCGCCCCGTCTCGCCCCGCCCCCTAGGCGGCTCCCTGCTGTG
CCCCGCCCCGGCCTCGCCACGCCCCCTACCTACCACGCCCCCGCATCGCCACGCCCCCGCATCGCCA
CGCTCCCTTACCATGCAGTCCC GCCCGTCCCTTCTCGTCCCGCTCGCCGCGAACACTTCACACACA
GCTTCGCCTCACCCATTACAGTCTCACAGGCCCGTCCCTCTCCGTTGAGCCCCGCGCTTCGCC
HD 1 reverse: **GAACGAGCACTCCGTCTTGG**
GGGTGGGGCGCTGCGCTGTCAGCGGC**CTTGCTGCGTGAGGCAGAAC**CTGCGGGGGCAGGGGCGGGCTG
GTTCCCTGGCCAGCCATTGGCAGAGTCCGCAGGCTAGGGCTGTCAATCATGCTGGCCGGCGTGCCCCCG
CTCCGCCGGCGCGGCCCGCTCCGCCGGCGCAGCGTCTGGGACGCAAGGCGCCGTGGGGGCTGCCGGG
ACGGGTCCAAGATGGACGGCCGCTCAGGTTCTGCTTTTACCTGCGGCCAGAGCCCCATTATTGCCCC

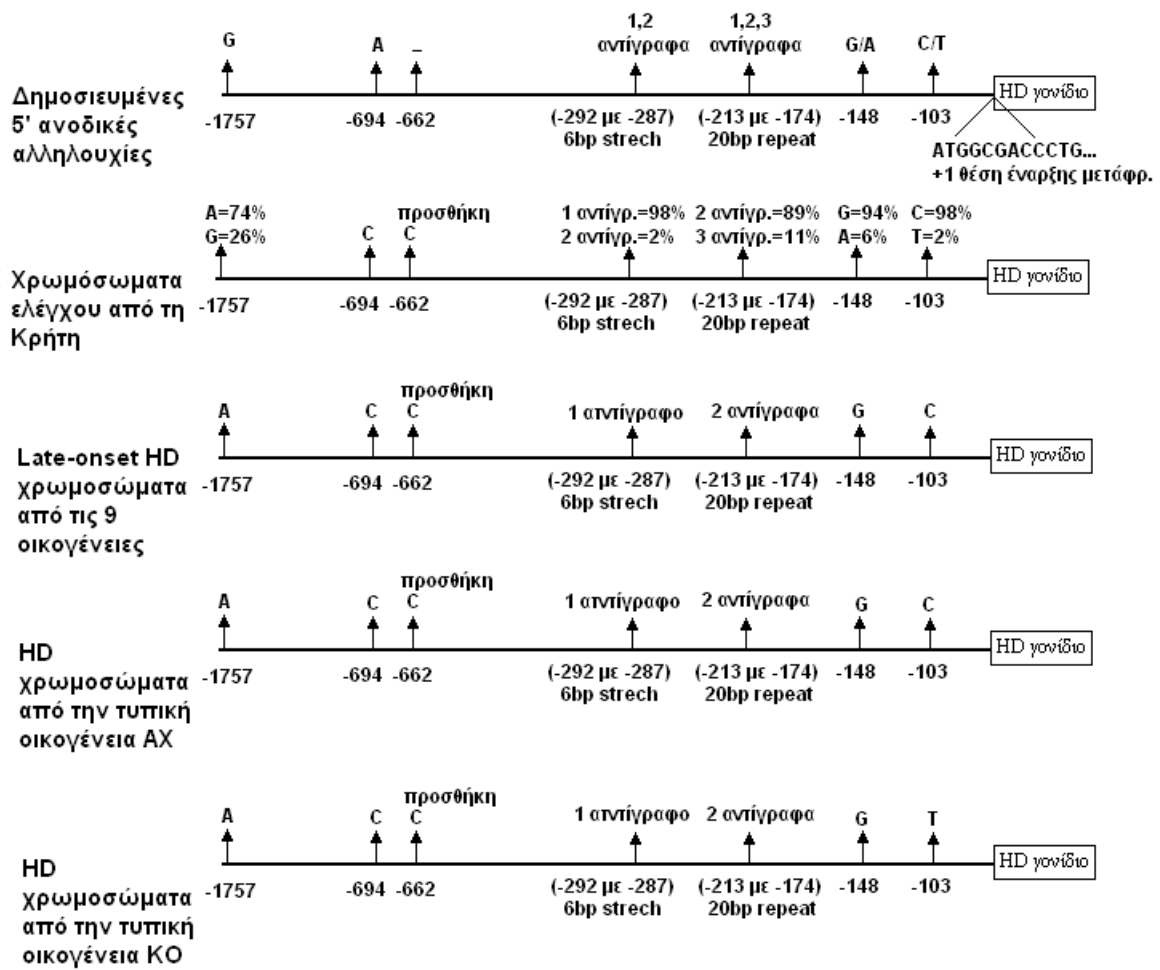
GGTGCTGAGCGGCGCCGCGAGTCGGCCCCGAGGCCTCCGGGGACTGCCGTGCCGGGCGGGAGACCGCC
 +1 → (αρχή μετάφρασης του εξωνίου 1 του HD γονιδίου)
 ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTCCCAGCAGCAGCAGCAGCAG
 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCCCGC.....

Εικόνα 28. Καμία αλλαγή οποιουδήποτε τύπου δεν διαπιστώθηκε η οποία να εμφανίζεται μόνο στους late-onset ασθενείς. Οι 5500 βάσεις του απλοτύπου στο 5' άκρο του HD γονιδίου δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ ασθενών με την τυπική μορφή της νόσου, ασθενών με την όψιμη μορφή της νόσου και φυσιολογικών ατόμων.

Οι πολυμορφισμοί που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν μια αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο στις θέσεις -103 (C→T) και -148 (G→A), μια stretch επανάληψη 6 νουκλεοτιδίων στη θέση -292 έως -287 και μια (direct repeat element) επανάληψη 20 ζ.β. στη θέση -213 έως -174. Επίσης βρήκαμε μια νέα αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στη θέση -1757 (G→A). Αυτή η νέα αλλαγή υπήρχε σε όλα τα HD χρωμοσώματα που μελετήσαμε, τόσο από τις late-onset, όσο και από τις τυπικές HD οικογένειες. Η G→A αλλαγή στη θέση -1757 βρέθηκε στο 74% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από την Κρήτη (n=206) και στο 52% των χρωμοσωμάτων από τη Βόρειο Αμερική με Ευρωπαϊκή καταγωγή (n=118) (p<0.001) (**Εικόνα 29**). Όλα τα HD χρωμοσώματα και από τις 9 late-onset οικογένειες και από την τυπική HD οικογένεια AX δείχνουν τον ίδιο απλότυπο (-103: C, -148: G, επανάληψη 20ζ.β. (-213 to -174): 2 αντίγραφα, επανάληψη 6ζ.β. (-292 to -287): 1 αντίγραφο, -1757: A). Αντίθετα η τυπική HD οικογένεια KO είχε ένα T αντί του C στη θέση -103. Αυτό ήταν παρών μόνο στο 2% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από την Κρήτη (**Εικόνα 29**).

Συγκρίναμε την αλληλουχία που μελετήσαμε με αυτή που είναι δημοσιευμένη στην databank και φάνηκαν δύο αλλαγές σε μονά νουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν μια μετατροπή A→C στη θέση -694 και μια προσθήκη ενός C μεταξύ -662 και -663. Αυτές οι αλλαγές υπήρχαν σε όλα τα HD χρωμοσώματα και τα χρωμοσώματα ελέγχου από την Κρήτη και σε όλα τα 28 χρωμοσώματα από την Βόρεια Αμερική με Ευρωπαϊκή καταγωγή.

Αυτές οι αλλαγές υπάρχουν στις αλληλουχίες όλων των ατόμων που εξετάστηκαν, υγιών και ασθενών. Αυτό το δεδομένο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για πολυμορφισμούς στο γονιδίωμα του Ελληνικού πληθυσμού.



Εικόνα 29: Απλότυποι της 5' περιοχής ανοδικά του HD γονιδίου. Εκτός από τους σπάνιους πολυμορφισμούς στις θέσεις -103, -148, -213 με -174 και -292 με -287, που έχουν ήδη περιγραφεί, ένα SNP (G→A) ανιχνεύθηκε στη θέση -1757. Αυτό ήταν παρών στο 74% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από τη Κρήτη και στο 52% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από την Βόρεια Αμερική. Επίσης η αλληλουχία μας διαφέρει από αυτή που έχει περιγραφεί παλιότερα, όπου μια αλλαγή A→C υπάρχει στη θέση -694 και μια εισαγωγή ενός C μεταξύ των θέσεων -662 και -663. Αυτές οι δύο τελευταίες αλλαγές υπάρχουν και στα 28 χρωμοσώματα ελέγχου από την Βόρεια Αμερική με Ευρωπαϊκή καταγωγή.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην Κρήτη παρατηρήσαμε μια μορφή της νόσου HD με καθυστερημένη ηλικία έναρξης (>50 χρόνια) των συμπτωμάτων (late-onset), η οποία ήταν πιο συχνή σε σχέση με την τυπική μορφή με έναρξη των συμπτωμάτων στη μέση ηλικία (typical onset). Τα δείγματα μας είναι αντιπροσωπευτικά από όλο τον πληθυσμό του νησιού, μια και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου καταφθάνουν ασθενείς από όλο το νησί. Τέτοια περιστατικά έχουν βρεθεί σε όλους τους νομούς της Κρήτης, αλλά έχουν εντοπιστεί σημαντικές εστίες της νόσου στο νομό Ηρακλείου και Λασιθίου, δηλαδή στο ανατολικό τμήμα της Κρήτης. Η συχνότητα των late-onset HD περιστατικών παγκοσμίως είναι 10%-25%, ενώ τα αντίστοιχα περιστατικά στην Κρήτη εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Οι Κρητικοί έχουν παρόμοια διάρκεια ζωής ή και μεγαλύτερη από ανθρώπους δυτικών χωρών, διατηρούν ισχυρούς οικογενειακούς δεσμούς και δεν παρατηρείται μεγάλος βαθμός μετανάστευσης. Αυτά τα δεδομένα μας επέτρεψαν να συλλέξουμε γενεαλογικές πληροφορίες από κάθε HD ασθενή και να περιγράψουμε τη νόσο για κάθε οικογένεια. Η μελέτη επεκτάθηκε και σε HD ασθενείς με την τυπική μορφή (typical-onset) της νόσου (έναρξη των συμπτωμάτων κατά την 4^η δεκαετία της ζωής) οι οποίοι προέρχονται από οικογένειες με καταγωγή επίσης από την Κρήτη, έτσι ώστε διαπιστώσουμε τυχόν διαφορές.

Για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας, η μελέτη μας δεν περιορίστηκε μόνο στα ασθενή άτομα των οικογενειών, αλλά και στους υγιείς συγγενείς τους και σε άτομα υγιή από τον γενικό πληθυσμό. Έτσι συλλέχθηκαν δείγματα από υγιή άτομα του γενικού πληθυσμού της Κρήτης. Δείγμα από αίμα των ατόμων αυτών πάρθηκε στο αιματολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και η επιλογή τους ήταν τυχαία. Τα άτομα αυτά δεν έχουν κανένα συγγενικό δεσμό μεταξύ τους. Στα άτομα ελέγχου προστέθηκαν και δείγματα που προϋπήρχαν στο εργαστήριο Νευρολογίας με ελληνική καταγωγή και χωρίς νευρολογικά συμπτώματα.

