

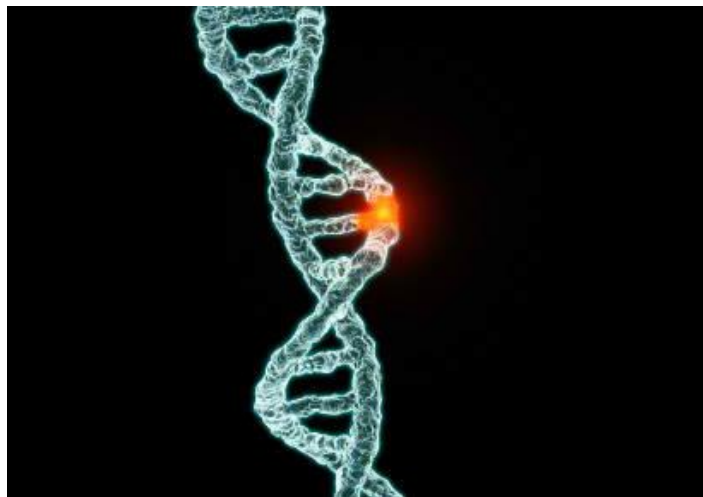
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ : «ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

-

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
(ΕΚΠΑ)

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ
ANGELMAN. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ- ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΕΥΜΟΡΦΙΑ Γ. ΤΖΑΓΚΑΡΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2013

UNIVERSITY OF CRETE

MEDICAL SCHOOL

**POSTGRADUATE PROGRAMME: “CELLULAR AND GENETIC
AETIOLOGY, DIAGNOSIS AND THERAPEUTICS OF HUMAN
DISEASES”**

-

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
MEDICAL SCHOOL, DEPARTMENT OF MEDICAL GENETICS**

**MOLECULAR INVESTIGATION OF ANGELMAN
SYNDROME PATIENTS. PHENOTYPE- GENOTYPE
CORRELATION**

PhD THESIS

EVMORFIA G. TZAGKARAKI

BIOLOGIST

HERAKLION, 2013

ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Πέμπτη 06 Ιουνίου 2013

Ιατρική Σχολή

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γεώργιος Γουλιέλμος- Επίκ. Καθ. Μοριακής Γενετικής
- ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ 1: Εμμανουήλ Καναβάκης- Καθ. Γενετικής
- ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ 2: Αριάδνη Καλπίνη- Μαύρου- Καθ. Γενετικής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Γεώργιος Γουλιέλμος- Επίκ. Καθ. Μοριακής Γενετικής
- Εμμανουήλ Καναβάκης- Καθ. Γενετικής
- Αριάδνη Καλπίνη- Μαύρου- Καθ. Γενετικής
- Ελένη Παπαδάκη- Καθ. Κλινικής Αιματολογίας
- Δημήτριος Καρδάσης- Καθ. Βιοχημείας
- Αριστείδης Ηλιόπουλος- Αναπλ. Καθ. Κυτταρικής – Μοριακής Βιολογίας
- Ευαγγελία Μαντζουράνη- Καθ. Παιδιατρικής

Η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο:

«Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διάγνωση και Θεραπευτική των Ασθενειών του Ανθρώπου»

Υπεύθυνος μεταπτυχιακού προγράμματος: Δημήτριος Μπούμπας, Καθ. Ρευματολογίας

Το πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων « Η Αγία Σοφία »

Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής: Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθ. Γενετικής

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΥΜΟΡΦΙΑ ΤΖΑΓΚΑΡΑΚΗ

Μοριακός Βιολόγος , M.Sc, PhD

2005- 2013

Διδακτορική Διατριβή (PhD)

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή : Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών « Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία, Διάγνωση και Θεραπευτική των Αθηνειών του Ανθρώπου»

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»

Θέμα διατριβής:

«Μοριακή μελέτη ασθενών με σύνδρομο Angelman. Συσχέτιση φαινοτύπου- γονοτύπου»

2003- 2005

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (M.Sc.)

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή

«Κυτταρική και γενετική αιτιολογία, διάγνωση και θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου»

Βαθμός: Άριστα (9/10)

Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, «Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο», Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»

Τίτλος μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας:

«Μοριακή μελέτη της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης – Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο UBE3A».

Βαθμός μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας: Άριστα (10/10)

Rotation projects:

- **Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο**
«Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *fra10ac1*, *sap145* και *dgcr14*»
Επιβλέπων: Νικόλαος Μοσχονάς, Καθ. Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου
- **Εργαστήριο Κλινικής Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο**
Εισαγωγή στην μεθοδολογία των κυτταροκαλλιιεργειών
Επιβλέπουσα: Ελένη Παπαδάκη, Καθ. Κλινικής Αιματολογίας

1999- 2003
Πτυχίο Βιολογίας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας

Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (7,03)

Διπλωματική εργασία : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Μοριακής Παθολογοανατομίας

Τίτλος:

«Μοριακή μελέτη της καρκινογένεσης όγκων μαλακών μορίων»

Βαθμός διπλωματικής εργασίας: Άριστα (10/10)

1998
Απολυτήριο Λυκείου

2^ο Γενικό Λύκειο Ρεθύμνου, Κρήτη

Βαθμός Απολυτηρίου : 18/ 20

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

2007

3rd INTERNATIONAL CONGRESS ON BRAIN AND BEHAVIOUR AND 16th THESSALONIKH CONFERENCE OF THE SOUTH- EAST EUROPEAN SOCIETY FOR NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (WPA)

Poster presentation: “Molecular Investigation of Angelman Syndrome in Greece. Screening for UBE3A mutations; preliminary results”

E. Tzagaraki^{1,2}, C. Sofocleous¹, N. Vogiatzakis¹, S. Kitsiou¹, H. Frysira¹, G. Goulielmos², E. Kanavakis¹, A. Mavrou¹

¹ University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece, ² University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete

2007

4^o ΕΤΗΣΙΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Poster presentation «Μοριακή διερεύνηση ασθενών με σύνδρομο Prader Willi ή Angelman. Μελέτη αίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο UBE3A σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman: πρώτα αποτελέσματα»

E. Τζαγκαράκη^{1,2}, Χ. Σοφοκλέους¹, Σ. Κίτσιου¹, Ε. Φρυσίρα¹, Γ. Γουλιέλμος², Ε. Καναβάκης¹, Α. Μαύρου¹

¹Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Αθήνα

²Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

2007

EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE- EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS (ESHG) 2007- NICE, FRANCE

Poster presentation “Molecular investigation of Angelman and Prader Willi syndromes. Screening for ube3a mutations. Preliminary results”

E. Tzagaraki^{1,2}, C. Sofocleous¹, S. Kitsiou¹, H. Frysira¹, G. Goulielmos², E. Kanavakis¹, A. Mavrou¹

¹ University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece, ² University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Tzagkaraki Evmorfia, Sofocleous C., Frysira H., Dinopoulos A., Mavrou A., Kanavakis E. Novel human pathological mutations. Gene symbol UBE3A. Disease: Angelman syndrome. **Human Genet. 2009 Aug; 126(2): 331**

2. Tzagaraki E., Sofocleous C., Tounta G., Mavrou A., Kolialexi A. The role of Vitamin C in human reproduction. **Handbook of Vitamin C Research; daily requirements, dietary sources and adverse effects. Nova Biomedical. Nova Publishers 2009**

3. Evmorfia Tzagkaraki, Christalena Sofocleous, Fryssira- Kanioura Helen, Argyris Dinopoulos, Georgios Goulielmos, Ariadni Mavrou, Kitsiou- Tzeli Sofia, Emmanuel Kanavakis. Screening of UBE3A gene in patients referred for Angelman Syndrome. **European Journal of Pediatric Neurology. 2013 Jul;17(4):366- 73**

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

Poster award : 3rd International Congress on Brain and Behavior and 16th Thessaloniki Conference of the South- East European Society for Neurology and Psychiatry (Dual Congress) , World Psychiatric Association (WPA)

« Molecular investigation of Angelman syndrome in Greece. Screening for UBE3A mutations; preliminary results»

E. Tzagaraki^{1, 2}, C. Sofocleous¹, N. Vogiatzakis¹, S. Kitsiou¹, H. Frysira¹, G. Goulielmos², E. Kanavakis¹, A. Mavrou¹

¹ University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece, ² University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- Διημερίδα Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής και Α΄Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα «20 Χρόνια Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση», Αθήνα 2010
- XX International Congress of Genetics, International Genetics Federation (IGF), Berlin Germany 2008

- 3rd International Congress on Brain and Behavior and 16th Thessaloniki Conference of the South- East European Society for Neurology and Psychiatry, World Psychiatric Association (WPA) 2007
- 20th Course in Medical Genetics, European Genetics Foundation, Bologna University Residential Centre, Bertinoro Di Romagna 2007
- 7th Course in Bioinformatics for Molecular Biologists, European Genetics Foundation, Bologna University Residential Centre, Bertinoro Di Romagna 2007
- 14^o Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Ελληνική Εταιρία Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 2007
- 6^o Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γενετικής με θέμα: «Γενετική Συγγενών Καρδιοπαθειών», Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα 2006
- Επιμορφωτικά Σεμινάρια Έρευνας και Τεχνολογίας: Σύγχρονες Μέθοδοι Φωτονικής Μικροσκοπίας και Εφαρμογές στην Βιοιατρική Έρευνα και Διάγνωση, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστερ, Αθήνα 2005
- 1^η Ημερίδα Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα: Γενετική και Υπογονιμότητα, Αθήνα 2005
- 12th Euroconference on Apoptosis , Chania, Crete 2004
- 2004 HDL Workshop, Heraklion, Crete 2004
- 1^o Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας στην Ελλάδα, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα 2004
- 2^o Σεμινάριο Γενετική Συμβουλευτική και Προγεννητικός Έλεγχος, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο 2004
- 2nd International Conference of Functional Genomics of Ageing, Hersonissos, Crete 2004
- 25^o Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Αθήνα 2003
- Μορφωτικός κύκλος ομιλιών στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στην Αθήνα με θέμα: Κοινωνία και Υγεία: Επίκαιρα Προβλήματα Υγείας και η Αντιμετώπιση τους, Αθήνα 2003
- 4^o Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου, Αθήνα 2002

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὀρκος τοῦ Ἱπποκράτους

Ὁμνῶμι Απόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ Θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ζυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωὔτεου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄφροσι, καὶ διδάζειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἀνευ μισθοῦ καὶ ζυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισι τε καὶ ἄρκεισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἰρξέειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὕψηλῆσομαι ζυμβουλίην τοιήνδε. Ὁμοίως δὲ οὐδέ γυναικί πεσοὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ἄσιως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τε μέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἀν εἰώω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πάσης ἀδικίης ἐκούσιος καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄδ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἀνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρὴ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγῆσομαι, ἄφροτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὀρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ζυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένω παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τᾶναντία τούτέων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. κ. Δημήτριο Μπούμπα ο οποίος ήταν ο βασικός υποστηρικτής της επιθυμίας μου να εκπονήσω το ερευνητικό μέρος της διατριβής σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και ο οποίος διασφάλισε αυτή την συνεργασία μέχρι την ολοκλήρωσή της. Με ιδιαίτερο σεβασμό θα ήθελα να αναφερθώ στον Καθ. κ. Εμμανουήλ Καναβάκη ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω το ερευνητικό τμήμα της διατριβής μου στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Η δυνατότητα που μου προσέφερε να συνεργαστώ με διακεκριμένους κλινικούς ιατρούς και επιστήμονες σε ένα χώρο που αποτελεί το κέντρο αναφοράς γενετικών νοσημάτων για την Ελλάδα, υπήρξε για μένα σταθμός ζωής, ενώ η συνεργασία μας υπήρξε ιδιαίτερα εποικοδομητική σε επιστημονικά θέματα. Συνεχίζοντας θέλω να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην Καθ. Γενετικής κ. Αριάδνη Καλπίνη- Μαύρου, υπό την επίβλεψη της οποίας ολοκληρώθηκε με επιτυχία η διδακτορική μου διατριβή. Την ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία που είχαμε, για τις επιστημονικές γνώσεις που μου προσέφερε και για την δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω ενεργά στις επιστημονικές δραστηριότητες του εργαστηρίου, γεγονός που καθόρισε την μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία. Ευχαριστώ θερμά τον Επίκ. Καθ. κ. Γεώργιο Γουλιέλμο για την συνεχή και αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας καθώς υπήρξε πάντα σύμβουλος και φίλος. Τον ευχαριστώ για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε για την πορεία της διατριβής μου αλλά και για τις προσωπικές συμβουλές και καθοδηγήσεις που υπήρξαν καθοριστικές για την ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθ. κ. Σοφία Κίτσιου- Τζέλη και την Καθ. κ. Έλενα Φρυσίρα για την σημαντική βοήθειά τους στο κλινικό κομμάτι της διατριβής μου και για την άψογη συνεργασία μας. Ευχαριστώ θερμά την βιολόγο, Dr Χρισταλένα Σοφοκλέους, για την ουσιαστική της συμβολή στην επιστημονική μου κατάρτιση και την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση τόσο στο πειραματικό όσο και στο θεωρητικό κομμάτι της διατριβής. Περισσότερο όμως την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια, την φιλία και την έμπρακτη συμπαράστασή της. Επίσης ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους που με στήριξαν καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής μου.

Το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» το οφείλω στην οικογένειά μου, στον πατέρα μου Γιώργο και την μητέρα μου Χρυσούλα, οι οποίοι υπήρξαν πάντα δίπλα μου, σύμβουλοι και υποστηρικτές αυτής της προσπάθειας. Τους ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξαν σε κάθε απόφασή μου, την ηθική και πρακτική στήριξη που μου προσέφεραν και την αμέριστη συμπαράστασή τους σε κάθε δυσκολία αυτής της διαδρομής.

Στους γονείς μου, Γιώργο και Χρυσούλα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23- 67
1.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	23- 27
1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN	28- 31
1.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN.....	32- 33
1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN	33- 35
1.5 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	35- 43
1.6 ΓΟΝΙΔΙΟ UBE3A	43- 47
1.7 ΠΡΩΤΕΪΝΗ E6- AP	47- 55
1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN	56
1.9 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ E6-AP ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....	57- 59
1.10 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN.....	59
1.11 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΜΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN	59- 63
1.12 ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN.....	64- 65
1.13 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN	66- 67
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	69- 71
3. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	73- 84
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	85- 130
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	85- 86
4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	86- 95
4.3 METHYLATION SPECIFIC PCR (MS- PCR).....	95- 102

4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 15 ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 15q11-q13.....	102- 106
4.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A.....	107- 117
4.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCREENING METHOD).....	117-121
4.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)..121- 127
4.8 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (Sequencing) ΓΙΑ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	128- 130
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	131- 152
5.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ECMA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ 7-16 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A ΣΤΟ ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	131- 143
5.2 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ AS41	143- 152
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	153- 176
6.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ (N=53).....	153- 161
6.2 ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ UBE3A ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ AS ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	161- 163
6.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ECMA ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ UBE3A	163- 164
6.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ- ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ	164- 171
6.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ 15q11-q13.....	171- 176
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	177- 178
8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ- ABSTRACT	179- 181
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	183- 189
10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	191

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

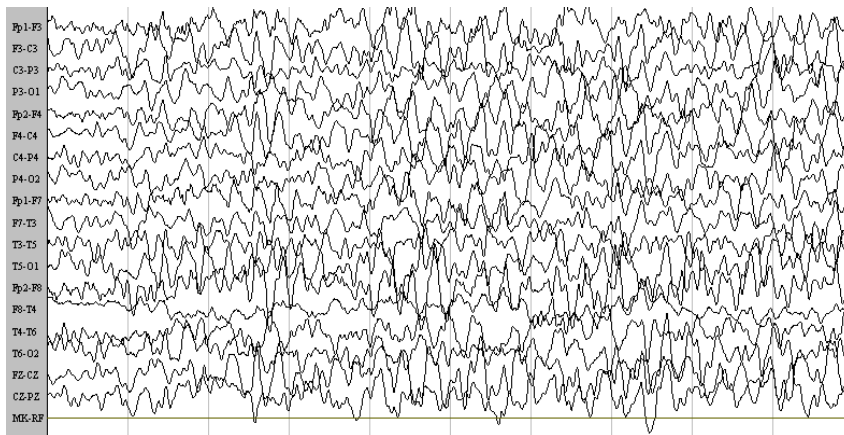
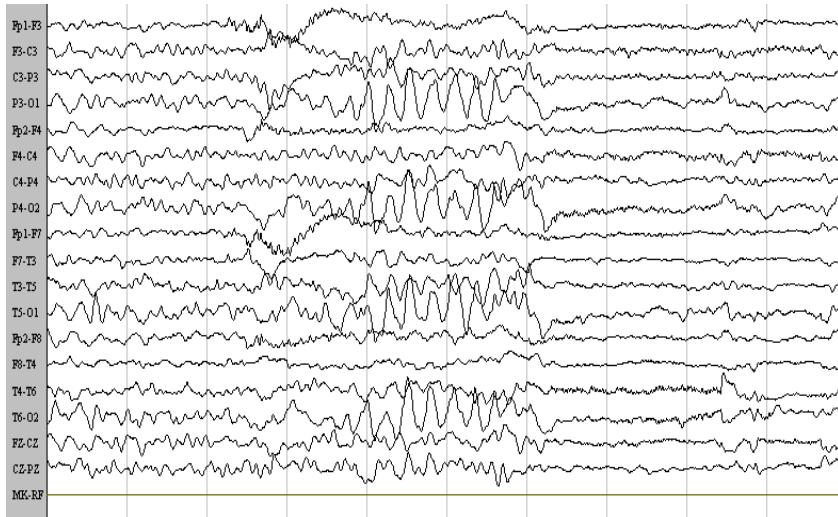
Το σύνδρομο Angelman περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1965 από τον Άγγλο παιδίατρο Harry Angelman, ο οποίος αναφέρει τις περιπτώσεις τριών παιδιών με κοινά κλινικά χαρακτηριστικά: σπασμωδικές κινήσεις, σοβαρές διαταραχές στην ομιλία, προεξέχουσα γλώσσα και ξεσπάσματα γέλιου [1]. Το σύνδρομο Angelman είναι γνωστό και σαν “happy puppet syndrome” λόγω των αταξικών κινήσεων που κάνουν οι ασθενείς. Αναγνωρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από χαρακτηριστικούς σπασμούς οι οποίοι συνοδεύονται και από ένα τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Το 1987 οι Magenis και συνεργάτες δημοσίευσαν για πρώτη φορά την ύπαρξη χρωμοσωμικού ελλείμματος στην περιοχή 15q11-q13 σε δύο ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman [2]. Επιστημονικές μελέτες έδειξαν ότι το σύνδρομο Angelman προκαλείται από διαφορετικούς γενετικούς μηχανισμούς που εντοπίζονται στην γονιδιακά αποτυπωμένη περιοχή q11-q13 του χρωμοσώματος 15, και επηρεάζουν την έκφραση του αποτυπωμένου γονιδίου UBE3A. Το σύνδρομο Angelman εμφανίζεται με συχνότητα 1: 10.000- 1:20.000 γεννήσεις, χωρίς να παρουσιάζει κάποια γεωγραφική κατανομή [3].

1.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει η πλειοψηφία των ασθενών με σύνδρομο Angelman περιλαμβάνουν : σοβαρή αναπτυξιακή και νοητική καθυστέρηση, διαταραχές λόγου, κινητικά προβλήματα ή προβλήματα ισορροπίας (κυρίως αταξικό βάδισμα), μικροκεφαλία και σπασμούς (οι οποίοι εμφανίζονται συνήθως σε ηλικία μικρότερη των 3 χρόνων). Επίσης, οι ασθενείς με σύνδρομο Angelman παρουσιάζουν ένα τυπικό προφίλ συμπεριφοράς το οποίο διακρίνεται από συχνά και αναίτια ξεσπάσματα γέλιου και χαρακτηριστικές αταξικές κινήσεις χεριών («*happy puppet*» syndrome) (Πίνακας 1.1). Σημαντικό εύρημα για την παραπομπή ασθενών για έλεγχο συνδρόμου Angelman είναι το τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) (Εικόνα 1.1), το οποίο παρουσιάζει υψηλά οξύαιχμα κύματα ή χαμηλού δυναμικού κύματα [3].

Πίνακας 1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman, ταξινομημένα ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης [4].

<p>Συχνότητα 100%</p> <ol style="list-style-type: none">1. Αναπτυξιακή καθυστέρηση, νοητική υστέρηση και σοβαρή διαταραχή ομιλίας2. Κινητικά ή προβλήματα ισορροπίας, κυρίως αταξία3. Τυπικό προφίλ συμπεριφοράς: συχνό γέλιο, χαρούμενη διάθεση, εξάψεις ενθουσιασμού, χαρακτηριστικές κινήσεις χεριών
<p>Συχνότητα > 80%</p> <ol style="list-style-type: none">1. Μικροκεφαλία (γίνεται εμφανής σε ηλικία 2 ετών)2. Σπασμοί (εμφανίζονται σε ηλικία > 3 ετών)3. Τυπικό παθολογικό ΗΕΓ
<p>Συχνότητα 20- 80 %</p> <ol style="list-style-type: none">1. Επίπεδο ινίο2. Προεξέχουσα γλώσσα3. Προβλήματα σίτισης στην νεογνική περίοδο4. Προγναθισμός5. Μικροστομία6. Αραιά δόντια7. Υπομελάγχρωση (ανοιχτόχρωμα μαλλιά / μάτια σε σχέση με τα οικογενή χαρακτηριστικά)8. Χαρακτηριστική στάση σώματος με ανασηκωμένα χέρια κατά την βάδιση9. Διαταραχές ύπνου



Εικόνα 1.1 Τυπική παθολογική εικόνα ΗΕΓ σε ασθενή με σύνδρομο Angelman.

1.1.1 ΚΥΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ

Η κύηση και η περιγεννητική περίοδος είναι συνήθως φυσιολογικά. Συχνά κατά την βρεφική περίοδο (στους πρώτους έξι μήνες) παρουσιάζονται προβλήματα σίτισης και κεντρική υποτονία με υπερτονία των άκρων [5]. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman και η νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση δεν είναι εμφανή στη νεογνική ηλικία και η διάγνωση του συνδρόμου μπορεί να γίνει μετά την ηλικία των δύο ετών [6].

1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman είναι ο προγναθισμός και το οξύ πηγούνι, το μεγάλο γελαστό στόμα με μεγάλη απόσταση των δοντιών, η προεξέχουσα γλώσσα, το μικρό άνω χείλος και η υποπλασία του μέσου προσώπου. Τυπική είναι η μικροκεφαλία ($ΠΚ < 3^η ΕΘ$), η βραχυκεφαλία, τα εμβυθισμένα μάτια, το μεγάλο μέτωπο και το επίπεδο ινίο (Εικ. 1.1.2)



Εικόνα 1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman

1.1.3 ΣΠΑΣΜΟΙ - ΗΛΕΚΤΡΟΕΓΚΕΦΑΛΟΓΡΑΦΗΜΑ

Κοινό χαρακτηριστικό των παιδιών με σύνδρομο Angelman είναι η εμφάνιση σπασμών, οι οποίοι ξεκινούν σε ηλικία 18- 24 μηνών, και αφορούν το 80% των παιδιών με AS. Έχουν παρατηρηθεί όλες οι μορφές σπασμών με χαρακτηριστικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα [7]. Το τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα περιλαμβάνει συνήθως υψηλά οξύαιχμα κύματα ή χαμηλού δυναμικού κύματα, κυρίως στις απαγωγές από τη βάση του εγκεφάλου, τα οποία αυξάνονται με το άνοιγμα των ματιών (Εικ. 1.1). Η αξονική και η μαγνητική τομογραφία δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα παθολογικά ευρήματα [8]. Μπορεί να αποτυπώνουν ήπια ατροφία του εγκεφαλικού φλοιού, διάταση των κοιλιών και μικροκεφαλία. Ο έλεγχος για *νευρομυικά* και μεταβολικά νοσήματα είναι αρνητικός.

1.1.4 ΨΥΧΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ

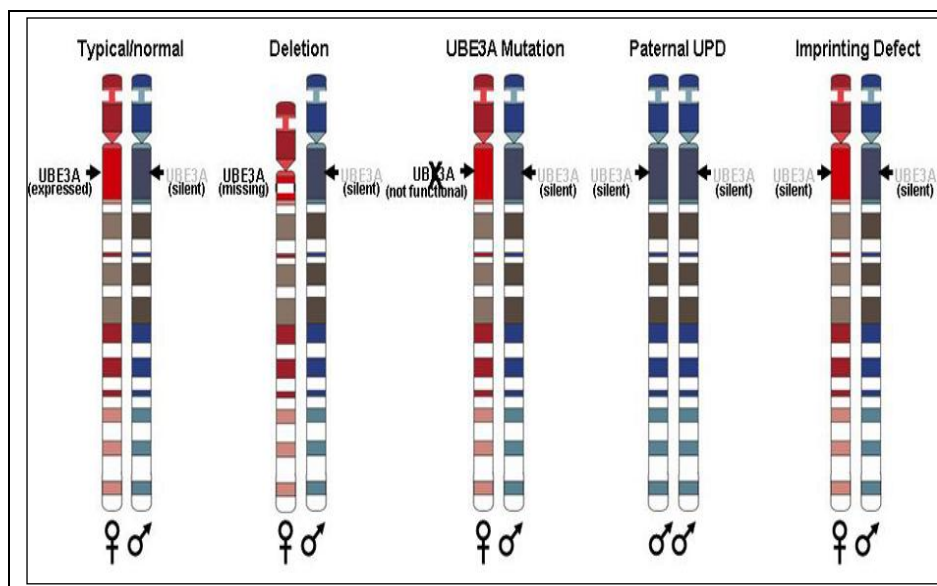
Η ψυχοκινητική καθυστέρηση, σε συνδυασμό με το τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, αποτελεί την κυριότερη αιτία παραπομπής για έλεγχο συνδρόμου Angelman. Η ψυχοκινητική καθυστέρηση που παρουσιάζουν οι πάσχοντες είναι βαριά και γίνεται εμφανής συνήθως από μικρή ηλικία λόγω καθυστέρησης στα αναπτυξιολογικά στάδια [9]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το πνευματικό πηλίκο των παιδιών με AS είναι εξαιρετικά χαμηλό (IQ ≈40). Οι ασθενείς με σύνδρομο Angelman κάθονται χωρίς υποστήριξη σε ηλικία 12 μηνών και περπατούν σε ηλικία 4 ετών. Το βάδισμά τους χαρακτηρίζεται ευρύ αταξικό με ανασηκωμένα χέρια και τρομώδεις κινήσεις. Η προσοχή τους αποσπάται εύκολα ενώ είναι αρκετά κοινωνικά και ευχάριστα παιδιά παρά τη σοβαρότητα της πνευματικής τους καθυστέρησης. Χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς τους είναι ότι αρέσκονται να κοιτούν στον καθρέφτη, αγαπούν το νερό και το κολύμπι. Τυπικό χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των παιδιών με σύνδρομο Angelman είναι η σοβαρές διαταραχές στην ομιλία, που εκδηλώνονται είτε με πλήρη έλλειψη ομιλίας είτε με την παραγωγή ελάχιστων λέξεων. Είναι σημαντικό ότι οι ασθενείς αντιλαμβάνονται πολλές από τις οδηγίες που τους δίνονται. Μελέτες δείχνουν ότι η έλλειψη ομιλίας δεν οφείλεται στην ψυχοκινητική καθυστέρηση αλλά ότι πρόκειται για λεκτική απραξία, η οποία συνοδεύεται από ανατομικές ανωμαλίες στην περιοχή Wernicke και ταυτόχρονη διεύρυνση της σχισμής του Sylvius. Πρόκειται μάλλον για γενετική διαταραχή που αφορά τη μετανάστευση των νευρικών οδών στην περιοχή αυτή [9].

1.1.5 ΥΠΟΜΕΛΑΓΧΡΩΣΗ

Η υπομελάγχρωση είναι συχνή στο σύνδρομο Angelman (60% των περιπτώσεων) λόγω της ύπαρξης του γονιδίου P μέσα στην 15q11- q13 χρωμοσωμική περιοχή. Πολλά παιδιά με σύνδρομο Angelman είναι ξανθά με γαλάζια μάτια, ανεξάρτητα από τα οικογενή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

1.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

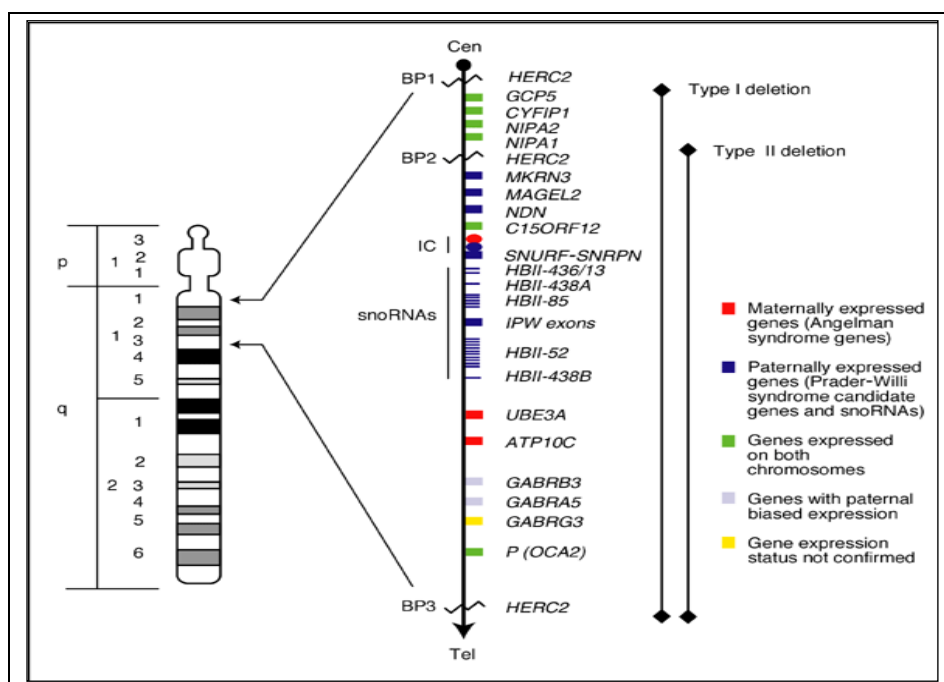
Το σύνδρομο Angelman προκαλείται από βλάβες που συμβαίνουν στο μητρικό αλληλόμορφο της περιοχής q11- q13 του χρωμοσώματος 15 (Εικ. 1.2 1)



Εικόνα 1.2.1 Διαγραμματική απεικόνιση μοριακών μηχανισμών παθογένεσης συνδρόμου Angelman (από www.cureangelman.org)

Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την εκδήλωση του συνδρόμου Angelman περιλαμβάνουν : α) Χρωμοσωμικά ελλείματα στην περιοχή 15q11- q13, σε ποσοστό ~ 65- 70% των ασθενών. Η πλειοψηφία των ελλειμάτων αυτών είναι του ίδιου μεγέθους, περίπου 4Mb, ενώ τα σημεία θραύσης εντοπίζονται μεταξύ συγκεκριμένων δεικτών (Εικ.1.2.2). Υπάρχει ένα κοινό σημείο θραύσης προς το τελομερικό άκρο και δύο κοινά σημεία θραύσης προς το κεντρομερίδιο. Το γεγονός ότι τα σημεία θραύσης εντοπίζονται σε συγκεκριμένες θέσεις υποδεικνύει ότι τα ελλείματα προκύπτουν από άνισο επιχιασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, υπόθεση η οποία έχει στηριχθεί με την αποκάλυψη

επαναλαμβανόμενων τμημάτων DNA και στα τρία σημεία θραύσης [10]. Μικρό ποσοστό ασθενών (<1%), μπορεί να έχει μικρότερου μεγέθους ελλείμματα τα οποία είναι αποτέλεσμα μη ισοζυγισμένης μετάθεσης ή άλλων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων [3].

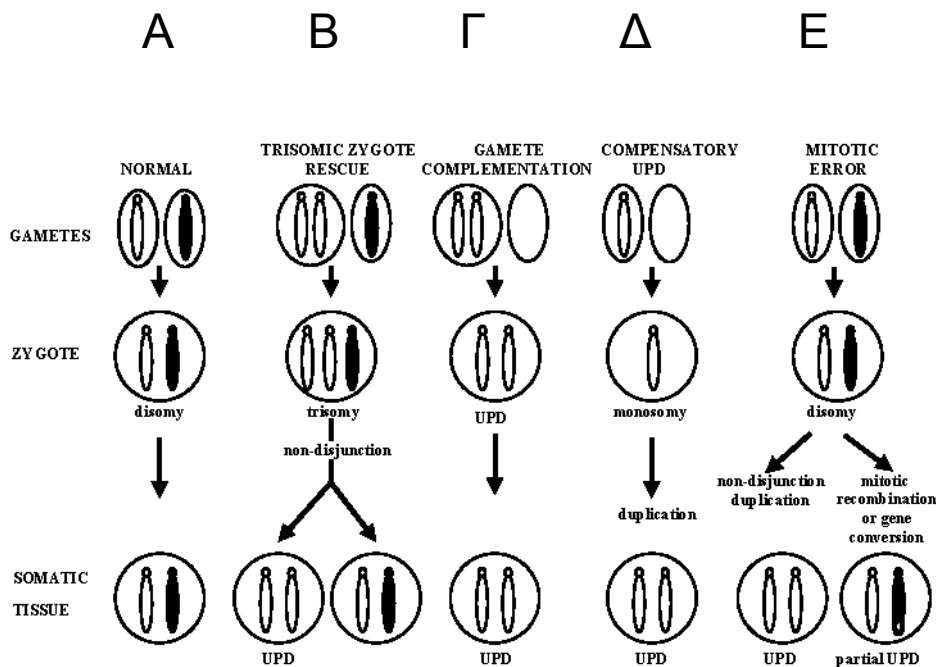


Εικόνα 1.2.2 Γενετικός χάρτης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα γονίδια τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά από το μητρικό αλληλόμορφο φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τα κοινά σημεία θραύσης (BP1, BP2 και BP3), τα οποία δημιουργούν τα χρωμοσωμικά ελλείμματα σε ασθενείς με AS, φαίνονται με κάθετες γραμμές (από Expert Reviews in Molecular Medicine, Vol 7; Issue 14; 25 July 2005, <http://www.expertreviews.org/>).

β) Η δεύτερη πιο συχνή μοριακή διαταραχή που εμφανίζεται σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman είναι η ύπαρξη ετερόζυγων μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A* (*UBE3A*, MIM# 601623) (5- 10%) το οποίο βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13, και εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο σε συγκεκριμένες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου. Οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση του συνδρόμου αφορούν κυρίως αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων της κωδικοποιούσας περιοχής

του γονιδίου οι οποίες προκαλούν την δημιουργία μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος.

γ) Μικρό ποσοστό ασθενών με σύνδρομο Angelman (3- 5%) εμφανίζουν πατρική μονογονεϊκή δισωμία του χρωμοσώματος 15 (pUPD15) [11]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μονογονεϊκή δισωμία αφορά ολόκληρο το χρωμόσωμα 15 και προκύπτει από λάθη που συμβαίνουν κατά την μειωτική διαίρεση και κατά τα πρώτα στάδια δημιουργίας του ζυγωτού [3]. Συγκεκριμένα, ατελής διαχωρισμός κατά την μειωτική διαίρεση στο σπερματοζώαριο, η δημιουργία τρισωμικού ζυγωτού και η διόρθωση της τρισωμίας με αποβολή του μητρικού αλληλομόρφου, οδηγεί σε πατρική δισωμία και εμφάνιση του συνδρόμου Angelman [12] (Εικ. 1.2.3).



Εικόνα 1.2.3 Μηχανισμοί δημιουργίας μονογονεϊκής δισωμίας: Α.Φυσιολογικά η γενετική πληροφορία που υπάρχει στο ζυγωτό προέρχεται από την ισότιμη συνεισφορά και των δύο γονέων, έτσι ώστε τα δύο αλληλόμορφα κάθε χρωμοσώματος να αντιπροσωπεύουν την πατρική και την μητρική σειρά, Β. Κατά την διόρθωση τρισωμικού ζυγωτού (trisomic zygote rescue), ατελής διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ζυγωτού, έχει σαν αποτέλεσμα την αποβολή του ενός αλληλομόρφου, που στην περίπτωση που πρόκειται για το αλληλόμορφο του φυσιολογικού μονοσωμικού γαμέτη, προκύπτουν κύτταρα τα οποία φέρουν δύο αλληλόμορφα από τον ένα γονέα (UPD), Γ. Στην

σπάνια περίπτωση γονιμοποίησης ενός ανώμαλου δισωμικού γαμέτη από έναν επίσης ανώμαλο γαμέτη από τον οποίον απουσιάζει το αλληλόμορφο του ίδιου χρωμοσώματος, προκύπτει ένα δισωμικό μεν ζυγωτό, με δύο όμως αλληλόμορφα από τον ένα μόνο γονέα (gamete complementation), Δ. Η διόρθωση ενός μονοσωμικού ζυγωτού, το οποίο έχει προκύψει από γονιμοποίηση ενός φυσιολογικού μονοσωμικού γαμέτη από έναν ανώμαλο γαμέτη, από τον οποίο απουσιάζει ένα αλληλόμορφο, με διπλασιασμό του μονοσωμικού αλληλομόρφου, δημιουργεί κύτταρα τα οποία περιέχουν δύο πανομοιότυπα αλληλόμορφα από τον έναν γονέα (ισοδισωμία) (compensatory UPD), Ε. Η μονογονεϊκή δισωμία μπορεί τέλος να προκύψει από λάθη κατά τον μιτωτικό διπλασιασμό σε ένα φυσιολογικό κατά τα άλλα ζυγωτό. Ατελής διαχωρισμός ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε μονογονεϊκή δισωμία ή μερική μονογονεϊκή δισωμία (segmental UPD) αντίστοιχα (Από Spence et al, 1998).

δ) Περίπου 3- 5% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν αλλαγές στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11- q13, με αποτέλεσμα το μητρικό αλληλόμορφο να φέρει πατρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης. Οι παρατηρούμενες αυτές αλλαγές μπορεί να οφείλονται είτε σε μικρά ελλείμματα και μεταλλάξεις σε περιοχές που ρυθμίζουν την γονιδιακή αποτύπωση της περιοχής (κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, IC), είτε σε αιτίες οι οποίες παραμένουν ακόμη άγνωστες.

Τέλος υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman, στους οποίους η κυτταρογενετική και μοριακή ανάλυση δεν αποκαλύπτει καμία από τις παραπάνω μοριακές βλάβες. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη μοριακών διαταραχών είτε σε άλλα γονίδια εντός της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13 (ATP10C) είτε σε γονίδια εκτός αυτής (CDKL- 5), που όμως εκδηλώνονται με παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά. Συνεχείς έρευνες υποστηρίζουν επίσης την ανάγκη για περισσότερες συγκριτικές μελέτες φαινοτύπου – γονοτύπου και άλλων συνδρόμων (σύνδρομο Rett), τα οποία εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο Angelman, και καθιστούν πολλές φορές δύσκολη την κλινική εκτίμηση.

1.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την μοριακή διάγνωση του συνδρόμου Angelman, περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο διαφορετικές μεθόδους, για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Η ανίχνευση χρωμοσωμικών ελλειμμάτων, μονογονεϊκής δισωμίας και μεταλλάξεων ή μικρών ελλειμμάτων στην περιοχή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (Imprinting Centre, IC), πραγματοποιείται με την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή και του εξωνίου 1 του SNRPN γονιδίου. Το διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης των δύο αλληλομόρφων (πατρικό, μητρικό) αποτελεί την βάση της μεθόδου που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για την μοριακή διάγνωση του συνδρόμου Angelman. Ποσοστό περίπου ίσο με το 80% των περιπτώσεων συνδρόμου Angelman μπορούν να διαγνωστούν με την μέθοδο της χημικής τροποποίησης του DNA και του MS-PCR (Methylation Specific PCR). Στην περίπτωση ύπαρξης παθολογικού ευρήματος με την μέθοδο MS-PCR, ακολουθεί η μοριακή ανάλυση πολυμορφικών δεικτών της κρίσιμης περιοχής, προκειμένου να αποκαλυφθεί αν πρόκειται για χρωμοσωμικό έλλειμμα ή μονογονεϊκή δισωμία. Η μέθοδος MS-PCR δεν αποκαλύπτει τις περιπτώσεις εκείνες (5- 10%) που αφορούν την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A*, δεδομένου ότι οι ασθενείς αυτοί έχουν φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης στην περιοχή 15q11-q13.

Για τον εντοπισμό ελλειμμάτων και μονογονεϊκής δισωμίας πραγματοποιείται συγκριτική ανάλυση απλοτύπων με τη μελέτη δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών δεικτών του χρωμοσώματος 15 στους γονείς και στο παιδί, προκειμένου να εξακριβωθεί το πρότυπο κληρονόμησης των πολυμορφικών αυτών θέσεων. Η μέθοδος αυτή (Dinucleotide Repeat Polymorphism, DNRP) απαιτεί την ύπαρξη ποικιλομορφίας στην οικογένεια για τις συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις που μελετώνται, καθώς επίσης και την ύπαρξη βιολογικού υλικού από τους γονείς, συνθήκες οι οποίες συχνά δεν είναι εφικτές. Με την μέθοδο FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) είναι δυνατή η ανίχνευση ελλειμμάτων, και χρησιμοποιείται όταν η ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες (DNRP) δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα (μη πληροφοριακές οικογένειες, μη διαθεσιμότητα των απαραίτητων βιολογικών

δειγμάτων κλπ). Επίσης, η χρήση κατάλληλων μοριακών ανιχνευτών μπορεί να αποκαλύψει μικρά ελλείμματα, τα οποία δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με την DNRP ανάλυση (για παράδειγμα μικρά ελλείμματα στην περιοχή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης), ενώ η χρήση κυτταρογενετικών μεθόδων μπορεί να αποκαλύψει την ύπαρξη σπάνιων χρωμοσωμικών ανακατάξεων που περιλαμβάνουν την περιοχή 15q11- q13. Πρόσφατα, χρησιμοποιείται εναλλακτικά και η μέθοδος MLPA (Multiplex ligation- dependent probe amplification) για την ανίχνευση ελλειμμάτων στην περιοχή 15q11- q13 σε ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης ελλειμμάτων μέσα στην περιοχή 15q11- q13 χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους ανιχνευτές που αντιστοιχούν σε διαφορετικά τμήματα της εν λόγω περιοχής (MRC Holland, <http://www.mrc-holland.com/>).

Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A* περιλαμβάνει τη μελέτη ολόκληρης της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου (εξώνια 7- 16) με την εφαρμογή αρχικά μίας μεθόδου σάρωσης (SSCP, dHPLC, ECMA), η οποία αποκαλύπτει την ύπαρξη τυχόν ελαττωματικού προϊόντος. Στη συνέχεια ελέγχεται η αλληλουχία του ελαττωματικού προϊόντος με την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής (direct sequencing) ώστε να εντοπιστεί και να ταυτοποιηθεί η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλλαγή.

1. 4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

Ο κίνδυνος επανεμφάνισης του συνδρόμου Angelman στις περιπτώσεις de novo χρωμοσωμικού ελλείμματος στην περιοχή 15q11- q13 είναι μικρότερος από 1% [13]. Οι Kokkonen και Leisti αναφέρουν την ύπαρξη του ίδιου χρωμοσωμικού ελλείμματος στην περιοχή 15q11-q13 του μητρικού αλληλομόρφου σε δύο αδέρφια, προτείνοντας την ύπαρξη γαμετικού μωσαϊκισμού στη μητέρα [14].

Σε ασθενείς με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις ή μικρά ελλείμματα ο κίνδυνος επανεμφάνισης μπορεί να φτάνει το 50%. Στις περιπτώσεις αυτές ο

χρωμοσωμικός έλεγχος της μητέρας (καρυότυπος ή/ και FISH) κρίνεται απαραίτητος, ώστε να αποκλειστεί ή όχι η ύπαρξη χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και να καθοριστεί η προέλευση του ελλείμματος (αν πρόκειται για κληρονομούμενο μητρικό χαρακτηριστικό ή έχει συμβεί *de novo* στο παιδί) [15].

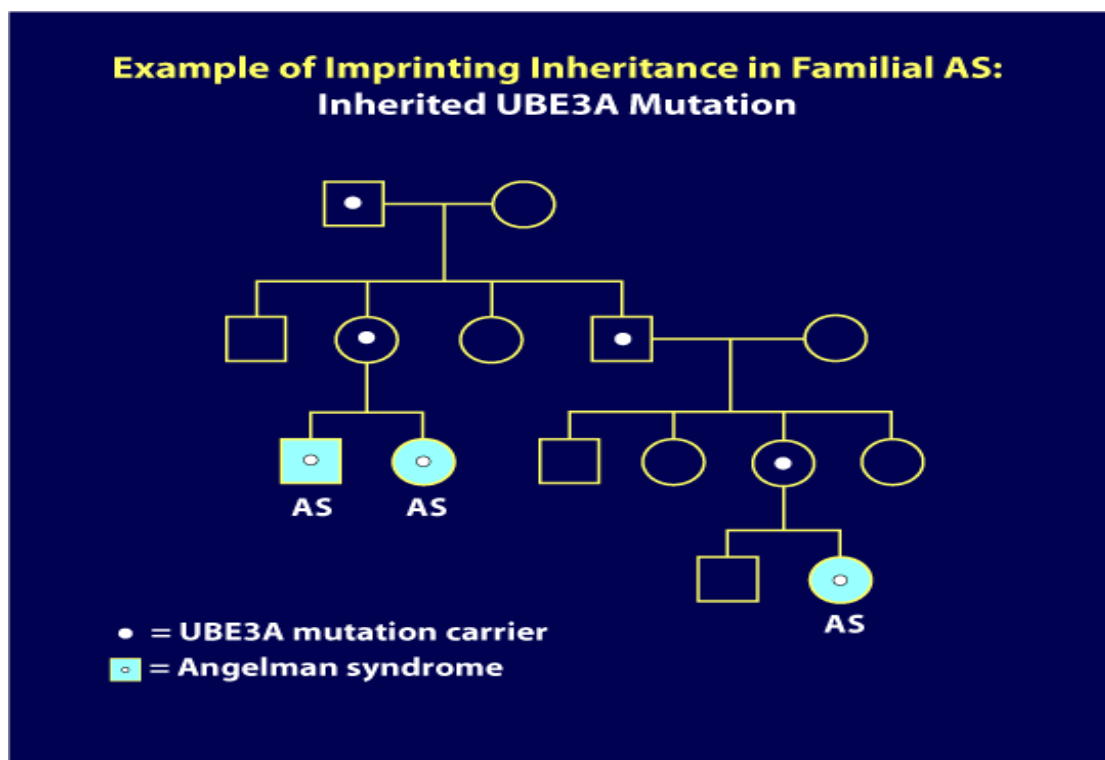
Η πατρική μονογονεϊκή δισωμία (pUPD) αποτελεί σποραδικό φαινόμενο, και ο κίνδυνος επανεμφάνισης υπολογίζεται μικρότερος από 1/200 [15]. Παρόλα αυτά, στις περιπτώσεις UPD, προτείνεται ο χρωμοσωμικός έλεγχος του ασθενούς, ώστε να αποκλειστεί η περίπτωση κληρονομούμενης πατρικής ροβερτιανής μετατόπισης 15;15. Εάν ο πατέρας του ασθενούς φέρει την μετατόπιση αυτή, ο κίνδυνος επανεμφάνισης μπορεί να φτάσει το 100%.

Ο κίνδυνος επανεμφάνισης μεταλλάξεων στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης μπορεί να ανέρχεται μέχρι και 50%, στις περιπτώσεις όπου μικροελλείμματα (2- 600kb) ή μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11- q13, υπάρχουν στην φαινοτυπικά φυσιολογική μητέρα και τα οποία έχουν κληρονομηθεί από τον πατέρα της (μητρικός παππούς του προσβεβλημένου ατόμου στην οικογένεια) [16]. Το 80% των ασθενών με βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, δεν αφορά οικογενείς περιπτώσεις, αλλά η βλάβη έχει συμβεί *de novo* στο πάσχον άτομο και, κατεπέκταση, ο κίνδυνος επανεμφάνισης σε αυτές τις περιπτώσεις είναι <1% [17].

Οι σημειακές μεταλλάξεις που συναντώνται σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman μπορεί να είναι *de novo* ή οικογενείς. Υπολογίζεται ότι το 55% των μεταλλάξεων αφορά οικογενείς περιπτώσεις, όπου ο κίνδυνος επανεμφάνισης είναι 50%. Στις μεταλλάξεις που εμφανίζονται *de novo* (45%), θεωρητικά δεν υπάρχει κίνδυνος επανεμφάνισης, αρκεί να έχει αποκλειστεί το φαινόμενο του γαμετικού μωσαϊκισμού στη μητέρα. Στην περίπτωση αυτή ο κίνδυνος επανεμφάνισης μπορεί να είναι ακόμη και 50% [17].

Ιδιαίτερα στις περιπτώσεις οικογενών σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A* καθώς και στις περιπτώσεις οικογενών σημειακών μεταλλάξεων ή μικρών χρωμοσωμικών ελλειμμάτων στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, το

πρότυπο κληρονομικότητας έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η μητέρα ενός παιδιού με τις παραπάνω βλάβες είναι φαινοτυπικά φυσιολογική, εφόσον φέρει τη μετάλλαξη στο πατρικό της αλληλόμορφο. Άλλα μέλη της οικογένειας της μητέρας μπορεί να φέρουν την ίδια μετάλλαξη στο πατρικό τους αλληλόμορφο. Οι άντρες- φορείς της μετάλλαξης, δεν έχουν άμεσο κίνδυνο γέννησης παιδιού με σύνδρομο Angelman, εφόσον το πατρικό αλληλόμορφο δεν εκφράζεται. Όμως, σε περίπτωση μεταβίβασης της μετάλλαξης σε κορίτσι, αυτό θα έχει 50% κίνδυνο να γεννήσει παιδί με σύνδρομο Angelman. Οι γυναίκες- φορείς της μετάλλαξης έχουν 50% κίνδυνο γέννησης παιδιού με σύνδρομο Angelman (Εικ. 1.4.1).



Εικόνα 1.4.1 Πρότυπο κληρονομικότητας του αποτυπωμένου γονιδίου UBE3A (λεπτομέρειες στο κείμενο).

1.5 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Η γονιδιακή αποτύπωση (genomic imprinting), αποτελεί μία επιγενετική διαδικασία κατά την οποία η θηλυκή και η αρσενική γαμετική σειρά αποκτά

ένα φυλο- καθοριζόμενο πρότυπο (imprint) σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές (imprint clusters). Το μητρικό και το πατρικό αλληλόμορφο δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα, παραμένουν όμως απαραίτητα για την φυσιολογική εμβρυονική ανάπτυξη [18, 19]. Η γονιδιακή αποτύπωση συνεπάγεται ότι το γονιδιακό αποτύπωμα (imprint) επαναδημιουργείται στη γαμετική σειρά σε κάθε γενιά, διατηρείται αυτούσιο μετά από κάθε σωματική διαίρεση κατά την ανάπτυξη του ζυγωτού και τέλος χρησιμοποιείται για να καθορίζει και να ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος [20]. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την επιγενετική κληρονομικότητα στα θηλαστικά. Το γεγονός ότι όλα τα αποτυπωμένα γονίδια που έχουν αναλυθεί περιέχουν μεθυλιωμένες αλληλουχίες είτε στο πατρικό είτε στο μητρικό αλληλόμορφο, ενισχύει τον ρόλο της μεθυλίωσης στην γονιδιακή αποτύπωση [21]. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα είδος διαφορικής ιχνηθέτησης των αποτυπωμένων γονιδίων στα γαμετικά κύτταρα των θηλαστικών. Η κληρονόμηση των επιγενετικών τροποποιήσεων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία διαφορετικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης. Αυτό αλλάζει κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής ενός οργανισμού και εξελίσσεται με διαφορετικό τρόπο στα γαμετικά και στα σωματικά κύτταρα.

Στα σωματικά κύτταρα, το γονιδιακό αποτύπωμα εγκαθίσταται με έναν ιστο-ειδικό τρόπο, και διατηρείται σταθερό κατά την αναπτυξιακή πορεία του οργανισμού. Η διατήρησή του προϋποθέτει ότι σε κάθε κυτταρική διαίρεση το διαφορετικό πρότυπο αποτύπωσης στο πατρικό και στο μητρικό αλληλόμορφο παραμένει αμετάβλητο (maintenance), το οποίο επιτυγχάνεται με την ενζυμική δραστηριότητα των μεθυλοτρανσφερασών διατήρησης.

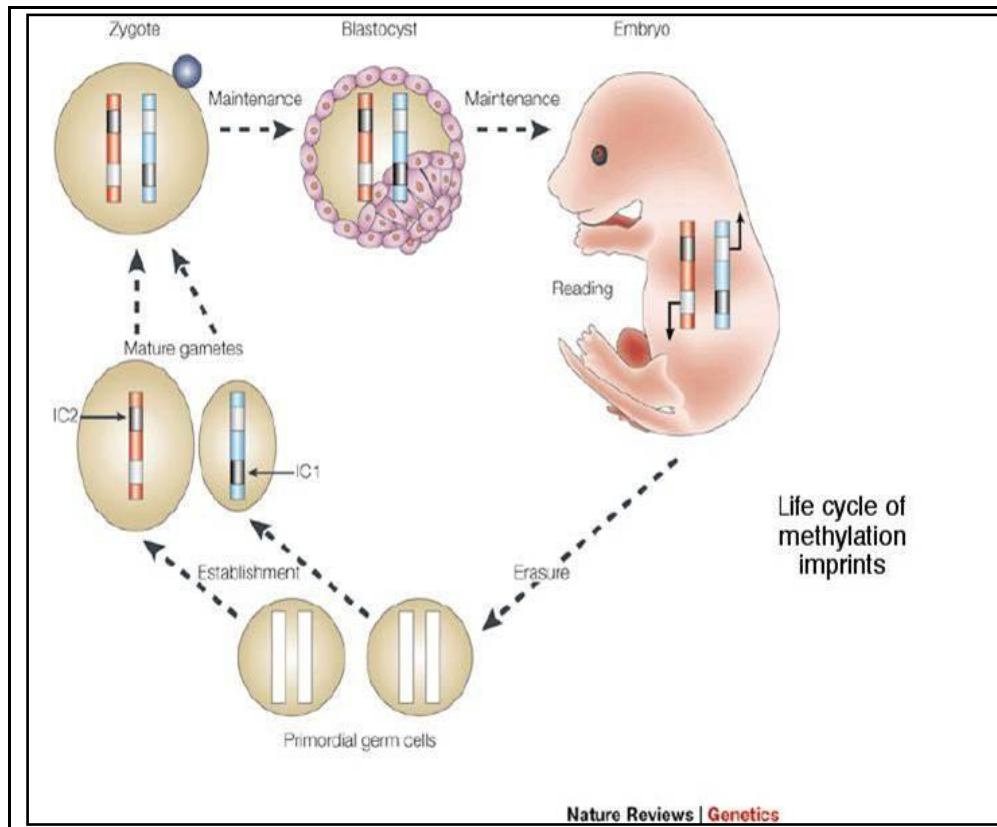
Το εναλλακτικό στάδιο στον κύκλο ζωής των αποτυπωμένων γονιδίων συμβαίνει στην γαμετική κυτταρική σειρά, όπου η διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης ολοκληρώνεται σε τρία διαφορετικά στάδια: α) Διαγραφή (Erasure), β) Εγκαθίδρυση (Establishment) και γ) Διατήρηση (Maintenance) του γονιδιακού αποτυπώματος (Εικ. 1.5.1).

α) *Διαγραφή*: Κατά την διαδικασία σχηματισμού των γαμετικών κυττάρων (ωάριο- σπερματοζωάριο), το γονιδιακό αποτύπωμα που υπάρχει στα σωματικά κύτταρα, διαγράφεται και ακολουθεί μία επανεγκαθίδρυση του αποτυπώματος, μέσω μίας γαμετο- ειδικής διαδικασίας (ανάλογα με το είδος των γαμετικών κυττάρων που σχηματίζονται: ωάριο ή σπερματοζωάριο). Η διαδικασία της διαγραφής του αποτυπώματος περιλαμβάνει την διαγραφή του προτύπου μεθυλίωσης, η οποία φαίνεται να πραγματοποιείται με παθητικούς μηχανισμούς. Ένζυμα ειδικά για την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από το DNA δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Ειδικό μεταγραφικό παράγοντας του αρσενικού και του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της εγκαθίδρυσης του γονιδιακού αποτυπώματος στα γαμετικά κύτταρα. Έχει βρεθεί ειδικός μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει την δημιουργία του γονιδιακού αποτυπώματος στην αρσενική γαμετική σειρά, ενώ ανάλογος ρυθμιστής στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα (Killian K, 2005).

