

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΗ ΕΥΜΟΡΦΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGFβ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ**

MASTER THESIS

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

1. ΣΥΝΔΡΟΜΑ PRADER WILLI ΚΑΙ ANGELMAN

Τα σύνδρομα Prader Willi (PWS) και Angelman (AS) αποτελούν δύο, κλινικά, διαφορετικές αναπτυξιακές και νευρολογικές διαταραχές, οι οποίες όμως έχουν παρόμοιο μοριακό μηχανισμό παθογένεσης. Και τα δύο σύνδρομα προκύπτουν από την απώλεια έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των δύο συνδρόμων διαφοροποιούνται ανάλογα με την γονεϊκή προέλευση του αλλοιωμένου αλληλομόρφου. Απώλεια της γονιδιακής έκφρασης της περιοχής 15q11-q13 του πατρικού αλληλομόρφου οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου Prader Willi, ενώ αντίστοιχα απώλεια των αποτυπωμένων γονιδίων της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής στο μητρικό αλληλόμορφο, αποτελεί την αιτία εμφάνισης του συνδρόμου Angelman. Η αποτυπωμένη περιοχή 15q11-q13 αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες περιοχές αποτυπωμένων γονιδίων. Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών παθογένεσης των δύο συνδρόμων έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση βιολογικών φαινομένων όπως η μονογονεϊκή δισωμία (Uniparental Disomy –UPD) και η γονιδιακή αποτύπωση (Genomic Imprinting) καθώς και των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν την τελευταία, όπως η μεθυλίωση του DNA.

1.1 ΣΥΝΔΡΟΜΟ PRADER WILLI

Το 1956, οι Prader et al, περιέγραψαν για πρώτη φορά τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, που σήμερα είναι γνωστό με το όνομα Prader Willi (Prader , 1956). Τα κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου περιλαμβάνουν αναπτυξιακή καθυστέρηση, συνοδευόμενη από βουλιμία και εκδήλωση παχυσαρκίας σε ηλικία 2- 4 ετών. Το κοντό ανάστημα, τα κοντά άκρα, η ήπια διανοητική καθυστέρηση με μαθησιακές δυσκολίες, ο υπογοναδισμός καθώς και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του προσώπου (αμυγδαλοειδές σχήμα ματιών και στενό μέτωπο), αποτελούν βασικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Prader Willi. Η βουλιμία και η έντονη παχυσαρκία έχει σαν αποτέλεσμα, ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi, να εκδηλώνουν την τάση ανάπτυξης διαβήτη τύπου II, καρδιαγγειακών προβλημάτων και υπέρτασης στην εφηβεία.

Η ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης στα άτομα αυτά εκδηλώνεται με την εμφανή αναπτυξιακή καθυστέρηση, το κοντό ανάστημα (μέσο ύψος στα αρσενικά άτομα: 155cm και στα θηλυκά άτομα: 148cm) και κοντά άκρα.

Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται ~1/ 10.000- 1/ 15.000.

Τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου Prader Willi, τα οποία αποτελούν και κριτήρια για την ασφαλή διάγνωση του συνδρόμου, δίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1.1 Κύρια κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Prader Willi

Παιδιά μικρότερα των 36 μηνών
1. Νεογνική υποτονία και λήθαργος
2. Προβλήματα σίτισης και ανεπαρκής πρόσληψη βάρους (ανάγκη παρεντερικής διατροφής)
3. Χαρακτηριστικό προσωπείο
4. Υποπλασία γεννητικών οργάνων
5. Καθυστέρηση ανάπτυξης
6. Απότομη αύξηση του βάρους μετά την ηλικία των 12 μηνών
Παιδιά μεγαλύτερα των 3 ετών
1. Ιστορικό νεογνικής υποτονίας
2. Ιστορικό ανεπαρκούς σίτισης στην νεογνική περίοδο και ανεπαρκής πρόσληψης βάρους
3. Παχυσαρκία που ξεκινά σε ηλικία 2- 4ετών
4. Χαρακτηριστικό προσωπείο (αμυγδαλωτά μάτια, λεπτό άνω χείλος,κατιούσα φορά των γωνιών του στόματος)
5. Υπογοναδισμός : α. Στα αγόρια : κρυσορχία, μικρό πέος και όρχεις, υποπλασία όσχεου, ελαττωμένη τριχοφυΐα προσώπου και σώματος, έλλειψη φυσιολογικού βράγχους φωνής β. Στα κορίτσια: υποπλασία μικρών χειλέων αιδοίου και κλειτορίδας, αμηνόρροια
6. Ήπια εως μέτρια πνευματική καθυστέρηση. Μαθησιακά προβλήματα. Εύκολη οπτική αντίληψη και οργάνωση
7. Υπερφαγία. Συνεχής αναζήτηση τροφής

1.2 ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN

Το 1965, ο Harry Angelman (Άγγλος παιδίατρος), αναφέρει τις περιπτώσεις τριών παιδιών με κοινά χαρακτηριστικά: νευρικές κινήσεις, προεξέχουσα γλώσσα και ξεσπάσματα γέλιου, στα οποία δίνει την ονομασία “puppets” («κούκλες»)

(Angelman, 1965). Το σύνδρομο είναι σήμερα γνωστό ως σύνδρομο Angelman ή happy puppet syndrome. Τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman στα πρώτα χρόνια ζωής του ασθενούς είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στο σύνδρομο Prader Willi και για τον λόγο αυτό είναι συχνά δύσκολη η διαφορική διάγνωση μεταξύ των 2 αυτών συνδρόμων.

Τα πρώτα συμπτώματα του συνδρόμου Angelman είναι η καθυστέρηση ομιλίας, η μυϊκή υποτονία, η αδυναμία συγχρονισμού των κινήσεων καθώς και προβλήματα σίτισης, που πηγάζουν κυρίως από ακατάλληλο μυϊκό έλεγχο μάσησης και κατάποσης. Σοβαρή αναπτυξιακή διαταραχή καθώς και διανοητική καθυστέρηση, συνοδεύουν ένα τυπικό προφίλ συμπεριφοράς, που χαρακτηρίζεται από συχνό γέλιο, χαρούμενη διάθεση, εύκολες και χωρίς λόγο εξάψεις ενθουσιασμού καθώς και διαταραχές ύπνου. Τυπικά χαρακτηριστικά του προσώπου παιδιών με σύνδρομο Angelman, περιλαμβάνουν μικροκεφαλία, προεξέχουσα γλώσσα, προγναθισμό και συχνά στραβισμό. Η πλειοψηφία των ασθενών με σύνδρομο Angelman εμφανίζουν μία τυπική παθολογική εικόνα σε ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (HEΓ), με υψηλά οξύαιχμα κύματα ή χαμηλού δυναμικού κύματα. Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται ~ 1/15.000 – 1/ 20.000.



Εικόνα 1.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παιδιών με σύνδρομο Angelman (αριστερά) και Prader Willi (δεξιά)

Πίνακας 1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman, ταξινομημένα ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης (Williams et al, 1995b).

Συχνότητα 100% <ol style="list-style-type: none">1. Αναπτυξιακή καθυστέρηση, καθυστέρηση και σοβαρή διαταραχή ομιλίας2. Κινητικά ή προβλήματα ισορροπίας, κυρίως αταξία3. Τυπικό προφίλ συμπεριφοράς: συχνό γέλιο, χαρούμενη διάθεση, εξάψεις ενθουσιασμού, χαρακτηριστικές κινήσεις χεριών
Συχνότητα > 80% <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
Συχνότητα 20- 80 % <ol style="list-style-type: none">1. Επίπεδο ινίο2. Προεξέχουσα γλώσσα3. Προβλήματα σίτισης στην νεογνική περίοδο4. Προγναθισμός5. Μικροστομία6. Αραιά δόντια7. Υπομελάγχρωση (ανοικτόχρωμα μαλλιά / μάτια σε σχέση με τα οικογενή χαρακτηριστικά)8. Χαρακτηριστική στάση σώματος με ανασηκωμένα χέρια κατά την βόδιση9. Διαταραχές ύπνου

1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ PRADER WILLI ΚΑΙ ANGELMAN

Η πιο κοινή μοριακή διαταραχή που ευθύνεται για την εκδήλωση των συνδρόμων Prader Willi και Angelman είναι η χρωμοσωμική έλλειψη, μεγέθους ~ 4Mb, στην περιοχή 15q11-q13 του πατρικού και του μητρικού αλληλομόρφου αντίστοιχα. Η έλλειψη αυτή ευθύνεται για το 70% των ασθενών με σύνδρομο Prader Willi και για το 65- 70% των ασθενών με σύνδρομο Angeman.

Η δεύτερη πιο συχνή μοριακή διαταραχή που εμφανίζεται σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi είναι η μητρικής προέλευσης μονογονεϊκή δισωμία 15 (UPD15), στην οποία δεν υπάρχει πατρικό αλληλόμορφο, και το χρωμόσωμα 15 αντιπροσωπεύεται αποκλειστικά από δύο μητρικά αλληλόμορφα. Αντίστοιχα, στο σύνδρομο Angelman η πατρική μονογονεϊκή δισωμία 15 (pUPD15) αφορά ένα μικρό ποσοστό των ασθενών (3-5%).

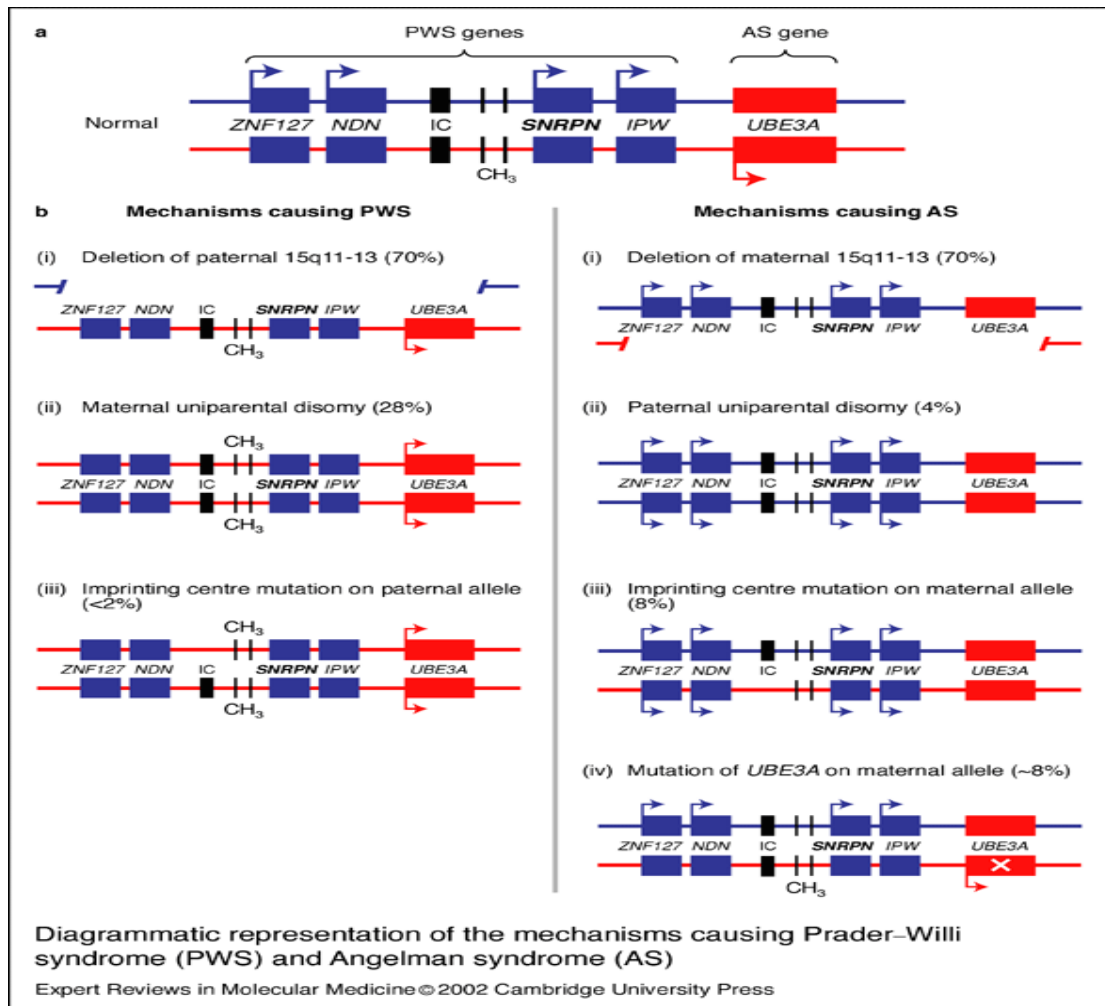
Μεταλλάξεις ή ελλείμματα στην περιοχή η οποία ρυθμίζει την γονιδιακή αποτύπωση της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 αποτελούν έναν ακόμη μηχανισμό παθογένεσης για τα δύο σύνδρομα. Ποσοστό ίσο με 1-3% των ασθενών με σύνδρομο Prader Willi έχει βρεθεί ότι φέρουν μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting centre) της περιοχής 15q11-q13. Στις μισές από αυτές τις περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις οφείλονται σε μικρή έλλειψη που εντοπίζεται στο εξώνιο 1 του SNRPN γονιδίου, και οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ύπαρξη μη φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης (Ohta et al, 1999). Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η αιτία ύπαρξης αλλοιωμένου προτύπου μεθυλίωσης παραμένει άγνωστη, αν και είναι πιθανή η ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων που επηρεάζουν την ρυθμιστική ικανότητα του κέντρου αποτύπωσης.

Περίπου 7- 9% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν αλλαγές στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, με αποτέλεσμα το μητρικό αλληλόμορφο να φέρει πατρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης. Ομοίως, οι παρατηρούμενες αυτές αλλαγές μπορεί να οφείλονται είτε σε μικρά ελλείμματα και μεταλλάξεις σε περιοχές που ρυθμίζουν την γονιδιακή αποτύπωση της περιοχής 15q11-q13, είτε σε αιτίες οι οποίες παραμένουν ακόμη άγνωστες.

Ποσοστό ίσο με 4-6% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A, το οποίο βρίσκεται μέσα 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 αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων της κωδικής περιοχής του γονιδίου οι οποίες προκαλούν την δημιουργία μη λειτουργικού γονιδιακού προϊόντος.

Τέλος, υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με σύνδρομο Angelman (10-14%) , στους οποίους δεν εντοπίζεται καμία μοριακή διαταραχή στην περιοχή 15q11-q13. Πιθανές εξηγήσεις για την περίπτωση αυτή είναι η λανθασμένη κλινική διάγνωση, ή η παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια της περιοχής 15q11-q13, ή και εκτός της 15q11-q13 (Jiang et al, 1999)

Αντίθετα, σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi δεν έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε συγκεκριμένο γονίδιο οι οποίες να μπορούν να συσχετισθούν με την εμφάνιση του συνδρόμου, ενώ έχουν αναφερθεί ελάχιστες περιπτώσεις ασθενών, όπου η μοριακή διαταραχή αφορά ισοζυγισμένη μετατόπιση τμήματος της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 (Πίν. 2.3)



Εικόνα 1.2. Διαγραμματική απεικόνιση των μοριακών μηχανισμών παθογένεσης των συνδρόμων Prader Willi και Angelman (Από Expert Reviews in Molecular Medicine,2002, Cambridge University Press)

ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΔΙΣΩΜΙΑ

Η έννοια της μονογονεϊκής δισωμίας χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Engel το 1980. Ορίζεται ως η μεταβίβαση και των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα μόνο γονέα στο παιδί. Συνεπώς, πρόκειται για μητρική μονογονεϊκή δισωμία όταν και τα δύο αλληλόμορφα προέρχονται από την μητέρα και πατρική μονογονεϊκή δισωμία όταν και τα δύο αλληλόμορφα κληρονομούνται από τον πατέρα. Η μονογονεϊκή δισωμία δεν αναφέρεται αποκλειστικά σε ολόκληρα χρωμοσώματα αλλά και σε τμήματα χρωμοσωμάτων (segmental UPD). Η συχνότητα της μονογονεϊκής δισωμίας έχει υπολογιστεί περίπου στις 2.8/ 10.000 γεννήσεις (Engel 1980) και έχει αναφερθεί για όλα τα χρωμοσώματα εκτός από τα 3, 12, 18 και

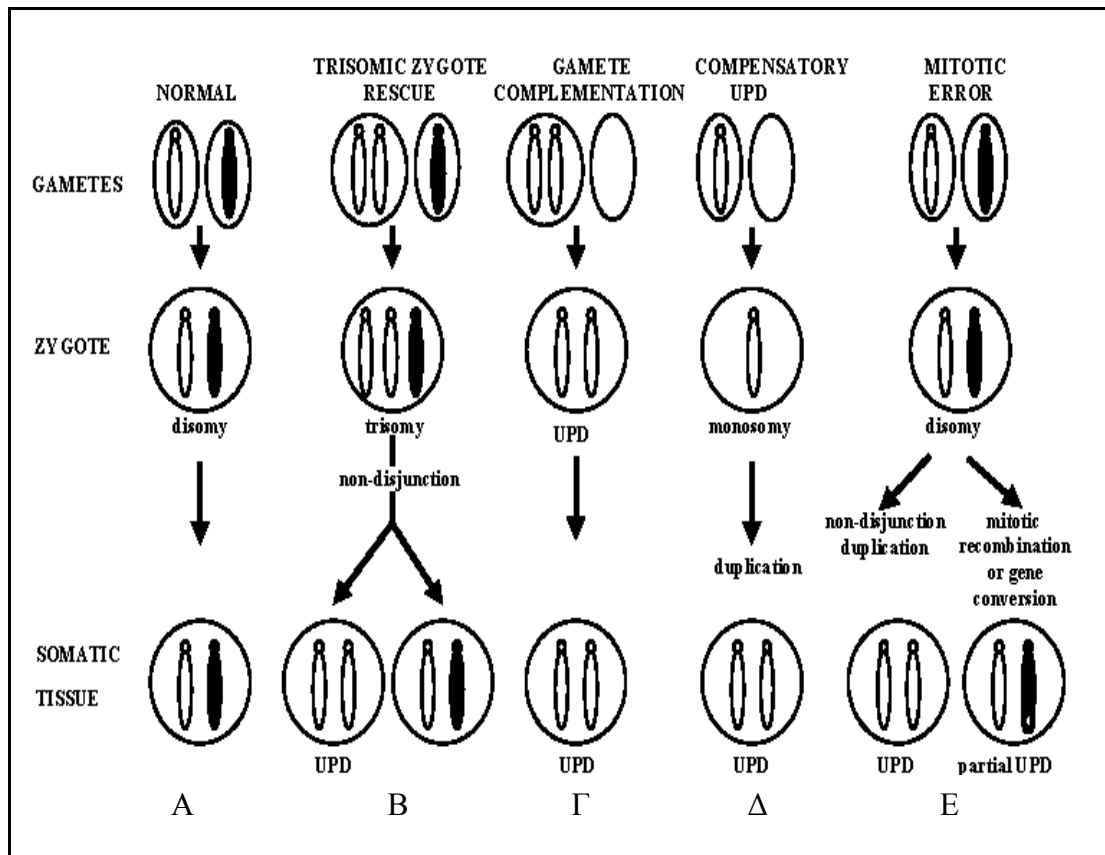
19. Υπάρχουν δύο τύποι μονογονεϊκής δισωμίας: η μεταβίβαση των δύο διαφορετικών ομόλογων χρωμοσωμάτων από τον ένα γονέα που ονομάζεται μονογονεϊκή ετεροδισωμία (heterodisomy), και η μεταβίβαση του ενός αλληλομόρφου από τον ένα γονέα που ονομάζεται μονογονεϊκή ισοδισωμία (isodisomy), εφόσον η γενετική πληροφορία που μεταβιβάζεται προέρχεται από το ένα μόνο αλληλόμορφο πατρικής ή μητρικής προέλευσης.

Η μονογονεϊκή δισωμία μπορεί να προκύψει με τους εξής 4 τρόπους (Εικ.1.3):

1. Διόρθωση τρισωμίας (trisomic zygote rescue) στα πρώτα στάδια δημιουργίας του ζυγωτού. Αποτελεί τον πιο συχνό μηχανισμό δημιουργίας μονογονεϊκής δισωμίας. Η τρισωμία φαίνεται να συμβαίνει συχνότερα σε κάποια χρωμοσώματα από ότι σε άλλα (32% των περιπτώσεων τρισωμίας αφορούν το χρωμόσωμα 16, 13% το χρωμόσωμα 21, 10% το χρωμόσωμα 15). Παρόλο που θεωρητικά οι ανευπλοειδίες συμβαίνουν εξίσου στα σπερματοζωάρια και τα ωάρια, στην πραγματικότητα είναι συχνότερες στα ωάρια και η συχνότητά τους αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας (Matei et al, 1979).
2. Γονιμοποίηση ενός δισωμικού ωαρίου (ή σπερματοζωαρίου) με ένα σπερματοζωάριο (ή ωάριο) στο οποίο απουσιάζει το ίδιο χρωμόσωμα.
3. Διόρθωση μονοσωμίας στα πρώτα στάδια της κύησης (στο ζυγωτό) με διπλασιασμό του χρωμοσώματος και
4. Λάθη κατά τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό.

Η ύπαρξη δισωμίας σε τμήμα ή ολόκληρο το χρωμόσωμα μπορεί να οδηγήσει:

1. Σε γέννηση παιδιού με αυτοσωμικό υπολειπόμενο νόσημα, εάν απουσιάζει το υγιές αλληλόμορφο
2. Μετάδοση φυλοσύνδετου νοσήματος από τον πατέρα στον γιο ή στην εκδήλωση φυλοσύνδετου υπολειπόμενου νοσήματος σε θηλυκό άτομο
3. Την ανάπτυξη παθολογικού φαινοτύπου όταν αφορά τμήμα του γονιδιώματος που υφίσταται γονιδιακή αποτύπωση {χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13(PWS/ AS), και 11p15.5 (σύνδρομο Beckwith- Wiedemann)}.