Οι κλινικές μελέτες στα άτομα των late-onset οικογενειών έδειξε ότι η μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου είναι στα 56.1 ± 10.2 έτη και δεν διέφερε αν συγκρίνουμε άτομα που έχουν πεθάνει ήδη από την νόσο με ασθενή άτομα που ζουν. Το 82% των ασθενών εκδηλώνουν τα πρώτα συμπτώματα της νόσου μετά τα 50 τους χρόνια, ενώ το 41% μετά τα 60 τους χρόνια. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων διαφέρει από αυτήν που έχει καταγραφεί βιβλιογραφικά για την HD

και είναι στα 40 χρόνια. Αξίζει να σημειωθεί ότι οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου (έναρξη συμπτωμάτων την 4^η δεκαετία της ζωής) έχουν ανιχνευθεί και στην Κρήτη, με μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στα 41.06 ± 10.08 χρόνια. Στις οικογένειες αυτές παρατηρούμε ότι η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων σε προσβεβλημένα άτομα που ζουν είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη ηλικία ατόμων από προηγούμενες γενιές που έχουν πεθάνει. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με το φαινόμενο του *anticipation*, που περιγράφεται παρακάτω.

Η καθυστερημένη ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στους late-onset ασθενείς συντείνει και στην παράταση του χρόνου ζωής τους. Στα 46 μέλη των οικογενειών που έχουν πεθάνει από τη νόσο, ο θάνατος επήλθε 12-14 χρόνια μετά την έναρξη των πρώτων συμπτωμάτων. Ο μέσος όρος ηλικίας θανάτου είναι $68,0 \pm 10.5$ χρόνια, ενώ δεν παρατηρούνται αποκλίσεις στην ηλικία θανάτου, να συγκρίνουμε γονείς και παιδιά που έχουν πεθάνει από τη νόσο. Στους typical onset ασθενείς της Κρήτης η ηλικία θανάτου είναι 58 ± 14.26 χρόνια.

Από κλινικές μελέτες σε 39 ζευγάρια γονιών-παιδιών (21 μεταβιβάσεις από πατέρα και 18 από μητέρα) στις late-onset οικογένειες δεν φάνηκε καμία διαφορά στην ηλικία έναρξης της νόσου. Καμιά από αυτές τις μεταβιβάσεις δεν οδήγησε σε εκδήλωση της νόσου σε νεαρότερη ηλικία (young –onset), είτε η μεταβίβαση ήταν από τον πατέρα είτε από την μητέρα. Επιπροσθέτως μελέτη σε 12 μειωτικές μεταβιβάσεις της CAG επανάληψης σε ασυμπτωματικά μέλη των οικογενειών δεν έδειξε επεκτάσεις που να προβλέπουν την εκδήλωση της ασθένειας σε νεαρότερη ηλικία γι' αυτά τα άτομα. Τα περισσότερα από αυτά τα άτομα με ένα HD χρωμόσωμα είναι ενήλικοι από 30 έως 50 έτη.

Η επέκταση της τριπλέτας CAG έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση της HD. Η ανάλυση της CAG επανάληψης στα άτομα που φέρουν το HD χρωμόσωμα (άτομα που νοσούν και άτομα που δεν έχουν εκδηλώσει ακόμα τα συμπτώματα, αλλά είναι σε υψηλό κίνδυνο) έδειξε ότι το μέγεθος της κυμαίνεται από 36-42 τριπλέτες και τα 2/3 των χρωμοσωμάτων φέρουν πάνω από 40 επαναλήψεις. Το μέγεθος της CAG επανάληψης είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της ασθένειας ($r = -0,74$). Το δεδομένο αυτό εμπλέκει την CAG επανάληψη σαν ένα ισχυρό παράγοντα για την φαινοτυπική έκφραση του HD γονιδίου στην Κρήτη σε αντίθεση με ότι παρατηρείται σε late-onset περιπτώσεις ανά τον κόσμο, όπου το μέγεθος της CAG επανάληψης έχει ελάχιστη συσχέτιση με την ηλικία έναρξης της νόσου (Kremer B. et al 1993). Στα typical-onset και early-onset περιστατικά, το

μέγεθος της CAG επανάληψης επίσης σχετίζεται άμεσα με την ηλικία έναρξης της νόσου (όσο μικρότερη είναι η ηλικία έναρξης, τόσο περισσότερες CAG επαναλήψεις έχει το άτομο) (Andrew S.E. et al 1993, Telenius H. et al 1993). Αυτό που δεν έχει εξηγηθεί είναι πως το μήκος της CAG επανάληψης σχετίζεται με την βιολογία της νόσου. Αν η επίδραση της CAG επανάληψης στην πρωτεΐνη σχετίζεται με το μήκος της επανάληψης θα περίμενε κανείς ότι οι μεγαλύτερες επαναλήψεις θα είχαν το χειρότερο αποτέλεσμα στο γονιδιακό προϊόν, άρα και η εκδήλωση των συμπτωμάτων στα άτομα αυτά να είναι σε πιο βαριά μορφή. Κάτι τέτοιο επαληθεύεται στα περιστατικά με την τυπική μορφή της νόσου, αλλά κυρίως στα άτομα με έναρξη των συμπτωμάτων σε πολύ νεαρή ηλικία, όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται νωρίς και σε βαριά μορφή. Στα late-onset περιστατικά από την Κρήτη, η CAG επανάληψη είναι στα χαμηλά παθολογικά όρια (μέση τιμή 42) και συνεργάζεται με ένα φαινότυπο που εμφανίζεται σε πολύ μεγαλύτερη ηλικία.

Το μέγεθος της επέκτασης της CAG επανάληψης δείχνει σταθερό μέσα σε κάθε οικογένεια, εκτός από μερικές εξαιρέσεις. Έτσι σε 3 μεταβιβάσεις παρατηρείται μείωση του μεγέθους της CAG επανάληψης κατά 1 τριπλέτα, σε μία μεταβίβαση μείωση κατά 2 τριπλέτες. Στην τελευταία περίπτωση η μεταβίβαση γίνεται από ένα ασθενές άτομο με 36 CAGs σε άτομο με 34 CAGs που δεν έχει εκδηλώσει τη νόσο (ηλικία 51 ετών) και οι πιθανότητες να την εκδηλώσει είναι ελάχιστες, αφού τα 34 CAGs είναι στα φυσιολογικά όρια (οικογένεια MA). Αύξηση κατά 1 τριπλέτα παρατηρήθηκε σε μία μεταβίβαση και σε άλλη μία μεταβίβαση αύξηση κατά δύο τριπλέτες. Είναι χαρακτηριστική η σταθερότητα της CAG επανάληψης κατά την μεταβίβαση σε τρεις γενιές (γονέας, παιδί, εγγόνι), (οικογένειες BR1 και BR3).

Η μελέτη συνολικά 14 μειωτικών μεταβιβάσεων της CAG επανάληψης (9 πατρικές και 5 μητρικές) έδειξε ότι στις 12 από αυτές η μεταβίβαση της CAG επανάληψης έχει γίνει σε ασυμπτωματικά παιδιά (που φέρουν το HD γονίδιο) και σε δύο σε παιδιά που έχουν εκδηλώσει τη νόσο. Φαίνεται λοιπόν ότι η CAG επανάληψη πέρασε στη επόμενη γενιά χωρίς να τροποποιηθεί σε 8 από τις 14 μεταβιβάσεις (ποσοστό 57%), ενώ στις υπόλοιπες 6 (43%) άλλαξε ελαφρώς (επέκταση ή συστολή κατά 1 με 2 τριπλέτες).

Οι αποκλίσεις αυτές είναι πολύ μικρές σε σχέση με αυτές που έχουν καταγραφεί διεθνώς και μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πράγματι το μέγεθος της CAG επανάληψης στους late-onset ασθενείς της Κρήτης παρουσιάζει μια σταθερότητα κατά τις μειωτικές μεταβιβάσεις. Επίσης το μέγεθος της CAG

επανάληψης μεταξύ αδελφών παρουσιάζεται σταθερό ή διαφέρει κατά μία τριπλέτα, μια παρατήρηση διαφορετική από άλλα περιστατικά από τον υπόλοιπο κόσμο και από άλλες περιοχές τις Ελλάδας.

Αντίθετα στις typical-onset οικογένειες από την Κρήτη το μέγεθος της CAG επανάληψης κυμαίνεται από 37-54 (μέση τιμή: 42). Στις δύο οικογένειες που μελετήσαμε παρουσιάζεται χαρακτηριστική αστάθεια της CAG επανάληψης, με τάση για επέκταση κατά την μεταβίβαση της από γενιά σε γενιά, ενώ δεν παρατηρείται καμία συστολή. Σε δύο μειωτικές μεταβιβάσεις που αναλύθηκαν η CAG επανάληψη επεκτάθηκε κατά 3 τριπλέτες στη μία και στη δεύτερη κατά 13 τριπλέτες. Η επέκταση των 13 CAGs παρατηρήθηκε σε άτομο που εκδήλωσε τη νόσο σε νεαρή ηλικία. Και οι δύο μεταβιβάσεις ήταν πατρικής προέλευσης. Διαφορές στον αριθμό των CAG τριπλετών παρατηρούνται και μεταξύ αδελφών. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν το φαινόμενο του anticipation σε αυτές τις οικογένειες και είναι παρόμοια με αυτά που έχουν δημοσιευθεί παγκοσμίως, αλλά διαφέρουν από αυτά που καταγράφηκαν για τις late-onset οικογένειες.

Επιπλέον ανάλυση σπέρματος με την τεχνική καθορισμού της (CAG) επανάληψης σε μονήρη σπερματικά κύτταρα, επιβεβαιώνει την σταθερότητα των (CAG)_n επαναλήψεων κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης στους κληθικούς ασθενείς.

Τα τωρινά μας αποτελέσματα βασίζονται σε 51 μεταβιβάσεις και δείχνουν σταθερότητα στη μεταβίβαση της CAG επανάληψης, ενώ η μικρή αστάθεια που παρατηρείται (1 με 2 τριπλέτες) είναι ανεξάρτητη από το φύλο του γονέα που μεταφέρει την επανάληψη. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα που υπάρχουν από μελέτες σε HD οικογένειες με την τυπική μορφή της νόσου, όπου η αστάθεια της CAG επανάληψης είναι πιο συχνή όταν μεταβιβάζεται από τον πατέρα (Snell R. G. et al 1993, Duyao M. et al 1993). Ο Snell αναφέρει ότι η μέση διαφορά στην ηλικία έναρξης της νόσου κατά τις πατρικές μεταβιβάσεις είναι 9.11 χρόνια, ενώ οι μετρήσεις στις δικές μας οικογένειες δείχνουν καθόλου έως ελάχιστη διαφορά (πατρικές μεταβιβάσεις 0.83 ± 7.94 χρόνια, μητρικές μεταβιβάσεις 1.1 ± 5.14).