β) *Εγκαθίδρυση*: Η εγκαθίδρυση (establishment) του γονιδιακού αποτυπώματος κατά την διαδικασία της γαμετογένεσης πραγματοποιείται σε διαφορετικά στάδια στην αρσενική και την θηλυκή γαμετική σειρά, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι τουλάχιστον στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα το χρονικό σημείο της εγκαθίδρυσης του γονιδιακού αποτυπώματος μπορεί να διαφέρει σε διαφορετικά γονίδια [22]. Επιπλέον επαναπρογραμματισμός συνεχίζεται κατά τα αρχικά στάδια δημιουργίας του ζυγωτού και τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις και περιλαμβάνει την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από τις μη αποτυπωμένες περιοχές του γονιδιώματος. Τελικά, ο επιγενετικός προγραμματισμός ολοκληρώνεται στο στάδιο περίπου της βλαστοκύστης [23, 24].

Λάθη στην γονιδιακή αποτύπωση μπορεί να συμβούν σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή της διαγραφής, της εγκαθίδρυσης και της διατήρησης του γονιδιακού αποτυπώματος. Η σημασία της μεθυλίωσης του DNA στην διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης υποστηρίζεται από πειράματα στα οποία η δημιουργία knock- out (KO) ποντικών για τα γονίδια των DNA μεθυλοτρανσφερασών προκαλεί διακοπή της γονιδιακής έκφρασης των

αποτυπωμένων γονιδίων H19, Igf2 και Igf2r, καταλήγοντας σε πρόωρο τερματισμό της εμβρυϊκής τους ανάπτυξης (Li et al, 1994).



Εικόνα 1.5.1 Ο κύκλος ζωής των αποτυπωμένων γονιδίων: α) Διαγραφή (Erasure), β) Εγκαθίδρυση (Establishment) και, γ) Διατήρηση (Maintenance)

1.5.1 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 15q11-q13

Μελέτες στα τέλη της δεκαετίας του '80, είχαν θέσει την υποψία για την ύπαρξη γονιδιακά αποτυπωμένης περιοχής στη θέση q11-q13 του χρωμοσώματος 15 στον άνθρωπο. Η αποκάλυψη της μητρικής προέλευσης των χρωμοσωμικών ελλειμμάτων της περιοχής 15q11-q13 σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman, και αντίστοιχα της ίδιας έλλειψης, πατρικής όμως προέλευσης, σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi, έθεσε την βάση για μία σειρά μελετών , αποτέλεσμα των οποίων είναι η αποκάλυψη ενός πολύ καλά

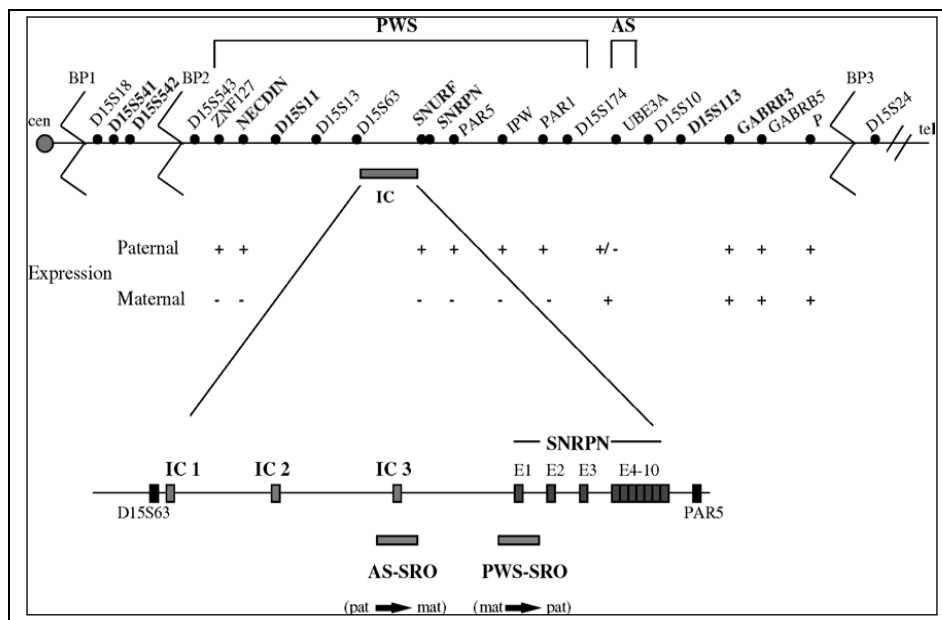
μελετημένου αποτυπωμένου προτύπου της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Τα αποτυπωμένα γονίδια της 15q11-q13, που εκτείνονται σε μία περιοχή μεγέθους 2Mb, εκφράζονται αποκλειστικά από το πατρικό αλληλόμορφο (*SNURF-SNRPN*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* κ.ά) (Εικ. 1.5.1) ενώ άλλα εμφανίζουν ιστο-ειδική πατρική ή μητρική έκφραση. Κάποια γονίδια της περιοχής αυτής εκφράζονται και από τα δύο αλληλόμορφα (*PWRN2*, *GABRB3* κ.ά). Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί δύο μόνο γονίδια (*UBE3A* και *ATP10C*) στην περιοχή 15q11-q13 τα οποία εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο σε συγκεκριμένους ιστούς. Η περιοχή *SNURF-SNRPN* είναι μία πολύπλοκη γενετική θέση η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 148 εξώνια [25]. Το κύριο γονίδιο της περιοχής αυτής, το *SNRPN*, αποτελείται από 10 εξώνια, τα οποία μεταγράφονται σε ένα πολυσιστρονικό mRNA, μεγέθους 1.4Kb. Τα εξώνια 1- 3 κωδικοποιούν την πρωτεΐνη *SNURF* και τα εξώνια 4-10 την *SmN* πρωτεΐνη. Το *SNRPN* είναι επίσης υπεύθυνο για την παραγωγή ενός εναλλακτικού μεταγράφου, από το οποίο προκύπτουν αρκετά snoRNAs (small nucleolar RNAs) [26]. Μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing),εκατέρωθεν της θέσης *SNURF*, παράγονται πολλά εναλλακτικά μετάγραφα (>100), έτσι ώστε η μεταγραφόμενη *SNURF-SNRPN* μονάδα να εκτείνεται σε μεγάλη απόσταση προς το 3' άκρο, επικαλύπτοντας μέρος του γονιδίου *UBE3A* [25]. Η μικρή πυρηνική πρωτεΐνη *SmN* (Small Nuclear RNA associated polypeptide N – *SmN*) αποτελεί συστατικό του μεταγραφωσώματος (spliceosome). Εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ιστών, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε κεντρικούς νευρώνες στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο νεφρό, στο πάγκρεας, στον πνεύμονα και στο ήπαρ [27, 28]. Η ευρεία αυτή έκφραση του *SNRPN* γονιδίου ενισχύει την υπόθεση ότι η *SmN* πρωτεΐνη εμπλέκεται στην ωρίμανση του mRNA πολλών γονιδίων ως βασικός ρυθμιστής [29]. Το *SNURF* αποτελείται από τα 3 εξώνια αριστερά (upstream) του *SNRPN* και κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη 71 αμινοξέων. Τα γονίδια *SNURF* και *SNRPN* εκφράζονται σε υγιή άτομα αλλά δεν εκφράζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi [26, 30].

1.5.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ 15q11-13 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Η γονιδιακή αποτύπωση της 15q11-q13 χρωμοσωμικής περιοχής ρυθμίζεται από έναν πολύπλοκο μηχανισμό. Πρωταρχικό ρόλο στον μηχανισμό αυτό φαίνεται να παίζει η διαφορετική μεθυλίωση συγκεκριμένων θέσεων της περιοχής (CpG δινουκελοτίδια) καθώς και η ύπαρξη ενός διμερούς κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (Imprinting Centre- IC). Η περιοχή της CpG νησίδας του SNRPN γονιδίου, η οποία βρίσκεται εντός του υποκινητή και του εξωνίου 1 του SNRPN γονιδίου, είναι διαφορετικά μεθυλιωμένη στο μητρικό και το πατρικό αλληλόμορφο. Ανάλυση της αλληλουχίας της συγκεκριμένης περιοχής του SNRPN γονιδίου αποκάλυψε ότι >96% όλων των CpG νουκλεοτιδίων είναι μεθυλιωμένα στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο, ενώ στο πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι μη μεθυλιωμένη. Τα δύο γονίδια (SNURF , SNRPN) αποτελούν μέρος της κρίσιμης περιοχής για το σύνδρομο Prader Willi (PW-SRO), ενώ το SNURF περιλαμβάνεται εξ' ολοκλήρου στην PW-SRO. Τα παραπάνω αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι η γενετική θέση SNURF- SNRPN καθώς και τα γονιδιακά προϊόντα που σχετίζονται με αυτήν, έχουν άμεση σχέση με την ρύθμιση των αποτυπωμένων γονιδίων της υπεύθυνης περιοχής για το σύνδρομο Prader Willi. Επιπλέον, ο εντοπισμός του μεταγράφου αντίθετης φοράς του UBE3A γονιδίου εντός της SNURF- SNRPN, αποκαλύπτει ότι η θέση αυτή ελέγχει την έκφραση του UBE3A γονιδίου από το μητρικό αλληλόμορφο, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τον βασικό ρυθμιστικό ρόλο της περιοχής στην συνολική διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης [31].

Μελέτες σε άτομα με σύνδρομο Prader Willi ή Angelman αποκάλυψαν ότι ένα ποσοστό των ασθενών φέρουν σημειακές μεταλλάξεις ή μικρά ελλείμματα (μικρά σε σχέση με τα συνήθη ελλείμματα των 4Mb που εντοπίζονται στην περιοχή, και έχουν μεγέθη που κυμαίνονται από 6- 200kb) σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στην περιοχή 15q11-q13 [32]. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο διακριτών αλληλουχιών οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να ρυθμίσουν την γονιδιακή αποτύπωση της περιοχής 15q11-q13. Οι αλληλουχίες αυτές είναι η PW-SRO (PW Shortest Region of Overlap),

μεγέθους 4.3 Kb, η οποία περιλαμβάνει τον υποκινητή και το εξώνιο 1 του *SNRPN* γονιδίου και η AS-SRO (AS Shortest Region of Overlap), μεγέθους 880bp, η οποία βρίσκεται 35Kb αριστερά από το *SNRPN* γονίδιο (Εικ. 1.5.1). Οι δύο αυτές περιοχές, παρόλο που απέχουν 35 Kb η μία από την άλλη, μπορούν και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αποτελώντας το κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13.



Εικόνα 1.5.1 Γενωμικός χάρτης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Σε μεγέθυνση φαίνεται η διμερής δομή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (IC) με τις δύο κρίσιμες περιοχές (AS-SRO / PW-SRO). Οι αλληλουχίες IC1, IC2 και IC3 αποτελούν εναλλακτικά εξώνια του *SNRPN*. Με τα σύμβολα +/- απεικονίζεται η μητρική ή/ και πατρική έκφραση των γονιδίων της περιοχής (από Fridman and Koiffmann, 2000).

Πρόσφατες μελέτες των *Perk και συνεργατών* (2002) παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις κρίσιμες περιοχές των συνδρόμων Prader Willi (PW-SRO) και Angelman (AS-SRO) [33]. Η κρίσιμη PW-SRO περιοχή είναι μεθυλιωμένη στο μητρικό αλληλόμορφο, ενώ στο πατρικό παραμένει αμεθυλιωτή [34]. Η AS-SRO περιοχή δεν φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο της διαφορετικής μεθυλίωσης, γεγονός που ενισχύεται και από τον χαμηλό αριθμό των CpG δινουκλεοτιδίων που βρίσκονται στην εν λόγω περιοχή.

Σημαντικό ρόλο στην γονιδιακή αποτύπωση της AS-SRO δεν παίζει η μεθυλίωση αλλά η δομή της χρωματίνης και η ακετυλίωση των ιστονών[33, 35]. Μελέτες σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman που φέρουν ελλείψεις στην περιοχή AS-SRO αποδεικνύουν ότι η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την διατήρηση των επιγενετικών χαρακτηριστικών της PW-SRO στο μητρικό αλληλόμορφο. Παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι ελλείψεις στην περιοχή PW-SRO στο μητρικό ή στο πατρικό αλληλόμορφο, δεν επηρεάζουν τα επιγενετικά χαρακτηριστικά της περιοχής AS-SRO [33].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, προτείνεται ο εξής μηχανισμός λειτουργίας του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 : Η περιοχή AS-SRO αποκτά το διαφορετικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης πιο νωρίς από την PW-SRO, και φαίνεται ότι αυτή διαμορφώνει το αντίστοιχο γονιδιακό αποτύπωμα της περιοχής PW-SRO (να μπει το ωραίο σχήμα). Η περιοχή AS-SRO βρίσκεται στην ενεργή μορφή της στο μητρικό αλληλόμορφο. Αυτό σημαίνει ότι στο μητρικό αλληλόμορφο η δομή της χρωματίνης επιτρέπει την πρόσδεση ειδικών παραγόντων στην περιοχή AS-SRO. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την διαφορετική μεθυλίωση του υποκινητή του SNRPN γονιδίου στην PW-SRO περιοχή, καταστέλλοντας την γονιδιακή έκφραση της περιοχής αυτής (PW-SRO). Συνεπώς, η PW-SRO περιοχή δεν εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο. Στο πατρικό αλληλόμορφο, η κλειστή δομή της χρωματίνης στην περιοχή AS-SRO, δεν επιτρέπει την πρόσδεση παραγόντων σε αυτή, με αποτέλεσμα να μην επάγεται η μεθυλίωση της PW-SRO. Η PW-SRO παραμένει αμεθυλιωτή και ενεργή στο πατρικό αλληλόμορφο, όπου, με μηχανισμό που δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί, προκαλεί την έκφραση όλων σχεδόν των γονιδίων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Σε αυτά περιλαμβάνεται και το μετάγραφο αντίθετης φοράς του UBE3A γονιδίου (UBE3A antisense transcript) το οποίο με την σειρά του φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση του UBE3A γονιδίου από το πατρικό αλληλόμορφο. Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου UBE3A δεν ρυθμίζεται άμεσα από την μεθυλίωση ενός υποκινητή αλλά από την έκφραση ενός μεταγράφου αντίθετης φοράς του πατρικού αλληλομόρφου [36]. Ο παραπάνω

μηχανισμός ενισχύεται και από πειράματα που δείχνουν ότι η δομή της χρωματίνης στην περιοχή PW-SRO είναι περισσότερο προσβάσιμη και επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση παραγόντων στο πατρικό αλληλόμορφο, οι οποίοι φαίνεται να είναι απαραίτητοι για την γονιδιακή ενεργοποίηση της 15q11-q13 [37].

1.6 ΓΟΝΙΔΙΟ UBE3A (Ubiquitin Protein Ligase)

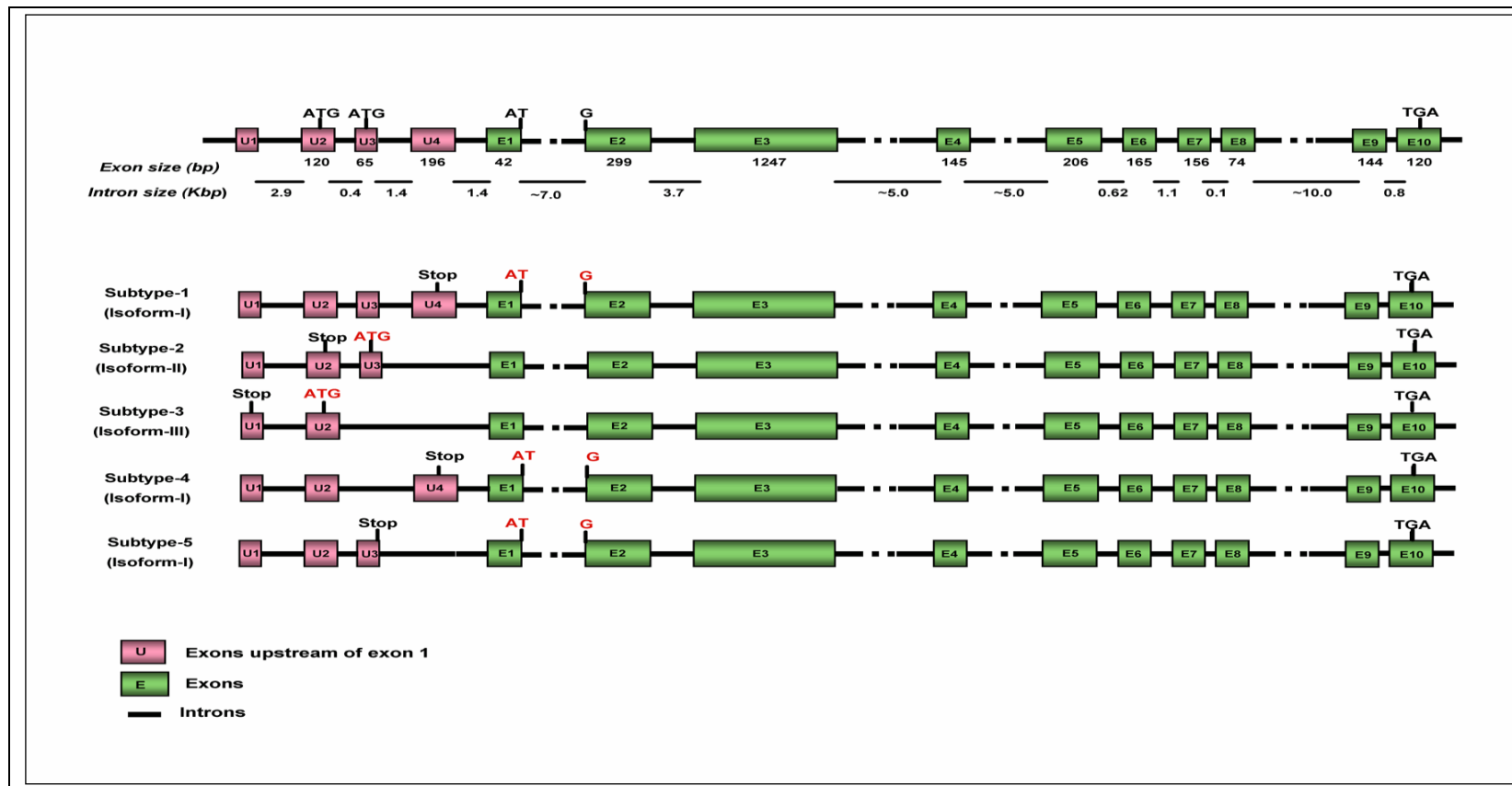
Η χαρτογράφηση του γονιδίου *UBE3A* εντός της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13, όπως και η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων μητρικής προέλευσης στο εν λόγω γονίδιο σε ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman, υποστήριξαν αρχικά την υπόθεση ότι το *UBE3A* είναι το υποψήφιο γονίδιο για το σύνδρομο Angelman [38]. Περαιτέρω μελέτες ανίχνευσης μεταλλάξεων αλλά και μελέτες έκφρασης, εδραίωσαν την υπόθεση αυτή, με αποτέλεσμα το γονίδιο *UBE3A* να θεωρείται το «γονίδιο του συνδρόμου Angelman».

1.6.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ UBE3A ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Το γονίδιο *UBE3A* εδράζεται στο τελομερικό άκρο της 15q11- q13 χρωμοσωμικής περιοχής, έχει μέγεθος 120Kb και μεταγραφικό προσανατολισμό από το τελομερίδιο προς το κεντρομερίδιο [39]. Αποτελείται από 16 τουλάχιστον εξώνια, από τα οποία τα εξώνια 1- 7 συνιστούν το 5' άκρο του γονιδίου, ενώ τα εξώνια 8- 16 αντιπροσωπεύουν την κωδικοποιούσα περιοχή, μεγέθους 2.6Kb. Το κωδικόνιο έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης (ATG) βρίσκεται στο εξώνιο 7 (AT) και 8 (G), ενώ το αντίστοιχο κωδικόνιο λήξης εντοπίζεται στο εξώνιο 16 και στο 3' άκρο του γονιδίου (3' UTR) (Εικ. 1.6.1). Τα μεγέθη των κωδικών εξωνίων του γονιδίου κυμαίνονται από 74bp (εξώνιο 14) έως 1247bp (εξώνιο 9). Το εξώνιο 9 αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου *UBE3A*, συνιστώντας >50% της κωδικοποιούσας περιοχής του (Εικ. 1.6.1). Ανάλυση cDNA κλώνων αποκάλυψαν την ύπαρξη 5 τουλάχιστον εναλλακτικών μεταγράφων (mRNA) στο 5' άκρο του γονιδίου το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 5- 8Kb [39, 40]. Αυτά τα εναλλακτικά

μετάγραφα κωδικοποιούν 3 διαφορετικές ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης, οι οποίες διαφέρουν στο αμινο-τελικό τους άκρο. Οι ισομορφές II και III έχουν στο άμινο-τελικό άκρο 20 και 23 αμινοξέα περισσότερα από την ισομορφή I. Τα εναλλακτικά μετάγραφα 1, 4 και 5 κωδικοποιούν την ισομορφή I της πρωτεΐνης E6-AP, η οποία αποτελεί και το κύριο πρωτεϊνικό προϊόν, ενώ τα cDNA 2 και 3 κωδικοποιούν τις ισομορφές II και III αντίστοιχα. Η λειτουργική σημασία των διαφορετικών αυτών αλληλομόρφων παραμένει ακόμα άγνωστη, ενώ έχει προταθεί ότι η παρουσία τους είναι κρίσιμη για την εξειδικευμένη πρόσδεση της πρωτεΐνης E6-AP σε διαφορετικά κυτταρικά υποστρώματα [40].

Έχουν εντοπιστεί 2 ψευδογονίδια *UBE3AP1* και *UBE3AP2*, τα οποία έχουν 90- 95% ομολογία με την αλληλουχία του γονιδίου *UBE3A*, και έχουν χαρτογραφηθεί στα χρωμοσώματα 2 και 21 αντίστοιχα. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένδειξη για την έκφραση των ψευδογονιδίων αυτών [39].



Εικόνα 1.6.1. Δομή της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου *UBE3A*. Α. Τα 10 εξώνια που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη E6-AP φαίνονται με πράσινο χρώμα (E1- E10). Τα εξώνια αριστερά από την κωδικοποιούσα περιοχή φαίνονται με ροζ χρώμα (U1- U4). Β. Διαγραμματική απεικόνιση των 5 εναλλακτικών μεταγράφων (mRNA), τα οποία διαφέρουν στο 5' άκρο, και των 3 ισομορφών της πρωτεΐνης (I, II, και III) (Από Ramamoorthy and Nawaz, 2008).

1.6.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UBE3A*

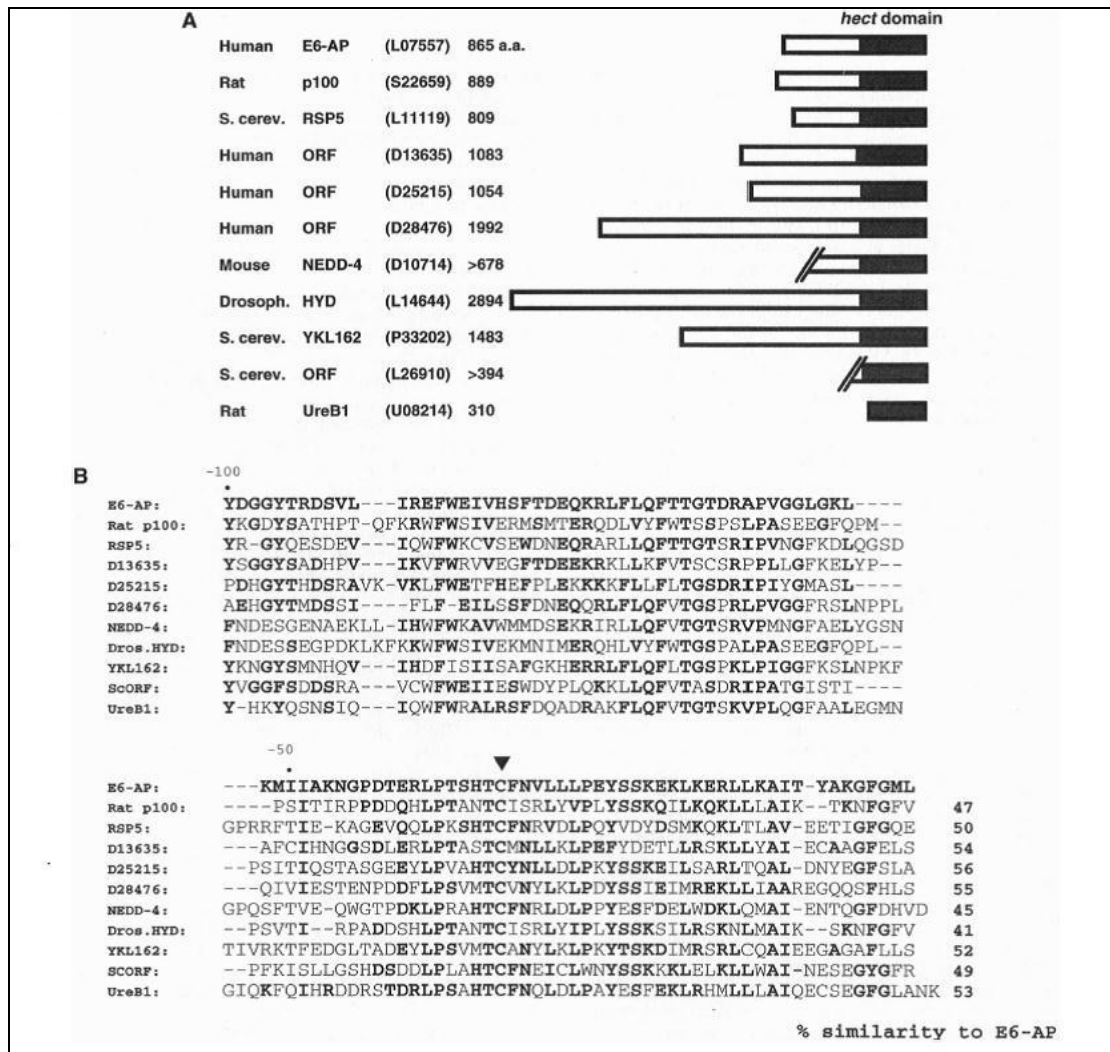
Το γονίδιο *UBE3A* εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα (πατρικό και μητρικό) σε πολλούς ιστούς που έχουν αναλυθεί (ινοβλάστες, λεμφοβλάστες, καρδιά, νεφρό), εκτός του εγκεφάλου [41, 42]. Μελέτες *in situ* υβριδοποίησης σε πειραματόζωα έδειξαν ότι το γονίδιο *Ube3a* εκφράζεται επιλεκτικά μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, επιβεβαιώνοντας την ιστοειδική μητρική έκφρασή του [43]. Οι περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες παρατηρείται επιλεκτική έκφραση του γονιδίου από το μητρικό αλλόμορφο περιλαμβάνουν την περιοχή του ιπποκάμπου, τα κύτταρα (νευρώνες) Purkinje της περιοχής της παρεγκεφαλίδας, τα μητροειδή κύτταρα του οσφρητικού βολβού, τον υποθάλαμο, τον μέσο εγκέφαλο, το ραβδωτό σώμα, και τον φλοιό του εγκεφάλου [43, 44].

Από την άλλη, μελέτη με RNA-FISH αποκάλυψε ότι η έκφραση του γονιδίου *UBE3A* εμφανίζει πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης και σε άλλους ιστούς εκτός του εγκεφάλου, παρουσιάζοντας επιλεκτική μητρική έκφραση σε ινοβλάστες, λεμφοβλάστες και αδιαφοροποίητα νευρικά κύτταρα. Το επίπεδο της έκφρασης διαφέρει ανάμεσα στους κυτταρικούς πληθυσμούς των παραπάνω ιστών, γεγονός που υποδικνείει την επιλεκτική, όχι όμως και την αποκλειστική, έκφραση του γονιδίου από το μητρικό αλληλόμορφο. Στην ίδια μελέτη προτείνεται ότι η έκφραση του *UBE3A* είναι δυνητικά μητρική στα αδιαφοροποίητα νευρικά κύτταρα, ενώ κατά την πλήρη διαφοροποίησή τους το γονίδιο *UBE3A* φαίνεται να αποκτά αποκλειστικά μητρική έκφραση [45]. Περαιτέρω *in vitro* μελέτες αποκάλυψαν την μητρική έκφραση του γονιδίου *Ube3a* στα νευρικά κύτταρα, ενώ στα νευρογλοιακά κύτταρα το γονίδιο εκφράζεται ισοδύναμα και από τα δύο αλληλόμορφα. Επίσης, η ίδια μελέτη αποκαλύπτει ότι το μετάγραφο αντίθετης φοράς του *Ube3a* (*Ube3a antisense transcript*) εκφράζεται αποκλειστικά από το πατρικό αλληλόμορφο στα νευρικά κύτταρα, ενώ δεν εκφράζεται στα νευρογλοιακά κύτταρα [46]. *In vivo* μελέτες έκφρασης, επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα [47]. Οι παρατηρήσεις αυτές διαμορφώνουν ένα κυτταροειδικό πρότυπο μητρικής έκφρασης του γονιδίου *Ube3a* στον εγκέφαλο. Η μητρικής προέλευσης πρωτεΐνη E6-AP εντοπίζεται στον πυρήνα των νευρικών κυττάρων, στον αυξητικό κώνο καθώς και στα προ- και μετά- συναπτικά τμήματα των

νευρώνων του ιππόκαμπου, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη ή/ και στη λειτουργία των νευρικών συνάψεων. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι πειραματικά μοντέλα για το σύνδρομο Angelman έχουν ανώμαλα σχηματισμένες, μικρότερες σε μέγεθος και πυκνότητα, δενδριτικές άκανθες (dendritic spines) [47].

1.7 ΠΡΩΤΕΪΝΗ E6- AP (Ubiquitin Protein Ligase)

Το γονίδιο *UBE3A* κωδικοποιεί μία λιγάση της ουβικιτίνης, την πρωτεΐνη E6-AP (E6-AP ubiquitin protein ligase). Πρόκειται για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, μεγέθους 100kDa και 865 αμινοξέων, η οποία αρχικά εντοπίστηκε με βάση την ιδιότητά της να αλληλεπιδρά με τις E6 ογκοπρωτεΐνες των ογκογόνων τύπων 16 και 18 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV16 και HPV18) [48, 49]. Είναι γνωστό ότι οι E6 πρωτεΐνες συνδέονται με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην αποδιάταξη της p53. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί τον τρόπο με τον οποίο οι E6 πρωτεΐνες απορρυθμίζουν τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και οδηγούν στην καρκινογένεση. Η απενεργοποίηση της p53 μέσω του συμπλόκου E6: E6- AP έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη περισσότερων από το 90% των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Η αλληλεπίδραση της E6- AP με τις E6 πρωτεΐνες αποτελεί ενδιάμεσο, απαραίτητο στάδιο για την σύνδεση των E6 πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη p53. Η E6-AP αποτέλεσε το πρώτο μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνών (λιγάσες της ουβικιτίνης ή E3 ενζυμικές πρωτεΐνες), οι οποίες ονομάζονται hect πρωτεΐνες, γιατί όλες περιέχουν μία περιοχή (350αα) ομόλογη στο καρβόξυ- τελικό τμήμα τους (**H**omology to the **E**6-AP **C**arboxyl **T**erminus) (Εικ. 1.7.1) Οι E3 πρωτεΐνες συμμετέχουν στο σύστημα πρωτεόλυσης μέσω μορίων ουβικιτίνης και πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System - UPS) [50].



Εικόνα 1.7.1 Σχηματική απεικόνιση της *hect* περιοχής της E6- AP και 10 άλλων πρωτεϊνών. Α. Δίνονται ο οργανισμός, το όνομα της πρωτεΐνης (ή το ORF), ο κωδικός GenBank και ο αριθμός των αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το αντίστοιχο cDNA. Β. Στοιχίαση της αλληλουχίας των 100 αμινοξέων του καρβόξυ – τελικού άκρου της E6- AP με τις 10 πρωτεΐνες. Ταυτόσημα ή όμοια αμινοξέα δίνονται με έντονο μαύρο χρώμα, ενώ σημειώνεται με βέλος το συντηρημένο αμινοξύ κυστεΐνη (C) στη θέση 820 της E6-AP (από Huibregtse et al, 1995).

1.7.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ E6- AP

Η E6- AP διαθέτει πέντε αυτόνομες λειτουργικές περιοχές:

- α) την περιοχή *HECT* (**H**omology to the **E**6-AP **C**arboxyl **T**erminus),
- β) την περιοχή πρόσδεσης των E6 ογκογόνων πρωτεϊνών (E6 binding domain) των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV16 και HPV18),

γ) την περιοχή πρόσδεσης της κυτταρικής ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 (p53 binding domain),

δ) τρεις περιοχές αλληλεπίδρασης με πυρηνικούς υποδοχείς (nuclear receptor interaction domains), και

ε) την περιοχή ενεργοποίησης, που σχετίζεται με την δράση της E6-AP σαν συνεργατικό μόριο στην ενεργοποίηση των υποδοχέων στεροειδών ορμονών.

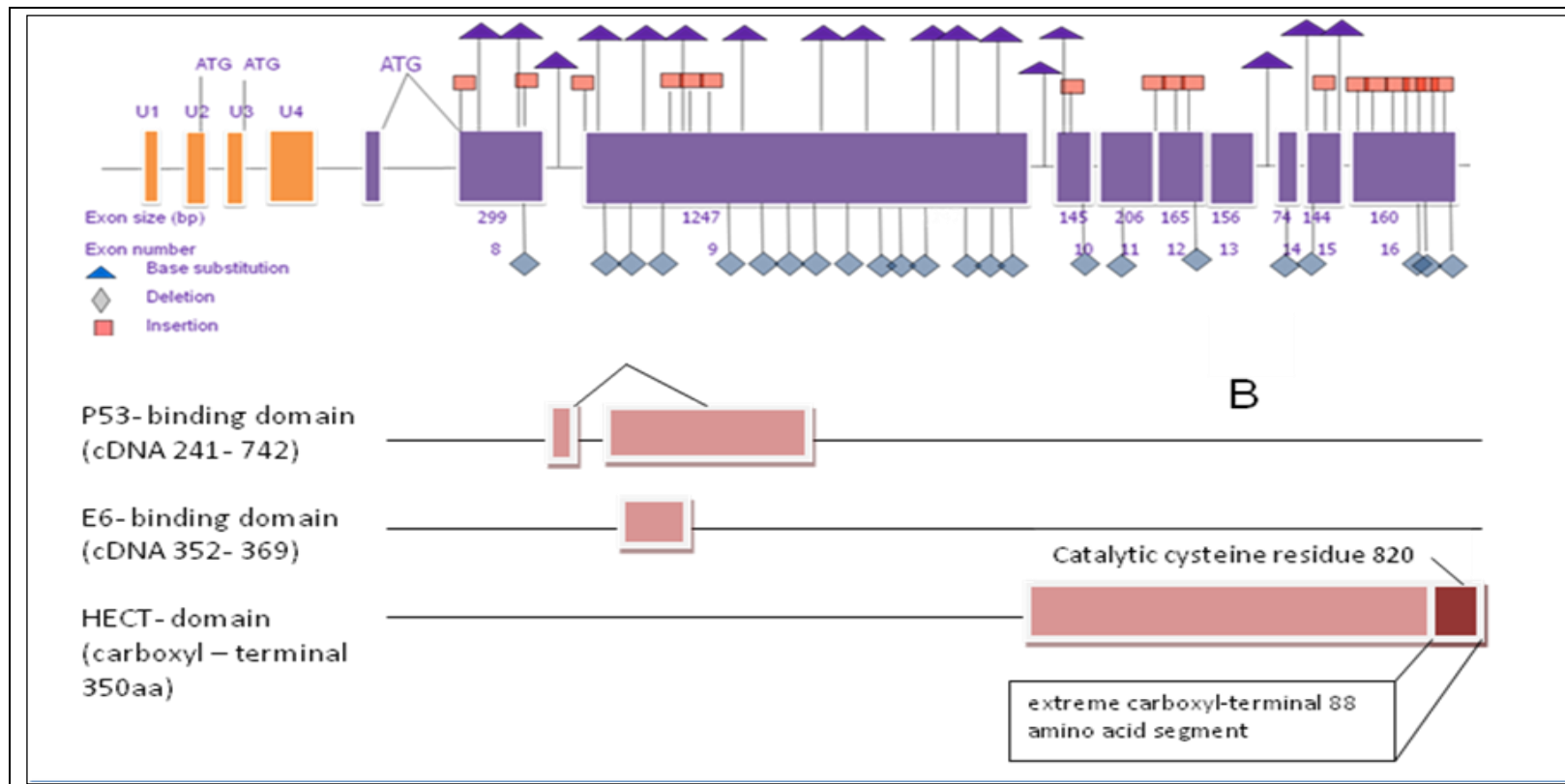
Στοιχεία για τις δομικές και λειτουργικές περιοχές της E6-AP έχουν προκύψει από την μελέτη της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με τις E6 πρωτεΐνες των ιών HPV [48, 49].

Η περιοχή *HECT* της πρωτεΐνης E6-AP κωδικοποιείται από το 3' άκρο του εξωνίου 9 και από τα εξώνια 10-16 του γονιδίου *UBE3A* και αποτελείται από τα 350 καρβοξυτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης (Εικ. 1.7.2). Συνιστά μία ομόλογη περιοχή που συναντάται σε αρκετές πρωτεΐνες, δομικά και λειτουργικά παρόμοιες με την E6-AP (Εικ. 1.7.1). Διαθέτει μία συντηρημένη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της, μεγέθους 40KDa, η οποία αποτελείται από 88 αμινοξέα και έχει τέσσερις τουλάχιστον βιοχημικές ιδιότητες, που αφορούν την ενεργή συμμετοχή της στο σύστημα πρωτεόλυσης μέσω της ουβικιτίνης: α) συνδέεται με συγκεκριμένα, χαμηλού μοριακού βάρους, E2 ένζυμα του συστήματος πρωτεόλυσης ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (UPS), όπως τα UbcH7, UbcH5B και UbcH8, β) δέχεται και συνδέεται με ενεργοποιημένα μόρια ουβικιτίνης, σχηματίζοντας ενδιάμεσα μόρια ουβικιτίνης-θειοεστέρα, μέσω της εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης της ουβικιτίνης με το αμινοξύ κυστεΐνη στην θέση 820 της πρωτεΐνης E6-AP. In vitro μελέτες έδειξαν ότι αλλαγή του αμινοξέος κυστεΐνη σε αλανίνη ή σερίνη, καθιστά την πρωτεΐνη ανίκανη να σχηματίσει θειοστερικό δεσμό με το μόριο της ενεργοποιημένης ουβικιτίνης [51], γ) μεταφέρει το ενεργοποιημένο μόριο της ουβικιτίνης σε πρωτεΐνες υποστρώματα, καταλύοντας τον σχηματισμό ισοπεπτιδικού δεσμού, και δ) συμπληρώνει την αλυσίδα μορίων ουβικιτίνης, μεταφέροντας και άλλα ενεργοποιημένα μόρια ουβικιτίνης [52, 53].

Η περιοχή της E6-AP που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση με τις E6 ογκογόνες πρωτεΐνες των HPV ιών κωδικοποιείται από το 5' άκρο του εξωνίου

9 (cDNA 352- 369) και αφορά μία μικρή περιοχή 18 αμινοξέων. Πειράματα *in vitro* μεταλλαξογένεσης έδειξαν ότι έλλειμμα των 18 αυτών αμινοξέων οδηγεί σε απουσία της ενεργότητας της E6 περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης [48, 49, 54]. Η αμινοξική αυτή αλληλουχία έχει χαρακτηριστεί σαν ένα πεπτίδιο πλούσιο σε λευκίνη (LXXLL motif) [55-58], και περιέχει 5 γλουταμινικά κατάλοιπα και δύο αμινοξέα αργινίνης. Ο όξινος χαρακτήρας της περιοχής αυτής φαίνεται να είναι σημαντικός για την αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες E6, οι οποίες έχουν βασικό χημικό χαρακτήρα. Μέσα στην περιοχή των 18 αμινοξέων υπάρχει μία θέση αναγνώρισης της κινάσης της καζεΐνης II (casein kinase II), γεγονός που υποδηλώνει ότι η κατάσταση φωσφορυλίωσης της περιοχής ίσως να σχετίζεται με την ικανότητά της να προσδένεται με τις E6 πρωτεΐνες [48, 49].

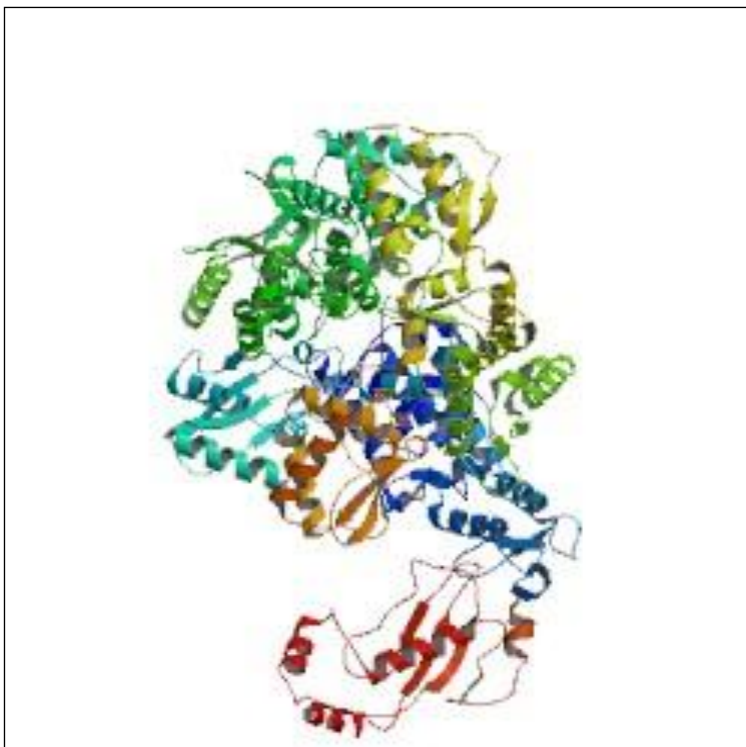
Η περιοχή μέσω της οποίας οι E6 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την κυτταρική πρωτεΐνη p53 κωδικοποιείται από το 3' άκρο του εξωνίου 8 και μέρος του εξωνίου 9 (cDNA 241- 742) και αποτελεί ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης E6-AP, μεγέθους περίπου 500 αμινοξέων, η οποία περιλαμβάνει και την περιοχή πρόσδεσης μεγέθους 18 αμινοξέων (E6 binding domain). Η αλληλεπίδραση των E6 πρωτεϊνών με την κυτταρική πρωτεΐνη p53 μέσω της E6 – binding περιοχής της E6-AP, δεν εξασφαλίζει και την αποδιάταξη της p53. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ύπαρξης του καρβοξυτελικού άκρου της E6 – binding περιοχής, μεγέθους 84 αμινοξέων.



Εικόνα 1.7.2. Απεικόνιση των περισσότερων μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευθεί στις κωδικοποιούσες και σε ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *UBE3A*. Β. Απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών της E6-AP σε αντιστοίχιση με τις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου *UBE3A*. Η αρίθμηση έγινε με βάση την αλληλουχία cDNA GenBank X98032.

1.7.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ E6-AP

Η ενδοκυτταρική καταστροφή πρωτεϊνών, που είτε παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα ενεργές μέσα στο κύτταρο είτε λόγω μη φυσιολογικής δομής (misfolded) πρέπει να καταστραφούν, πραγματοποιείται μέσω του συστήματος πρωτεόλυσης με την συμμετοχή μορίων ουβικιτίνης και του πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System- UPS). Το σύστημα αυτό (UPS) λειτουργεί καταστρέφοντας συγκεκριμένες κυτταρικές πρωτεΐνες με έναν αυστηρά ρυθμιζόμενο τρόπο. Η αδυναμία στόχευσης, αναγνώρισης και καταστροφής των



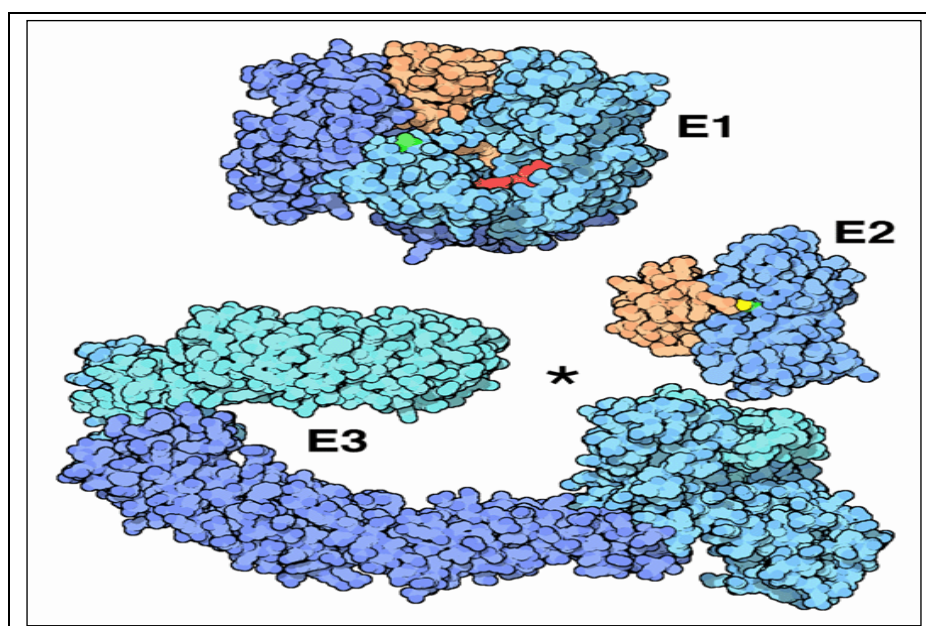
Εικ. 1.7.3 Δομή της πρωτεΐνης E6- AP

(Από : Protein Data Bank

<http://www.rcsb.org/pdb>)

πρωτεϊνικών αυτών μορίων οδηγεί στην δημιουργία τοξικών ενδοκυτταρικών συσσωματωμάτων, γεγονός το οποίο έχει συσχετισθεί με πολλές νευροεκφυλιστικές και νευρολογικές καταστάσεις (Bence NF et al., 2001). Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών μέσω του UPS περιλαμβάνει δύο διακριτά και διαδοχικά βήματα: α) την πρόσδεση μορίων ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη –

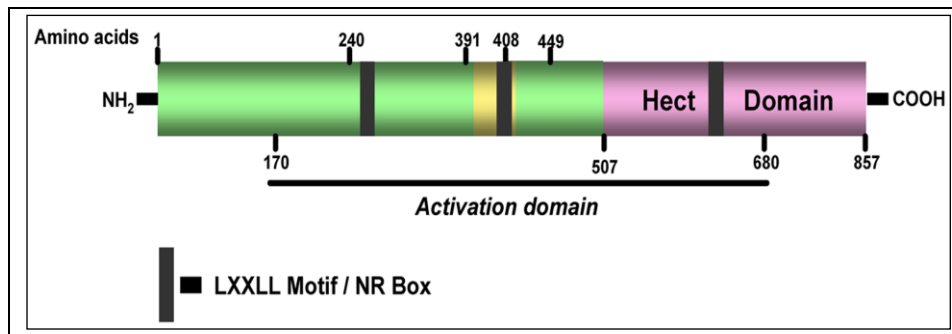
στόχο, κατά την οποία εξασφαλίζεται η αναγνώριση του υποστρώματος, και β) την καταστροφή της πρωτεΐνης- στόχου από το 26S πρωτεάσωμα[59]. Η προσθήκη μορίων ουβικιτίνης στην πρωτεΐνη- στόχο αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία (ubiquitination) η οποία απαιτεί την συντονισμένη δράση τριών διαφορετικών ενζυμικών πρωτεϊνών: του ενζύμου ενεργοποίησης E1 (ubiquitin- activating E1), του συζευκτικού ενζύμου E2 (ubiquitin- conjugating E2) και της λιγάσης E3 (ubiquitin- ligase E3) (Εικ. 1.7.4) Το ένζυμο E1 (E1 ubiquitin- activating enzyme) συνδέεται με το μόριο της ουβικιτίνης η οποία και ενεργοποιείται μέσω μιας ATP – εξαρτώμενης αντίδρασης, που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός θειοεστέρα μεταξύ του συντηρημένου αμινοξέως κυστεΐνη και του καρβοξυτελικού άκρου της ουβικιτίνης. Η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μεταφέρεται και προσδένεται με το ένζυμο E2 με δεσμό υψηλής ενέργειας. Στην συνέχεια το σύμπλεγμα ενώνεται με το ένζυμο E3 (λιγάση της ουβικιτίνης), ένα από τα οποία είναι και η πρωτεΐνη E6-AP. Η ειδικότητα με την οποία αναγνωρίζονται οι πρωτεΐνες του υποστρώματος που πρόκειται να διασπαστούν εξασφαλίζεται από τα ένζυμα E3. Οι πρωτεΐνες E3 εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και αποτελούν σήματα έναρξης της απόπτωσης του κυττάρου.



Εικόνα 1.7.4 Δομή του πρωτεϊνικού συμπλόκου που συμμετέχει στο σύστημα πρωεόλυσης ουβικιτίνης – πρωτεασώματος. Το ένζυμο E1, με την βοήθεια ATP μορίου (κόκκινο χρώμα), προσδένεται με ένα μόριο ουβικιτίνης (πορτοκαλί χρώμα).

Το μόριο της ουβικιτίνης μεταφέρεται από το ένζυμο E1, σε ένα από τα ένζυμα E2. Η πρωτεΐνη στόχος προσδένεται στο σημείο του αστερίσκου, με την συνεργασία των ενζύμων E2 και E3.

Η πρωτεΐνη E6- AP λειτουργεί επιπλέον σαν μόριο συνενεργοποίησης (co-activator) των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (steroid hormone receptors), όπως οι υποδοχείς ανδρογόνων (Androgen Receptors- AR), υποδοχείς προγεστερόνης (Progesterone Receptors –PR), υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors- ER), υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptors- GR), α- υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος (Retinoid Acid Receptor –α- RAR-α) και υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών (Thyroid Hormone Receptor- TR) . Οι υποδοχείς αυτοί δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού ενεργοποίησης, στον οποίο συμμετέχουν οι ειδικές πρωτεΐνες συνενεργοποίησης (co- activator proteins) [60]. Οι πρωτεΐνες αυτές ενισχύουν την ενεργότητα των υποδοχέων, γεγονός που οδηγεί στην μέγιστη μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων στόχων[60-65]. Η πρωτεΐνη E6-AP αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών μέσω μίας περιοχής ενεργοποίησης. Το μοναδικό χαρακτηριστικό που φαίνεται να διαθέτει η περιοχή αυτή σε σχέση με την πρόσδεση με τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών είναι τρεις πρωτεϊνικές δομές τύπου LXXLL (LXXLL motifs). Οι δύο από αυτές έχουν εντοπιστεί στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ η τρίτη βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Όπως ισχύει γενικά για τα περισσότερα μόρια συνενεργοποιητών που έχουν μελετηθεί , η E6- AP δεν εμφανίζει ειδικότητα στην αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς, αλλά φαίνεται ότι η περιοχή ενεργοποίησης είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση με όλους τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών [60],(Εικ. 1.7.5)



Εικόνα 1.7.5. Διαγραμματική απεικόνιση της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης E6- AP. Δίνονται οι θέσεις των LXXLL motifs κατά μήκος της πρωτεΐνης σε σχέση με τον αριθμό των αμινοξέων (από Ramammourthy S. and Nawaz Z., 2008).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η δράση της E6- AP σαν συνεργατικό μόριο ενεργοποίησης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών είναι ανεξάρτητη από την δράση της σαν λιγάση της ουβικιτίνης. Υποστηρίζεται ότι η δράση της E6- AP ως λιγάση της ουβικιτίνης δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργότητα της πρωτεΐνης ως συνεργατικό μόριο σχετικά με την ενεργοποίηση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών [60]. Από την άλλη, προτείνεται ότι η E6- AP λιγάση της ουβικιτίνης, ενδέχεται να συνεισφέρει στην μεταγραφική ενεργοποίηση, μέσω του συστήματος πρωτεόλυσης προωθώντας την αποικοδόμηση πρωτεϊνών οι οποίες καταστέλλουν την μεταγραφική δραστηριότητα (co-repressors). Επίσης, υπάρχουν μελέτες οι οποίες εμπλέκουν την δράση της E6-AP στην διαδικασία της αναπαραγωγής. E6- AP knock- out ποντίκια και των δύο φύλων είναι λιγότερο γόνιμα από τα αντίστοιχα άγριου τύπου (wild type), λόγω του μικρότερου μεγέθους των γονάδων τους καθώς και των ελαττωματικών λειτουργιών παραγωγής σπερματοζωαρίων και ωορηξίας [66]. Σύμφωνα με αποτελέσματα της ίδιας, αλλά και άλλων παρόμοιων μελετών, η E6-AP ρυθμίζει την ανάπτυξη του προστάτη, μέσω σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα ανδρογόνων (AR signaling pathway), το PI3K/AKT και το RhoA σηματοδοτικό μονοπάτι, καθώς και την απόπτωση μέσω της πρωτεΐνης p53 [67].

1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

Το πρώτο πειραματικό μοντέλο για το σύνδρομο Angelman ήταν διαγονιδιακά ποντίκια με πατρική και μητρική ελαττωματική έκφραση του γονιδίου *Ube3a* και δημιουργήθηκε το 1998 από τους *Jiang και συνεργάτες* [68]. Τα διαγονιδιακά ποντίκια με βλάβη στο μητρικό αλληλόμορφο, εμφάνισαν μία σειρά από διαταραχές νευρολογικής φύσεως: κινητική δυσλειτουργία, defective context- dependent learning and hippocampal LTP, σπασμούς και παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Ομοίως, οι *Miura και συνεργάτες* (2001) δημιούργησαν ποντίκια με παρόμοια βλάβη στο γονίδιο *Ube3a* και επικεντρώθηκαν στις ανωμαλίες της συμπεριφοράς και της ηλεκτροεγκεφαλικής δραστηριότητας. Διαπίστωσαν ότι τα παθολογικά ποντίκια εκδήλωσαν ελαττωματική ικανότητα μάθησης που συνδέεται με δυσλειτουργία του ιππόκαμπου, καθώς και παθολογική ηλεκτροεγκεφαλική δραστηριότητα της ίδιας περιοχής, ευρήματα τα οποία είναι συμβατά με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται σε ασθενείς με AS [69]. Ομοίως, μελέτες έκφρασης με διαγονιδιακά ποντίκια πραγματοποιήθηκαν και από τους *Cheron και συνεργάτες* (2005), τα αποτελέσματα των οποίων συμπλήρωσαν τα παραπάνω, διαπιστώνοντας ότι βλάβη στο γονίδιο *Ube3a* επηρεάζει και την λειτουργία της παρεγκεφαλίδας [70].

Πειραματικά μοντέλα δροσόφιλας για το σύνδρομο Angelman έχουν επίσης δημιουργηθεί. Το γονίδιο *Ube3a* της δροσόφιλας (*dube3a*) εμφανίζει μεγάλη ομολογία στο επίπεδο της πρωτεΐνης με το ανθρώπινο γονίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για οργανισμούς στους οποίους το γονίδιο αυτό είναι λειτουργικά συντηρημένο. Αυξημένη έκφραση του *dube3a* έχει παρατηρηθεί στο νευρικό σύστημα της δροσόφιλας, σε περιοχές υπεύθυνες για την μάθηση και τη μνήμη. Ανωμαλίες στο σχηματισμό των δενδριτών μπορεί να ενέχεται στην παθολογία του AS, δεδομένου ότι η πειραματική απενεργοποίηση του *dube3a* είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των δενδριτών των αισθητικών νευρώνων στο περιφερικό νευρικό σύστημα της δροσόφιλας [71, 72].

1.9 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ E6-AP ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Παθογενετικοί μηχανισμοί, που έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης E6-AP ή και έλλειψη της πρωτεΐνης, είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση του συνδρόμου Angelman στον άνθρωπο. Η συσχέτιση της ελαττωματικής αυτής έκφρασης της E6-AP με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Πρωταρχικός σκοπός των ερευνών είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών- στόχων της E6-AP σχετικά με την δράση της σαν λιγάση της ουβικιτίνης. Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί πολλές πρωτεΐνες- στόχοι της E6- AP, μέχρι πρόσφατα δεν έχει δοθεί κάποιος μηχανισμός μέσω του οποίου οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου Angelman. Πρωτεΐνες στόχοι της E6-AP περιλαμβάνουν την HHR23A (human omologue of the yeast DNA repair protein RAD23), την Blk της Src οικογένειας τυροσινικών κινασών, τους υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και ανδρογόνων (AR), την AIB1 (συνεργατική πρωτεΐνη των πυρηνικών υποδοχέων), την αννεξίνη A1 (Annexin A1) καθώς και την ίδια την πρωτεΐνη E6- AP, δεδομένου ότι η λιγάση της ουβικιτίνης μπορεί να στοχεύει τον εαυτό της για αποδιάταξη τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [67, 73-79]. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών αυτών από την E6- AP δεν εξηγεί την συμμετοχή της λιγάσης της ουβικιτίνης στην παθογένεια του συνδρόμου Angelman.