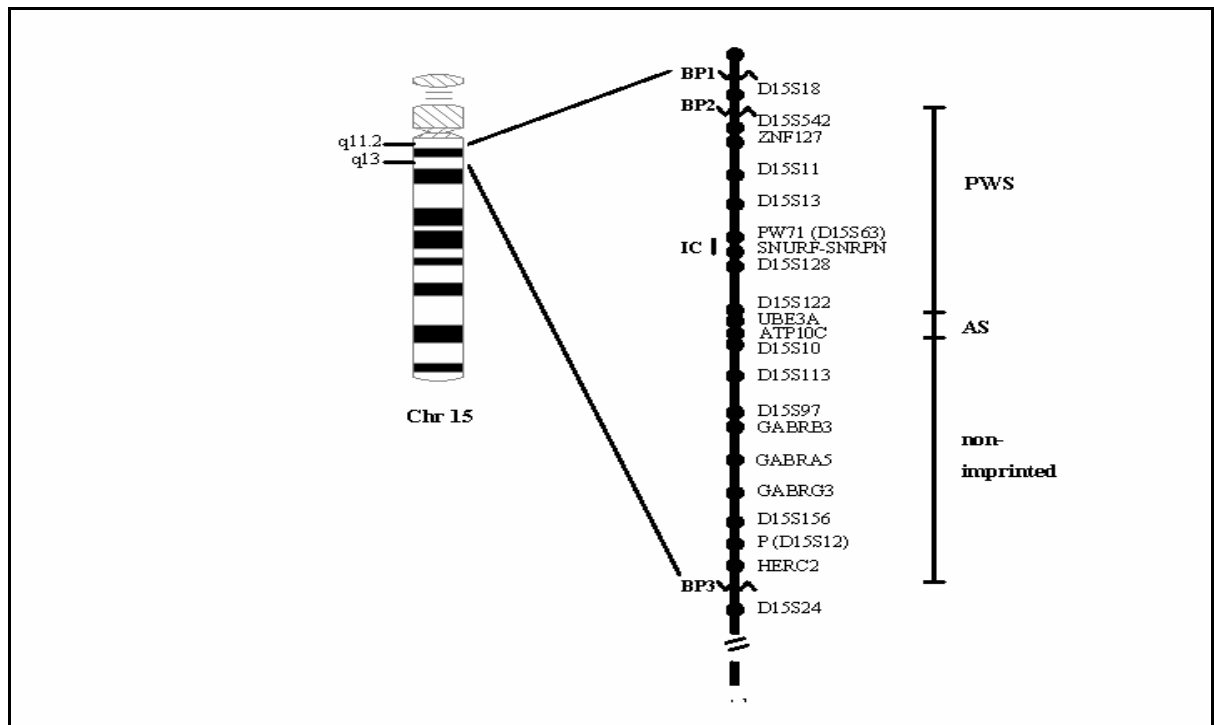
Εικόνα 1.3. Μηχανισμοί δημιουργίας μονογονεϊκής δισωμίας: Α. Φυσιολογικά η γενετική πληροφορία που υπάρχει στο ζυγωτό προέρχεται από την ισότιμη συνεισφορά και των δύο γονέων, έτσι ώστε τα δύο αλληλόμορφα κάθε χρωμοσώματος να αντιπροσωπεύουν την πατρική και την μητρική σειρά, Β. Κατά την διόρθωση τρισωμικού 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).

Η πρώτη αναφορά μητρικής μονογονεϊκής δισωμίας 15 (mUPD15) σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi έγινε το 1989 (Nichols et al, 1989b). Στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Prader Willi η μονογονεϊκή δισωμία προκύπτει μετά από διόρθωση τρισωμίας στο ζυγωτό. Η δημιουργία

τρισωμικού ζυγωτού είναι αποτέλεσμα ατελούς διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων του ωαρίου κατά την διάρκεια της μείωσης (maternal non-disjunction). Η μεγάλη ηλικία της μητέρας αναφέρεται ότι είναι προδιαθεσικός παράγοντας στις περιπτώσεις αυτές. Ομοίως, ατελής διαχωρισμός κατά την μειωτική διαίρεση στο σπερματοζωάριο, η δημιουργία τρισωμικού ζυγωτού και διάσωση της τρισωμίας με αποβολή του μητρικού αλληλομόρφου, οδηγεί σε πατρική δισωμία και εμφάνιση του συνδρόμου Angelman (Nichols et al, 1992). Η πιθανότητα εμφάνισης ατελούς διαχωρισμού στο σπερματοζωάριο είναι μικρότερη από ότι στο ωάριο, γεγονός που δικαιολογεί την μικρότερη συχνότητα εμφάνισης πατρικής δισωμίας του χρωμοσώματος 15 (3-5%) σε σχέση με την αντίστοιχη μητρική μονογονεϊκή δισωμία 15 (25-30%) (Glenn et al, 1997).

ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 15q11-q13

Τα ελλείμματα που παρατηρούνται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13 στους ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi ή Angelman είναι παρόμοιου μεγέθους (~ 4Mb) ενώ τα σημεία θραύσης εντοπίζονται μεταξύ συγκεκριμένων δεικτών (Εικ.1.4). 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 ελλείμματα προκύπτουν από άνισο επιχιασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Πράγματι, μελέτες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων μονάδων DNA και στα τρία σημεία θραύσης και έχει προταθεί ότι τα ελλείμματα προκύπτουν μετά από άνισο επιχιασμό μεταξύ των επαναλήψεων αυτών (Amos-Landgraf et al, 1999).



Εικόνα 1.4. Γενετικός χάρτης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Τα κοινά σημεία θραύσης (BP1, BP2, BP3) φαίνονται με κάθετες γραμμές.

2. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ – ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Προκειμένου να γίνει κατανοητό το φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης και ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζεται και ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση, είναι σημαντικό να μελετηθεί ένα εξίσου σημαντικό φαινόμενο: η μεθυλίωση του DNA.

2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς της αποσιώπησης γονιδίων (gene silencing), ένα φαινόμενο που συνδέεται άμεσα με την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος στα θηλυκά άτομα (X inactivation) και την γονιδιακή αποτύπωση (genomic imprinting). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην ρύθμιση της ιστοειδική έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε ενήλικες ιστούς, τονίζοντας την σημασία της μεθυλίωσης στην εδραίωση και την διατήρηση κύτταρο-ειδικής γονιδιακής έκφρασης (Futscher et al, 2002).

Η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση, αναστέλλοντας την μεταγραφική ενεργότητα. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται φαίνεται να σχετίζονται με την δομή της χρωματίνης, με τους εξής τρόπους:

1. Αδυναμία πρόσδεσης ειδικών μεταγραφικών παραγόντων

Ένας μεγάλος αριθμός μεταγραφικών παραγόντων αναφέρεται στην βιβλιογραφία, οι οποίοι αδυνατούν να προσδεθούν στην ρυθμιστική περιοχή μετά την προσθήκη μεθυλομάδας μέσα ή κοντά σε αυτή (Tate et al, 1993).

2. Σχηματισμός ετεροχρωματίνης

Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από περιοχές έντονα μεθυλιωμένες καθώς και από την παρουσία υποακετυλιωμένων ιστονών. Ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης έχει συσχετισθεί με την μεταγραφική καταστολή, υπό την έννοια ότι η δομή αυτή είναι λιγότερο «προσβάσιμη» από τους μεταγραφικούς παράγοντες, από ότι η ευχρωματίνη. Ευχρωματινικές περιοχές, μεταγραφικά ενεργές, συνδέονται με ακετυλιωμένες ιστόνες, ενώ αντίθετα, στις μεταγραφικά ανενεργές περιοχές συναντάμε απακετυλιωμένες ιστόνες. Η λειτουργική σχέση μεταξύ της ακετυλίωσης των ιστονών και της μεταγραφικής ενεργότητας υποστηρίζεται από την (πειραματική) ενεργοποίηση της μεταγραφής μετά από επίδραση χημικών παραγόντων (όπως η τριχοστατίνη A- TSA), που παρεμποδίζουν την απακετυλίωση των ιστονών. Η απακετυλίωση των ιστονών γίνεται με την βοήθεια ειδικών ενζύμων, τις απακετυλάσες (HDAC, Histone Deacetylases). Η σχέση της απακετυλίωσης των ιστονών και της μεθυλίωσης του DNA έχει μελετηθεί και βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες και οι απακετυλάσες των ιστονών μπορούν να αλληλεπιδρούν, άμεσα ή έμμεσα, και να συγκεντρώνονται στην διχάλα διπλασιασμού, επηρεάζοντας την διαδικασία αντιγραφής του DNA (Fuks et al , 2000).

Περαιτέρω μελέτες ίσως βοηθήσουν στον χαρακτηρισμό μιας πιθανής σχέσης μεταξύ της απακετυλίωσης των ιστονών, της μεθυλίωσης του DNA και της γονιδιακής καταστολής (gene silencing) (Paulsen et al, 2001).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

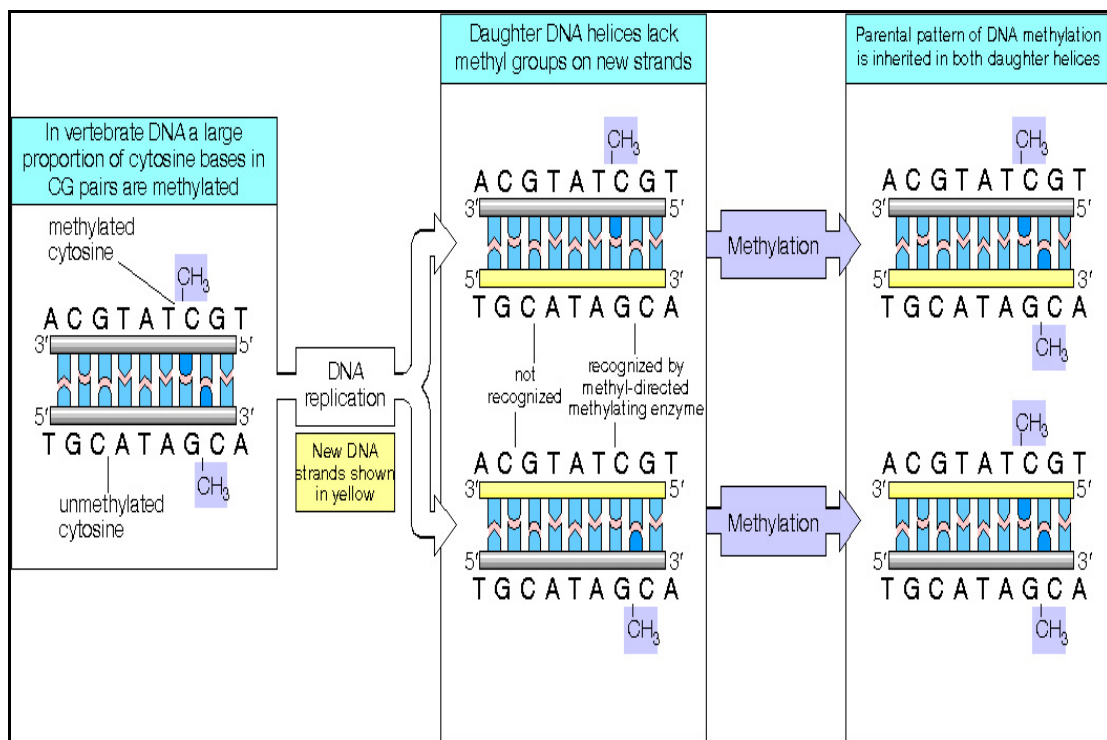
Τόσο στους προκαρυωτικούς, όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μία συχνή τροποποίηση του γενετικού υλικού. Η προσθήκη μεθυλομάδας (-CH₃) μπορεί θεωρητικά να συμβεί και στις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη). Η πιο κοινή τροποποίηση που παρατηρείται στο επίπεδο του γενετικού υλικού των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι η μεθυλίωση των καταλοίπων κυτοσίνης. Ποσοστό ίσο με 2- 7% των κυτοσινών στο γονιδίωμα των θηλαστικών είναι μεθυλιωμένο. Η προσθήκη της μεθυλομάδας γίνεται στο 5' άτομο C των καταλοίπων κυτοσίνης στα δινουκλεοτίδια CG (5' - CpG- 3'), όπου και οι δύο κυτοσίνες των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA είναι μεθυλιωμένες.

Συγκρινόμενα με άλλα δινουκλεοτίδια, τα CpG δινουκλεοτίδια εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό κατά μήκος του γονιδιώματος των θηλαστικών, σχηματίζοντας όμως περιοχές υψηλής συγκέντρωσης, γνωστές ως CpG νησίδες (CpG islands) (Paulsen and Smith, 2005). Στις περιοχές αυτές η αναλογία των βάσεων C, G φτάνει το 60%, ενώ στο υπόλοιπο γονιδίωμα κυμαίνεται περίπου στο 40%. Οι CpG νησίδες έχουν μέγεθος περίπου 1- 2 Kb και υπολογίζεται ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 45.000 τέτοιες περιοχές. Οι κυτοσίνες των CpG νησίδων είναι συνήθως υπομεθυλιωμένες και εντοπίζονται κοντά ή και μέσα στην περιοχή των υποκινητών γονιδίων (ποσοστό 56% των ανθρώπινων γονιδίων έχει συσχετισθεί με CpG νησίδες) (Antequera F. et al, 1993). Τα κατάλοιπα των κυτοσινών των CpG νησίδων προστατεύονται από την μεθυλίωση με μηχανισμό που δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστός. Εντούτοις, το 70% περίπου των CpG δινουκλεοτιδίων που βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα, και δεν αποτελούν μέρος κάποιας CpG νησίδας, είναι μεθυλιωμένα (Meehan et al, 2003).

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια ενζυμική τροποποίηση η οποία πραγματοποιείται από συγκεκριμένα ένζυμα, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες. Η μεθυλομάδα που προστίθεται δεν επηρεάζει το ζευγάρι των βάσεων, αλλά η προεξοχή που δημιουργεί στην μεγάλη αύλακα της αλυσίδας του DNA μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις του μορίου με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες (Razin et al, 1980). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν χαρακτηριστεί δύο διαφορετικά είδη μεθυλοτρασφερασών: 1. οι de novo μεθυλοτρανσφεράσες, οι οποίες χρησιμοποιούν μη μεθυλιωμένο DNA σαν

υπόστρωμα, και 2. οι μεθυλοτρανσφεράσες διατήρησης (maintenance methyltransferases), οι οποίες δρουν σε ημι- μεθυλιωμένο DNA. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί 5 διαφορετικές μεθυλοτρανσφεράσες κυτοσίνης (DNMTs) στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών (Bestor et al, 2000). Οι DNMT3A και DNMT3B μεθυλοτρανσφεράσες δρουν σε μη μεθυλιωμένο DNA (de novo methyltransferases), ενώ η DNMT1 μεθυλιώνει ημι- μεθυλιωμένο DNA.

Έχει παρατηρηθεί ότι και οι δύο κυτοσίνες (στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA) σε ένα CpG δινουκλεοτίδιο είναι μεθυλιωμένες. Προκειμένου να διατηρηθεί το πρότυπο αυτό κατά την κυτταρική διαίρεση και τον διπλασιασμό του DNA, είναι απαραίτητη η καταλυτική δράση των μεθυλοτρανσφερασών διατήρησης (maintenance methyltransferases) (Εικ.2.1).



Εικόνα 2.1 Κατά τον διπλασιασμό του DNA η θυγατρική αλυσίδα που προκύπτει είναι μη μεθυλιωμένη στα κατάλοιπα κυτοσίνης, δημιουργώντας έτσι μία αλυσίδα DNA ημι-μεθυλιωμένη. Η διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης και στις δύο αλυσίδες DNA επιτυγχάνεται με την μεταφορά μεθυλ- ομάδας στα μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης, με την δράση των μεθυλοτρανσφερασών διατήρησης (DNMT1)

Μηχανισμοί απώλειας της μεθυλίωσης (demethylation) έχουν παρατηρηθεί και μπορεί να είναι παθητικοί ή ενεργητικοί. Παθητικοί μηχανισμοί, κατά τους οποίους εμποδίζεται η πρόσβαση των DNMTs στην συγκεκριμένη περιοχή, έχουν αναφερθεί πολλές φορές (Hsien, 1999), ενώ αντίθετα, λίγες αναφορές έχουν γίνει για την ύπαρξη ενεργητικού μηχανισμού απώλειας της μεθυλίωσης μέσω συγκεκριμένων ενζύμων (Bruniquel et al, 2003). Μία από τις αναφορές αυτές αφορά την ενεργή απώλεια του προτύπου μεθυλίωσης, η οποία ακολουθείται από de novo μεθυλίωση σε μεταγενέστερο αναπτυξιακό στάδιο, και παρατηρείται κατά την διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης.

2.2 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (GENOMIC IMPRINTING)

Η γονιδιακή αποτύπωση αποτελεί έναν επιγενετικό μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης, ο οποίος καθορίζει την διαφορετική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων από το ένα μόνο αλληλόμορφο, πατρικής ή μητρικής προέλευσης. Στην περίπτωση αυτή και τα δύο αλληλόμορφα είναι παρόντα (μητρικό και πατρικό), αλλά λειτουργικά ενεργό είναι μόνο το ένα.

Η ιδέα ότι ένας μηχανισμός όπως η γονιδιακή αποτύπωση μπορεί να εξηγήσει λειτουργικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ του μητρικού και του πατρικού γονιδιώματος στα θηλαστικά, προτάθηκε το 1984 από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες (McGrath and Solter, 1984, Surani et al, 1984). Οι McGrath and Solter και οι Surani et al, έδειξαν ότι έμβρυα που έχουν είτε 2 θηλυκούς είτε 2 αρσενικούς μονάχα προπυρήνες, εμφανίζουν πρόωμη εμβρυϊκή θνησιμότητα και σε καμία περίπτωση δεν ολοκληρώνεται η ανάπτυξή τους. Η συμβολή της μητρικής και της πατρικής γενετικής πληροφορίας είναι απαραίτητη για την φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αποτυπωμένα γονίδια των θηλαστικών καθώς και οι χρωμοσωμικές περιοχές που εντοπίζονται εμφανίζουν κοινά φυσικοχημικά, γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά. Τα αποτυπωμένα γονίδια συγκεντρώνονται συνήθως σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές, σχηματίζοντας ομάδες γονιδίων (gene clusters). Αυτό το πρότυπο οργάνωσης πιστεύεται ότι αντανακλά μία συντονισμένη ρύθμιση των γονιδίων της συγκεκριμένης περιοχής. Σε αρκετές από αυτές τις χρωμοσωμικές περιοχές έχει εντοπιστεί ένα κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης (Imprinting Centre- IC), το οποίο είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της γονιδιακής αποτύπωσης και την ρύθμιση της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων. Ελλείψεις

και αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης στην περιοχή του IC έχει συσχετισθεί με απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης και την εκδήλωση ασθενειών (σύνδρομα Prader Willi και Angelman). Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των αλληλουχιών των περιοχών αυτών, έδειξε την ύπαρξη δύο στοιχείων λειτουργικής σημασίας: οι περιοχές αυτές είναι πλούσιες σε CpG νησίδες, καθώς και σε επιπλέον νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, οι οποίες εντοπίζονται γύρω από τις CpG νησίδες. Η ύπαρξη των χαρακτηριστικών αυτών δομών φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση του διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης του αποτυπωμένου αλληλομόρφου (Rek and Walter, 2001).

Το μητρικό και το πατρικό αλληλόμορφο ενός αποτυπωμένου γονιδίου, έχουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης. Αυτές οι διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές είναι γνωστές ως DMRs (Differentially Methylated Regions) και φαίνεται να διαθέτουν διαφορετικές ιδιότητες και διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τόσο στα γαμετικά όσο και στα σωματικά κύτταρα. Ελλείψεις στις DMRs έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης (LOI) (Scarano et al, 2001).

Από την άλλη, τα γονιδιακά προϊόντα των αποτυπωμένων γονιδίων εμφανίζουν ομοιότητες μόνο σε λειτουργικό επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο που παίζουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των περιοχών των αποτυπωμένων γονιδίων είναι η ύπαρξη γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν μη μεταφραζόμενο RNA καθώς και μετάγραφα αντίθετης φοράς (antisense RNA μετάγραφα). Ένας αριθμός αποτυπωμένων γονιδίων σχετίζεται με την ύπαρξη antisense RNA μεταγράφων, τα οποία εκφράζονται από το μη λειτουργικό αλληλόμορφο της συγκεκριμένης περιοχής (Πίνακας).

Πίνακας 2.1 Αποτυπωμένα γονίδια, στα οποία έχει βρεθεί η ύπαρξη μετγράφου αντίθετης φοράς (antisense RNA μετάγραφο) (Πίνακας από Paulsen and Smith, 2001)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ (εκφράζει το sense μετάγραφο)	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟ (εκφράζει το antisense μετάγραφο)
hKCNQ1	11p15.5	ΜΗΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
hZNF127	15q11-q13	ΠΑΤΡΙΚΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ
hUBE3A	15q11-q13	ΜΗΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
Nesp	Χρωμόσωμα 2	ΜΗΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
Corpg2	Χρωμόσωμα 6	ΜΗΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
Zfp127 (Znf127)	Χρωμόσωμα 7	ΠΑΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
Igf2	Χρωμόσωμα 7	ΠΑΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ
Igf2r	Χρωμόσωμα 17	ΜΗΤΡΙΚΟ	ΠΑΤΡΙΚΟ

Φαίνεται ότι τα antisense RNA μετάγραφα αποτελούν ρυθμιστικό μηχανισμό της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων, μέσω ανταγωνιστικής δράσης των sense και antisense RNA μεταγράφων μιας αποτυπωμένης περιοχής. Παρόμοιος μηχανισμός ρύθμισης φαίνεται να υπάρχει και στην περιοχή 15q11-q13, όπου η έκφραση του antisense UBE3A RNA μεταγράφου από το πατρικό αλληλόμορφο, προκαλεί την καταστολή της έκφρασης του UBE3A γονιδίου.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ

Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποτύπωσης είναι πολύπλοκος και όχι απόλυτα κατανοητός. 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 (Razin et al, 1995). Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα είδος διαφορικής ιχνηθέτησης των αποτυπωμένων γονιδίων στα γαμετικά κύτταρα των θηλαστικών. Η κληρονόμηση των επιγενετικών αυτών

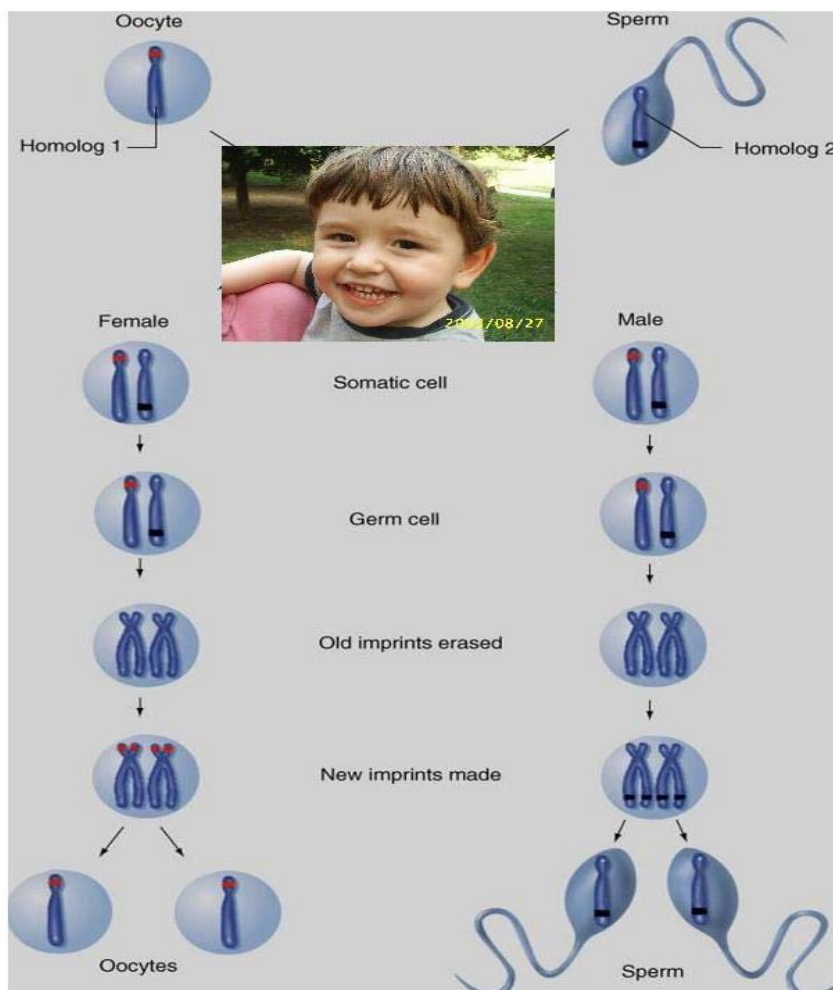
τροποποιήσεων έχει σαν αποτέλεσμα την εγκατάσταση διαφορετικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης.