Η έλλειψη anticipation στις late-onset HD οικογένειες της Κρήτης, ίσως μπορεί να εξηγηθεί από την τάση της CAG επανάληψης να διατηρεί το μέγεθος της ή να παθαίνει μικρές αλλαγές (μία με δύο CAG τριπλέτες) κατά την μεταφορά της σε διαδοχικές γενεές.

Απλοτυπική ανάλυση

Στόχος της μελέτης μας αρχικά στην ιδιαίτερη αυτή ομάδα HD ασθενών από την Κρήτη (late-onset) ήταν να ερευνήσουμε κατά πόσο τα άτομα των οικογενειών αυτών σχετίζονται με μια αρχική μετάλλαξη (founder effect) και για το λόγο αυτό καθορίσαμε το απλοτυπικό προφίλ των οικογενειών χρησιμοποιώντας πολυμορφικούς STR δείκτες εντός και εκτός του HD γονιδίου και SNPs μέσα στο HD γονίδιο. Η επιλογή των δεικτών έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε ο απλότυπος των HD ασθενών εκτείνεται σε μια περιοχή όσο το δυνατόν μικρότερη που να περιλαμβάνει το HD γονίδιο, αλλά και περιοχές προς το τελομερές και προς το κεντρομερές.

Κατά την απλοτυπική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 11 πολυμορφικοί STRs δείκτες από την 4p16.3 περιοχή και ο αρχικός έλεγχος των αποτελεσμάτων μας ήταν κατά πόσο οι δείκτες αυτοί παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό στα άτομα ελέγχου που διαθέτουμε. Πράγματι, όπως φαίνεται και στους πίνακες 13-17 (κεφάλαιο αποτελεσμάτων) τα περισσότερα από τα δημοσιευμένα αλληλόμορφα των δεικτών εμφανίζονται τόσο στα φυσιολογικά χρωμοσώματα από τα άτομα ελέγχου, όσο και στα φυσιολογικά χρωμοσώματα από τους HD ασθενείς. Στα παθολογικά χρωμοσώματα εμφανίζονται λιγότερα σε αριθμό αλληλόμορφα και σε διαφορετικά ποσοστά (μικρότερα ή μεγαλύτερα συγκρινόμενα με τα ποσοστά στα φυσιολογικά χρωμοσώματα). Φαίνονται δε τα διαφορετικά αλληλόμορφα που επικρατούν στους late-onset ασθενείς σε σχέση με τους typical-onset, μια ένδειξη ότι έχει λάβει χώρα μετάλλαξη στην περιοχή του HD γονιδίου και διαφοροποιεί την κληρονομηση της νόσου στις δύο της μορφές στην Κρήτη. Όσον αφορά τα ενδογονιδιακά SNPs, 12 από αυτά παρουσιάζουν πολυμορφισμό στα άτομα ελέγχου. Στα 9 από τα 12 SNPs παρατηρούμε ότι τα αλληλόμορφα που εμφανίζονται στους late-onset ασθενείς είναι ίδια με τους typical-onset και είναι αυτά με το μεγαλύτερο ποσοστό στα άτομα ελέγχου. Μόνο τρία SNPs (rs362277, rs3025814 και rs 2530596) δείχνουν διαφοροποίηση μεταξύ των late-onset και των typical-onset ασθενών.

Τα αποτελέσματα από την απλοτυπική ανάλυση κατέδειξαν ότι όλες οι late-onset HD οικογένειες φέρουν ένα κοινό απλότυπο, ο οποίος καθορίζεται από τους ακόλουθους STRs δείκτες και SNPs: D4S95:1090, D4S127:157, rs362277:A, rs3025814:G, rs2530596:A. Το μήκος αυτής της συντηρημένης περιοχής είναι 0.277 Mb. Αυτοί οι δείκτες συνδέονται ισχυρά με την μετάλλαξη, χωρίς να παρατηρείται ανασυνδιασμός μεταξύ τους, τουλάχιστον για αρκετές εκατοντάδες μειώσεις. Οι οικογένειες (BR1-BR6) που προέρχονται από το ίδιο χωριό (BR) έχουν κοινή μια

μεγαλύτερη περιοχή του χρωμοσώματος, μήκους 2.7Mb μεταξύ των δεικτών D4S3038 και ADRA2C. Επίσης οι 6 οικογένειες από το χωριό BR και η οικογένεια από το χωριό MA έχουν κοινή μια μεγαλύτερη περιοχή του χρωμοσώματος που περικλείεται από τους δείκτες D4S182 και ADRA2C, μήκους περίπου 1 Mb (Για τον δείκτη D4S182 δεν έχει εκτιμηθεί η ακριβής θέση του στην περιοχή 4p16.3). Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να σχετίζονται με το γεγονός ότι οι οικογένειες αυτές προέρχονται από γειτονικές περιοχές και υποδηλώνουν ότι η αρχική μετάλλαξη υπήρξε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα χωριά AM και PE και μεταγενέστερα κατευθύνθηκε προς το χωριό MA και τελικά προς το χωριό BR.

Σε αντίθεση οι HD οικογένειες από την Κρήτη με την τυπική μορφή της νόσου μοιράζονται έναν δικό τους διαφορετικό απλότυπο (D4S95:1090, D4S127:159/155, rs362277:G/A, rs3025814:C, rs2530596:G), πράγμα που προτείνει ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί ιδρυτές founder της νόσου στην Κρήτη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ενδογονιδιακός δείκτης Δ2642 (έλλειψη της τριπλέτας GAG), ο οποίος υπάρχει σε ποσοστό 2% στα υγιή άτομα από την Κρήτη (πίνακας 15) και εμφανίζεται και στην οικογένεια AX, αλλά όχι στην οικογένεια KO, που εμφανίζουν και οι δύο την τυπική μορφή της νόσου. Το αντίστροφο παρουσιάστηκε για τον σπάνιο πολυμορφισμό στη θέση -103 (C→T) του υποκινητή, που εμφανίζεται στην οικογένεια KO και όχι στην AX. Αυτός ο πολυμορφισμός παρουσιάζεται στο 2% των υγιών ατόμων από την Κρήτη (άτομα ελέγχου).

Ανάλυση αλληλουχίας

Η μελέτη τμήματος αλληλουχίας από το πρώτο εξώνιο του HD γονιδίου και μέρος της ρυθμιστικής του περιοχής (-109ζ.β έως +587 ζ.β. (μέγεθος 696 ζ.β.)) έδειξε ότι η CAG επανάληψη είναι συνεχής και δεν διακόπτεται από άλλες μικρότερες αλληλουχίες. Σε άλλους HD ασθενείς έχει παρατηρηθεί μια μετατροπή της τριπλέτας CAA σε CAG, όμως στους late-onset HD ασθενείς από την Κρήτη δεν παρατηρείται καμιά τέτοια μετατροπή. Μέχρι τώρα μελέτες σε άλλα νοσήματα με αστάθεια του (CAG) repeat, όπως στην αταξία τύπου I (SCA I) έχουν δείξει ότι στην πλειονότητα των φυσιολογικών ατόμων η επανάληψη διακόπτεται προσδίδοντας έτσι σταθερότητα στο γονίδιο και στην ανάπτυξη της μετάλλαξης. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και για την επανάληψη AGG στο FMR1 γονίδιο. Η απώλεια της διακοπής αυτής (interruption) οδηγεί στην αστάθεια. Οι δικές μας παρατηρήσεις δεν έδειξαν κάτι αντίστοιχο που

να ερμηνεύει τη σταθερότητα της CAG επανάληψης στους late-onset HD ασθενείς από την Κρήτη.

Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο Νευρολογίας (Tsagournisakis M. et al. 1996), προχώρησε στην ανάλυση των τριπλετών CCG που βρίσκονται καθοδικά του CAG που κωδικοποιούν για το αμινοξύ προλίνη και φαίνεται ότι είναι πολυμορφική. Η πολυμορφική επανάληψη φαίνεται να δείχνει στοιχεία γενετικής σύνδεσης ανισορροπίας (lingage disequilibrium) με τη νόσο του HD (Rubinsztein C. D. et al 1993, Barron L. et al 1994, Yarijakis C. et al 1995). Βρέθηκε ότι όλοι οι ασθενείς με την νόσο του HD έχουν 7 (CCG) επαναλήψεις, ενώ στα φυσιολογικά άτομα παρουσιάζεται πολυμορφισμός (7-12 επαναλήψεις). Αυτό σημαίνει ότι οι επαναλήψεις της προλίνης μπορεί να διευκολύνουν την αστάθεια του (CAG) κατά την μεταβίβαση του από γενιά σε γενιά, δηλαδή να είναι ένας παράγοντας (αλλά όχι ο μοναδικός) που οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των τριπλετών (CAG). Όμως το εύρημα ότι υπάρχουν 7 CCG επαναλήψεις σε όλα τα χρωμοσώματα των ασθενών της Κρήτης με μεγάλη ηλικία έναρξης, δεν τα διαχωρίζει από την κλασσική μορφή, η οποία επίσης παρουσιάζει τον (CCG) απλότυπο. Έτσι η αλλαγή αυτή δεν μπορεί να ευθύνεται για την ύπαρξη της νόσου σε μεγάλη ηλικία, αλλά και για τη σταθερότητα της CAG επανάληψης στις late-onset οικογένειες.

Στη διερεύνηση μας για άλλα στοιχεία του γονιδιώματος (cis-acting elements) που μπορεί να σχετίζονται με την CAG σταθερότητα και εφόσον η CAG επανάληψη δεν παρουσιάζει καμιά διακοπή ή αλλαγή, προχωρήσαμε σε ανάλυση της αλληλουχίας περιοχών πιο μακριά από το HD γονίδιο. Πιο συγκεκριμένα ψάξαμε για τυχόν αλλαγές στις αλληλουχίες που γειτνιάζουν με το HD γονίδιο, σε μια περιοχή μήκους 5500ζ.β. από την -317 μέχρι την -5515 βάση ανοδικά της 5' μεταγραφόμενης περιοχής του HD γονιδίου. Η ρυθμιστική περιοχή του HD γονιδίου βρέθηκε από πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια. Έτσι φαίνεται να εμπλέκεται μια περιοχή 1000ζ.β. ανοδικά της θέσης +1 στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου. Η έναρξη της μεταγραφής πιστεύεται ότι ξεκινάει από την -135 ή δυνητικά από την -145 θέση. Η περιοχή είναι πλούσια σε G/C (70% GC-rich) και δεν υπάρχει TATA ή CCAAT box. Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι μια ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή αφού εμφανίζει 78.8% ομοιότητα με αυτή του ποντικού (Coles R. et al 1998). Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των late-onset και των typical-onset HD ασθενών ή μεταξύ των late-onset και των υγιών ατόμων. Οι αλληλουχίες όμως από όλα τα άτομα που μελετήθηκαν εμφάνισαν

διαφορές με την ανθρώπινη αλληλουχία που υπάρχει διαθέσιμη στις databases στο διαδίκτυο. Οι αλλαγές αυτές ήταν κοινές σε 3 κατηγορίες ατόμων και αφορούν σημειακές αλλαγές νουκλεοτιδίων στις θέσεις -662, -694, -1757, -2118. Διευρευνήσαμε αν τα 4 αυτά σημεία ήταν αναγνωρισμένα SNPs, αλλά δεν υπάρχουν πληροφορίες για πολυμορφισμούς στην περιοχή αυτή. Ίσως και να μην έχει ελεγχθεί ακόμα αυτή η περιοχή. Η έλλειψη πληροφοριών για SNPs δεν αναιρεί την πιθανότητα, αυτές οι 4 αλλαγές να αφορούν πολυμορφισμούς του κρητικού, αλλά και ευρύτερα του ελληνικού πληθυσμού, αφού παρουσιάζονται σε όλα τα άτομα ανεξάρτητα από τη καταγωγή τους.