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη αποκαλύφθηκε ότι η έκφραση της E6- AP ρυθμίζεται από την συναπτική δραστηριότητα, μέσω της ενεργότητας της λιγάσης της ουβικιτίνης, συμμετέχοντας ενεργά στην αποδιάταξη της συναπτικής πρωτεΐνης Arc (Activity- Regulated Cytoskeleton- associated protein, MIM* 612461). Η απουσία της πρωτεΐνης E6- AP προκαλεί την συσσώρευση της πρωτεΐνης Arc στους νευρώνες, γεγονός που οδηγεί σε υπερβολική ενδοκύτωση των συναπτικών υποδοχέων AMPA και σε ελαττωματική συναπτική λειτουργία [80]. Η συναπτική δραστηριότητα ρυθμίζεται από πρωτεΐνες όπως η Arc, η παρουσία της οποίας ελέγχεται τοπικά και χρονικά από την E6- AP ως εξής: η συναπτική διέγερση από το γλουταμινικό οξύ ακολουθείται από παραγωγή της πρωτεΐνης Arc, η οποία

ελέγχει την συναπτική δραστηριότητα, περιορίζοντας την διέγερση μέσω της ενδοκύττωσης των AMPA υποδοχέων σε συγκεκριμένο χρόνο. Η έκφραση της πρωτεΐνης Arc και η παραμονή της στον συναπτικό χώρο, πρέπει να ρυθμίζεται ώστε να διατηρείται η φυσιολογική συναπτική λειτουργία. Στην μελέτη των *Greer και συνεργατών* (2010) αποκαλύπτεται ότι η μεταγραφή της E6- AP ξεκινάει αργότερα από την αντίστοιχη της Arc, και δρα σαν ρυθμιστής της συναπτικής δραστηριότητας, προκαλώντας την αποδιάταξη της Arc και κατά επέκταση την καταστολή της συναπτικής της δράσης. Πειραματόζωα στα οποία δεν εκφράζεται η E6- AP (knock- out) εμφανίζουν συσσώρευση της Arc στις συνάψεις, λιγότερους AMPA υποδοχείς και ελαττωματική συναπτική δραστηριότητα [80]. Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με την έρευνα των *Yashiro και συνεργατών*, οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η απουσία της E6- AP επηρεάζει την συναπτική πλαστικότητα και την ικανότητα των συνάψεων να εξελίσσονται και να αναπτύσσονται βάση προγενέστερων εμπειριών (experience – dependent synaptic plasticity) [81]. Οι *Greer και συνεργάτες*, προτείνουν ότι το σύνδρομο Angelman μπορεί να προκαλείται από την διακοπή κάποιας σημαντικής διαδικασίας στην ανάπτυξη των συνάψεων μέσω προγενέστερων εμπειριών και ότι το πρόγραμμα έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζεται από την νευρολογική δραστηριότητα ενδέχεται να σχετίζεται με την διανοητική και την γνωστική ανάπτυξη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι και άλλα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία της νευρολογικής ανάπτυξης, εμπλέκονται σε σύνδρομο με διανοητική καθυστέρηση, επιληψία και αυτιστικά χαρακτηριστικά (Slc9A6L-VSCC, RSK2, MeCP2, CBP, PDCH10 και DIA1) [82, 83].

Οι *Weeber και συνεργάτες* (2003), σε αντίστοιχη μελέτη με Ube3a- null πειραματόζωα, αναφέρουν την συμμετοχή της πρωτεΐνης CaMKII (calcium/ calmodulin- dependent protein kinase II) στην παθογένεια του συνδρόμου Angelman. Προτείνουν ότι η μειωμένη δραστηριότητα της CaMKII στην περιοχή του ιπποκάμπου, φαίνεται να παίζει ρόλο στην μειωμένη συναπτική πλαστικότητα, όπως επίσης και στα προβλήματα μάθησης και μνήμης, που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα πειραματόζωα- μοντέλα του συνδρόμου Angelman [84].

Εκτός από την συμμετοχή της E6-AP στο νευρικό σύστημα, μελέτες αναφέρουν μείωση της έκφρασης της σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και του προστάτη, η οποία φαίνεται να συχετίζεται με αυξημένη έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER) και των ανδρογόνων (AR) αντίστοιχα. Επίσης, *in vivo* πειράματα ενισχύουν την παραπάνω άποψη, τεκμηριώνοντας την αυξημένη έκφραση των υποδοχέων ER και AR στο μαστό και τον προστάτη σε E6- AP null ποντίκια [67, 85].

1.10 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του συνδρόμου Angelman μέχρι σήμερα είναι συμπτωματική. Αφορά κυρίως την αντιμετώπιση των σπασμών με φαρμακευτική αγωγή, καθώς και φυσιοθεραπευτικές και λογοθεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των κινητικών προβλημάτων (αταξικό βάδισμα) και των διαταραχών του λόγου. Οι μελέτες των *Greer και συνεργατών* (2010) και των *Van Woerden και συνεργατών* (2007) προτείνουν δύο πιθανούς τρόπους θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με σύνδρομο Angelman. Οι *Greer και συνεργάτες*, βάση των παρατηρήσεών τους ότι βλάβη στο γονίδιο UBE3A σχετίζεται με ελλατωματική έκφραση των υποδοχέων AMPAR στις συνάψεις, προτείνουν ότι η αύξηση της γονιδιακή έκφρασης των υποδοχέων αυτών, θα μπορούσε να αντιστρέψει τα συμπτώματα στους ασθενείς με σύνδρομο Angelman [80]. Οι *Van Woerden και συνεργάτες* (2007), αναφέρουν την επιδιόρθωση των νευρολογικών συμπτωμάτων σε UBE3A knock – out ποντίκια, με την μείωση της φωσφορυλίωσης της CaMKII πρωτεΐνης και αύξηση της δραστικότητάς της [86].

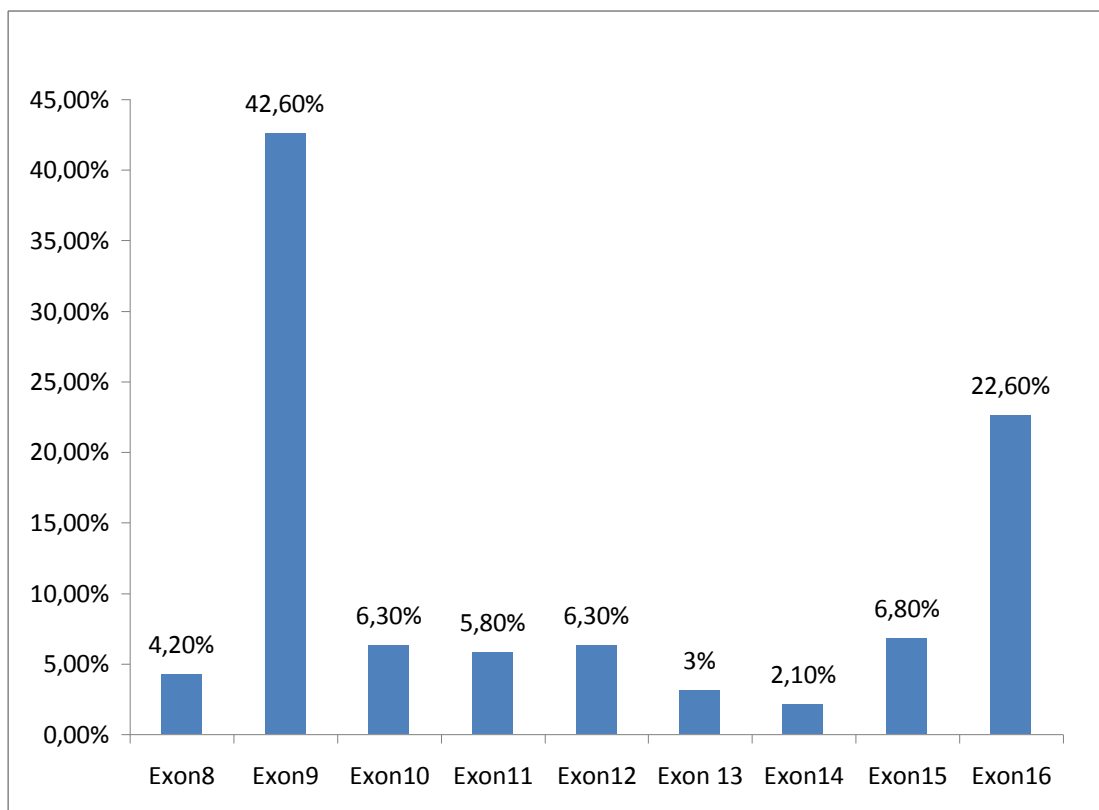
1.11 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN

Οι πρώτες αναφορές παθολογικών μεταλλάξεων στο γονίδιο UBE3A σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman, έγιναν το 1997 από τους *Kishino και συνεργάτες* και *Matsuura και συνεργάτες*. Πρόκειται για ένα *de novo* διπλασιασμό 5 νουκλεοτιδίων- μία μετάλλαξη που μεταβιβάσθηκε από το μητρικό αλληλόμορφο και αφορά θέση ματίσματος εξωνίων (splice site

mutation)- και μία *de novo* αντικατάσταση αμινοξέος [38, 56]. Οι δύο μεταλλάξεις οδηγούν στην αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της κωδικοποιούσα περιοχής (ORF) της πρωτεΐνης E6-AP και σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Μέχρι σήμερα, στην βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί 66 διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, οι οποίες έχουν ανιχνευθεί σε περισσότερους από 100 ασθενείς με σύνδρομο Angelman (Πίνακας 1.11.1). Εκτός από τις μεταλλάξεις που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, υπάρχουν και μεταλλάξεις οι οποίες είναι καταχωρημένες μόνο στην βάση δεδομένων LOVD (Leiden Open Variation Database, www.lovd.nl) του Πανεπιστημίου του Leiden. Η βάση δεδομένων LOVD περιέχει 163 μοναδικές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, από τις οποίες οι 17 θεωρούνται σιωπηλές αλλαγές, δεδομένου ότι δεν φαίνεται να προκαλούν αλλαγή στην δομή και την λειτουργία της πρωτεΐνης ενώ ένας μικρός αριθμός μεταλλάξεων δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί.

Οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, αφορούν κυρίως την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου (εξώνια 8- 16) , ενώ έχουν βρεθεί κάποιες μεταλλάξεις και σε ιντρονικές περιοχές, κυρίως κοντά στα σημεία ματίσματος (splice acceptor/ donor sites). Το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων έχει εντοπιστεί στα εξώνια 9 (43%) και 16 (23%), τα οποία τείνουν να χαρακτηριστούν «*hot spots*» (Εικ. 1.11.1). Το εξώνιο 9 είναι το μεγαλύτερο εξώνιο του γονιδίου καλύπτοντας περισσότερο από 50% της συνολικής κωδικοποιούσας περιοχής (1247bp). Στο μικρό εξώνιο 7, το οποίο περιλαμβάνει το δινουκλεοτίδιο AT της τριπλέτας έναρξης της μεταγραφής (ATG), δεν έχει βρεθεί καμία μετάλλαξη [87-91]. Επίσης, δεν έχει εντοπιστεί καμία μετάλλαξη στα εξώνια 4 και 5 του 5' άκρου του γονιδίου, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί υποκινητής του γονιδίου *UBE3A* [87, 89, 90, 92].



Εικόνα 1.11.1 Συχνότητα μεταλλάξεων σε κάθε εξώνιο του γονιδίου *UBE3A* (Συνδυαστικά αποτελέσματα από την βιβλιογραφία, την βάση δεδομένων LOVD και προσωπική επικοινωνία).

Οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα στο γονίδιο *UBE3A* αφορούν ετερόζυγες μεταλλάξεις αντικατάστασης, ελλείμματος, ένθεσης, διπλασιασμού, αναστροφής βάσεων ή και σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις συνδυασμό των παραπάνω. Η πλειοψηφία αυτών (περίπου 68%, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 1.11.1), αφορά πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές (frameshift mutations), οι οποίες αλλάζουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης της πρωτεΐνοσύνθεσης και την παραγωγή κολοβής (truncated) πρωτεΐνης. Τέσσερις μεταλλάξεις από αυτές αφορούν στα σημεία ματίσματος (splice sites), προκαλώντας και πάλι την παραγωγή κολοβής πρωτεΐνης.

Ποσοστό ίσο με 12% των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευθεί στο γονίδιο *UBE3A* αφορούν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations), στις οποίες η αλλαγή ενός αμινοξέος επηρεάζει την λειτουργία του πρωτεϊνικού προϊόντος, ενώ 15% των σημειακών αλλαγών αφορούν ανερμηνεύσιμες

μεταλλάξεις (nonsense mutations) που έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόωρη λήξη της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Επίσης, έχουν αναφερθεί δύο περιπτώσεις στις οποίες έλλειμμα τριών (c.2346del3) και δώδεκα (c.2269del12) νουκλεοτιδίων προκαλούν την απώλεια ενός (F782Δ) και τεσσάρων (YTRD757Δ) αμινοξέων, αντίστοιχα [88, 92, 93]. Οι *Boyes L. και συνεργάτες*, αναφέρουν την έλλειψη ολόκληρης της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου *UBE3A* (εξώνια 8- 16) σε δύο αδέρφια με σύνδρομο Angelman, ενώ έλλειψη μεγέθους 570kb, η οποία περιλαμβάνει ολόκληρο το γονίδιο, έχει εντοπιστεί σε έναν ασθενή με σύνδρομο Angelman [94, 95].

Σύμφωνα με τα δεδομένα της βάσης LOVD, οι σημειακές μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *UBE3A* αφορούν στο μεγαλύτερο ποσοστό αντικαταστάσεις και ελλείμματα βάσεων (40% και 40% αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν οι διπλασιασμοί (13%), οι ενθέσεις (6%) και συνδυασμός ένθεσης / ελλείματος βάσεων (2%).

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Πίνακα 1.11.1 (Παράρτημα), που αντιπροσωπεύουν την διεθνή βιβλιογραφία μέχρι σήμερα, ποσοστό ίσο με 55% των σημειακών μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *UBE3A*, αφορούν οικογενείς (familial) περιπτώσεις, στις οποίες η μετάλλαξη κληρονομείται από την μητέρα και μπορεί να υπάρχουν ένα ή και περισσότερα προσβεβλημένα μέλη στην οικογένεια. Η μητέρα- φορέας της μετάλλαξης, δεν εκδηλώνει τον φαινότυπο του συνδρόμου Angelman, επειδή η μετάλλαξη βρίσκεται στο πατρικό της αλληλόμορφο. Ποσοστό ίσο με 45% των μεταλλάξεων αφορούν σποραδικές περιπτώσεις, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί *de novo* στο μητρικό αλληλόμορφο του πάσχοντος ατόμου. Τέλος, υπάρχουν και κάποιες σημαντικές αναφορές για την ύπαρξη μωσαϊκισμού (σωματικού ή γαμετικού) σε μητέρες παιδιών με σύνδρομο Angelman [89-91, 96].

Η συντριπτική πλειοψηφία (83%) των μεταλλάξεων που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *UBE3A* προκαλούν πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης και έχουν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μη λειτουργικού πρωτεϊνικού

προϊόντος δεδομένου ότι επηρεάζεται η καταλυτική περιοχή HECT (350 καρβόξυ- τελικά αμινοξέα) της πρωτεΐνης E6- AP.

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες προσδιορισμού της επίδρασης γνωστών μεταλλάξεων στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, οι οποίες επαληθεύουν τα αποτελέσματα σχετικά με τις λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης E6-AP [55]. Έχει προσδιοριστεί η δραστικότητα της λιγάσης της ουβικιτίνης (E6- AP) σε ετερόζυγες μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή ενός κωδικονίου (missense mutations), και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την δημιουργία μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος, λόγω της επίδρασης στην κρίσιμη περιοχή HECT και την ανικανότητα δημιουργίας θειοεστέρα μεταξύ του συντηρημένου αμινοξέος κυστεΐνη (αα820) και του μορίου της ουβικιτίνης. Συνεπώς, οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα ένζυμα E2 του μονοπατιού ουβικιτίνης- πρωτεασώματος. Σε κάποιες περιπτώσεις ελαττωματικής πρωτεΐνης E6-AP, λόγω ύπαρξης σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο UBE3A, η μείωση ή η απώλεια της δραστικότητας της πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται και σε άλλες αιτίες. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της μετάλλαξης C21Y, η ελαττωματική δραστικότητα της πρωτεΐνης, σύμφωνα με μελέτες έκφρασης, φαίνεται να οφείλεται στην ασταθή μορφή της και του μικρού χρόνου ημιζωής της. Επίσης, πρωτεϊνικά προϊόντα που προκύπτουν από μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου, οι οποίες δεν επηρεάζουν την περιοχή HECT, μπορεί να είναι μη λειτουργικά ως προς την αλληλεπίδραση τους με την ουβικιτίνη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μελέτες έκφρασης προσδιορίζουν την διαταραχή των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με την περιοχή HECT ως υπεύθυνη για την δυσλειτουργία της πρωτεΐνης.

1.12 ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN

1.12.1 ΓΟΝΙΔΙΟ *CDKL5* (MIM*300203)

Το γονίδιο *CDKL5* βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (Χρ22), και κωδικοποιεί για μία φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών Ser/ Thre. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKL5* έχουν συσχετισθεί με το σύνδρομο X- linked infantile spasm 2 (ISSX2, MIM#300672), γνωστό επίσης και ως X- linked West syndrome, με το σύνδρομο Rett, καθώς και με μη τυπικό σύνδρομο Angelman ή με ασθενείς με αλληλεπικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε σύνδρομο Angelman ή / και Rett [97-100]. Ειδικά για την συμμετοχή του γονιδίου *CDKL5* στην παθογένεια του συνδρόμου Rett, μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *CDKL5* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη *MECP2*, τόσο in vitro όσο και in vivo, και ότι η πρωτεΐνη *CDKL5* μεσολαβεί στην φωσφορίωση της πρωτεΐνης *MECP2* [101].

1.12.2 ΓΟΝΙΔΙΟ *SLC9A6* (MIM*300231)

Το γονίδιο *SLC9A6* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ανταλλαγής Na(+)/ H(+) η οποία εντοπίζεται στα ενδοσώματα , και φαίνεται να συμμετέχει στην ρύθμιση του pH. Μεταλλάξεις στο *SLC9A6* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με Christianson type X- linked syndromic mental retardation (MIM#300243), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μικροκεφαλία, επιληψία, αταξία, διαταραχές στην ομιλία και συχνά παραπέμπουν στο σύνδρομο Angelman. Συγκεκριμένη μελέτη υποστηρίζει ότι μεταλλάξεις στο *SLC9A6* είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση διανοητικής καθυστέρησης που συνδέεται με το χρωμόσωμα X, ενώ προτείνει ότι άρρεν άτομα με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman, χωρίς επιβεβαιωμένη μοριακή βλάβη, είναι υποψήφια για έλεγχο στο γονίδιο *SLC9A6* [82].

1.12.3 ΓΟΝΙΔΙΟ *TCF4* (MIM*602272)

Το γονίδιο *TCF4* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας των E- πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται στην περιοχή E- box του DNA. Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν συσχετισθεί με το σύνδρομο Pitt- Hopkins (PTHS, MIM#610954) το οποίο εκδηλώνεται με σοβαρή διανοητική καθυστέρηση και κάποια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (μεγάλο στόμα) τα οποία εμφανίζονται και στο σύνδρομο Angelman. Πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι στη διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Angelman θα πρέπει να περιλαμβάνετε και το σύνδρομο Pitt- Hopkins. Η άποψη αυτή ενισχύεται με τα αποτελέσματα της έρευνας, στην οποία το 2% των ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman που ελέγχθηκαν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TCF4* [102].

1.12.4 ΓΟΝΙΔΙΟ *ATP10A* (MIM*605855)

Το γονίδιο *ATP10A* κωδικοποιεί μία ATPάση, που πιθανόν συμμετέχει στην μεταφορά Ca ή φωσφολιπιδίων και εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11- q13, σε απόσταση 200kb δεξιά από το γονίδιο *UBE3A* [103, 104]. Το *Atp10a* έχει το ίδιο πρότυπο έκφρασης όπως και το *Ube3a*, και εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (ιππόκαμπος και οσφρητικός βολβός) [105]. Το γεγονός ότι το γονίδιο *ATP10A* δεν εκφράζεται σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman που φέρουν ελλείμματα στην 15q11- q13 περιοχή του μητρικού αλληλομόρφου ή μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, σε συνδυασμό με την ομοιότητα στο πρότυπο έκφρασης με γονίδιο *UBE3A*, καθιστά το *ATP10A* πιθανό υπεύθυνο γονίδιο για νευρολογικές διαταραχές όπως ο αυτισμός και το σύνδρομο Angelman [103, 105]. Μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων στο *ATP10A* σε ασθενείς με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman.

1.13 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ANGELMAN

Η διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Angelman θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής σύνδρομα:

1. Σύνδρομο Rett, 2. Αταξική σπαστική τετραπληγία, 3. Σύνδρομο φυλοσύνδετης α- μεσογειακής αναιμίας με πνευματική καθυστέρηση (X-linked α- thalassemia/ mental retardation syndrome, ATR-X), 4. Σύνδρομο Mowat- Wilson και 5. Σύνδρομο ελλείμματος στην χρωμοσωμική περιοχή 22q13 (Phelan- McDermid Syndrome) [15].

1.13.1 ΣΥΝΔΡΟΜΟ RETT (MIM# 312750)

Ένα ποσοστό ασθενών με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Angelman, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *MECP2* (MIM*300005), επιβεβαιώνοντας την διάγνωση του συνδρόμου Rett [106]. Διπλασιασμός της περιοχής Xq28, ο οποίος περιλαμβάνει και το γονίδιο *MECP2*, έχει εντοπιστεί σε άρρεν ασθενείς με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman [107]. Το γονίδιο *MECP2* κωδικοποιεί την methyl- CpG binding πρωτεΐνη, η οποία καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Το σύνδρομο Rett χαρακτηρίζεται από οπισθοδρόμηση και απώλεια αποκτημένων δεξιοτήτων, μικροκεφαλία, αταξία και απώλεια των σκόπιμων κινήσεων των χεριών.

1.13.2 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΗΣ Α- ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ ΜΕ ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ (MIM# 301040)

Το σύνδρομο ATR-X προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *XNP* (MIM*300032) του χρωμοσώματος X (Xq13). Οι ασθενείς εμφανίζουν βαριά πνευματική καθυστέρηση με απουσία λόγου και σπασμούς.

1.13.3 ΣΥΝΔΡΟΜΟ MOWAT- WILSON (MIM# 235730)

Το σύνδρομο Mowat- Wilson προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *ZFX1B* (*ZEB2*, MIM*605802) το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 (2q22). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, η σοβαρή διανοητική καθυστέρηση, η μικροκεφαλία και οι σπασμοί παραπέμπουν στα αντίστοιχα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σύνδρομο Angelman [108].

1.13.4 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Χρωμοσωμικά μικροελλείμματα εμφανίζονται σε ασθενείς με ένα ευρύ φάσμα κλινικών χαρακτηριστικών, που μοιάζουν με τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman. Τα πιο συνήθη από αυτά εντοπίζονται στην υποτελομεριδιακή περιοχή 1p36, στην 17q21 και στην 22q13 χρωμοσωμική περιοχή. Οι ασθενείς με έλλειμμα στην περιοχή 22q13 παρουσιάζουν αναπτυξιακή καθυστέρηση, ήπια έως βαριά διανοητική καθυστέρηση, διαταραχές λόγου και δυσμορφικά χαρακτηριστικά [109]. Επίσης, μικροελλείμματα στην περιοχή 2q23.1 έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με αταξία, σπασμούς και προβλήματα ύπνου [110].

Η εφαρμογή συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (Comparative Genomic Hybridization, CGH) κρίνεται ολοένα και πιο σημαντική για την αποκάλυψη παρόμοιων χρωμοσωμικών μικροελλειμμάτων σε ασθενείς με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman και αρνητικό μοριακό έλεγχο.

2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η διαγνωστική προσέγγιση παιδιών με κλινικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν στο σύνδρομο Angelman καταλήγει σε ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων αρνητική, αδυνατώντας έτσι να βοηθήσει στην καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση του προβλήματος καθώς και στην παροχή γενετικής συμβουλευτικής σε οικογένειες με πάσχον μέλος. Η εργαστηριακή διαγνωστική προσέγγιση ασθενών που παραπέμπονται για σύνδρομο Angelman περιλαμβάνει αρχικά την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13 για την αποκάλυψη ελλειμμάτων, μονογονεϊκής δισωμίας ή βλαβών στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης. Η μελέτη της περιοχής αυτής έχει πλέον επικεντρωθεί στο γονίδιο UBE3A το οποίο βρίσκεται εντός της 15q11-q13 περιοχής, και σύμφωνα με μελέτες είναι το υπεύθυνο γονίδιο για το σύνδρομο Angelman. Η μοριακή μελέτη του γονιδίου περιλαμβάνει μεθόδους διαλογής ώστε να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις στα 16 εξώνια της κωδικής του περιοχής, καθώς και ανάλυση της πρωτοταγούς δομής (sequencing) ώστε να χαρακτηριστούν οι σημειακές αλλαγές.

Στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, έχουν συγκεντρωθεί περιστατικά ασθενών που έχουν παραπεμφθεί για έλεγχο συνδρόμου Angelman και έχουν αρνητικά αποτελέσματα από την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης της περιοχής 15q11- q13.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

- Η εφαρμογή και αξιολόγηση μίας καινούριας μεθόδου διαλογής (screening), για τον εντοπισμό πιθανόν μεταλλάξεων, η οποία εφαρμόζεται για πρώτη φορά για την μοριακή μελέτη του γονιδίου UBE3A. Μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι που απαιτούν ειδικό σχεδιασμό εκκινητών και συνθηκών (π.χ. η μέθοδος dHPLC) ή είναι χρονοβόρες και απαιτούν ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. DGGE και SSCP). Η εξεταζόμενη μέθοδος ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων μεθόδων διαλογής, και

σε αυτά εστιάζεται η προσπάθεια εφαρμογής της στην παρούσα μελέτη: στην αξιολόγηση καταρχήν της αξιοπιστίας της μεθόδου, το οποίο θα επιτευχθεί με την παράλληλη εφαρμογή και δεύτερης επιβεβαιωτικής μεθόδου, και κατ'επέκταση της δυνατότητας αντικατάστασης των χρονοβόρων και απαιτητικών μεθόδων, από την μέθοδο αυτή.

- Η μοριακή ανάλυση του γονιδίου UBE3A σε ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν στο σύνδρομο Angelman και με αρνητικό μοριακό έλεγχο για έλλειμμα, μονογονεϊκή δισωμία ή βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11- q13. Η ανίχνευση μίας μετάλλαξης στο γονίδιο UBE3A η οποία θα επιβεβαιώσει την κλινική εικόνα είναι πολύ σημαντική καταρχήν για την οικογένεια: η δυνατότητα παροχής γενετικής συμβουλευτικής και προγεννητικού ελέγχου σε μία οικογένεια με πάσχον μέλος, έχει ιδιαίτερη αξία για τον οικογενειακό προγραμματισμό όπως επίσης και για την παροχή βοήθειας και υποστήριξης στο πάσχον μέλος. Πέρα όμως από την προσφορά στην ίδια την οικογένεια, η μοριακή ανάλυση του γονιδίου έχει ιδιαίτερη ερευνητική αξία, δεδομένου ότι πλέον το γονίδιο UBE3A θεωρείται το υπεύθυνο γονίδιο για το σύνδρομο Angelman. Ο πίνακας με τις μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί στο γονίδιο UBE3A και οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση των κλινικών χαρακτηριστικών του συνδρόμου, συνεχώς μεγαλώνει, γεγονός το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ένα σπάνιο γενετικό νόσημα. Η συγκέντρωση γενετικών πληροφοριών για ένα κληρονομικό νόσημα με συχνότητα 1: 15.000 γεννήσεις κατά μέσο όρο, η οποία θα δώσει τη δυνατότητα τόσο για την μοριακή διάγνωση όσο και για προγεννητικό έλεγχο του συνδρόμου αυτού απαιτεί μεγάλο αριθμό περιστατικών με ακριβή κλινική εκτίμηση, κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με την παράλληλη μελέτη σε πολλά κέντρα γενετικής. Το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, ώντας κέντρο αναφοράς των γενετικών νοσημάτων στην Ελλάδα, διαθέτει το κατάλληλο υλικό για τέτοιου είδους μελέτη.

- Η σύγκριση φαινοτύπου- γονοτύπου, η οποία αποτελεί συνέχεια των παραπάνω, σχετικά με την συγκέντρωση γενετικής πληροφορίας και την δυνατότητα χρησιμοποίησης της για διαγνωστικούς ή προληπτικούς σκοπούς. Ασθενείς με σύνδρομο Angelman εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια κλινικών χαρακτηριστικών ανάλογα με την μοριακή βλάβη την οποία φέρουν. Μεγάλες έρευνες σύγκρισης φαινοτύπου – γονοτύπου έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την μοριακή βλάβη με συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Κάτι τέτοιο διευκολύνει την μοριακή προσέγγιση, δεδομένου ότι υπάρχουν και άλλα σύνδρομα τα οποία έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά με το σύνδρομο Angelman.

3. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν συνολικά 53 παιδιά, ηλικίας από 5 μηνών έως 18 ετών, με κοινό χαρακτηριστικό την ήπια έως σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση σε συνδυασμό με κάποια επιπλέον κλινικά στοιχεία που παραπέμπουν στο σύνδρομο Angelman. Η ολική εκτίμηση της κλινικής εικόνας έγινε από κλινικούς γενετιστές, παιδίατρους και παιδονευρολόγους οι οποίοι παρέπεμψαν τα παιδιά στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman.

Τα κύρια χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κλινική αξιολόγηση των ασθενών της μελέτης, περιλαμβάνουν:

- 1. Σοβαρή αναπτυξιακή και νοητική καθυστέρηση
- 2. Διαταραχές λόγου
- 3. Κινητικά προβλήματα και διαταραχή της ισορροπίας, η οποία συχνά εκδηλώνεται με αταξικό βάδισμα
- 4. Διαταραχές συμπεριφοράς, οι οποίες εκδηλώνονται με συχνά και αναίτια ξεσπάσματα γέλιου και χαρακτηριστικές αταξικές κινήσεις χεριών («*happy puppet*» syndrome)
- 5. Μικροκεφαλία
- 6. Σπασμοί, οι οποίοι εμφανίζονται συνήθως σε ηλικία μικρότερη των 3 ετών
- 7. Τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ), το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλά οξύαιχμα κύματα ή χαμηλού δυναμικού κύματα (Πίνακας 3.1) [3, 4].

Σε όλους τους ασθενείς της μελέτης πραγματοποιήθηκε αρχικά μοριακός έλεγχος του προτύπου μεθυλίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13, ο οποίος δεν αποκάλυψε παθολογικό πρότυπο αποκλείοντας έτσι την ύπαρξη ελλείμματος, πατρικής μονογονεϊκής δισωμίας ή βλάβης στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής.

Οι ασθενείς μπορούν να χωρισθούν σε δύο ομάδες : Α. Αυτούς στους οποίους είχε πραγματοποιηθεί ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) κατά τη διάρκεια της μοριακής ανάλυσης, και αποτελούν το 61% (28 από τους 46 ασθενείς) των παιδιών της μελέτης, και Β. αυτούς που δεν είχαν υποβληθεί σε ηλεκτροεγκεφαλογράφημα στο χρονικό διάστημα της μελέτης και περιλαμβάνουν 18 από τους 46 ασθενείς. Από τους ασθενείς της ομάδας Β, τρεις δεν είχαν αναλυτικό ιστορικό αλλά είχαν παραπεμφθεί για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας Α και Β δίνονται αναλυτικά στους Πίνακες 3.1α και 3.1β.

Πίνακας 3.1α Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας Α.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ									
	ΗΛΙΚΙΑ*	(ΒΑΡΙΑ) ΔΙΑΝΟΗΤΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΙΛΙΑ	ΑΤΑΞΙΑ/ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΧΑΡΟΥΜΕΝΗ ΔΙΑΘΕΣΗ	ΜΙΚΡΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΗΕΓ	ΣΠΑΣΜΟΙ	MRI/CT SCAN	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
AS1	2 ετών	ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Αδυναμία βάδισης/ Υπερτονία άκρων	ΚΦ	ΚΦ	+	+	Παθολογικά ευρήματα	+
AS2	15 μηνών	ΚΦ	ΔΑ	Αδυναμία βάδισης	ΚΦ	ΚΦ	+ (ενδεικτικό επιληψίας)	Νεογνικοί σπασμοί/ Σύνθετες εστιακές κρίσεις επιληψίας (ιστορικό μητέρας)	ΚΦ	ΚΦ
AS3	7 ετών	Βαρεία ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αδυναμία βάδισης	ΚΦ	ΚΦ	+	+ (από 7 μηνών)	Παθολογικά ευρήματα (ατροφία παρεγκεφαλίδας)	ΚΦ
AS4	6 ετών	ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Αταξία/ Αδυναμία βάδισης	+	ΚΦ	+	+	ΔΕ	+
AS5	18 ετών	Βαρεία ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	ΚΦ	+	ΚΦ	+	+ (από 5 ετών)	ΚΦ	ΚΦ
AS8	2 ετών	ΚΦ	ΚΦ	Αταξία	+	ΚΦ	ΚΦ	+ (από 2 μηνών)	ΚΦ	+
AS9	5 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Καθυστερήση βάδισης (3 ετών)/ Υπερκινητικότητα	+	ΚΦ	+	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ
AS14	5.5 ετών	Αυτιστικές τάσεις/ Έλλειψη βλεμματικής επαφής	Προβλήματα λόγου	Αταξικό βάδισμα/Στερεοτυπίες/ Βαρεία υποτονία	+	ΚΦ	ΚΦ	+(νεογνικοί σπασμοί)	+(βλάβη παρεγκεφαλίδας)	+

AS15	8 ετών	Ήπια ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Βραδυκινησία/ Αστάθεια	ΚΦ	ΚΦ	+(επιληπτόμορφη δραστηριότητα)	Επιληψία	ΔΕ	ΚΦ
AS16	10 ετών	Βαρεία ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Καθυστέρηση βάρδισης (6.5 ετών)/ Στερεότυπες κινήσεις/ Υπέρτονια	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS18	2.5 ετών	Βαρεία ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αδυναμία βάρδισης/ Στερεότυπες κινήσεις χεριών	+	ΚΦ	+	ΚΦ	ΚΦ	+
AS19	8 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Αυτιστικά στοιχεία	Έλλειψη ομιλίας	Υπερκινητικότητα	+	+	+	+(από 2 μηνών)	+(ατροφία εγκεφάλου)	+
AS21	11 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Αυτιστικά στοιχεία	ΔΑ	Καθυστέρηση βάρδισης/ Αταξικό βάρδισμα	ΚΦ	ΚΦ	Στην αρχή αποδιοργανωμένο, μετά ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS23	6 ετών	Νοητική υστέρηση	ΔΑ	Ήπια αταξία	+	ΚΦ	+	+	+(Μαγνητική υπερδιέγερση λευκής ουσίας)	ΚΦ
AS24	3 ετών	ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Αστάθεια κορμού	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	+(από νεογνό)	ΚΦ	ΚΦ
AS27	4 ετών	Διαταραχές συμπεριφορές	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	+(αιχμηρά στοιχεία στις μετωπιαίες περιοχές)	+(νεογνικοί σπασμοί)	+	ΚΦ
AS28	5 ετών	ΨΚΚ	Προβλήματα λόγου	Ήπιο αταξικό βάρδισμα/ Στερεότυπες κινήσεις στα άνω άκρα	ΚΦ	ΚΦ	+	+(μυοκλονικές κρίσεις)	ΔΕ	+
AS29	8ετών	ΨΚΚ/ Αυτιστικά	Περιορισμένη ικανότητα	Καθυστέρηση βάρδισης	+	ΚΦ	+	+(τρόμος στις λεπτές	ΚΦ	ΚΦ

		στοιχεία	ομιλίας					κινήσεις		
AS31	3 ετών	Ήπια ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αστάθεια	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	+ (σύνθετοι πυρετικοί σπασμοί από 13 μηνών)	ΚΦ	ΚΦ
AS32	3 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αταξικό βάδισμα	ΚΦ	ΚΦ	+ (ήπιες ανωμαλίες)	+(γενικευμένοι τονικοί σπασμοί από 6 μηνών)	ΚΦ	ΚΦ
AS33	13 ετών	Αυτιστικά στοιχεία			+	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	Πρόβλημα ακοής
AS34	12 μηνών	ΨΚΚ	ΔΑ	ΔΑ	ΚΦ	ΚΦ	+	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ
AS35	1.5 έτους	ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Περπατά με υποστήριξη	ΚΦ	+	ΚΦ	+	ΔΕ	+
AS40	5.5 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Κινητική καθυστέρηση	ΚΦ	+	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ
AS41		Ήπια ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα ομιλίας	Αταξικό βάδισμα	ΚΦ	+	+	+	ΚΦ	ΚΦ
AS42	16 μηνών	Σοβαρή ΨΚΚ	ΔΑ	Αστάθεια/ Αταξία/ Στερεότυπες κινήσεις χεριών	+ (;)	+	+	+	+ (ατροφία σκώληκος και ημισφαιρίων παρεγκεφαλίδας)	ΚΦ
AS45	3 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αταξικό βάδισμα	ΚΦ	ΚΦ	+ (ήπιες ανωμαλίες)	+ (από 6 μηνών)	ΚΦ	ΚΦ
AS49	4 ετών	ΨΚΚ	Διαταραχές λόγου	Αταξικό βάδισμα/ Αταξία άκρων	ΚΦ	+	+	+ (άτυπα αφαιρετικά επεισόδια/ στιγμιαία επεισόδια απώλειας τόνου)	+ (ανωριμότητα στη μυελίνωση)	ΔΑ

Πίνακας 3.1β Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας Β.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ									
	ΗΛΙΚΙΑ*	(ΒΑΡΙΑ) ΔΙΑΝΟΗΤΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΙΛΙΑ	ΑΤΑΞΙΑ/ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΧΑΡΟΥΜΕΝΗ ΔΙΑΘΕΣΗ	ΜΙΚΡΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΗΕΓ	ΣΠΑΣΜΟΙ	MRI/CT SCAN	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
AS6	6 ετών	Ήπια ΨΚΚ	Ήπια προβλήματα λόγου	Ήπια γενικευμένη υποτονία	+	+	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS7	3.5 ετών	ΨΚΚ	Καθυστερήση ομιλίας	Υπερκινητικότητα	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ
AS10	Ζητήθηκε για αποκλεισμό συνδρόμου Angelman									
AS11	2 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αδυναμία βάρδισης/ Στερεότυπες κινήσεις χεριών/ Αταξία	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS12	4 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Αυτιστικά στοιχεία	Καθυστερήση ομιλίας	ΚΦ	+	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS13	2 ετών	ΚΦ	Καθυστερήση ομιλίας	Καθυστερήση βάρδισης/ Υπερκινητικότητα	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS17	14 μηνών	ΨΚΚ	ΔΑ	ΔΑ	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	+ (ατελής μυελίνωση)	+
AS20	18 μηνών	ΨΚΚ/ Αυτιστικές τάσεις	ΚΦ	Αδυναμία βάρδισης/ Αταξία	+	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS22	2 ετών	ΨΚΚ	Περιορισμένη ικανότητα	Υποτονία/ Αταξία	+	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ

AS25	5.5 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Αυτιστικά στοιχεία	ομιλίας Έλλειψη ομιλίας	Στερεοτυπίες/ Υπερκινητικότητα	+	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS26	2 ετών	ΨΚΚ	ΔΑ	Αδυναμία βάδισης	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS30	3 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Αφηρημέ νο βλέμμα	Έλλειψη ομιλίας	Αδυναμία βάδισης/ Στερεότυπες κινήσεις χεριών	+	+	ΔΕ	+	+ (ατροφία εγκεφάλου)	+
AS37	3ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Κινητική καθυστέρηση	ΚΦ	+	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	ΚΦ
AS38	8 ετών	Βαρεία ΨΚΚ	Σοβαρή καθυστέρηση ομιλίας	Ήπια αταξία/ Υπέρτονια άκρων	+	+	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS39	Δεν υπάρχει διαθέσιμο ιστορικό- Παραπομπή για έλεγχο συνδρόμου									
AS43	5μηνών	ΚΦ	ΚΦ	Ελαφριά υπέρτονια	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ
AS44	2.5 ετών	ΨΚΚ/ Αυτισμό ς	ΔΑ	Γενικευμένη υποτονία	ΚΦ	+	ΔΕ	ΚΦ	+	ΚΦ
AS51	Δεν υπάρχει διαθέσιμο ιστορικό- Παραπομπή για έλεγχο συνδρόμου Angelman									

ΚΦ: Φυσιολογικά ευρήματα (κατά φύση) / +/++: Παθολογικά ευρήματα / ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε / ΔΑ: Δεν αναφέρεται / * Ηλικία κλινικής εκτίμησης

Με μπλε γραμματοσειρά σημειώνονται οι ασθενείς εκείνοι στους οποίους αναλύθηκε και το εξώνιο 7 του γονιδίου *UBE3A* (ομάδα Γ)

Τα κύρια χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης είναι η σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση (93%), το αταξικό βάδισμα (86%) καθώς και τα προβλήματα λόγου (70%) (Πίνακας 3.2). Από το σύνολο των ασθενών (53), οι 18 δεν είχαν υποβληθεί σε ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ), ενώ μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (MRI) ή αξονική τομογραφία (CT scan) είχε πραγματοποιηθεί σε 39 από τους 53 ασθενείς. Όλες οι οικογένειες της μελέτης, εκτός από μία οικογένεια με δίδυμα (ασθενείς AS42 και AS43) τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστικά AS, αφορούν σποραδικές περιπτώσεις. Επίσης, οι ασθενείς AS9, AS22 και AS29 έχουν γεννηθεί με Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.

Πίνακας 3.2 Η συχνότητα των κλινικών χαρακτηριστικών των ατόμων της μελέτης

Κλινικά χαρακτηριστικά	Αριθμός ασθενών [†]	Ποσοστό επί του συνόλου (43 άτομα)
Ψυχοκινητική καθυστέρηση	40/43	93%
Κινητικά προβλήματα/ Διαταραχές Ισοροπίας/ Αταξία	37/43	86%
Παθολογικό ΗΕΓ*	20/28	71%
Διαταραχές λόγου	30/43	70%
Σπασμοί	22/43	51%
Διαταραχές συμπεριφοράς (χαρούμενη διάθεση)	18/43	39%
Μικροκεφαλία	10/43	23%

[†]Στους 7 από τους 53 ασθενείς της μελέτης ανιχνεύθηκαν μοριακές βλάβες σε άλλα γονίδια και σε άλλες χρωμοσωμικές περιοχές, εκτός της 15q11-q13. Επίσης, σε 3 ασθενείς δεν υπήρχε ιατρικό ιστορικό. Τα παιδιά αυτά (10 από τα 53) δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση, επομένως ο αριθμός των ασθενών είναι 43.

* Η συχνότητα του παθολογικού ΗΕΓ αφορά τα άτομα εκείνα (ομάδα Α) τα οποία είχαν υποβληθεί σε ΗΕΓ πριν ή κατά τη διάρκεια της μοριακής μελέτης (βλέπε Πίνακα 3.1α).

Και στους 53 ασθενείς εφαρμόστηκε μοριακή μελέτη για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A*, όπου αναλύθηκαν τα εξώνια 8-16. Σε μία ομάδα 19 ασθενών (ομάδα Γ), αναλύθηκε επιπλέον το εξώνιο 7, το οποίο φέρει το δινουκλεοτίδιο AT της τριπλέτας έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης ATG (το νουκλεοτίδιο G είναι το πρώτο του εξωνίου 8)

(βλέπε Εικ. 4.7.1). Οι ασθενείς αυτοί σημειώνονται με μπλε γραμματοσειρά στους Πίνακες 3.1α, 3.1β και 3.3.

Ταυτόχρονα με την μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A*, στους ασθενείς AS50, AS52 και AS53 πραγματοποιήθηκε μοριακή μελέτη των γονιδίων *CDKL5* (AS50 και AS52) και *MECP2* (AS53), ενώ στους ασθενείς AS36, AS46, AS47 και AS48 πραγματοποιήθηκε μοριακή μελέτη με την χρήση DNA μικροσυστοιχιών και την μέθοδο του Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού (array- CGH) για την αποκάλυψη χρωμοσωμικών ελλειμμάτων ή διπλασιασμών. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών (Πίνακας 3.3) αρχικά έθεσαν την υποψία συνδρόμου Angelman, αλλά λόγω των αρνητικών ευρημάτων της μοριακής ανάλυσης της περιοχής 15q11- q13, ο μοριακός έλεγχος συνεχίστηκε και αποκάλυψε την ύπαρξη μοριακών διαταραχών σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Το σύνολο των παραπάνω ασθενών (7/53) αποκλείστηκε από την στατιστική ανάλυση που αφορά στην μοριακή μελέτη ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A*. Επίσης, στα στατιστικά αποτελέσματα δεν συμπεριλήφθηκαν οι τρεις ασθενείς για τους οποίους δεν υπήρχε ιατρικό ιστορικό. Συνεπώς, στη στατιστική ανάλυση της μελέτης ο συνολικός αριθμός των ασθενών είναι σαράντα τρεις (Πίνακας 3.2). Σημειώνεται ότι η μοριακή ανάλυση των γονιδίων *CDKL5* και *MECP2*, πραγματοποιήθηκε σε εργαστήρια του εξωτερικού (GENetic DIAgnostic network, GENDIA και Universitair Medisch Centrum, Utrecht, Department of Medical Genetics) ενώ ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (array- CGH) έγινε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η μοριακή ανάλυση των δύο γονιδίων (*CDKL5* και *MECP2*) πραγματοποιήθηκε με ανάλυση της πρωτοταγούς δομής (sequencing) των γονιδίων, και ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός έγινε με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων Agilent 244K arrays.

Στη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες δείγματα τα οποία έφεραν γνωστές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A* (Πίνακας 3.4), και τα οποία μας παραχωρήθηκαν από το Πανεπιστήμιο Erasmus, Rotterdam, Holland.

Για την περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση των νέων σημειακών αλλαγών που αποκαλύφθηκαν κατά τη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A*, αναλύθηκαν 100 διαφορετικά αλληλόμορφα από μία ομάδα 50 μη συγγενικών φυσιολογικών ατόμων.

Πίνακας 3.3 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μοριακά ευρήματα στα γονίδια CDKL5, MECP2 καθώς και σε άλλες χρωμοσωμικές θέσεις.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ									
	ΗΛΙΚΙΑ*	(ΒΑΡΙΑ) ΔΙΑΝΟΗΤΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΙΛΙΑ	ΑΤΑΞΙΑ/ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ	ΧΑΡΟΥΜΕΝΗ ΔΙΑΘΕΣΗ	ΜΙΚΡΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΗΕΓ	ΣΠΑΣΜΟΙ	MRI/CT SCAN	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ
AS36	5 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Έντονα αυτιστικά στοιχεία	Έλλειψη ομιλίας	Έντονη Υπερκινητικότητα	ΚΦ	ΚΦ	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	+
AS46	10 μηνών	Βαρεία ΨΚΚ	ΔΑ	Κεντρική υποτονία/ Περιφερειακή υπερτονία	ΚΦ	+	ΚΦ	+	ΚΦ	+
AS47	17 μηνών	Ήπια ΨΚΚ	ΔΑ	ΚΦ	ΚΦ	+	+	+	ΚΦ	+
AS48	6.5 ετών	Βαρεία ΨΚΚ/ Έντονα αυτιστικά στοιχεία	Έλλειψη ομιλίας	Αταξικό βάδισμα	ΚΦ	+	ΚΦ	+	ΚΦ	+(διεύρυνση υπαραχνοειδούς χώρου και κοιλιών)
AS50	2 ετών	ΨΚΚ (Χωρίς βλεμματική επαφή)	ΔΑ	Στερεότυπες κινήσεις χερών/Υποτονία	ΚΦ	+	ΔΕ	+	ΚΦ	ΔΑ
AS52	3 ετών	ΨΚΚ	Έλλειψη ομιλίας	Αδυναμία βάδισης	ΚΦ	+	ΔΕ	ΚΦ	+	+(καθυστερημένη μυελίνωση)
AS53	2 ετών	ΨΚΚ-Αυτιστικές τάσεις	Έλλειψη ομιλίας	Αταξικό βάδισμα/Υπερκινητικότητα	+	+	ΔΕ	ΚΦ	ΚΦ	Χαρούμενο προσωπίο

ΚΦ: Φυσιολογικά ευρήματα (κατά φύση) / +/++: Παθολογικά ευρήματα / ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε / ΔΑ: Δεν αναφέρεται / * Ηλικία κλινικής εκτίμησης

Με μπλε γραμματοσειρά σημειώνονται οι ασθενείς εκείνοι στους οποίους αναλύθηκε και το εξώνιο 7 του *UBE3A* γονιδίου (ομάδα Γ).

Πίνακας 3.4 Δείγματα με γνωστές σημειακές αλλαγές στο UBE3A γονίδιο (positive controls)

ΘΕΣΗ	ΣΗΜΕΙΑΚΗ ΑΛΛΑΓΗ*
Εξώνιο 9	c.532G>A
Εξώνιο 10	c.1636G>A
Εξώνιο 11	c.1739_1743dupCATCT
Εξώνιο 12	c.1900-12_1900-6delTCTGGTT
Εξώνιο 13	c.2182A>T
Εξώνιο 14	c.2240C>T
Εξώνιο 15	(c.2311G>A+)c.2318_2321delCATT
Εξώνιο 16	c.2480C>T

*Η αρίθμηση έχει γίνει σύμφωνα με την αλληλουχία GenBank X98032

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το δείγμα αίματος συλλέγεται σε ειδικό φιαλίδιο γενικής αίματος που περιέχει αντιπηκτικό (EDTA) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4° C για 48 ώρες. Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα QIAamp® DNA Blood Mini Kit της εταιρείας Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την απομόνωση γενωμικού DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος, απαιτεί αρχική ποσότητα δείγματος 200μl και αποδίδει 3-12μg DNA. Η διαδικασία απομόνωσης περιγράφεται παρακάτω. Το γενωμικό DNA που εκλύεται έχει μέγεθος μέχρι και 50kb (μεταξύ 20 – 30 kb) και διατηρείται σε θερμοκρασία 4° C για μικρό χρονικό διάστημα (μέχρι ένα χρόνο), ενώ για μεγάλα χρονικά διαστήματα διατηρείται στους -20° C.

4.1.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Μικροφυκόμετρο
- Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου
- Heat block

4.1.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Η ποσότητα και η καθαρότητα του δείγματος DNA υπολογίζεται με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του ποσού της υπεριώδους ακτινοβολίας που απορροφάται από τις βάσεις του DNA. Η συγκέντρωση του DNA κάθε δείγματος σε ng /ml υπολογίζεται από την τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD-optical density) στα 260 nm, με βάση τον τύπο:

$$C(\text{ng /ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{αραίωση του δείγματος}$$

ή

$$C(\mu\text{g/ ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 0.05 \times \text{αραίωση του δείγματος}$$

(Μία μονάδα OD_{260nm} αντιστοιχεί σε 50 $\mu g/ ml$ δίκλωνου DNA).

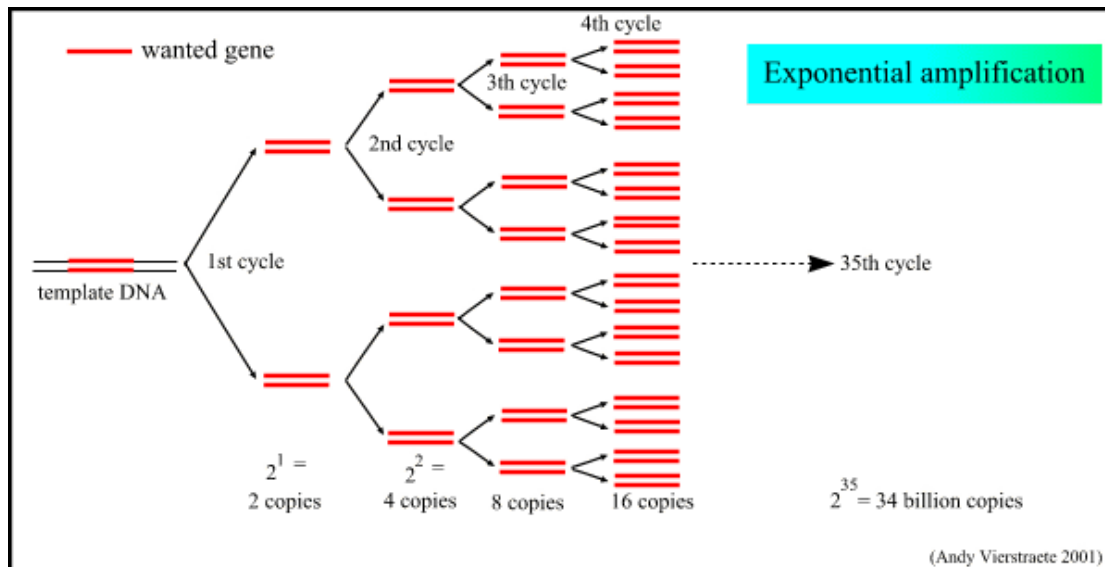
Η καθαρότητα του δείγματος ελέγχεται από τον λόγο OD_{260nm} / OD_{280nm} . Δείγματα με τιμή OD_{260nm} / OD_{280nm} μεταξύ 1,7 και 1,9 είναι καθαρά, δηλαδή απαλλαγμένα από πρωτεΐνες, αμινοξέα και οργανικούς διαλύτες, προσμείξεις που μπορούν να παρεμποδίσουν ενζυμικές αντιδράσεις (όπως την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τον αυτόματο αναλυτή Spectrophotometer, NanoDrop 1000, της εταιρείας Thermo Scientific. Ποσότητα ίση με 1 μl δείγματος προστίθεται σε ειδική υποδοχή του αναλυτή και η μέτρηση πραγματοποιείται αυτόματα. Τα αποτελέσματα εκτυπώνονται με μορφή καμπύλης ή πίνακα.

4.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (ή αλληλουχιών DNA) ανάμεσα από έναν ετερογενή πληθυσμό DNA (π.χ. ολικό γενωμικό DNA ή πληθυσμό cDNA), χωρίς την μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και δίνει τη δυνατότητα γρήγορης ανάλυσης ειδικών περιοχών DNA. Με την αντίδραση PCR παράγονται πολλαπλά αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, μεγέθους από 50 ως 2000 ζεύγη βάσεων, σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών. Λόγω της ανθεκτικότητας του ενζύμου πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR αντίδραση, η διαδικασία δημιουργίας αντιγράφων DNA μπορεί να επαναληφθεί μέχρι και 35 – 40 κύκλους, χωρίς την ανάγκη προσθήκης νέας ποσότητας ενζύμου. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας – στόχου. Έτσι, η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων γίνεται εκθετικά σε κάθε κύκλο, και μετά από 30 κύκλους, ο αριθμός αυτός υπολογίζεται σε 2^{30} , δηλαδή έχει αυξηθεί κατά 10^9 φορές. Με τον τρόπο αυτό,

η συγκέντρωση του συγκεκριμένου αντιγράφου είναι πολύ μεγάλη και, συγκριτικά με τις υπόλοιπες αλληλουχίες στο προϊόν της PCR αντίδρασης, μοναδικό, γεγονός που επιτρέπει την μελέτη του συγκεκριμένου αντιγράφου με μεθόδους όπως π.χ. ανάλυση της πρωτοδιάταξης (sequencing) (Εικ. 4.2.1)



Εικόνα 4.2.1 Η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων στο τέλος κάθε κύκλου της PCR αντίδρασης.

4.2.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής PCR (Εικ. 4.2.2)



Εικόνα 4.2.2 Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής PCR της εταιρείας Techne.

4.2.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή της μεθόδου, η οποία αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1987 από τον Mullis K. (βραβείο Νόμπελ Χημείας 1993) και τους συνεργάτες του, βασίζεται στην χρησιμοποίηση ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase). Το ένζυμο απομονώνεται από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* (το οποίο ανακαλύφθηκε από τον Brock TD, 1960) και είναι ανθεκτικό μέχρι και την θερμοκρασία των 94°C, με καλύτερη απόδοση στους 75- 80°C. Έχει χρόνο ημιζωής 9 λεπτά στους 97,5°C και μπορεί να συνθέσει αλυσίδα DNA μέχρι και 1000 ζεύγη βάσεων σε χρόνο λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα στους 72°C [111]. Η ανακάλυψη της Taq DNA πολυμεράσης αντικατέστησε την πολυμεράση της *Echerichia coli* που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε [112]. Μειονέκτημα της Taq πολυμεράσης είναι η έλλειψη ενεργότητας 3'- 5' εξωνουκλεάσης, γεγονός που μειώνει την πιστότητα της αντιγραφής [111]. Η συχνότητα λάθους της Taq πολυμεράσης έχει υπολογισθεί σε 1/ 9,000 νουκλεοτίδια [111]. Σήμερα, υπάρχουν DNA πολυμεράσες (Pfu DNA polymerases) με ενεργότητα 3'- 5' εξωνουκλεάσης, οι οποίες προσφέρουν υψηλής πιστότητας πολλαπλασιασμό του DNA. Οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA. Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (DNA primers), που παίζουν τον ρόλο εκκινήτων της σύνθεσης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Οι εκκινήτες έχουν μήκος 15-25 νουκλεοτίδια και είναι συμπληρωματικοί με τις δύο αντίθετες αλυσίδες του υποστρώματος DNA. Ο σχεδιασμός τους απαιτεί την γνώση μέρους της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και σχεδιάζονται έτσι ώστε σε κάθε αντίδραση να συντίθεται DNA σε κατεύθυνση προς τον αντίθετο εκκινήτη. Έτσι, το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί οριοθετείται από τους δύο εκκινήτες.