Το πρότυπο της γονιδιακής αποτύπωσης αλλάζει κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής ενός οργανισμού και εξελίσσεται με διαφορετικό τρόπο στα γαμετικά και στα σωματικά κύτταρα. Στα σωματικά κύτταρα ενός οργανισμού, το γονιδιακό αποτύπωμα εγκαθίσταται με έναν ιστο- ειδικό τρόπο, και διατηρείται σταθερό κατά την αναπτυξιακή πορεία του οργανισμού. Η διατήρηση της γονιδιακής αποτύπωσης προϋποθέτει ότι σε κάθε κυτταρική διαίρεση πρέπει να διατηρείται το διαφορετικό πρότυπο αποτύπωσης στο πατρικό και στο μητρικό αλληλόμορφο (Διατήρηση – Maintenance). Αυτό επιτυγχάνεται με την ενζυμική δραστηριότητα των μεθυλοτρανσφερασών διατήρησης (Εικ.2.1)

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 (Εικ. 2.3):

1. Διαγραφή (Erasure), 2. Εγκαθίδρυση (Establishment) και 3. Διατήρηση (Maintenance) του γονιδιακού αποτυπώματος.

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 (Εικ. 2.2). Ένζυμα ειδικά για την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από το DNA δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες του αρσενικού και του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της εγκαθίδρυσης του γονιδιακού αποτυπώματος στα γαμετικά κύτταρα. Ο μεταγραφικός παράγοντας BORIS ρυθμίζει την δημιουργία του γονιδιακού αποτυπώματος στην αρσενική γαμετική σειρά, ενώ ανάλογος ρυθμιστής στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα δεν έχει βρεθεί ακόμη (Killian K. , 2005)

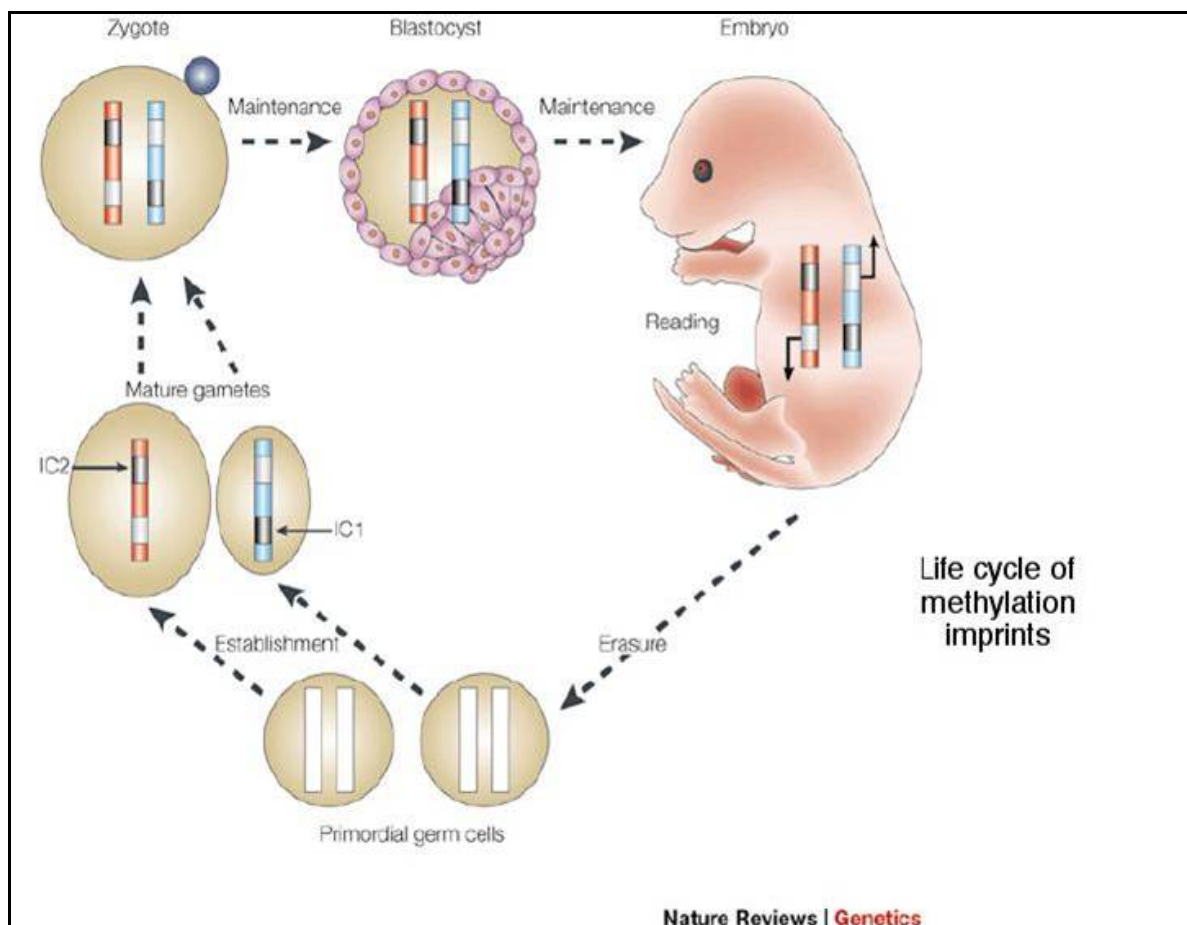


Εικόνα 2.2. Η διαδικασία της διαγραφής του γονιδιακού αποτυπώματος κατά τον σχηματισμό γαμετικών κυττάρων. Προκειμένου στα γαμετικά κύτταρα να υπάρχει μόνο το θηλυκό ή αρσενικό γονιδιακό αποτύπωμα (για τα ωάρια και τα σπερματοζώαρια αντίστοιχα), είναι απαραίτητη η διαγραφή του προϋπάρχοντος γονιδιακού αποτυπώματος (το οποίο περιλαμβάνει και το θηλυκό και το αρσενικό αποτύπωμα).

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 (Paolani-Giacobino et al, 2004). 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 (Mayer et al, 2000, Oswald et al, 2000). 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 όπου η δημιουργία knock-out (KO) ποντικών για τα γονίδια των DNA μεθυλοτρανσφερασών προκαλεί διακοπή της γονιδιακής έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων H19, Igf2 και Igf2r. Τα πειραματόζωα αυτά δεν ολοκληρώνουν την εμβρυϊκή τους ανάπτυξη, γεγονός που τονίζει την σημασία των ενζύμων της μεθυλίωσης στην φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη (Li et al, 1994).



Εικόνα 2.3 Ο κύκλος ζωής των αποτυπωμένων γονιδίων: 1. Διαγραφή (Erasure), 2. Εγκαθίδρυση (Establishment) και, 3. Διατήρηση (Maintenance)

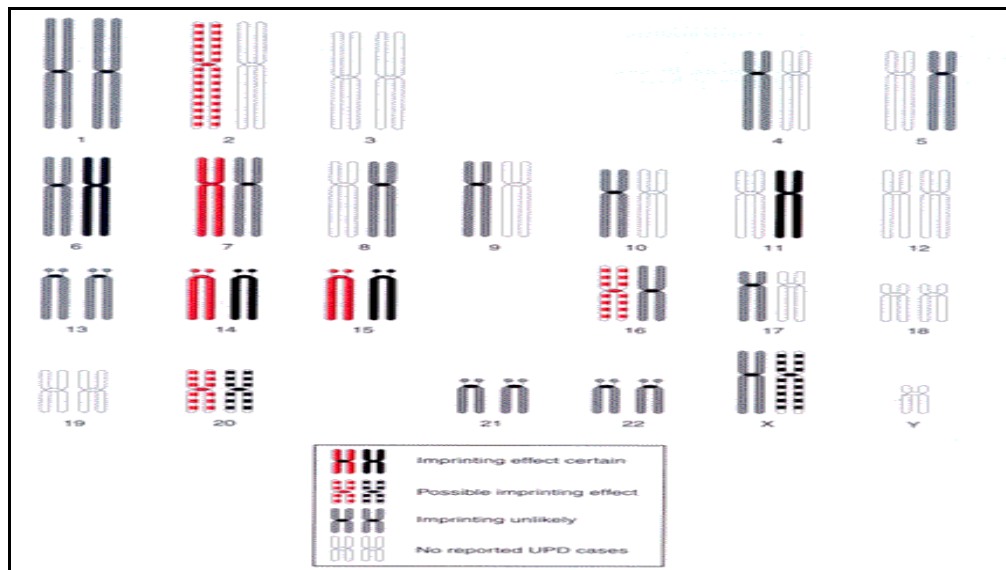
ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 83 αποτυπωμένα γονίδια στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού (41 στον άνθρωπο, 71 στον ποντικό και

29 κοινά). Τα αποτυπωμένα γονίδια έχουν εντοπιστεί σε 27 συνολικά χρωμοσωμικές περιοχές (16 στον άνθρωπο και 22 στον ποντικό), από τις οποίες οι 13 (8 στον άνθρωπο και 12 στον ποντικό) αποτελούν γονιδιακά αποτυπωμένες περιοχές που περιέχουν ομάδες αποτυπωμένων γονιδίων (imprinting clusters). Από τα ήδη ταυτοποιημένα αποτυπωμένα γονίδια, τα 63 κωδικοποιούν πρωτεΐνες (35 στον άνθρωπο και 54 στον ποντικό). Τα υπόλοιπα (25 συνολικά) κωδικοποιούν μη μεταφραζόμενα RNA (antisense μετάγραφα, μικρά πυρηνικά RNA- snoRNAs, ψευδογονίδια, κ.α.), ορισμένα από τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν έμμεσα στην γονιδιακή αποτύπωση, ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων αποτυπωμένων γονιδίων (Morison et al, 2005).

Το πρώτο αποτυπωμένο γονίδιο στο γονιδίωμα των θηλαστικών ταυτοποιήθηκε το 1991 (DeChiara et al, 1991). Πρόκειται για το γονίδιο Igf2 (Insulin- like growth factor 2). Το 1994 οι Hayashizaki et al υπολόγισαν ότι το 2% των CpG νησίδων εμφανίζουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης εξαρτώμενο από την γονεϊκή προέλευση του κάθε αλληλομόρφου. Βασισμένοι σε μελέτες που υπολογίζουν ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 29.000 CpG νησίδες (33), ο αριθμός των αποτυπωμένων γονιδίων ανέρχεται στα 100.

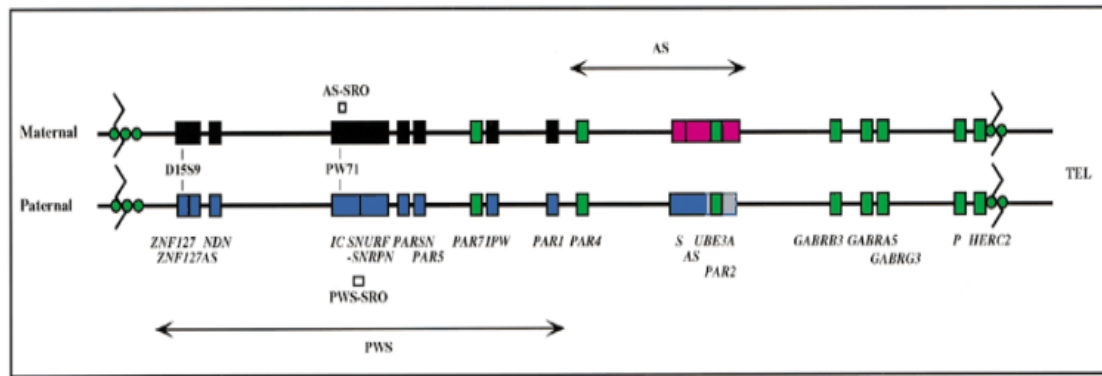
Αλλαγές στην έκφραση των αποτυπωμένων γονιδίων αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα σε 10 περίπου σύνδρομα και ασθένειες του ανθρώπου. Από την άλλη, μελέτες συνεχίζονται προκειμένου να εντοπιστούν αποτυπωμένα γονίδια τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες που εμφανίζουν γονεϊκό εξαρτώμενο τρόπο εκδήλωσης (όπως το σύνδρομο μητρικής μονογονεϊκής δισωμίας για τα χρωμοσώματα 2 και 16), καθώς και με πολύπλοκες γενετικές ασθένειες όπως άσθμα, αυτισμός, ψωρίαση, αλκοολισμός κ.ά (Morison et al, 2005).



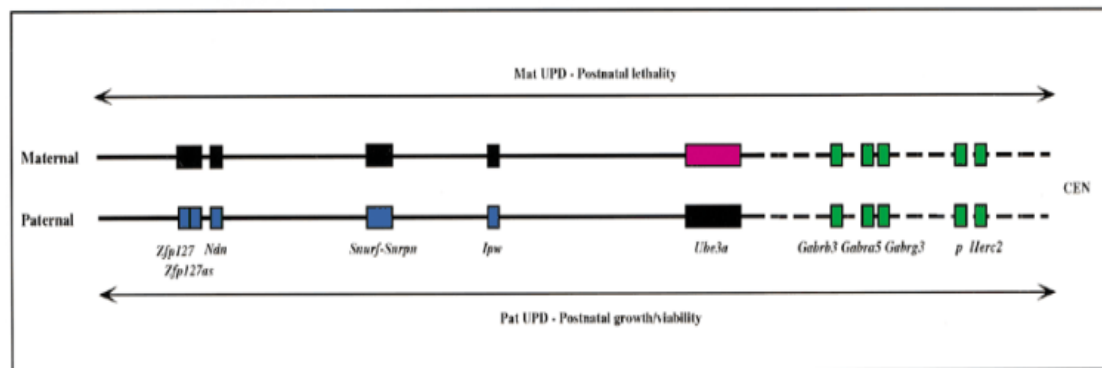
Εικόνα 2.4 Κατανομή γονιδιακής αποτύπωσης στα χρωμοσώματα του ανθρώπου. Κόκκινο-μαύρο: αλληλόμορφα στα οποία έχει παρατηρηθεί γονιδιακή αποτύπωση, Διακεκομμένες κόκκινες- μαύρες γραμμές: πιθανή περιοχή γονιδιακής αποτύπωσης, Γκρι: μικρή πιθανότητα γονιδιακής αποτύπωσης, Άσπρο: καμία αναφορά μονογονεϊκής δισωμίας, που να υποδεικνύει γονιδιακή αποτύπωση

2.3 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ 15q11-q13- ΚΕΝΤΡΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ (IMPRINTING CENTRE)

Η χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13, αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες περιοχές γονιδιακής αποτύπωσης στον άνθρωπο, η οποία έχει άμεσα συσχετισθεί με τα σύνδρομα Prader Willi και Angelman. Στην περιοχή αυτή εδράζεται μία ομάδα γονιδίων τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά από το πατρικό αλληλόμορφο (π.χ. SNRPN, SNURF, IPW), ενώ έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δύο γονίδια (UBE3A και ATP10C) τα οποία εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο (Εικ.2.5)



HUMAN CHROMOSOME 15q11-q13

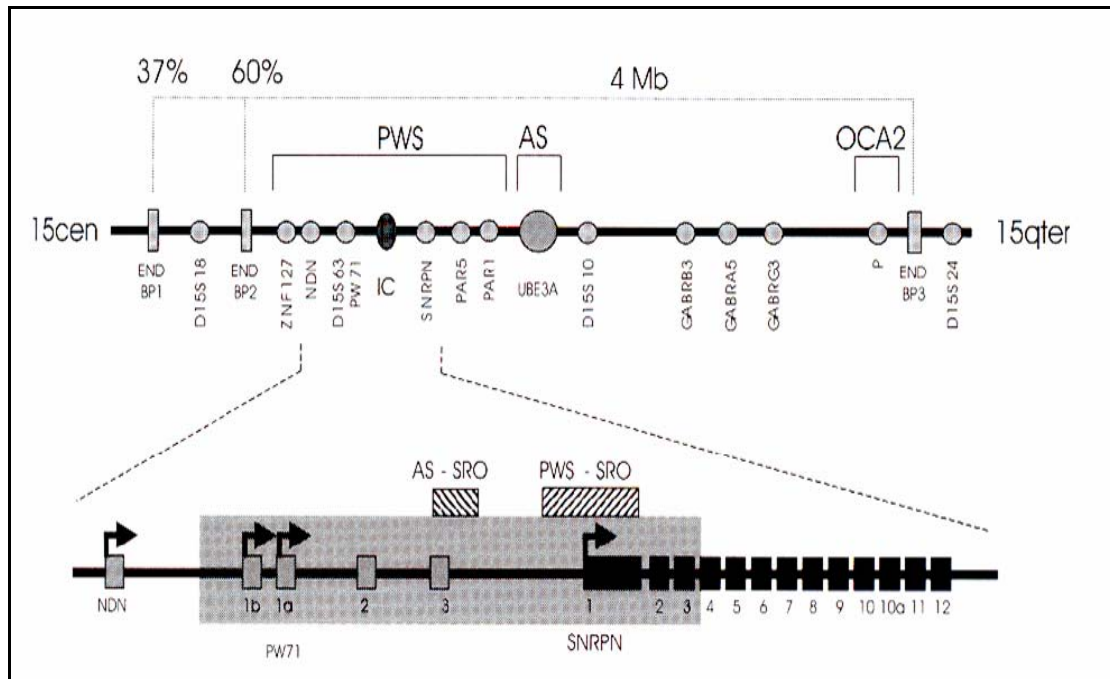


CENTRAL MOUSE CHROMOSOME 7

Εικόνα 2.5 Γενετικός χάρτης της περιοχής 15q11-q13 του ανθρώπινου γονιδιώματος και η συντενική περιοχή στο γονιδίωμα του ποντικού. Α) Τα γονίδια που εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο φαίνονται με ροζ χρώμα, ενώ τα αντίστοιχα που εκφράζονται από το πατρικό αλληλόμορφο μπλε χρώμα. Τα γονίδια τα οποία δεν εκφράζονται στο κάθε αλληλόμορφο φαίνονται με μαύρο χρώμα, ενώ τα μη αποτυπωμένα γονίδια με πράσινο (Από Mann et al, 1999).

Η γονιδιακή αποτύπωση της περιοχής αυτής ρυθμίζεται από έναν πολύπλοκο μηχανισμό. Πρωταρχικό ρόλο στον μηχανισμό αυτό φαίνεται να παίζει η διαφορετική μεθυλίωση συγκεκριμένων θέσεων της περιοχής καθώς και η ύπαρξη ενός κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (Imprinting Centre- IC). Μελέτες σε άτομα με σύνδρομο Prader Willi ή Angelman αποκάλυψαν ότι ένα ποσοστό των ασθενών φέρουν μεταλλάξεις ή ελλείμματα σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στην περιοχή 15q11-q13, οι οποίες φαίνεται να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση ολόκληρης της περιοχής. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο δομικά διαφορετικών αλληλουχιών οι οποίες όμως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να ρυθμίσουν την γονιδιακή αποτύπωση της περιοχής 15q11-q13: 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 1.15Kb, η οποία

βρίσκεται 35Kb αριστερά από το SNRPN γονίδιο (Εικ. 2.6). 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 2.6 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) (Από Engel E. and Antonarakis SE)

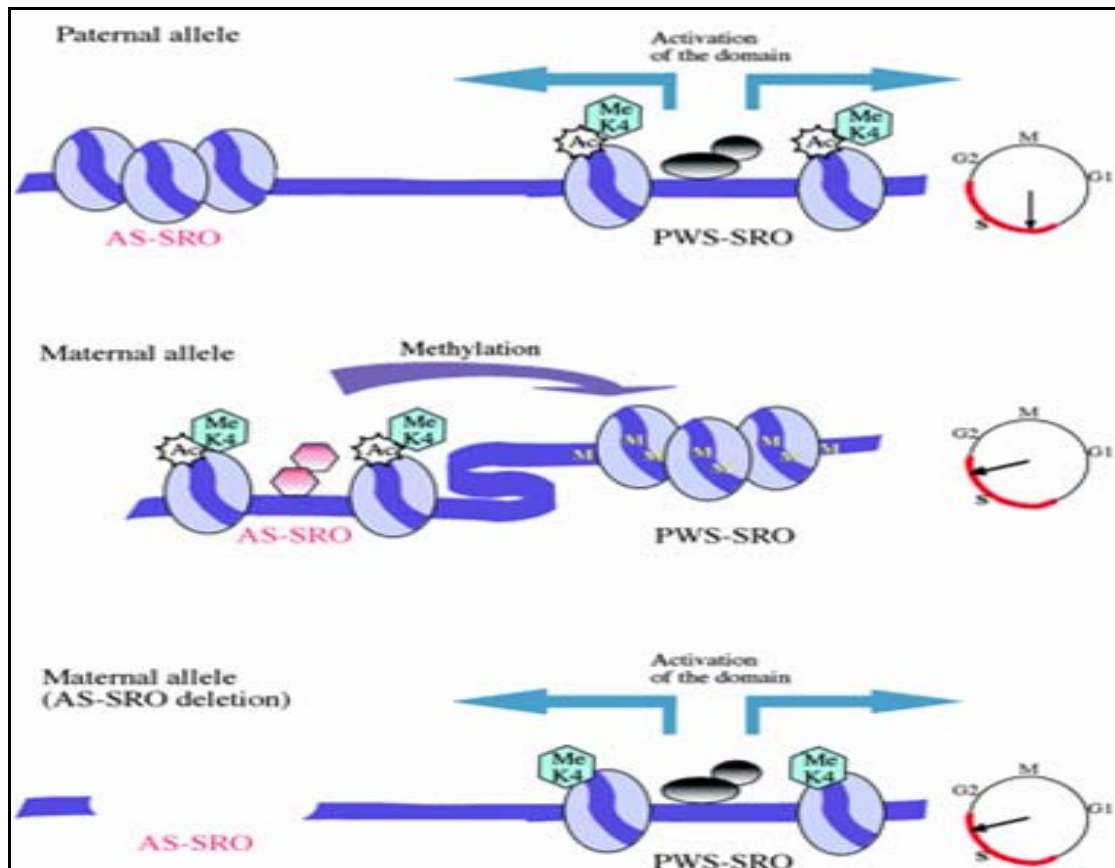
Ελλείψεις ή μεταλλάξεις στην περιοχή PW-SRO στο πατρικό αλληλόμορφο φαίνεται να εμποδίζουν την εδραίωση ή/ και την διατήρηση του πατρικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης. Συνεπώς, το πατρικό αλληλόμορφο ή απουσιάζει ή φαίνεται να προσομοιάζει το μητρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης. Αντίστοιχα, σε άτομα με σύνδρομο Angelman, ελλείψεις ή μεταλλάξεις στην περιοχή AS-SRO στο μητρικό αλληλόμορφο εμποδίζουν την εδραίωση ή/ και την διατήρηση του μητρικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης, αφήνοντας ενεργό μόνο το πατρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης.