Οι πολυμορφισμοί που παρατηρήθηκαν περιλαμβάνουν μια αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο στις θέσεις -103 (C→T) και -148 (G→A), μια stretch επανάληψη 6 νουκλεοτιδίων στη θέση -292 έως -287 και μια (direct repeat element) επανάληψη 20 ζ.β. στη θέση -213 έως -174. Επίσης βρήκαμε μια νέα αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στη θέση -1757 (G→A). Αυτή η νέα αλλαγή υπήρχε σε όλα τα HD χρωμοσώματα που μελετήσαμε, τόσο από τις late-onset, όσο και από τις τυπικές HD οικογένειες. Η G→A αλλαγή στη θέση -1757 βρέθηκε στο 74% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από την Κρήτη (n=206) και στο 52% των χρωμοσωμάτων από τη Βόρειο Αμερική με Ευρωπαϊκή καταγωγή (n=118) (p<0.001). Όλα τα HD χρωμοσώματα και από τις 9 late-onset οικογένειες και από την τυπική HD οικογένεια AX δείχνουν τον ίδιο απλότυπο (-103: C, -148: G, επανάληψη 20ζ.β. (-213 to -174): **2 αντίγραφα**, επανάληψη 6ζ.β. (-292 to -287): **1 αντίγραφο**, -1757: A). Αντίθετα η τυπική HD οικογένεια KO είχε ένα T αντί του C στη θέση -103. Αυτό ήταν παρών μόνο στο 2% των χρωμοσωμάτων ελέγχου από την Κρήτη. (**Εικόνα 29**).

Συγκρίναμε την αλληλουχία που μελετήσαμε με αυτή που είναι δημοσιευμένη στην databank και φάνηκαν δύο αλλαγές σε μονά νουκλεοτίδια που περιλαμβάνουν μια μετατροπή A→C στη θέση -694 και μια προσθήκη ενός C μεταξύ -662 και -663. Αυτές οι αλλαγές υπήρχαν σε όλα τα HD χρωμοσώματα και τα χρωμοσώματα ελέγχου από την Κρήτη και σε όλα τα 28 χρωμοσώματα από την Βόρεια Αμερική με Ευρωπαϊκή καταγωγή. Αυτές οι αλλαγές υπάρχουν στις αλληλουχίες όλων των ατόμων που εξετάστηκαν, υγιών και ασθενών. Αυτό το δεδομένο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για πολυμορφισμούς στο γονιδίωμα του Ελληνικού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα μας λοιπόν μας οδηγούν στα εξής συμπεράσματα: α) Η περιοχή που διαφοροποιεί τους late-onset από τους typical-onset HD ασθενείς και πιθανόν καθορίζει και την αστάθεια της CAG επανάληψης, δεν εντοπίζεται στην περιοχή των 5500ζ.β. β) δεν υπάρχει καμιά νουκλεοτιδική διαφορά στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου ή μέσα στο πρώτο εξώνιο στις δύο ομάδες ασθενών που να δικαιολογεί τη διαφορά στην αστάθεια της CAG επανάληψης.

Είναι λοιπόν πιθανό, πέραν της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου, η λειτουργικότητα της οποίας θεωρείται απαραίτητη για την εμφάνιση της (CAG)n αστάθειας σε διαγονιδιακά ποντίκια (Mangiarini L. et al 1997, Goldberg Y. P. et al 1996), να υπάρχουν και άλλες αλληλουχίες μακριά από το γονίδιο που και αυτές να εμπλέκονται στην CAG αστάθεια.

Ανάλυση σύνδεσης ανισορροπίας

Για να εκτιμήσουμε κατά πόσο οι δείκτες μας σχετίζονται με την κληρονόμηση του HD γονιδίου προχωρήσαμε σε ανάλυση σύνδεσης γενετικής ανισορροπίας. Ο έλεγχος έγινε για τους 5 πολυμορφικούς δείκτες που περιβάλλουν τον συντηρημένο απλότυπο (D4S43, D4S136, D4S182, D4S126 και D4S431). Ένα αλληλόμορφο για κάθε δείκτη σχετίζεται με την ασθένεια και παρουσιάζεται σε μεγάλο ποσοστό στους late-onset ασθενείς, σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό στα χρωμοσώματα ελέγχου. Τα αλληλόμορφα αυτά δεν εμφανίζονται στους typical-onset HD ασθενείς.

Η Coalescence ανάλυση για τις late-onset HD οικογένειες έδειξε συνένωση των οικογενειών 31.0 ± 2.1 γενεές πηγαίνοντας πίσω στο παρελθόν (με 90% διάστημα εμπιστοσύνης = 25-30 γενεές). Αν υποθέσουμε ότι η μία γενιά διαρκεί 25 χρόνια, τότε η μετάλλαξη έλαβε χώρα πριν 875 χρόνια ή το 1100 μ.Χ.. Αυτή η χρονολογία ταυτίζεται με την ύστερη Βυζαντινή περίοδο ή την πρώιμη περίοδο της Ενετικής Αυτοκρατορίας στη Κρήτη. Όπως γίνεται αντιληπτό σ' αυτά τα χρόνια οι μετακινήσεις πληθυσμών ήταν πολλές και η πιθανότητα να εισήχθη η μετάλλαξη στον πληθυσμό της Κρήτης ήταν μεγάλη, καθώς και η περίπτωση να συνέβη η μετάλλαξη. Οι υπολογισμοί μας για την ηλικία της μετάλλαξης δεν καθορίζουν το πότε μπορεί να έγινε η μετάλλαξη, ή πότε επεκτάθηκε η CAG τριπλέτα από το φυσιολογικό στο παθολογικό μέγεθος, αλλά πότε ο πιθανός πρόγονος απέκτησε το HD χρωμόσωμα το οποίο οδήγησε στις late-onset HD περιπτώσεις. Η σύνδεση ανισορροπίας που βρέθηκε σε αρκετούς DNA δείκτες στην περιοχή 4p16.3 με τον

γενετικό τόπο της ασθένειας είναι ξεκάθαρο ότι δεν οφείλεται στην διαστρωμάτωση η οποία μπορεί να συνέβη σε απομονωμένες γενετικές ομάδες, αφού τα φυσιολογικά χρωμοσώματα των late-onset ασθενών παρουσιάζουν παρόμοιες συχνότητες στα αλληλόμορφα των δεικτών, με αυτές που παρατηρούνται στον γενικό πληθυσμό.

Από τη μελέτη σε ζευγάρια γονιών-παιδιών στις late-onset HD οικογένειες δεν φάνηκε ιδιαίτερη διαφορά στην ηλικία έναρξης της νόσου, εκτός από μια μικρή τάση η γενιά των απογόνων να εμφανίζει την νόσο λίγο πιο νωρίς (μέση ηλικία: 1.0 χρόνια) (**πίνακας 3 κεφάλαιο αποτελεσμάτων**). Αν πραγματικά σε διαδοχικές γενιές εκδηλώνεται η νόσος 1 χρόνο νωρίτερα κάθε φορά, είναι πιθανόν να χρειαστούν 30 γενιές (όπως δείχνει και η coalescence ανάλυση) ώστε η ηλικία έναρξης της νόσου να είναι μικρότερη από τα 56 χρόνια που έχουμε παρατηρήσει εμείς. Αν έχει συμβεί αυτό, τη χρονική στιγμή που παρουσιάστηκε ο απλότυπος που συνεργάζεται με την νόσο (30 γενιές πίσω) στον πρώτο πρόγονο, περιμένουμε το άτομο αυτό να είχε παρουσιάσει τα πρώτα του συμπτώματα σε πολύ μεγάλη ηλικία (την 8^η ή την 9^η δεκαετία της ζωής του).

Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι η δημιουργία της HD μετάλλαξης στις late-onset HD περιπτώσεις έγινε με μικρές προσαυξήσεις κατά την επέκταση της CAG επανάληψης, πιθανόν μέσα σε πολλές γενιές. Θα μπορούσε αυτή η μετάλλαξη να έχει δημιουργηθεί από την επέκταση ενός φυσιολογικού ενδιάμεσου αλληλομόρφου που περιέχει 25-35 CAGs (αλληλόμορφα με αυτό το μέγεθος έχουν βρεθεί στα φυσιολογικά χρωμοσώματα από τους HD ασθενείς της Κρήτης) και αυτή η σταδιακή διαδικασία φαίνεται να δημιουργεί αλληλόμορφα στο χαμηλό παθολογικό όριο (λίγο πάνω από το κατώφλι για την εκδήλωση της νόσου) που οδηγεί σε γηρασμένους HD αρχικούς προγόνους. Όμως αν αυτός είναι ο επικρατής τρόπος γένεσης της HD μετάλλαξης, γιατί τα late-onset HD οικογενειακά δέντρα δεν υπερισχύουν; Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η HD μετάλλαξη στις late-onset HD περιπτώσεις στον πληθυσμό της Κρήτης είναι ένα σχετικά πρόσφατο γεγονός και έτσι η εμφάνιση και των δύο μορφών της νόσου (late-onset και typical HD) στον πληθυσμό μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικά στάδια στην εξέλιξη της νόσου.

Σε αντίθεση με το μοντέλο αυτό της σταδιακής γένεσης της HD μετάλλαξης, όλες οι νέες HD μεταλλάξεις (*de novo*) που έχουν δημοσιευτεί στην βιβλιογραφία (Kremer B. et al 1994, Goldberg Y.P. et al 1993, Rubinsztein D.C. et al 1996, Goldberg Y.P. et al 1995, Goldberg Y.P. et al 1993, Laccone F. et al 2000, Sanchez A. et al 1997, Watanabe M. et al 2000), σχετίζονται με μεγάλη έκτασης επέκταση των γονεϊκών

ενδιάμεσων αλληλομόρφων (27-35 CAGs). Ειδικότερα σε 37 νέες HD μεταλλάξεις (σποραδικές περιπτώσεις) που έχουν περιγραφεί, (The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993, Goldberg Y.P. et al 1993, Goldberg Y.P. et al 1995, Goldberg Y.P. et al 1993, Laccone F. et al 2000, Sanchez A. et al 1997, Watanable M. et al 2000) το μεταλλαγμένο γονεϊκό ενδιάμεσο αλληλόμορφο αυξάνεται κατά 4-30 τρινουκλεοτιδικές τριπλέτες δίνοντας παθολογικά αλληλόμορφα με 41-66 επαναλήψεις. Η μέση ηλικία έναρξης της νόσου γι' αυτές τις *de novo* HD περιπτώσεις ήταν 33 ± 16 χρόνια (Goldberg Y.P. et al 1993, Goldberg Y.P. et al 1995, Goldberg Y.P. et al 1993), η οποία είναι χαμηλότερη απ' ότι αυτή για τις οικογενειακές HD περιπτώσεις. Η τάση των ενδιάμεσων αλληλομόρφων των γονιών στις *de novo* HD περιπτώσεις να παθαίνουν μεγάλες επεκτάσεις κατά τη διάρκεια της μειωτικής μεταβίβασης χρειάζεται να αποδειχθεί περαιτέρω από το αυξανόμενο και επαναλαμβανόμενο ρίσκο των παιδιών από γονείς με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (Goldberg Y.P. et al 1993, Rannala B. et al 2001, McNeil S.M. et al 1997, Goldberg Y.P. et al 1995, Goldberg Y.P. et al 1993, Laccone F. et al 2000, Sanchez A. et al 1997, Watanable M. et al 2000). Επιπροσθέτως η νέα εκτεταμένη CAG επανάληψη παραμένει ασταθής κατά τη διάρκεια της μεταβίβασης σε διαδοχικές γενιές (Duyao M. et al 1993, Djousse L. et al 2003). Από την άλλη, ενδιάμεσα αλληλόμορφα που βρίσκονται σε παράλληλους κλάδους από *de novo* HD οικογένειες εμφανίζονται σταθερά κατά τη διάρκεια της μειωτικής μεταβίβασης ή εμφανίζουν μια μικρή αστάθεια που περιλαμβάνει μικρές προσαυξήσεις. (Goldberg Y.P. et al 1993, McNeil S.M. et al 1997, Goldberg Y.P. et al 1995, Goldberg Y.P. et al 1993, Laccone F. et al 2000, Sanchez A. et al 1997, Watanable M. et al 2000).