Με την παρουσία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, των εκκινήτων, του υποστρώματος και των κατάλληλων δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε ιδανικές συνθήκες, που εξασφαλίζονται από ποικίλους παράγοντες και περιγράφονται παρακάτω, αρχίζει η σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται για 20-40 κύκλους. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι κάθε σταδίου εξαρτώνται από τον τύπο της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται, την αλληλουχία και το μήκος των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (primers), το μήκος της αλληλουχίας- στόχου και τη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων της PCR.

Hot Start Taq DNA polymerase

Ένα αρχικό στάδιο ενεργοποίησης του ενζύμου είναι απαραίτητο όταν χρησιμοποιείται Hot Start Taq DNA πολυμεράση. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει θέρμανση στους 94- 96°C για 5-15 λεπτά. Οι *Hot Start Taq DNA* πολυμεράσες, είναι ανενεργές σε χαμηλές θερμοκρασίες, λόγω της παρουσίας ειδικών αναστολέων, οι οποίοι είναι ενωμένοι με το ένζυμο με ομοιοπολικό δεσμό και η αποδέσμευσή τους απαιτεί την επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες. Η χρήση των τέτοιων ενζύμων στην PCR αντίδραση ελαττώνει την πιθανότητα δημιουργίας μη ειδικών προϊόντων ή διμερών προϊόντων των εκκινητών (primer – dimer) τα οποία συνήθως δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Τα υπόλοιπα βασικά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνουν τα εξής:

1. Αποδιάταξη του υποστρώματος DNA (template denaturation)

Αρχικά το DNA αποδιατάσσεται σε μονές αλυσίδες με επώαση στους 93-97°C για 20- 30 δευτερόλεπτα. Στις θερμοκρασίες αυτές σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις συμπληρωματικές βάσεις του DNA.

2. Υβριδισμός των εκκινητών με την συμπληρωματική αλληλουχία στο DNA υπόστρωμα (primer annealing)

Κατά το δεύτερο στάδιο, οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές τους περιοχές στην αλληλουχία- στόχο. Ο υβριδισμός των εκκινητών με το υπόστρωμα πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 50- 65°C για 30

δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι καθοριστική για την επιτυχία της αντίδρασης και καθορίζεται αποκλειστικά από την σύσταση των νουκλεοτιδίων των εκκινητών. Η DNA πολυμεράση αλληλεπιδρά με την περιοχή πρόσδεσης του εκκινητή και ξεκινάει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA.

3. Επέκταση των υβριδισμένων εκκινητών (primer extension) και επιμήκυνση της αλυσίδας – στόχου (elongation)

Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA με επέκταση των υβριδισμένων εκκινητών. Η θερμοκρασία στο στάδιο αυτό εξαρτάται από το είδος του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Συνήθως, η σύνθεση με Taq πολυμεράση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 70 - 75⁰C. Η διάρκεια της σύνθεσης εξαρτάται τόσο από το είδος του ενζύμου όσο και από το μέγεθος της αλληλουχίας- στόχου. Θεωρητικά, η DNA πολυμεράση, σε ιδανικές συνθήκες, πολυμερίζει 1000 βάσεις/ λεπτό. Πρακτικά, το στάδιο αυτό έχει διάρκεια 30 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά.

Κάτω από ιδανικές συνθήκες, στο τέλος κάθε σταδίου επέκτασης/ επιμήκυνσης έχει διπλασιαστεί η αλληλουχία – στόχος και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποτελούν εκ νέου υπόστρωμα για τη σύνθεση DNA (αλυσιδωτή αντίδραση).

Τέλος, πραγματοποιείται ένα ενιαίο στάδιο επιμήκυνσης, συνήθως στους 70-74⁰C για 5- 15 λεπτά, κατά το οποίο εξασφαλίζεται η ολοκλήρωση πολυμερισμού όλων των αλληλουχιών- στόχων.

4.2.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια για την επιτυχή αντίδραση πολλαπλασιασμού. Η ειδικότητα με την οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας DNA, εξαρτάται από την «ικανότητα» των εκκινητών να αναγνωρίσουν και να προσδεθούν στην επιθυμητή αλληλουχία για την οποία έχουν σχεδιαστεί. Οι μεταβλητές οι οποίες πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό των εκκινητών, είναι οι εξής:

- *Μήκος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών):* Γενικά, ολιγονουκλεοτίδια με μήκος 18- 24 βάσεις είναι ειδικά ως προς την πρόσδεσή τους στην αλληλουχία στόχο. Για πολύπλοκες πηγές DNA (όπως ολικό γενωμικό DNA), ένα μέσο μήκος εκκινητών είναι περίπου 20 βάσεις.
- *Σύσταση των βάσεων:* Πρέπει να αποφεύγονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μειώνουν δραστικά την ειδικότητα του υβριδισμού των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχο. Η σύσταση των βάσεων των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 45- 55% στα νουκλεοτίδια GC. Η σύσταση των βάσεων ρυθμίζει τη θερμοκρασία τήξης T_m που υπολογίζεται με βάση τον τύπο: $T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$. Ο προσεκτικός υπολογισμός της θερμοκρασίας T_m είναι σημαντικός, δεδομένου ότι από αυτή καθορίζεται η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (annealing temperature) σύμφωνα με τη σχέση $T_m - 5$ °C. Σημειώνεται ότι η θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών θα πρέπει να είναι παρόμοια, έτσι ώστε να μην υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις κατά τον υπολογισμό της θερμοκρασίας υβριδισμού.
- *Η χαμηλή συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ των δύο εκκινητών, ιδιαίτερα στο 3' άκρο, αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιτυχίας της αντίδρασης, εφόσον έτσι μειώνεται η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ των δύο εκκινητών (primer dimer formation).*

4.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεθόδου PCR, τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, η βασική δομική μονάδα του οποίου είναι η αγαροβιόζη (agarobiose). Η αγαροβιόζη αποτελείται από από D-γαλακτόζη και ομάδες 3, 6- άνυδρο – L – γαλακτόζης. Είναι συστατικό του άγαρ, το οποίο λαμβάνεται

κυρίως από ροδοφύκη των γενών *Gracilaria* και *Gelidium* και *Pterocladia*. Έχει την τάση να σχηματίζει πηκτώματα, γεγονός το οποίο οφείλεται στην δημιουργία διπλής έλικας σε τμήματα του μορίου της . Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα δίκτυο που περιέχει δεσμευμένο νερό. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TBE 1X) μαζί με ειδική χρωστική (loading dye). Η χρωστική που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, δεδομένου ότι ηλεκτροφορούνται με την ίδια ταχύτητα με συγκεκριμένου μήκους μόρια DNA. Κατά τον διαχωρισμό βάνονται με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr, C₂₁H₂₀BrN₃), το οποίο έχει την ικανότητα πρόσδεσης μεταξύ των βάσεων του DNA. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για να είναι δυνατή η αξιολόγηση του προϊόντος ηλεκτροφορείται παράλληλα και ένα μείγμα θραυσμάτων DNA γνωστού μεγέθους (κλίμακα μεγέθους) . Ο βασικός παράγοντας της ηλεκτροφορητικής ικανότητας ενός μορίου DNA είναι το μέγεθός του. Μικρότερα μόρια DNA ηλεκτροφορούνται με μικρότερη ταχύτητα. Αύξηση της συγκέντρωσης της αγαρόζης στο πήκτωμα μειώνει την ταχύτητα ηλεκτροφόρησης και εξυπηρετεί τον διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA. Συνήθως πηκτώματα αγαρόζης 2% είναι κατάλληλα για διαχωρισμό μικρών μορίων DNA (Πίνακας 4.2.1). Αύξηση της ηλεκτρικής τάσης της ηλεκτροφόρησης προκαλεί πιο γρήγορο διαχωρισμό των μορίων DNA στο πήκτωμα. Όμως, περιοριστικός παράγοντας για την αύξηση της τάσης είναι η μείωση της ευκρίνειας των διαχωριζόμενων μορίων (για τάσεις μεγαλύτερες από 5- 8Volt/cm)

Πίνακας 4.2.1 Αντιστοιχία συγκέντρωσης πηκτώματος αγαρόζης και ευκρίνειας DNA.

Συγκέντρωση πηκτώματος αγαρόζης (g/100mL)	Βέλτιστη ευκρίνεια DNA (Kb)
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-10
1,2	0,4-7
1,5	0,2-3
0,2	0,2- 1

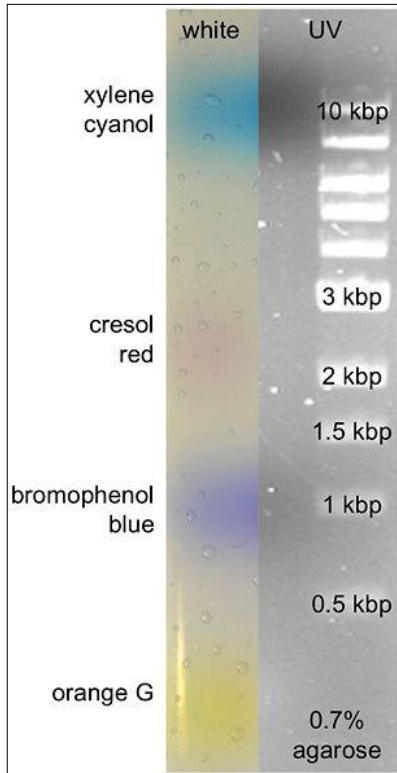
Στοιχεία από : <http://openwetware.org/>

4.2.5 ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Συνήθεις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση DNA είναι το μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue, $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) και το κυανό του ξυλενίου (Xylene Cyanol, $C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$), οι οποίες ηλεκτροφορούνται με την ίδια ταχύτητα όπως μόρια DNA μεγέθους περίπου 300bp και 5000bp αντίστοιχα, ανάλογα πάντα με το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης και την συγκέντρωση του πηκτώματος αγαρόζης (Εικ.4.2.3). Γενικά, σε ηλεκτροφόρηση με 1% πήκτωμα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ή TAE, το μπλε της βρωμοφαινόλης διαχωρίζεται όπως ένα μόριο DNA περίπου 500bp, ενώ αντίστοιχα το κυανό του ξυλενίου στις 4000bp. Για διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA χρησιμοποιούνται εναλλακτικά οι χρωστικές Cresol Red ($C_{21}H_{17}NaO_5S$) και Orange G ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$), οι οποίες ηλεκτροφορούνται με ταχύτητα περίπου 125bp και 50bp αντίστοιχα σε 1% πήκτωμα αγαρόζης. Στον Πίνακα 4.2.2, δίνονται τα μεγέθη των μορίων DNA στις θέσεις των οποίων ηλεκτροφορούνται οι χρωστικές Bromophenol Blue και Xylene Cyanol. Η Bromophenol Blue παρά το μεγαλύτερο μοριακό της βάρος (670g/mol) ηλεκτροφορείται πιο γρήγορα από την Xylene Cyanol (539g/mol), λόγω του μεγαλύτερου αρνητικού της φορτίου.

Πίνακας 4.2.2 Αντιστοιχία ηλεκτροφορητικής ικανότητας των χρωστικών *Bromophenol Blue* και *Xylene Cyanol* και συγκέντρωσης πηκτώματος αγαρόζης

Χρωστική	Ηλεκτροφόρηση βάση μορίου DNA συγκεκριμένου μήκους (bp)	% πήκτωμα αγαρόζης
<i>Bromophenol Blue</i>	1,000	0,7
	500	1
	150	2
	50	3
<i>Xylene Cyanol</i>	10,000	0,7
	4,000	1,5
	750	2
	200	3



Εικόνα 4.2.3 Ηλεκτροφορητική ικανότητα των τεσσάρων χρωστικών σε 0,7% πηκτώματος αγαρόζης.

4.2.6 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι τα εξής: Tris/ Acetate/ EDTA (TAE) και Tris/ Borate/ EDTA (TBE). Το EDTA χρησιμοποιείται σαν προστατευτικός παράγοντας της ενζυματικής υδρόλυσης του DNA, δεσμεύοντας τα ιόντα Mg^{++} . Και τα δύο ρυθμιστικά διαλύματα δημιουργούν βασικές συνθήκες στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης (pH 8), και διατηρούν το DNA σε διαλυτή μορφή. Το TAE έχει πλεονέκτημα σχετικά με την επανέκλυση του DNA μετά την ηλεκτροφόρηση και χρησιμοποίησή του σε ενζυμικές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα την κλωνοποίηση του DNA. Αντίθετα, το βορικό οξύ που περιέχει το TBE δρα σαν αναστολέας ή παρεμποδιστής πολλών ενζύμων, οπότε η χρησιμοποίηση μορίων DNA που έχουν ηλεκτροφορηθεί σε διάλυμα TBE δεν ενδείκνυται. Η αναλογίες των συστατικών των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων δίνονται στον Πίνακα 4.2.3.

Πίνακας 4.2.3α 10X TBE ρυθμιστικό διάλυμα τελικού όγκου 1lt.

Συστατικό	Ποσότητα	10X Stock Συγκέντρωση	Τελική 1X Συγκέντρωση
<i>Tris Base</i>	108 g	890 mM	89 Mm
<i>Boric Acid</i>	55 g	890 mM	89 mM
<i>EDTA (pH 8.0)</i>	40 ml (0,5M)	20 mM	2 mM

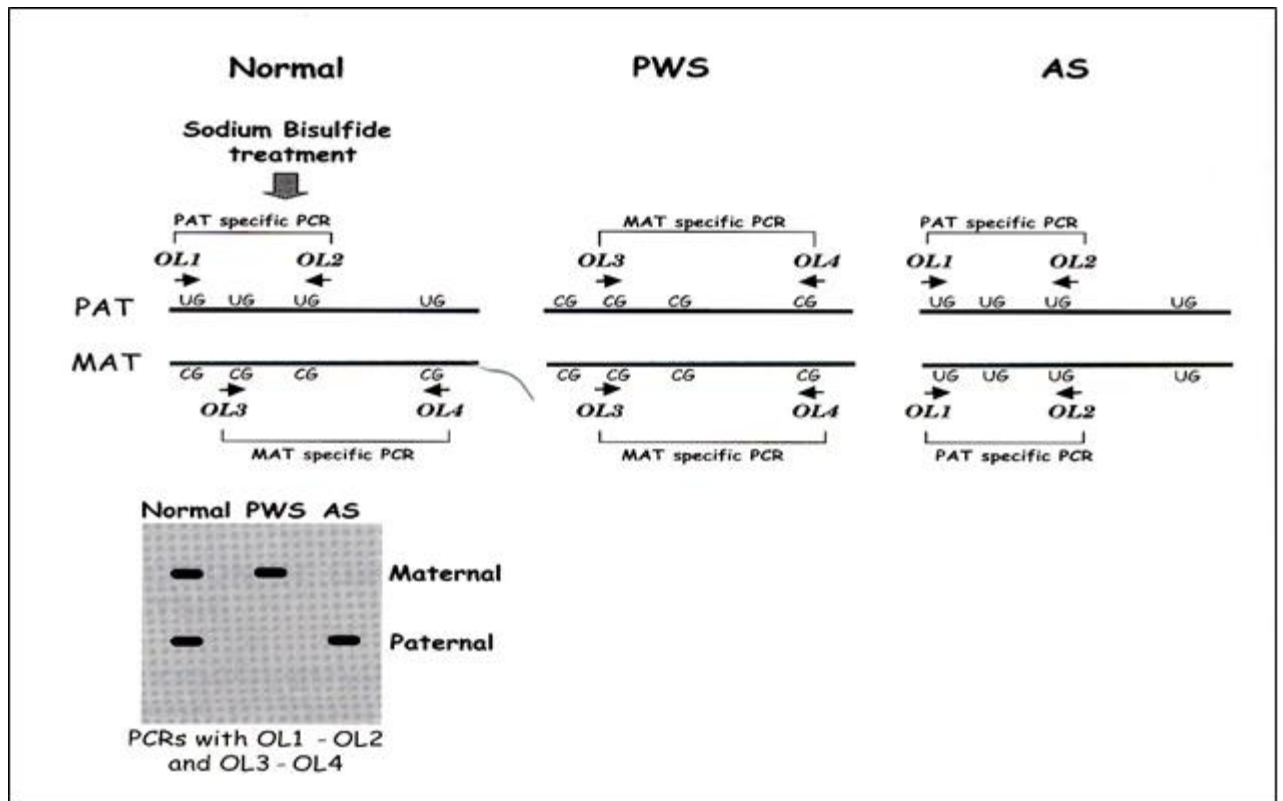
Πίνακας 4.2.3β 50X TAE ρυθμιστικό διάλυμα τελικού όγκου 1lt.

Συστατικό	Ποσότητα	50X Stock Συγκέντρωση	Τελική 1X Συγκέντρωση
<i>Tris Base</i>	242 g	2M	40 mM
<i>Glacial Acetic Acid</i>	57,1 g	2M	40 mM
<i>EDTA (pH 8.0)</i>	100 ml (0,5M)	50 mM	1 mM

4.3 METHYLATION SPECIFIC PCR (MS-PCR)

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, περιοχές με έντονη μεθυλίωση αποτελούν τα 5'-CpG-3' δινουκλεοτίδια. Περίπου 80% των δινουκλεοτιδίων αυτών στο γονιδίωμα των θηλαστικών είναι μεθυλιωμένο. Έντονη μεθυλίωση παρατηρείται στις CpG νησίδες που βρίσκονται κοντά σε ρυθμιστικές περιοχές αποτυπωμένων γονιδίων (imprinted genes), και η οποία σχετίζεται με την μεταγραφική απενεργοποίηση των ρυθμιστικών αυτών περιοχών. Παράδειγμα γονιδίων που υπόκεινται στη ρύθμιση τέτοιων περιοχών είναι τα γονίδια της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Η μέθοδος MS-PCR στηρίζεται στην χημική μετατροπή όλων των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA σε ουρακίλες, μετά από την επίδραση με δισουλφίδιο του νατρίου (bisulfite treatment). Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες (5-μεθυλοκυτοσίνες) είναι ανθεκτικές στην χημική αυτή μετατροπή και παραμένουν ανεπηρέαστες. Συνεπώς, η αλληλουχία του DNA που προκύπτει μετά την επεξεργασία με δισουλφίδιο του νατρίου, θα διαφέρει ανάλογα με το αρχικό πρότυπο μεθυλίωσης εφόσον στη θέση κάθε μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης θα υπάρξει ουρακίλη, που σε δίκλωνες αλυσίδες συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με

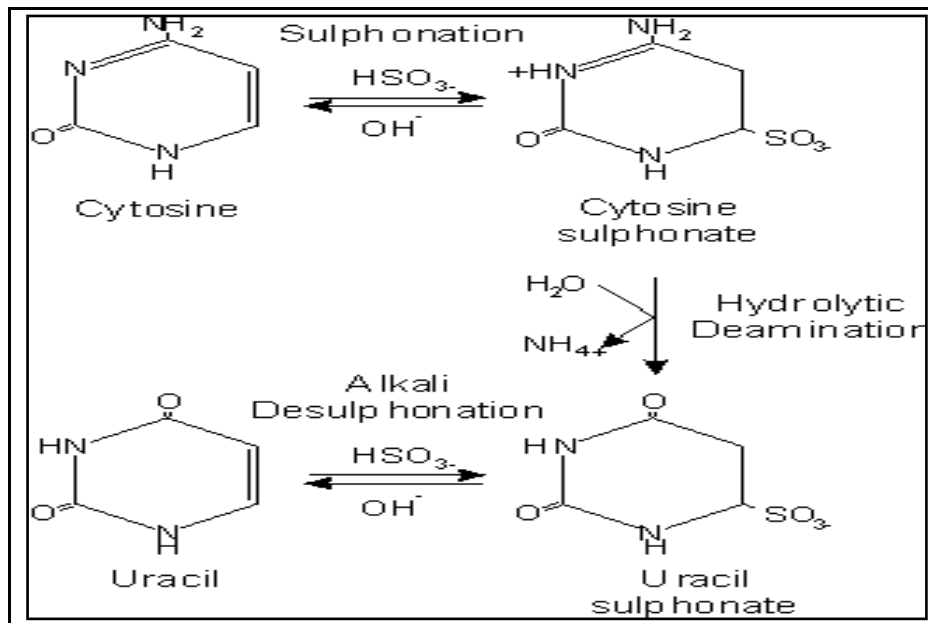
αδενίνη. Με βάση την διαφοροποίηση αυτή έχει σχεδιαστεί μία αντίδραση PCR με την οποία είναι δυνατός ο διαχωρισμός του μεθυλιωμένου από το μη μεθυλιωμένο DNA. Συγκεκριμένα, η περιοχή της CpG νησίδας του SNRPN γονιδίου εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης στο μητρικό και στο πατρικό αλληλόμορφο. Ανάλυση της αλληλουχίας της συγκεκριμένης περιοχής αποκάλυψε ότι >96% όλων των CpG νουκλεοτιδίων είναι μεθυλιωμένα στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο, ενώ στο πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι μη μεθυλιωμένη. Με βάση αυτή την παρατήρηση, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών (primers) για την μεθυλιωμένη και τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία της CpG νησίδας του SNRPN γονιδίου. Συγκεκριμένα, ένα ζεύγος εκκινητών (OL1, OL2) είναι σχεδιασμένο για τη μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA του μητρικού αλληλομόρφου, η οποία δεν τροποποιείται μετά από την επίδραση με δισουλφίδιο του νατρίου και το PCR προϊόν προκύπτει από το μητρικό αλληλόμορφο το οποίο περιέχει κατάλοιπα κυτοσίνης. Ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών (OL3, OL4) είναι σχεδιασμένο για την μη μεθυλιωμένη αλληλουχία DNA, η οποία τροποποιείται μετά από την χημική επεξεργασία, και το προϊόν PCR προκύπτει από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο, το οποίο περιέχει ουρακίλες. Τα δύο παραπάνω ζεύγη εκκινητών είναι κατά τέτοιο τρόπο σχεδιασμένα ώστε να δίνουν σε κάθε περίπτωση προϊόντα διαφορετικού μεγέθους και να είναι δυνατός ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός τους. Το προϊόν PCR που προέρχεται από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο έχει μέγεθος 174bp, και το αντίστοιχο που προέρχεται από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο 100bp. Με βάση τα παραπάνω, δείγματα από φυσιολογικά άτομα δίνουν και τα δύο προϊόντα PCR, δείγματα από ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi δίνουν μόνο το προϊόν από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο, ενώ ασθενείς με σύνδρομο Angelman δίνουν μόνο το προϊόν από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο (Εικ.4.3.1)



Εικόνα 4.3.1 Αρχή της μεθόδου MS-PCR (λεπτομέρειες στο κείμενο)

4.3.1 ΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΗΣ ΜΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΚΥΤΟΣΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑΚΙΛΗ

Το DNA αρχικά υποβάλλεται σε αποδιατακτικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία) και το δίκλωνο μόριο μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με κατάλληλο διάλυμα που περιέχει δισουλφίδιο του νατρίου και το οποίο προκαλεί την ενσωμάτωση της ρίζας SO_3^- στις μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Ακολουθεί υδρολυτική απαμίνωση και παραγωγή ενός ενδιάμεσου καταλοίπου ουρακίλης (uracil sulphonate) (Εικ. 4.3.2). Η τελική μετατροπή σε ουρακίλη επιτυγχάνεται με απομάκρυνση της ρίζας SO_3^- (desulphonation), η οποία πραγματοποιείται μέσα σε στήλες με την επίδραση κατάλληλων διαλυμάτων. Το τροποποιημένο DNA διηθείται και συλλέγεται σε κατάλληλο διάλυμα έκλουσης.



Εικόνα 4.3.2 Χημική μετατροπή θυμίνης (T) σε ουρακίλη (U)

Η διαδικασία της χημικής τροποποίησης πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου EZ DNA Methylation- Gold™ kit (Zymo Research Corp).

4.3.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής PCR
- Μικροφυγόκεντρος

4.3.3 METHYLATION SPECIFIC PCR (MS- PCR)

Το προϊόν της χημικής τροποποίησης χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα σε PCR αντίδραση με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές. Το ένα ζεύγος εκκινητών προσδένεται στη μεθυλιωμένη αλληλουχία του μητρικού αλληλομόρφου ενώ το άλλο ζεύγος προσδένεται στην μη μεθυλιωμένη, άρα και τροποποιημένη, αλληλουχία του πατρικού αλληλομόρφου.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες του MS- PCR δίνονται στον Πίνακα 4.3.1. Οι αντιδράσεις MS-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1- 2μl προϊόντος χημικής τροποποίησης (template). Στην ίδια PCR αντίδραση πολλαπλασιάστηκαν και τα δύο προϊόντα του μητρικού και του πατρικού αλληλομόρφου με αναλογία εκκινητών μητρικοί/ πατρικοί 2:1. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για το MS-PCR είναι η HotStarTaq® polymerase της Qiagen. Το ένζυμο παρέχεται σε ανενεργή μορφή και ενεργοποιείται μετά από επώαση στους 95°C για 15 λεπτά. Το ένζυμο περιέχεται μέσα σε έτοιμο διάλυμα 2x HotStarTaq Master Mix (Πίνακας 4.3.2).

Πίνακας 4.3.1. Αλληλουχίες εκκινητών του εξωνίου 1 του *SNRPN* γονιδίου και συνθήκες της PCR αντίδρασης

Εκκινητές	Αλληλουχία	Συνθήκες αντίδρασης PCR†	Μέγεθος προϊόντος (bp)
Μητρικοί SNRPNM For SNRPNM Rev	5'-TAAATAAGTACGTTTGC GCGGTC- 3' 5'- AACCTTACCCGCTCCATCGCG -3'	1. Ενεργοποίηση <i>HotStart Taq DNA polymerase</i> : 95 °C για 10 λεπτά 2. Αποδιάταξη DNA: 94 °C για 30 δευτ. 3. Υβριδισμός εκκινητών: 62 °C για 30 δευτ.	174
Πατρικοί SNRPNP For SNRPNP Rev	5-GTGAGTTTGGTGTAGAGTGGAGTGGTTGTTG-3' 5'- ACATCAAACATCTCCAACAACCA- 3'	4. Επιμήκυνση- Σύνθεση DNA: 72 °C για 30 δευτ. 5. Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 λεπτά Συνολικοί κύκλοι: 35	100

† Στην αντίδραση PCR η αναλογία των εκκινητών μητρικών : πατρικών είναι 2:1, και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι SNRPNMaternal :0.72μM και SNRPNPaternal: 0.36μM. Η συγκέντρωση Mg⁺⁺ είναι 1.5mM.

Πίνακας 4.3.2 Σύνθεση του HotStarTaq Master Mix (Qiagen)

HotStarTaq Master Mix (2x)	Σύνθεση / Χαρακτηριστικά
1. HotStarTaq DNA πολυμεράση	<ul style="list-style-type: none"> • Τροποποιημένη μορφή της ανασυνδυασμένης DNA πολυμεράσης, απομονωμένης από το <i>T. Aquaticus</i>, και κλωνοποιημένης στην <i>E.coli</i> • 5 units/μl • 94kDa • Ρυθμός επιμήκυνσης: 2-4kb/ λεπτό στους 72°C • Χρόνος ημιζωής: 10 λεπτά (97°C), 60 λεπτά (94°C)
2. Storage/ dilution Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 20mM Tris- HCL • 100mM KCl • 1mM DTT • 0,1mM EDTA • 0,5% (v/v) Nonidet® P- 40 • 0,5% (v/v) Tween 20 • 50% glycerol (v/v) • Stabilizer • pH 9.0
3. PCR Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • Tris- HCL • KCl • (NH₄)₂SO₄ • 3mM MgCl₂ • pH 8.7
4. dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	<ul style="list-style-type: none"> • 400μM το κάθε dNTP

4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 15 ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 15q11-q13

Η ύπαρξη δύο αντιγράφων μίας γενετικής θέσης τα οποία έχουν κληρονομηθεί από τον ένα μόνο γονέα (μονογονεϊκή δισωμία- UPD) ή η απουσία γενετικής συμμετοχής του ενός γονέα για μία συγκεκριμένη γενετική θέση (έλλειμμα), μπορούν να ανιχνευθούν με συγκριτική ανάλυση απλοτύπων μελετώντας τους

κατάλληλους πολυμορφικούς δείκτες της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πολυμορφικών θέσεων στο DNA, όπως πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs), επαναλήψεις μεταβλητού μήκους (Variable Nucleotide Tandem Repeats; VNTRs), επαναλήψεις μικρού μήκους (Short Tandem Repeats; STRs), μικροδορυφορικές επαναλήψεις (microsatellites) κ.ά.

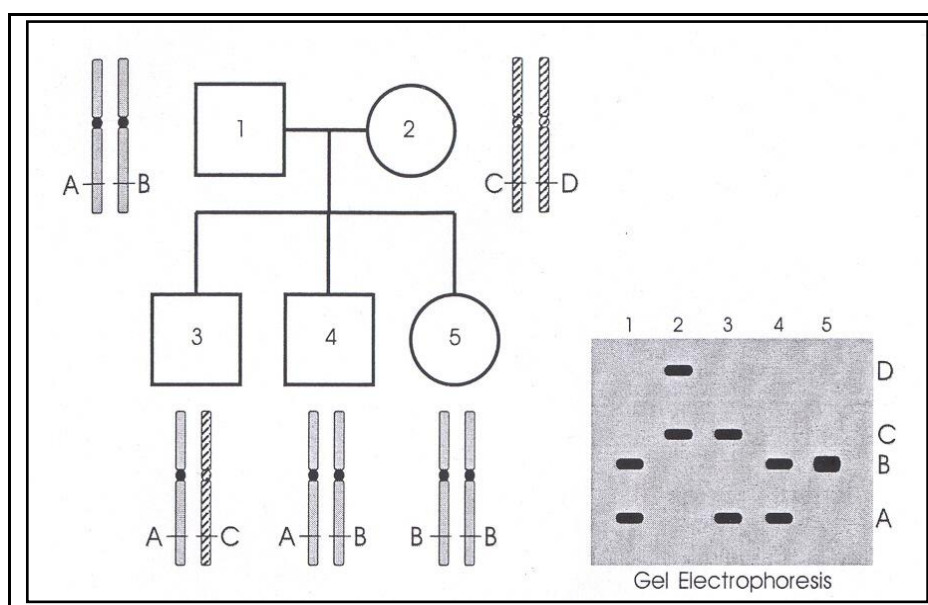
Για την μελέτη της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 χρησιμοποιούνται επαναλήψεις μικρού μήκους και συγκεκριμένα δινουκλεοτιδικοί πολυμορφικοί δείκτες. Η μέθοδος ονομάζεται Dinucleotide Repeat Polymorphism analysis (DNRP analysis). Το κύριο πλεονέκτημα των δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών δεικτών είναι ότι συνήθως υπάρχουν περισσότερα από δύο αλληλόμορφα για κάθε γενετική θέση, γεγονός που καθιστά τις θέσεις αυτές πληροφοριακές και κατάλληλες για ανίχνευση μονογονεϊκής δισωμίας και χρωμοσωμικών ελλειμμάτων. Για την μελέτη αυτή απαιτείται γενετικό υλικό από το παιδί και από τους δύο βιολογικούς γονείς προκειμένου να εξακριβωθεί το πρότυπο κληρονομής των πολυμορφικών αυτών θέσεων. Επιπλέον, η DNRP ανάλυση απαιτεί την ύπαρξη ποικιλομορφίας στην οικογένεια για τις συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις που μελετώνται. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχουν τόσα διαφορετικά αλληλόμορφα στους γονείς που να επιτρέπουν την ανίχνευση της απουσίας της γονική συνεισφοράς.

4. 4.1 ANIXNEYΣH MONOGONEΪKHΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ (UNIPARENTAL DISOMY)

Για την ανίχνευση της μονογονεϊκής δισωμίας στο χρωμόσωμα 15 χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμορφικοί δείκτες CYP19 και D15S87, οι οποίοι βρίσκονται τελομερικά του χρωμοσώματος 15. Η αρχή της μεθόδου δίνεται σχηματικά στην Εικόνα 4.4.1.

Ο πατέρας διαθέτει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα (A και B) για την πολυμορφική θέση η οποία μελετάται (έστω X), και η μητέρα δύο επίσης διαφορετικά αλληλόμορφα (C και D). Το ένα παιδί (άτομο 4) έχει κληρονομήσει και τα δύο αλληλόμορφα (A και B) από τον πατέρα, ενώ δεν φέρει κανένα αλληλόμορφο της μητέρας για την συγκεκριμένη θέση (X). Το παιδί αυτό παρουσιάζει πατρική μονογονεϊκή ετεροδισωμία (pUPD)

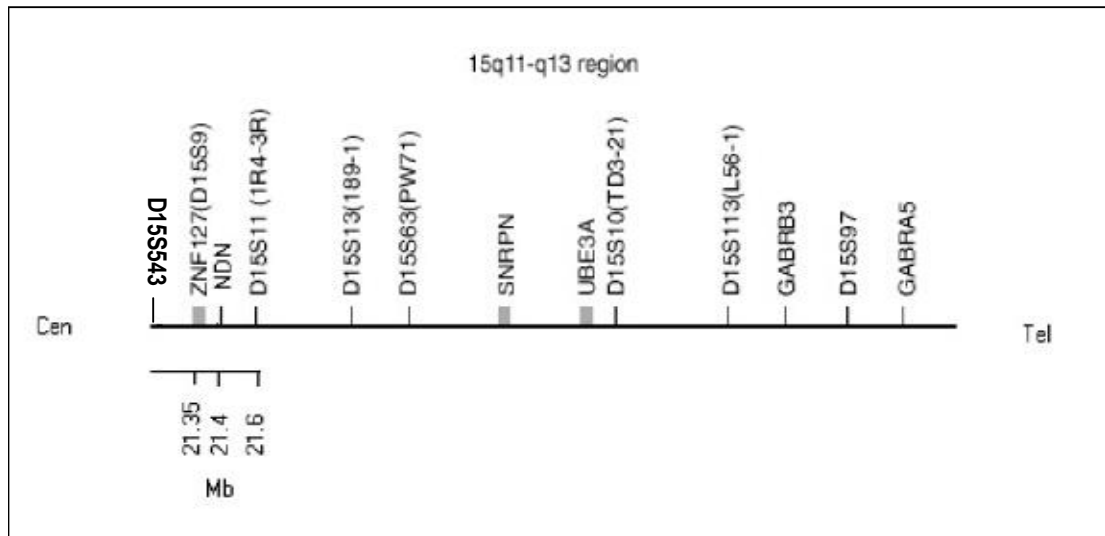
(ετεροδισωμία λόγω της ύπαρξης και των δύο διαφορετικών αλληλομόρφων του ενός γονέα). Στο άτομο 5, υπάρχει ομοζυγωτία για τον πολυμορφικό δείκτη B στην θέση X, που οδηγεί στην διάγνωση πατρικής μονογονεϊκής ισοδισωμίας (ισοδισωμία λόγω της κληρονόμησης δύο αντιγράφων ενός αλληλομόρφου από τον ένα μόνο γονέα). Τέλος, στο παιδί 3 ανιχνεύονται δύο διαφορετικοί πολυμορφικοί δείκτες (A και C), που έχουν κληρονομηθεί φυσιολογικά από τον πατέρα και από την μητέρα αντίστοιχα.



Εικόνα 4.4.1 Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας με την ανάλυση πολυμορφικών θέσεων (λεπτομέρειες στο κείμενο). (Από Engel E and Antonarakis SE)

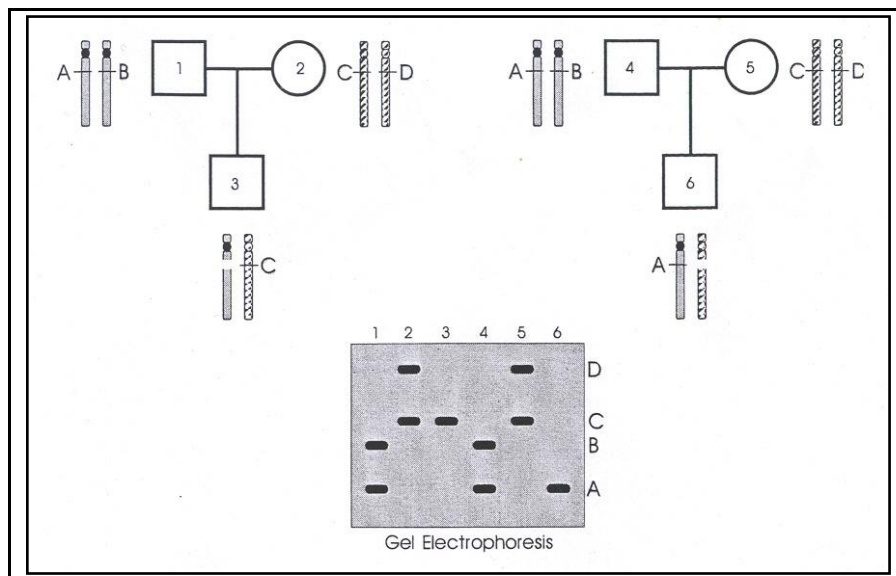
4.4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 15q11-q13

Για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ελλειμμάτων στην περιοχή 15q11-q13 χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμορφικοί δείκτες D15S543, D15S11, D15S10, D15S97, D15S113 και GABRB3, οι οποίοι βρίσκονται κατά μήκος της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 (Εικ. 4.4.2).



Εικόνα 4.4.2 Γενωμική οργάνωση χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Δίνονται οι θέσεις των έξι πολυμορφικών δεικτών (D15S543, D15S11, D15S10, D15S113, GABRB3 και D15S97) που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των απλοτύπων της περιοχής.

Στην Εικόνα 4.4.3 επεξηγείται διαγραμματικά η ανίχνευση χρωμοσωμικού ελλείμματος με την χρήση πολυμορφικών δεικτών.



Εικόνα 4.4.3 Διαγραμματική απεικόνιση ανίχνευσης χρωμοσωμικού ελλείμματος με την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών (λεπτομέρειες στο κείμενο) (Από Engel E. and Antonarakis SE).

Στην περίπτωση χρωμοσωμικού ελλείμματος, στην γενετική θέση που μελετάται εντοπίζεται το προϊόν ενός αλληλομόρφου (μητρικού αλληλομόρφου C στο διάγραμμα αριστερά και πατρικού αλληλομόρφου A στο διάγραμμα δεξιά).

Όπως και στην περίπτωση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας, είναι απαραίτητο τα μέλη της οικογένειας που μελετώνται (παιδιά – γονείς), να είναι πληροφοριακά στις γενετικές θέσεις που εξετάζονται. Επιπλέον, στην περίπτωση ανίχνευσης πατρικής προέλευσης ελλείμματος, πρέπει να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μη πατρότητας, εξετάζοντας και άλλες πολυμορφικές θέσεις στο γονιδίωμα, οι οποίες θα εξασφαλίσουν την φυσιολογική κληρονομικότητα και την επιβεβαίωση της πατρότητας.

Η μελέτη των δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών δεικτών της περιοχής 15q11-q13 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και τον κάθετο ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων PCR σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (fragment analysis). Η ηλεκτροφόρηση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο αναλυτή Long- Read Tower™ System της εταιρείας Visible Genetics.

Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφικό δείκτη, τα χαρακτηριστικά αυτών, καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR, δίνονται στον Πίνακα 4.4.1.

Οι θέσεις των πολυμορφικών δεικτών κατά μήκος της 15q11-q13 φαίνονται στην Εικόνα 4.4.2.

Πίνακας 4.4.1 Αλληλουχίες και ειδικές συνθήκες των εκκινητών για την ενίσχυση των πολυμορφικών θέσεων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13

Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητή	Θερμοκ. υβριδισμού (°C)	MgCl ₂ (mM)†
<i>D15S543For</i>	5'- GCTGTGTTCACTTTCCAGAG- 3'	56	2.5
<i>D15S543Rev</i>	3'- GTCGTGATCTGTTTCAACAGAG- 5'		
D15S11For	5'-GACATAGACCACAAAGAAACCTTAGAC-3'	55	2.5
D15S11Rev	5'- GTGGTTACTGAGGCAAGAAATTGGTGACTG- 3'		
D15S10 For	5'- GTAACACTATGAATTGTTAGTG- 3'	52	3.5
D15S10Rev	3'- GACAGCTGAACGTAGTTAAAG- 5'		
D15S97For	5'- CTTCTAGCCTCAGGTTCCCC- 3'	60	2.5
D15S97Rev	3'- ATTCACTTTTCAAACCACCCC- 5'		
D15S113For	5'- CATGTACTGTTTTATCCCTGTGGC-3'	55	2.5
D15S113Rev	5'- CTGCTGCTTATACTCTTTCTCTATTC- 3'		
GABRB3For	5'- GTTGGTGACACCAGGAATTCAGC- 3'	55	2.5
GABRB3Rev	3'- GTACAGCCAGTAAACTAAGTTG- 5'		
CYP19For	5'- GCAGGTACTTAGTTAGCTAC- 3'	58	2.5
CYP19Rev	3'- TTACAGTGAGCCAAGGTCGT- 5'		
D15S87For	5'- GATAAATGCCAAACATGTTGT- 3'	55	3.5
D15S87Rev	3'- TGCTCTCAGGATTCCTCCA- 5'		

† Σε κάθε μία αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση εκκινητών 0.5μM, HotStartTag τελικής συγκέντρωσης 2.5units και 200μM από κάθε dNTP (όλα συμπεριλαμβάνονται στο HotStartTaq Master Mix (βλέπε Πίνακα 4.3.2)

4.5 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ *UBE3A* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

4.5.1 ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ ΤΟΥ *UBE3A* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Τα 9 εξώνια (8- 16) της κωδικοποιούσας περιοχής του *UBE3A* γονιδίου ενισχύθηκαν με διαφορετικές αντιδράσεις PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι προσδένονται σε ιντρονικές περιοχές. Στην περίπτωση του εξωνίου 9, το οποίο είναι το μεγαλύτερο εξώνιο του γονιδίου (1247bp), χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, χωρίζοντας την αλληλουχία του εξωνίου σε επιμέρους τμήματα. Τα εξώνια 13 και 14 ενισχύθηκαν με κοινή χρήση ενός ζεύγους εκκινητών, δεδομένου ότι η ιντρονική περιοχή μεταξύ τους είναι μόλις 101bp. Το εξώνιο 7, το οποίο περιέχει την αλληλουχία AT του κωδικονίου έναρξης ATG (η βάση G βρίσκεται στο εξώνιο 8) μελετήθηκε σε 19 άτομα, τα οποία παρουσίαζαν τυπική εικόνα συνδρόμου Angelman. Βάση της βιβλιογραφίας, δεν έχει ανιχνευθεί καμμία μετάλλαξη που να αφορά το εξώνιο 7 σε όλους τους ασθενείς που έχουν ελεγχθεί μέχρι σήμερα. Οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών, καθώς και οι αλληλουχίες που πολλαπλασιάζονται δίνονται παρακάτω. Με έντονη έγχρωμη γραμματοσειρά σημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών (forward και reverse) για κάθε εξώνιο. Στο εξώνιο 9 σημειώνονται και τα έξι βασικά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Ίδιο χρώμα γραμματοσειράς αντιστοιχεί σε ζεύγος εκκινητών για κάθε εξώνιο. Με έντονο μαύρο χρώμα σημειώνεται η αλληλουχία του κάθε εξωνίου, ενώ το γκρι χρώμα αντιστοιχεί στην αλληλουχία των ιντρονικών περιοχών. Στο εξώνιο 7 με πράσινο χρώμα σημειώνεται η 5' περιοχή του γονιδίου. Στα εξώνια 7 και 8 με κίτρινη επισήμανση τονίζεται η τριπλέτα έναρξης ATG της μεταγραφής.

Exon 7 (42bp)

gaccactttc tttcatggtt acatctttaa **atggc cacctgatct** ttttaaaact gttttattta
 gtgcttaaat cttgtttaca aaattgtctt cctaagtaat atgtctacct
 ttttttttgg aatatggaat attttgctaa ctgtttctca attgcatttt
 acagatcagg agaacctcag tctgacgaca ttgaagctag ccga**AT**GTAA
 GTGTAACCTG GTTGAGACTG TGGTTCTTAT TTTGAGTTGC CCTAGACTGC
 TTTAAATTAC GTCACATTAT TTGGAAATAA TTTCTGGTTA AAAGAAAGGA
 ATCATTTAGC AGTA**AATGGG AGATAGGAAC ATACCT**

Exon 8 (299bp)

ATTTCACTAG TCAGGAGTTG TGGTAAATAG
 TGCATCTCCA TTTTCTACTT CTCATCTTCA TACACAGGTT AATCACTTCA
 GTGCTTGACT AACTTTTGCC TTGATGATAT GTTGAGCTTT GTACTTGAGA
 GCTGTACTAA TCACTGTGCT TATTGTTTGA ATGTTTGGTA CA**GGAAGCGA**
GCAGCTGCAA AGCATCTAAT AGAACGCTAC TACCACCAGT TAACTGAGGG
CTGTGGAAAT GAAGCCTGCA CGAATGAGTT TTGTGCTTCC TGTCCAACTT
TTCTTCGTAT GGATAATAAT GCAGCAGCTA TTAAAGCCCT CGAGCTTTAT
AAGATTAATG CAAAACTCTG **TGATCCTCAT CCCTCCAAGA AAGGAGCAAG**
CTCAGCTTAC CTTGAGAACT **CGAAAGGTGC CCCCAACAAC TCCTGCTCTG**
AGATAAAAAT GAACAAGAAA GCGCTAGAA **TTGATTTTAA AG**GTAAGATG
 TTTTATTTTC AATTGAGAAT TGTTCCTGA AAACCATGTG GGAGATTTAA
 ATGTATTAGT TTTTATTTGT TTTTCTTCT GTGACATAAA GACATTTTGA
 TATCGTAGAA CCAATTT**TTT ATTG**TGGTAA **CGGACAGGAA**

Exon 9 (1247bp)

AATGTTTGGC TGTTTTACTT TTAGAACTTT **TTGCAACAGA GTA**AACATAC
 ATATTATGAA AATAAATGTT CTCTTTTTTC CTCTGATTTT CTAG**ATGTGA**
CTTACTTAAC AGAAGAGAAG GTATATGAAA TTCTTGAATT ATGTAGAGAA
AGAGAGGATT ATTCCCCTTT AATCCGTGTT ATTGGAAGAG TTTTTTCTAG
TGCTGAGGCA TTGGTACAGA GCTTCCGGAA AGTTAAACAA CACACCAAGG
AAGAACTGAA ATCTCTTCAA GCAAAAGATG AAGACAAAGA TGAAGATGAA
AAGGAAAAAG CTGCATGTTT TGCTGCTGCT ATGGAAGAAG ACTCAGAAGC
ATCTTCCTCA AGGATAGGTG ATAGCTCACA GGGAGACAAC AATTTGCAAA
AATTAGGCC TGATGATGTG TCTGTGGATA TTGATGCCAT TAGAAGGGTC
TACACCAGAT TGCTCTCTAA TGAAAAAATT GAACTGCCT TTCTCAATGC
ACTTGATAT TTGTCACCTA **ACGTGGAATG T**GACTTGACG **TATCACAATG**
TATACTCTCG AGATCCTAAT TATCTGAATT TGTTCATTAT **CG**TAAATGGAG
AATAGAAATC TCCACAGTCC TGAATATCTG GAAATGGCTT TGCCATTATT

TTGCAAAGCG	ATGAGCAAGC	TACCCCTTGC	AGCCCAAGGA	AAACTGATCA
GACTGTGGTC	TAAATACAAT	GCAGACCAGA	TTCGGAGAAT	GATGGAGACA
TTTCAGCAAC	TTATTACTTA	TAAAGTCATA	AGCAATGAAT	TTAACAGTCG
AAATCTAGTG	AATGATGATG	ATGCCATTGT	TGCTGCTTCG	AAGTGCTTGA
AAATGGTTTA	CTATGCAAAT	GTAGTGGGAG	GGGAAGTGGG	CACAAATCAC
AATGAAGAAG	ATGATGAAGA	GCCCATCCCT	GAGTCCAGCG	AGCTGACACT
TCAGGAACTT	TTGGGAGAAG	AAAGAAGAAA	CAAGAAAGGT	CCTCGAGTGG
ACCCCTGGA	AACTGAACTT	GGTGTTAAAA	CCCTGGATTG	TCGAAAACCA
CTTATCCCTT	TTGAAGAGTT	TATTAATGAA	CCACTGAATG	AGGTTCTAGA
AATGGATAAA	GATTATACTT	TTTTCAAAGT	AGAAACAGAG	AACAAATTCT
CTTTTATGAC	ATGTCCCTTT	ATATTGAATG	CTGTCACAAA	GAATTTGGGA
TTATATTATG	ACAATAGAAT	TCGCATGTAC	AGTGAACGAA	GAATCACTGT
TCTCTACAGC	TTAGTTCAAG	GACAGCAGTT	GAATCCATAT	TTGAGACTCA
AAGTTAGACG	TGACCATATC	ATAGATGATG	CACTTGTCCG	GGTAA ^{GTTGG}
GCTGCTAGAT	TAAAAACCTA	ATAATGGGGA	TATCATGATA	CAGTTCAGTG
AATTCATTTT	AAAAGTGACT	GAAAAAATG	ATACCATATA	GCATAGGAAC
ACATGGACAT	TTCTGATCTT	ATATAAGTAT	TATACTTTTG	TTGTTCTGT

Exon 10 (145bp)

GA	CTGAATCTTT	GTCTTCACTG	GCTTTTTATC	AGTTTGCTTT
CTGTTTCCAT	TTACATACAA	AAAGTCAAAA	ATTTGTATTT	GTTTCCTAAT
CCTACTCCTT	GTTTTTATTT	TGTTTTTTTC	CTGATACTAG	CAATCATCTT
CTTTTCATGT	TTATCTTTTC	AATCACTAGC	TAGAGATGAT	CGCTATGGAA
AATCCTGCAG	ACTTGAAGAA	GCAGTTGTAT	GTGGAATTTG	AAGGAGAACA
AGGAGTTGAT	GAGGGAGGTG	TTTCCAAAGA	ATTTTTTCAG	CTGGTTGTGG
AGGAAATCTT	CAATCCAGAT	ATTGGTAAAT	ACATTAGTAA	TGTGATTATG
GTGTCGTATC	ATCTTTTGAG	TTAGTTATTT	GTTTATCTTA	CTTTGTAAAT
ATTTTCAGCT	ATGAAGAGCA	GCAAAGAAG	GATTTGGTAT	GGATTACCCA
GAATCACACA	TCATGACTG			

Exon 11 (206bp)

C

TACCCGATGC **CACCAAATTA** **CTTACTACTT** TATTCCTTTG GCTTCATAAA
 ATTACATATC ACCATTCACC CCAATTTATA GCAGATATAT GTGGACATTG
 TTTTCTCAAG TGCTAATATA ATAGAAATCA ATGTTGCATG CCTAATTACA
 TATATTTTAA ATGTTTTATA TGCATAATTA TTTTAAGTTT ATATTTGTAT
 TATTCATCAG TCCTTAATAA AATACAAAAG TAATGTATTT TAAAAAATCA
 TTTCTTATAG **GTATGTTTAC** **ATACGATGAA** **TCTACAAAAT** **TGTTTTGGTT**
TAATCCATCT **TCTTTTGAAA** **CTGAGGGTCA** **GTTTACTCTG** **ATTGGCATAG**
TACTGGGTCT **GGCTATTTAC** **AATAACTGTA** **TACTGGATGT** **ACATTTTCCC**
ATGGTTGTCT **ACAGGAAGCT** **AATGGGGAAA** **AAAGGAACCT** **TTCGTGACTT**
GGGAGACTCT **CACCCAGTAA** GTTCTTTGTC ATTTTTTTAA TTCAGTCTCT
 TAGATTTTAT TAAATGCAA AAATTTAATT TATGTCAAAA TTTTAAAGTT
 TTTGTTTAGA ATCTTTGTTG ATACTCTTAT CAATAAGATA AAAATGTTTT
 AATCTGACCG AAGTACCAGA AACACT

Exon 12 (165bp)

AGAA GAGTGATATA AATTATTTGT

TGTATTTTGT AGTTCTATGG TGGCCTCAAT TTACCATTTT TGGTTGCTAG
GTTCTATATC **AGAGTTTAAA** **AGATTTATTG** **GAGTATGAAG** **GGAATGTGGA**
AGATGACATG **ATGATCACTT** **TCCAGATATC** **ACAGACAGAT** **CTTTTTGGTA**
ACCCAATGAT **GTATGATCTA** **AAGGAAAATG** **GTGATAAAAT** **TCCAATTACA**
AATGAAAACA **GGAAGGTAAT** AAATGTTTTT ATGTCACATT TTGTCTCTTC
 ATTAACACTT TCAAAGCATG TATGCTTATA ATTTTTAAAG AAGTATCTAA
 TATAGTCTGT ACAAAAAAAAA AACAAGTAAC TAAGTTTATG TAAATGCTAG
 AGTCCACTTT TCTAAATCTT GGATATAAGT TGGTATGAAA GCACACAGTT
 GGGCACTAAA GCCCCTTTTA GAGAAAGAGG ACATGAAGCA G

Exon 13/14 (156bp ; 74bp)

GCT

ATGCAGCCCA **ATAACTTGTG** **TTTTGTTTGC** ATAGCATATT ATAAGAAGTT
 CTTGTGATTA ATGTTTTCTA CAG**GAATTTG** **TCAATCTTTA** **TTCTGACTAC**
ATTCTCAATA **AATCAGTAGA** **AAAACAGTTC** **AAGGCTTTTC** **GGAGAGGTTT**
TCATATGGTG **ACCAATGAAT** **CTCCCTTAAA** **GTACTTATTC** **AGACCAGAAG**
AAATTGAATT **GCTTATATGT** **GGAAGCCGG** TAAGAAAGCA GGTGTCTGCA
 AAAAGTCATG TATCGATTTA TTGTTTGTA TGTACAGTA GTATAGCAGA
 TAACTAAGAC ATATTTTCTT GAATTTGCAG **AATCTAGATT** **TCCAAGCACT**
AGAAGAAACT **ACAGAATATG** **ACGGTGGCTA** **TACCAGGGAC** **TCTGTTCTGA**
TTAGGTGAGG TACTTAGTTC TTCAGAGGAA GATTTGATTC ACCAAAGGGG
 TGTGTGATTT TGCTTCAGAC CTTTATCTCT AGGTACTAAT TCCCAAATAA
 GCAAACCTCAC AAATTGTCAT CTATATACTT AGATTTGTAT TTGTAATATA
 ATCACCATTT TTCAGAGCTA ATCTTGTGAT TTATTTTCATG AATGAAGTGT
 TGTTATATAT AAGTCTCATG TAA**TCTCCTG** **CATTTGGCGT** **ATGGATTATC**

Exon 15 (144bp)

ATGAA **TGCCAAACTG**

AAACCAGTAT TGTATTTTTT CTCATTAGGG **AGTTCTGGGA** **AATCGTTCAT**
TCATTTACAG **ATGAACAGAA** **AAGACTCTTC** **TTGCAGTTTA** **CAACGGGCAC**
AGACAGAGCA **CCTGTGGGAG** **GACTAGGAAA** **A**T**TAAAGATG** **ATTATAGCCA**
AAAATGGCCC **AGACACAGAA** **AGGTAGGTAA** TTATTAACTT GTGACTGTAT
 ACCTACCGAA AACCTTGCAT TCCTCGTCAC ATACATATGA ACTGTCTTTA
 TAGTTTCTGA GCACATTTCGT GATTTTATAT ACAAAATCCCC AAATCATATT
 AGACAATTGA GAAAATACTT TGCTGTCATT GTGTGAGGAA ACTTTTAAGA
 AATTGCCCTA GTTAAAAATT ATTATGGGGC TCACATTGGT TTGGAATCAA
 ATTAGTGTGA TTCATTTACT TTTTGTGATC CCAGCTTGTT AATTGAAAGC
 CATATAACAT GATCATCTAT TTAGAATGGT TACATTGAGG CTCGGAAGAT
 TATCATTTGA TTGTGCTAGA ATCCTGTATT CAAAT**TCATTT** **TCTTAGTCAT**
ATTGCCAGC

Exon 16 (>2000bp including part of 3' UTR)

```
CCATGAC TTACAGTTTT CCTGTTTTTTT TCCCCTTTTC TCTATTTAGG
TTACCTACAT CTCATACTTG CTTTAATGTG CTTTTACTTC CGGAATACTC
AAGCAAAGAA AACTTAAAG AGAGATTGTT GAAGGCCATC ACGTATGCCA
AAGGATTTGG CATGCTGTAA aacaaaacaa aacaaaataa aacaaaaaaaa STOP CODON
aggaaggaaa aaaaaagaaa aaatttaaaa aattttaaaa atataacgag (Kishino and
ggataaaattt ttggtggtga tagtgtccca Wagstaff)
```

Στον Πίνακα 4.5.1 δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινήτων για κάθε εξώνιο, η θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους εκκινήτων καθώς και το μέγεθος του κάθε προϊόντος PCR αντίδρασης. Επίσης, γίνεται και η αντίστοιχη βιβλιογραφική αναφορά στα ζεύγη εκκινήτων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες.