Πρόσφατες μελέτες των Perk et al (2005) παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις κρίσιμες περιοχές των συνδρόμων Prader Willi (PW-SRO) και Angelman (AS-SRO). Η κρίσιμη PW-SRO περιοχή είναι μεθυλιωμένη στο μητρικό αλληλόμορφο, ενώ στο πατρικό παραμένει αμεθυλιωτή (Glenn et al, 1996). 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 (Scweizer et al, 1999, Saitoh and Wada, 2000, Perk et al, 2002). 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 (Perk et al, 2002).

Με βάση τα παραπάνω, προτείνεται ο εξής μηχανισμός λειτουργίας του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 (Εικ. 2.7):

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. 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 αμεθυλίωτη και ενεργή στο πατρικό αλληλόμορφο, όπου, με μηχανισμό που δεν έχει ακόμα χαρακτηρισθεί, προκαλεί την έκφραση όλων σχεδόν των γονιδίων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Σε αυτά περιλαμβάνεται και το μετάγραφο αντίθετης φοράς του UBE3A γονιδίου. το οποίο με την σειρά του φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση του UBE3A γονιδίου από το πατρικό αλληλόμορφο.



Εικόνα 2.7 Μηχανισμός γονιδιακής αποτύπωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Δίνεται διαγραμματικά και η περίπτωση ελλείμματος στην κρίσιμη AS-SRO περιοχή στο μητρικό αλληλόμορφο, που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PW-SRO και την επακόλουθη δημιουργία πατρικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης στο μητρικό αλληλόμορφο (Σύνδρομο Angelman)

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 (Paulsen and Smith, 2001).

2.4 ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ PRADER WILLI ΚΑΙ ANGELMAN

Η χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13 περιέχει μία ομάδα αποτυπωμένων γονιδίων, η πλειοψηφία των οποίων εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο, καθώς και γονίδια τα οποία εκφράζονται και από το πατρικό και από το μητρικό

αλληλόμορφο. Στην προσπάθεια απομόνωσης των γονιδίων της περιοχής αυτής και της πιθανής συσχέτισής τους με τα κλινικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων Prader Willi και Angelman, σημαντικό ρόλο έπαιξε η μελέτη της συντενικής περιοχής του χρωμοσώματος 7 στο ποντίκι (Cattanach et al, 1992) (Εικ.2.5)

Για το σύνδρομο Angelman έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο (UBE3A), οι οποίες έχουν συσχετισθεί με τον φαινότυπο του συνδρόμου. Αντίθετα, σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi δεν έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, οι οποίες να μπορούν να συσχετισθούν με τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου. Πιστεύεται ότι ο φαινότυπος του συνδρόμου Prader Willi είναι αποτέλεσμα συντονισμένης αλλαγής στην γονιδιακή έκφραση πολλών γονιδίων της περιοχής 15q11-q13.

ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ PRADER WILLI

Η κρίσιμη περιοχή για το σύνδρομο Prader Willi, εκτείνεται σχεδόν στο μισό της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 και περιλαμβάνει ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων και μεταγραφόμενων μονάδων (transcription units- TUs), τα οποία εκφράζονται από το πατρικό αλληλόμορφο. Η ομάδα των γονιδίων αυτών περιλαμβάνει τέσσερα τουλάχιστον αποτυπωμένα γονίδια: το SNRPN (Glenn et al, 1993a), το NDN (necdin- encoding gene), το MAGEL2 (NDNL1) και το ZNF127 (Jong et al, 1999). Επίσης, περιλαμβάνει και αρκετές μεταγραφόμενες μονάδες όπως οι PAR-1, PAR-5, IPW, ZNF127AS, PARSN.

Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν και ποιο από αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση του συνδρόμου Prader Willi, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί μετάλλαξη η οποία να επηρεάζει την έκφραση ενός μόνο από τα παραπάνω γονίδια ενώ η απώλεια της έκφρασης ενός μόνο γονιδίου δεν έχει συσχετισθεί με το σύνδρομο Prader Willi. Ένα από τα πιθανά υποψήφια γονίδια για το σύνδρομο Prader Willi είναι το SNRPN καθώς και τα υπόλοιπα μεταγραφικά προϊόντα της θέσης SNURF-SNRPN. Η περιοχή SNURF-SNRPN είναι μία πολύπλοκη γενετική θέση η οποία περιλαμβάνει περισσότερα από 148 εξόνια (Runte et al, 2001). Το κύριο γονίδιο της περιοχής αυτής, το SNRPN αποτελείται από 10 εξόνια, τα οποία μεταγράφονται σε ένα bicistronic mRNA, μεγέθους 1.4Kb. Τα εξόνια 1- 3 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη SNURF και τα εξόνια 4- 10 την SmN πρωτεΐνη (Gray et al, 1999).

Το SNRPN γονίδιο κωδικοποιεί μία μικρή πυρηνική πρωτεΐνη (Small Nuclear RNA associated polypeptide N – SmN), η οποία αποτελεί συστατικό του μεταγραφώματος (spliceosome). Εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ιστών, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στο νεφρό, στο πάγκρεας, στον πνεύμονα και στο ήπαρ (Sutcliffe et al, 1994). Η ευρεία αυτή έκφραση του SNRPN γονιδίου ενισχύει την υπόθεση ότι η SmN πρωτεΐνη εμπλέκεται στην ωρίμανση του mRNA πολλών γονιδίων ως βασικός ρυθμιστής (Leff et al, 1992).

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 (Runte et al, 2001). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το σημείο έναρξης της μεταγραφής για το UBE3A antisense μετάγραφο (το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση του UBE3A γονιδίου) βρίσκεται εντός της SNURF- SNRPN περιοχής (Runte et al, 2001).

Τα γονίδια SNURF και SNRPN εκφράζονται σε υγιή άτομα αλλά δεν εκφράζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi (Glenn et al, 1993a, Gray et al, 1999).

Το εξόνιο 1 και ο υποκινητής του SNRPN γονιδίου βρίσκονται μέσα στην CpG νησίδα, η οποία είναι μεθυλιωμένη κατά 97% στο μητρικό χρωμόσωμα και μη μεθυλιωμένη στο πατρικό αλληλόμορφο. 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 γενετικής αυτής περιοχής στην διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης της περιοχής 15q11-q13 (Runte et al., 2004).

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι στην παθογένεια του συνδρόμου Prader Willi ενέχεται η δράση πολλών αποτυπωμένων γονιδίων , που εκφράζονται από το πατρικό

μόνο αλληλόμορφο, και το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα πολυγονιδιακό σύνδρομο (contiguous gene syndrome).

ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN- UBE3A ΓΟΝΙΔΙΟ

Σε αντίθεση με το σύνδρομο Prader Willi, ένα μεγάλο ποσοστό (20%) των ασθενών με Angelman, υπολογίζεται ότι φέρουν μεταλλάξεις σε κάποιο γονίδιο, δεδομένου ότι ελλείψεις, μονογονεϊκή δισωμία και μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης έχουν αποκλειστεί. Πράγματι, ποσοστό ίσο με 4-6% αυτής της κατηγορίας των ασθενών έχει βρεθεί ότι φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A.

Το UBE3A γονίδιο εμφανίζει ένα ιστο-ειδικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης και εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου: στα νευρικά κύτταρα του ιππόκαμπου, στα κύτταρα του οσφρητικού φλοιού και στα κύτταρα Purkinje στο ποντίκι (Albrecht et al, 1997) και στον ανθρώπινο εγκέφαλο, παρέχοντας σημαντικές ενδείξεις για τον ρόλο του στην παθογένεια του συνδρόμου Angelman. Στα υπόλοιπα μέρη του εγκεφάλου καθώς και στους άλλους ιστούς του σώματος το γονίδιο εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα και δεν εμφανίζει κανένα πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης. Το UBE3A γονίδιο αποτελείται από 16 εξώνια. Στο 5' άκρο του, με την διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος, δημιουργούνται 11 εναλλακτικά μετάγραφα (9 έχουν ανιχνευθεί στους ενήλικες ιστούς και 2 στους εμβρυϊκούς) (Yamamoto et al, 1997, Kishino et al, 1997). Αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα κωδικοποιούν 3 διαφορετικές ισομορφές της ίδιας πρωτεΐνης, οι οποίες διαφέρουν στο αμινο- τελικό τους άκρο. Η λειτουργική σημασία των διαφορετικών αυτών αλληλομόρφων παραμένει ακόμα άγνωστη (Kishino et al, 1998).

Το UBE3A γονίδιο κωδικοποιεί την E6-AP λιγάση της ουμπικουιτίνης (E6-AP ubiquitin protein ligase). Πρόκειται για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, μεγέθους 100kDa, η οποία αρχικά απομονώθηκε με βάση την ιδιότητά της να συνδέεται με την E6 πρωτεΐνη του ανθρώπινου ιού papilloma και να καταλύει την αποδιάταξη της πρωτεΐνης p53 (Huibregtse et al, 1991). Η E6-AP πρωτεΐνη αποτέλεσε το πρώτο μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνών (λιγάσες της ουμπικουιτίνης),

οι οποίες ονομάζονται *hect* πρωτεΐνες, γιατί όλες περιέχουν μία περιοχή (350aa) ομόλογη στο καρβόξυ- τελικό τμήμα της E6-AP (Homology to the E6-AP Carboxyl Terminus).

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών, που είτε παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα ενεργές μέσα στο κύτταρο είτε λόγω μη φυσιολογικής δομής πρέπει να καταστραφούν, πραγματοποιείται μέσω του συστήματος πρωτεόλυσης με την συμμετοχή μορίων ουμπικουιτίνης. Το σύστημα αυτό λειτουργεί καταστρέφοντας συγκεκριμένες κυτταρικές πρωτεΐνες με έναν αυστηρά ρυθμιζόμενο τρόπο. Η αναγνώριση του συγκεκριμένου υποστρώματος – πρωτεΐνης η οποία πρόκειται να αποδιαταχθεί, γίνεται με την μεταφορά μορίου ουμπικουιτίνης σε αυτό. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την συντονισμένη δράση τριών διαφορετικών πρωτεϊνών: το ένζυμο E1 (E1 ubiquitin- activating enzyme) συνδέεται με το μόριο της ουμπικουιτίνης η οποία και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη ουμπικουιτίνη μεταφέρεται και προσδένεται με ένα δεύτερο ένζυμο E2 με δεσμό υψηλής ενέργειας. Στην συνέχεια το σύμπλεγμα ενώνεται με το ένζυμο E3 (λιγάση της ουμπικουιτίνης), ένα από τα οποία είναι και η E6-AP πρωτεΐνη. Το σύμπλεγμα αυτό με μεγάλη ειδικότητα διασπά πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. 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.

Μία ακόμη λειτουργία της E6-AP είναι η συμμετοχή της σαν μεταγραφικός συνενεργοποιητής (transcriptional coactivator) των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (Nawaz et al, 1999). Οι δύο αυτές λειτουργίες της E6-AP επιτελούνται από διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης: η μεταγραφική ενεργοποίηση επιτελείται από την N- τελική περιοχή, ενώ η ενεργότητα της λιγάσης της ουμπικουιτίνης εντοπίζεται στην C- τελική περιοχή. Φαίνεται πάντως ότι στην παθογένεια του συνδρόμου Angelman ενέχονται μόνο αλλαγές που επηρεάζουν την ενεργότητα της λιγάσης (Nawaz et al, 1999).

Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν το UBE3A γονίδιο (Ube3a knock-out) έδειξαν ότι αυτά εμφάνισαν κινητικές δυσκολίες, αταξία καθώς και μαθησιακές δυσκολίες και επιληπτικές κρίσεις που σχετίζονται με τα κύτταρα Purkinjia και την περιοχή του ιπόκαμπου αντίστοιχα. Άμεση απόδειξη για τις περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου όπου το UBE3A γονίδιο είναι αποτυπωμένο δεν υπάρχει. Όμως, τα αυξημένα επίπεδα της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης p53 στα

κύτταρα Purkinje και σε κάποιους νευρώνες του ιππόκαμπου στα ΚΟ ποντίκια (Jiang et al, 1998b), όπως επίσης έχει παρατηρηθεί και σε κάποιους ασθενείς με σύνδρομο Angelman, παρέχει έμμεση ένδειξη ότι το UBE3A γονίδιο είναι αποτυπωμένο σε αυτές τις περιοχές και του ανθρώπινου εγκεφάλου.

Πρόσφατα, ένα ακόμα αποτυπωμένο γονίδιο έχει εντοπιστεί στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13 κοντά στο γονίδιο UBE3A. Πρόκειται για το ATP10C το οποίο εκφράζεται από το μητρικό μόνο αλληλόμορφο και κωδικοποιεί μία ATPάση τύπου P. Η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να καταστέλλεται σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman, οι οποίοι φέρουν ελλείψεις στην περιοχή 15q11-q13 ή μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης, γεγονός που υποδεικνύει μία πιθανή συσχέτιση του γονιδίου ATP10C με τις φαινοτυπικές εκδηλώσεις του συνδρόμου (Meguro et al, 2001, Herzing et al, 2001).

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ UBE3A

Περίπου 4-6% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A (Malzac et al, 1998, Fang et al, 1999, Baumer et al, 1999, Russo et al, 2000, Lossie et al, 2000, Rapakko et al, 2004, Tsai et al, 1998). Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί περίπου 40 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A που φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με τον φαινότυπο του συνδρόμου (Πίνακας 2.2). Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις (84%) αφορούν αντικατάσταση βάσης και προκαλούν την δημιουργία κωδικώνιου λήξης στο mRNA, πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, και απουσία της λειτουργικότητας της E6-AP πρωτεΐνης. Από αυτές έχουν βρεθεί 30 μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις-frameshift mutations) και 7 χαρακτηρίζονται ως χωρίς νόημα και συνήθως αφορούν την δημιουργία νέου κωδικού λήξης (nonsense mutation). Ένα ποσοστό 9% αφορά παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations) ενώ 7% των μεταλλάξεων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πρωτεΐνης με διαφορετικό αριθμό αμινοξέων.

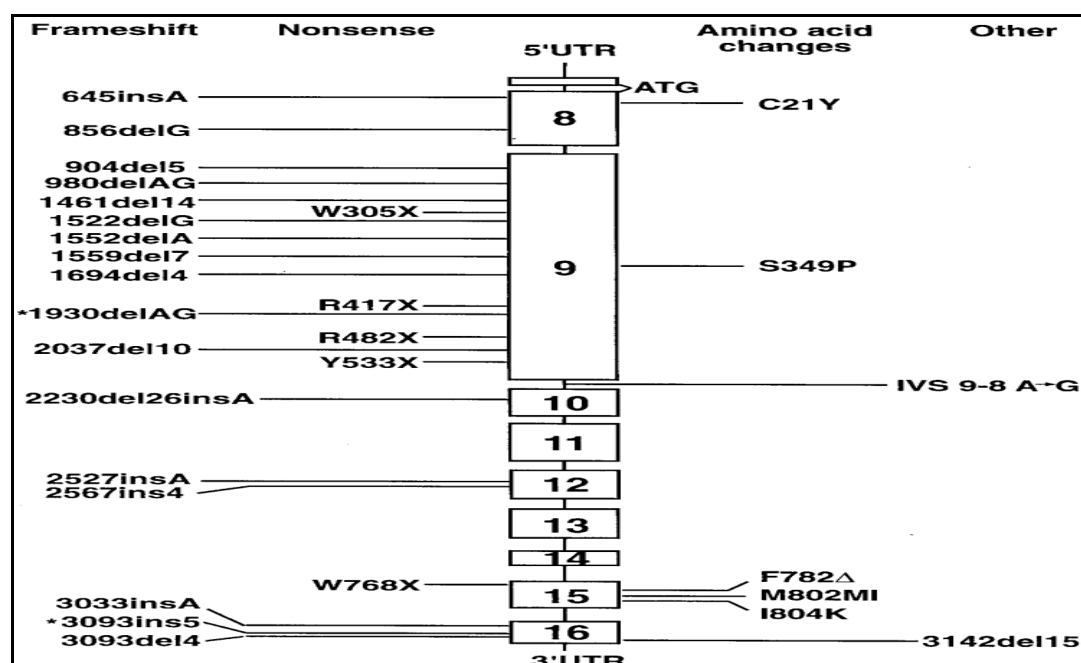
Η απουσία λειτουργικής E6-AP πρωτεΐνης φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινοτύπου του συνδρόμου Angelman. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να επηρεάζουν είτε τα επίπεδα του UBE3A mRNA είτε να προκαλούν την δημιουργία πρωτεϊνικού προϊόντος το οποίο είναι λειτουργικά ανενεργό (Huibregtse et al, 1995). Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, οι περισσότερες από

τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και τις προσθήκες / αφαιρέσεις αμινοξέων, επηρεάζουν την περιοχή *hect* της UBE3A πρωτεΐνης, η οποία φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης (Huang et al, 1999).

Οι πρώτες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο UBE3A σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman αφορούν ένα *de novo* διπλασιασμό 5 νουκλεοτιδίων, μία μετάλλαξη που μεταβιβάζεται από το μητρικό αλληλόμορφο και αφορά θέση ματίσματος εξωνίων (*splice site mutation*) και μία *de novo* αντικατάσταση αμινοξέως (Kishino et al, 1997, Matsuura et al, 1997). Οι τρεις αυτές μεταλλάξεις οδηγούν στην αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής (ORF) και σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης.

Ο μεγαλύτερος αριθμός των μεταλλάξεων εντοπίζεται στο εξώνιο 9 του UBE3A γονιδίου, το οποίο είναι και το μεγαλύτερο εξώνιο του γονιδίου καλύπτοντας περισσότερο από το 50% της συνολικής κωδικής περιοχής (1247bp) (Kishino et al., 1998), (Εικ. 2.8)

Στην επόμενη σελίδα δίνεται ένας λεπτομερής κατάλογος από τις μέχρι σήμερα ταυτοποιημένες μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A, τα εξώνια στα οποία εντοπίζονται, καθώς και η αλλαγή που προκαλούν στην αλληλουχία του γονιδίου (Πίν. 2.2)



Εικόνα 2.8 Δίνονται διαγραμματικά οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στην κωδική περιοχή του γονιδίου UBE3A. Τα εξώνια αναπαρίστανται σε αναλογία με το πραγματικό μέγεθος

Πίνακας 2.2. Σύνολο μεταλλάξεων στο UBE3A γονίδιο που αναφέρονται στην βιβλιογραφία

Εξόνιο	Αλλαγή στην αλληλουχία	Τύπος Μετάλλαξης	Κληρονομικότητα	Βιβλιογραφική Αναφορά
Εξόνιο 8	645 insA	Πλαισιο/ποιητική*	Σποραδική (μητρικό μωσαϊκό)	Malzac et al., 1998
Εξόνιο 8	648G – A	C21Y	Οικογενής**	Fang et al., 1999 Matsura et al., 1997
Εξόνιο 8	856delG	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Fang et al., 1999
Εξόνιο 9	897insA	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Russo et al, 2000
Εξόνιο 9	904delG	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Fang et al, 1999
Εξόνιο 9	980delG	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Fang et al, 1999
Εξόνιο 9	1085G – T	E167X	Σποραδική	Russo et al, 2000
Εξόνιο 9	1461del14	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Malzac et al., 1998
Εξόνιο 9	1500G – A	W305X	Οικογενής	Fang et al., 1999
Εξόνιο 9	1522delG	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Malzac et al., 1998
Εξόνιο 9	1522delA	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξόνιο 9	1558del7	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξόνιο 9	1631T – C	S349P	Οικογενής	Malzac et al., 1998
Εξόνιο 9	1694del4	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Fang et al., 1999
Εξόνιο 9	1835C – T	R417X	Σποραδική	Fang et al., 1999 Matsura et al., 1997
Εξόνιο 9	1930delAG	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999 Matsura et al., 1997 Fung et al., 1998
Εξόνιο 9	2030C – T	R482X	Οικογενής/ Σποραδική	Malzac et al,1998 Russo et al., 2000
Εξόνιο 9	2037del10	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Malzac et al,1998
Εξόνιο 9	2185T – G	Y533X	Οικογενής	Fang et al.,1999
Εξόνιο 9	IVS9-8A-G	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Kishino et al.,1997
Εξόνιο 9	902A – C	Missense	Σποραδική (μητρικό μωσαϊκό)	Rapakko et al., 2004

Εξώνιο 9	975T – C	Missense	Σποραδική	Rapakko et al., 2004
Εξώνιο 9	904del5	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξώνιο 10	2230del26in sA	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Malzac et al,1998
Εξώνιο 12	2527insA	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Malzac et al,1998
Εξώνιο 12	2567insA	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξώνιο 12	2544insA	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Russo et al., 2000
Εξώνιο 15	2929del3	F782Δ	Οικογενής	Fang et al., 1999
Εξώνιο 15	2890G – A	W768X	Οικογενής	Fang et al., 1999 Tsai et al., 1998
Εξώνιο 15	2992ins3	M802MI	Οικογενής	Malzac et al,1998
Εξώνιο 15	2997T – A	I804K	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξώνιο 16	3033insA	Πλαισιο/ποιητική	Οικογενής	Malzac et al,1998
Εξώνιο 16	3086ins5	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Kishino et al.,1997
Εξώνιο 16	3093del4	Πλαισιο/ποιητική	Σποραδική	Fang et al., 1999
Εξώνιο 16	3142del15	Επιμυκησμένη πρωτεΐνη	Σποραδική	Fang et al., 1999

*Πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή (Frameshift mutation)

**Μετάλλαξη η οποία έχει μεταβιβαστεί από την μητέρα

***Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων έχει γίνει σύμφωνα με την αλληλουχία με κωδικό GenBank U84404 (<http://www.ncbi.gov/Web/Genbank>)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ

Η εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην διάγνωση των δύο συνδρόμων, περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο μοριακές μεθόδους, για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Η ανίχνευση ελλειμμάτων, μονογονεϊκής δισωμίας και μεταλλάξεων ή μικρών ελλειμμάτων στην περιοχή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης, μπορεί να εξασφαλιστεί με σχετική ασφάλεια με την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης της SNRPN περιοχής τη 15q11-q13. Η ύπαρξη διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης στα δύο αλληλόμορφα (πατρικό, μητρικό) χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια σαν διαγνωστική μέθοδος για τα σύνδρομα Prader Willi και Angelman. Ποσοστό μεγαλύτερο από 99% των περιπτώσεων συνδρόμου PW μπορούν να διαγνωστούν με

την μέθοδο της χημικής τροποποίησης του DNA και του MSPCR (Methylation Specific PCR). Στις περιπτώσεις συνδρόμου Angelman ποσοστό περίπου 80% μπορεί να διαγνωστεί με την μέθοδο του MSPCR. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να αποκαλύψει τον ακριβή μηχανισμό παθογένεσης των συνδρόμων, ενώ για την περίπτωση του συνδρόμου Angelman ένα σημαντικό ποσοστό ($\approx 20\%$) δεν αποκαλύπτεται με την μέθοδο αυτή. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούν την ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο UBE3A (4-6%), ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που παραμένουν αδιάγνωστες.