Προς το παρόν οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην αστάθεια της CAG επανάληψης στην HD δεν είναι διευκρινισμένοι. Ο Goldberg et.al. δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια που περιείχαν ολόκληρο το ανθρώπινο HD cDNA και βρήκαν ότι η CAG επανάληψη παρέμενε σταθερή κατά τη διάρκεια 97 μειώσεων, γεγονός που προτείνει ότι γενωμικές αλληλουχίες έξω από το HD γονίδιο είναι υπεύθυνες για την αστάθεια της CAG επανάληψης (Goldberg Y.P. et al 1996). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει από τους La Spada et.al. για το Kennedy syndrome, όπου εμπλέκονται *cis-acting elements* στην αστάθεια της CAG επανάληψης. Συγκεκριμένα ενσωμάτωσαν ένα τμήμα 70 Kb από τον human androgen receptor (AR) locus σε ποντίκια και δημιούργησαν ασταθείς διαγονιδιακές σειρές, ενώ η ενσωμάτωση του

ίδιου τμήματος απουσία γειτονικών αλληλουχιών παρήγαγε σταθερές διαγονιδιακές σειρές (La Spada A.R. et al 1998). Επίσης έχει προταθεί ότι ειδικές αλληλουχίες πολύ κοντά στο υπεύθυνο γονίδιο για την SCA-7 επηρεάζουν τη αστάθεια της επανάληψης γι' αυτό τον γενετικό τόπο (Libby R.T. et al 2003). Ενώ για το fragile X γονίδιο (FRAXA) έχει ταυτοποιηθεί μια περιοχή μήκους 50 Kb ανοδικά του γονιδίου που φαίνεται να εμπλέκεται στην αστάθεια του FRAXA αλληλομόρφου (La Spada, A.R. et al 2004).

Οι παρατηρήσεις μας δείχνουν ότι όλες οι late-onset οικογένειες (σε αντίθεση με τις οικογένειες με την τυπική μορφή της HD) προέρχονται από τον ίδιο πρόγονο, κάτι που προτείνει ότι αυτή η μορφή της HD καθορίζεται γενετικά μέσω cis-acting στοιχείων. Στη διερεύνηση αυτών των cis-acting στοιχείων κάναμε ανάλυση της 5' ανοδικής αλληλουχίας σε χρωμοσώματα από άτομα της Κρήτης και βρήκαμε, εκτός από τους 4 σπάνιους πολυμορφισμούς στον υποκινητή του γονιδίου (Coles R. et al 1997), τρεις νέες αλλαγές σε μονά νουκλεοτίδια. Δύο από αυτές τις αλλαγές (μία αλλαγή A→C στη θέση -694 και μια προσθήκη ενός C μεταξύ του -662 και -663 σχετικά με τη +1 θέση έναρξης της μετάφρασης) μπορεί να είναι λάθη στην αλληλουχία, αφού υπήρχαν σε όλα τα φυσιολογικά χρωμοσώματα ελέγχου από την Κρήτη καθώς και στα 28 χρωμοσώματα από την Βόρεια Αμερική. Δεν αποκλείεται όμως και η πιθανότητα οι αλλαγές αυτές να είναι όντως νέοι πολυμορφισμοί του κρητικού ή ακόμα και του ελληνικού πληθυσμού. Βέβαια στην περιοχή δεν υπάρχουν πληροφορίες για πολυμορφισμούς και πιθανότατα δεν έχει ελεγχεί ακόμα. Αντικατάσταση ενός G από A στη θέση -1757 εμφανίζεται στο 74% των φυσιολογικών χρωμοσωμάτων από την Κρήτη, στο 52% των χρωμοσωμάτων από την Βόρειο Αμερική και σε όλα τα HD χρωμοσώματα από την Κρήτη. Ο απλότυπος γι' αυτή την περιοχή εμφανίζεται κοινός για τις late-onset οικογένειες και για την οικογένεια AX (τυπική μορφή) και εμφανίζεται και στο 71% των χρωμοσωμάτων ελέγχου, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτές οι αλλαγές πιθανόν να μην παίζουν ενεργό ρόλο στην σταθερότητα της CAG επανάληψης. Βέβαια δεν μπορούμε να αποκλείσουμε και την πιθανότητα άλλες cis-acting αλληλουχίες σε μεγαλύτερες αποστάσεις από το HD γονίδιο να επηρεάζουν την σταθερότητα της CAG επανάληψης όπως συμβαίνει στο Kennedy syndrome και τη FRAXA (La Spada, A.R. et al 2004).

Σ' αυτό τον μικρό πληθυσμό της Κρήτης που μοιράζεται ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο, παρατηρούμε ότι οι late-onset HD οικογένειες επικρατούν έναντι αυτών με την τυπική μορφή της νόσου με έναρξη στη μέση ηλικία. Η απλοτυπική μας ανάλυση προτείνει, ότι όλες οι late-onset HD περιπτώσεις έχουν προέλθει από ένα κοινό πρόγονο, που έζησε πριν από 1000 χρόνια περίπου. Τα ευρήματα μας προτείνουν ότι η late-onset HD μορφή της Κρήτης είναι γενετικά καθορισμένη και η υπεύθυνη μετάλλαξη για την νόσο εξελίχθηκε μέσω των αιώνων μέσω μικρών ασταθών προσαυξήσεων της CAG τριπλέτας. Η σταθερότητα της CAG επανάληψης στους late-onset HD ασθενείς της Κρήτης φαίνεται να σχετίζεται με άλλες περιοχές του γονιδιώματος, μακριά από τον υποκινητή και τις 5' αλληλουχίες ανοδικά του HD γονιδίου. Επομένως η έρευνα πρέπει να συνεχιστεί σε άλλες περιοχές ποιο μακριά από το γονίδιο ή ακόμα και σε άλλα χρωμοσώματα. Η απάντηση στη ερώτηση αυτή θα βοηθήσει στη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη δημιουργία αστάθειας των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και κατ' επέκταση στην παθογένεση των ασθενειών που οφείλονται σε δυναμικές μεταλλάξεις.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alford RL, Ashizawa T, Jankovic J. *et.al.* Molecular detection of new mutations, resolution of ambiguous results and complex genetic counseling issues in Huntington disease. *Am. J. Med. Genet.* 18, 66(3), 281-6(1996).
2. Allitto B.A. *et.al.* Deletion by PCR of the VNTR polymorphism at D4S95. *Nucleic Acid Research* 19(14), 4015 (1991).
3. Almqvist E. *et.al.* Geographical distribution of haplotypes in the Swedish families with huntington's disease. *Hum.Genet.* 94, 124-128 (1994).
4. Almqvist E., Andrew S., Theilmann J., Goldberg P., *et.al.* Geographical distribution of haplotypes in Swedish families with Huntington's disease. *Hum. Genet.* 94, 124-128 (1994).
5. Almqvist E., Spence N., Nichol K., Andrew S.E., Vesa J., *et.al.* Ancestral differences in the distribution of the $\Delta 2642$ glutamic acid polymorphism is associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insights into the genetic evolution of the Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 2, 207-214 (1995).
6. Ambrose M C., Duyao P.M., Barnes G., Lin S.C. *et.al.* Structure and Expression of the Huntington's disease genes. Evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Som. Cell and Molec. Genet.* 20, 27-38 (1994).
7. Andrew S.E., Goldberg Y.P., Kremer B., *et.al.* The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics* 4, 398-403 (1993).
8. Andrew S.E., Goldberg Y.P., Kremer B. *et.al.* Huntington disease without CAG expansion: phenocopies or errors in assignment? *Am.J.Hum.Genet.* 54, 852-863, (1994).

9. Andrew S.E., Goldberg Y.P., Theilman J., Zeisler J. and Hayden M. A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum.Mol.Genet.* 3, 65-67 (1994).
10. Andrew SE, Hayden MR. Origins and evolution of Huntington disease chromosomes. *Neurodegeneration*, 4(3) 239-44 (1995).
11. Ashizawa, T and Conneally, P.M. Repeats may not be everything in anticipation. *Neurology*, 53, 1164-1165 (1999).
12. Bao J., Sharp A.H. *et.al.* Expansion of polyglutamine repeat in Huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 5037-5042 (1996).
13. Barinaga M. New clues found to Huntington's. *Science* 270, 1110 (1995).
14. Barinaga M. An intriguing new lead on huntington's disease. *Science* 271, 1233-1234 (1996).
15. Barron L., Rae A., Holloway S., Brock D.H.D. and Warner J.P. A single allele from the polymorphic CCG rich sequence immediately 3' the unstable CAG trinucleotide in the IT-15 cDNA shows almost complete disequilibrium with Huntington's disease chromosomes in the Scottish population. *Hum. Mol. Genet.* 3, 173-175 (1994).
16. Bates G. and Lehrach The huntington disease gene-still a needle in a haystack? *Hum.Mol.Genet.* 2, 343-347 (1993).
17. Bates G. Expanded glutamines and neurodegeneration - a gain of insight. *BioEssays* 18, 175-178 (1996).