Πίνακας 4.5.1 Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των εξωνίων 7- 16 του *UBE3A* γονιδίου.

Εξώνιο	Αλληλουχίες εκκινητών (οι αλληλουχίες είναι γραμμένες με κατεύθυνση 5' – 3')	Θέση εκκινητών	Θερμοκρασία Υβριδισμού (°C)	Συγκέντρωση MgCl ₂ (mM)	Συγκέντρωση εκκινητών (μM)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά
7 For Rev	ATGGCCACCTGATCTGACCACCACTTTC AGGTATGTTCTATCTCCATT	Intron6 Intron7	58	1.5	1.0	351	Fang et al., 1999
8 For Rev	TTTCACTAGTCAGGAGTTGTGGT CCTGTCCGTTACCACAATAAA	Intron7 Intron8	58	1.5	1.0	617	Tzagkaraki et al.,
9AB For Rev	TTGCAACAGAGTAAACATACATAT CTCCATCATTCTCCGAATCTGGT	Intron8 Exon9	55	4.0	0.5	717	Fang et al, 1999
9C For Rev	ACCTAACGTGGAATGTGACTTGAC ACTCGAGGACCTTTCTGGTTTCTT	Exon9 Exon9	64	3.0	1.0	483	Rapakko et al, 2004
9D For	TAGTGGGAGGGGAAGTGGACA	Exon9	64	1.5	0.5	473	Rapakko et al,

Rev	TACCCGGACAAGTGCATCATCTA	Exon9					2004
9E							
For	CGCATGTACAGTGAACGAAGAA	Exon9	57	3.0	0.5	282	Rapakko et al,
Rev	TGCACAGGAACAACAAAAGTAT	Intron9					2004
10							
For	GACTGAATCTTTGTCTTCACTGGC	Intron9	54	2.5	0.4	461	Authors
Rev	CAGTCATGATGTGTGATTCTGGGT	Intron10					
ForB	GTTTGCTTTCTGTTTCCATTTAC	Intron9	60	2.5	1.0	392	Rapakko et al.,
RevB	ATCCTTCTTTTGCTGCTCTTC	Intron10					2004
11							
For	CTACCCGATGCCACCAAATTAC	Intron10	57	1.5	1.0	627	Authors
Rev	AGTGTTTCTGGTACTTCGGTCAGA	Intron11					
12							
For	AGAAGAGTGATATAAATTATTTG	Intron11	58	3.5	0.8	465	Fang et al, 1999
Rev	CTGCTTCATGTCCTCTTTCTCT	Intron12					
13/14							

For	GCTATGCAGCCCAATAACTTGTGT	Intron12	64	2.75	0.5	68	Authors
Rev	TCCATACGCCAAATGCAGGAGA	Intron14					
15							
For	ATGAATGCCAAACTGAAACCAG	Intron14	58	3.0	1.0	574	Fang et al, 1999
Rev	GCTGGCAATATGACTAAGAAAATG	Intron15					
16							
For	CCATGACTTACAGTTTTTCCT	Intron15	58	3.0	1.0	277	Malzac et al,
Rev	TGGGACACTATCACCACCAA	3' UTR					1998

* Αλληλουχίες M13 συμπεριλαμβάνονται στο 5' άκρο όλων των εκκινητών; M13 Forward: TGTA AACGACGGCCAGT, M13 Reverse : CAGGAAACAGCTATGACC

† Σε κάθε μία αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε HotStartTag DNA πολυμεράση τελικής συγκέντρωσης 2.5units και 200μM από κάθε dNTP (όλα συμπεριλαμβάνονται στο HotStartTaq Master Mix /βλέπε Πίνακα 4.3.2)

Οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR διαφοροποιήθηκαν από τις αντίστοιχες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία και διαμορφώθηκαν με βάση το είδος του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε (HotStarTag DNA πολυμεράση της QIAGEN). Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50μl. Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών σε κάθε αντίδραση είναι 2.5mM για κάθε forward και reverse εκκινητή.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις PCR δίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 4.5.2.

Πίνακας 4.5.2 Συνθήκες PCR αντίδρασης για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό των εξωνίων 7-16 του *UBE3A* γονιδίου

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Ενεργοποίηση <i>HotStart Taq DNA polymerase</i>	95	10 λεπτά
Αποδιάταξη του DNA	95	1 λεπτό
Υβριδισμός εκκινητών	54 (εξώνιο 10- primers A) 55 (εξώνιο 9AB) 57 (εξώνια 9E και 11) 58 (εξώνια 7, 8, 12, 15 και 16) 60 (εξώνιο 10- primers B) 64(εξώνια 9C, 9D και 13/14)	1 λεπτό
Επιμήκυνση – Σύνθεση DNA	72	1 λεπτό
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά
Συνολικοί κύκλοι : 35		

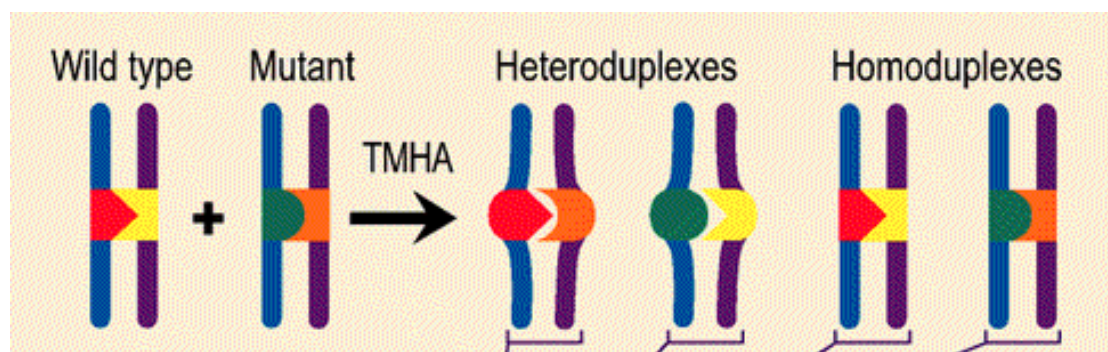
4.5.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας των PCR αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Η ποσότητα του PCR προϊόντος που ηλεκτροφορήθηκε αντιστοιχεί στο 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης PCR. Ποσότητα ίση με 5μl του PCR προϊόντος αναμιγνύεται με 2μl 6X διαλύματος χρωστικής και το δείγμα φορτώνεται στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 125Volt και ο χρόνος ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 30- 45 λεπτά. Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι η φικόλη, ενώ μάρτυρες μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν ο φάγος φχ174 και μάρτυρας 1Kb. Βρωμιούχο αιθίδιο προστέθηκε κατά την παρασκευή των πήκτωμάτων αγαρόζης. Η απεικόνιση των ηλεκτροφορημάτων έγινε με το σύστημα UVP (Ultra Violet Products) Bioimaging Systems, και φωτογραφήθηκαν με το Video Graphic Printer της Sony.

4.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCREENING METHOD)

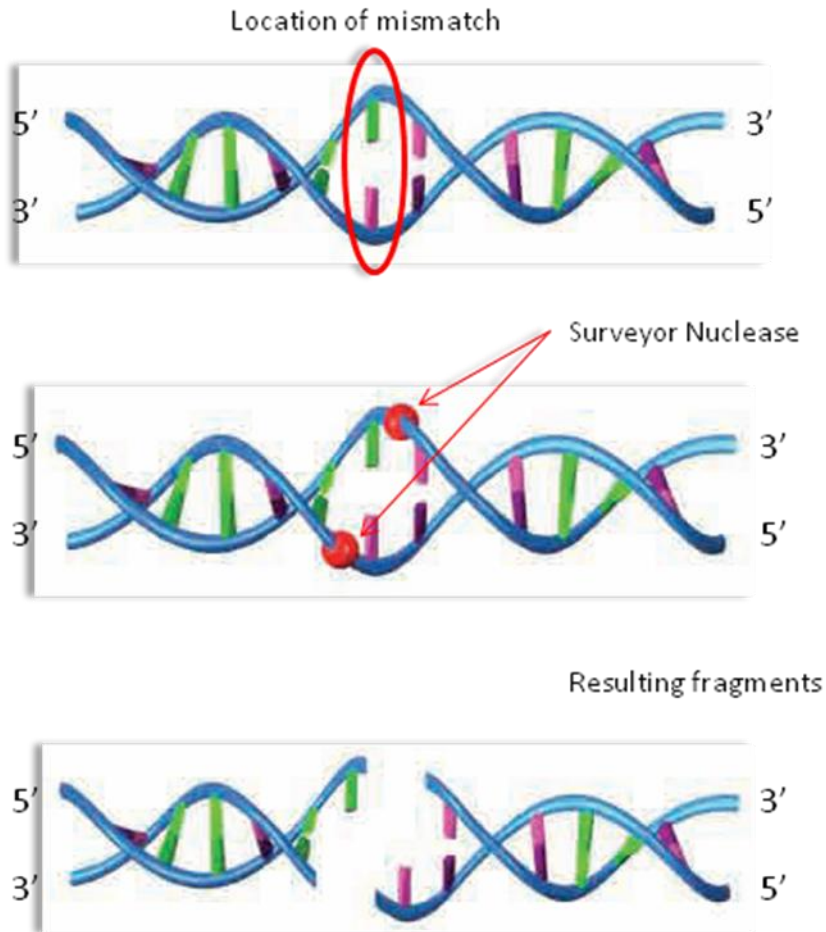
Η μέθοδος σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της κωδικής περιοχής του γονιδίου *UBE3A* είναι η Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis (ECMA), εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος SURVEYOR® Mutation Detection Kit της Transgenomic®. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην χρήση μίας ενδονουκλεάσης η οποία αναγνωρίζει τη θέση μη συμπληρωματικότητας (mismatch) των βάσεων σε ένα δίκλωνο μόριο DNA και στην ικανότητά της να κόβει και τις δύο αλυσίδες προς το 3' τμήμα της θέσης αυτής. Η μέθοδος παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη, την θέση και, σε πολλές περιπτώσεις, τον τύπο της μετάλλαξης. Η ενδονουκλεάση που χρησιμοποιείται ανήκει στην οικογένεια των ειδικών νουκλεασών CEL που αναγνωρίζουν θέσεις μη συμπληρωματικότητας των βάσεων στο DNA και απομονώνονται από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (σέλινο). Η Surveyor nuclease (εμπορική ονομασία του ενζύμου) αναγνωρίζει

όλους τους τύπους των σημειακών μεταλλάξεων: ένθεση ή αφαίρεση μίας ή περισσοτέρων βάσεων, αντικατάσταση ή και συνδυασμούς αυτών σε κάθε τύπο ετεροδιμερούς DNA. Από τα μεγέθη των τμημάτων που προκύπτουν μετά από την αποκοπή στις θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου, μπορεί να υπολογιστεί με ικανοποιητική ακρίβεια η θέση της μετάλλαξης. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται αποτελεί προϊόν αντίδρασης PCR για την συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή ελέγχου. Ταυτόχρονα με τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό του δείγματος προς ανάλυση (test), πραγματοποιείται και επιλεκτικός πολλαπλασιασμός του ίδιου γονιδιακού τμήματος σε φυσιολογικό δείγμα (wild type). Στο πρώτο στάδιο της μεθόδου ECMA πραγματοποιείται ανάμιξη του προϊόντος PCR του δείγματος προς ανάλυση με το αντίστοιχο του φυσιολογικού δείγματος. Ακολουθεί αποδιάταξη (denaturation) και επαναδιάταξη (reannealing) του μίγματος και, στην περίπτωση ύπαρξης σημειακής μετάλλαξης, προκύπτει ένας πληθυσμός ομοδιμερών και ετεροδιμερών τμημάτων DNA (Εικ. 4.6.1).



Εικόνα 4.6.1 Σχηματισμός πληθυσμού ομοδιμερών και ετεροδιμερών τμημάτων DNA μετά από ανάμιξη, αποδιάταξη και επαναδιάταξη DNA αλληλουχιών φυσιολογικού (wild type) και παθολογικού (mutant) δείγματος.

Στο δεύτερο στάδιο της μεθόδου ECMA, προστίθεται το ένζυμο Surveyor nuclease, το οποίο αναγνωρίζει τις θέσεις μη συμπληρωματικότητας των βάσεων (mismatch) στα ετεροδιμερή και κόβει και τις δύο αλυσίδες προς το 3' άκρο (Εικ. 4.6.2).



Εικόνα 4.6.2 Αναγνώριση της θέσης μη συμπληρωματικότητας των βάσεων από το ένζυμο Surveyor nuclease, αποκοπή των δύο αλυσίδων προς το 3' άκρο και δημιουργία δύο τμημάτων DNA.

Η ανίχνευση των επιμέρους τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά από την εφαρμογή της μεθόδου ECMA, γίνεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

4.6.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής
- Σύστημα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

4.6.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΜΕΘΟΔΟΥ ECMA

Στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου ECMA χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων για κάθε εξώνιο σε όλους τους ασθενείς. Σε κάθε εφαρμογή ECMA συμπεριλήφθηκε και ένα θετικό δείγμα ελέγχου για έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου (βλέπε «Υλικό της μελέτης»). Οι σημειακές μεταλλάξεις στο αυτοσωμικό γονίδιο *UBE3A* αφορούν ετερόζυγες αλλαγές στην αλληλουχία DNA. Συνεπώς, κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου η δημιουργία ετεροδιμερών επιτυγχάνεται μόνο με το προϊόν του δείγματος προς ανάλυση (test sample) και δεν απαιτείται η ανάμειξή του με φυσιολογικό δείγμα για τη συγκεκριμένη αλληλουχία. Σε περίπτωση ύπαρξης μετάλλαξης η μία αλυσίδα αντιπροσωπεύει το φυσιολογική αλληλουχία και η άλλη την παθολογική. Αντίθετα σε περιπτώσεις ομόζυγων μεταλλάξεων ή μεταλλάξεων σε γονίδια των φυλετικών χρωμοσωμάτων, απαιτείται πάντα η ανάμειξη με φυσιολογικό δείγμα, ώστε να δημιουργηθούν τα ετεροδιμερή.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα εξής:

1. *Δημιουργία ετεροδιμερών*: Ποσότητα ίση με 20μl δείγματος (PCR προϊόν) επωάζεται στους 95°C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι δύο αλυσίδες DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί η επαναδιάταξη των δύο αλυσίδων και η δημιουργία ομοδιμερών και ετεροδιμερών μορίων DNA με σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας μέχρι τους 25°C, σύμφωνα με τις συνθήκες:

- 95°C έως 85°C με ρυθμό -1°C/ δευτερόλεπτο
- 85°C έως 25°C με ρυθμό - 0.1°C/ δευτερόλεπτο

2. *Πέψη με το ένζυμο Surveyor nuclease*: Το δείγμα επωάζεται με το ένζυμο στους 46°C για 35 λεπτά. Σε ποσότητα δείγματος ίση με 20μl προστίθενται 3μl μίγματος που περιέχει το ένζυμο Surveyor nuclease, τον ενισχυτή Enhancer και BSA (Bovine Serum Albumin) 1% σε αναλογία 1:1:1. Η αντίδραση πέψης τερματίζεται με προσθήκη 2μl STOP solution. Όλα τα αντιδραστήρια που

χρησιμοποιούνται για την πέψη, εκτός από το διάλυμα BSA, παρέχονται στο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα της Transgenomic.

3.Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης: Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ποσότητα ίση με τον συνολικό όγκο της αντίδρασης πέψης (23μl) αναμιγνύεται με 2.5μl 6X Orange G Loading buffer και το δείγμα φορτώνεται στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120volt και ο χρόνος ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 45 λεπτά. Οι μάρτυρες μεγέθους που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο φάγος φχ174 (Biolabs) και μάρτυρας 1Kb. Βρωμιούχο αιθίδιο προστέθηκε κατά την παρασκευή των πηκτωμάτων αγαρόζης. Η απεικόνιση των ηλεκτροφορημάτων έγινε με το σύστημα UVP (Ultra Violet Products) Bioimaging Systems, και φωτογραφήθηκαν με το Video Graphic Printer της Sony.

4.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων ενός γονιδίου ή τμήματος ενός γονιδίου και την ανίχνευση αλλαγών σε αυτή, ακόμη και αλλαγή μίας βάσης στην αλληλουχία του DNA. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA στηρίζεται στην ενζυμική μέθοδο κατά Sanger, η αρχή της οποίας είναι ο τερματισμός της σύνθεσης της νέας αλυσίδας DNA σε συγκεκριμένες βάσεις οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να ανιχνευθούν. Πιο συγκεκριμένα, στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η μία αλυσίδα του DNA ως μήτρα για την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, με πρόδρομα μόρια όχι μόνο τριφωσφορικά νουκλεοσίδια (dNTPs) αλλά και, σε καθορισμένη συγκέντρωση, διδεόξυ ανάλογά τους ddNTPs (τριφωσφορικά 2', 3'-διδεόξυνουκλεοσίδια). Τα τελευταία διαφέρουν από τα δεόξυ- νουκλεοσίδια στην απουσία της υδροξυλομάδας (- OH) στο 3' και στο 2' άτομο άνθρακα. Τα ddNTPs μπορούν να ενσωματωθούν σε μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA σχηματίζοντας φωσφοδιεστερικό δεσμό με το προηγούμενο νουκλεοσίδιο (το 5' άτομο άνθρακα του ddNTP ενώνεται με το 3' άτομο άνθρακα του

προηγούμενου νουκλεοσιδίου). Όμως, κανένα ddNTP δεν μπορεί να συμμετάσχει σε φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 3' άτομο άνθρακα, δεδομένου ότι στερούνται την 3' υδροξυλομάδα. Αποτέλεσμα της δομής των ddNTPs είναι ότι η ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA λειτουργεί ως σημείο λήξης, γιατί το άκρο της αλυσίδας δεν έχει πλέον ελεύθερο 3'-OH .

Για την πραγματοποίηση της παραπάνω αντίδρασης απαιτείται, εκτός από το πρωταρχικό τμήμα DNA, το οποίο είναι προϊόν PCR αντίδρασης, το ένζυμο DNA πολυμεράση, και ένα ζεύγος εκκινητών (primer) συμπληρωματικό του υποστρώματος DNA προς ανάλυση. Τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις, κάθε μία ειδική για κάθε μία βάση (αδενίνη, κυτοσίνη, γουανίνη και θυμίνη), διεξάγονται ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας για κάθε μία, ένα μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) καθώς και μία συγκεκριμένη αναλογία ενός από τα τέσσερα διδεόξυ ανάλογα (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Με τον τρόπο αυτό, κάθε μία αντίδραση προχωράει με την σύνθεση συμπληρωματικού DNA και τερματίζεται κάθε φορά που ένα διδεόξυ τριφωσφορικό νουκλεοσίδιο (ddNTP) , συγκεκριμένο για κάθε μία αντίδραση, ενσωματώνεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Η αναλογία dNTP: ddNTP καθορίζεται έτσι ώστε στο τέλος κάθε μίας από τις τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις, να προκύπτει ένα σύνολο από τμήματα DNA διαφορετικού μήκους, με κοινό 5' άκρο και διαφορετικό 3'. Το 5' άκρο καθορίζεται από τον εκκινητή ενώ το 3' άκρο στο οποίο τερματίζεται η σύνθεση της αλυσίδας διαφέρει γιατί η ενσωμάτωση του ddNTP γίνεται κάθε φορά τυχαία στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα.

Η ανάλυση των αντιδράσεων sequencing πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο γενετικό αναλυτή Long- Read Tower™ System της Visible Genetics.

4.7.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΟ LONG- READ TOWER™ SYSTEM ΤΗΣ VISIBLE GENETICS

4.7.1.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA (DNA SEQUENCING)

Η αντίδραση sequencing πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*, της εταιρείας GE Healthcare, το οποίο χρησιμοποιεί το ένζυμο *Thermo Sequenase DNA Polymerase*. Η αντίδραση sequencing περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμικής αποδιάταξης του DNA, υβριδισμό του εκκινητή και πολυμερισμό των νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η γραμμική αύξηση των προϊόντων της αντίδρασης (cycle sequencing). Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων χρησιμεύουν ως υποστρώματα για την αντίδραση sequencing. Κάθε ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό κάθε εξωνίου (Πίνακας 4.5.1), φέρει την επιπλέον αλληλουχία M13 στο 5' άκρο του. Σε κάθε αντίδραση sequencing χρησιμοποιείται ένας από τους δύο σημασμένους M13 εκκινητές του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος (Cy5.5 M13 Forward primer και Cy5.0 M13 Reverse primer), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία M13 των προϊόντων PCR. Κάθε διάλυμα A, C, G, T περιέχει το αντίστοιχο τριφωσφορικό δεόξυ- νουκλεοσίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), το διδεόξυ ανάλογο (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) και το ένζυμο *Thermo Sequenase DNA Polymerase* (Πίνακας 4.7.1).

Πίνακας 4.7.1 Συστατικά των τεσσάρων αντιδραστηρίων του *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*, GE Healthcare

Αντιδραστήρια	Συστατικά	
A (adenine) reagent	1.33 μ M ddATP	<ul style="list-style-type: none"> • 40 mM Tris- HCl, pH 9.5 • 6 mM MgCl₂ • 0.04% TweenTM- 20 • 0.04% TritonTM X-100 • 0.08 mM 2- mercaptoethanol • 1.67 units/μl <i>Thermo Sequenase DNA Polymerase</i> with 0.00028 units/μl <i>Thermoplasma acidophilum</i> inorganic pyrophosphatase • 0.4mM of each one of dATP, dCTP, 7-deaza- dGTP και dTTP
C (cytosine) reagent	1.33 μ M ddCTP	
G (guanine) reagent	1.33 μ M ddGTP	
T (thymine) reagent	1.33 μ M ddTTP	

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης sequencing που πραγματοποιήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Τα προϊόντα PCR αραιώνονται με ddH₂O σε τελική συγκέντρωση 0.5-5.0 μ g δίκλωνου DNA και τελικό όγκο \leq 12 μ l. Πρακτικά, 3 μ l προϊόντος PCR αραιώνονται με την προσθήκη 9 μ l ddH₂O, και στην αντίδραση sequencing προστίθενται 3.0 μ l από το αραιωμένο δείγμα.
- Σε κάθε αντίδραση sequencing προστίθεται σημασμένος M13 Forward ή Reverse εκκινητής σε τελική συγκέντρωση 5 μ M.
- Ποσότητα ίση με 2 μ l από το μίγμα που περιέχει τον εκκινητή και το αραιωμένο PCR προϊόν, αναμιγνύεται με 2 μ l από κάθε ένα διάλυμα βάσης (A, C, G και T reagent).

Η αντίδραση sequencing πραγματοποιείται σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή και οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον Πίνακα 4.7.2.

Πίνακας 4.7.2 Συνθήκες αντίδρασης sequencing (*Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, GE Healthcare*)

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ
Αποδιάταξη DNA	95	30δευτ.	25
Υβριδισμός εκκινητών	55	30δευτ.	
Πολυμερισμός	72	1λεπτό	

4.7.1.2 ΚΑΘΕΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ SEQUENCING ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ *LONG- READ TOWER™ SYSTEM (VISIBLE GENETICS)*

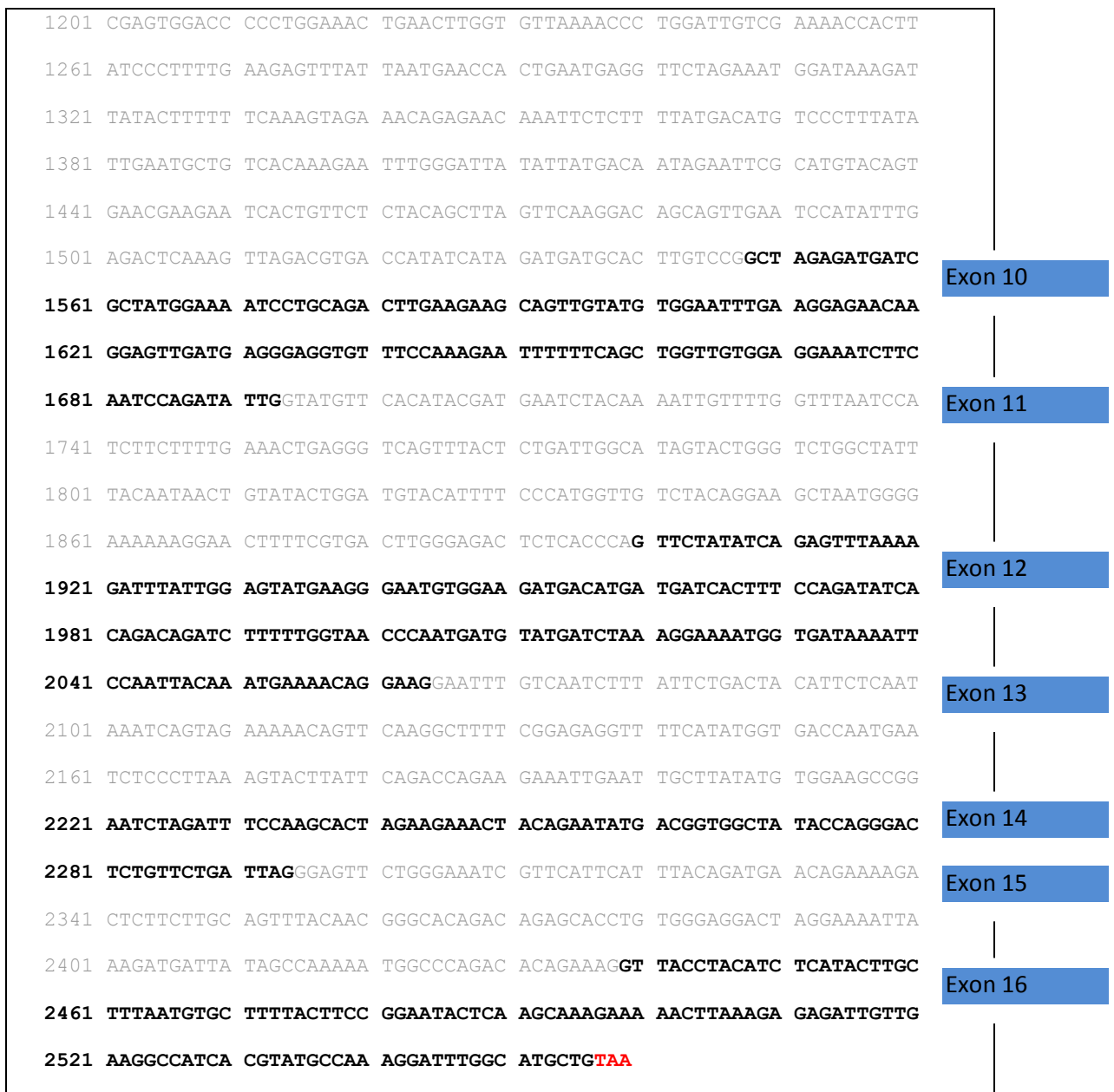
Τα προϊόντα της αντίδρασης sequencing ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% (SUREFILL™ 6% Sequencing Gel Cartridge, SIEMENS) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE (1X). Τα προϊόντα αναμιγνύονται με 6μl χρωστικής που περιέχει φορμαμίδιο (formamide loading dye) και αποδιάσσονται στους 72°C για 2 λεπτά. Μετά την αποδιάταξη τοποθετούνται σε πάγο και ποσότητα ίση με 2μl φορτώνονται στο πήκτωμα. Τα προϊόντα των 4 αντιδράσεων sequencing για κάθε δείγμα (μία αντίδραση για κάθε βάση) ηλεκτροφορούνται σε ξεχωριστές θέσεις στο πήκτωμα και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθορίζεται από το μέγεθος της αλληλουχίας του DNA που αναλύεται. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης δίνονται στον Πίνακα 4.7.3.

Πίνακας 4.7.3 Συνθήκες κάθετης ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Θερμοκρασία	55°C
Τάση	1200V
Ένταση Laser	50%
Διάρκεια ηλεκτροφόρησης	35λεπτά (για ανάλυση ~350βάσεων)
Ρυθμιστικό διάλυμα	TBE 1X

Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης sequencing, κάθε ένα από αυτά ανιχνεύεται με τον φθορισμό που προκαλεί η ειδική δέσμη φωτός (laser) στην χρωστική του κάθε εκκινητή, Cy5.0 (670nm) και Cy5.5 (694nm). Η πληροφορία που λαμβάνεται από τον φθορισμό καταγράφεται ηλεκτρονικά, αναλύεται και μετατρέπεται σε αλληλουχία βάσεων, η οποία αποθηκεύεται στην βάση δεδομένων του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η αλληλουχία κάθε εξωνίου που λαμβάνεται μετά την ηλεκτροφόρηση συγκρίνεται με την φυσιολογική αλληλουχία του γονιδίου (<http://snpper.chip.org/>), για τον εντοπισμό αντικαταστάσεων, ελλειμμάτων ή προσθήκης βάσεων. Η αρίθμηση των σημειακών αλλαγών στην κωδικοποιούσα περιοχή του *UBE3A* γονιδίου έγινε με την αλληλουχία GenBankX98032 (*H. sapiens* mRNA for E6-AP isoform- I) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Εικ. 4.7.1)

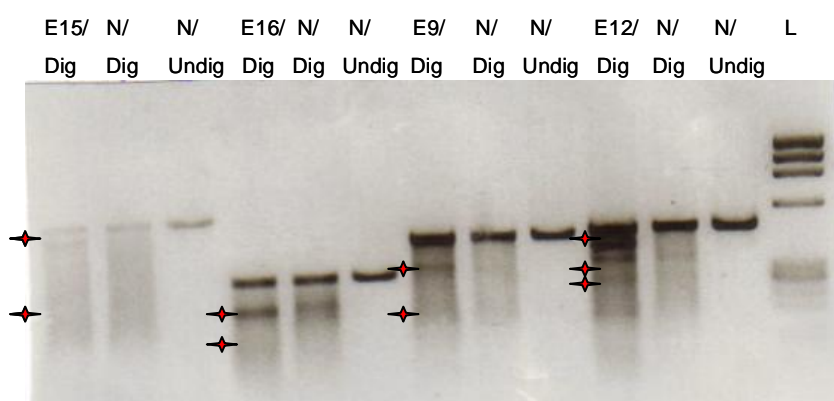
<pre> 1 AT* GAAGCGAG CAGCTGCAAA GCATCTAATA GAACGCTACT ACCACCAGTT AACTGAGGG 61 TGTGGAAATG AAGCCTGCAC GAATGAGTTT TGTGCTTCCT GTCCAACCTT TCTTCGTATG 121 GATAATAATG CAGCAGCTAT TAAAGCCCTC GAGCTTTATA AGATTAATGC AAAACTCTGT 181 GATCCTCATC CCTCCAAGAA AGGAGCAAGC TCAGCTTACC TTGAGAACTC GAAAGGTGCC 241 CCCAACAACT CCTGCTCTGA GATAAAAATG AACAAGAAAG GCGCTAGAAT TGATTTTAAA 301 GATGTGACTT ACTTAACAGA AGAGAAGGTA TATGAAATTC TTGAATTATG TAGAGAAAAGA 361 GAGGATTATT CCCCTTTAAT CCGTGTATT TTTCTAGTGC TGAGGCATTG 421 GTACAGAGCT TCCGGAAGT TAAACAACAC ACCAAGGAAG AACTGAAATC TCTTCAAGCA 481 AAAGATGAAG ACAAAGATGA AGATGAAAAG GAAAAAGCTG CATGTTCTGC TGCTGCTATG 541 GAAGAAGACT CAGAAGCATC TTCCTCAAGG ATAGGTGATA GCTCACAGGG AGACAACAAT 601 TTGCAAAAAT TAGGCCCTGA TGATGTGTCT GTGGATATTG ATGCCATTAG AAGGGTCTAC 661 ACCAGATTGC TCTCTAATGA AAAAATTGAA ACTGCCTTTC TCAATGCACT TGTATATTTG 721 TCACCTAACG TGGAATGTGA CTTGACGTAT CACAATGTAT ACTCTCGAGA TCCTAATTAT 781 CTGAATTTGT TCATTATCGG AATGGAGAAT AGAAATCTCC ACAGTCCTGA ATATCTGGAA 841 ATGGCTTTGC CATTATTTTG CAAAGCGATG AGCAAGCTAC CCCTTGCAGC CCAAGGAAAA 901 CTGATCAGAC TGTGGTCTAA ATACAATGCA GACCAGATTC GGAGAATGAT GGAGACATTT 961 CAGCAACTTA TTA CTTTATAA AGTCATAAGC AATGAATTTA ACAGTCGAAA TCTAGTGAAT 1021 GATGATGATG CCATTGTTGC TGCTTCGAAG TGCTTGAAAA TGGTTTACTA TGCAAATGTA 1081 GTGGGAGGGG AAGTGGACAC AAATCACAAT GAAGAAGATG ATGAAGAGCC CATCCCTGAG 1141 TCCAGCGAGC TGACACTTCA GGAAC TTTTG GGAGAAGAAA GAAGAAACAA GAAAGGTCTC </pre>	<p>Exon 8</p> <hr style="width: 100%;"/> <p>Exon 9</p>
--	--



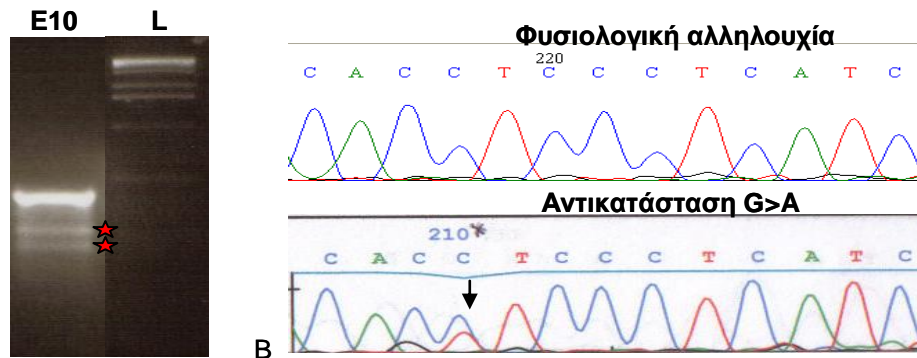
Εικόνα 4.7.1 Αλληλουχία κωδικοποιούσας περιοχής (mRNA) του γονιδίου *UBE3A* GenBank X98032 (*H. sapiens* mRNA for E6-AP isoform- I). Με κόκκινη γραμματοσειρά σημειώνονται η τριπλέτα έναρξης (ATG) και λήξης (TAA) της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων δίνεται στην αριστερή πλευρά, ενώ σημειώνονται και τα εξώνια 8- 16 του γονιδίου. *Τα νουκλεοτίδια AT της τριπλέτας ATG ανήκουν στο εξώνιο 7 του γονιδίου.

4.8 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ (Sequencing) ΓΙΑ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (POSITIVE CONTROLS)

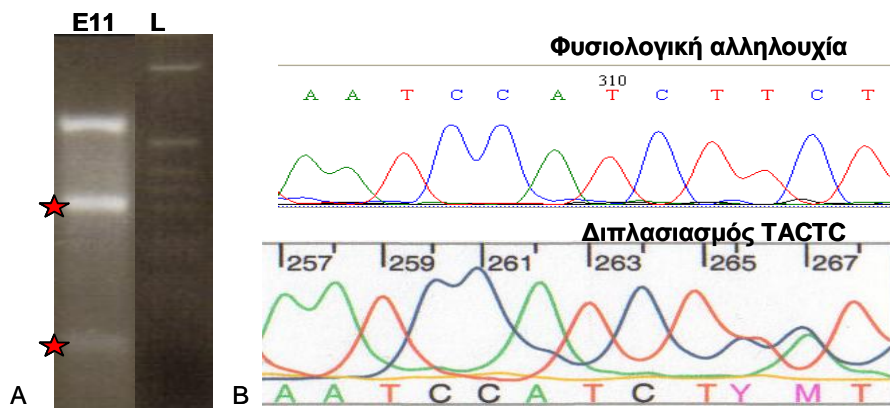
Ο εσωτερικός έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης ECMA πραγματοποιήθηκε με την χρήση θετικών δειγμάτων ελέγχου (positive controls), (βλέπε «Υλικό Της Μελέτης»). Σε κάθε εφαρμογή της αντίδρασης ECMA συμπεριλήφθηκε και το κατάλληλο για κάθε εξώνιο θετικό δείγμα (εκτός από τα εξώνια 7 και 8, όπου δεν ήταν διαθέσιμο θετικό δείγμα, οπότε χρησιμοποιήθηκε θετικό δείγμα άλλου εξωνίου). Στις εικόνες 4.8.1 έως 4.8.5 δίνονται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ECMA για κάθε ένα θετικό δείγμα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) των δειγμάτων αυτών για την επιβεβαίωση της μοριακής βλάβης.



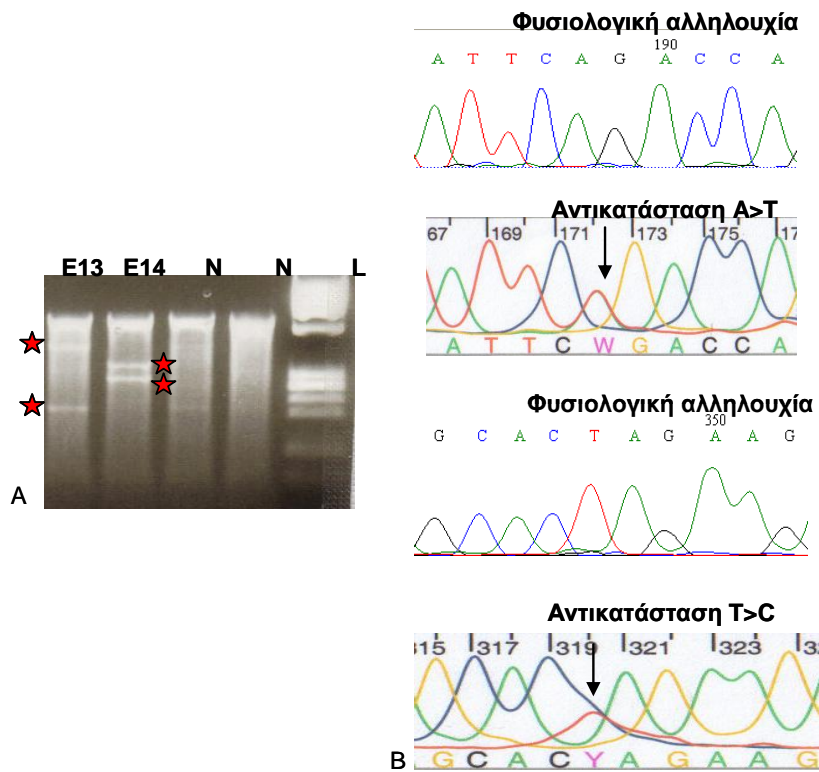
Εικόνα 4.8.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης ECMA για τα θετικά δείγματα ελέγχου των εξωνίων 9, 12, 15 και 16. Στην πρώτη στήλη φαίνεται το θετικό δείγμα κάθε εξωνίου μετά από πέψη με το ένζυμο Surveyor nuclease. Με αστερίσκο επισημαίνονται τα προϊόντα πέψης, που υποδηλώνουν την δημιουργία ετεροδιμερών, δηλ. την ύπαρξη σημειακής αλλαγής στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Στη δεύτερη και τρίτη στήλη φαίνεται φυσιολογικό δείγμα (χωρίς σημειακή αλλαγή) με/ και χωρίς πέψη με το ένζυμο Surveyor nuclease. L: ladder



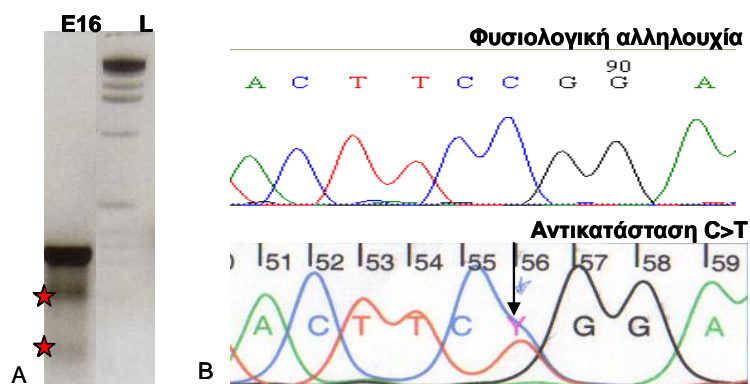
Εικόνα 4.8.2 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) (B) για το θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) του εξωνίου 10. Η σημειακή αλλαγή αφορά την αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) από το νουκλεοτίδιο της αδενίνης (A) στη θέση c.1636 (c.1636G>A) του c.DNA του γονιδίου (GenBank X98032).



Εικόνα 4.8.3 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) για το θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) του εξωνίου 11. Η σημειακή αλλαγή αφορά τον διπλασιασμό πέντε νουκλεοτιδίων στη θέση c.1739 (c. 1739_1743dupTACTC) του c.DNA του γονιδίου (GenBank X98032).



Εικόνα 4.8.4 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) για τα θετικά δείγματα ελέγχου (positive controls) των εξωνίων 13 και 14. Η σημειακή αλλαγή του εξωνίου 13 αφορά την αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (A) από το νουκλεοτίδιο της θυμίνης (T) στη θέση c.2182 (c.2182A>T) του c DNA του γονιδίου (GenBank X98032), ενώ στο εξώνιο 14, στη θέση c.2240, φαίνεται η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης (T) από το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης (C) (c.2240T>C).



Εικόνα 4.8.5 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) για το θετικό δείγμα ελέγχου (positive control) του εξωνίου 16. Η σημειακή αλλαγή αφορά την αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της κυτοσίνης (C) από το νουκλεοτίδιο της θυμίνης (T) στη θέση c.2480 (c.2480C>T) του c.DNA του γονιδίου (GenBank X98032).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ECMA ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ 7-16 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UBE3A* ΣΤΟ ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗ

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τα εξώνια 7- 16 του γονιδίου *UBE3A* για τους 53 ασθενείς της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ECMA και στη συνέχεια για την ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing), σε εκείνα τα δείγματα που παρατηρήθηκε η ύπαρξη δύο ή περισσότερων ζωνών, γεγονός που υποδεικνύει την δημιουργία ετεροδιμερών (Βλέπε «Μεθοδολογία»). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής αποκάλυψαν παθολογικές μεταλλάξεις σε δύο (2) ασθενείς (Πίνακας 5.1.1) και πολυμορφισμούς σε εννέα (9) ασθενείς (Πίνακας 5.1.2), τα οποία αναλύονται παρακάτω.

Πίνακας 5.1.1 Σημειακές μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου *UBE3A* που ανιχνεύθηκαν σε δύο AS ασθενείς της μελέτης

Ασθενείς	Θέση	Σημειακή νουκλεοτιδική αλλαγή*	Τύπος μετάλλαξης	Κληρονομικότητα	Βιβλιογραφικές αναφορές
AS41	Exon 9	c.418_419insG	Πλαισιοτροποποιητική (p. 148X)	Σποραδική (de νονο) ή γαμετικός μωσαϊκισμός στη μητέρα	Tzagaraki et al.,2009
AS49	Exon16	2507_2510del4	Πλαισιοτροποποιητική (p. 839X)	ΔΕ**	Fang et al, Lossie et al, Rapakko et al, Hitchins et al, Camprubi et al., 2009

*Αρίθμηση σύμφωνα με το GenBank accession number X98032

** ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε λόγω έλλειψης βιολογικού υλικού των γονέων

Πίνακας 5.1.2 Πολυμορφισμοί στο γονίδιο UBE3A που ανιχνεύθηκαν σε εννέα ασθενείς της μελέτης

Ασθενείς	Θέση	Σημειακή νουκλεοτιδική αλλαγή*	Τύπος μετάλλαξης	Κληρονομικότητα	Βιβλιογραφικές αναφορές
AS10, AS16, AS31, AS44, AS51	Ιντρόνιο 7	c.3-66_68delGAT (GATGAT>GAT)	-	ΔΕ [†]	Fang et al. (1999)
AS 51	Εξώνιο 9	c.532G>A	Παρερμηνεύσιμη (A178T)	Μητρική	Matsuura et al. (1997), Fang et al. (1999), Malzac et al. (1998), Baumer et al, Rappako et al, Camprubi et al., 2009
AS36, AS47	Ιντρόνιο 10	c.1694 -58T>G**	-	ΔΕ [†]	Camprubi C et al (2008)
AS37	Ιντρόνιο 14	c.2294 + 119A>G	-	Πατρική	Παρούσα μελέτη

* Αρίθμηση σύμφωνα με το GenBank accession number X98032

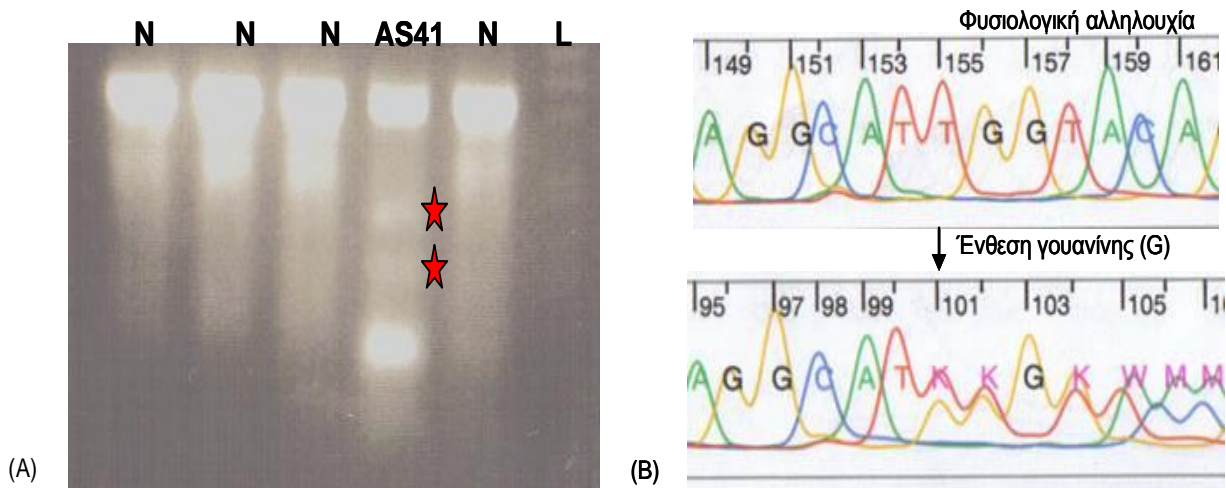
** Αντιστοιχεί στο SNP rs10519485: A>C

† ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε λόγω έλλειψης βιολογικού υλικού των γονέων

5.1.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΣΑ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A

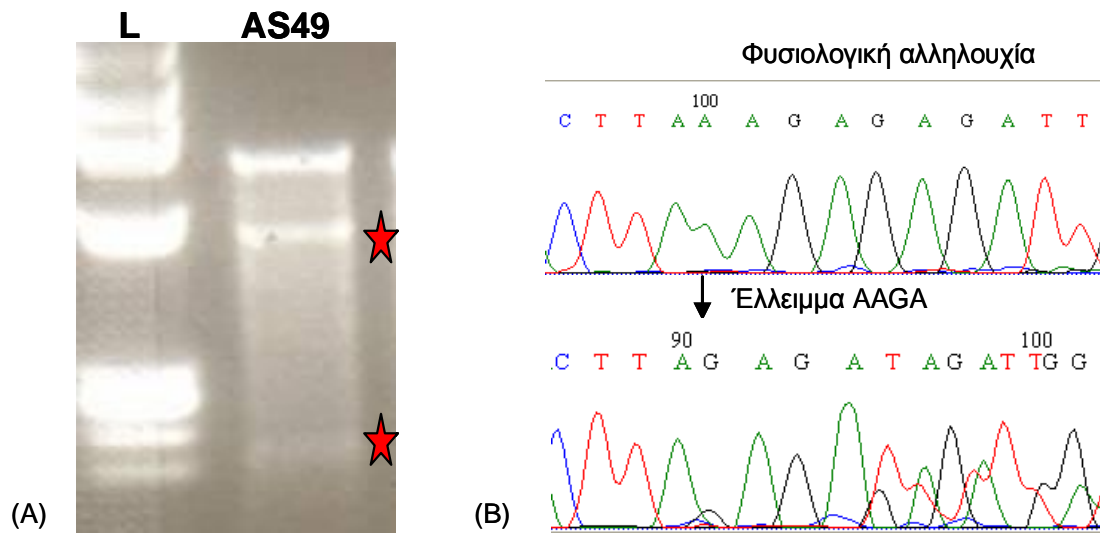
Σημειακές μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου *UBE3A* ανιχνεύθηκαν σε δύο από τους σαράντα τρεις (5%) ασθενείς της μελέτης. Και οι δύο ήταν σποραδικές περιπτώσεις και παραπέμφθηκαν για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman λόγω της ψυχοκινητικής καθυστέρησης σε συνδυασμό με το τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) και την μικροκεφαλία (Πίνακας 3.1). Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είναι οι εξής:

- **Ασθενής AS41:** Η ένθεση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) στην θέση 418 του εξωνίου 9, **c.418_419insG**, που ανιχνεύθηκε στον ασθενή **AS41**, προκαλεί αλλαγή στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και δημιουργεί κωδικόνιο τερματισμού στην θέση p.148 του πρωτεϊνικού προϊόντος E6AP (ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη- nonsense mutation). Η μετάλλαξη αυτή δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους δύο γονείς του παιδιού και συνεπώς, πρόκειται για *de novo* αλλαγή ή αφορά την ύπαρξη γαμετικού μωσαϊκισμού στη μητέρα. Η συσχέτιση της συγκεκριμένης γενετικής αλλαγής με την κλινική εικόνα του ασθενούς AS41 βασίζεται στο γεγονός ότι η βλάβη επηρεάζει κρίσιμες περιοχές της πρωτεΐνης E6AP και η κολοβή πλέον πρωτεΐνη (truncated protein) δεν είναι λειτουργική. Τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς AS41 περιλαμβάνουν ήπια διανοητική καθυστέρηση η οποία συνοδεύεται από διαταραχές λόγου και κινητικά προβλήματα, σπασμούς, μικροκεφαλία καθώς και τυπικό παθολογικό ΗΕΓ (Πίνακας 3.1)



Εικόνα 5.1.1 Αποτελέσματα (A) της ανάλυση ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) για το εξώνιο 9 του ασθενούς AS41. A) Η ανάλυση ECMA για το εξώνιο 9 αποκάλυψε προϊόντα πέψης (αστερίσκοι) στον ασθενή AS41, που υποδηλώνουν την δημιουργία ετεροδιμερών και την ύπαρξη σημειακής αλλαγής στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. B) Η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 9 αποκάλυψε την ένθεση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) στη θέση c.418 (c. 418_419insG) του c.DNA του γονιδίου (GenBank X98032).

- Ασθενής AS49:** Το έλλειμμα των τεσσάρων βάσεων από την θέση 2507 του εξωνίου 16, **c.2507_2510del4**, που ανιχνεύθηκε στον ασθενή **AS49**, είναι μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη (nonsense mutation), που προκαλεί αλλαγή στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και δημιουργεί κωδικόνιο λήξης στην θέση p.839 του πρωτεϊνικού προϊόντος E6AP. Ο προσδιορισμός της κληρονομικότητας της μετάλλαξης δεν ήταν δυνατός στην οικογένεια του ασθενούς AS49. Παρόλα αυτά, η σοβαρή βλάβη που προκαλείται στο πρωτεϊνικό προϊόν από την συγκεκριμένη γενετική αλλαγή, όπως επίσης και το γεγονός ότι αποτελεί γνωστή παθολογική μετάλλαξη, επιβεβαιώνει την συσχέτιση της σημειακής αυτής αλλαγής με το φαινότυπο του ασθενούς AS49. Τα κλινικά χαρακτηριστικά του, εκτός από το τυπικό παθολογικό ΗΕΓ και την μικροκεφαλία, περιλαμβάνουν ψυχοκινητική καθυστέρηση με διαταραχές λόγου και κινητικά προβλήματα (Πίνακας 3.1).



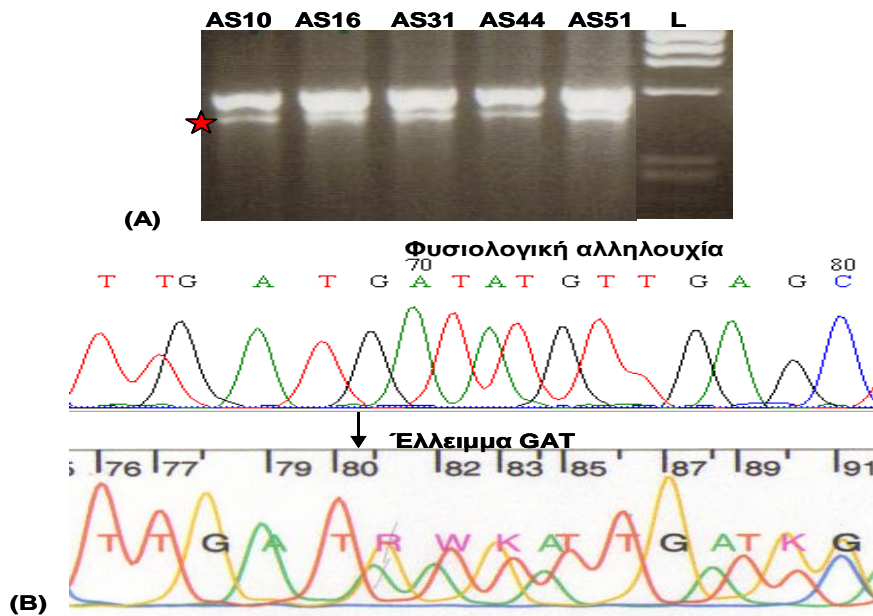
Εικόνα 5.1.2 Αποτελέσματα (A) της ανάλυση ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) για το εξώνιο 16 του ασθενούς AS49. A) Η ανάλυση ECMA για το εξώνιο 16 αποκάλυψε προϊόντα πέψης (αστερίσκοι) στον ασθενή AS49, που υποδηλώνουν την δημιουργία ετεροδιμερών και την ύπαρξη σημειακής αλλαγής στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. B) Η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 16 αποκάλυψε έλλειμμα 4 νουκλεοτιδίων (AAGA) από τη θέση c.2507 (c. 2507_2510del4) του c.DNA του γονιδίου (GenBank X98032).

5.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *UBE3A*

Η μοριακή μελέτη του γονιδίου *UBE3A* αποκάλυψε την ύπαρξη πέντε σημειακών αλλαγών σε κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως πολυμορφισμοί (Πίνακας 5.1.2). Ένας από αυτούς, c.2064+9T>C, ανιχνεύθηκε σε φυσιολογικό άτομο και όχι σε ασθενή της μελέτης. Επίσης, ο πολυμορφισμός c. 2294+119A>G δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία. Αναλυτικά, οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύθηκαν είναι οι εξής:

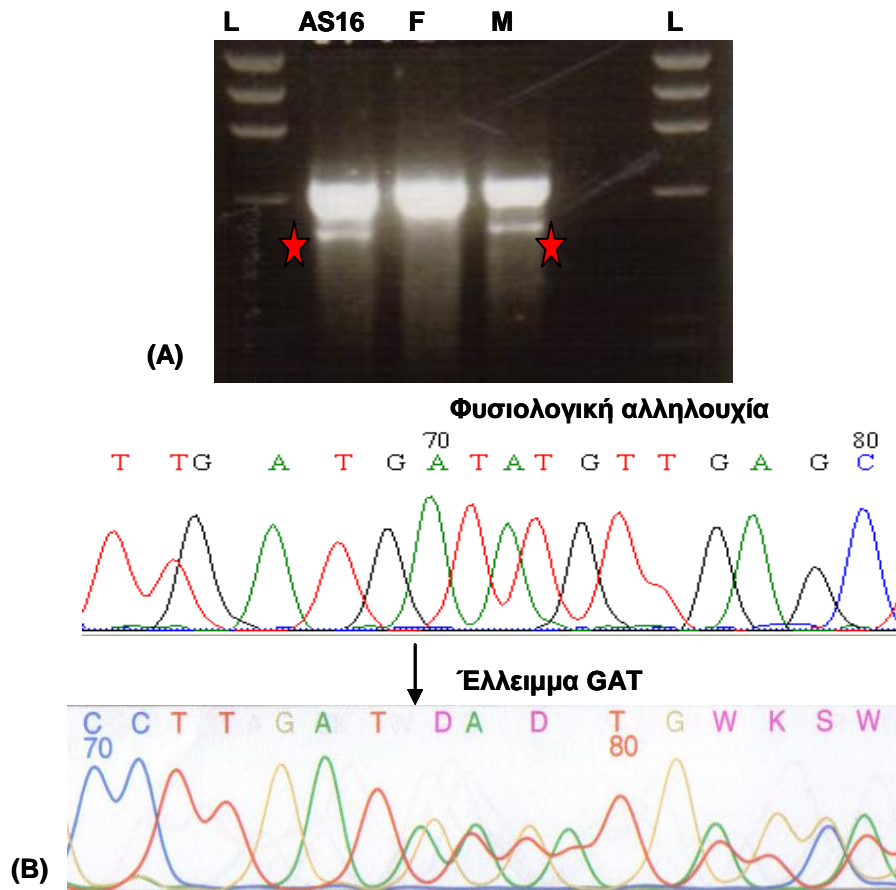
5.1.2.A ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΕ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΣΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UBE3A*

α) c. 3- 66_68delGAT: Το έλλειμμα της τριπλέτας GAT στην περιοχή του ιντρονίου 7 ανιχνεύθηκε σε πέντε από τους πενήντα τρεις ασθενείς της μελέτης (9%) (Εικ. 5.1.3). Η αλλαγή αυτή δεν σχετίζεται με τον φαινότυπο του συνδρόμου Angelman, αλλά αποτελεί γνωστό πολυμορφισμό [88].