Για τον εντοπισμό ελλειμμάτων και μονογονεϊκής δισωμίας πραγματοποιείται ανάλυση πληροφοριακών δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών δεικτών του χρωμοσώματος 15 στους γονείς και στο παιδί, προκειμένου να εξακριβωθεί το πρότυπο κληρονόμησης των πολυμορφικών θέσεων. Η μέθοδος αυτή (DNRP) απαιτεί την ύπαρξη πληροφοριακής οικογένειας 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 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).

Η χρήση κυτταρογενετικών μεθόδων μπορεί να αποκαλύψει την ύπαρξη σπάνιων χρωμοσωμικών ανακατάξεων.

Πίνακας2.3α.Συσχέτιση μοριακών μηχανισμών PWS με αποτελέσματα διαγνωστικών μεθόδων

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	MSPCR	DNRP	FISH
Έλλειψη στην 15q11-q13 του πατρικού αλληλομόρφου	70%	Μη φυσιολογικό	Έλλειμμα ή NI	Έλλειμμα
Μητρική UPD15	25- 30%	Μη φυσιολογικό	2μητρικά αλληλόμορφα ή NI	N
Μετάλλαξη στο κέντρο αποτύπωσης (χωρίς έλλειμμα)	1- 2%	Μη φυσιολογικό	N ή NI	N
Μετάλλαξη στο κέντρο αποτύπωσης (με έλλειμμα)	1- 2%	Μη φυσιολογικό	N ή NI ή έλλειμμα	N ή Έλλειμμα
Ισοζυγισμένη μετάθεση στην 15q11-q13	< 1%	?	N ή NI	N

Πίνακας2.3β Συσχέτιση μοριακών μηχανισμών AS με αποτελέσματα διαγνωστικών μεθόδων

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ	DNRP	FISH
Έλλειψη στην 15q11-q13 του μητρικού αλληλομόρφου	65- 70%	Μη φυσιολογικό	Έλλειμμα ή NI	Έλλειμμα
Πατρική UPD15	3- 5%	Μη φυσιολογικό	2μητρικά αλληλόμορφα ή NI	N
Μετάλλαξη στο κέντρο αποτύπωσης (χωρίς έλλειμμα)	3- 5%	Μη φυσιολογικό	N ή NI	N
Μετάλλαξη στο κέντρο αποτύπωσης (με έλλειμμα)	3- 5%	Μη φυσιολογικό	N ή NI ή έλλειμμα	N ή Έλλειμμα
Μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A	4 – 6%*	Φυσιολογικό	N ή NI	N
Άγνωστος	10-14%	Φυσιολογικό	N ή NI	N

* Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί στο 20% του συνόλου των ασθενών με πιθανό σύνδρομο Angelman, αλλά χωρίς μοριακά ευρήματα που να αφορούν ελλείμματα, μονογονεϊκή δισωμία ή αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης. N: normal (φυσιολογικό) / NI: non informative (μη πληροφοριακό)

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του προτύπου μεθυσίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 σε ασθενείς με σύνδρομο Prader Willi και Angelman και η εφαρμογή αυτής στην μοριακή διάγνωση των δύο συνδρόμων. Η μελέτη του προτύπου μεθυσίωσης της αποτυπωμένης περιοχής 15q11-q13 παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ρύθμιση της γονιδιακής αποτύπωσης και τον ρόλο της μεθυσίωσης σε αυτήν.

Επιπλέον, σε ασθενείς με κλινική διάγνωση συνδρόμου Angelman, χωρίς ελλείμματα, μονογονεϊκή δισωμία, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή βλάβες στο πρότυπο μεθυσίωσης της περιοχής 15q11-q13, θα ακολουθήσει ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων στο UBE3A γονίδιο και θα μελετηθεί η πιθανή συσχέτιση των μεταλλάξεων με τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου.

Η ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτούς τους ασθενείς, εκτός του ότι παρέχει μοριακή διάγνωση, μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τον ακριβή μοριακό μηχανισμό του συνδρόμου Angelman.

4.ΥΛΙΚΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι ασθενείς που επιλέγησαν για την μελέτη, έχουν διαγνωσθεί, από κλινικούς ιατρούς (παιδιάτρους και νευρολόγους) και κλινικούς γενετιστές, με σύνδρομο Prader Willi και Angelman, και προσήλθαν στο εργαστήριο για μοριακή επιβεβαίωση της κλινικής εικόνας. Το υλικό αφορά σποραδικές περιπτώσεις και αποτελείται από 81 συνολικά ασθενείς ηλικίας από 18 ημερών μέχρι 16 ετών. 31 ασθενείς παραπέμφθηκαν για σύνδρομο PWS με κύρια χαρακτηριστικά την γενικευμένη υποτονία και παχυσαρκία και 50 για σύνδρομο AS με βαρύτατη ψυχοκινητική καθυστέρηση.

Επιλέγησαν ασθενείς, στους οποίους η μοριακή μελέτη με ανάλυση δινοκλεοτιδικών επαναλήψεων (DNRPs) δεν ήταν δυνατόν να δώσει αποτελέσματα (μη πληροφοριακές οικογένειες, μη διαθεσιμότητα κατάλληλου βιολογικού υλικού), προκειμένου να εφαρμοστεί η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης για την ολοκληρωμένη μοριακή ανάλυση των συνδρόμων.

Από τους 50 ασθενείς με κλινική υποψία AS επιλέχθηκαν 20 στους οποίους είχε αποκλειστεί η περίπτωση ελλείματος, μονογονεϊκής δισωμίας και χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (με συνδυασμό DNRPs, FISH και methylation analysis). Στα άτομα αυτά έγινε ανάλυση για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε 4 εξόνια (9, 12, 15 και 16) του UBE3A γονιδίου. Η επιλογή των 20 αυτών ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη έγινε με βάση αποτελέσματα μελετών συσχέτισης φαινοτύπου – γονοτύπου, για ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A. Η επιλογή των εξονίων έγινε με βάση την συχνότητα των μεταλλάξεων που ανιχνεύεται σε κάθε ένα από αυτά, σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα.

5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η απομόνωση DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος έγινε με δύο διαφορετικές μεθόδους: την μέθοδο εξαλάτωσης “salting out” (Miller et al, 1985) και τη μέθοδο που ακολουθεί το πρωτόκολλο QIAmp DNA Blood Mini Kit της εταιρείας Qiagen.

Απομόνωση DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος:

Η απομόνωση γίνεται από περιφερικό αίμα (10-20 ml) που συλλέγεται σε αντιπηκτικό {(4.5%EDTA,0.7%NaCl) 2mg/ml αίματος} και διατηρείται σε θερμοκρασία 4 °C έως -80°C. Η διαδικασία ακολουθεί τη μέθοδο εκχυλίσεως με άλας («salting out»), ολοκληρώνεται σε δύο μέρες και περιλαμβάνει τρία συνολικά στάδια: λύση ερυθρών, λύση λευκών αιμοσφαιρίων και κατακρήμνιση και συλλογή του DNA.

1. Η λύση των ερυθροκυττάρων αρχίζει με την κατάψυξη και απόψυξη του περιφερικού αίματος και ολοκληρώνεται μετά από παραμονή των κυττάρων σε υπότονο διάλυμα «Lysis I» (NH₄Cl 155mM, KHCO₃ 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4) σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C με στόχο την απομόνωση των λευκών αιμοσφαιρίων που συγκρατούνται στο ίζημα. Ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα « Lysis I», διαδικασία που επαναλαμβάνεται δύο φορές.
2. Μετά τη τρίτη φυγοκέντρηση ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος σε 12ml διαλύματος «Lysis II» (Tris/HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM, pH 8,2) και προσθήκη 400μl διαλύματος 20%SDS (Dodecylsulphate Sodium Salt) και 2mg/140μl πρωτεΐνης K. Το μείγμα υπόκειται σε ισχυρή ανάδευση και παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 16- 24 ώρες και 55°C για 1 ώρα (επωαστήρας ανακίνησης υπό θερμοκρασία, Orbital Shaker ή υδατόλουτρο εξοπλισμένο με σύστημα ανακίνησης). Κατά το στάδιο αυτό επιτυγχάνεται λύση της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης των λευκών

κυττάρων και αποδέσμευση των μορίων DNA απο τις ενδοπυρηνικές πρωτεΐνες.

3. Ακολουθεί προσθήκη 4ml κορεσμένου διαλύματος NaCl 6M και ισχυρή ανάδευση με στόχο την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και των υπολειμμάτων των μεμβρανών που απομακρύνονται υπό τη μορφή ιζήματος μετά απο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 5000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Σε αυτή τη φάση το DNA βρίσκεται στην υπερκείμενη παχύρρευστη στιβάδα σε μορφή διαλύματος. Η απομόνωση του DNA επιτυγχάνεται όταν, μετά απο προσθήκη διαλύματος απόλυτης αιθανόλης τα μόρια του DNA εμφανίζονται με τη μορφή λεπτού νήματος που συλλέγεται με τη βοήθεια λεπτού γυάλινου στηλεού. Τέλος το DNA αναδιαλύεται σε δισαπεσταγμένο νερό, διατηρείται στους 4 °C και αποθηκεύεται στους -20 °C.

5.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία ενζυμική μέθοδος που επιτρέπει τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (ή αλληλουχιών DNA) ανάμεσα από έναν ετερογενή πληθυσμό αλληλουχιών DNA (π. χ. ολικό γενωμικό DNA ή πληθυσμό cDNA), χωρίς την μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Μέσω αυτής δίνεται η δυνατότητα γρήγορης ανάλυσης ειδικών περιοχών DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Με την αντίδραση PCR παράγονται πολλαπλά αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (μεγέθους από 50 ως 2000 ζεύγη βάσεων), σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή της μεθόδου, η οποία αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1987 από τον K. Mullis και τους συνεργάτες του, βασίζεται στην χρησιμοποίηση ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq polymerase). Το ένζυμο απομονώνεται από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτικό μέχρι και την θερμοκρασία 94⁰C, με καλύτερη απόδοση σε θερμοκρασία

80⁰C. Οι DNA πολυμεράσες συνθέτουν συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA. Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, που παίζουν τον ρόλο εκκινητών (primers). Οι εκκινητές 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 εκκινητή. Έτσι, το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί οριοθετείται από τους δύο εκκινητές.

Με την παρουσία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, των εκκινητών, του υποστρώματος και των κατάλληλων δεσοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε ιδανικές συνθήκες που παρέχει κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου αρχίζει η σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια τα οποία - μετά την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA- επαναλαμβάνονται για 20-30 κύκλους:

1. Αποδιάταξη του υποστρώματος DNA (template denaturation)

Αρχικά το DNA αποδιάσσεται σε μονές αλυσίδες με θέρμανση στους 93-97⁰C για 30 –90 sec

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

Κατά το δεύτερο στάδιο οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες (για τις οποίες έχουν συντεθεί). Ο υβριδισμός των εκκινητών με το υπόστρωμα πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 50- 70⁰C για 30 sec- 3 λεπτά. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι καθοριστική για την επιτυχία της αντίδρασης και καθορίζεται αποκλειστικά από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των εκκινητών (2⁰C για κάθε θυμίνη – T- και αδερίνη – A , 4⁰C για κάθε γουανίνη – G – και κυτοσίνη – C).

3. Επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών (primer extension)

Στο τρίτο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών. Η σύνθεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 70 - 75°C για 30sec- 3 λεπτά.

Στο τέλος κάθε κύκλου οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες DNA αποτελούν εκ νέου υπόστρωμα για τη σύνθεση DNA (αλυσιδωτή αντίδραση). Σε κάθε αντίδραση PCR έχουμε εκθετική αύξηση του αρχικού υποστρώματος μέχρι και 2^{20} φορές μετά από 20 κύκλους.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Ο σωστός 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 υπ όψιν κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, περιλαμβάνουν τα εξής:

- Μήκος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων: 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: Γενικά 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% 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 (annealing temperature) υβριδισμού των εκκινητών σύμφωνα με την σχέση

Tm-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).

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR 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, το οποίο αποτελείται 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*, καθώς και *Pterocladia* (N. Ζηλανδία). 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 αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ηλεκτροφορούνται στο πήκτωμα μαζί με ειδική χρωστική (Loading dye) και κατά τον διαχωρισμό βάνονται με βρωμιούχο αιθίδιο, 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 με μεγέθους)

5. ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ

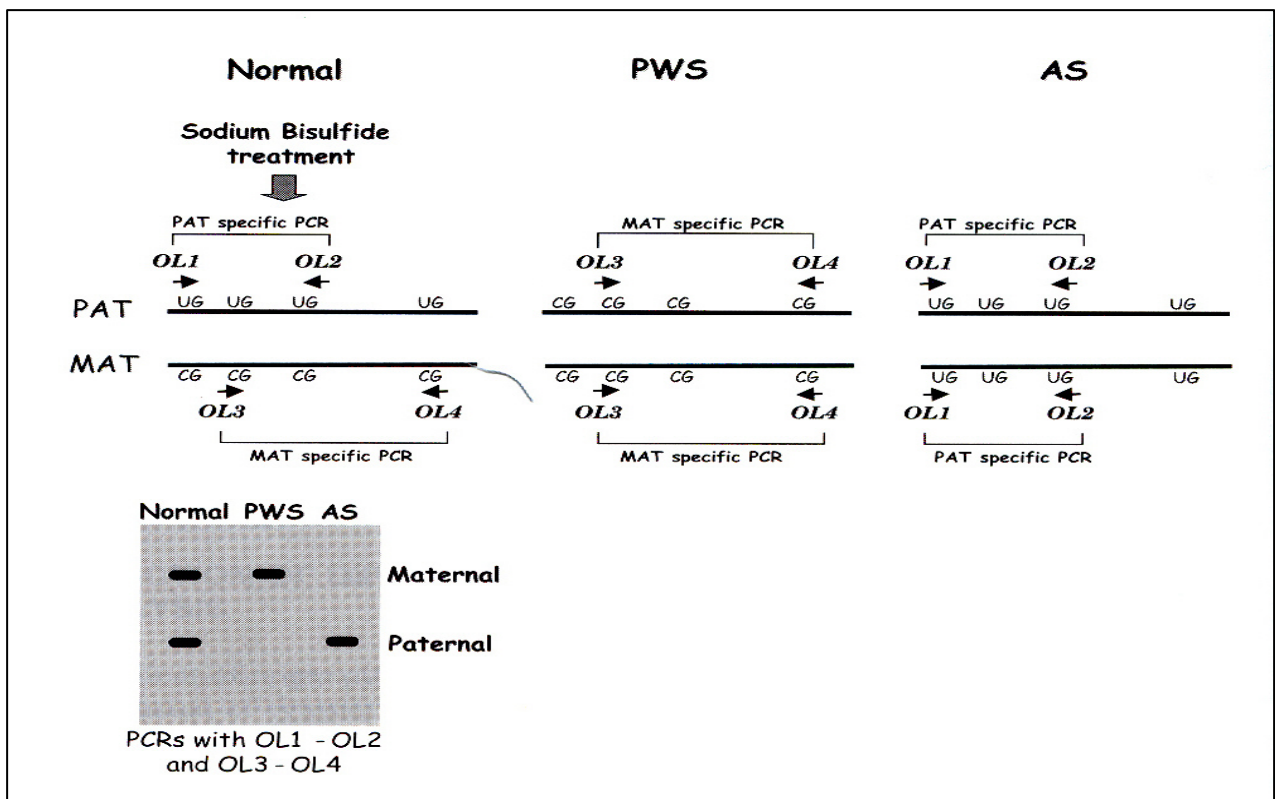
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα, η μεθυλίωση (προσθήκη μεθυλομάδας στο 5' άκρο καταλοίπων κυτοσίνης) γίνεται σε περιοχές φτωχές σε CG (CG- poor regions). Περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε κατάλοιπα CG (γνωστά ως CpG islands- CpG νησίδες), παραμένουν αμεθυλιώτα. Εντούτοις, έντονη μεθυλίωση παρατηρείται στις CpG νησίδες που βρίσκονται κοντά σε ρυθμιστικές περιοχές αποτυπωμένων γονιδίων (imprinted genes), και η οποία σχετίζεται με μεταγραφική απενεργοποίηση των ρυθμιστικών αυτών περιοχών. Παράδειγμα γονιδίων που υπόκεινται στη ρύθμιση τέτοιων περιοχών είναι τα γονίδια που σχετίζονται με τα σύνδρομα Prader Willi και Angelman .

Η μέθοδος στηρίζεται στην χημική μετατροπή όλων των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA σε ουρακίλες, μετά από την επίδραση με δισουλφίδιο του νατρίου (Bisulfite treatment). Οι 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 κυτοσίνης θα υπάρχει 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 (υποψήφιο γονίδιο για το σύνδρομο Prader Willi) είναι διαφορετικά μεθυλιωμένη: 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. Με βάση αυτή την παρατήρηση, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών (primers) για την μεθυλιωμένη και τη μη μεθυλιωμένη μορφή της CpG νησίδας του SNRPN γονιδίου. Συγκεκριμένα, 1 ζεύγος εκκινητών (primers) (OL1 , OL2) είναι σχεδιασμένο για το μεθυλιωμένο DNA, το οποίο δεν τροποποιείται μετά από την επίδραση με δισουλφίδιο του νατρίου, και το προϊόν PCR προκύπτει από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο (περιέχει κυτοσίνες). Ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών (primers) (OL3, OL4) είναι σχεδιασμένο για το μη μεθυλιωμένο

DNA, το οποίο τροποποιείται μετά από την χημική επεξεργασία, και το προϊόν PCR προκύπτει από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο (περιέχει κυτοσίνες και ουρακίλες). Τα δύο παραπάνω ζεύγη εκκινήτων είναι κατά τέτοιο τρόπο σχεδιασμένα ώστε να δίνουν σε κάθε περίπτωση προϊόντα διαφορετικού μεγέθους ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους: το προϊόν PCR που προέρχεται από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο έχει μέγεθος 174 βάσεις, και το αντίστοιχο που προέρχεται από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο 100 βάσεις.

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι 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 (Σχ.5.1)

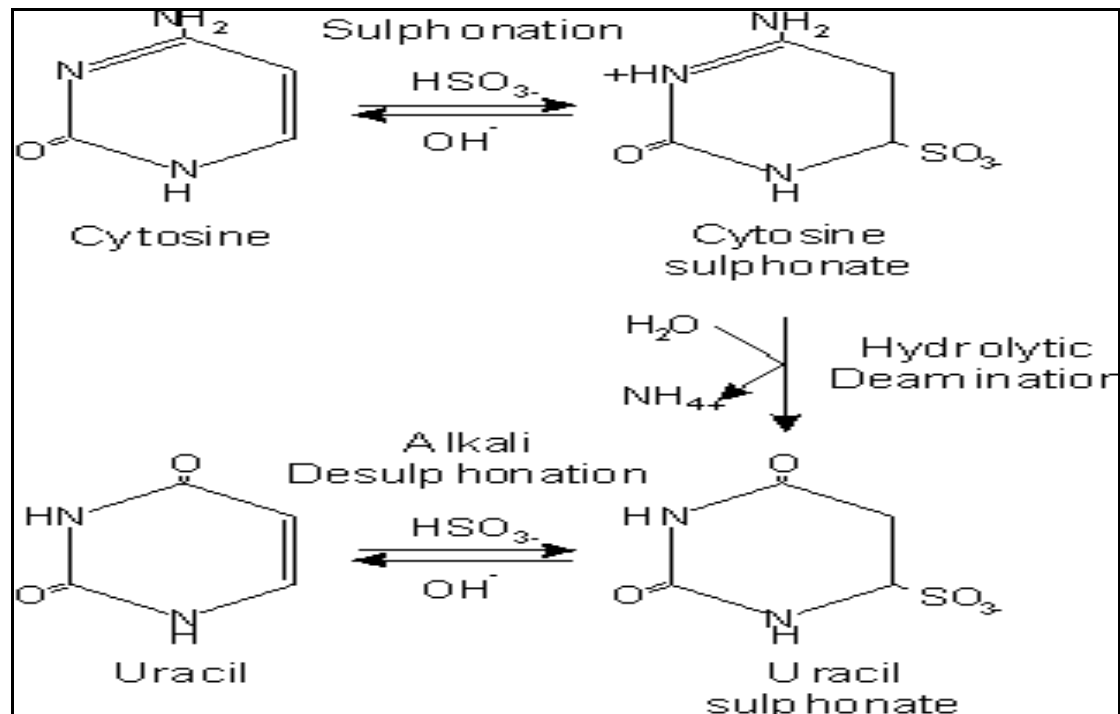


Σχήμα 5.1 Αρχή της μεθόδου MSPCR (λεπτομέρειες στο κείμενο)

ΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΗΣ ΜΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΗΣ ΚΥΤΟΣΙΝΗΣ ΣΕ ΟΥΡΑΚΙΛΗ

Οι βάσεις αρχικά υποβάλλονται σε αποδιατακτικές συνθήκες (ήπια θέρμανση και αλκαλικό pH) και το δίκλωνο μόριο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Το DNA Modification Reagent I (βλέπε παρακάτω) , περιέχοντας διθειφίδιο του Na, προκαλεί την ενσωμάτωση της ρίζας SO_3^- στις μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες, ακολουθεί υδρολυτική απαμίνωση και παραγωγή ενός ενδιάμεσου καταλοίπου ουρακίλης (Uracil sulphonate) (Εικόνα 5.1).

Το DNA στην συνέχεια προσδένεται σε μικρο- μοριακούς φορείς (DNA Modification Reagent III), με την παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης άλατος (DNA Modification Reagent II). Απομάκρυνση του άλατος επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις και επαναδιαλύσεις σε 70% αιθανόλη. Η τελική μετατροπή σε ουρακίλη επιτυγχάνεται με απομάκρυνση της ρίζας SO_3^- σε αλκαλικό pH. Το τροποποιημένο DNA διηθείται και συλλέγεται σε διάλυμα TE (10mM Tris/ 0.1mM EDTA, pH 7)



Εικόνα 5.1 . Χημική μετατροπή θυμίνης (T) σε ουρακίλη (U)

Η διαδικασία της χημικής τροποποίησης πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο CpGenome™ Kit (DNA Modification Kit, της Q-Biogene), και το οποίο περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

ΗΜΕΡΑ ΠΡΩΤΗ:

Επειδή η επιτυχία της τροποποίησης εξαρτάται απόλυτα από τη συγκέντρωση του DNA για κάθε δείγμα το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης μετά από φωτομέτρηση.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ DNA

Η ποσότητα και η καθαρότητα κάθε 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 μg/ ml δίκλωνου DNA).

Η αραίωση που γίνεται συνήθως για τον φωτομετρικό προσδιορισμό του δείγματος είναι 1:100 (10μl DNA : 990μl ddH₂O).