18. Bates G. Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease *Lancet (rapid review)*, 361: 1642–1644 (2003).
19. Baxendale S. *et.al.* A cosmid contig and high resolution restriction map of the 2 megabase region containing the huntington's disease gene. *Nature Genetics* 4, 181-186 (1993).
20. Baxendale S. *et.al.* Comparative sequence analysis of the human and pufferfish huntington's disease genes. *Nature Genetics* 10, 67-76 (1995).
21. Beal MF. Mitochondria, free radicals and neurodegeneration. *Curr. Opinion in Neurol.* 6, 661-666 (1996).
22. Bengtsson, B.O. & Thomson, G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens* 18, 356–363 (1981).
23. Bertorelle G. and Rannala B. Using rare mutations to estimate population divergence times: A maximum likelihood approach *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Evolution* 95, 15452–15457 (1998).
24. Britton J.W., Uitti R.J., Ahlskog J.E. *et.al.* Hereditary late-onset chorea without significant dementia: Genetic evidence for substantial phenotypic variation in Huntington's disease. *Neurology* 45, 443-447 (2005).
25. Britton J.W. *et.al.* Hereditary late-onset chorea without significant dementia: Genetic evidence for substantial phenotypic variation in Huntington's disease. *Neurology* 45, 443-447 (1995).
26. Brock, G.J.R., Anderson, N.H. and Moncton, D.G. *Cis*-acting modifiers of expanded CAG/CTG triplet repeat expandability: associations with flanking GC content and proximity to CpG islands. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1061-1067 (1999).

27. Bucan M., Zimmer M. *et.al.* "Physical map of 4p16.3, the area expected to contain the Huntington Disease mutation " *Genomics* 6, 1-15 (1990).
28. Burke J.R., Englund J.J. *et.al.* Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nature Medicine* 2, 347-350 (1996).
29. Burright E.N., Clark H.B., *et.al.* SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell Sep* 22;82 (6):937-48 (1995).
30. Cariello L., Cristofaro T., Zanetti L. *et.al.* Transglutaminase activity is related to CAG repeat length in patients with Huntington disease. *Hum. Genet.* 98, 633-635 (1996).
31. Carter R.L., Strand A., Peters N.L. *et.al.* Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Mol. Genet.* 9, 1259-1271 (2000).
32. Chan V., Yo YL., Chan TP. *et.al.* DNA analysis of Huntington's disease in southern Chinese. *J. Med. Genet.* 32(2), 120-124 (1995).
33. Chattopadhyay B., Ghosh S., Gangopadhyay P.K. *et.al.* Modulation at of age at onset in Huntington;s disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neuroscience Letters* 345, 93-96 (2003).
34. Chong, S.S., Almqvist, E., Telenius, H. *et.al.* Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Hum. Mol. Genet.* 6, 301-309 (1997).
35. Choudhry S., Mukerji M., Srivastava AK. *et.al.* CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 10(21), 2437-2446 (2001).

36. Chung M.Y., Ranum L.P., Duvick L.A. *et al.* Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature Genet.* **5**, 254-258 (1993).
37. Clayton D. and Jones H. Transmission/Disequilibrium test for extended marker haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1161-1169 (1999).
38. Clearly, J.D., Nichol, K., Wang, Y.H., Pearson, C.E. Evidence of *cis*- acting factors in replication-mediated trinucleotide repeat instability in primate cells. *Nat. Genet.* **31**: 37-46 (2002).
39. Coles R., Leggo J. and Rubinsztein D.C. “ Analysis of the 5’ upstream sequence of the Huntington’s disease (HD) gene shows six new rare alleles which are unrelated to the age at onset of HD.” *J.Med.Genet.* **34**, 371-374 (1997).
40. Coles R., Caswell, R. and Rubinsztein D.C. Functional analysis of the Huntington’s disease (HD) gene promoter. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 791-800 (1998).
41. Collins A., Frezal J., Teague J. and Morton N.E. A metric map of Humans: 23,500 loci in 850 bands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14771-14775 (1996).
42. Collins A. and Morton N.E. Mapping a disease locus by allelic association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1741-1745 (1998).
43. Conneally, P.M. Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 506-526 (1984).
44. Craufurd D. and Dodge Alan. Mutation size and age at onset in Huntington’s disease *J. Med. Genetics* **30**, 1008-1011 (1993).
45. Cummings CJ. and Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* **9(6)**, 909-916 (2000).

46. De Stefano A.L. *et.al.* A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph Disease. *Am.J.Hum.Genet.* 59, 119-127 (1996).
47. De Rooij K.E., *et.al.* Dynamic mutation in Dutch Huntington's disease patients : increased paternal repeat instability extending to within the normal size range. *J. Med. Genet.* 30(12), 996-1002 (1993).
48. Djian P., Hancock J.M. and Chana H.S. Codon repeats in genes associated with human diseases: fewer repeats in the genes of nonhuman primates and nucleotide substitutions concentrated at the sites of reiteration. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 417-421 (1996).
49. Djousse L, Knowlton B, Hayden M *et. al.* Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am. J. Med. Genet.* 119, 279-282 (2003).
50. Diaz G. A., Gelb B. D., Risch N. *et.al.* Gaucher Disease: The Origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG Acid b-Glucosidase Mutations *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1821–1832 (2000).
51. Dib C. *et.al* A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatellites *Nature* 380: 152-154 (1996).
52. Durst R., Colombo R., Shpitzen S. *et.al.* Recent Origin and Spread of a Common Lithuanian Mutation, G197del LDLR, Causing Familial Hypercholesterolemia: Positive Selection Is Not Always Necessary to Account for Disease Incidence among Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1172–1188, (2001).
53. Duyao M., Ambrose C., Myers R. *et.al.* Trinucleotide repeat length instability and age of onset in HD. *Nature Genet.* 4, 387-392 (1993).
54. Duyao M. P. *et.al.* Inactivation of the mouse huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410 (1995).

55. Eichler E.E. *et.al.* Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genetics* 8, 88-94 (1994).
56. Ellis N. A., Ciocci S., Proytcheva M., *et.al.* The Ashkenazic Jewish Bloom Syndrome Mutation blmAsh Is Present in Non-Jewish Americans of Spanish Ancestry *Am. J. Hum. Genet.* 63:1685–1693 (1998).
57. Falush D., Almquist E. W. Brinkmann R. R. *et.al.* Measurement of Mutational Flow Implies Both a High New-Mutation Rate for Huntington Disease and Substantial Underascertainment of Late-Onset Cases *Am. J. Hum. Genet.* 68, 373–385 (2000).
58. Farrer LA, Conneally PM, Yu PL. The natural history of Huntington disease: possible role of "aging genes". *Am.J.Med.Genet.* 18, 115-123 (1984).
59. Fernandez, M., McClain, M.E., Martinez, B.S., Snow, K., Lipe, H., Ravits, J., Bird, T.D., La Spada, A.R. Late-onset SCA2 : 33 CAG repeats are sufficient to cause disease. *Neurology* 55, 569-572 (2000).
60. Folstein S.E. Huntington's Disease. A Disorder of Families. John Hopkins University Press, Baltimore (1989).
61. Foroud T. *et.al.* Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J.Neurol. Neurosurg Psychiatry* 66, 52-56 (1999).
62. Fortune M.T., Vassilopoulos C., Coolbaugh M.I., *et.al.* Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability. *Hum. Mol. Genet.* 9 (3), 439-445 (2000).
63. Frontali M. *et.al.* Genetic fitness in huntington's disease and spinocerebellar ataxia 1: a population genetics model for CAG repeat expansions. *Ann.Hum.Genet.* 60, 423-435 (1996).

64. Gacy A.M., Goellner G., Juranic N., Macura S. and McMurray C.T. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vivo. *Cell* 81, 533-540 (1995).
65. Gaspar, C. *et.al.* Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: A Worldwide haplotype study. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 523-528, report (2001).
66. Gerber H.P. *et.al.* Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263, 808-811 (1994).
67. Goldberg Y.P., Andrew S.E., Clarke L.A. and Hayden M.R. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in new mutations for Huntington's disease: *Hum. Mol. Genet.* 2, 635-636 (1993).
68. Goldberg Y.P., McMurray C.T., Zeisler J, *et al.* Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. *Hum. Mol. Genet.* 4(10), 1911-1918 (1995).
69. Goldberg Y.P., Kalchman, M.A. *et.al.* Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntington disease transcript. *Hum. Mol. Genet.* 5, No 2 , 177-185 (1996).
70. Goldberg Y.P., Kremer B., Andrew S.E. *et.al.* Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nature Genetics* 5, 174-179 (1993).
71. Goldberg Y.P., Kremer B., Andrew S.E., Theilmann, J. *et.al.* Familial predisposition to recurrent mutations causing Huntington's disease: genetic risk to sibs of sporadic cases. *J. Med. Genet.* 30, 987-990 (1993).
72. Gomez-Tortosa E., del Barrio A., *et.al.* Severity of cognitive impairment in juvenile and late-onset Huntington disease. *Arch Neurol.* 55(6), 835-843 (1998).

73. Goodfellow P.N. Planting Alfalfa and Cloning the Huntington Disease gene. *Cell* 72, 817-818 (1993).
74. Goldstein D. B. and Cavalleri G. L. "Understanding human diversity" *Nature* 437, 1241-1242 (2005).
75. Goldstein D. B., Reich D. E. Bradman N. *et.al.* Age Estimates of Two Common Mutations Causing Factor XI Deficiency: Recent Genetic Drift Is Not Necessary for Elevated Disease Incidence among Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1071–1075, (1999).
76. Goold R.D., diSibio G.L., Xu., Lang D.B., Dadgar J. *et.al.* The development of sequence tagged sites for human chromosome 4. *Hum. Mol. Genet.*2 (8): 1271-1288 (1993).
77. Gray I.C., Campbell D.A. and Spurr N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum. Mol. Genet*; 9, No16 Review 2403-2408. (2000).
78. Green H. and Wang N. Codon reiteration and the evolution of proteins. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 91, 4298-4302 (1994).
79. Green H. Human Genetic Diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. (*Letter to the Editor*) *Cell* 74, 955-956 (1993).
80. Grosson C.L.S., MacDonald M.E., Duyao M.P., Ambrose C.M., Roffler-Tarlov S. and Gusella J.F. Synteny conservation of the Huntington's disease gene and surrounding loci on mouse chromosome 5. *Mammalian Genome* 5, 424-428 (1994).
81. Gusella J. and MacDonald M.E. Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology. *Cur.Biol.* 5, 656-662 (1995).
82. Gusella J. "DNA markers for Nervous System diseases" *Science*, 225 (1984).

83. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, *et al.* "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." *Nature* 306, 2348 (1983).
84. Gyapay, G *et.al.* A radiation hybrid map of the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 5 (3): 339-346 (1996).
85. Haaf T., Sirugo G., Kidd K.K, *et.al.* Chromosomal localization of long trinucleotide repeats in the human genome by fluorescence *in situ* hybridization. *Nat. genet.* 12, 183-185 (1996).
86. Hayden M.R., Beighton P. Genetic aspects of Huntington's chorea: results of a national survey. *Am. J. Med. Genet.* Feb; 11(2): 135-41. (1982).
87. Hickey M. A., Chesselet M-F. Apoptosis in Huntington's disease *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 255–265 (2003).
88. Hodgson J.G. *et.al.* Human huntingtin derived from YAC transgenes compensates for loss of murine huntingtin by rescue of the embryonic lethal phenotype. *Hum.Mol.Genet.* 5, 1875-1885 (1996).
89. Hoogeveen A.T., Willemsen R., Meyer N., de Rooij K.E. *et.al.* Characterization and localization of the huntington disease gene product. *Hum.Mol.Genet.* 2, 2069-2073 (1993).
90. Hummerich H., Baxandale S., Mott R., Kirby S.F. *et.al.* Distribution of trinucleotide repeat sequences across a 2 Mbp region containing the huntington's disease gene. *Hum.Mol.Genet.* 3, 73-78 (1994).
91. Huntington F. Willard The needle found !!! Trinucleotide repeat expansion in the huntington's disease gene. *Hum.Mol.Genet.* 2, 497-498 (1993).
92. Igarashi S. *et.al.* Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genetics* 18, 111-117 (1998).