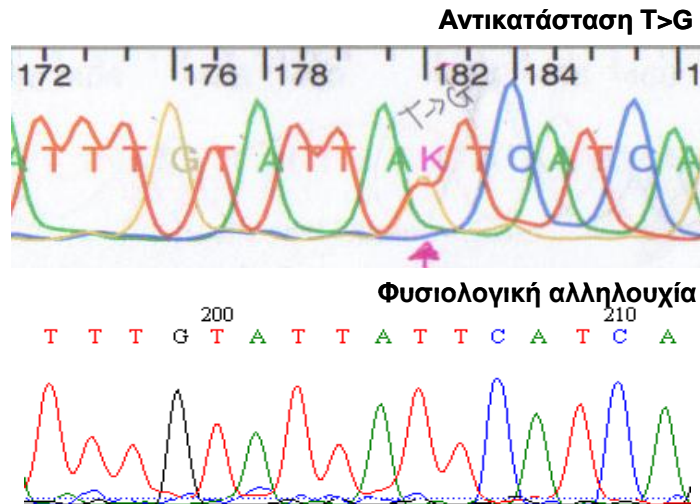
Εικόνα 5.1.3 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) στους πέντε ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό c.3-66_68delGAT στο ιντρόνιο 7. A) Η ανάλυση ECMA για το εξώνιο 8, αποκάλυψε την ύπαρξη προϊόντων πέψης (αστερίσκος), που υποδηλώνουν παρουσία σημειακής αλλαγής στην αλληλουχία των βάσεων. B) Η ανάλυση πρωτοδιάταξης του εξωνίου 8 και τμήματος των ιντρονικών περιοχών εκατέρωθεν αυτού, αποκάλυψε το έλλειμμα τριών νουκλεοτιδίων (GAT) στο ιντρόνιο 8 του γονιδίου UBE3A.

Στον ασθενή AS16, όπου η μελέτη των βιολογικών γονέων ήταν εφικτή, αποκαλύφθηκε ότι ο πολυμορφισμός c. 3- 66_68delGAT , βρίσκεται στο μητρικό αλληλόμορφο (Εικόνα 5.1.4).



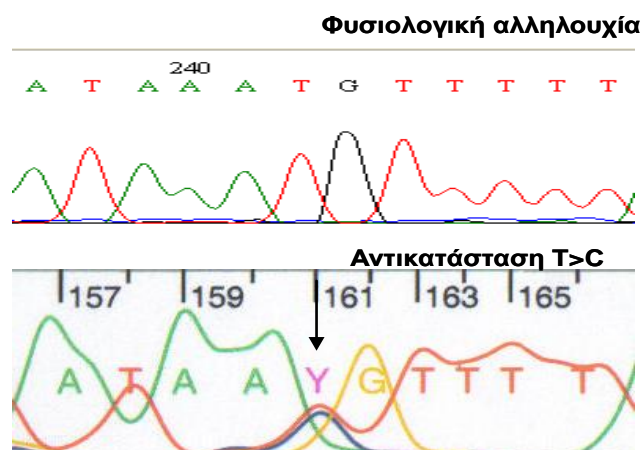
Εικόνα 5.1.4 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 8 στους γονείς του ασθενή AS16. A) Η ανάλυση ECMA αποκάλυψε το ίδιο πρότυπο στη μητέρα του ασθενούς AS16. B) Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης ECMA, πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση πρωτοδιάταξης του εξωνίου 8 και τμήματος των ιντρονικών περιοχών εκατέρωθεν αυτού, στην μητέρα του ασθενούς AS16.

β) c. 1694- 58T>G: Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης (T) από το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G) στην περιοχή του ιντρονίου 10 ανιχνεύθηκε σε δύο από τους πενήντα τρεις ασθενείς της μελέτης (~4%). Η αλλαγή αυτή δεν σχετίζεται με τον φαινότυπο του συνδρόμου Angelman, αλλά αποτελεί γνωστό πολυμορφισμό [96].



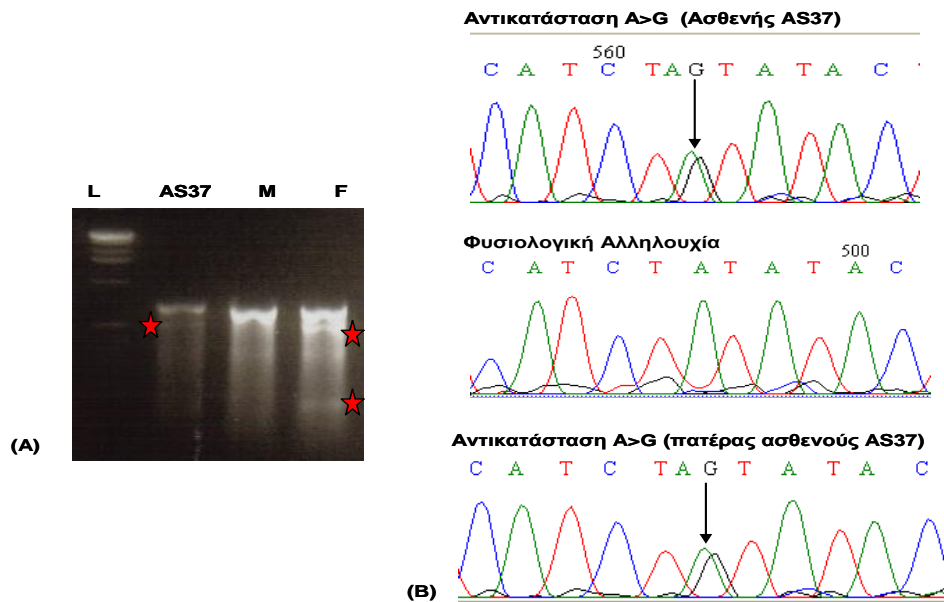
Εικόνα 5.1.5 Αποτελέσματα της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 10, όπου αποκαλύπτεται η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης (T) από το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G) (c.1694-58T>G).

γ) c. 2064+9T>C: Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης (T) από το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης (C) στην περιοχή του ιντρονίου 12 ανιχνεύθηκε σε ένα φυσιολογικό άτομο που χρησιμοποιήθηκε αρχικά σαν αρνητικό άτομο ελέγχου (negative control). Η σημειακή αυτή αλλαγή δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στην διεθνή βιβλιογραφία. Έχει καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων LOVD (www.lovd.org) με απροσδιόριστη παθογενετικότητα. Η αλλαγή αυτή δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τους πενήντα τρεις ασθενείς της μελέτης. Ο έλεγχος της κληρονομικότητας έδειξε ότι το φυσιολογικό άτομο έφερε την σημειακή αυτή αλλαγή στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο, δεδομένο το οποίο επιτρέπει τον χαρακτηρισμό της αλλαγής αυτής ως πολυμορφισμό.



Εικόνα 5.1.6 Αποτελέσματα της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 12, όπου φαίνεται η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης (T) από το νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης (C) (c.2064+ 9T>C).

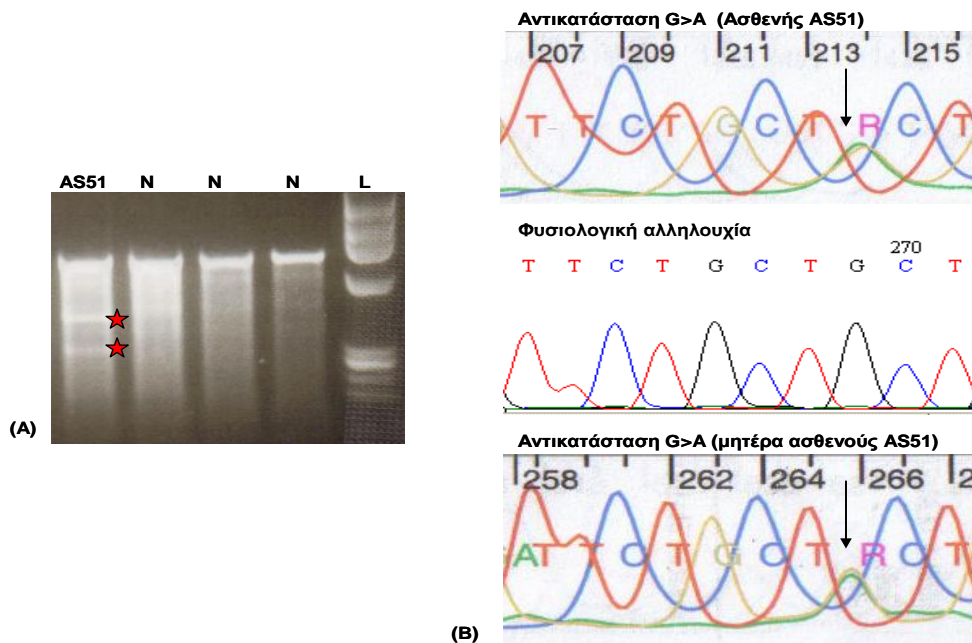
δ) c. 2294+119A>G: Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (A) από το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G) στην περιοχή του ιντρονίου 14, ανιχνεύθηκε σε έναν από τους πενήντα τρεις ασθενείς της μελέτης και ο προσδιορισμός της κληρονομικότητας έδειξε ότι έχει πατρική προέλευση. Η σημειακή αυτή αλλαγή δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στην διεθνή βιβλιογραφία και για τον χαρακτηρισμό της, αναλύθηκαν 50 φυσιολογικά άτομα από τα οποία το ένα (1) έφερε την αλλαγή αυτή (2%). Συνεπώς, η **c. 2294+119A>G** χαρακτηρίστηκε ως πολυμορφισμός.



Εικόνα 5.1.7 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) του ιντρονίου 14 στον ασθενή AS37 και τους γονείς του. A) Στην ανάλυση ECMA φαίνονται τα προϊόντα πέψης στον ασθενή και τον πατέρα του. B) Η ανάλυση πρωτοδιάταξης αποκάλυψε την αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (A) από το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G) στη θέση c. 2294+119 του ιντρονίου 14 (c. 2294+119T>G).

5.1.2B. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΣΕ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΣΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UBE3A*

α) c. 532G>A: Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) από το νουκλεοτίδιο της αδενίνης (A), στην θέση 532 του εξωνίου 9, ανιχνεύθηκε σε έναν από τους πενήντα τρεις ασθενείς της μελέτης (~2%). Πρόκειται για μία παρερμηνεύσιμη αλλαγή που έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνη (A) από το αμινοξύ θρεονίνη (T) στην θέση 178 του πρωτεϊνικού προϊόντος. Η αντικατάσταση αυτή έχει αναφερθεί αρκετές φορές στην διεθνή βιβλιογραφία όπου έχει χαρακτηριστεί ως πολυμορφισμός δεδομένου ότι δεν επηρεάζει την λειτουργία της πρωτεΐνης E6-AP [38, 87-89, 91, 96].



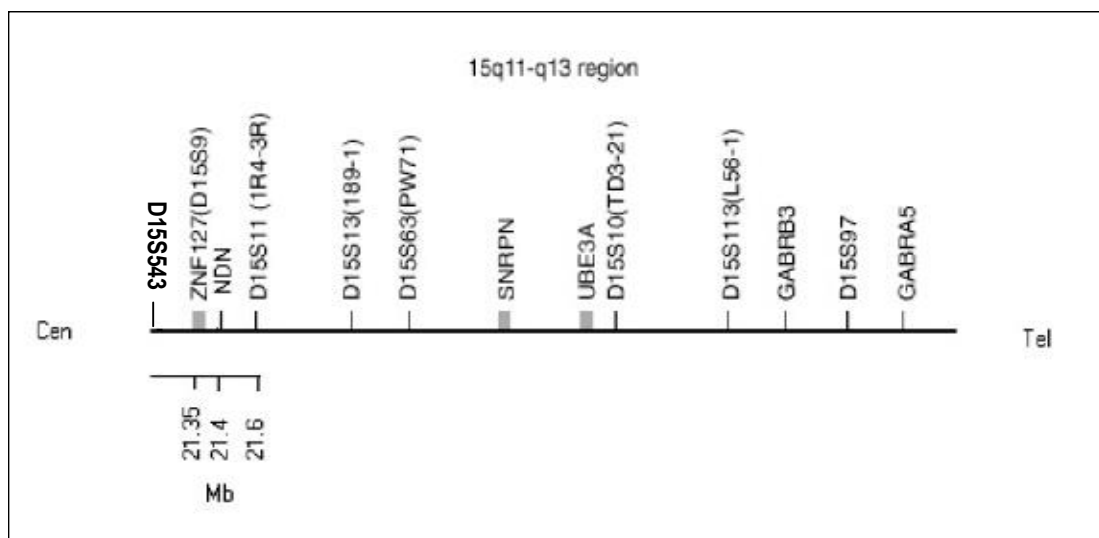
Εικόνα 5.1.8 Αποτελέσματα (A) της ανάλυσης ECMA και (B) της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) του εξωνίου 9 στον ασθενή AS51, όπου αποκαλύφθηκε ότι ο ασθενής φέρει την σημειακή αλλαγή c.532G>A στο μητρικό του αλληλόμορφο.

5.2 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ AS41

Λόγω της ύπαρξης της παθολογικής μετάλλαξης **c.418_419insG** στον ασθενή AS41 και της πιθανότητας γαμετικού μωσαϊκισμού στη μητέρα του, προσφέρθηκε γενετική συμβουλευτική στην οικογένεια σχετικά με τον πιθανό τρόπο κληρονομικότητας της συγκεκριμένης μετάλλαξης και τον κίνδυνο επανεμφάνισης σε επόμενη κύηση.

Προγεννητικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε δύο επόμενες κυήσεις στην οικογένεια AS41 με την μοριακή μελέτη του εξωνίου 9 του γονιδίου *UBE3A* και την μοριακή ανάλυση των απλοτύπων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Η μελέτη του εξωνίου 9 πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή δύο διαφορετικών μεθόδων, της μεθόδου ECMA και της ανάλυσης της πρωτοδιάταξης του DNA (sequencing). Η μοριακή μελέτη απλοτύπων της 15q11-q13 περιοχής πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση πέντε δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών δεικτών κατά μήκος της περιοχής (D15S543,

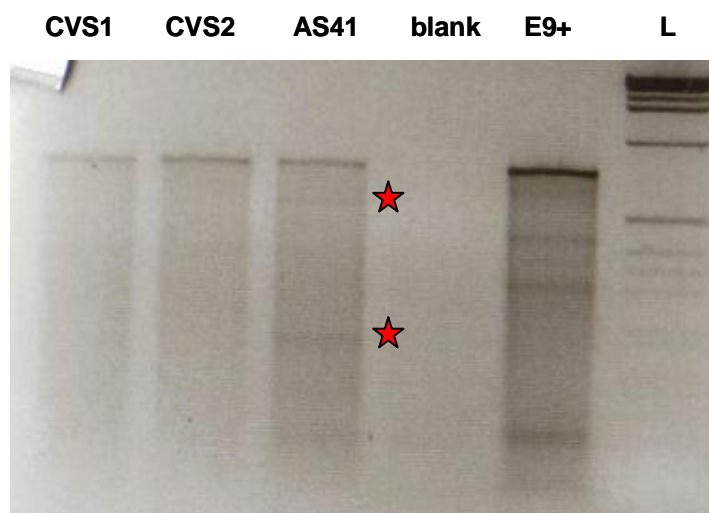
D15S11, D15S10, D15S113 και GABRB3) (Εικ. 5.2.1) και 2 πολυμορφικών δεικτών στο τελομερικό άκρο του χρωμοσώματος 15 (CYP19 και D15S87) (βλέπε Μεθοδολογία).



Εικόνα 5.2.1 Γενωμική οργάνωση της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Δίνονται οι θέσεις των πέντε πολυμορφικών δεικτών (D15S543, D15S11, D15S10, D15S113 και GABRB3) που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των απλοτύπων της περιοχής στους δύο προγεννητικούς ελέγχους της οικογένειας AS41.

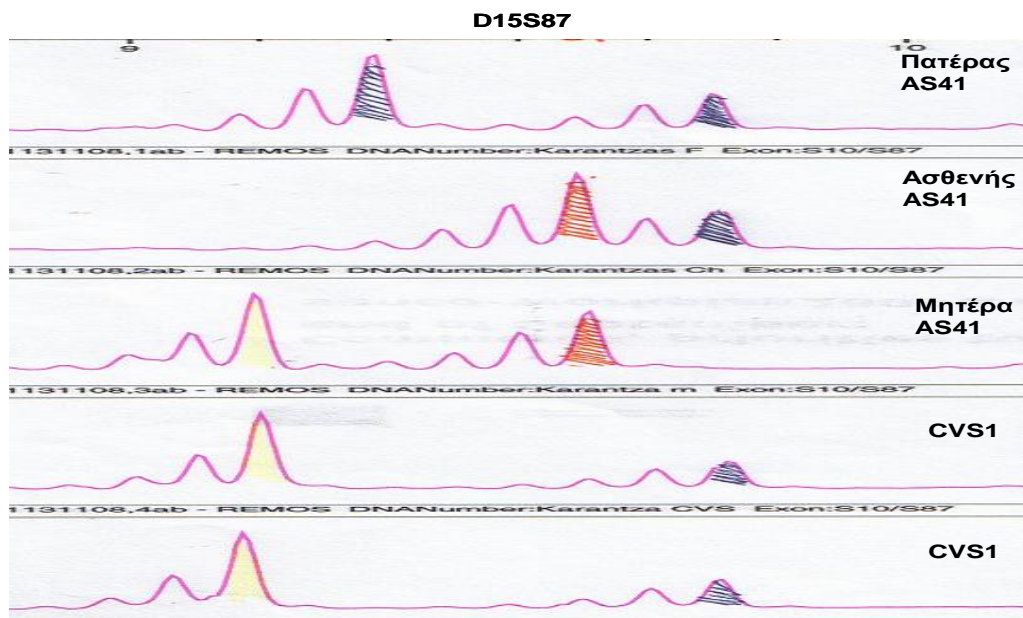
5.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΤΟ ΠΡΩΤΟ ΕΜΒΡΥΟ (CVS1) ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ AS41

i) Μελέτη του εξωνίου 9 του γονιδίου *UBE3A*: Η μέθοδος ECMA αποκάλυψε την ύπαρξη φυσιολογικού προϊόντος για το εξώνιο 9 του γονιδίου *UBE3A* και η ανάλυση πρωτοδιάταξης (sequencing) επιβεβαίωσε την ύπαρξη φυσιολογικής αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (Εικ 5.2.2) στο πρώτο έμβρυο της οικογένειας. Κατά συνέπεια το έμβρυο δεν φέρει την παθολογική μετάλλαξη του πάσχοντος μέλους AS41.

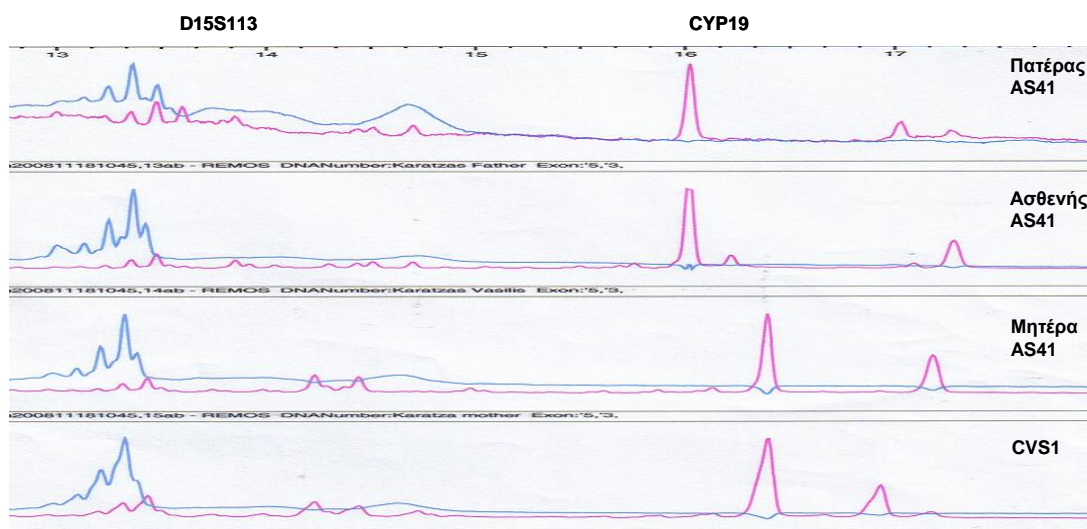


Εικόνα 5.2.2 Αποτελέσματα προγεννητικού ελέγχου στην οικογένεια AS41. Η μοριακή ανάλυση ECMA για το εξώνιο 9, αποκάλυψε φυσιολογικό πρότυπο και για τα δύο έμβρυα (CVS1 και CVS2). AS41: πάσχον άτομο της οικογένειας που φέρει την μετάλλαξη c.418_419insG, E9+: θετικό δείγμα ελέγχου (positive control), L: ladder

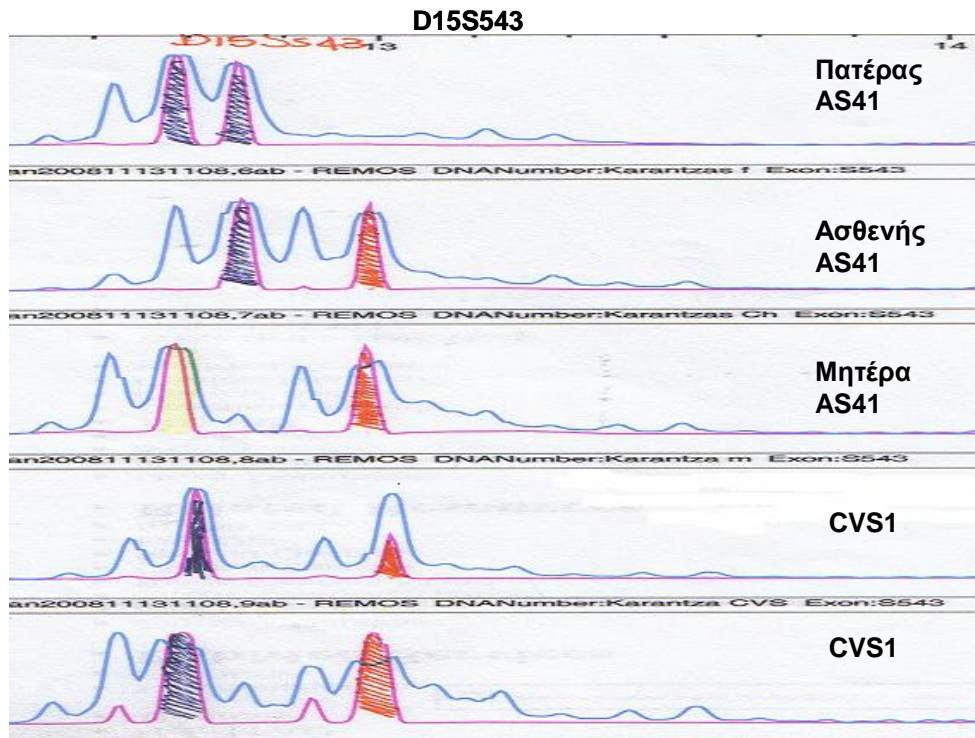
ii) Μοριακή μελέτη απλοτύπων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13: Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη του ίδιου μητρικού απλότυπου στο πρώτο έμβρυο και στο πάσχον παιδί της οικογένειας (AS41), όπως φαίνεται από την ανάλυση των πολυμορφικών θέσεων D15S543, D15S11, D15S10 και GABRB3, ενώ στη θέση D15S113 η οικογένεια είναι μη πληροφοριακή (Εικόνες 5.2.5 έως 5.2.8). Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με την απουσία της παθολογικής μετάλλαξης στο έμβρυο, υποδηλώνει την πιθανότητα η μετάλλαξη αυτή είτε να έχει δημιουργηθεί de novo στο πάσχον άτομο (AS41) είτε να οφείλεται σε γαμετικό μωσαϊκισμό της μητέρας.



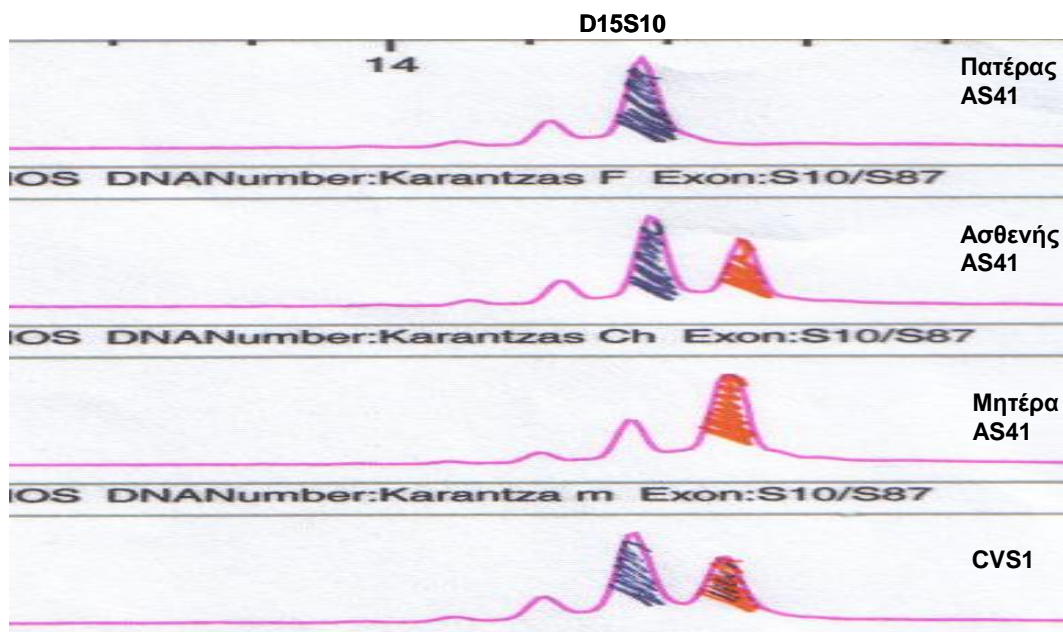
Εικόνα 5.2.3 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη D15S87 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβρυο έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον άτομο AS41 (το έμβρυο έχει κληρονομήσει το μπλε μητρικό αλληλόμορφο ενώ το πάσχον παιδί το κόκκινο).



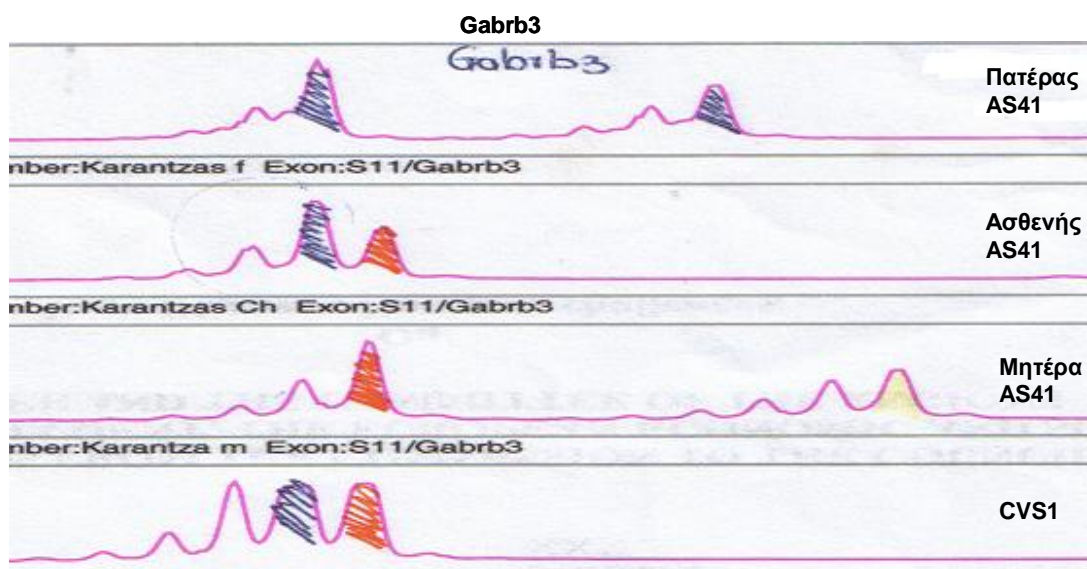
Εικόνα 5.2.4 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας των πολυμορφικών δεικτών D15S113 και CYP19 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβρυο έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον άτομο AS41 στη θέση CYP19, ενώ η θέση D15S113 είναι μη πληροφοριακή για την οικογένεια.



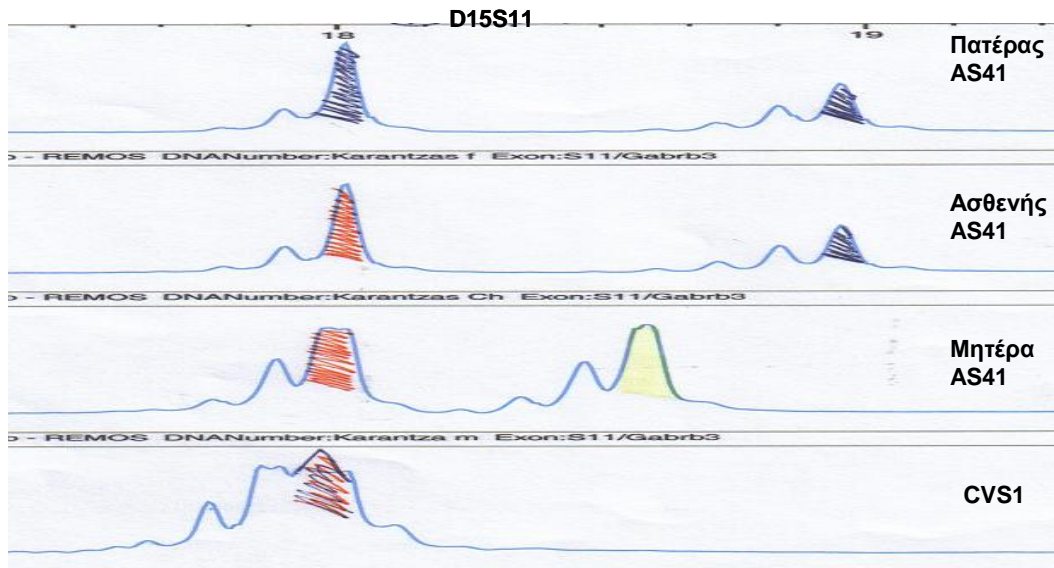
Εικόνα 5.2.5 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη D15S543 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβρυο (CVS1) έχει κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο με το πάσχον άτομο AS41 (κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο).



Εικόνα 5.2.6 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη D15S10 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβρυο (CVS1) έχει κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο με το πάσχον άτομο AS41 (κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο).



Εικόνα 5.2.7 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη GABRB3 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβρυο (CVS1) έχει κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο με το πάσχον άτομο AS41 (κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο).

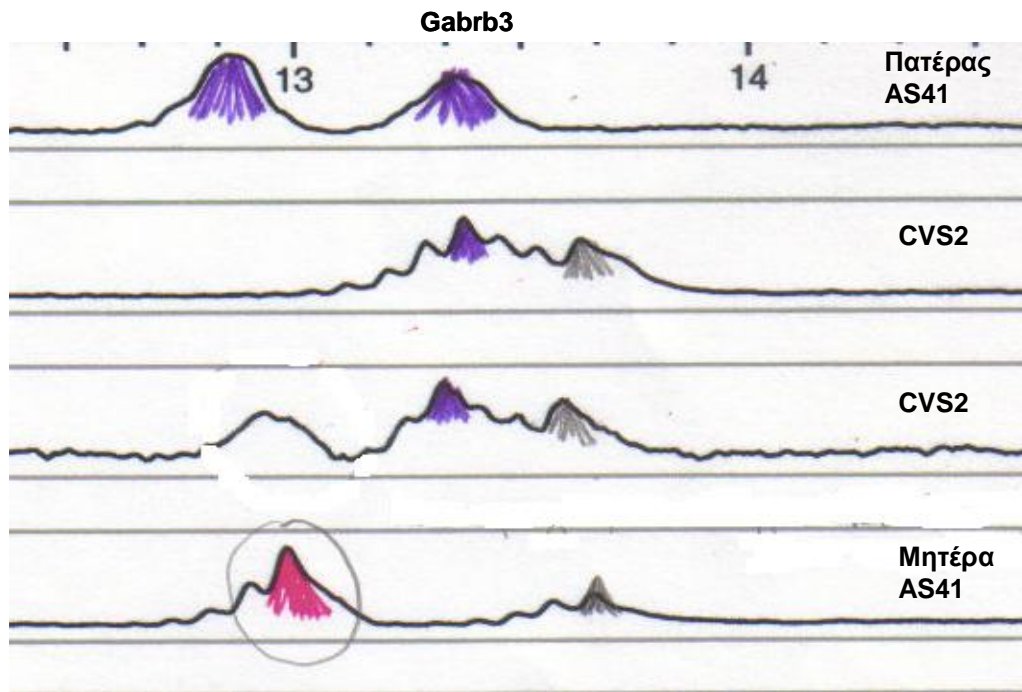


Εικόνα 5.2.8 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη D15S11 στην οικογένεια AS41 και στο CVS1. Το έμβryo (CVS1) έχει κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο με το πάσχον άτομο AS41 (κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο).

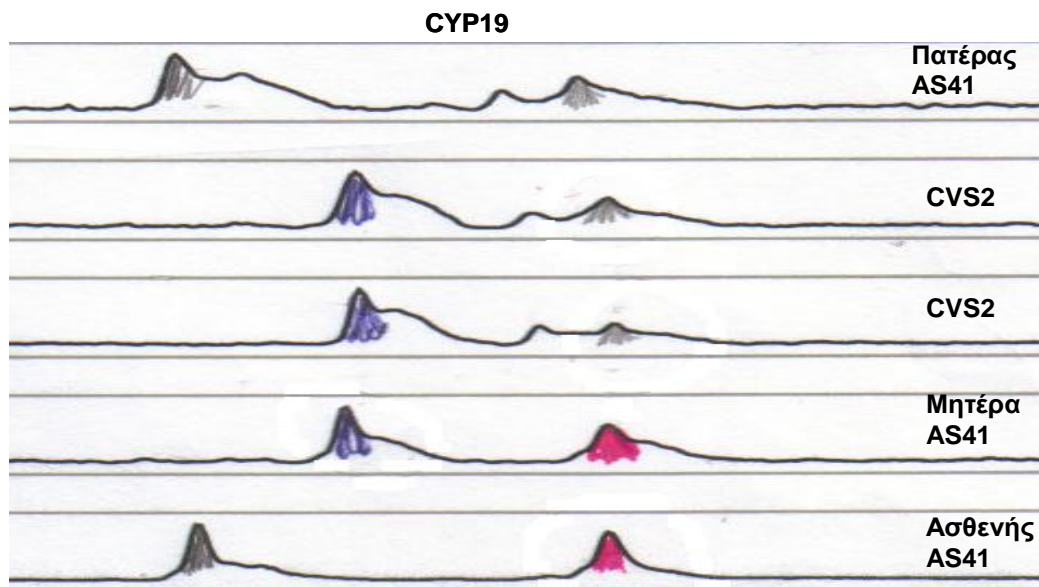
5.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟ ΕΜΒΡΥΟ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ AS41

i) Μελέτη του εξωνίου 9 του γονιδίου *UBE3A*: Η μοριακή ανάλυση του εξωνίου 9 αποκάλυψε την ύπαρξη φυσιολογικής αλληλουχίας νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 9 στο δεύτερο έμβρυο της οικογένειας (CVS2). Κατά συνέπεια, ούτε το δεύτερο έμβρυο (CVS2) φέρει την παθολογική μετάλλαξη του πάσχοντος ατόμου (Εικ. 5.2.2)

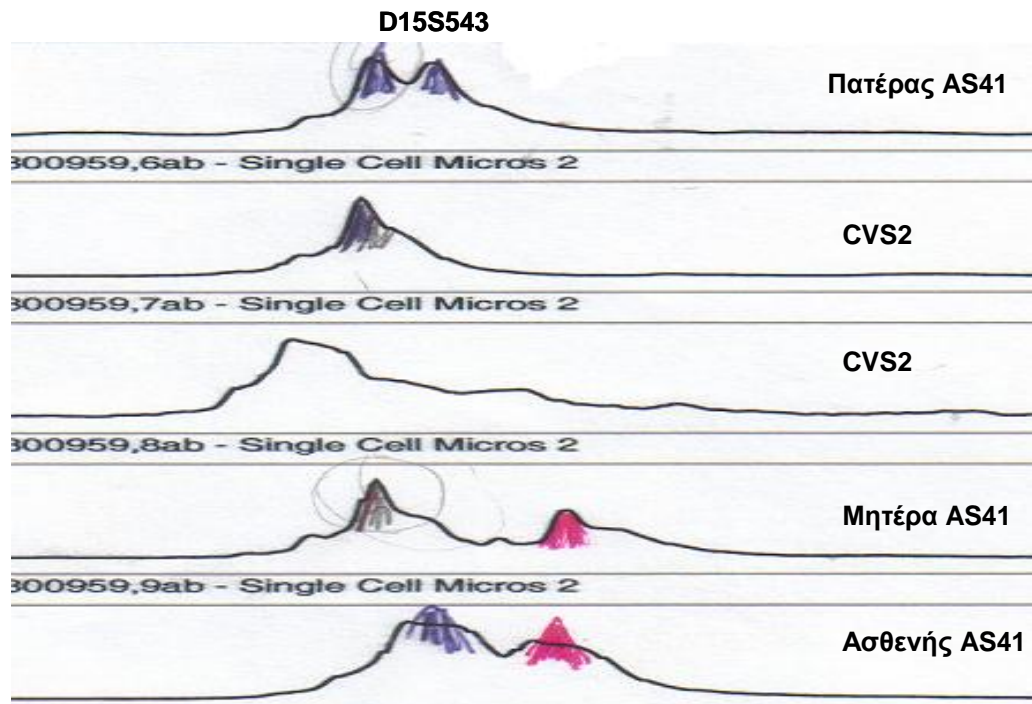
ii) Μοριακή μελέτη απλοτύπων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13: Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν την ύπαρξη διαφορετικού μητρικού απλότυπου στο έμβρυο (CVS2) και στο πάσχον παιδί της οικογένειας (AS41), όπως φαίνεται από την ανάλυση των πολυμορφικών θέσεων D15S543 και GABRB3 (Εικόνες 5.2.9 έως 5.2.11), οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου *UBE3A* (Εικ.5.2.1).



Εικόνα 5.2.9 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη GABRB3 στην οικογένεια AS41 και στο CVS2. Το έμβρυο (CVS2) έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον άτομο AS41 (ο AS41 έχει κληρονομήσει το κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο- γνωστό από τον πρώτο προγεννητικό έλεγχο-, ενώ το CVS2 το γκρι μητρικό αλληλόμορφο).



Εικόνα 5.2.10 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη CYP19 στην οικογένεια AS41 και στο CVS2. Το έμβρυο (CVS2) έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον άτομο AS41 (ο AS41 έχει κληρονομήσει το κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο, ενώ το CVS2 το μπλε μητρικό αλληλόμορφο).



Εικόνα 5.2.11 Μοριακή ανάλυση κληρονομικότητας του πολυμορφικού δείκτη D15S543 στην οικογένεια AS41 και στο CVS2. Το έμβρυο (CVS2) έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον άτομο AS41 (ο AS41 έχει κληρονομήσει το κόκκινο μητρικό αλληλόμορφο, ενώ το CVS2 το μπλε μητρικό αλληλόμορφο).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *UBE3A* ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ (N=53)

6.1.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *UBE3A*

Όλα τα άτομα (N=53) μελετήθηκαν για την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων στα εξώνια 8-16 του γονιδίου *UBE3A*. Τα άτομα αυτά περιλαμβάνουν τους ασθενείς της ομάδας (Α) (που είχαν υποβληθεί σε ΗΕΓ), της ομάδας (Β) (που δεν είχαν υποβληθεί σε ΗΕΓ) καθώς και τους ασθενείς εκείνους στους οποίους η μοριακή μελέτη άλλων γονιδίων και χρωμοσωμικών περιοχών αποκάλυψε διαφορετική μοριακή βλάβη (Πίνακες 3.1α, 3.1.β και 3.3). Στους ασθενείς της ομάδας (Γ) αναλύθηκε επιπλέον το εξώνιο 7 του γονιδίου, το οποίο περιέχει το δινουκλεοτίδιο ΑΤ της τριπλέτας έναρξης της μεταγραφής ΑΤΓ.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A* εντοπίστηκαν σε δύο ασθενείς της ομάδας (Α), τον AS41 και τον AS49. Η μετάλλαξη που εντοπίστηκε στον ασθενή AS41 δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στην διεθνή βιβλιογραφία, ενώ η μετάλλαξη του ασθενούς AS49, έχει αναφερθεί αρκετές φορές μέχρι τώρα σε διαφορετικές μελέτες (88, 91, 92, 96, 113).

Στον ασθενή AS41 ανιχνεύθηκε η ένθεση του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (G) στη θέση 418 της αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου *UBE3A* (GenBank X98032). Στον ασθενή AS49 εντοπίστηκε η ένθεση τεσσάρων νουκλεοτιδίων (AAGA) στη θέση 2507 της αλληλουχίας του cDNA του *UBE3A* γονιδίου (GenBank X98032).

Η ένθεση ενός ή περισσοτέρων νουκλεοτιδίων στην κωδικοποιούσα περιοχή ενός γονιδίου, προκαλεί την αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου (Open Reading Frame, ORF).

6.1.1.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ c. 418_419insG ΚΑΙ c.2507_2510del4 ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ E6- AP

Οι σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα δύο πάσχοντα παιδιά (AS41 και AS49), επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης E6- AP. Πρόκειται για πλαισιοτροποποιητικές (frameshift) αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *UBE3A*, οι οποίες διαταράσσουν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου (ORF) και δημιουργούν πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού της μεταγραφής (ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις) και παραγωγή κολοβής πρωτεΐνης (truncated protein).

Η πρωτεΐνη E6-AP αποτελείται από 865 αμινοξέα (ισομορφή I), έχει ενεργότητα λιγάσης της ουβικιτίνης (ubiquitin protein ligase) και συμμετέχει στην μεταφορά μορίων ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες- υποστρώματα που πρόκειται να αποδιαταχθούν. Αποτέλεσε το πρώτο μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνών (λιγάσες της ουβικιτίνης ή E3 ενζυμικές πρωτεΐνες), οι οποίες ονομάζονται HECT πρωτεΐνες, γιατί όλες περιέχουν μία περιοχή (350αα) ομόλογη στο καρβόξυ- τελικό τμήμα τους (Homology to the E6-AP Carboxyl Terminus) (Εικ. 1.7.1). Η HECT περιοχή της πρωτεΐνης E6- AP κωδικοποιείται από το 3' άκρο του εξωνίου 9 και από τα εξώνια 10- 16 του γονιδίου *UBE3A*, περιλαμβάνοντας έτσι τα τελευταία 350 αμινοξέα προς το καρβόξυ- τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικ. 1.7.2). Διαθέτει μία συντηρημένη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της, μεγέθους 40KDa, η οποία αποτελείται από 88 αμινοξέα και έχει βασικές βιοχημικές ιδιότητες, που αφορούν την ενεργή συμμετοχή της πρωτεΐνης στο σύστημα πρωτεόλυσης μέσω της ουβικιτίνης (UPS). Στη θέση p.820 της πρωτεΐνης, μέσα στη συντηρημένη αυτή περιοχή, βρίσκεται το αμινοξύ κυστεΐνη (Cys), το οποίο έχει κυρίαρχο ρόλο στην λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού μορίου. Το συντηρημένο αυτό αμινοξικό κατάλοιπο ενώνεται με τα ενεργοποιημένα μόρια ουβικιτίνης προκειμένου τα τελευταία να μεταφερθούν στις πρωτεΐνες- υποστρώματα οι οποίες θα αποδιαταχθούν.

Παρακάτω αναλύεται η επίδραση κάθε μίας από τις δύο παθολογικές μεταλλάξεις στην λειτουργία του πρωτεϊνικού μορίου E6-AP.

i) Σημειακή μετάλλαξη c.418_419insG

Η σημειακή μετάλλαξη c. 418_419insG του παιδιού AS41, που εντοπίστηκε στο εξώνιο 9 του *UBE3A*, αλλάζει το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου και προκαλεί την δημιουργία κωδικονίου τερματισμού στη θέση 148 του πρωτεϊνικού προϊόντος. Συνεπώς, η μετάλλαξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή κολοβής πρωτεΐνης (truncated protein), η σύνθεση της οποίας είναι δυνατή μέχρι τη θέση p. 148 της E6- AP. Είναι γνωστό ότι μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε λόγω άμεσης δημιουργίας κωδικονίου τερματισμού (nonsense mutations), είτε λόγω μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), είναι σχεδόν πάντοτε παθολογικές, γιατί επηρεάζουν την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Συνεπώς, παρόλο που, στη παρούσα μελέτη, δεν πραγματοποιήθηκε βιοχημική ανάλυση της συγκεκριμένης κολοβής πρωτεΐνης, είναι εμφανές ότι στο πρωτεϊνικό μόριο που προκύπτει απουσιάζει η κρίσιμη περιοχή HECT όπως και τα 88 τελευταία αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την δράση της πρωτεΐνης σαν λιγάσης της ουβικιτίνης. Με δεδομένο την απώλεια των σημαντικών αυτών περιοχών, συμπεραίνουμε ότι το πρωτεϊνικό προϊόν που προκύπτει από το μεταλλαγμένο μητρικό αλληλόμορφο του ασθενούς AS41 δεν είναι λειτουργικό και η σημειακή μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για τον παθολογικό φαινότυπο του παιδιού.

Περισσότερες πληροφορίες για το χαρακτήρα μίας νέας μετάλλαξης μπορούμε να έχουμε από την ανάλυση του τρόπου κληρονομησης της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Η πρωτεΐνη E6- AP εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά από το μητρικό αλληλόμορφο στους ιστούς του εγκεφάλου, ενώ στο πατρικό αλληλόμορφο το γονίδιο *UBE3A* δεν εκφράζεται [43]. Η ταυτοποίηση της γονεϊκής προέλευσης μίας μετάλλαξης στο γονίδιο *UBE3A* μπορεί να δώσει τα παρακάτω αποτελέσματα, τα οποία ερμηνεύονται με έναν ιδιαίτερο τρόπο λόγω της επιλεκτικής έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου:

a) Η σημειακή αλλαγή έχει μητρική προέλευση

Στην περίπτωση που η σημειακή αλλαγή στο πάσχον παιδί ανιχνευθεί στην φαινοτυπικά φυσιολογική μητέρα, τότε η αλλαγή αυτή θα μπορούσε να είναι

υπεύθυνη για τον παθολογικό φαινότυπο του παιδιού. Για να συμβαίνει όμως αυτό θα πρέπει η σημειακή αυτή αλλαγή να βρίσκεται στο πατρικό αλληλόμορφο της μητέρας, το οποίο δεν εκφράζεται, είτε έχοντας δημιουργηθεί *de novo* σε αυτό είτε έχοντας κληρονομηθεί από τον μητρικό παππού.

β) Η σημειακή αλλαγή έχει πατρική προέλευση

Στην περίπτωση που η σημειακή αλλαγή ενός πάσχοντος παιδιού ανιχνευθεί στον φαινοτυπικά φυσιολογικό πατέρα, τότε η αλλαγή αυτή δεν εκφράζεται στο παιδί, δεδομένου ότι το γονίδιο *UBE3A* εκφράζεται μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο φαινότυπος του παιδιού δεν θα μπορούσε να οφείλεται στην αλλαγή αυτή, γεγονός όμως που δεν αποκλείει την παθολογική φύση της αλλαγής αυτής.

γ) Η σημειακή αλλαγή δεν ανιχνεύεται σε κανέναν από τους δύο βιολογικούς γονείς

Εάν η σημειακή αλλαγή που υπάρχει στο πάσχον παιδί, δεν ανιχνευθεί σε κανέναν από τους δύο γονείς, τότε δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την φύση της αλλαγής αυτής. Μια τέτοια περίπτωση υποδηλώνει είτε την *de novo* εμφάνιση της σημειακής αλλαγής στο παιδί είτε την ύπαρξη μωσαϊκισμού (γαμετικού ή σωματικού) σε έναν από τους γονείς του παιδιού.

Η μοριακή ανάλυση του εξωνίου 9 του γονιδίου *UBE3A* στους γονείς του παιδιού AS41, αποκάλυψε την ύπαρξη φυσιολογικής αλληλουχίας και στους δύο. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η περίπτωση αυτή εμπίπτει στην τρίτη κατηγορία και συνεπώς δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτή την πληροφορία για τον χαρακτηρισμό της φύσης της μετάλλαξης.

Όμως παρόλα αυτά, λόγω της σοβαρής επίδρασης της σημειακής αλλαγής c.418_419insG στην δομή της πρωτεΐνης E6-AP, συμπεραίνουμε ότι

πρόκειται για παθολογική μετάλλαξη που ευθύνεται για την κλινική εικόνα του παιδιού AS41.

ii) Σημειακή μετάλλαξη c. 2507_2510del4

Στον ασθενή AS49, η παθολογική μετάλλαξη c.2507_2510del4 στο εξώνιο 16 του γονιδίου *UBE3A* προκαλεί την αλλαγή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης και τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης στη θέση p.839 της πρωτεΐνης E6- AP, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης στην θέση αυτή και την παραγωγή κολοβής (truncated) πρωτεΐνης. Στην παθολογική αυτή πρωτεΐνη, παρόλο που το τμήμα που λείπει είναι σχετικά μικρό (26 αμινοξέα προς το καρβόξυ- τελικό άκρο), εντούτοις περιλαμβάνει τμήμα της κρίσιμης περιοχής των 88 καρβόξυ- τελικών αμινοξέων, που είναι απαραίτητα για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, η παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης στον ασθενή AS49 οφείλεται στην απώλεια μέρους της περιοχής των 88 τελευταίων αμινοξέων της E6- AP.

Η σημειακή αυτή μετάλλαξη έχει αναφερθεί αρκετές φορές στην διεθνή βιβλιογραφία και η παθογένειά της είναι επιβεβαιωμένη [88, 91, 92, 96, 113]. Η ανάλυση του τρόπου κληρονόμησής της στην οικογένεια του παιδιού AS49 δεν ήταν εφικτή λόγω μη διαθεσιμότητας βιολογικού δείγματος από τους γονείς.

6.1.1.2 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΛΟΤΥΠΩΝ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ AS41

Στην οικογένεια του ασθενούς AS41 προσφέρθηκε γενετική συμβουλευτική από τους κλινικούς γενετιστές του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανίχνευση της παθολογικής μετάλλαξης c.418_419insG στο παιδί AS41 σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μοριακή μελέτη του γονιδίου *UBE3A* στους γονείς του ασθενούς αποκάλυψε την ύπαρξη φυσιολογικής αλληλουχίας τόσο στον πατέρα όσο και στην μητέρα, καθιστά τον προγεννητικό έλεγχο απαραίτητο για κάθε επόμενη κύηση, δεδομένου ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί το φαινόμενο του μωσαϊκισμού στη

μητέρα. Πιο αναλυτικά, το γεγονός ότι η μητέρα δεν φαίνεται να φέρει την παθολογική μετάλλαξη του παιδιού AS41, μπορεί να ερμηνευτεί ως εξής:

α) Η παθολογική μετάλλαξη του παιδιού AS41 έχει δημιουργηθεί *de novo* στο μητρικό του αλληλόμορφο. Στην περίπτωση αυτή, ο κίνδυνος επανεμφάνισης της μετάλλαξης σε επόμενη κύηση της μητέρας είναι πολύ μικρός (<1%).

β) Η παθολογική μετάλλαξη έχει κληρονομηθεί από την φαινοτυπικά φυσιολογική μητέρα, η οποία φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ένα ποσοστό των γαμετικών ή και των σωματικών της κυττάρων (μωσαϊκισμός). Ο μωσαϊκισμός αποτελεί μία ιδιαίτερη περίπτωση σχετικά με τον κίνδυνο επανεμφάνισης της μετάλλαξης ο οποίος υπολογίζεται με πολύπλοκα μαθηματικά μοντέλα [114] και μπορεί να ανέρχεται μέχρι και σχεδόν 50%, εξαρτώμενος από την αναλογία παθολογικών και φυσιολογικών γαμετικών κυττάρων.

Ο σωματικός μωσαϊκισμός (somatic mosaicism) υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών κυτταρικών σειρών (μίας φυσιολογικής και μίας που φέρει ένα παθολογικό γονότυπο) στους σωματικούς ιστούς. Ο γαμετικός μωσαϊκισμός (germline/ gonadal mosaicism) αναφέρεται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών στα γαμετικά κύτταρα όπου ένα ποσοστό των γαμετικών κυττάρων φέρει τον παθολογικό γονότυπο, ενώ τα υπόλοιπα γαμετικά κύτταρα είναι φυσιολογικά. Στην περίπτωση όπου η δημιουργία μίας μετάλλαξης γίνει σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του οργανισμού, μπορεί να επηρεάσει τόσο σωματικές όσο και γαμετικές κυτταρικές σειρές, με αποτέλεσμα ο μωσαϊκισμός να αφορά και σωματικά και γαμετικά κύτταρα και κατ'επέκταση να μπορεί να κληρονομηθεί και στους απογόνους.

Η ανάλυση των απλοτύπων της περιοχής 15q11- q13, στην οικογένεια του παιδιού AS41 (γονείς, πάσχον παιδί AS41, CVS1 και CVS2), έγινε με την ανάλυση της κληρονομικότητας 5 πολυμορφικών δεικτών κατά μήκος της περιοχής 15q11- q13 και εκατέρωθεν του γονιδίου *UBE3A* (Εικ. 5.4.1). Οι πολυμορφικοί δείκτες GABRB3, D15S113 και D15S10 βρίσκονται δεξιά του γονιδίου (upstream) ενώ οι D15S11 και D15S543 βρίσκονται αριστερά (downstream) του γονιδίου *UBE3A*.

Η μοριακή μελέτη των παραπάνω πολυμορφικών δεικτών στην οικογένεια AS41, αποκάλυψε ότι το πάσχον άτομο AS41 και το πρώτο έμβρυο (CVS1) έχουν κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο. Συγκεκριμένα, έφεραν τον ίδιο μητρικό απλότυπο στις θέσεις GABRB3, D15S10, D15S11 και D15S543, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου *UBE3A* (Εικόνες 5.4.3 έως 5.4.8). Στην περίπτωση αυτή η πιθανότητα το έμβρυο να φέρει την παθολογική μετάλλαξη, κυμαίνεται από <1% (de novo μετάλλαξη) μέχρι και σχεδόν 50% (γαμετικός μωσαϊκισμός). Η μοριακή ανάλυση του εξωνίου 9 του γονιδίου *UBE3A* στο έμβρυο κρίθηκε απαραίτητη στην περίπτωση αυτή, όπου και αποκάλυψε φυσιολογική αλληλουχία. Συνεπώς, το έμβρυο CVS1 της οικογένειας έχει κληρονομήσει το ίδιο μητρικό αλληλόμορφο με τον ασθενή AS41, αλλά δεν φέρει την παθολογική μετάλλαξη.