Η καθαρότητα του δείγματος ελέγχεται από τον λόγο OD_{260nm} / OD_{280nm} (RATIO). Δείγματα με τιμή RATIO μεταξύ 1,8 και 2,0 θεωρούνται καθαρά, δηλαδή απαλλαγμένα από πρωτεΐνες, αμινοξέα και οργανικούς διαλύτες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA

1. Μέσα σε eppendorfs του 1.5ml, τοποθετούνται: 7μl 3M NaOH σε 1.0μg DNA (που πρόκειται να τροποποιηθεί) στα 100μl ddH₂O. Η συγκέντρωση του DNA που προστίθεται πρέπει να υπολογιστεί με ακρίβεια και να είναι ίση με 10ng / μl.
2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση (vortex) και το δείγμα επωάζεται στους 37⁰C (επωαστικός κλίβανος ή υδατόλουτρο) για 10λεπτά.
3. Μετά το τέλος της επώασης, προστίθενται 550μl διαλύματος DNA Modification Reagent I σε κάθε δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση (vortex).
4. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία 50⁰C (υδατόλουτρο) για 16- 20 ώρες.

ΗΜΕΡΑ ΔΕΥΤΕΡΗ: ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

1. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 5μl διαλύματος DNA Modification Reagent III (το οποίο έχει πορώδη υφή και περισυλλέγει το διαλυμένο DNA) και 750μl διαλύματος DNA Modification Reagent II. Ακολουθεί ήπιο ανακάτεμα (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C) για 5- 10 λεπτά.
2. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 80000rpm για 20 sec προκειμένου να καθιζάνει το DNA Modification Reagent III μαζί με το DNA.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1ml 70% αιθανόλη, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα από τα διαλύματα.
4. Το σχηματισθέν ίζημα αναδιαλύεται (vortex), ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 80000rpm για 20 sec και το υπερκείμενο απομακρύνεται.
5. Το στάδιο 4 επαναλαμβάνεται 3 φορές, ενώ στην τρίτη φορά τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 13.000rpm για 3λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται με πιπέτα.
6. Ακολουθεί προσθήκη 50μl 20mM NaOH/ 90% αιθανόλη (για 1ml: 900μl απόλυτης αιθανόλης, 93.4μl ddH₂O, 6.6μl 3M NaOH) στο κάθε δείγμα, ανάδευση για επαναδιάλυση του ιζήματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C) για 5 λεπτά.

7. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 80000rpm για 20 sec, προστίθεται 1ml 90% αιθανόλη, επαναδιάλυση του ιζήματος (vortex) και επανάληψη του σταδίου 7 για 2 φορές. Την δεύτερη φορά τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται με πιπέτα.
8. Τα δείγματα αφήνονται για 15 περίπου λεπτά στον πάγκο έως ότου εξατμιστεί η αιθανόλη.
9. Ακολουθεί προσθήκη 35μl TE (10mM Tris/ 0.1mM EDTA, pH 7.5) σε κάθε δείγμα και ήπια ανάδευση (vortex).
10. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 55⁰C (υδατόλουτρο).
11. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 3 λεπτά και τέλος μεταφορά του υπερκειμένου (χημικά τροποποιημένο DNA) σε καθαρό αποστειρωμένο eppendorf.
12. Τα δείγματα του χημικά τροποποιημένου DNA μπορούν να φυλαχθούν για 2 μήνες στους -15 έως -25⁰C. Η χημική τροποποίηση του DNA είναι πολύ ευαίσθητη διαδικασία και είναι καλό τα δείγματα να χρησιμοποιούνται άμεσα στην επόμενη φάση της πειραματικής διαδικασίας (Methylation Specific PCR ή ανάλυση της αλληλουχίας του DNA- sequencing).

METHYLATION SPECIFIC PCR – MSP

Τα προϊόντα της χημικής τροποποίησης χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα σε PCR αντίδραση με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές, οι οποίοι ανιχνεύουν το μεθυλιωμένο (άρα και το τροποποιημένο) DNA που προκύπτει από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο καθώς και το μη μεθυλιωμένο (άρα και τροποποιημένο) DNA που προκύπτει από το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται στον Πίνακα 5.1, ενώ στον Πίνακα 5.2 δίνονται οι συνθήκες της PCR αντίδρασης.

Οι αναλογίες των συστατικών της αντίδρασης PCR είναι δίνονται στον Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.1. Αλληλουχίες εκκινητών του εξωνίου 1 του SNRPN γονιδίου

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	(°C) annealing	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
Μητρικοί SNRPNMFor SNRPNMRev	5'- TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTC - 3' 5'- AACCTTACCCGCTCCATCGCG -3'	62	174
Πατρικοί SNRPNPFor SNRPNPRev	5-GTGAGTTTGGTGTAGAGTGGAGTGGTTGTTG-3' 5'- ACATCAAACATCTCCAACAACCA- 3'	62	100

Πίνακας 5.2 Συνθήκες αντίδρασης MSPCR

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ
Αρχική αποδιάταξη	95	10 λεπτά
Αποδιάταξη	94	30δευτέρα
Υβριδισμός εκκινητών	62	30δευτέρα
Επιμήκυνση – Σύνθεση DNA	72	30δευτέρα
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά
Συνολικοί κύκλοι : 35		

Πίνακας 5.3 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων MSPCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
HotStarTaqMasterMix	2.5 units HotStarTag DNA πολυμεράση* 1.5mM MgCl ₂ 200mM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
MgCl ₂	1.5mM
Μητρικοί εκκινητές**	0.72mM
Πατρικοί εκκινητές	0.5mM

*Το ένζυμο HotStarTag DNA πολυμεράση παρέχεται σε μία ανενεργή μορφή, χωρίς ενεργότητα πολυμεράσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτό εμποδίζει τον σχηματισμό διμερών μεταξύ των εκκινητών σε χαμηλές θερμοκρασίες (primer dimmer formation). Το

ένζυμο HotStarTag DNA πολυμεράση ενεργοποιείται μετά από επώαση στους 95°C για 15 λεπτά (Αρχική αποδιάταξη αντιδράσεων PCR- Πίνακας 5.2) **Αναλογία μητρικοί: πατρικοί εκκινητές 2:1

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

DNA Modification Reagent I

Για κάθε δείγμα που πρόκειται να τροποποιηθεί διαλύονται 227mg από το DNA Modification Reagent I (σκόνη) σε 571 μl ddH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 5.0 με την προσθήκη μικρής ποσότητας 3M NaOH. Ακολουθεί ανάδευση ενώ προσοχή απαιτείται με το διάλυμα δεδομένου ότι είναι τοξικό στο δέρμα και στο αναπνευστικό σύστημα.

DNA Modification Reagent II

Για κάθε δείγμα που πρόκειται να τροποποιηθεί διαλύονται 1.35g από το DNA Modification Reagent II (σκόνη) σε 750μl διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης (1μl β-μερκαπτοαιθανόλη σε 20ml ddH₂O). Ακολουθεί ανάδευση ενώ προσοχή απαιτείται με το διάλυμα δεδομένου ότι η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι τοξική στο δέρμα και στο αναπνευστικό σύστημα.

Όλα τα διαλύματα που αναφέρονται στο πρωτόκολλο της χημικής τροποποίησης παρασκευάζονται την ίδια μέρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.

5.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 15 ΚΑΙ 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 τη χρήση των κατάλληλων πολυμορφικών θέσεων στο DNA. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πολυμορφικών θέσεων στο DNA, όπως πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single nucleotide polymorphisms- SNPs) , επαναλήψεις μεγάλου μήκους (Variable Nucleotide Tandem Repeats- VNTRs), κ.ά. Για την μελέτη της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13 χρησιμοποιούνται πολυμορφισμοί μικρών επαναλήψεων (μικροδορυφόροι) (Short Sequence Repeats –

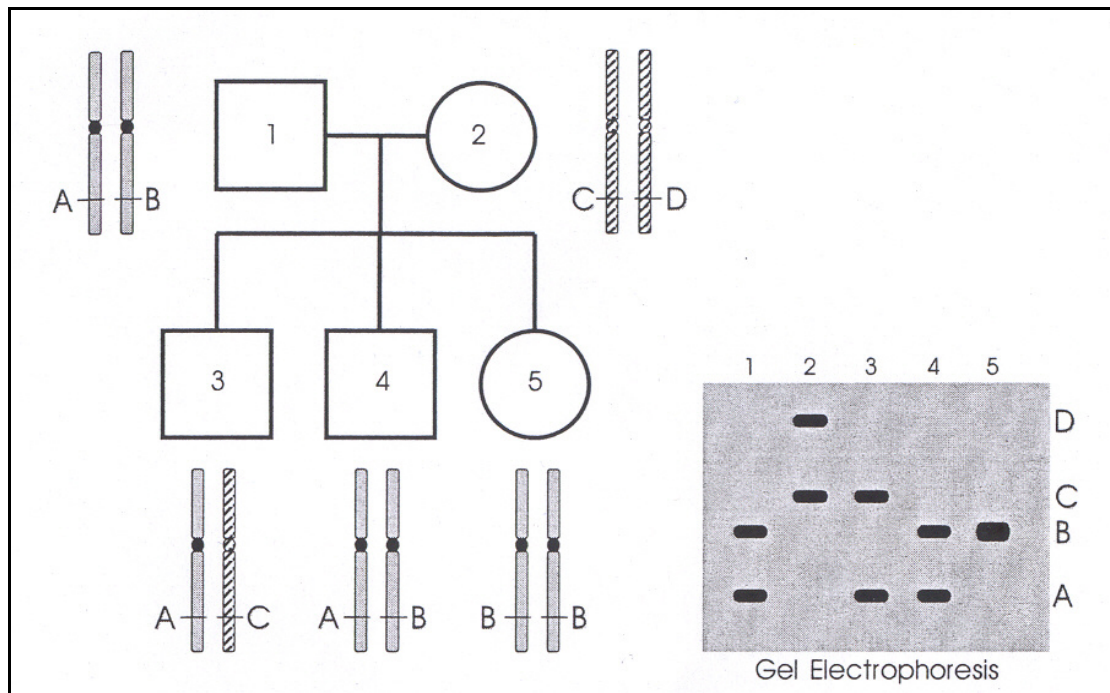
SSRs). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται διουκλεοτιδικές πολυμορφικές επαναλήψεις της μορφής (CA) n . Το κύριο πλεονέκτημα των SSRs είναι ότι συνήθως υπάρχουν περισσότερα από δύο αλληλόμορφα για κάθε θέση, γεγονός που καθιστά τις θέσεις αυτές πληροφοριακές και κατάλληλες για ανίχνευση μονογονεϊκής δισωμίας και χρωμοσωμικών ελλείψεων. Η συχνότητα των SSRs υπολογίζεται περίπου 1 πολυμορφική SSR θέση καθε 10 – 50 Kb ανθρώπινου γενωμικού DNA.

Είναι απαραίτητο να υπάρξει γενετικό υλικό από το παιδί και από τους δύο βιολογικούς γονείς προκειμένου να είναι δυνατή η ανίχνευση μονογονεϊκής δισωμίας και χρωμοσωμικών ελλειμάτων. Επιπλέον, οι πολυμορφικές θέσεις για κάθε οικογένεια που μελετάται πρέπει να είναι πληροφοριακές. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχουν τόσα διαφορετικά αλληλόμορφα στους γονείς που να επιτρέπουν την ανίχνευση της απουσίας της γονική συνεισφοράς.

A. ANIXNEYΣH MONOGONEIKHΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ

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 5.2 .

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 από τον πατέρα και απο την μητέρα αντίστοιχα.



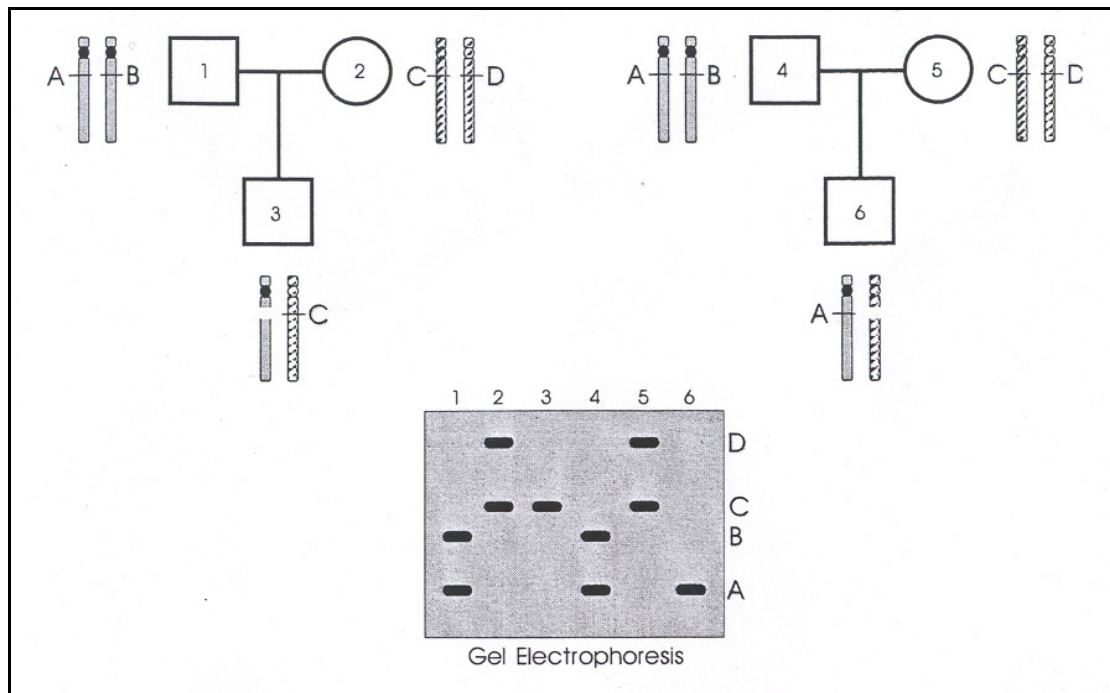
Εικόνα 5.2. Διαγραμματική απεικόνιση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας με την ανάλυση πολυμορφικών θέσεων (λεπτομέρειες στο κείμενο) (Από Engel E. and Antonarakis SE) (Από Engel E and Antonarakis SE)

B. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 15q11-q13

Για την ανίχνευση ελλειμμάτων στην περιοχή 15q11-q13 χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμορφικοί δείκτες D15S10, D15S11, D15S13, D15S97 και GABRb3, οι οποίοι βρίσκονται εντός της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Η αρχή της μεθόδου δίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 5.3 .

Στην περίπτωση ελλείματος πατρικής προέλευσης ,στο DNA του παιδιού δεν εντοπίζεται προϊόν πατρικής προέλευσης, ενώ αντίστοιχα έλλειμμα μητρικής προέλευσης εντοπίζεται από την απουσία μητρικού προϊόντος στο DNA του παιδιού.

Όπως και στην περίπτωση της ανίχνευσης μονογονεϊκής δισωμίας, είναι απαραίτητο τα μέλη της οικογένειας που μελετώνται (παιδί – γονείς), να είναι πληροφοριακά στις γενετικές θέσεις που εξετάζονται. Επιπλέον, στην περίπτωση ανίχνευσης πατρικής προέλευσης ελλείματος, πρέπει να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μη πατρότητας, εξετάζοντας και άλλες πολυμορφικές θέσεις στο γονιδίωμα. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε η πολυμορφική θέση D15S543 στο χρωμόσωμα 22.



Εικόνα 5.3 . Διαγραμματική απεικόνιση ανίχνευσης χρωμοσωμικού ελλείμματος με την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών (λεπτομέρειες στο κείμενο) (Από Engel E. and Antonarakis SE) (Από Engel E and Antonarakis SE).

Η ανίχνευση πολυμορφικών αλληλομόρφων στις περιοχές που αναφέραμε, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, με την χρήση του αυτόματου αναλυτή Long- Read Tower™ System της Visible Genetics.

Οι αλληλυχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πολυμορφικό δείκτη, τα χαρακτηριστικά αυτών, καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων PCR, δίνονται στον Πίνακα 5.4 .

Οι θέσεις των πολυμορφικών δεικτών κατά μήκος της 15q11-q13 φαίνονται στην Εικόνα 1.4.

Πίνακας 5.4 . Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντιδράσεων PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
HotStarTaqMasterMix	2.5 units HotStarTag DNA πολυμεράση 1.5mM MgCl ₂ 200mM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
MgCl ₂	2.5 – 3.5 mM*
Εκκινητές	0.5Mm

*Βλέπε Πίνακα

Πίνακας 5.5 . Αλληλουχίες και ειδικές συνθήκες των εκκινητών για την ενίσχυση των πολυμορφικών θέσεων

Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητή	Θερμοκασία Annealing (⁰ C)	MgCl ₂ (mM)
D15S543	5'- GCTGTGTTCACTTTCCAGAG- 3' 3'- GTCGTGATCTGTTTCAACAGAG- 5'	56	2.5
D15S11	5'-GACATAGACCACAAAGAAACCTTAGAC-3' 3'- GTGGTACTGAGGCAAGAAATTGGTGACTG- 5'	55	2.5
D15S10	5'- GTAACACTATGAATTGTTAGTG- 3' 3'- GACAGCTGAACGTAGTTAAAG- 5'	52	3.5
D15S113	5'- CATGTACTGTTTTATCCCTGTGGC-3'	55	2.5
Gabrb3	5'- GTTGGTGACACCAGGAATTCAGC- 3' 3'- GTACAGCCAGTAAACTAAGTTG- 5'	55	2.5
D15S97	5'- CTTCTAGCCTCAGGTTCCCC- 3' 3'- ATTCACTTTTCAAACCACCCC- 5'	60	2.5
CYP19	5'- GCAGGTTACTTAGTTAGCTAC- 3' 3'- TTACAGTGAGCCAAGGTCGT- 5'	58	2.5
D15S87	5'- GATAAATGCCAAACATGTTGT- 3' 3'- TGCTCTCAGGATTTCTCCA- 5'	55	3.5

5.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA – DNA SEQUENCING

Η μέθοδος επιτρέπει την ακριβή ανάλυση και αναγνώριση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του DNA. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων ενός γονιδίου ή τμήματος ενός γονιδίου και η ανίχνευση αλλαγών σε αυτή, ακόμη και αλλαγή μίας βάσης στην αλληλουχία του DNA. Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA στηρίζεται στην ενζυμική μέθοδο του 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 νουκλεοτίδια dNTPs αλλά και με καθορισμένη ποσότητα από τα διδεόξυ ανάλογά τους ddNTPs (τριφωσφορικά 2', 3'-διδεόξυνουκλεοτίδια). Τα

τελευταία διαφέρουν από τα δεόξυ- νουκλεοτίδια 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 νουκλεοτίδιο (το 5' άτομο άνθρακα του ddNTP ενώνεται με το 3' άτομο άνθρακα του προηγούμενου νουκλεοτιδίου). Όμως, κανένα ddNTP δεν μπορεί να συμμετάσχει σε φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 3' άτομο άνθρακα, δεδομένου ότι στερούνται την 3' υδροξυλομάδα. Αποτέλεσμα, λοιπόν, της δομής των ddNTPs είναι ότι, όταν ενσωματώνονται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, δρουν ως σημεία 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 (υπόστρωμα), ένα ειδικό ένζυμο (DNA πολυμεράση), και ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο εκκινητής (primer), που είναι συμπληρωματικό μιας μικρής περιοχής του υποστρώματος DNA. 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 μεν 5' άκρο καθορίζεται από τον εκκινητή ενώ το 3' άκρο στο οποίο τερματίζεται η σύνθεση της αλυσίδας διαφέρει γιατί η συγκέντρωση του ddNTP αναλόγου είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των dNTPs, και η ενσωμάτωση του ddNTP γίνεται κάθε φορά τυχαία στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα.

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA γίνεται με αυτοματοποιημένο τρόπο, ο οποίος βασίζεται στο γεγονός ότι ο εκκινητής που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι σημασμένος με ειδική φθορίζουσα χρωστική και μπορεί να ανιχνευθεί με τη βοήθεια laser. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα των 4 αντιδράσεων sequencing ηλεκτροφορούνται σε ξεχωριστές θέσεις σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Ο φθορισμός της χρωστικής με την οποία είναι σημασμένος ο εκκινητής επιτυγχάνεται με την εκπομπή ακτινοβολίας από πηγή

laser, το οποίο εκπέμπει σε συγκεκριμένη θέση στο πήκωμα. Τα αποτελέσματα καταγράφονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το σύστημα ηλεκτροφόρησης, και στη συνέχεια αναλύονται με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού του ηλεκτρονικού υπολογιστή, παρέχοντας έτσι την ακριβή αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του τμήματος του DNA. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης αξιολογούνται τόσο από τεχνικά μέσα (ηλεκτρονικοί υπολογιστές) όσο και από τον ανθρώπινο παράγοντα .

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A (Ubiquitin- Protein Ligase E3A)

Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τεσσάρων εξωνίων του γονιδίου UBE3A αναλύθηκε προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις σε αυτά.

Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης των εξωνίων έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Long- Read Tower™ System της Visible Genetics.

Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

A. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΜΕ ΤΗΝ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των συγκεκριμένων αλληλουχιών των εξωνίων (9, 12, 15 και 16) του UBE3A γονιδίου, δίνονται στον Πίνακα 1.

5.6. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση sequencing

Εξώνιο και εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	(°C) annealing	Μέγεθος Προϊόντος (bp)	Μεγεθος Εξωνίου (bp)
<u>9</u> E9aFor E9aRev	5'-(M13)-TTGCAACAGAGTAAACATACATAT- 3' 5'-(M13)-CTCCATCATTCTCCGAATCTGGT – 3'	55	717	1247
E9bFor E9bRev	5'-(Cy5.0)-TTGCAAAGCGATGAGCAAGCTACCC- 3' 5'-(Cy5.0)-CACTGAACTGTATCATGATAT- 3'	55	750	
<u>12</u> E12For E12Rev	5'-(M13)-AGAAGAGTGATATAAATTATTTG- 3' 5'-(M13)-CTGCTTCATGTCCTCTTTCTCT- 3'	58	465	165
<u>15</u> E15For E15Rev	5'-(M13)-ATGAATGCCAAACTGAAACCAG- 3' 5'-(M13)-GCTGGCAATATGACTAAGAAAATGA- 3'	58	574	144
<u>16</u> E16For E16Rev	5'-(M13)-CCATGACTTACAGTTTTTCCT- 3' 5'-(M13)-TGGGACACTATCACCACCAA- 3'	58	277	159

Οι εκκινητές E9a, E12, E15 και E16 φέρουν την ειδική αλληλουχία αλληλουχία M13 (For: TGTAACGACGGCCAGT, Rev: CAGGAAACAGCTATGACC) στο 5' άκρο τους. Ο εκκινητής E9b είναι άμεσα συνδεδεμένος με την χρωτική Cy5 στο 5' άκρο.

Η αλληλουχία M13 χρησιμεύει στην αντίδραση πρωτοδιάταξης, δεδομένου ότι είναι συμπληρωματική ως προς τον εκκινητή της αντίδρασης πρωτοδιάταξης και αποτελεί

το σημείο από το οποίο θα ξεκινήσει η αλληλούχιση των βάσεων του κάθε τμήματος DNA.

Οι αντιδράσεις PCR για κάθε τμήμα DNA πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες υβριδισμού οι οποίες δίνονται στον Πίνακα 5.6

Πίνακας 5.7 . Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντιδράσεων PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
HotStarTaqMasterMix	2.5 units HotStarTag DNA πολυμεράση* 1.5mM MgCl ₂ 200mM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
MgCl ₂	1mM για τα εξώνια 12, 15, 16 και το πρώτο τμήμα του εξωνίου 9 (εκκινητής 9α) 0.5mM για το δεύτερο τμήμα του εξωνίου 9 (εκκινητής 9b)
Εκκινητές E9aFor/ E9aRev, E9bRev, E12For/ E12Rev, E16For/ E16Rev	2.5mM
Εκκινητές E15For/ E15Rev	1.5mM

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης των PCR αντιδράσεων δίνονται στον Πίνακα 5.8.