93. Imbert G. *et.al.* Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nature genetics* 14, 285-291 (1996).
94. Jou Y-S. and Myers R. Evidence from antibody studies that the CAG repeat in the Huntington disease gene is expressed in the protein. *Hum.Mol.Genet.* 4, 465-469 (1995).
95. Kalchman M.A., Koide H.B. *et.al.* HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nature Genetics* 16, 44-53 (1997).
96. Karlin S. and Burge C. Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1560-1565 (1996).
97. Koide R., Kobayashi S., Shimohata T. *et.al.* A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease?. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2047-2053 (1999).
98. Kremer B, Almqvist E, Theilmann J. *et.al.* Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am.J.Hum.Genet.* 57(2), 343-50(1995).
99. Kremer B, Goldberg P, Andrew SE *et al.* A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Engl. J. Med.* 330, 1401-6 (1994).
100. Kremer B. Squitieri F, Telenius H et al. Molecular analysis of late onset Huntington's disease. *J. Med. Genet.* 30(12), 991-5 (1993).
101. Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* Jun 17;77 (6):853-61 (1994).

102. Laccone F. and Christian W. A recurrent expansion of a maternal allele with 36 CAG repeats causes Huntington disease in two sisters. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1145-1148 (2000).
103. Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D. *et.al.* A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet*, 65: 267-277(2004).
104. La Spada, A.R., Peterson, K.R., Meadows, S.A., McClain, *et al.* Androgen receptor YAC transgenic mice carrying CAG 45 alleles show trinucleotide repeat instability. *Hum.Mol.Genet.* 7, 959-67 (1998).
105. La Spada AR, Richards RI, Wieringa B. Dynamic mutations on the move in Banff. *Nat. Genet.* Jul:36 (7):667-70 (2004).
106. Lee J., *et.al.* An upstream open reading frame impedes translation of the huntingtin gene. *Nucl.Acid.Res.* 30, No23, 5110-5119 (2002).
107. Lee M.K. *et.al.* Transgenic models of neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 6, 651-660 (1996).
108. Leeflang E.P. *et.al.* Single sperm analysis of the trinucleotide repeats in the Huntington's disease gene: quantification of the mutation frequency spectrum. *Hum.Mol.Genet.* 4, 1519-1526 (1995).
109. Libby R.T., Monckton D.G., Fu Y.H., *et.al.* Genomic context drives SCA7 CAG repeat instability, while expressed SCA7 cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 12(1), 41-50 (2003).
110. Li H., Li S-H., Cheng A.L. *et.al.* Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1227-1236 (1999).

111. Li X.J. *et.al.* A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402 (1995).
112. Li X.J., Sharp A.H., Li S-H., Dawson T.M. Snyder S.H. and Ross C.A. Huntingtin-associated protein (HAP1): Discrete neuronal localizations in the brain resemble those of neuronal nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 4839-4844 (1996).
113. Li JL, Hayden MR, Almqvist EW. *et al.* A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 682-687(2003).
114. Lin B. *et.al.* Differential 3' polyadenylation of the huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1541-1545 (1993).
115. Lin B. *et.al.* Structural analysis of the 5' region of mouse and human Huntington disease genes reveals conservation of putative promoter region and di- and trinucleotide polymorphisms. *Genomics* 25, 707-715 (1995).
116. Lin B. *et.al.* Sequence of the murine huntington disease gene: evidence for conservation, and polymorphism in a triplet (CCG) repeat alternate splicing. *Hum.Mol.Genet.* 3, 85-92 (1994).
117. Lonjou C, Collins A, Ajioka RS *et al.* Allelic association under map error and recombinational heterogeneity: A tale of two sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11366-11370 (1998).
118. Lucotte G, Turpin JC, Riess O, *et.al.* Confidence intervals for predicted age of onset, given the size of (CAG)n repeat, in Huntington's disease. *Hum. Genet.* 95, 2312 (1995).

119. Lucotte G, Gerard G., Roubertoux N., *et.al.* Relationship of the 2642 deletion polymorphism (delta 2642) in the huntingtin gene with the CAG repeat expansion length and age at onset of the disease. *Genet. Couns.* 7(4), 297-302 (1996).
120. MacDonald M.E., Gines S., Gusella JF. and Wheeler VC. Huntington's Disease. *Neuromolecular Med.* 4(1-2), 7-20 (2003).
121. MacDonald M.E. and Gusella J.F. Huntington's disease: Translating a CAG repeat into a pathogenic mechanism. *Cur. Opin. Neur.* 6, 638-643 (1996).
122. MacDonald M.E., Vonsattel J.P., Shrinidhi J. *et.al.* Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neyrology* 53, 1330-1332 (1999).
123. MacDonald M.E., Novelletto A., Lin C., Tagle D., Barnes G., *et.al.* The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nature genet.* 1, 99-103 (1992).
124. Maddox J. Triplet repeat genes raise a question. *Nature* 368, 685 (1994).
125. Mandel J.L. Trinucleotide disease on the rise. *Nature genet.* 7, 453-455 (1994).
126. Mandich P, Di Maria E, Bellone E. *et.al.* Molecular analysis of the IT15 gene in patients with apparently 'sporadic' Huntington's disease. *Eur.Neurol.*36(6),348-352(1996).
127. Mangiarini L. *et.al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506 (1996).
128. Mangiarini L., Sathasivam, K., Mahal, A. *et.al* Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nat. Genet.* 15, 197-200 (1997).

129. Manley, K., Shirley, T.L., Flaherty, L., Messer, A. Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat. Genet.* 23, 471-773 (1999).
130. Martin E.R., Lai E.H., Gilbert J. R. *et.al.* SNPing Away at Complex Disease: Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms around APOE in Alzheimer Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 383-394 (2000).
131. Martin J.B. Molecular genetics in neurological diseases. *Science* 262, 674-678 (1993).
132. Martindale D., Hackman A. *et.al.* Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nature Genetics* 18, 150-154 (1998).
133. Maurer D.J., O'Callaghan B.L. and Livingston D.M. Orientation dependence of trinucleotide CAG repeat instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cellul. Biol.* 16, 6617-6622 (1996).
134. McNeil S.M., Novelletto A., Srinidhi J. *et al.* Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum. Molec. Genet.* 6, 775-779 (1997).
135. McVean G., Spencer C.C.A. and Chaix R. Perspectives on Human Genetic Variation from the HapMap project. *Plos Genetics* Vol1 (4), 413-418 (2005).
136. Moore R.C., Xiang F., Monaghan J., *et.al.* Huntington disease phenocopy is a familial Prion Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1385-1388 (2001).
137. Morton N.E. Parameters of the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7474-7476 (1991).
138. Myers RH, Sax DS, Koroshetz WJ, Mastromauro C, Cupples LA, Kiely DK, Pettengill FK, Bird ED. Factors associated with slow progression in Huntington's disease [see comments]. *Arch Neurol* 48, 800-804 (1991).

139. Myers RH, Sax DS, Schoenfeld M, Bird ED, Wolf PA. *et.al.* Late onset of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48, 530-534 (1985).
140. Myers R.H. *et.al.* *De Novo* expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nature Genetics* 5, 168-173 (1993).
141. Nance M.A. *et.al.* Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 52, 392-394 (1999).
142. Nance M.A. Huntington Disease - Another Chapter Rewritten. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1-6 (1996).
143. Nasir J. *et.al.* Targeted disruption of the huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823 (1995).
144. Nenguke T. *et.al.* Candidate DANN replication initiation regions at human trinucleotide repeat disease loci. *Hum.Mol.Genet.* 12, No 9, 1021-1028 (2003).
145. Neri C. *et.al.* Survey of CAG/CTG repeats in human cDNAs representing new genes: candidates for inherited neurological disorders. *Hum.Mol.Gen.* 5, 1001-1009 (1996).
146. Neuhausen S. L., Godwin A. K., Gershoni-Baruch R. *et.al.* Haplotype and Phenotype Analysis of Nine Recurrent BRCA2 Mutations in 111 Families: Results of an International Study *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1381-1388 (1998).
147. Nolin S.L. *et.al.* Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. *Am.J.Hum.Genet.* 59, 1252-1261 (1996).
148. Norremolle A., Riess O., Epplen J. *et.al.* Trinucleotide repeat elongation in the Huntington disease patients from 71 Danish families. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1475-1476 (1993).

149. Norremolle A. *et.al.* Nucleotide sequence and PCR-amplification of a polymorphic Mbol site in DNA marker D4S95 linked to the Huntington disease locus. *Clini.Genetic* 42, 210-211 (1992).
150. Novelletto A., Persichetti F., Sabbadini G., Mandich P., *et.al.* Polymorphism analysis of the huntingtin gene in Italian families affected with Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1129-1132 (1994).
151. Novelletto A. *et.al.* Analysis of the trinucleotide repeat expansion in Italian families affected with Huntington disease. *Hum.Mol.Genet.* 3, 93-98 (1994).
152. Orita M., Suzuki Y., Sekija T. And Hayashik K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the PCR. *Geomics* 5, 874-879 (1989).
153. Papapetropoulos S. *et.al.* A case of maternally transmitted juvenile Huntington's disease with a very large trinucleotide repeat. (unpublished data).
154. Parkin A.J. Human memory: The hippocampus is the key. *Current Biology* 6, 1583-1585 (1996).
155. Perutz M.F. Glutamine repeats and inherited neurodegeneration diseases: molecular aspects. *Cur.Opin.Struct.Biol.* 6, 848-858 (1996).
156. Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M. and Finch J.T. Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91, 5355-5358 (1994).
157. Passani LA., Bedford MT., Faber PW., *et.al.* huntingtin's WW domain partners in Huntington's disease post-mortem brain fulfill genetic criteria for direct involvement in Huntington's disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 9(14) 2175-2182 (2000).

158. Perutz M.F., Staden R., Moens L. and Baere I. Polar zippers. *Current Biology* 3, 249-253 (1993).
159. Pritchard C., Casher D., Bull L., Cox D.R. and Myers R.M. A cloned DNA segment from the telomeric region of human chromosome 4p is not detectably rearranged in huntington disease patients. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 7309-7313 (1990).
160. Pritchard C., Zhu N., Zuo J., Bull L., Pericak-Vance M.A., *et.al.* Recombination of 4p16.3 DNA markers in an unusual Family with Huntington' disease. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 1218-1230 (1992).
161. Rannala, B. & Bertorelle, G. Using Linked Markers to Infer the Age of a Mutation. *Human Mutation.* Review article 18, 87-100 (2001).
162. Rannala B. and Reeve J. P. High-Resolution Multipoint Linkage-Disequilibrium Mapping in the Context of a Human Genome Sequence
Am. J. Hum. Genet. 69, 159–178 (2001).
163. Rannala B. and Slatkin M. *et.al.* Likelihood Analysis of Disequilibrium Mapping, and Related Problems *Am. J. Hum. Genet.* 62, 459–473, (1998).
164. Ranen N.G. *et.al.* Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeat in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am.J.Hum.Genet.* 57, 593-602 (1995).
165. Reddy, P.H., Williams, M. and Tagle, D.A. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Treds Neurosci*, 22, 248-255 (1999).
166. Richards R.I. and Sutherland G.R. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genetics* 6, 114-116 (1994).
167. Richards R.I. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Hum. Mol. Gen.* 10 (20), 2187-2194, (2001).