Το δεύτερο έμβρυο της οικογένειας, CVS2, έχει κληρονομήσει διαφορετικό μητρικό αλληλόμορφο από το πάσχον παιδί AS41, όπως φαίνεται από την ανάλυση των πολυμορφικών δεικτών D15S543 και GABRB3 οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου *UBE3A* (Εικ. 5.4.9 έως 5.4.11). Συνεπώς, η πιθανότητα ύπαρξης της παθολογικής μετάλλαξης της οικογένειας στο δεύτερο έμβρυο είναι πάρα πολύ μικρή (<1%). Παρόλα αυτά, η ανάλυση του εξωνίου 9 έγινε και αποκάλυψε φυσιολογική αλληλουχία. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την μοριακή ανάλυση του *UBE3A* σε όλα τα άτομα της οικογένειας, καθώς και της μελέτης των απλοτύπων, συμπεραίνουμε τα εξής:

i) Κανένα από τα δύο έμβρυα δεν φέρει την μετάλλαξη c. 418_419insG του ασθενούς AS41, όπως αποκάλυψε η μοριακή ανάλυση.

ii) Ο ασθενής AS41 φέρει τον ίδιο μητρικό απλότυπο με το ένα από τα δύο έμβρυα. Η μετάλλαξη c. 418_419insG είτε έχει δημιουργηθεί de novo στο πάσχον παιδί AS41, είτε έχει κληρονομηθεί από την, φαινοτυπικά φυσιολογική μητέρα του, η οποία στα γαμετικά της κύτταρα φέρει σε κάποιο βαθμό την συγκεκριμένη μετάλλαξη (μωσαϊκισμός).

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την πιθανή ύπαρξη μωσαϊκισμού (γαμετικού ή σωματικού) σε οικογένειες με ένα ή περισσότερα πάσχοντα μέλη. Η πρώτη τέτοια αναφορά έγινε από τους *Malzac P. και συνεργατών*

(1998), οι οποίοι αναφέρουν την μελέτη τριών οικογενειών στις οποίες υπάρχουν ενδείξεις για πιθανό μωσαϊκισμό στη μητέρα [89]. Οι τρεις αυτές περιπτώσεις αναλύονται παρακάτω:

α) Οικογένεια με τρία πάσχοντα και τρία φυσιολογικά μέλη: Μελέτη απλοτύπων στην οικογένεια αποκάλυψε ότι τα δύο πάσχοντα παιδιά έχουν τον ίδιο μητρικό γονότυπο με ένα από τα φυσιολογικά αδέρφια, ενώ η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* στη μητέρα, έδειξε ότι πρόκειται για σωματικό μωσαϊκισμό.

β) Οικογένεια με δύο πάσχοντα αδέρφια και μία πάσχουσα εξαδέρφη της μητέρας: Στην οικογένεια αυτή, η μετάλλαξη κληρονομήθηκε από τον μωσαϊκό μητρικό παππού, στις δύο από τις τρεις κόρες του, οι οποίες ήταν φαινοτυπικά φυσιολογικές και απέκτησαν συνολικά τρία πάσχοντα παιδιά. Η περίπτωση της κληρονομικότητας μίας παθολογικής *AS* μετάλλαξης από τον μητρικό παππού μπορεί να εξηγηθεί και χωρίς την ύπαρξη μωσαϊκισμού. Όμως, στη συγκεκριμένη οικογένεια, η μοριακή ανάλυση της μετάλλαξης στον μητρικό παππού αποκάλυψε την ύπαρξη σωματικού μωσαϊκισμού

γ) Οικογένεια με ένα πάσχον παιδί: Η μοριακή ανάλυση στην οικογένεια αυτή αποκάλυψε την ύπαρξη παθολογικής μετάλλαξης στο παιδί, και την ύπαρξη σωματικού μωσαϊκισμού στη μητέρα.

Παρόμοιες αναφορές μωσαϊκισμού (σωματικού ή γαμετικού) υπάρχουν και σε άλλες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία [11, 90, 91, 96]. Μέχρι τώρα, δεν έχει αναφερθεί καμία περίπτωση μωσαϊκισμού που να αφορά παθολογική μετάλλαξη στο μητρικό αλληλόμορφο ασθενούς με σύνδρομο Angelman, κάτι το οποίο πιθανότατα θα προκαλούσε ηπιότερη κλινική εικόνα του συνδρόμου, δεδομένου ότι θα υπήρχαν δύο κυτταρικές σειρές, μία παθολογική και μία φυσιολογική. Σε μία τέτοια περίπτωση μωσαϊκισμού, η ταυτόχρονη παρουσία φυσιολογικών και παθολογικών αλληλομόρφων του γονιδίου *UBE3A* θα δημιουργούσε έναν ηπιότερο φαινότυπο συνδρόμου Angelman, δεδομένου ότι ένα ποσοστό των κυττάρων θα παράγει φυσιολογικό πρωτεϊνικό προϊόν. Η αναλογία φυσιολογικών / παθολογικών κυττάρων σε μια τέτοια περίπτωση θα καθόριζε την βαρύτητα του κλινικού φαινοτύπου. Η ανίχνευση μωσαϊκισμού με

τις κλασικές μεθόδους σάρωσης των γονιδίων φαίνεται να είναι αποτελεσματική, δεδομένου ότι έχει ανιχνευθεί σε γονείς παιδιών με γενετικά νοσήματα, όπως και στην περίπτωση του συνδρόμου Angelman, όταν αφορά και σωματικά κύτταρα. Όμως, δεδομένου ότι ο μωσαϊκισμός μπορεί να επηρεάζει άλλους ιστούς, εκτός από το αίμα που συνήθως αποτελεί το βιολογικό υλικό απομόνωσης γενετικού υλικού, υπάρχει ο κίνδυνος η μέθοδος σάρωσης να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση μωσαϊκισμού.

Έχει επίσης αναφερθεί η ύπαρξη μωσαϊκισμού σε AS ασθενείς με χρωμοσωμικό έλλειμμα στην περιοχή 15q11- q13 ή με βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης [115-117]. Στις παραπάνω περιπτώσεις η υποψία του μωσαϊκισμού τίθεται από τα αποτελέσματα του MS-PCR, όπου ανιχνεύεται αχνή ζώνη μεθυλιωμένου προϊόντος. Οι *Buiting και συνεργάτες* (2003), αναφέρουν την περίπτωση βλάβης στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting defect), όπου το φάσμα της κλινικής εικόνας είναι ευρύ και περιλαμβάνει ασθενείς με τυπικό, ήπιο ή ακόμα και μη – τυπικό φαινότυπο συνδρόμου Angelman [116, 117]. Επίσης, όπως διευκρινίζεται στην παραπάνω μελέτη όλοι οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας (mosaic imprinting defect) έχουν πολύ μικρό ποσοστό φυσιολογικών κυττάρων, γεγονός που δημιουργεί ερωτήματα αν ασθενείς με μεγαλύτερο ποσοστό φυσιολογικών κυττάρων έχουν πολύ ήπιο φαινότυπο ώστε διαφεύγουν της κλινικής εκτίμησης.

6.2 ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ UBE3A ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΥΣ AS ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, ποσοστό ίσο με 5% των ασθενών που μελετήθηκαν έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*. Το ποσοστό αυτό συμφωνεί με τα αντίστοιχα ποσοστά παρόμοιων μελετών, όπου κυμαίνεται από 5 έως 10% [38, 56, 88, 89].

Οι πρώτες αναφορές παθολογικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *UBE3A* σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman έγιναν το 1997 από τους *Kishino και συνεργάτες* και *Matsuura και συνεργάτες* και αφορούσαν ένα de novo διπλασιασμό 5 νουκλεοτιδίων- μία μετάλλαξη που μεταβιβάστηκε από το μητρικό αλληλόμορφο και αφορά θέση ματίσματος εξωνίων (splice site mutation)- και μία de novo αντικατάσταση αμινοξέος [38, 56]. Οι δύο μεταλλάξεις οδηγούν στην αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου ORF) και σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Μέχρι σήμερα, στην βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί 66 διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, οι οποίες έχουν ανιχνευθεί σε περισσότερους από 100 ασθενείς με σύνδρομο Angelman (Πίνακας 1.11.1). Εκτός από τις μεταλλάξεις που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, υπάρχουν και μεταλλάξεις οι οποίες είναι καταχωρημένες μόνο στην βάση δεδομένων LOVD (Leiden Open Variation Database, www.lovd.nl) του Πανεπιστημίου του Leiden. Η βάση δεδομένων LOVD περιέχει 163 μοναδικές σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, από τις οποίες οι 17 θεωρούνται σιωπηλές αλλαγές, δεδομένου ότι δεν φαίνεται να προκαλούν αλλαγή στην δομή και την λειτουργία της πρωτεΐνης ενώ ένας μικρός αριθμός μεταλλάξεων δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί. Σύμφωνα με τα δεδομένα της βάσης LOVD, οι σημειακές μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *UBE3A* αφορούν στο μεγαλύτερο ποσοστό αντικαταστάσεις και ελλείμματα βάσεων (40% και 40% αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν οι διπλασιασμοί (13%), οι ενθέσεις (6%) και συνδυασμός ένθεσης / ελλείματος βάσεων (2%).

Οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *UBE3A*, εντοπίζονται κυρίως στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου (εξώνια 8- 16) , ενώ έχουν βρεθεί κάποιες μεταλλάξεις και σε περιοχές ιντρονίων, κυρίως κοντά στα σημεία ματίσματος (splice acceptor/ donor sites). Πρόκειται για ετερόζυγες μεταλλάξεις αντικατάστασης, ελλείματος, ένθεσης, διπλασιασμού, αναστροφής βάσεων ή και σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις συνδυασμό των παραπάνω. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων (περίπου 68%, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 1.11.1), αφορά πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές (frameshift mutations), οι οποίες αλλάζουν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου,

με αποτέλεσμα την δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και την παραγωγή κολοβής (truncated) πρωτεΐνης. Ποσοστό ίσο με 12% των μεταλλάξεων του γονιδίου *UBE3A* αφορούν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations), στις οποίες η αλλαγή ενός αμινοξέος επηρεάζει την λειτουργία του πρωτεϊνικού προϊόντος, ενώ 15% των σημειακών αλλαγών αφορά ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (nonsense mutations) και έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόωρη λήξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επίσης, έχουν αναφερθεί δύο περιπτώσεις στις οποίες έλλειμμα τριών (c.2346del3) και δώδεκα (c.2269del12) νουκλεοτιδίων προκαλούν την απώλεια ενός (F782Δ) και τεσσάρων (YTRD757Δ) αμινοξέων, αντίστοιχα, από την πρωτεΐνη [88, 92, 93]. Οι *Boyes L. και συνεργάτες*, αναφέρουν την έλλειψη ολόκληρης της κωδικής περιοχής του γονιδίου *UBE3A* (εξώνια 8- 16) σε δύο αδέρφια με σύνδρομο Angelman, ενώ έλλειψη μεγέθους 570kb, η οποία περιλαμβάνει ολόκληρο το γονίδιο *UBE3A*, έχει εντοπιστεί σε ασθενή με σύνδρομο Angelman [94, 95].

6.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ECMA ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *UBE3A*

Η αξιολόγηση της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση σημειακών αλλαγών στο γονίδιο *UBE3A* έδειξε ότι η μέθοδος ECMA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγάλη ασφάλεια σαν μέθοδος σάρωσης (screening) για την μοριακή μελέτη του γονιδίου *UBE3A* σε ασθενείς με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman. Η παράλληλη εφαρμογή της μεθόδου ECMA και της ανάλυσης πρωτοδιάταξης (sequencing) στα 20 πρώτα δείγματα της μελέτης, επιβεβαίωσε την μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου ECMA και την αξιοπιστία σαν μέθοδο σάρωσης. Σε κάθε εφαρμογή της μεθόδου ECMA χρησιμοποιήθηκε ένα ή δύο θετικά δείγματα ελέγχου (positive controls) καθώς και αρνητικά δείγματα ελέγχου (negative controls), έτσι ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία της μεθόδου.

Η μέθοδος ECMA, παρόλο που έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη αρκετών

γονιδίων μέχρι σήμερα, είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται σαν μέθοδος σάρωσης για την ανίχνευση σημειακών αλλαγών στο γονίδιο *UBE3A*. Η μέθοδος αυτή υπερτερεί ως προς το χρόνο, τον εξοπλισμό και την ευκολία σχεδιασμού και εφαρμογής της, από τις αντίστοιχες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του γονιδίου *UBE3A*, όπως η μέθοδος SCCP (Single Strand Conformation Polymorphism), CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) και DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), παρέχοντας το ίδιο ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα. Επίσης, η παράλληλη εφαρμογή δύο μεθόδων (ECMA και sequencing) είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ασφάλειας και αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

6.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ- ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ

Όπως προκύπτει από την παρούσα μελέτη, η κλινική εικόνα των παιδιών που παραπέμπονται για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman, αν και παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, περιλαμβάνει στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών, κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου: ψυχοκινητική καθυστέρηση (η οποία κυμαίνεται από ήπια έως βαριά μορφή, και εκδηλώνεται κυρίως με διαταραχές στην ομιλία), κινητικά προβλήματα (τα οποία εκδηλώνονται συνήθως με ευρύ, αταξικό βάδισμα) και σπασμούς (οι οποίοι εμφανίζονται κυρίως στη νεογνική ηλικία). Τα υπόλοιπα κλινικά χαρακτηριστικά, όπως η μικροκεφαλία, η χαρούμενη διάθεση και τα μορφολογικά στοιχεία, χαρακτηρίζουν μικρότερο ποσοστό των ασθενών που παραπέμπονται για έλεγχο συνδρόμου Angelman.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Πίνακα 3.1, σχεδόν το σύνολο των ασθενών (93%) είχαν κάποιου βαθμού (ήπια έως σοβαρή) ψυχοκινητική καθυστέρηση.

Μεγάλο ποσοστό των ασθενών της μελέτης (86%) έχουν κινητικά προβλήματα, αταξία και διαταραχές της ισορροπίας. Ανεξάρτητα από την ηλικία που ξεκινούν να περπατούν, το βάδισμά τους χαρακτηρίζεται από τάση

εμπρόσθιας κλίσης, δυσκαμψία ή τρέμουλο ποδιών, τα οποία παραμένουν ανοιχτά και σε απόσταση μεταξύ τους.

Διαταραχές λόγου στις οποίες συμπεριλαμβάνονται καταστάσεις όπως καθυστέρηση ομιλίας, χρήση περιορισμένου λεξιλογίου καθώς και απουσία λόγου, έχει μεγάλο ποσοστό των ασθενών της μελέτης (70%).

Παραπάνω από τους μισούς ασθενείς (51%) εμφάνισαν, σε κάποια περίοδο της νεογνικής ή παιδικής τους ηλικίας, σπασμούς, ενώ μικρότερο ήταν το ποσοστό των ασθενών που είχε την χαρακτηριστική χαρούμενη διάθεση των παιδιών με σύνδρομο Angelman (39%) η οποία εκδηλώνεται με αναίτια ξεσπάσματα γέλιου και χαρακτηριστικές τρομώδεις κινήσεις των χεριών.

Ποσοστό ίσο με 23% των ασθενών της μελέτης παρουσίαζε κάποιου βαθμού μικροκεφαλία (σχετική ή απόλυτη μικροκεφαλία) χαρακτηριστικό το οποίο φαίνεται να είναι πλέον τυπικό των παιδιών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A* [113].

Επίσης, παρόλο που η αξιολόγηση του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος (ΗΕΓ) σε παιδιά με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman φαίνεται να έχει ιδιαίτερη σημασία για την διαφορική διάγνωση του συνδρόμου, ποσοστό ίσο με 48% των ατόμων της μελέτης δεν είχαν υποβληθεί σε ΗΕΓ. Από εκείνους τους ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ηλεκτροεγκεφαλογραφική μελέτη, σημαντικό ποσοστό (71%) είχαν θετικά ευρήματα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν την παραπάνω άποψη για την χρησιμότητα του ΗΕΓ στα παιδιά με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman. Και οι δύο ασθενείς έφεραν τυπικό παθολογικό ΗΕΓ, σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, συμπεριλαμβανομένης και της μικροκεφαλίας. Επίσης, τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να υποστηρίξουν την ετερογένεια στην βαρύτητα του κλινικού φαινοτύπου, σχετικά με την ψυχοκινητική καθυστέρηση και τα κινητικά προβλήματα, σε παιδιά που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*.

Ο ασθενής AS41 έχει σχετικά ήπια κλινική εικόνα συνδρόμου Angelman. Πρόκειται για άρρεν άτομο το οποίο γεννήθηκε με καισαρική τομή, το βάρος

γέννησής του ήταν 3.300Kgrs, το ύψος του 51cm και η περίμετρος κεφαλής σε φυσιολογικά επίπεδα (34cm). Από τον δεύτερο μήνα της ζωής του εμφάνισε προβλήματα σίτισης ενώ στον ένατο μήνα η περίμετρος κεφαλής άρχισε να μειώνεται και η επανεξέταση σε ηλικία δεκαπέντε μηνών αποκάλυψε την στασιμότητα της περιμέτρου κεφαλής, η οποία βρισκόταν πλέον κάτω από την 3^η Ε. Θ. Στην ηλικία αυτή το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) ήταν φυσιολογικό. Ο ασθενής άρχισε να περπατάει με υποστήριξη σε ηλικία 1.5 έτους με εμφανή στοιχεία διαταραχής της ισορροπίας και αταξίας. Σε ηλικία δύο ετών παρουσίασε επεισόδια σπασμών ενώ η μαγνητική τομογραφία που έγινε δεν αποκάλυψε παθολογικά ευρήματα. Το παιδί υπεβλήθη σε δεύτερο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, όπου εντοπίστηκε η τυπική παθολογική εικόνα που παραπέμπει στο σύνδρομο Angelman (Εικ. 1.1). Η πιο πρόσφατη κλινική εκτίμηση του παιδιού, σε ηλικία 3 ετών, αποκάλυψε την σχετικά ήπια διανοητική και αναπτυξιακή καθυστέρηση, η οποία χαρακτηρίζεται από ικανότητα βάδισης χωρίς υποστήριξη καθώς και ικανότητα επικοινωνίας με τους γονείς του, με την χρήση 2- 3 μεμονωμένων λέξεων. Είναι υπερκινητικό παιδί και η προσοχή του διασπάται εύκολα, όμως δεν έχει τη χαρακτηριστική χαρούμενη διάθεση των παιδιών με AS και είναι σε θέση να ακολουθεί απλές εντολές.

Ο ασθενής AS49 είναι αγόρι ηλικίας 3 ετών και 9 μηνών, με σφαιρικού τύπου ψυχοκινητική καθυστέρηση που χαρακτηρίζεται από μικροκεφαλία, ήπιο αταξικό βάδισμα με ελαφριά αταξία άκρων, καθώς και σοβαρή διαταραχή στην αντίληψη και την έκφραση του λόγου. Επίσης, παρουσιάζει άτυπα αφαιρετικά επεισόδια και στιγμιαία επεισόδια απώλειας τόνου (near- drop attacks). Ο καρυότυπος του παιδιού είναι φυσιολογικός (46, XY) ενώ η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου παρουσιάζει κάποια ανωριμότητα στην μυελίνωση. Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) παρουσιάζει βραδέα κύματα ινιακά με ανεμειγμένες αιχμές.

Ο συνδυασμός τυπικού παθολογικού ΗΕΓ και μικροκεφαλίας στην κλινική εκτίμηση παιδιών με μετάλλαξη στο γονίδιο *UBE3A* υποστηρίζεται από δύο μελέτες όπου πραγματοποιήθηκε σύγκριση φαινοτύπου- γονοτύπου [90, 113].

Τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα και μικροκεφαλία είχαν, εκτός από τους δύο ασθενείς της παρούσας μελέτης στους οποίους ανιχνεύθηκε παθολογική μετάλλαξη στο γονίδιο *UBE3A*, οι ασθενείς AS19, AS42 και AS47, στους οποίους όμως η μοριακή ανάλυση του *UBE3A* γονιδίου δεν αποκάλυψε καμμία παθολογική μετάλλαξη.

Ο ασθενής AS19 έχει τυπική κλινική εικόνα συνδρόμου Angelman εμφανίζοντας βαριά ψυχοκινητική καθυστέρηση και αυτιστικά στοιχεία, τα οποία συνοδεύονται από το τυπικό χαρούμενο προσωπείο των παιδιών με AS. Παρουσιάζει σοβαρές διαταραχές στην ομιλία (απουσία λόγου) και έχει σπασμούς από την ηλικία των δύο μηνών. Περπάτησε σε ηλικία 2 ετών αλλά είναι πολύ υπερκινητικό παιδί. Η αξονική τομογραφία (CT) αποκάλυψε την ύπαρξη ατροφίας στον εγκέφαλο. Η μελέτη του γονιδίου *UBE3A* δεν αποκάλυψε την ύπαρξη παθολογικής μετάλλαξης σε κανένα από τα εξώνια του γονιδίου (εξώνια 7- 16).

Ο ασθενής AS42 ανήκει στην οικογένεια με τα δύο πάσχοντα αδέρφια (AS42 και AS43) και διαθέτει μία μάλλον τυπική εικόνα συνδρόμου Angelman.

Τέλος, ο τρίτος ασθενής (AS47) που έχει και τα δύο χαρακτηριστικά (μικροκεφαλία και παθολογικό ΗΕΓ) ανήκει στους ασθενείς εκείνους στους οποίους η μοριακή ανάλυση με την μέθοδο του Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού, αποκάλυψε πιθανή βλάβη σε άλλη περιοχή εκτός της 15q11-q13. Εκτός από την μικροκεφαλία και το παθολογικό ΗΕΓ, ο AS47, σε ηλικία 17 μηνών, εμφάνισε ήπια ψυχοκινητική καθυστέρηση, χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα ομιλίας, ενώ περπάτησε σε ηλικία 14 μηνών. Εμφάνισε σπασμούς από την ηλικία των 10 μηνών, μικροκεφαλία καθώς και ήπια δυσμορφικά στοιχεία, όπως μικρογναθία, θολωτή υπερώα και χαμηλή θέση του λοβίου του ωτός.

Στον Πίνακα 4.5, οι ασθενείς της μελέτης έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση πόσα από τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κλινική εκτίμησή τους, εμφάνιζαν θετικά και συμβατά με την κλινική εικόνα του συνδρόμου Angelman, κατά την περίοδο της εκτίμησής τους από τους παραπέμποντες ιατρούς. Οι περισσότεροι ασθενείς της μελέτης ανήκουν σε

δύο κατηγορίες: σε αυτούς που έφεραν θετικά πέντε (5) από τα επτά (7) κλινικά στοιχεία (35%) και σε αυτούς που εμφάνιζαν τρία (3) από τα επτά (7) διαμορφώνοντας ένα ποσοστό ίσο με 25%. Οι υπόλοιποι ασθενείς μοιράζονται κυρίως μεταξύ 2, 4 και 6 κλινικών χαρακτηριστικών, ενώ υπάρχει και ένας ασθενής (AS19) ο οποίος έχει και τα επτά (7) κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman.

Επίσης, στην ομάδα (Γ), στους οποίους έγινε μελέτη και του εξωνίου 7 του γονιδίου *UBE3A*, επιλέχθηκαν ασθενείς οι οποίοι είχαν περισσότερο τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά AS από τους υπόλοιπους ασθενείς, ή είχαν ένα χαρακτηριστικό που παραπέμπει σε AS όπως θετικό ΗΕΓ ή μικροκεφαλία. Τα κλινικά στοιχεία των ασθενών αυτών δίνονται στους Πίνακες 3.1α, 3.1β και 3.3.

Στην παρούσα μελέτη υπήρχαν και τρεις μη τυπικοί ασθενείς (AS2, AS8 και AS43) οι οποίοι δεν εμφανίζουν ψυχοκινητική καθυστέρηση αλλά παραπέμφθηκαν για διαφορετικούς λόγους για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman:

Ασθενής AS2: Ο ασθενής AS2 είχε νεογνικούς σπασμούς σε ηλικία 2 μηνών, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως σύνθετες εστιακές κρίσεις επιληψίας. Το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα είχε παθολογικά ευρήματα συμβατά επιληπτόμορφης δραστηριότητας ενώ υπήρχε οικογενειακό ιστορικό κρίσεων επιληψίας στην μητέρα.

Ασθενής AS8: Ο ασθενής AS8 παραπέμφθηκε για μοριακό έλεγχο συνδρόμου Angelman λόγω των νεογνικών σπασμών, της αταξίας, της χαρούμενης διάθεσης, καθώς και κάποιων μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως ο στραβισμός και το μεγάλο στόμα.

Ασθενής AS43: Ο ασθενής AS43 είναι το δεύτερο πάσχον παιδί μιας οικογένειας. Πρόκειται για θήλυ άτομο, ηλικίας 5 μηνών, η κλινική εικόνα του οποίου χαρακτηρίζεται από ελαφριά υπέρταση. Ο λόγος που συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* ήταν το οικογενειακό του ιστορικό. Η πάσχουσα αδερφή του (AS42) από την ηλικία των 16 μηνών

εμφάνισε σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, γενικευμένη αταξία και ασύντακτες κινήσεις χεριών, ξεσπάσματα γέλιου, μικροκεφαλία (<3^η Ε.Θ.) και σπασμούς οι οποίοι συνοδεύονταν από το τυπικό παθολογικό ΗΕΓ (Πίνακας 3.1α). Σε κανένα από τα δύο παιδιά, η μοριακή ανάλυση του *UBE3A* δεν αποκάλυψε την ύπαρξη παθολογικής μετάλλαξης.

Οι AS ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A* φαίνεται να διαφέρουν ως προς την βαρύτητα της κλινικής τους εικόνας από τους ασθενείς που έχουν έλλειμμα, μονογονεϊκή δισωμία ή βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13. Σύμφωνα με τους *Lossie και συνεργάτες* (2001), τέσσερα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι κοινά σε όλες τις κατηγορίες των AS ασθενών: βαριά διανοητική και αναπτυξιακή καθυστέρηση, σοβαρές διαταραχές στην ομιλία, κινητικά προβλήματα και χαρακτηριστικό προφίλ συμπεριφοράς [113]. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, έχουν συνήθως πιο ήπια κλινική εικόνα από τους ασθενείς με χρωμοσωμικό έλλειμμα, αλλά ταυτόχρονα φέρουν πιο τυπικό AS φαινότυπο από τους ασθενείς με μονογονεϊκή δισωμία ή βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης [113]. Σχετικά με την μικροκεφαλία, η παραπάνω μελέτη καταλήγει στο ότι περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με μετάλλαξη στο *UBE3A* έχουν μικροκεφαλία, ενώ σχεδόν οι μισοί εκδήλωσαν σπασμούς σε μέσο όρο ηλικίας τα 2.7 έτη. Η μέση ηλικία έναρξης της βάδισης στους ασθενείς με μετάλλαξη υπολογίστηκε στην ίδια μελέτη, στα 2.5 έτη, ενώ η αντίστοιχη στους ασθενείς με χρωμοσωμικό έλλειμμα είναι 4.6 έτη. Σε μία παρόμοια μελέτη, οι *Moncla και συνεργάτες* (1999), προτείνουν τα παρακάτω ελάχιστα κλινικά κριτήρια για την παραπομπή των ασθενών με υποψία συνδρόμου Angelman, για μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A*: ψυχοκινητική καθυστέρηση, τυπικό προφίλ συμπεριφοράς με χαρούμενη διάθεση, παθολογικά ευρήματα στο ΗΕΓ, διανοητική καθυστέρηση και σοβαρές διαταραχές λόγου [90].

Στις περιπτώσεις όπου η μοριακή διαταραχή περιορίζεται σε βλάβες στο γονίδιο *UBE3A*, όπως συμβαίνει στους ασθενείς με *UBE3A* μεταλλάξεις, η δομή και η λειτουργία της υπόλοιπης 15q11- q13 περιοχής δεν επηρεάζεται. Αντίθετα, στην περίπτωση χρωμοσωμικού ελλείμματος ή UPD ή βλάβης στο

κεντρο γονιδιακής αποτύπωσης (Imprinting Defect, ID), επηρεάζεται το σύνολο των γενετικών παραγόντων της περιοχής, που περιλαμβάνει και άλλα γονίδια, όπως το γονίδιο *ATP10C* (Aminophospholipid-Transporting ATPase), το οποίο εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά γονιδιακής αποτύπωσης με το *UBE3A* [103]. Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε να εξηγηθεί η πιο βαριά κλινική εικόνα των ασθενών με χρωμοσωμικό έλλειμμα, με την παραδοχή ότι και άλλα γονίδια (όπως π.χ το *ATP10C*) επηρεάζουν τον φαινότυπο των AS ασθενών.

6.4.1 ΤΥΠΙΚΟΙ AS ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Στην μελέτη υπήρχαν ασθενείς οι οποίοι έφεραν τυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman, συμπεριλαμβανομένου και της χαρούμενης διάθεσης αλλά και κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά προσώπου (π.χ. μεγάλο στόμα με αραιά δόντια, προεξέχουσα γλώσσα κ.ά) στους οποίους όμως η μοριακή βλάβη δεν αποκαλύφθηκε και πιθανότατα δεν αφορά την χρωμοσωμική περιοχή 15q11- q13. Σε παρόμοιες μελέτες, όπως των *Baumer και συνεργάτων* (1999), τα αποτελέσματα αφορούν την μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* σε ασθενείς με υποψία συνδρόμου Angelman, στους οποίους όμως συμπεριλήφθηκαν και ομάδες ασθενών που δεν επιλέχθηκαν με αυστηρά κλινικά AS κριτήρια, με σκοπό να διερευνηθεί αν μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A* ευθύνονται για την εμφάνιση πιο ήπιων, μη τυπικών φαινοτύπων AS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις του *UBE3A* φαίνεται να αφορούν ασθενείς AS που φέρουν τυπική κλινική εικόνα συνδρόμου Angelman, συμπεριλαμβάνοντας τα παρακάτω: ψυχοκινητική καθυστέρηση, διαταραχές λόγου, αταξία, σπασμούς, τυπικό παθολογικό ΗΕΓ, χαρακτηριστική χαρούμενη διάθεση και κάποια τυπικά μορφολογικά στοιχεία (προεξέχουσα γλώσσα, μεγάλο στόμα, υπερκινητικότητα των άνω άκρων) [87]. Παρόλα αυτά, σε ένα ποσοστό ασθενών που φέρει τυπικό φαινότυπο AS, δεν αποκαλύπτεται η μοριακή βλάβη, μετά από μοριακή ανάλυση της 15q11-q13 αλλά και του γονιδίου *UBE3A*. Προκύπτει λοιπόν το ερώτημα αν στους ασθενείς αυτούς, μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, δεν αποκαλύπτονται

ή υπάρχουν και άλλα γονίδια , εκτός ή εντός της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13, τα οποία επηρεάζουν την έκφραση του *UBE3A*. Μελέτες στο επίπεδο του cDNA σε αυτούς τους ασθενείς θα μπορούσε να δώσει απάντηση στο ερώτημα αν έχει επηρεαστεί η έκφραση του γονιδίου *UBE3A*, παρόλο που δεν έχει αποκαλυφθεί μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή του. Ευρήματα σαν τα παραπάνω θα αποτελούσαν ένδειξη για την ύπαρξη άλλων γενετικών ή επιγενετικών παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση του *UBE3A*. Μελέτες έκφρασης του γονιδίου *UBE3A* σε ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά AS, δεν φαίνεται να υπάρχουν στην βιβλιογραφία, πιθανότατα λόγω της δυσκολίας τέτοιων μελέτων, δεδομένου ότι το γονίδιο εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα στους περισσότερους ιστούς (εκτός από συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου), ενώ τα επίπεδα έκφρασής του στο αίμα είναι πολύ χαμηλά [39].

6.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ 15q11-q13

Μετά από αίτημα των γονέων, και στα πλαίσια της μοριακής διαγνωστικής προσέγγισης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μοριακή διερεύνηση σε συγκεκριμένους ασθενείς της παρούσας μελέτης (ομάδα Γ), στους οποίους η ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* δεν είχε αποκαλύψει πιθανή μοριακή βλάβη. Στους ασθενείς αυτούς ανιχνεύθηκαν παθολογικές μεταλλάξεις σε γονίδια που βρίσκονται εκτός της περιοχής 15q11- q13 (*CDKL- 5* και *MECP- 2*), καθώς και χρωμοσωμικά ελλείμματα και διπλασιασμοί σε περιοχές οι οποίες περιέχουν σημαντικά γονίδια για κρίσιμες αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα αποτελέσματα της μοριακής αυτής διερεύνησης αναλύονται παρακάτω.

6.5.1.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *CDKL5* (MIM#300203)

Σε δύο ασθενείς (AS50 και AS52) ανιχνεύθηκαν σημειακές αλλαγές στο γονίδιο *CDKL5*, το οποίο εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος

X (Χρ22) και κωδικοποιεί για μία φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη με δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών Ser/ Thre. Στον AS50, η σημειακή μετάλλαξη c. 2153_2154dupTG, προκαλεί την αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) της πρωτεΐνης Cdkl5 (frameshift mutation), προκαλώντας την δημιουργία κωδικονίου λήξης της πρωτεϊνοσύνθεσης και την παραγωγή μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Η ανίχνευση της μετάλλαξης αυτής στον ασθενή AS50 , θέτει την κλινική διάγνωση Συνδρόμου West (X- linked infantile spasm syndrome) ή μη τυπικού Συνδρόμου Rett.

Στον ασθενή AS52, η σημειακή αλλαγή που ανιχνεύθηκε στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *CDKL5* (IVS4+28_29insAT) δεν έχει άμεσα συσχετισθεί με τον βαρύ φαινότυπο του ασθενούς, χωρίς να αποκλείεται η αρνητική επίδραση της συγκεκριμένης αλλαγής στην φυσιολογική έκφραση και λειτουργία του γονιδίου.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών δίνονται στον Πίνακα 3.3. Οι δύο παραπάνω ασθενείς εμφανίζουν διαφορετικού βαθμού ψυχοκινητική καθυστέρηση, με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη μικροκεφαλίας. Κανένας από τους δύο ασθενείς δεν είχε υποβληθεί σε ηλεκτροεγκεφαλική μελέτη (HEΓ), το οποίο φαίνεται τελικά να έχει μεγάλη σημασία στην διαφορική διάγνωση του συνδρόμου Angelman [106]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKL5* έχουν συσχετισθεί μέχρι σήμερα με το σύνδρομο X- linked infantile spasm (ISSX), γνωστό επίσης και ως X- linked West syndrome, με το σύνδρομο Rett, καθώς και με μη τυπικό σύνδρομο Angelman ή με ασθενείς με αλληλοεπικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά που παραπέμπουν σε σύνδρομο Angelman και Rett [97-100]. Ειδικά για την συμμετοχή του *CDKL5* γονιδίου στην παθογένεια του συνδρόμου Rett, μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *CDKL5* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη *MECP2*, τόσο in vitro όσο και in vivo, και ότι η *CDKL5* μεσολαβεί στην φωσφορυλίωση της *MECP2* [101].

6.5.1.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *MECP2* (MIM#300005)

Σε έναν από τους ασθενείς της μελέτης (AS53), με κλινικά στοιχεία συνδρόμου Angelman (Πίνακας 3.3), και χωρίς ευρήματα από την μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A*, ανιχνεύθηκε σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 4 του γονιδίου *MECP2*, το οποίο εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος X (Xq28). Το γονίδιο *MECP2* κωδικοποιεί την methyl- CpG binding πρωτεΐνη, η οποία καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της κυτοσίνης (C) από το νουκλεοτίδιο της θυμίνης (T) στην θέση 916 του cDNA του *MECP2* γονιδίου (c. 916C>T) προκαλεί την αντικατάσταση του αμινοξέος της αργινίνης (Arg, R) σε κυστεΐνη (Cys, C), στη θέση 306 του πρωτεϊνικού προϊόντος (p.R306C). Η διαφορική διάγνωση των δύο συνδρόμων, συνδρόμου Rett και Angelman, είναι πολύ δύσκολη ιδιαίτερα σε μικρές ηλικίες και σε μη τυπικούς ασθενείς. Και τα δύο σύνδρομα αποτελούν νευρολογικές διαταραχές που εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία και περιλαμβάνουν τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: διανοητική και ψυχοκινητική καθυστέρηση, διαταραχές λόγου, κινητικά προβλήματα, μικροκεφαλία, σπασμούς, στερεότυπες κινήσεις των χεριών καθώς και αυτιστικά στοιχεία [106]. Υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την επίδραση της ελαττωματικής έκφρασης του γονιδίου *MECP2* στην έκφραση του γονιδίου *UBE3A*. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η δυσλειτουργία του *MECP2* σχετίζεται με την αποσιώπηση (silencing) του *UBE3A* από το μητρικό αλληλόμορφο, μέσω της επαγόμενης έκφρασης του *UBE3A* μεταγράφου αντίθετης φοράς (antisense transcript) από το μητρικό αλληλόμορφο στον εγκέφαλο [118, 119]. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του *Ube3a* γονιδίου στον εγκέφαλο και της λειτουργικότητας του *Mecp2*, σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια [120].

6.5.1.3 ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΣΕ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΗΣ 15q11-q13

Σε τέσσερεις ασθενείς της μελέτης (AS36, AS46, AS47 και AS48) ανιχνεύθηκαν μικροδιπλασιασμοί και μικροελλείμματα σε χρωμοσωμικές περιοχές εκτός της 15q11- q13, με τη μέθοδο του Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού (array- CGH). Ορισμένες από αυτές τις μοριακές αλλαγές αφορούν γνωστούς πολυμορφισμούς αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs) και δεν συμβάλλουν στον παθολογικό φαινότυπο. Βρέθηκαν όμως μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί σε χρωμοσωμικές περιοχές που περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία μπορεί να σχετίζονται με τον παθολογικό φαινότυπο, γιατί συμμετέχουν και ρυθμίζουν σημαντικές αναπτυξιακές και νευρολογικές διαδικασίες. Παρακάτω, περιγράφονται γονίδια που βρίσκονται εντός των χρωμοσωμικών περιοχών στις οποίες ανιχνεύθηκαν μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί, και τα οποία θα μπορούσαν να σχετίζονται με την εκδήλωση του παθολογικού φαινοτύπου στους τέσσερεις ασθενείς:

Έλλειμμα στην περιοχή 7q31.1: Στην περιοχή αυτή εδράζεται το γονίδιο *FOXP2* (*Forkhead Box P2*; MIM# 605317) το οποίο κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα και έχει συσχετισθεί με αναπτυξιακές διαταραχές του λόγου [121, 122].

Έλλειμμα στην περιοχή 11q13.5: Το γονίδιο *MAP6* (*Microtubule Associated protein 6*; MIM# 601783), που βρίσκεται στην περιοχή 11q13.5, συμμετέχει στην σταθεροποίηση του δικτύου των μικροσωληνίσκων . Ποντίκια knock- out για το γονίδιο *MAP6*, εμφανίζουν διαταραχές στις νευρικές συνάψεις, οι οποίες συσχετίζονται με σοβαρές διαταραχές συμπεριφοράς [123].

Διπλασιασμός (μεγέθους 0.010Mb) στην περιοχή 3q27.1: Στην περιοχή αυτή εδράζεται το γονίδιο *CLCN2* (*Chloride Channel 2*; MIM# 600570), το οποίο είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων χλωρίου στους νευρώνες. Μεταλλάξεις στο *CLCN2* έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση νεανικής μυοκλονικής και ιδιοπαθούς γενικευμένης επιληψίας [124, 125].

Διπλασιασμός (μεγέθους 0.008Mb) στην περιοχή 16p13.3: Στην περιοχή αυτή εδράζεται το γονίδιο *CACNA1H* (*Calcium channel, voltage dependent, T type, Alpha 1H Subunit*; MIM# 607904), το οποίο κωδικοποιεί για κανάλι ιόντων καλίου. Ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν συσχετισθεί με την αφαιρετική επιληψία της παιδικής ηλικίας (*childhood absence epilepsy*) καθώς και με την ιδιοπαθή γενικευμένη επιληψία [126, 127].

Έλλειμμα (μεγέθους 1.01Mb) στην περιοχή 5p15.33: Δύο γονίδια που πιθανόν σχετίζονται με τον φαινότυπο του ασθενούς εδράζονται στην περιοχή αυτή. Το *SLC6A3* (*Solute Carrier Family 6*; MIM# 126455), το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη νευροδιαβιβαστή, και έχει συσχετισθεί με την Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής – Υπερκινητικότητα (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD*) [128, 129]. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται και το γονίδιο *IRX4* (*Iroquois Homeobox Protein 4*; MIM# 606199), το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος [130].

Έλλειμμα (μεγέθους 0.515Mb) στην περιοχή 2q14.2: Το γονίδιο *GLI2* (MIM# 165230) έχει συσχετισθεί με την φυσιολογική ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου [131].

Διπλασιασμός (μεγέθους 0.645Mb) στην περιοχή 6q24.3: Στην περιοχή αυτή εδράζονται δύο γονίδια που πιθανόν να σχετίζονται με τον φαινότυπο του ασθενούς. Το γονίδιο *EPM2A* (607566) έχει συσχετισθεί με μυοκλονικές επιληψίες τύπου Lafora (MIM# 254780) [132, 133], ενώ το γονίδιο *GRM1* (*Glutamate Receptor*; MIM* 604473), το οποίο κωδικοποιεί για τον υποδοχέα του γλουταμινικού οξέος, έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη σοβαρών προβλημάτων συντονισμού κινήσεων, αταξίας και μαθησιακές δυσκολίες [134, 135].

Τα κοινά κλινικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων αυτών ατόμων είναι η ψυχοκινητική καθυστέρηση, η μικροκεφαλία, και οι σπασμοί (εκτός από τον ασθενή AS36) (Πίνακας 3.3).

Το εύρος της διανοητικής καθυστέρησης είναι μεγάλο και πολύπλοκο. Μελέτες στις οποίες θα περιλαμβάνονται τέτοιες ομάδες ατόμων, με ανεξήγητη μοριακή βλάβη, και θα ελέγχονται με την χρήση μεθόδων όπως ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (array- CGH), θα προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για την συμμετοχή επιμέρους χρωμοσωμικών περιοχών ή γονιδίων στην εμφάνιση ψυχοκινητικών διαταραχών, και θα οδηγήσουν και στην αποκάλυψη νέων συνδρόμων που μέχρι σήμερα παραμένουν άγνωστα.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μοριακή μελέτη του συνδρόμου Angelman, περιλαμβάνει την ανάλυση του προτύπου μεθυσίας της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11- q13 σε συνδυασμό με την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών της περιοχής (DNRP analysis), για την αποκάλυψη ελλειμμάτων, πατρικής μονογονεϊκής δισωμίας και διαταραχών στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής, καλύπτοντας το 70- 80% των ασθενών με AS. Η μοριακή μελέτη του γονιδίου *UBE3A* σε ασθενείς με κλινική υποψία συνδρόμου Angelman, προσφέρει διάγνωση στο 5- 10% των AS ασθενών, ενώ παραμένει αδιευκρίνιστη η μοριακή βλάβη σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών (10-20%) που παραπέμπονται για έλεγχο συνδρόμου Angelman.

Τα εύρος της κλινικής ετερογένειας των ασθενών με AS ανάλογα με την μοριακή βλάβη την οποία φέρουν, σε συνδυασμό με την αλληλεπικάλυψη κάποιων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών με το σύνδρομο Rett ή το σύνδρομο West, καθιστά την κλινική εκτίμηση δύσκολη, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μη τυπικών ασθενών. Μελέτες σύγκρισης φαινοτύπου – γονοτύπου υποστηρίζουν την ύπαρξη κύριων κλινικών στοιχείων για την παραπομπή AS ασθενών για μοριακό έλεγχο του γονιδίου *UBE3A*, όπως η μικροκεφαλία και το τυπικό παθολογικό ΗΕΓ.

Η εφαρμογή μίας γρήγορης, εύχρηστης και αξιόπιστης μεθόδου σάρωσης, όπως η μέθοδος ECMA, για μεγάλες ερευνητικές μελέτες αλλά και για την έγκυρη και ασφαλή διάγνωση των AS ασθενών με *UBE3A* μεταλλάξεις, είναι απαραίτητη, προκειμένου να αντικατασταθούν οι αντίστοιχες χρονοβόρες, όπως η μέθοδος SCCP.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν ότι το ποσοστό των AS ασθενών που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *UBE3A*, κυμαίνεται από 5 έως 10%. Στις περιπτώσεις ύπαρξης σημειακών μεταλλάξεων είναι απαραίτητη η παροχή γενετικής συμβουλευτικής στην οικογένεια, δεδομένου ότι η συχνότητα επανεμφάνισης μπορεί να ανέρχεται έως και 50%, εάν η μητέρα είναι φορέας

της μετάλλαξης. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην περίπτωση μωσαϊκισμού (γαμετικού ή σωματικού) στην μητέρα, όπου η συχνότητα επανεμφάνισης μπορεί να είναι επίσης αρκετά μεγάλη (έως και σχεδόν 50%).

Η ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *MECP2* και *CDKL5* σε ασθενείς της μελέτης, τονίζει την ανάγκη για περισσότερες μελέτες σύγκρισης φαινοτύπου – γονοτύπου, ώστε να καθοριστούν ασφαλή κλινικά κριτήρια για την διαφορική διάγνωση των συνδρόμων. Δημιουργείται παράλληλα και το ερώτημα αν υπάρχει in vivo αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών, γεγονός που θα εξηγούσε τα κοινά κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με σύνδρομο Angelman, Rett και West.

Τέλος, όπως υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στο ποσοστό των ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman στους οποίους δεν ανιχνεύεται καμία μοριακή βλάβη με την υπάρχουσα διαγνωστική προσέγγιση, η ανάλυση και άλλων γενετικών περιοχών και γονιδίων, μπορεί να αποκαλύψει την πιθανή μοριακή διαταραχή. Μέθοδοι όπως ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (array- CGH) μπορεί να αποκαλύψει νέες χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες να σχετίζονται με την εμφάνιση κάποιων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με σύνδρομο Angelman.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Σύνδρομο Angelman είναι μία νευροαναπτυξιακή διαταραχή η οποία εκδηλώνεται με ποικίλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, προκαλείται από την ελαττωματική έκφραση του γονιδίου *UBE3A* από το μητρικό αλληλόμορφο και οφείλεται κυρίως σε χρωμοσωμικά ελλείμματα, πατρική μονογονεϊκή δισωμία και βλάβη στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11- q13. Οι τρεις παραπάνω παθογενετικοί μηχανισμοί ανιχνεύονται στο 70- 80% των ασθενών με σύνδρομο Angelman. Σημειακές μεταλλάξεις στο μητρικό αλληλόμορφο του γονιδίου *UBE3A* έχουν ανιχνευθεί και αποτελούν την γενετική βάση του συνδρόμου σε ποσοστό 5- 10% των ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* σε συνολικά 53 ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman. Ανιχνεύθηκαν δύο παθολογικές σημειακές μεταλλάξεις, η μία εκ των οποίων αναφέρεται για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία, και τέσσερις πολυμορφικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένου και μίας πρωτότυπης. Και οι δύο ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκαν σημειακές μεταλλάξεις, έφεραν τυπικό παθολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα και μικροκεφαλία. Στην μία εκ των δύο οικογενειών ακολούθησε προγεννητικός έλεγχος σε δύο επόμενες κυήσεις, όπου σε καμμία από τις δύο δεν ανιχνεύθηκε η παθολογική μετάλλαξη.

Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) για την μοριακή ανάλυση του γονιδίου *UBE3A* σε ασθενείς με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman, και αξιολογήθηκε η ακρίβεια, η ευαισθησία και η επαναληψιμότητά της.

Παρόλο που η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο UBE3A συνεχώς αυξάνεται, η μεγάλη ετερογένεια των ασθενών με διανοητική και αναπτυξιακή καθυστέρηση που παραπέμπονται για διερεύνηση συνδρόμου Angelman, καθιστά πολλές φορές αναγκαία την μοριακή ανάλυση και άλλων γονιδίων (π.χ. CDKL5 και MECP2) ή ακόμα και την εφαρμογή μεθόδων, όπως ο Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός (array- CGH), ώστε να είναι δυνατή η διαφορική διάγνωση από άλλα σύνδρομα με τα οποία έχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά (π.χ. σύνδρομο Rett, West, κ.ά).

ABSTRACT

Angelman Syndrome is a neurodevelopmental disorder with a complex phenotype caused by deficiency of maternal *UBE3A* gene expression on the imprinted Prader Willi/ Angelman syndrome critical region which results from chromosomal deletions, uniparental disomy and imprinting defects of the 15q11-q13 region in 70- 80% of patients. Loss of function mutations in maternally inherited *UBE3A* is the genetic cause of the disease in 5- 10% of patients. In the present study, molecular analysis of the *UBE3A* gene in 43 Greek Angelman syndrome patients revealed two pathological mutations- one of them novel - and four sequence changes considered as polymorphic variants- one of them novel alteration. The two pathological mutations were revealed in patients with typical electroencephalography pattern and microcephaly.

ECMA assay (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) has been applied for the first time as a screening method for molecular analysis of *UBE3A* gene and it has been evaluated for its sensitivity and reliability.

Although the number of *UBE3A* mutations reported in the literature is increasing, mental retardation phenotypes are complex, suggesting additional mutation analysis of other genes (e.g. *MECP2* and *CDKL5*), or genome wide screening methods (such as array- CGH), especially in atypical cases.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Angelman, H., "Puppet children". A report of three cases. *Dev Med Child Neurol*, 1965. **7**: p. 681- 688.
2. Magenis, R.E., et al., *Is Angelman syndrome an alternate result of del(15)(q11q13)?* *Am J Med Genet*, 1987. **28**(4): p. 829-38.
3. Clayton-Smith, J. and L. Laan, *Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects.* *J Med Genet*, 2003. **40**(2): p. 87-95.
4. Williams, C.A., et al., *Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria.* *Angelman Syndrome Foundation.* *Am J Med Genet*, 1995. **56**(2): p. 237-8.
5. Williams, C.A., *Neurological aspects of the Angelman syndrome.* *Brain Dev*, 2005. **27**(2): p. 88-94.
6. Fryburg, J.S., W.R. Breg, and V. Lindgren, *Diagnosis of Angelman syndrome in infants.* *Am J Med Genet*, 1991. **38**(1): p. 58-64.
7. Clayton-Smith, J. and M.E. Pembrey, *Angelman syndrome.* *J Med Genet*, 1992. **29**(6): p. 412-5.
8. Leonard, C.M., et al., *Angelman and Prader-Willi syndrome: a magnetic resonance imaging study of differences in cerebral structure.* *Am J Med Genet*, 1993. **46**(1): p. 26-33.
9. Penner, K.A., et al., *Communication, cognition, and social interaction in the Angelman syndrome.* *Am J Med Genet*, 1993. **46**(1): p. 34-9.
10. Amos-Landgraf, J.M., et al., *Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints.* *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(2): p. 370-86.
11. Molfetta, G.A., W.A. Silva-Jr, and J.M. Pina-Neto, *Clinical, cytogenetical and molecular analyses of Angelman syndrome.* *Genet Couns*, 2003. **14**(1): p. 45-56.
12. Nicholls, R.D., et al., *Paternal uniparental disomy of chromosome 15 in a child with Angelman syndrome.* *Ann Neurol*, 1992. **32**(4): p. 512-8.
13. Stalker, H.J., C.A. Williams, and J. Wagstaff, *Genetic counseling in Angelman syndrome: gonadal mosaicism.* *Am J Med Genet*, 1998. **78**(5): p. 482.
14. Kokkonen, H. and J. Leisti, *An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germ-line mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family.* *Hum Genet*, 2000. **107**(1): p. 83-5.
15. Van Buggenhout, G. and J.P. Fryns, *Angelman syndrome (AS, MIM 105830).* *Eur J Hum Genet*, 2009. **17**(11): p. 1367-73.
16. Buiting, K., et al., *Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome.* *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(5): p. 1290-4.
17. Burger, J., et al., *Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome.* *Am J Hum Genet*, 1997. **61**(1): p. 88-93.
18. McGrath, J. and D. Solter, *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes.* *Cell*, 1984. **37**(1): p. 179-83.
19. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris, *Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome.* *Cell*, 1986. **45**(1): p. 127-36.
20. Barlow, D.P., *Gametic imprinting in mammals.* *Science*, 1995. **270**(5242): p. 1610-3.
21. Razin, A. and R. Shemer, *DNA methylation in early development.* *Hum Mol Genet*, 1995. **4 Spec No**: p. 1751-5.
22. Paoloni-Giacobino, A. and J.R. Chaillet, *Genomic imprinting and assisted reproduction.* *Reprod Health*, 2004. **1**(1): p. 6.

23. Mayer, W., et al., *Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 629-34.
24. Oswald, J., et al., *Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote*. Curr Biol, 2000. **10**(8): p. 475-8.
25. Runte, M., et al., *The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(23): p. 2687-700.
26. Gray, T.A., S. Saitoh, and R.D. Nicholls, *An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5616-21.
27. Ozcelik, T., et al., *Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 265-9.
28. Sutcliffe, J.S., et al., *Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 52-8.
29. Leff, S.E., et al., *Maternal imprinting of the mouse Snrpn gene and conserved linkage homology with the human Prader-Willi syndrome region*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 259-64.
30. Glenn, C.C., et al., *Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(9): p. 1377-82.
31. Runte, M., et al., *SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome*. Hum Genet, 2004. **114**(6): p. 553-61.
32. Glenn, C.C., et al., *Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(4): p. 321-32.
33. Perk, J., et al., *The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5807-14.
34. Glenn, C.C., et al., *Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene*. Am J Hum Genet, 1996. **58**(2): p. 335-46.
35. Saitoh, S. and T. Wada, *Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1958-62.
36. Horsthemke, B. and J. Wagstaff, *Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region*. Am J Med Genet A, 2008. **146A**(16): p. 2041-52.
37. Paulsen, M. and A.C. Ferguson-Smith, *DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease*. J Pathol, 2001. **195**(1): p. 97-110.
38. Matsuura, T., et al., *De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 74-7.
39. Kishino, T. and J. Wagstaff, *Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes*. Genomics, 1998. **47**(1): p. 101-7.
40. Yamamoto, Y., J.M. Huibregtse, and P.M. Howley, *The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing*. Genomics, 1997. **41**(2): p. 263-6.
41. Vu, T.H. and A.R. Hoffman, *Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain*. Nat Genet, 1997. **17**(1): p. 12-3.
42. Rougeulle, C., H. Glatt, and M. Lalande, *The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain*. Nat Genet, 1997. **17**(1): p. 14-5.
43. Albrecht, U., et al., *Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons*. Nat Genet, 1997. **17**(1): p. 75-8.

44. Gustin, R.M., et al., *Tissue-specific variation of Ube3a protein expression in rodents and in a mouse model of Angelman syndrome*. Neurobiol Dis. **39**(3): p. 283-91.
45. Herzing, L.B., E.H. Cook, Jr., and D.H. Ledbetter, *Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of UBE3A and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(15): p. 1707-18.
46. Yamasaki, K., et al., *Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(8): p. 837-47.
47. Dindot, S.V., et al., *The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(1): p. 111-8.
48. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4918-27.
49. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(2): p. 775-84.
50. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2563-7.
51. Ramamoorthy, S. and Z. Nawaz, *E6-associated protein (E6-AP) is a dual function coactivator of steroid hormone receptors*. Nucl Recept Signal, 2008. **6**: p. e006.
52. Huang, L., et al., *Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1321-6.
53. Scheffner, M., U. Nuber, and J.M. Huibregtse, *Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade*. Nature, 1995. **373**(6509): p. 81-3.
54. Zanier, K., et al., *Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance*. J Mol Biol, 2005. **349**(2): p. 401-12.
55. Cooper, E.M., et al., *Biochemical analysis of Angelman syndrome-associated mutations in the E3 ubiquitin ligase E6-associated protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 41208-17.
56. Kishino, T., M. Lalande, and J. Wagstaff, *UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 70-3.
57. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
58. Talis, A.L., J.M. Huibregtse, and P.M. Howley, *The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6439-45.
59. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
60. Nawaz, Z., et al., *The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1182-9.
61. Shibata, H., et al., *Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action*. Recent Prog Horm Res, 1997. **52**: p. 141-64; discussion 164-5.
62. Anzick, S.L., et al., *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer*. Science, 1997. **277**(5328): p. 965-8.
63. Li, H., et al., *Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(13): p. 2025-37.

64. Spencer, T.E., et al., *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 194-8.
65. Tjian, R., *The biochemistry of transcription and gene regulation*. Harvey Lect, 1994. **90**: p. 19-39.
66. Smith, C.L., et al., *Genetic ablation of the steroid receptor coactivator-ubiquitin ligase, E6-AP, results in tissue-selective steroid hormone resistance and defects in reproduction*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(2): p. 525-35.
67. Khan, O.Y., et al., *Multifunction steroid receptor coactivator, E6-associated protein, is involved in development of the prostate gland*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(3): p. 544-59.
68. Jiang, Y.H., et al., *Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 799-811.
69. Miura, K., et al., *Neurobehavioral and electroencephalographic abnormalities in Ube3a maternal-deficient mice*. Neurobiol Dis, 2002. **9**(2): p. 149-59.
70. Cheron, G., et al., *Fast cerebellar oscillation associated with ataxia in a mouse model of Angelman syndrome*. Neuroscience, 2005. **130**(3): p. 631-7.
71. Wu, Y., et al., *A Drosophila model for Angelman syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12399-404.
72. Lu, Y., et al., *The Drosophila homologue of the Angelman syndrome ubiquitin ligase regulates the formation of terminal dendritic branches*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(3): p. 454-62.
73. Harris, K.F., et al., *Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13738-43.
74. Kumar, S., W.H. Kao, and P.M. Howley, *Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13548-54.
75. Nuber, U., S.E. Schwarz, and M. Scheffner, *The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate*. Eur J Biochem, 1998. **254**(3): p. 643-9.
76. Li, H., et al., *Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13636-43.
77. Dhananjayan, S.C., et al., *WW domain binding protein-2, an E6-associated protein interacting protein, acts as a coactivator of estrogen and progesterone receptors*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2343-54.
78. Mani, A., et al., *E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8680-6.
79. Shimoji, T., et al., *Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation*. J Cell Biochem, 2009. **106**(6): p. 1123-35.
80. Greer, P.L., et al., *The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc*. Cell, 2010. **140**(5): p. 704-16.
81. Yashiro, K., et al., *Ube3a is required for experience-dependent maturation of the neocortex*. Nat Neurosci, 2009. **12**(6): p. 777-83.
82. Gilfillan, G.D., et al., *SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 1003-10.
83. Greer, P.L. and M.E. Greenberg, *From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 846-60.