Πίνακας 5.8: Συνθήκες PCR αντίδρασης

Στάδιο	Θερμοκρασία σε °C	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95	10 λεπτά
Αποδιάταξη	95	1 λεπτό
Υβριδισμός εκκινητών	55 (εξώνιο 9) 58 (εξώνια 12, 15, 16)	1 λεπτό
Επιμήκυνση – Σύνθεση DNA	72	1 λεπτό
Τελική επιμήκυνση	72	10 λεπτά
Συνολικοί κύκλοι : 35		

Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων PCR ελέγχεται με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και ανίχνευση των ζωνών με επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

B. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA – DNA SEQUENCING

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων χρησιμεύουν ως υποστρώματα για την αντίδραση αλληλούχισης. Τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις (χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο 7-Deaza-dGTP, CyTM5/ Cy5.5 Dye Primer, Cycle Sequencing Kit, της Bayer Health Care) δίνονται στους παρακάτω δύο πίνακες:

Πίνακας 5.9 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αντιδράσεων sequencing

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
Ρυθμιστικό Διάλυμα Sequencing	260mM Tris- HCL, pH 8.3, 39mM MgCl ₂
Διάλυμα αραιώσης του Ενζύμου (Dilution Buffer)	10mM Tris- HCL, pH 8, 1mM- 2ME, 0.55% (v/v) Tween-20, 0.5% (v/v) NP-40
Ένζυμο (Thermo Sequenase Enzyme)	32U/ mL
M13 Universal Cy5.0 εκκινητής	3μM
Deaza- A Termination Mix	750μM από dATP, dCTP, dTTP και 562.5μM dGTP, 187.5μM 7- deaza- dGTP και 2.5μM ddATP σε 0.1mM EDTA, pH 8
Deaza- C Termination Mix	750μM από dATP, dCTP, dTTP και 562.5μM dGTP, 187.5μM 7- deaza- dGTP και 2.5μM ddCTP σε 0.1mM EDTA, pH 8
Deaza- G Termination Mix	750μM από dATP, dCTP, dTTP και 562.5μM dGTP, 187.5μM 7- deaza- dGTP και 2.5μM ddGTP σε 0.1mM EDTA, pH 8
Deaza- T Termination Mix	750μM από dATP, dCTP, dTTP και 562.5μM dGTP, 187.5μM 7- deaza- dGTP και 2.5μM ddTTP σε 0.1mM EDTA, pH 8
Χρωστική	Χρωστική τερματισμού αντίδρασης σε φορμαμίδιο

Το ένζυμο χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:10 , και τα υποστρώματα κάθε αντίδρασης (προϊόν PCR) χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:30 ή 1:45, ανάλογα με την καθαρότητα και την ποσότητα του εκάστοτε PCR προϊόντος. Σε κάθε αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε επιπλέον DMSO (Dimethyl sulfoxide), προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός δευτεροταγών δομών.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (Flexigene της Techne). Η αντίδραση Cycle Sequencing περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμικής αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης/ τερματισμού, ώστε να αυξηθεί η ένταση του σήματος που λαμβάνεται και να μειωθεί η ποσότητα του απαιτούμενου υποστρώματος. Οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης πρωτοδιάταξης δίνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 5.10. Συνθήκες αντίδρασης sequencing

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΚΛΩΝ
Αρχική αποδιάταξη	94	2 λεπτά	1
1 ^ο Στάδιο Κύκλων	94	20δευτερα	25
	50	45δευτερα	
	70	1λεπτό	
2 ^ο Στάδιο Κύκλων	94	25δευτερα	15
	70	2λεπτά	
Τελική Επιμήκυνση	72	2λεπτά	

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ SEQUENCING ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA γίνεται με αυτόματο τρόπο με τη χρήση laser, ηλεκτρονικού υπολογιστή και εξειδικευμένου λογισμικού ανάλυσης (software). Τα προϊόντα κάθε αντίδρασης αλληλούχισης ηλεκτροφορούνται σε διαφορετικές στήλες σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6%. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ρυθμίζονται μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή, καθώς και η ένταση της πηγής του laser (Πίνακας 5.11).

Πίνακας 5.11 Συνθήκες Ηλεκτροφόρησης σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης

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

Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθορίζεται από το μέγεθος της αλληλουχίας του DNA που αναλύεται.

Κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, η πηγή laser προκαλεί τον φθορισμό της χρωστικής Cy5.0 (μήκος κύματος απορρόφησης: 600- 650nm) με την οποία είναι σημασμένοι οι εκκινητές. Η πληροφορία που λαμβάνεται από τον φθορισμό καταγράφεται ηλεκτρονικά, αναλύεται και μετατρέπεται σε αλληλουχία βάσεων, η οποία αποθηκεύεται στην βάση δεδομένων του ηλεκτρονικού υπολογιστή.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ PRADER- WILLI ΚΑΙ ANGELMAN

ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ METHYLATION SPECIFIC PCR (MSPCR)

Συνολικά μελετήθηκαν 81 ασθενείς, που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο για μοριακή μελέτη των συνδρόμων Prader Willi (31) και Angelman (50).

Σύνδρομο Prader Willi

Από τους 31 ασθενείς της μελέτης με κλινική υποψία συνδρόμου Prader-Willi βρέθηκαν 6 άτομα με αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Από αυτά, ένα άτομο είχε ήδη διαγνωστεί μοριακά ως θετικό για σύνδρομο Prader Willi και το αποτέλεσμα της χημικής τροποποίησης επιβεβαίωσε την αρχική αυτή διάγνωση. Για τα υπόλοιπα 4 άτομα (≈13,0%) η προηγηθείσα εργαστηριακή μελέτη δεν είχε επιβεβαιώσει την κλινική διάγνωση επειδή τα άτομα της οικογένειας (μητέρα- πατέρας- παιδί) δεν ήταν πληροφοριακά (3) ή δεν είχε εφαρμοσθεί λόγω απουσίας δειγμάτων από τους γονείς (1). Επομένως, τα αποτελέσματα της χημικής τροποποίησης και του MSPCR ήταν καθοριστικά για τον ολοκληρωμένο μοριακό έλεγχο του συνδρόμου Prader Willi.(Πίνακας 6.2)

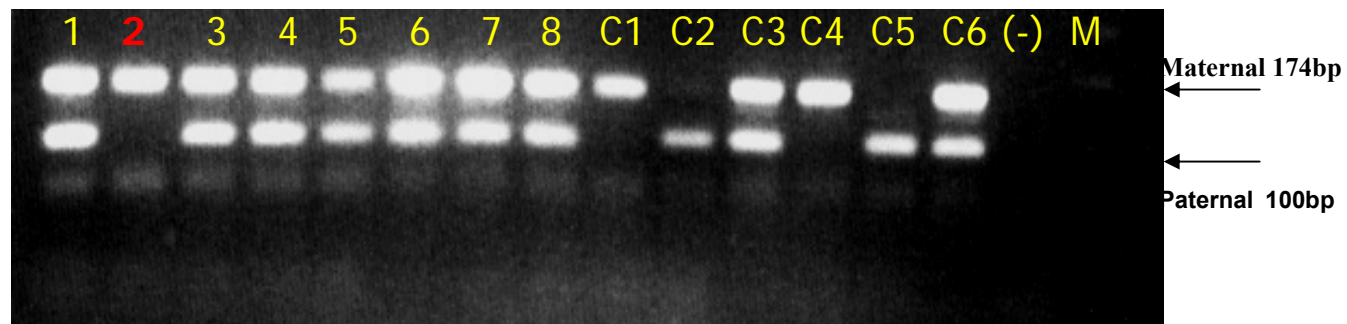
Σύνδρομο Angelman

Από τα 50 άτομα που παραπέμφθηκαν για έλεγχο συνδρόμου Angelman, 7 εμφάνισαν αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Από αυτά, 5 άτομα διαγνώστηκαν παράλληλα και με ανάλυση DNRP (Dinucleotide Repeat Polymorphism) ως θετικά για το σύνδρομο Angelman. Για τα υπόλοιπα 2 (4,3%) που και σε αυτή την περίπτωση δεν ήταν δυνατόν να διαγνωσθούν με τις προηγηθείσες μοριακές μεθόδους, τα αποτελέσματα της μελέτης του προτύπου μεθυλίωσης ήταν καθοριστικά για τον ολοκληρωμένο μοριακό έλεγχο του συνδρόμου Angelman. (Πίνακας 6.3)

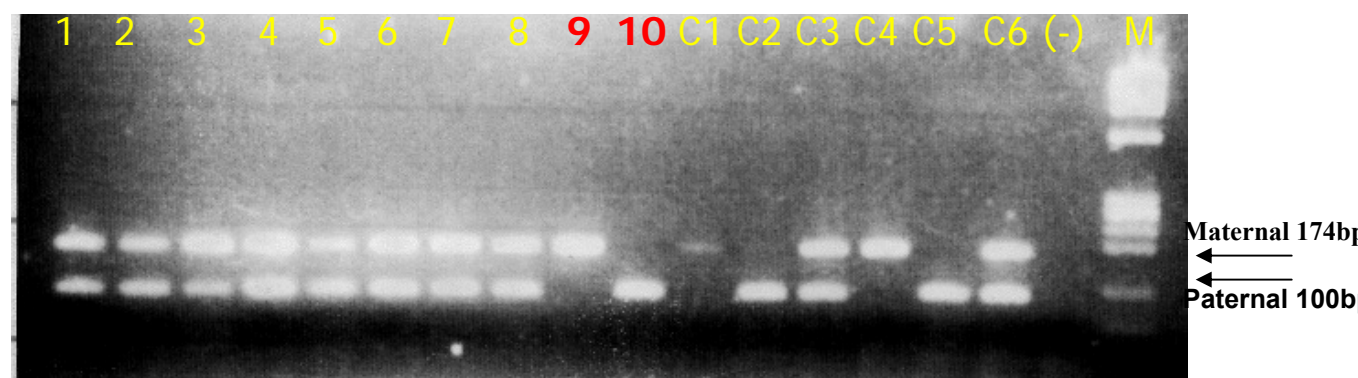
Η παρουσία προϊόντος MSPCR μητρικής (Prader Willi) ή πατρικής (Angelman) μόνο προέλευσης πιθανόν να εξηγείται με την παρουσία ελλείμματος που δεν ανιχνεύθηκε με την προηγούμενη μοριακή μελέτη (DNRP) ή με την αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης λόγω παρουσίας μοριακών διαταραχών (ελλειμμάτων ή

σημειακών μεταλλάξεων) στην περιοχή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting centre) στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13.

Τα αποτελέσματα από το MSPCR γίνονται ορατά μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%.



Εικόνα 6.1α Αποτελέσματα του MSPCR. Στη θέση 2 η παρουσία του προϊόντος από το μητρικό αλληλόμορφο μόνο, αποδεικνύει την απουσία αλληλομόρφου με πατρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (διάγνωση ασθενούς με σύνδρομο Prader Willi).



Εικόνα 6.1β Αποτελέσματα του MSPCR. Στη θέση 9 η παρουσία του προϊόντος από το μητρικό αλληλόμορφο μόνο, αποδύκνυει την απουσία αλληλομόρφου με πατρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (διάγνωση ασθενούς με σύνδρομο Prader Willi). Αντίθετα στην θέση 10 η παρουσία προϊόντος από το πατρικό μόνο αλληλόμορφο, αποδεικνύει την απουσία αλληλομόρφου με μητρικό πρότυπο γονιδιακής αποτύπωσης (διάγνωση ασθενούς με σύνδρομο Angelman).

C1, C2 και C3: Άτομα που χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες για θετικό Prader Willi, Angelman και φυσιολογικό αντίστοιχα. Τα δείγματα αυτά συμπεριλήφθηκαν στην συγκεκριμένη χημική τροποποίηση.

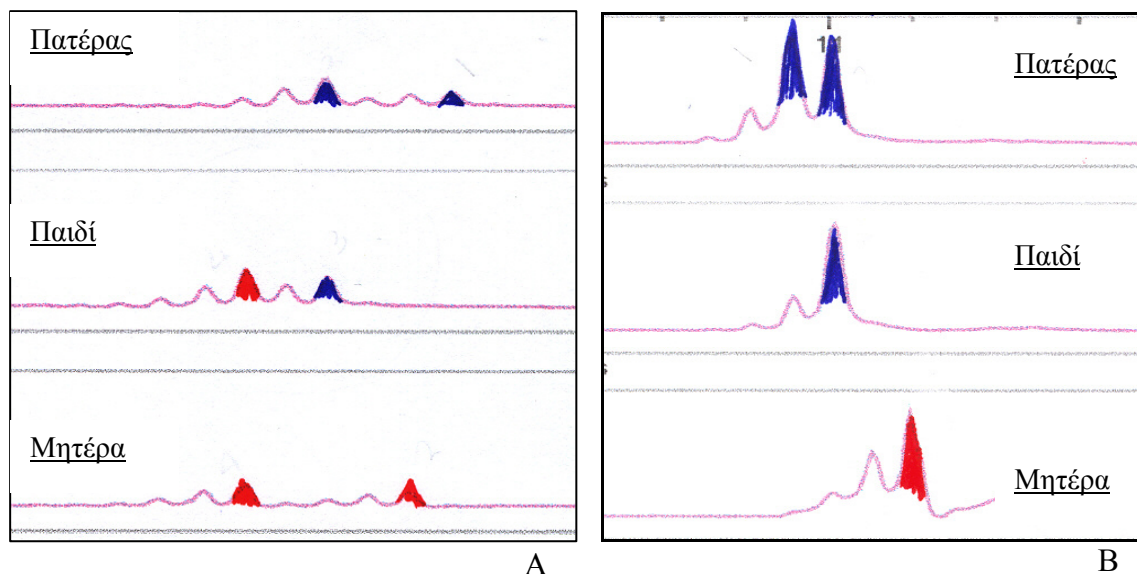
C4, C5 και C6: Δείγματα που χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες για τον έλεγχο της επιτυχίας του MSPCR. Τα δείγματα αυτά έχουν τροποποιηθεί σε προηγούμενη χημική τροποποίηση και έχουν δώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα μετά το MSPCR.

M: κλίμακα μεγέθους

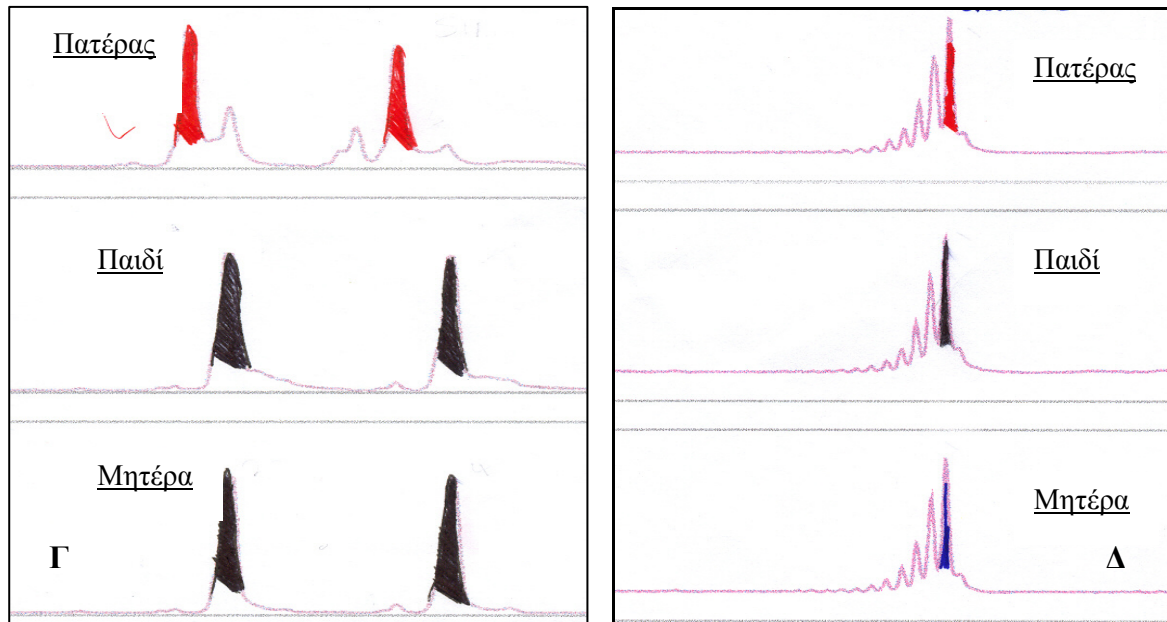
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΘΕΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΛΛΕΙΨΗΣ Ή ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗΣ ΔΙΣΩΜΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ 15q11- q13 (DNRP – Dinucleotide Repeat Polymorphism)

Η ανάλυση πολυμορφικών θέσεων της περιοχής 15q11-q13 εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής ως η κύρια μέθοδος διάγνωσης των συνδρόμων PWS/AS. Στη παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής, αφορούν: α) δείγματα από προηγούμενα έτη για τα οποία και χρησίμευσε ως κριτήριο επιλογής για την αναγκαιότητα εφαρμογής MSPCR (MSPCR εφαρμόστηκε σε εκείνα τα περιστατικά που χαρακτηρίστηκαν ως αδιάγνωστα – 2 διαδοχικές πολυμορφικές θέσεις μη πληροφοριακές) και β) ασθενείς που προσήλθαν κατά τη διάρκεια της μελέτης και εξετάστηκαν παράλληλα και με τις δύο μεθόδους.

Στη συνέχεια παραθέτονται ενδεικτικά τα πρότυπα αποτελεσμάτων DNRP ανάλυσης μετά από PCR και ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης και επεξεργασίας απο αυτόματο αναλυτή (Εικ.6.2). Στους Πίνακες 6.2 και 6.3 δίνονται τα συμπερασματικά αποτελέσματα για το σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν.



Εικόνα 6.2α Αποτελέσματα ανάλυσης του δινουκλεοτιδικού πολυμορφικού δείκτη D15S543. Α. Εικόνα φυσιολογικού προτύπου κληρονομησης. Φαίνεται ότι το παιδί έχει κληρονομήσει ένα αλληλόμορφο από τον πατέρα (μπλε) και ένα αλληλόμορφο από την μητέρα (κόκκινο). Β. Εικόνα χαρακτηριστική για έλλειμμα μητρικής προέλευσης. Το παιδί έχει κληρονομήσει το ένα αλληλόμορφο από τον πατέρα (μπλε) και κανένα αλληλόμορφο από την μητέρα.



Εικόνα 6.2β Αποτελέσματα ανάλυσης του δινουκλεοτιδικού πολυμορφικού δείκτη GABRB3. Γ. Εικόνα μητρικής μονογονεϊκής δισωμίας. Το παιδί έχει κληρονομήσει και τα δύο αλληλόμορφα από την μητέρα (μαύρο) και κανένα από τον πατέρα. Δ. Εικόνα μη πληροφοριακής οικογένειας. Πατέρας, μητέρα και παιδί, φέρουν το ίδιο αλληλόμορφο, και δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η γονεϊκή προέλευση αυτού.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ 9, 12, 15 ΚΑΙ 16 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A

Έγινε ανάλυση της πρωτοταγούς δομής τεσσάρων εξωνίων του γονιδίου UBE3A σε 20 συνολικά ασθενείς με φαινότυπο συνδρόμου Angelman χωρίς μοριακά ευρήματα από την ανάλυση πολυμορφικών δεικτών και την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης. Τα εξώνια που μελετήθηκαν είναι τα 9, 12, 15 και 16, τα χαρακτηριστικά των οποίων καθώς και τα χαρακτηριστικά των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 5.6. Στην Εικόνα 6.3(α, β, γ) φαίνονται τα αποτελέσματα PCR για τον πολλαπλασιασμό των εξωνίων που μελετήθηκαν και αφορούν τον πρώτο έλεγχο που περιλαμβάνει τον αποκλεισμό μεγάλων ελλειμμάτων που γίνονται ορατά με την εμφάνιση προϊόντων μικρότερου μεγέθους. Στην παρούσα μελέτη και στο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν με ανάλυση πρωτοταγούς δομής δεν αποκαλύφθηκαν μεγάλα ελλείμματα ή σημειακές μεταλλάξεις στις αλληλουχίες των εξωνίων.

Σε έναν από τους ασθενείς εντοπίστηκε αντικατάσταση μίας βάσης στην αλληλουχία του ιντρονίου 12. Η αλλαγή **IVS2650- 13T > G**, αφορά αντικατάσταση θυμίνης (T) από γουανίνη (G) στην θέση 13 του ιντρονίου 12 (Εικ.6.4).

Στον Πίνακα 6.1 δίνεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του εξωνίου 12 του UBE3A γονιδίου. Σημειώνονται οι θέσεις και οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του εξωνίου. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του εξωνίου 12 και μέρος του ιντρονίου 12, φαίνονται στην Εικόνα 6.4.