168. Ridley, R.M., Frith, C.D., Crow, T.J., & Conneally, P.M. Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female. *J. Med. Genet.* **25**, 589-95 (1988).
169. Riess O., Kozak C. and Van Ommen G.J. Report of the fourth international workshop on human chromosome 4 mapping 1996. *Cytogenet. Cell Genet.* **74**, 57-69 (1996).
170. Riess O. *et.al.* “(CA)_n – dinucleotide repeat polymorphism at the locus for the alpha 2C adrenergic receptor (ADRA2C) on 4p16”. *Hum.Molec.Genet.* **1**:452 (1992).
171. Riess O., Noerremolle A., Soerensen S. A., & Epplen J. T. Improved PCR conditions for the strength of (CAG)_n repeats causing HD. *Hum. Molec. Genet.* **2**(9), 1523 (1993).
172. Riggins G.J., Lokey L.K., Chastain J.L., Leiner H.A., Sherman S.L., Wilkinson K.D., and Warren S.T. Human genes containing polymorphic trinucleotide repeats. *Nature Genetics* **2**, 186-191 (1992).
173. Risch N, de Leon D, Ozelius L. *et al.* Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Askenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nature Genet.* **9**, 152-159 (1995).
174. Rommens J.M., Lin B., Hutchinson G.B., Andrew S.E. *et.al.* A transcriptional map of the region containing the Huntington disease gene. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 901-907 (1993).
175. Ross C.A. When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron* **15**, 493-496 (1995).
176. Rubinsztein C.D., Leggo J., Goodburn S., Barton E.D. and Ferguson-Smithe A.M. Haplotype analysis of the Δ 2642 and (CAG)_n polymorphisms in the

- Huntington's disease (HD) gene provides an explanation for an apparent "founder" HD haplotype. *Hum. Mol. Genet.* 4, 203-206 (1995).
177. Rubinsztein D.C. *et.al.* Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *AM.J.Hum.Genet.* 59, 16-22, (1996).
178. Rubinsztein D.C., Barton D.E. Davison B.C.C. and Ferguson-Smith M.A. Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of huntington's disease and CAG repeat number. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1713-1715 (1993).
179. Rubinsztein D.C., Leggo J., Chiano M. *et.al.* Genotypes at the GluR6 Kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 94, 3872-3876 (1997).
180. Saleem Q., Choudhry S., Mukerji M. *et.al.* Molecular analysis of autosomal dominant hereditary ataxias in the Indian population: high frequency of SCA2 and evidence for a common founder mutation. *Hum. Genet.* 106, 179-187 (2000).
181. Samadashwily G.M., Raca G. and Mirkin S.M. Trinucleotide repeats affect DNA replication *in vivo*. *Nature Genetics* 17, 298-304 (1997).
182. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
183. Sanchez A. *et.al.* Maternal transmission in sporadic Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* 62(5), 535-537 (1997).
184. Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 74, 5463-5467 (1977).

185. Seznec H., Lia-Baldini A-S., Duros C., *et.al.* Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1185-1194 (2000).
186. Scherzinger E. *et.al.* Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90, 549-558 (1997).
187. Schilling G., Sharp A.H., Love S.J., Wagster M.V., *et.al.* Expression of the Huntington's disease (IT15) protein product in HD patients. *Hum.Mol.Genet.* 4, 1365-1371 (1995).
188. Schmitt I., Bacher D., Megow D., Henklein., Hameister H., Epplen J.T. and Riess O. Expression of the huntington disease gene in rodents: cloning the rat homologue and evidence for downregulation in non-neuronal tissues during development . *Hum.Mol.Genet.* 4, 1173-1182 (1995).
189. Shifman S., Bronstein M., Sternfeld M. *et.al.* A Highly significant association between a COMT haplotype and Sczhizofrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1296-1302 (2002).
190. Schols L., Menezes Vieira-Saecker A.M., Schols S., Przuntek H., Epplen J.T. and Riess O. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum.Mol.Genet.* 4, 1001-1005 (1995).
191. Skraastad MI. Van de Vosse E., Belfroid R. *et.al.* Significant linkage disequilibrium between the Huntington disease gene and the loci D4S10 and D4S95 in the Dutch population. *Am. J. Hum. Genet.* 51(4), 730-735 (1992).
192. Slaugenhaupt S. A., Acierno J. S. Jr., Helbling L. A. *et.al.* Mapping of the Mucopolidosis Type IV Gene to Chromosome 19p and Definition of Founder Haplotypes *Am. J. Hum. Genet.* 65, 773-778 (1999).

193. Snell R.G., Lazarou L.P., Youngman S., Quarell O.W.J., Wasmuth J.J., Shaw D.J. and Harper P.S. Linkage disequilibrium in Huntington's disease: an improved localization for the gene. *Journal of medical genet.* 26, 673-675 (1989).
194. Snell R.G., MacMillan J.C., Cheadle J.P. *et.al.* Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genet.* 4 393-397 (1993).
195. Stine O.C., Li S.H., Pleasant N. Wagster M.V., Hedreen J.C. and Ross C.A. Expression of the mutant allele of IT-15 (the HD gene) in striatum and cortex of Huntington's disease patients. *Hum.Mol.Genet.* 4, 15-18 (1995).
196. Stine O.C., Pleasant N., Franz M.L., Abbott M.H., Folstein S.E. and Ross C.A. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum. Mol.Genet.* 2, 1547-1549 (1993).
197. Strong T.V. *et.al.* Widespread expression of the human and rat huntington's disease gene in brain and noneural tissues. *Nature Genetics* 5, 259-265 (1993).
198. Squitieri F., Andrew S.E., Goldberg Y.P., Kremer B., Spence N., Zeisler J. Nichol K., Theilmann I. *et.al.* DNA haplotype analysis of Huntington's disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2103-2114 (1994).
199. Squitieri F., Cannella M., Giallonardo P., *et.al.* Onset and pre-onset studies to define the Huntington's disease natural history. *Brain Research Bulletin* 56, 233-238 (2001).
200. Squitieri F., Gellera C., Cannella M., *et.al.* Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126, 946-955 (2003).

201. Tangle A.D., Blanchard-McQuate K.L., Valdes J., Castilla L. And Collins F.S. Dinucleotide repeat polymorphisms at the D4S126 and D4S114 loci. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1077 (1993).
202. Tangle A.D., Blanchard-McQuate K. and Collins S.F. Dinucleotide repeat polymorphism in the Huntington's disease region at the D4S43 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1, 215 (1992).
203. Tangle A.D., Blanchard-McQuate K. Valdes J. et.al. Dinucleotide repeat polymorphism in the Huntington's disease region at the D4S182 locus. *Hum. Mol. Genet.* 2(4), 489 (1993).
204. Taylor S.A.M., Barnes G.T., MacDonald M.E. and Gusella J.F. A dinucleotide repeat polymorphism at the D4S127 locus. *Hum. Mol. Genet.* 1, 142 (1992).
205. Telenius H., Kremer H.P.H. *et.al.* Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1535-1540 (1993).
206. Telenius H., *et.al.* Somatic mosaicism in sperm is associated with intergenerational (CAG)_n changes in Huntington disease. *Hum.Mol.Genet.* 4, 189-195 (1995).
207. The Huntington's disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on HD chromosomes. *Cell* 72, 971-983 (1993).
208. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 (27), 1299-1318 (2005).
209. Theilman J. *et.al.* " Non-random association between alleles detected at D4S95 and D4S98 and the HD gene ". *Journal of Medical Genetics*, 26, (1989).

210. Tobin, A.J. and Singer, E. R. Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 10, 531-536 (2000).
211. Tremblay M. and Vezina H. New estimates of intergenerational time intervals for the calculation of age and origins of mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 651-658 (2000).
212. Trottier Y. *et.al.* Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature Genetics* 10, 104-110 (1995).
213. Trottier Y., Lutz Y. *et.al.* Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378, 403-406 (1995).
214. Tsagournisakis M., Fesdjian O.C., Shashidharan P. And Plaitakis A. A stability of the Huntington's disease (CAG)_n repeat in a late onset form occurring on the island of Crete. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2239-2243 (1996).
215. Valdes J.M., Tangle D.A., Elmer L.W. and Collins F.S. A simple non-radioactive method for diagnosis of huntington's disease. *Hum.Mol.Genet.* 2, 633-634 (1993).
216. Watanabe M., *et.al.* *De novo* expansion of CAG repeat in a Japanese patient with sporadic Huntington's disease. *J. Neurol. Sciences* 178, 159-162 (2000).
217. Wanker E.E. *et.al.* A huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum.Mol.Genet.* 6, 487-495 (1997).
218. Watkins W.S., Bamshad M. and Jorde L.B. Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1485-1491 (1995).

219. Weber B., Collins C., Kowbel D., Riess O. and Hayden M.R. Identification of multiple CpG islands and association conserved sequences in a candidate region for the huntington disease gene. *Genomics* 11, 1113-1124 (1991).
220. Weber B. *et.al.* Delineation of a 50Kb DNA segment containing the recombination site in a sporadic case of Huntington's disease . *Nature Genetics* 2, 216-222 (1992).
221. Weissenbach J, Gyapay G, et al .A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*. 359:794-801(1992)
222. Wexler N.S. *et.al.* Homozygotes for huntington's disease. *Nature* 326, 194-197 (1987).
223. Wheeler VC. Auerbach W., White JK. *et.al.* Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease Knock-in mouse. *Hum. Mol. Genet.* 8(1), 115-122 (1999).
224. Willard H.F. The needle is found !!! Trinucleotide repeat expansion in the Huntington's disease gene. *Hum. Mol. Genet.* 2(5), 497-498 (1993).
225. Wood J.D., MacMillan J.C. Harper PS., Lowenstein P.R. and Jones A.L. Partial characterisation of murine huntingtin and apparent variations in the subcellular localization of huntingtin in human, mouse and rat brain. *Hum.Mol.Genet.* 5, 481-487 (1996).
226. Yapijakis C., Vassilopoulos D. *et.al.* Linkage disequilibrium between expanded (CAG)_n repeat and an allele of the adjacent (CCG)_n repeat in huntington's disease patient of Greek origin. *Eur.J.Hum.Genet.* 99 (1995).
227. Yapijakis C., Vassilopoulos D., Tsagourkidakis M., Maris T., Fesdjian C.D., Papageorgiou K. And Plaitakis A. Huntington's disease (CAG)_n repeat expansion in Greek families. *Hum. Mol. Genet.* (1994).

228. Young A.B. Huntingtin in Health and disease. *J. Clin. Invest.* 111, 299-302 (2003).
229. Zeitlin S. *et.al.* Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the huntington's disease gene homologue. *Nature Genetics* 11, 155-163 (1995).
230. Zuhlke C., Riess O., Schroder K., Siedlaczek I., Eppen J., Engel W. and Thies U. Expansion of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1467-1469 (1993).
231. Zuo J., Robbins C., Baharloo S., Cox R.D. and Myers R. Construction of cosmid contig and high resolution restriction mapping of the Huntington's disease region of human chromosome 4. *Hum. Mol. Genet.* 2, 8 89-899 (1993).