84. Weeber, E.J., et al., *Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome*. J Neurosci, 2003. **23**(7): p. 2634-44.
85. Gao, X., et al., *Decreased expression of e6-associated protein in breast and prostate carcinomas*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1707-12.
86. van Woerden, G.M., et al., *Rescue of neurological deficits in a mouse model for Angelman syndrome by reduction of alphaCaMKII inhibitory phosphorylation*. Nat Neurosci, 2007. **10**(3): p. 280-2.
87. Baumer, A., D. Balmer, and A. Schinzel, *Screening for UBE3A gene mutations in a group of Angelman syndrome patients selected according to non-stringent clinical criteria*. Hum Genet, 1999. **105**(6): p. 598-602.
88. Fang, P., et al., *The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(1): p. 129-35.
89. Malzac, P., et al., *Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1353-60.
90. Moncla, A., et al., *Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling*. J Med Genet, 1999. **36**(7): p. 554-60.
91. Rapakko, K., H. Kokkonen, and J. Leisti, *UBE3A gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by conformation sensitive gel electrophoresis*. Am J Med Genet A, 2004. **126A**(3): p. 248-52.
92. Hitchins, M.P., et al., *Investigation of UBE3A and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS*. Am J Med Genet A, 2004. **125A**(2): p. 167-72.
93. Russo, S., et al., *Novel mutations of ubiquitin protein ligase 3A gene in Italian patients with Angelman syndrome*. Hum Mutat, 2000. **15**(4): p. 387.
94. Boyes, L., et al., *Detection of a deletion of exons 8-16 of the UBE3A gene in familial Angelman syndrome using a semi-quantitative dosage PCR based assay*. Eur J Med Genet, 2006. **49**(6): p. 472-80.
95. Burger, J., et al., *Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome*. Am J Med Genet, 2002. **111**(3): p. 233-7.
96. Camprubi, C., et al., *Novel UBE3A mutations causing Angelman syndrome: different parental origin for single nucleotide changes and multiple nucleotide deletions or insertions*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(3): p. 343-8.
97. Bahi-Buisson, N., et al., *Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations*. Brain, 2008. **131**(Pt 10): p. 2647-61.
98. Grosso, S., et al., *Seizures and electroencephalographic findings in CDKL5 mutations: case report and review*. Brain Dev, 2007. **29**(4): p. 239-42.
99. Russo, S., et al., *Novel mutations in the CDKL5 gene, predicted effects and associated phenotypes*. Neurogenetics, 2009. **10**(3): p. 241-50.
100. Tao, J., et al., *Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(6): p. 1149-54.
101. Mari, F., et al., *CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(14): p. 1935-46.
102. Takano, K., et al., *Two percent of patients suspected of having Angelman syndrome have TCF4 mutations*. Clin Genet. **78**(3): p. 282-8.

103. Herzing, L.B., et al., *The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression.* Am J Hum Genet, 2001. **68**(6): p. 1501-5.
104. Meguro, M., et al., *A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome.* Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 19-20.
105. Kashiwagi, A., et al., *Predominant maternal expression of the mouse Atp10c in hippocampus and olfactory bulb.* J Hum Genet, 2003. **48**(4): p. 194-8.
106. Jedele, K.B., *The overlapping spectrum of rett and angelman syndromes: a clinical review.* Semin Pediatr Neurol, 2007. **14**(3): p. 108-17.
107. Van Esch, H., et al., *Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males.* Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 442-53.
108. Garavelli, L. and P.C. Mainardi, *Mowat-Wilson syndrome.* Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 42.
109. Phelan, M.C., *Deletion 22q13.3 syndrome.* Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 14.
110. van Bon, B.W., et al., *The 2q23.1 microdeletion syndrome: clinical and behavioural phenotype.* Eur J Hum Genet. **18**(2): p. 163-70.
111. Lawyer, F.C., et al., *High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity.* PCR Methods Appl, 1993. **2**(4): p. 275-87.
112. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
113. Lossie, A.C., et al., *Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome.* J Med Genet, 2001. **38**(12): p. 834-45.
114. van der Meulen, M.A., M.J. van der Meulen, and G.J. te Meerman, *Recurrence risk for germinal mosaics revisited.* J Med Genet, 1995. **32**(2): p. 102-4.
115. Tekin, M., et al., *Fluorescence in situ hybridization detectable mosaicism for Angelman syndrome with biparental methylation.* Am J Med Genet, 2000. **95**(2): p. 145-9.
116. Buiting, K., et al., *Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(3): p. 571-7.
117. Gillissen-Kaesbach, G., et al., *A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect.* Eur J Hum Genet, 1999. **7**(6): p. 638-44.
118. Makedonski, K., et al., *MeCP2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetic aberrations at the PWS/AS imprinting center that affects UBE3A expression.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(8): p. 1049-58.
119. Samaco, R.C., A. Hogart, and J.M. LaSalle, *Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(4): p. 483-92.
120. Jordan, C. and U. Francke, *Ube3a expression is not altered in Mecp2 mutant mice.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(14): p. 2210-5.
121. Konopka, G., et al., *Human-specific transcriptional regulation of CNS development genes by FOXP2.* Nature, 2009. **462**(7270): p. 213-7.
122. Vernes, S.C., et al., *A functional genetic link between distinct developmental language disorders.* N Engl J Med, 2008. **359**(22): p. 2337-45.

123. Andrieux, A., et al., *The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders*. *Genes Dev*, 2002. **16**(18): p. 2350-64.
124. Haug, K., et al., *Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies*. *Nat Genet*, 2003. **33**(4): p. 527-32.
125. Saint-Martin, C., et al., *Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy*. *Hum Mutat*, 2009. **30**(3): p. 397-405.
126. Chen, Y., et al., *Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy*. *Ann Neurol*, 2003. **54**(2): p. 239-43.
127. Heron, S.E., et al., *Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants*. *Ann Neurol*, 2007. **62**(6): p. 560-8.
128. Cook, E.H., Jr., et al., *Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56**(4): p. 993-8.
129. Waldman, I.D., et al., *Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity*. *Am J Hum Genet*, 1998. **63**(6): p. 1767-76.
130. Bosse, A., et al., *Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system*. *Mech Dev*, 1997. **69**(1-2): p. 169-81.
131. Roessler, E., et al., *Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13424-9.
132. Gomez-Garre, P., et al., *Mutational spectrum of the EPM2A gene in progressive myoclonus epilepsy of Lafora: high degree of allelic heterogeneity and prevalence of deletions*. *Eur J Hum Genet*, 2000. **8**(12): p. 946-54.
133. Minassian, B.A., et al., *Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy*. *Nat Genet*, 1998. **20**(2): p. 171-4.
134. Aiba, A., et al., *Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice*. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 365-75.
135. Conquet, F., et al., *Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1*. *Nature*, 1994. **372**(6503): p. 237-43.

10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A.

AS: Angelman Syndrome

AS- SRO: Angelman Syndrome- Shortest Region of Overlap

AMPA Receptors: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors

B.

BSA: Bovine Serum Albumin

bp: base pair

C.

CT Scan: Computed Tomography

CNVs: Copy Number Variations

CGH: Comparative Genomic Hybridization

D.

DNRP: Dinucleotide Repeat Polymorphism

dHPLC: Denaturing High- Performance Liquid Chromatography

E.

EtBr: Ethidium Bromide

EEG: Electroencephalography

ECMA: Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis

F.

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

H.

HECT: Homology to the E6- AP Carboxyl Terminus

I.

IQ: Intelligence Quotient

IC: Imprinting Centre

ISSX: X- linked Infantile Spasm Syndrome

ID: Imprinting Defect

K.

Kb: Kilobase

KO: Knock- Out

M.

MLPA: Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification

Mb: Megabase

mUPD: Maternal Uniparental Disomy

MSPCR: Methylation Specific PCR

MRI: Magnetic Resonance Imaging

O.

OD: Optical Density

ORF: Open Reading Frame

P.

pUPD: Paternal Uniparental Disomy

PWS: Prader Willi Syndrome

PW-SRO: Prader Willi- Shortest Region of Overlap

S.

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism

snoRNA: Small Nucleolar RNA

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

STRs: Short Tandem Repeats

T.

TBE: Tris Borate EDTA

TAE: Tris Acetate EDTA

U.

UPS: Ubiquitin Proteasome System

UPD: Uniparental Disomy

V.

VNTRs: Variable Nucleotide Tandem Repeats

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ II

Δ.

ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε

ΔΑ: Δεν αναφέρεται

Η.

ΗΕΓ: Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα

Κ.

ΚΦ: Κατά Φύση

Π.

ΠΚ: Περίμετρος Κεφαλής

Ψ.

ΨΚΚ: Ψυχοκινητική καθυστέρηση

ΘΕΣΗ ^α	ΑΛΛΑΓΗ ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ	ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
E8	c.59_60insA (645insA)	Πλαισιοτροποποιητική	Μωσαϊκό (στη μητέρα)	1	1	Malzac et al. (1998)
E8	c.62G>A (648G>A)	Παρερμηνεύσιμη p.C21Y	Οικογενής	1	1	Matsuura et al. (1997), Fang et al.(1999), Lossie et al (2005)
E8	c.116G>A (702G>A)	Παρερμηνεύσιμη p.R39H	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Malzac et al. (1998)
E8	c.176_177insGA (762–763insGA)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	1	Baumer et al (1999)
E8	c.270delG (856delG)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	1	Fang et al. (1999)
I8	IVS9- 8A>G (302-8A>G)	Πλαισιοτροποποιητική (νέο 3' splice site)	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Kishino et al. (1997), Malzac et al. (1998)
E9	c.311dupA (897insA)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	2	2 αδέρφια	Russo et al. (2000)
E9	c.316A>C (902A>C)	Παρερμηνεύσιμη p.T106P	Μωσαϊκό (στη μητέρα)	1	1	Rapakko et. al. (2004)
E9	c.323del5 (904del5)	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Fang et al. (1999)
E9	c.325A>T	Ανερμηνεύσιμη p. L109X	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Camprubi et al. (2009)
E9	c.360delAG (946delAG)	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Van De Oueland. (1999)
E9	c.389T>C (975T>C)	Παρερμηνεύσιμη p.I130T	Σποραδική	1	1	Rappako et al. (2004)
E9	c.397_398delAG (980del AG)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Fang et al. (1999), Lossie et al. (2001)

E9	c.418_419insG (1005insG)	Πλαισιοτροποπο ιητική P148X	Σποραδική Ή Μωσαϊκό (στη μητέρα)	1	1	Reported in this paper
E9	c.499G>A (1085G>T)	Nonsense p.E167X	Σποραδική	1	1	Russo et al. (2000)
E9	c.573ins4 (1161dup4,1165 insGTGA)	Πλαισιοτροποπο ιητική p.194X	Οικογενής	1	2 (από τα 3) αδέρφια	Hitchins et al.(2004)
E9	c.711dupT (1296insT)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Baumer
E9	c.876_889del14 (1461del14)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια και μία μητρική πρώτη εξαδέρφη	Malzac et al. (1998)
E9	c.914G>A (1500G>A)	Ανερμηνεύσιμη p.W305X	Οικογενής	1	1	Fang et al. (1999)
E9	c.934C>T	Ανερμηνεύσιμη p.Gln312X	Οικογενής	1	1	Camprubi et al. (2009)
E9	c.936delG (1522del G)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Malzac et al. (1998), Lossie et al. (2001)
E9	c.966delA (1552delA)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Fang et al. (1999), Lossie et al. (2001)
E9	c.974_980del (1559del7)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Fang et al.(1999)
E9	c.986T>C	Παρερμηνεύσιμη p.Ile329Thr	ND ^B (υιοθετημε νο παιδί)	1	1	Camprubi et al. (2009)
E9	c.1006C>T	Ανερμηνεύσιμη p.Arg336X	Οικογενής	1	1	Camprubi et al. (2009)
E9	c.1045T>C (1631T>C)	Παρερμηνεύσιμη p.S349P	Οικογενής	1	3 αδέρφια	Malzac et al. (1998)
E9	c.1109_1112del 4 (1694del4)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1		Fang et al.(1999)

E9	c.1249C>T (1835C→T)	Ανερμηνεύσιμη p.R417X	Σποραδική Οικογενής	1 1	1 1	Matsuura et al. (1997), Fang et al. (1999), Lossie et al. (2001) Camprubi et al. (2009)
E9	c.1337_1344del 8	Πλαισιοτροποπο ιητική	Μωσαϊκό (στη μητέρα)	1	1	Camprubi et al. (2009)
E9	c.1347_1348del AG (1930delAG)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική Σποραδική Οικογενής Σποραδική	1 1 1 1	1 1 1 1	Matsuura et al. (1997), Fang et al.(1999) Fung et al. (1998) Lossie et al. (2001) Rapakko et al. (2004)
E9	c.1382delT (1965delT)	Πλαισιοτροποπο ιητική p.490X	Σποραδική	1	1	Hitchins et al.(2004)
E9	c.1407_1411del 5	Πλαισιοτροποπο ιητική	ND ^B	1	1	Camprubi et al. (2009)
E9	c.1410del5 (1993del5)	Πλαισιοτροποπο ιητική p.473X	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Hitchins et al.(2004)
E9	c.1444C>T (2030C>T)	Ανερμηνεύσιμη p.R482X	Σποραδική Οικογενής	1 1	1 1 και μία μητρική πρώτη εξαδέρφη	Malzac et al. (1998), Lossie et al.(2001) Russo et al (2000)
E9	c.1447A>T (2033 A > T)	Ανερμηνεύσιμη p.R483X	Οικογενής	1	4 αδέρφια	Lossie et al. (2001)
E9	c.1451_1460del 10 (2037del10)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Malzac et al.(1998)
E9	c.1516C>T (2102C>T)	Παρερμηνεύσιμ η p.Arg506Cys	Σποραδική Οικογενής	1 1	1 1	Baumer et al.(1999) Camprubi et al. (2009)
E10	c.1559delTC	Πλαισιοτροποπο	Σποραδική	1	1	Runte et al.(2004)

	(c.2145delTC)	ιητική				
E10	c.1599T>G (2185T→G)	Ανερμηνεύσιμη p.Y533X	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Fang et al. (1999)
E10	c.1632dupGAG G (2218dupGAGG)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	2 πρώτα εξαδέρφια	Molfetta et al. (2004)
E10	c.1644_1669deli nsA (2230del26insA)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Malzac et al. (1998)
I10	c.1108+1G>A (1693 +1G>A)	Πλαισιοτροποπο ιητική (splice site mutation)	Σποραδική	1	1	Sartori S. et al, (2008)
E11	c.1790delG (2376delG)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Baumer et al. (1999)
E11	c.1893_1894del 2	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Camprubi et al. (2009)
I11	c.1900-12del7 (2486-12del7)	Πλαισιοτροποπο ιητική (Splice acceptor site mutation)	Οικογενής	1	2 αδέρφια και η ετεροθαλής αδερφή τους (από την ίδια μητέρα)	Van den Ouweland et al. (1999)
E12	c.1941insA (2527insA)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Malzac et al. (1998)
E12	c.1981ins4 (2567ins4)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Σποραδική	1	1	Fang et al. (1999)
E12	c.1957insA (2544insA)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	1	Russo et al. (2000)
E12	c.1985del4 (2571 del4)	Πλαισιοτροποπο ιητική	Οικογενής	1	1	Runte et al. (2004)
E14	c.2269del12 (2855del12)	ΥTRD757Δ	Οικογενής	1	1	Hitchins et al.(2004)
I14	c.2295-2 A>G	Πλαισιοτροποπο ιητική (Splice mutation)	Μωσαϊκό (στη μητέρα)	1	2 αδέρφια	Hosoki et al. (2005)
E15	c.2304G>A (2890G>A)	Ανερμηνεύσιμη p.W768X	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Tsai et al.(1998), Fang et al. (1999), Runte et al. (2004)

E15	c.2336_2337dup4	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Camprubi et al. (2009)
E15	c.2346del3 (2929del3)	F782Δ	Οικογενής	1 1 1	2 αδέρφια 1 2 αδέρφια	Fang et al. (1999), Russo et al. (2000) Hitchins et al.(2004)
E15	c.2406ins3 (2992ins3)	p.l802ins	Οικογενής	1	2 μητρικά δεύτερα εξαδέρφια	Malzac et al.(1998)
E15	c.2411T>A (2997T>A)	Παρερμηνεύσιμη p.l804K	Σποραδική	1	1	Fang et al. (1999)
E16	c.2441insT (3027ins T)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	2 αδέρφια	Van den Ouweland et al. (1999)
E16	c.2448dupA (3033insA)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	2 μητρικά πρώτα εξαδέρφια	Malzac et al. (1998)
E16	c.2452ins8 (3038ins8)	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Russo et al. (2000)
E16	c.2490ins4 (3076ins4)	Πλαισιοτροποποιητική	Οικογενής	1	Μονοζυγωτικά δίδυμα	Van den Ouweland et al. (1999)
E16	c.2500ins5 (3086ins5)	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Kishino et al. (1997), Malzac et al. (1998)
E16	c.2506delA (3092 del A)	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	1	1	Lossie et al. (2001)
E16	c.2507del4 (3093del4)	Πλαισιοτροποποιητική p.839X	Σποραδική	1 1 2 1	1 1 2 1	Fang et al.(1999) Lossie et al. (2001) Rapakko et al. (2004) Hitchins et al. (2004) Camprubi et al. (2009)
E16	c.2507del4	Πλαισιοτροποποιητική	Σποραδική	2	2	Tzagkaraki et al.

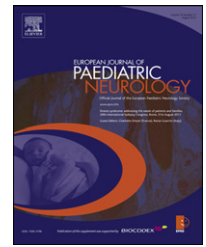
	(3093del4)	ιητική p.839X		1	1	
E16	c.2508dup5 (3094 dup5)	Πλαισιοτροποπο ιητική p.842X	Σποραδική	1	1	Hitchins et al.(2004)
E16	c.2534ins16 (3120ins16)	Πλαισιοτροποπο ιητική (elongated protein)	Σποραδική	1	1	Baumer et al. (1999)
E16	c.2556del15 (3142del15)	Πλαισιοτροποπο ιητική (elongated protein)	Σποραδική	1	1	Fang et al.(1999)

Πίνακας 1.11.1. Σημειακές μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο UBE3A και αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία.



ELSEVIER

Official Journal of the European Paediatric Neurology Society



Original article

Screening of UBE3A gene in patients referred for Angelman Syndrome

Evmorfia Tzagkaraki^{a,b,*}, Christalena Sofocleous^{a,c,*}, Fryssira-Kanioura Helen^a, Argyris Dinopoulos^d, Georgios Goulielmos^b, Ariadni Mavrou^a, Kitsiou-Tzeli Sofia^a, Emmanuel Kanavakis^a

^aDepartment of Medical Genetics, University of Athens School of Medicine, Choremeio Research Laboratory, Aghia Sophia Children's Hospital, Thivon and Levadeias str, 11527 Goudi, Athens, Greece

^bUniversity of Crete Medical School, Heraklion, Greece

^cResearch Institute for the Study of Genetic and Malignant Disorders in Childhood, St Sophia's Children's Hospital, Athens, Greece

^d3rd Department of Pediatrics, University of Athens School of Medicine, 'Attikon Hospital', Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Received in revised form

27 December 2012

Accepted 30 December 2012

Keywords:

Angelman Syndrome

Electroencephalography (EEG)

Microcephaly

UBE3A mutations

ABSTRACT

Angelman Syndrome (AS) is a neurodevelopmental disorder characterized by severe developmental delay, speech impairment and unique behaviors including inappropriate laughter and happy disposition. AS is related to deficient maternal UBE3A gene expression caused either by chromosomal deletions, uniparental disomy, molecular defects of the imprinted 15q11-q13 critical region or by loss of function mutations in the maternally inherited UBE3A. In the present study, screening UBE3A was performed in 43 patients who were referred for AS but whom previous molecular diagnostic tests failed to provide a diagnosis. Two causative mutations – one of them novel – and four polymorphic variants one of which is also novel were revealed. Further investigation of 7 patients disclosed defects in other genes involved in clinical phenotypes mimicking AS. A typical EEG pattern and microcephaly in patients with developmental delay prompt for AS investigation while wide genetic screening should be applied to help resolution of the complex phenotypes characterized by developmental delay.

© 2013 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Angelman Syndrome (AS, OMIM # 105830) is a rare neurodevelopmental disorder occurring in 1/10,000 to 1/20,000 live births. It is characterized by severe mental retardation, speech impairment, ataxia, specific electroencephalography (EEG)

pattern and a typical behavioral phenotype with a tendency to frequent and inappropriate laughter. Microcephaly, seizures and dysmorphic facial features are common in Angelman Syndrome patients.^{1,2} It is now well established that AS is caused by loss of function of the maternally expressed Ubiquitin Protein Ligase E3A gene (UBE3A) (MIM; 601623) located in

* Corresponding authors. Department of Medical Genetics, University of Athens School of Medicine, Choremeio Research Laboratory, Aghia Sophia Children's Hospital, Thivon and Levadeias str, 11527 Goudi, Athens, Greece. Tel.: +30 213 2013462; fax: +30 210 7795553. E-mail addresses: evmorfia.tzagkaraki@hotmail.com (E. Tzagkaraki), csfofkl@med.uoa.gr (C. Sofocleous).

1090-3798/\$ – see front matter © 2013 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.12.010>

the 15q11-q13 imprinted region.² Abnormalities along the paternally expressed genes of the same chromosomal region are related to a completely different syndrome known as Prader Willi Syndrome.³ Among the individuals presenting with AS phenotype 10–14% remains unclassified as no confirmative diagnosis is established and the remaining 86–90% presents with variable molecular defects.² Most of AS cases (65–70%), are caused by de novo deletions in the q11-q13 region of the maternally inherited chromosome 15, the majority of which are of similar size (approximately 4 Mb) and seem to have common breakpoints. Rarely, patients with Angelman Syndrome (<1%) have a different sized deletion, which is related to an unbalanced translocation or chromosome rearrangements, resulting in microdeletions in the 15q11-q13 region.² A small percentage (3–5%) of patients have paternal uniparental disomy for chromosome 15 while epigenetic alterations in the imprinting centre of 15q11-q13 region account for 3–5% of AS patients.⁴ Finally, 5–10% of AS patients carry *UBE3A* heterozygous loss of function mutations. The role of *UBE3A* deficiency in Angelman Syndrome was highlighted when in vitro targeted inactivation of *Ube3a* gene in mice indicated that mutant mice displayed features of Angelman Syndrome when the mutation was maternally transmitted.^{5,6}

The *UBE3A* gene spans 120 kb, consists of 16 exons and its coding sequence includes the last two nucleotides of exon 7 (dinucleotide AT of the ATG start codon) and exons 8–16.⁷ The gene is imprinted and is expressed only from the maternal allele in certain brain regions.⁸ The identification of a paternally expressed antisense transcript (*UBE3A-AS*) in the human brain raises the hypothesis that the monoallelic maternal expression of *UBE3A* gene is regulated by antisense-mediated paternal *UBE3A* gene silencing.^{9,10}

The *UBE3A* gene encodes E6-AP, an E3 ubiquitin protein ligase, necessary for the ubiquitination of proteins targeted for degradation.¹¹ Recently, Greer P. et al., proposed a possible model according to which a synaptic protein (*Arc*) serves as an E6-AP protein substrate, explaining how the *UBE3A* dysfunction may be responsible for synaptic impairment.¹²

The present study reports on findings from the molecular analysis of *UBE3A* coding sequence among patients who were referred for AS and comments on the significance of electroencephalography in the differential diagnosis of Angelman Syndrome especially in the case of milder phenotypes.

2. Patients and methods

2.1. Patients

A group of 43 patients, aged from 5 months to 18 years old (mean age 4.5 years old), were referred to the Department of Medical Genetics of Athens University for genetic evaluation, by clinical geneticists or child neurologists. Table 1 presents the incidence of clinical characteristics in the patients included in the study. Almost all patients of this study (93%) had mild to severe developmental delay. In more details, 11 patients (28%) had severe developmental delay with or without autistic behavior while the rest (72%) had mild developmental delay. Communication skills were limited in all patients with 14 presenting total absence of speech and 10 exhibiting verbal skills restricted to 3–5 words. The remaining patients had either speech delay or mild speech impairment with a fair ability to communicate. Ten patients (~27%) were never able to walk and presented with balance disorder and ataxia. Another 27% showed typical stereotypic hand movements and 37% had ataxic gait. More than half the patients (51%) had infantile (or neonatal) seizures starting as early as the age of 2 months. Fifteen out of the 43 patients (35%) presented, in addition, typical phenotypic features such as hypopigmentation, widely spaced teeth, and protruding tongue as well as the typical happy disposition followed by hand movements and burst of laughs.

The main criteria used in our study to evaluate Angelman Syndrome patients are reviewed by Clayton-Smith et al. and include severe developmental delay, unique behavioral profile, microcephaly and a typical electroencephalography pattern (Figs. 1 and 2).² Except for one case where two affected siblings were studied all other cases were sporadic and informed consent was obtained before the molecular analysis. Deletions, paternal uniparental disomy and imprinting defects of the 15q11-q13 critical region were excluded by Methylation Specific PCR.¹³ Prenatal diagnosis was offered to one couple, after the identification of a disease causative mutation in the *UBE3A* gene in the first child of the family. Evaluation of novel alterations included the molecular screening of 50 unrelated normal individuals (100 alleles), allowing for the characterization of the variations identified.

Table 1 – Clinical characteristics of the two Angelman Syndrome patients carrying *UBE3A* mutations and frequency of each clinical trait in the total number of Angelman Syndrome patients (43) included in the present study.

Clinical characteristics	Patients positive/Total no	Frequency (%)	Patient AS41	Patient AS49
Clinical diagnostic age	5 months–18 years	–	2.5 years	4 years
Developmental delay	40/43	93	+	+
Balance disorder/Ataxia	37/43	86	+	+
Pathological electroencephalography (EEG) ^a	20/28	71	+	+
Speech impairment	30/43	70	+	+
Seizures	22/43	51	+	+
Happy disposition	17/43	39	N	N
Microcephaly	10/43	23	+	+

a For fifteen (15) patients, EEG was not at the time of the molecular investigation available. The rate has been estimated according to the total number (28) of patients, who underwent an EEG. N: Normal.

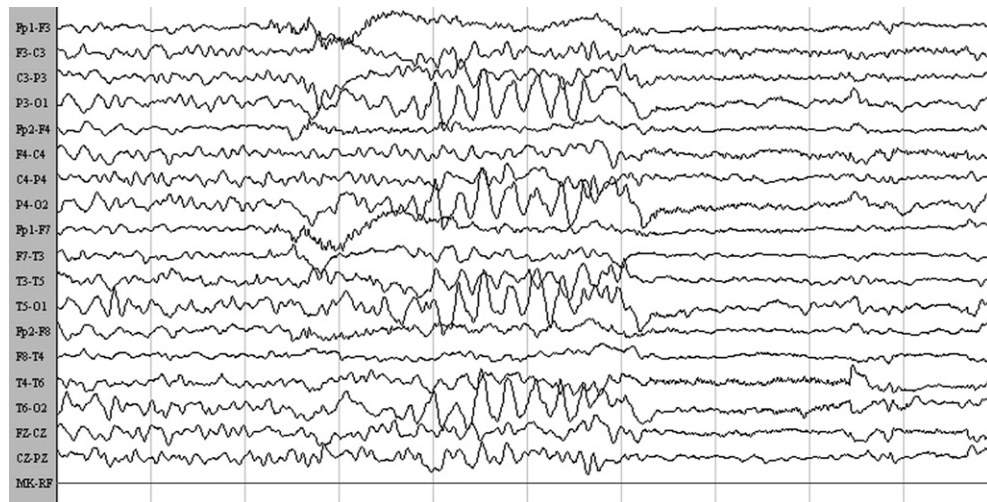


Fig. 1 – Typical electroencephalography (EEG) pattern of AS41. During wakefulness the EEG showed a high amplitude (150–200 μ V) rhythmic activity over the occipital head region that disappeared with eye opening.

3. Methods

3.1. Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes using standard procedures. Methylation Specific PCR was performed according to previously described procedures including the use of the EZ DNA Methylation – Gold™ Kit (Zymo Research) and the primers designed by Kubota et al.¹³ Mutation analysis was performed by PCR amplification followed by Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis (ECMA), using the SURVEYOR™ Mutation Detection Kit (Transgenomic®).¹⁴ Coding exons 8–16 were amplified using primers, either designed by the authors (exons 8, 11, 13/14) (Table 2) or previously described.^{15–17} For exon 9a various combinations of primers and PCR conditions were assessed in order to provide the highest accuracy and specificity in the

mutation screening assay. Samples demonstrating ECMA heteroduplex formation (Fig. 3) were sequenced to allow characterization of the molecular alteration (Fig. 4). Sequencing reactions were performed with M13-universal primers using either the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare) or the 7-deaza-dGTP Cy™5/Cy5.5 Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Visible Genetics). Sequencing products were analyzed on MegaBACE SNP Genotyping System (GE Healthcare) and OpenGene™ Long Read Tower System™ (Visible Genetics) respectively.

3.2. Haplotype analysis

Haplotype analysis was carried out using primers for 6 microsatellite markers (D15S543, D15S11, D15S10, D15S97, D15S113, GABRB3) along the critical 15q11-q13 region and 2 additional markers (D15S87 and CYP19) on chromosome 15,

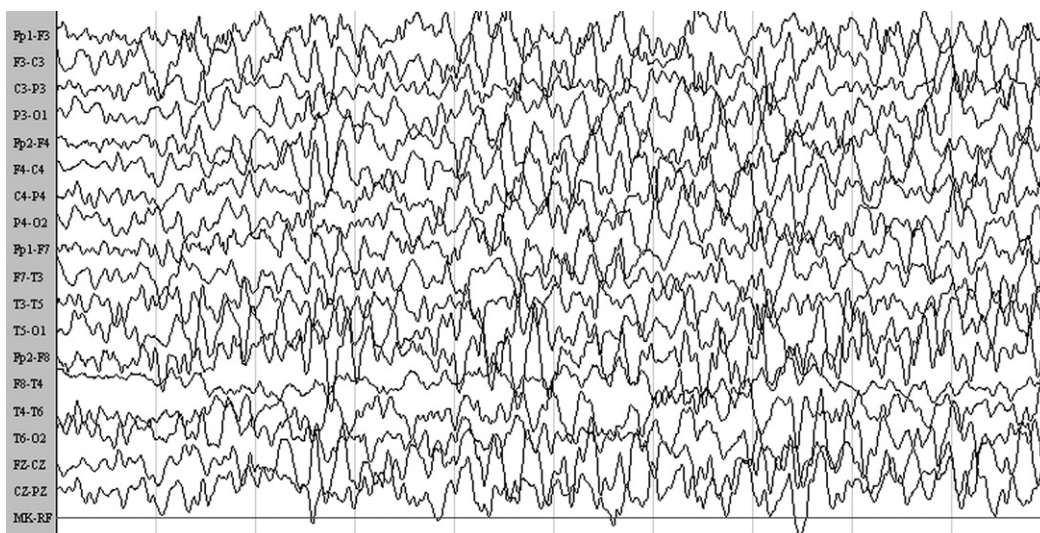


Fig. 2 – Typical electroencephalography (EEG) pattern of AS41. During drowsiness the EEG showed prolonged runs of high amplitude delta activity with intermixed spikes maximal over the frontal regions.

Table 2 – The primers and PCR conditions designed for the analysis of exons 8, 11, 13 and 14 of the UBE3A gene in the present study.

Exon	Primers ^a	Primer location	Product size (bp)	Tm (°C)
8	5'-TTTACTAGTCAGGAGTTGTGGT-3' 5'-CCTGTCCGTTACCAATAAAA-3'	Intron 7 Intron 8	617	58
11	5'-CTACCCGATGCCACCAAATTAC-3' 5'-AGTGTCTTCTGGTACTTCGGTCAGA-3'	Intron 10 Intron 11	627	57
13/14	5'-GCTATGCAGCCCAATAACTTGTGT-3' 5'-TCCATACGCCAAATGCAGGAGA-3'	Intron 12 Intron 14	653	64

^a M13 universal primers were attached to 5' end of each primer; M13 forward: TGTAACGACGGCCAGT; M13 reverse : CAGGAAACAGCTATGACC.

for parental inheritance analysis. All primer sequences and PCR conditions were as previously described.^{18,19}

4. Results

Forty-three (43) patients who underwent clinical examination were evaluated using the main AS criteria (Table 1). Molecular analysis of UBE3A gene revealed a causative mutation only in two sporadic cases (5%). In patient AS41, insertion of a G nucleotide in exon 9 (c.418_419insG) of the UBE3A gene (Fig. 4A) causes a premature stop codon at position p.148, resulting in a truncated E6-AP protein. Although the pathogenic alteration was not detected in the parents, consecutive prenatal diagnosis was performed for two subsequent pregnancies where exon 9 of the UBE3A gene was analyzed by enzymatic cleavage mismatch analysis and direct sequencing. Neither of the two fetuses carried the c.418_419insG mutation of the first child. Haplotype analysis revealed that the first fetus shared the same maternal haplotype as the affected sibling while the second carried a different haplotype. c.418_419insG mutation is a novel alteration first described by the authors.²⁰

In patient AS49, the previously described pathogenic deletion of 4 nucleotides in exon 16, c.2507_2510del4 (Table 3), of the UBE3A coding sequence (Fig. 4B) leads to the production of a truncated protein, as it terminates the polypeptide chain at amino acid 839. Neither of the patients' parents carried the c.2507_2510del4 alteration.

Both patients were tested for UBE3A mutation analysis mainly due to microcephaly and typical electroencephalography pattern (Figs. 1 and 2) along with other Angelman Syndrome compatible features (Table 1). However, both subjects lacked the typical Angelman Syndrome facial characteristics (e.g. large mouth with widely spaced teeth, protruding tongue, hypopigmented skin and eyes, etc).

In addition to the pathogenic mutations reported above, UBE3A screening disclosed four sequence alterations, considered as polymorphic variants (Table 4), one of them (c.2294+119A>G) being first reported by the authors. The novel c.2294+119A>G substitution was detected in UBE3A intron 14 in three individuals, a patient, his father and one unrelated female and was thus characterized as a benign polymorphism.

5. Discussion

Disease causative mutations of UBE3A were identified in two sporadic cases representing approximately 5% of the 43 patients analysed in the present study. Both alterations are frameshift mutations where a premature stop codon, results in the production of truncated proteins (positions p.148 and p839 respectively). The E6-AP protein consists of 865 amino acids and has at least six functional domains, three of which are involved in ubiquitin ligase activity. Of those, the highly conserved homologous to the E6-AP carboxyl terminus

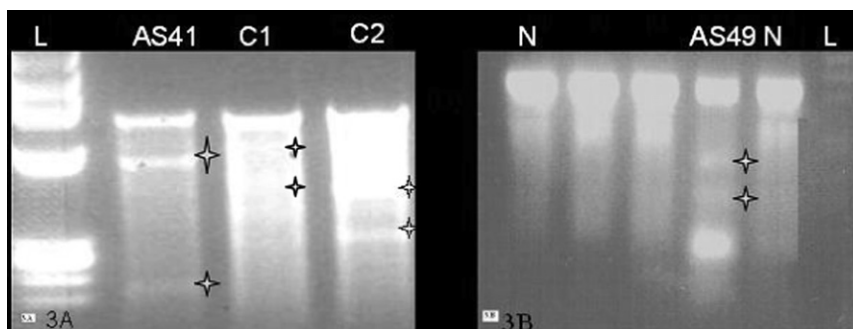


Fig. 3 – Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis (ECMA assay) results. ECMA analysis of UBE3A exons 9 and 16 showed the presence of three products in patient AS41 (A) and AS49 (B) (one from the undigested PCR product and two -asterisk indicated- from the cleavage of mismatched sites) indicating the occurrence of a molecular alteration. L: Size marker 1 kb, C1 and C2: Positive controls, N: Normal controls.

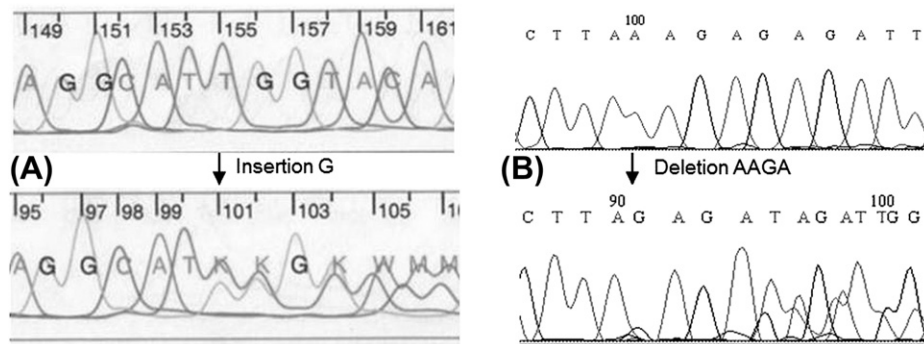


Fig. 4 – Automated sequencing results. Direct sequencing analysis of UBE3A exons 9 and 16 revealed the mutations c.418_419insG (A) and 2507_2510del4 (B) in patients AS41 and AS49 respectively.

domain is encoded by exons 9–16 and since it contains the minimal region necessary for the ubiquitination and degradation of the target proteins (the extreme carboxyl-terminal 88 amino acid segment) it is considered to be functionally important.^{11,21} Since the early stop codon at amino acid 148 of the protein resulting from the c.418_419insG mutation, leads to the substantial loss of the substrate binding domain, the homologous to the E6-AP carboxyl terminus domain and the carboxyl terminus, complete loss of function of all E6-AP isoforms should be expected. The severity of the sequence alteration in proband AS41 supports the hypothesis that this mutation is most probably disease causing. The mutation c.418_419insG was not detected in neither of the patients' parents and it is therefore assumed that it has either occurred de novo in the patient or represents germline mosaicism in the mother. In the latter case, the recurrence risk could be high.²² Prenatal testing in two subsequent pregnancies was carried out involving both UBE3A mutation screening and haplotyping, and revealed male fetuses carrying a wild-type allele.

In patient AS41 the protein E6-AP is severely damaged but he seems to have a milder phenotype than that of typical Angelman Syndrome patients. Even though at the time of referral he possessed 6 out of 7 of the main clinical criteria of Angelman Syndrome (Table 1), the patient at the age of 4 walks independently, follows simple orders and his speech is no more limited to three or four words. The patient was born after an uneventful pregnancy with caesarian section. His birth weight was 3.300 kg, his height 51 cm and his head circumference 34 cm all well within normal. However, during check up at nine months his head circumference started decreasing and follow-up at the age of 15 months confirmed head circumference at the 3rd centile. He started walking at the age of 18 months although with balance disorder and

ataxia. At the age of two years he suffered from epileptic seizures and while the MRI performed was normal the EEG presented the typical AS compatible pattern (Figs. 1 and 2). Follow-up at the age of three years disclosed a mild to moderate developmental delay combined with adequate verbal and communication skills as well as independent walking ability. The patient although experiencing attention deficit hyperactivity disorder he lacks the typical Angelman happy disposition and he retains the ability to respond to simple commands.

In the case of the c.2507_2510del4 mutation, the last 26 amino acids of the protein are missing and the homologous to the E6-AP carboxyl terminus domain is disrupted indicating the presence of a defective and most probably non-functional protein. The patient was referred at the age of three years presenting with global developmental delay characterized by persistent microcephaly, ataxic gait and severe speaking impairment. The parents have reported episodes of atypical seizures as well as near-drop attacks. Interestingly besides his severe delay the patient preserves adequate motor skills (Table 1).¹ Previous laboratory investigation and imaging (both EEG and MRI) revealed a normal 46, XY karyotype and disclosed dysmyelination and EEG patterns compatible with the AS phenotype. As MS-PCR allowed exclusion of common causal defects (e.g. deletions), Ube3A mutation screening was performed to reveal the c.2507_2510del4 mutation which has been previously reported more than 15 times both in scientific manuscripts^{15,17,23,25} and the Leiden Open Variation Database (<http://ngml.man.ac.uk/lovd2/>). This is the highest rate for a mutation in the UBE3A gene, suggesting that c.2507_2510del4 mutation or the specific region of exon 16 is a mutation hot spot.

Almost 70% of patients in this study, presented with 3–5 of the typical clinical characteristics of Angelman Syndrome

Table 3 – Mutations of UBE3A gene detected in the two (out of 43) Angelman Syndrome patients of this study.

Patient	Location	Sequence change ^a	Type of mutation	Inheritance	Literature reports
AS41	Exon 9	c.418_419insG	Frameshift	De novo or maternal germline mosaicism	[18]
AS49	Exon16	2507_2510del4	Frameshift	ND ^b	[15,17,23–25]

a Nucleotide numbered according to GenBank accession number X98032.

b ND: Not determined.

Table 4 – Polymorphic variants of UBE3A gene detected in Angelman Syndrome patients of this study.

Patient	Location	Sequence change ^a	Type of alteration	Inheritance	Reference
AS10, AS16, AS31, AS44, AS51	Intron 7	c.3-66_68delGAT (GATGAT>GAT)	–	ND ^c	[15]
AS51	Exon 9	c.532G>A	A178T	Maternal	[15–17,24,26,31]
AS36, AS47	Intron 10	c.1694_58T>G ^b	–	ND ^c	[24]
AS37	Intron 14	c.2294+119A>G	–	Paternal	Present study

a Nucleotide numbered according to GenBank accession number X98032.

b Corresponds to SNP rs10519485: A>C.

c ND: Not determined.

while the main clinical feature present in almost all patients was developmental delay (93%) followed by balance disorder/ataxia (86%) and speech impairment (70%) (Table 1).

Both AS41 and AS49 patients had 6/7 of the typical clinical characteristics of Angelman Syndrome (Table 1) but neither possessed specific facial characteristics as these are described by William CA et al., 1995.¹ On the other hand, several of the patients did have typical facial features (large mouth with widely-spaced teeth, protruding tongue etc.), but no molecular alteration was identified in 15q11-q13 chromosomal region or UBE3A gene. Previous large phenotype–genotype correlation studies^{23,26} as well as this study, concluded that facial features, should not necessarily be included in the clinical criteria for UBE3A mutation analysis.

Five to ten percent of patients referred for AS are expected to bare a UBE3A mutation which is in consistence with the ~5% percentage estimated in the present study.^{15,16,27,28} However, as more recent studies disclosed the presence of sub-microscopic or intragenic deletions as well as rare gene/allele dosage imbalance in AS patients,^{29–32} an even higher percentage could be expected regarding UBE3A alterations escaping routine screening. MLPA and semi-quantitative dosage PCR have been developed to help towards the resolution of AS diagnosis in cases where both MS-PCR and UBE3A direct sequencing failed to provide a confirmative result.^{31,32} In most surveys, patients with both typical and atypical Angelman Syndrome phenotypes were included and a thorough review indicated minor differences among the expected phenotypic outcomes. Patients with UBE3A mutations or intragenic deletions/duplications, which impair the normal expression of the maternal copy of UBE3A, are characterized by clinical presentations that tend to fall in between the spectrum of phenotypes observed in individuals with large deletions or UPD and seem to have a higher incidence of seizures and microcephaly.^{23,26,33–35} Moncla et al. (1999) suggested that minimal clinical criteria comprising of psychomotor delay, happy disposition, hyper-excitable personality, electroencephalography abnormalities, mental retardation and severe speech impairment should prompt UBE3A mutation screening.²⁶ Baumer et al. (1999), selected Angelman Syndrome patients according to non-stringent clinical criteria and concluded that mutations were identified only in typical Angelman Syndrome patients.³⁶ Conversely, Molfetta et al. (2004) were the first to describe two cousins who although sharing the same UBE3A mutation presented with discordant phenotypes with one of them being even more severe of that in the typical Angelman Syndrome.⁴

Assessment of both previous reports and of the Leiden Open Variation Database (<http://ngl.man.ac.uk/lovd2/>),

allowed for the re-evaluation of the mutation rate in each exon (Fig. 5). After a thorough review of the literature and personal communication with researchers, it was concluded that in some studies the same patients were re-evaluated. Fig. 5 presents the rate of mutations in each exon in terms of how many times they were detected among patients with a UBE3A mutation reported so far. Each patient was included once and mutations reported in published studies but not in the database were also included in the data. Most of the mutations identified in UBE3A gene are grouped in exons 9 and 16 and therefore are considered as hot spots.

Frameshift mutations account for approximately 68% of disease-causing mutations found so far in the UBE3A gene while at least 5 intragenic deletions have already been reported. Most of the mutations in exons 9 and 16 are de novo and approximately 20% are, familial.²³ On the other hand, there are some reports of germline mosaicism in the mothers^{16,17,37,38} as well as some of inherited intragenic deletions that prompt the importance of genetic counselling and prenatal testing in families with UBE3A alterations, where the recurrence risk may be as high as 50%.³⁹

When mutations of the UBE3A gene occur, the damage is restrained to the loss or impaired function of E6-AP protein, while establishment of imprinting is preserved. In the case of deletions, other adjacent genes may also be involved, either by being deleted or because their imprinting pattern turned out to be abnormal. More specifically, the ATP10C gene (Aminophospholipid Transporting ATPase)⁴⁰ mapping within 200 kb distal to UBE3A was also found to demonstrate imprinted

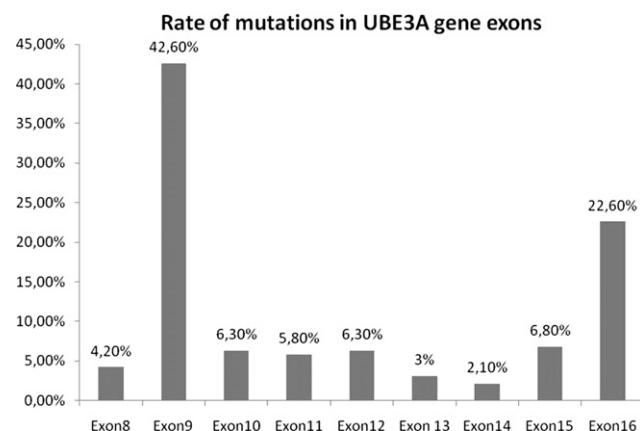


Fig. 5 – Frequency of mutations found in Angelman Syndrome patients in each coding exon of the UBE3A gene (combined data from the Leiden Open Variation Database, LOVD, <http://ngl.man.ac.uk/lovd2/>, the literature and personal communication).

preferential maternal expression in the human brain.⁴¹ When uniparental disomy or imprinting centre mutations are involved, regulation of the 15q11-q13 region through normal imprinting is altered and both *UBE3A* and *ATP10C* expression is virtually absent. However, as uniparental disomy patients tend to be less severely affected,³⁵ showing better physical growth, higher cognitive skills and lower incidences of seizures, microcephaly and ataxia^{23,42} it may be assumed that “double dosage” of the genes from the paternal allele may ameliorate the Angelman Syndrome phenotype in these patients.²³ Both the location and mode of expression of the *ATP10C* gene raise the hypothesis that it may also contribute to the Angelman syndrome phenotype. Investigation of the role of adjacent genes, along with further studies of *UBE3A* mutations in Angelman Syndrome patients, are expected to help the elucidation of the *UBE3A* and other imprinted genes’ expression.^{23,43}

Conversely, according to the most recent report by Tan et al., 2011 no significant differences in the physical and behavioural traits between deletion and non-deletion patients (those with UPD, ID and *UBE3A* mutations) have been recorded.⁴⁴ The phenotype of patients with *UBE3A* mutations seems to resemble that caused by 15q11-q13 deletions but is generally considered milder and associated with better psychomotor development.^{26,45} They display seizures, speech impairment and microcephaly, but they have better motor skills and improved ability to communicate and follow simple commands.^{26,43,46}

Finally, Tan et al. suggested that certain features such as mouthing behaviour, sleep difficulties, and fascination with water in a child with developmental delay, absent or minimal speech development, abnormal EEG, and an ataxic or broad-based gait should raise the suspicion for AS.⁴⁴ According to their report and our findings it could be concluded that the combination of a typical EEG pattern (Figs. 1 and 2), microcephaly and a specific behavioural profile, including mild to moderate developmental delay, could serve towards the facilitation of AS differential diagnosis.

In a group of 7 out of the 43 patients (~16%), where further molecular investigation was applied, defects were disclosed concerning *CDKL5* mutations in two patients,⁴⁷ *MECP2* mutations in one⁴⁸ and various copy number variations detected by array-CGH analysis in the remaining four (~9%).⁴⁹ Such a high percentage of other defects and more specifically those of copy number variations should raise the question of whether wide scale screening methods (such as array-based Comparative Genomic Hybridization)^{50,51} should precede a specific diagnostic test such as screening for *UBE3A* or *MECP2* genes, in patients presenting with phenotypes mimicking that of Angelman Syndrome.^{49,52}

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families for participating in the study. We also thank Dr. Georgia Tounta, for her assistance in preparing the manuscript. The authors would also like to acknowledge the contribution of the Department of Clinical Genetics of Erasmus University,

Rotterdam in the standardization of the techniques. This work is part of the Graduate Programme “The molecular basis of human disease”, University of Crete Medical School, Greece and was done in the Department of Medical Genetics, University of Athens School of Medicine, Choremeio Research Laboratory, Aghia Sophia Children’s Hospital, Athens, Greece.

REFERENCES

- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, et al. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* 1995;56:237–8.
- Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 2003;40:87–95.
- Magenis RE, Brown MG, Lacy DA, et al. Is Angelman syndrome an alternate result of del (15)(q11q13)? *Am J Med Genet* 1987;28:829–38.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, et al. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 1998;21:799–811.
- Miura K, Kishino T, Li E, et al. Neurobehavioral and electroencephalographic abnormalities in Ube3a maternal-deficient mice. *Neurobiol Dis* 2002;9:149–59.
- Molfetta GA, Silva Jr WA, Pina-Neto JM. Clinical, cytogenetical and molecular analyses of Angelman syndrome. *Genet Couns* 2003;14:45–56.
- Kishino T, Wagstaff J. Genomic organization of the *UBE3A/E6-AP* gene and related pseudogenes. *Genomics* 1998;47:101–7.
- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, et al. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* 1997;17:75–8.
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, et al. An imprinted antisense RNA overlaps *UBE3A* and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* 1998;19:15–6.
- Rougeulle C, Lalonde M. Angelman syndrome: how many genes to remain silent? *Neurogenetics* 1998;1:229–37.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5249.
- Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, et al. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell* 2010;140:704–16.
- Kubota T, Das S, Christian SL, et al. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* 1997;16:16–7.
- Vogiatzakis N, Kekou K, Sophocleous C, et al. Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol. *Mol Biotechnol* 2007;37:212–9.
- Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, et al. The spectrum of mutations in *UBE3A* causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 1999;8:129–35.
- Malzac P, Webber H, Moncla A, et al. Mutation analysis of *UBE3A* in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1998;62:1353–60.
- Rapakko K, Kokkonen H, Leisti J. *UBE3A* gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by conformation sensitive gel electrophoresis. *Am J Med Genet A* 2004;126A:248–52.
- Salavoura K, Sophocleous C, Mavrou A, et al. Prader-Willi and Angelman syndrome in the Greek population: a clinical and molecular study. *Balkan J Med Genet* 2003;6:21–32.

19. Mutirangura A, Greenberg F, Butler MG, et al. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum Mol Genet* 1993;2:143–51.
20. Tzagkaraki E, Christalena S, Helen F, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: UBE3A. Disease: Angelman Syndrome. *Hum Genet* 2009;126:331.
21. Huijbregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:4918–27.
22. van der Meulen MA, van der Meulen MJ, te Meerman GJ. Recurrence risk for germinal mosaics revisited. *J Med Genet* 1995;32:102–4.
23. Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, et al. Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* 2001;38:834–45.
24. Camprubi C, Guitart M, Gabau E, et al. Novel UBE3A mutations causing Angelman syndrome: different parental origin for single nucleotide changes and multiple nucleotide deletions or insertions. *Am J Med Genet A* 2009;149A:343–8.
25. Hitchins MP, Rickard S, Dhalla F, et al. Investigation of UBE3A and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS. *Am J Med Genet A* 2004;125A:167–72.
26. Moncla A, Malzac P, Livet MO, et al. Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling. *J Med Genet* 1999;36:554–60.
27. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997;15:70–3.
28. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997;15:74–7.
29. Burger J, Horn D, Tonnie H, Neitzel H, et al. Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 2002;111:233–7.
30. Boyes L, Wallace AJ, Krajewska-Walasek M, et al. Detection of a deletion of exons 8–16 of the UBE3A gene in familial Angelman syndrome using a semi-quantitative dosage PCR based assay. *Eur J Med Genet* 2006;49:472–80.
31. Cali F, Ragalmuto A, Chiavetta V, et al. Novel deletion of the E3A ubiquitin protein ligase gene detected by multiplex ligation-dependant probe amplification in a patient with Angelman syndrome. *Exp Mol Med* 2010;42:842–8.
32. Belezza-Meireles A, Cerqueira R, Sousa SB, et al. Novel deletion encompassing exons 5–12 of the UBE3A gene in a girl with Angelman syndrome. *Eur J Med Genet* 2011;54:348–50.
33. Burger J, Kunze J, Sperling K, Reis A. Phenotypic differences in Angelman syndrome patients: imprinting mutations show less frequently microcephaly and hypopigmentation than deletions. *Am J Med Genet* 1996;66:221–6.
34. Smith A, Marks R, Haan E, et al. Clinical features in four patients with Angelman syndrome resulting from paternal uniparental disomy. *J Med Genet* 1997;34:426–9.
35. Fridman C, Varela MC, Kok F, et al. Paternal UPD15: further genetic and clinical studies in four Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* 2000;92:322–7.
36. Baumer A, Balmer D, Schinzel A. Screening for UBE3A gene mutations in a group of Angelman syndrome patients selected according to non-stringent clinical criteria. *Hum Genet* 1999;105:598–602.
37. Hosoki K, Takano K, Sudo A, et al. Germline mosaicism of a novel UBE3A mutation in Angelman syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;138A:187–9.
38. Monzon FA, Kant J, Sanders E, Bay C. Gene symbol: UBE3A. Disease: Angelman syndrome. *Hum Genet* 2003;113:367.
39. Stalker HJ, Williams CA. Genetic counseling in Angelman syndrome: the challenges of multiple causes. *Am J Med Genet* 1998;77:54–9.
40. Herzing LB, Kim SJ, Cook Jr EH, Ledbetter DH. The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1501–5.
41. Kashiwagi A, Meguro M, Hoshiya H, et al. Predominant maternal expression of the mouse *Atp10c* in hippocampus and olfactory bulb. *J Hum Genet* 2003;48:194–8.
42. Varela MC, Kok F, Otto PA, Koiffmann CP. Phenotypic variability in Angelman syndrome: comparison among different deletion classes and between deletion and UPD subjects. *Eur J Hum Genet* 2004;12:987–92.
43. Dan B. Angelman syndrome: current understanding and research prospects. *Epilepsia* 2009;50:2331–9.
44. Tan W-H, Bacino CA, Skinner SA, et al. Angelman syndrome: mutations influence features in early childhood. *Am J Med Genet A* 2010;155:81–90.
45. Sartori S, Anesi L, Polli R, et al. Angelman syndrome due to a novel splicing mutation of the UBE3A gene. *J Child Neurol* 2008;23:912–5.
46. Gillissen-Kaesbach G, Albrecht B, Passarge E, Horsthemke B. Further patient with Angelman syndrome due to paternal disomy of chromosome 15 and a milder phenotype. *Am J Med Genet* 1995;56:328–9.
47. Psoni S, Willems PJ, Kanavakis E, et al. A novel p.Arg970X mutation in the last exon of the CDKL5 gene resulting in late-onset seizure disorder. *Eur J Paediatr Neurol* 2010;14:188–91.
48. Psoni S, Sofocleous C, Traeger-Synodinos J, et al. MECP2 mutations and clinical correlations in Greek children with Rett syndrome and associated neurodevelopmental disorders. *Brain Dev* 2012;34:487–95.
49. Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, Xaidara A, Kanavakis E. The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. *Expert Rev Mol Diagn* 2012 Jun;12:449–57.
50. Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M, et al. 2q23.1 microdeletion identified by array comparative genomic hybridisation: an emerging phenotype with Angelman-like features? *J Med Genet* 2009;46:847–55.
51. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* 2008;124:1–17.
52. Lawson-Yuen A, Wu BL, Lip V, et al. Atypical cases of Angelman syndrome. *Am J Med Genet A* 2006;140:2361–4.