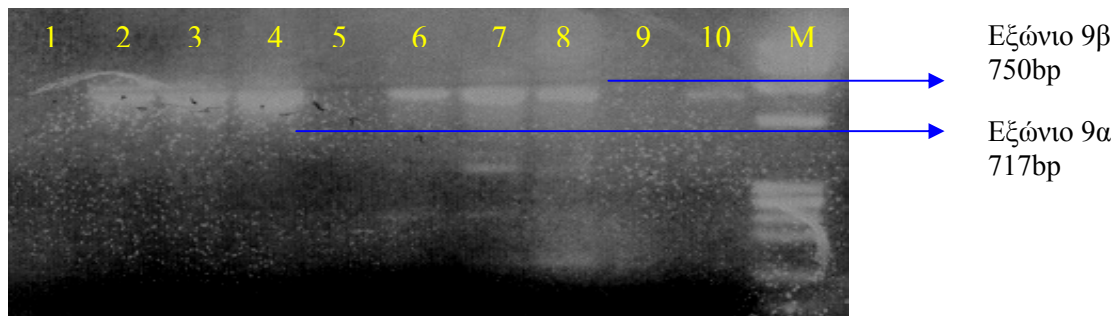
Πίνακας 6.1 Αλληλουχία εξωνίου 12 (και τμήμα του ιντρονίου12) του UBE3A γονιδίου

1	cacccccacc ttgagacacc acagaatttc tcatagagca cagtgatgaat tctattgcta	
61	aattgggtgtg atgggggttc tcagcagaga atggacatca cagtgactga caatctttct	
121	tttatagggtt ggtaactatt tgggggactg gagggatact gtctacactt tttacaatt	
181	tttattgata agatttttgt tgccttcta a gaagagtgat ataaattatt tgtt gtatt	→ E12For
241	tgtagttcta tgggtggcctc aatttaccat ttctggttgc taggttctat atcagagttt	
301	aaaagattta ttggagtatg aagggaatgt ggaagatgac atgatgatca cttccagat	
361	atcacagaca gatctttttg gtaaccaat gatgtatgat ctaaaggaaa atggtgataa	
421	aattccaatt acaaatgaaa acaggaaggt aataaatgt T tttatgtcac atttgtctc	
481	ttcattaaca cttcaaagc atgtatgctt ataattttta aagaagtatc taatatagtc	
541	tgtacaaaaa aaaaacaagt aactaagttt atgtaaagtc hagagtccac ttttctaaat	
601	ctggatata agttggtatg aaagcacaca gttgggcaact aaagcccctt ttagagaaaag	→ E12Rev
661	aggacatgaa gcagg gagata gttaatagct aagtgktggt ttagtataa agcaagagca	
721	gggtgtttct tgtattaagc tgta	

*Με κίτρινη υπογράμμιση δίνονται οι αλληλουχίες και οι θέσεις των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτής της περιοχής

**Με μπλε γραμματοσειρά υπογραμμίζεται η αλληλουχία του εξωνίου 12, ενώ η θέση της αντικατάστασης (T> G) που εντοπίστηκε δίνεται με κόκκινο χρώμα (η αλληλουχία προέρχεται από την βάση δεδομένων του NCBI < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> >, με κωδικό -accession number- AJ001111)

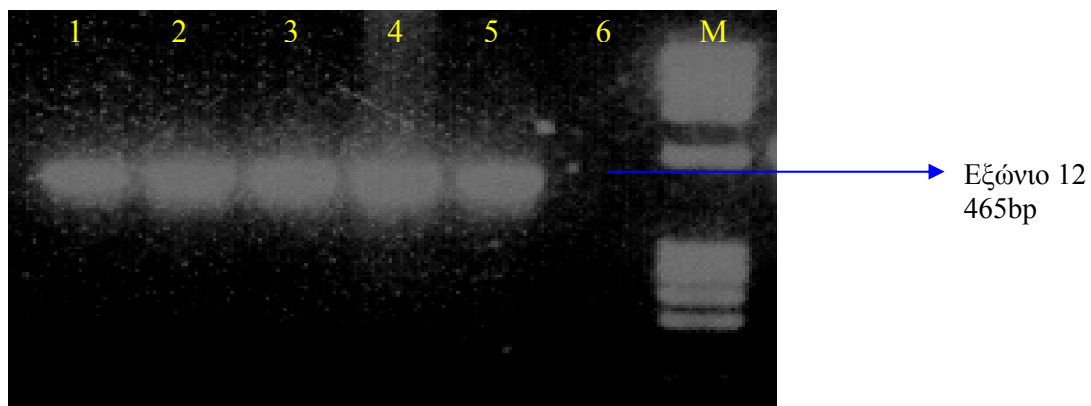
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΕΞΩΝΙΩΝ 9, 12, 15 ΚΑΙ 16 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ UBE3A



Εικόνα 6.3α Προϊόντα PCR της αλληλουχίας 9α του εξωνίου 9, του γονιδίου UBE3A, (θέσεις 2, 3, 4) και της αλληλουχίας 9β του εξωνίου 9 (θέσεις 6, 7, 8, 9, 10).

Θέσεις 1 και 5 : αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης PCR

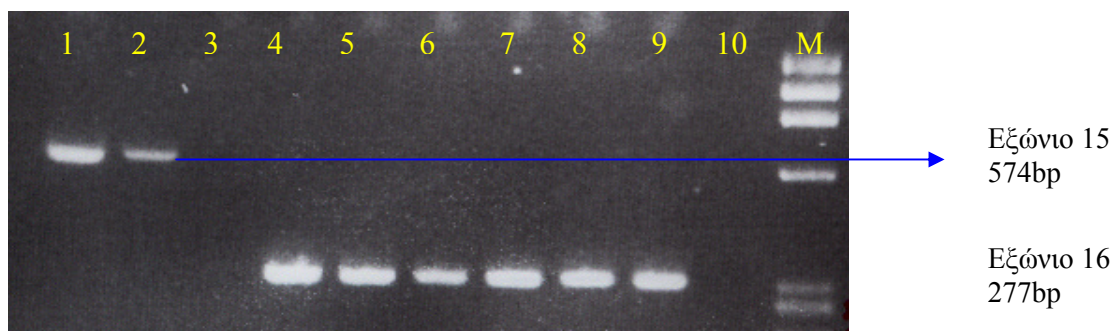
M: Κλίμακα μεγέθους



Εικόνα 6.3β Προϊόντα PCR της αλληλουχίας του εξωνίου 12, του γονιδίου UBE3A

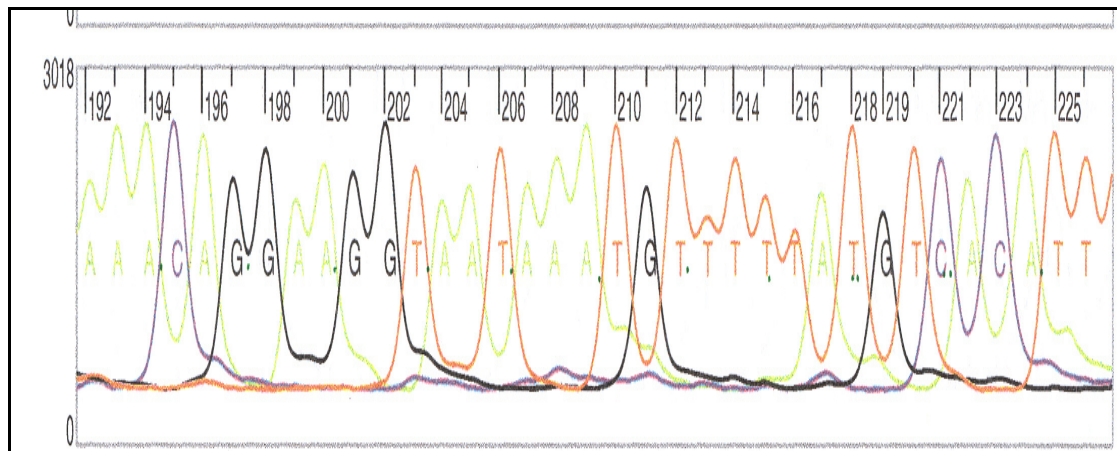
Θέση 6 : αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης PCR

M: Κλίμακα μεγέθους

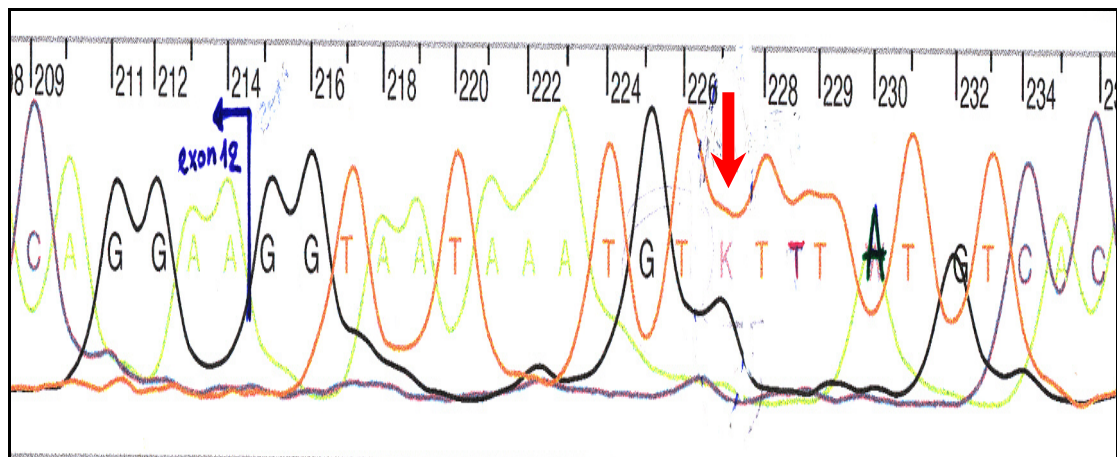


Εικόνα 6.3γ Προϊόντα PCR της αλληλουχίας του εξωνίου 15, του γονιδίου UBE3A, (θέσεις 1, 2) και της αλληλουχίας του εξωνίου 16 (θέσεις 4, 5, 6, 7, 8, 9). Θέσεις 3 και 10 : αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης PCR M: Κλίμακα μεγέθους

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΕΞΩΝΙΟΥ
12 ΤΟΥ UBE3A ΓΟΝΙΔΙΟΥ**



Εικόνα 6.4A.



Εικόνα 6.4B

Αποτελέσματα ανάλυσης πρωτοταγούς δομής του εξωνίου12 του UBE3A γονιδίου. Στην Εικόνα 2A φαίνεται η αλληλουχία των βάσεων του ιντρονίου 12 σε ένα φυσιολογικό άτομο. Στην Εικόνα 2B φαίνεται η αλληλουχία των βάσεων στο ιντρόνιο 12 του ασθενούς με σύνδρομο Angelman, όπου φαίνεται η αντικατάσταση της θυμίνης (T) από γουανίνη (G) στην θέση 13 του ιντρονίου 12 (**IVS2650- 13T > G**) (κόκκινο βέλος). Σημειώνεται το 3' άκρο του εξωνίου 12.

Πίνακας 6.2 Αποτελέσματα μοριακής μελέτης ασθενών με σύνδρομο Prader Willi

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ PWS	MSP	DNRP
PW1	N	NI
PW2	N	NI
PW3	N	NI
PW4	N	N
PW5	N	NI
PW6	N	NI
PW7	M	NI
PW8	N	NI
PW9	N	NI
PW10	M	Έλλειμμα
PW11	M	NI
PW12	M	NI
PW13	N	NI
PW14	N	NI
PW15	N	NI
PW16	M	M-UPD
PW17	N	NI
PW18	N	NI
PW19	M	NA
PW20	N	NI
PW21	N	NI
PW22	N	NI
PW23	N	NI
PW24	N	NI
PW25	N	NI
PW26	N	NI
PW27	N	NI
PW28	N	NI
PW29	N	N
PW30	N	NI
PW31	N	NI

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AS	MSP	DNRP	Sequencing UBE3A/ Exons 9, 12, 15, 16
AS1	N	NI	N
AS2	N	NI	N
AS3	N	NI	N
AS4	N	N	N
AS5	N	NI	N
AS6	N	NI	N
AS7	P	P-UPD*	N
AS8	P	NI	N
AS9	N	NI	N
AS10	N	NI	N
AS11	N	NI	N
AS12	N	NI	N
AS13	N	NI	N
AS14	N	NI	N
AS15	P	Έλλειμμα	N
AS16	N	NI	N
AS17	N	NI	N
AS18	N	NI	IVS2650- 13T > G
AS19	N	NI	N
AS20	N	NI	N
AS21	N	NI	N
AS22	P	Έλλειμμα	N
AS23	N	NI	N
AS24	N	NI	N
AS25	N	NI	N
AS26	N	NI	N
AS27	N	NI	N
AS28	N	NI	N
AS29	N	NI	N
AS30	N	NI	N
AS31	N	NI	N
AS32	N	N	N
AS33	N	NI	N

AS34	N	NI	N
AS35	N	NI	N
AS36	N	NI	N
AS37	N	NI	N
AS38	N	NI	N
AS39	N	NI	N
AS40	N	NI	N
AS41	N	NI	N
AS42	N	N	N
AS43	P	Έλλειμμα	N
AS44	N	NI	N
AS45	P	Έλλειμμα	N
AS46	N	NI	N
AS47	N	NI	N
AS48	N	NI	N
AS49	N	NI	N
AS50	P	NI	N

Πίνακας 6.3 Αποτελέσματα μοριακής μελέτης ασθενών με σύνδρομο Angelman

M: προϊόν μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο

P: προϊόν μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο / NI: μη πληροφοριακό

N: normal:

- DNRP ανάλυση : δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα και από τους δύο γονείς
- ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του γονιδίου UBE3A: φυσιολογική αλληλουχία των βάσεων στα εξώνια που μελετήθηκαν (απουσία ανίχνευσης μεταλλάξεων)
- MSPCR : φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης και στα δύο αλληλόμορφα

NA: Non Applicable: δεν έγινε επειδή δεν ήταν διαθέσιμα κατάλληλα δείγματα από τους βιολογικούς γονείς (υιοθεσίες, εξωσωματικές κλπ) ή και το παιδί

M-UPD: maternal uniparental disomy, μητρική μονογονεϊκή δισωμία

P-UPD: paternal uniparental disomy , πατρική μονογονεϊκή δισωμία

Με κόκκινη γραμματοσειρά υπογραμμίζονται τα περιστατικά εκείνα στα οποία η μέθοδος του MSPCR έδωσε θετικό αποτέλεσμα, ενώ με πράσινη τονίζεται το περιστατικό στο οποίο η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του UBE3A γονιδίου αποκάλυψε αλλαγή στην αλληλουχία του ιντρονίου 12

* πατρική ισοδισωμία που προέκυψε από ισοζυγισμένη μετάθεση των χρωμοσωμάτων 15 (καρυότυπος ασθενούς: 45,XY, t(15;15))

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μοριακή μελέτη των συνδρόμων Prader Willi και Angelman παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η ύπαρξη, σε καθένα από αυτά, διαφορετικών μοριακών μηχανισμών παθογένεσης καθιστά πολλές φορές δύσκολη (ίσως και αδύνατη) την μοριακή διάγνωση αυτών. Η απώλεια έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων που βρίσκονται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13 έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση των δυο συνδρόμων. Η πιο κοινή μοριακή διαταραχή που εμφανίζεται και στα δύο σύνδρομα (σε ποσοστό 70- 75%) περιλαμβάνει την έλλειψη μεγάλου χρωμοσωμικού τμήματος (4MB) της περιοχής 15q11-q13 στην οποία έχει εντοπιστεί μία ομάδα αποτυπωμένων γονιδίων (μεγέθους 2- 3MB). Τα διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων Prader Willi και Angelman οφείλονται στην γονεϊκή προέλευση του αλληλομόρφου που φέρει την μοριακή διαταραχή. Η μοριακή διαταραχή στο σύνδρομο Prader Willi συμβαίνει πάντα στο πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο, ενώ αντίστοιχα στο σύνδρομο Angelman, στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωση των δύο συνδρόμων περιλαμβάνουν, εκτός από την χρωμοσωμική έλλειψη στην περιοχή 15q11-q13, μονογονεϊκή δισωμία {μητρική στο σύνδρομο PraderWilli (20- 25%), και πατρική στο σύνδρομο Angelman (3-5%)} , καθώς και αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης στην περιοχή του SNRPN γονιδίου (1% στο σύνδρομο PraderWilli και 3-5% στο σύνδρομο Angelman). Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό 4-6% των ασθενών με σύνδρομο Angelman, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών παραμένει αδιάγνωστο (10-14%) {Πίνακες 2.3(α, β)}, (Engel E. and Antonarakis SE). Πιθανολογείται ότι στον μηχανισμό παθογένεσης των αδιάγνωστων περιπτώσεων συνδρόμου Angelman, ενέχεται η συμμετοχή και άλλων γονιδίων εντός της περιοχής 15q11-q13 ή ακόμα και γονιδίων εκτός της περιοχής αυτής.

Το γονεϊκής προέλευσης πρότυπο μεθυλίωσης που έχει αναφερθεί για την θέση του SNRPN γονιδίου που βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα αξιόπιστο εργαλείο για την μοριακή ανάλυση των συνδρόμων Prader Willi και Angelman.

Στην περίπτωση του συνδρόμου Prader Willi το πρότυπο μεθυλίωσης είναι αλλοιωμένο στο πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται ορθή εδραίωση και διατήρηση του πατρικού προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης αφήνοντας ενεργό μόνο το μητρικό αλληλόμορφο. **Όπως γίνεται κατανοητό ενώ η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης μπορεί να θέσει τη διάγνωση για το σύνδρομο Prader Willi, δεν είναι δυνατό να παρέχει πληροφορίες για τον ακριβή μοριακό μηχανισμό παθογένεσης ο οποίος πιθανό να περιλαμβάνει έλλειψη, μονογονεϊκή δισωμία ή μεταλλάξεις στο κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης (Πίνακας 2.3α).**

Αντίθετα όπως προκύπτει και από τα δεδομένα του Πίνακα 8, **μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης** αποκαλύπτεται μόνο στο **80% περίπου των ασθενών με σύνδρομο Angelman, αφήνοντας ένα ποσοστό περίπου 20% των ασθενών αδιάγνωστο. (Πίνακας 2.3β).** Στο σύνολο των ασθενών με κλινικό φαινότυπο συνδρόμου Angelman έχει παρατηρηθεί και ένα ποσοστό 4-6% στο οποίο η βλάβη αφορά μοριακές αλλοιώσεις του γονιδίου UBE3A. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του γονιδίου UBE3A σε περιπτώσεις ασθενών με τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman, στους οποίους δεν έχει ανιχνευθεί έλλειμμα, μονογονεϊκή δισωμία ή αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης. Το υπόλοιπο 10-14% διαφεύγει της διάγνωσης και παραμένουν ακόμα και σε διεθνές επίπεδο **άγνωστες οι πιθανές μοριακές βλάβες, οι οποίες δεν αποκλείεται να αποδειχθεί ότι αφορούν και άλλα γονίδια.** Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν την πιθανή συσχέτιση ενός δεύτερου γονιδίου (ATP10C) με την παθογένεια του συνδρόμου Angelman (Runte et al, 2001). Επίσης, ενδέχεται ότι οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν παρόμοια κλινική εικόνα με αυτή του συνδρόμου Angelman, λόγω μοριακών βλαβών που εντοπίζονται σε γονίδια εκτός της περιοχής 15q11- q13. Για παράδειγμα, το σύνδρομο Angelman και το σύνδρομο Rett έχουν παρόμοια κλινική εικόνα. Είναι πιθανό περιπτώσεις ασθενών που διαγνώστηκαν κλινικά σαν Angelman, να φέρουν μεταλλάξεις στο πρόσφατα ταυτοποιημένο γονίδιο υπεύθυνο για το σύνδρομο Rett , MECP2 (Amir et al, 1999).

7.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η ακριβής ταυτοποίηση του προτύπου μεθυλίωσης του DNA στις CpG νησίδες έχει γίνει απαραίτητη για την κατανόηση βιολογικών φαινομένων όπως η ρύθμιση της έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων (imprinted genes), η αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος (X chromosome inactivation) καθώς και η αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε ανθρώπινους καρκίνους. Αρχικά, η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης στηρίχτηκε στην χρήση περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στην μεθυλίωση και σε μεθόδους όπως η αποτύπωση κατά Southern. Οι μέθοδοι αυτοί απαιτούν μεγάλες ποσότητες DNA, μπορούν να ανιχνεύσουν μεθυλιωμένες περιοχές μόνο στην περίπτωση που η μεθυλίωση ξεπερνά ένα συγκεκριμένο ποσοστό και, τέλος, παρέχουν πληροφορίες μονάχα για εκείνες τις θέσεις που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται.

Η μέθοδος της χημικής τροποποίησης του DNA μετά από επίδραση με δισουλφίδιο του νατρίου, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των CpG νησίδων. Αρχικά, η περαιτέρω μελέτη του τροποποιημένου DNA γινόταν με ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της συγκεκριμένης αλληλουχίας (sequencing). Με τον τρόπο αυτό παρέχονται λεπτομερείς πληροφορίες για την τροποποιημένη αλληλουχία και το ακριβές πρότυπο μεθυλίωσης αυτής. Εντούτοις, η μέθοδος της ανάλυσης πρωτοταγούς δομής (sequencing), είναι τεχνικά δύσκολη και χρονοβόρα. Η μέθοδος της χημικής τροποποίησης και του Methylation Specific PCR παρέχει έναν **γρήγορο** (συνολικός χρόνος ολοκλήρωσης της μεθόδου: 24-30 hrs) και **ειδικό** τρόπο ανάλυσης του προτύπου μεθυλίωσης στις CpG νησίδες. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη (περισσότερο ευαίσθητη από την χρήση περιοριστικών ενζύμων και αποτύπωσης κατά Southern), δίνοντας την δυνατότητα εντοπισμού μικρού αριθμού μεθυλιωμένων αλληλομόρφων και μελέτης της μεθυλίωσης σε δείγματα με μικρή ποσότητα DNA (αρκεί 1.0μg DNA). Επιπλέον, με τη μέθοδο του MSP μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση της μεθυλίωσης σε DNA το οποίο έχει απομονωθεί από ιστό σε παραφίνη (τέτοιο υλικό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην μέθοδο της αποτύπωσης κατά Southern), καθώς επίσης και μελέτη όλων των CpG θέσεων μέσα σε μία CpG νησίδα, και όχι μόνο αυτών που βρίσκονται μέσα στις αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα. Κάτι τέτοιο αυξάνει τον αριθμό των

περιοχών που μπορούν να αναλυθούν και επιτρέπει την ανάλυση των προτύπων μεθυλίωσης κατά μήκος περιοχών πλούσιων σε CpG (CpG –rich regions).

Συγκριτικά με την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της τροποποιημένης αλληλουχίας, η μέθοδος MSP, έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. είναι πιο απλή μέθοδος: αρκεί μία τυπική αντίδραση PCR και ένας ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι επίσης πιο απλή, και δεν απαιτεί την εμπειρία που απαιτεί η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής.
2. απαιτεί λιγότερο χρόνο: ένα τυπικό PCR και ένας ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός σε πήκτωμα αγαρόζης διαρκεί περίπου 4 ώρες, ενώ μία ανάλυση πρωτοταγούς δομής τουλάχιστον 2 ημέρες
3. είναι πιο οικονομική μέθοδος, αποφεύγοντας την χρήση ακριβών αντιδραστηρίων

Αυτοί οι παράγοντες καθιστούν την μέθοδο του MSPCR κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και με αξιόπιστα αποτελέσματα, όπως απαιτεί μία μέθοδος που εφαρμόζεται στην μοριακή διάγνωση ασθενειών.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η διεξαγωγή του πρωτοκόλλου της χημικής τροποποίησης απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή δεδομένου ότι η χημική τροποποίηση σαν επεξεργασία του γενετικού υλικού είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία. Προσοχή χρειάζεται στον ακριβή υπολογισμό της ποσότητας DNA που χρησιμοποιείται. Αυτό το στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση της μεθόδου και την αξιόπιστη έκβαση των αποτελεσμάτων. Μικρότερη ποσότητα αρχικού DNA μπορεί να προκαλέσει αποβάθμιση ή και απώλεια του σήματος, και να καταστήσει αδύνατη την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Αντίθετα, μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA, είναι πιθανό να οδηγήσει σε μη ολοκληρωμένη τροποποίηση, λόγω αλλαγής της στοιχειομετρίας της αντίδρασης. Η αποθήκευση του τροποποιημένου πλέον DNA, αποτελεί σημαντική παράμετρο για την επιτυχία της μεθόδου (διατηρείται στους -15 έως -25° C για 2 μήνες), δεδομένου ότι η χρησιμοποίηση τροποποιημένου DNA για ανάλυση

προτύπου μεθυλίωσης μετά από το παραπάνω χρονικό όριο δίνει λανθασμένα αποτελέσματα.

Με την παραπάνω μεθοδολογία της χημικής τροποποίησης και του MSPCR οι πληροφορίες που παρέχονται αφορούν μόνο την ύπαρξη ή όχι αλλοιωμένου προτύπου μεθυλίωσης (και κατ' επέκταση, στην περίπτωση των αποτυπωμένων γονιδίων την ύπαρξη ή όχι ελαττωματικής αποτύπωσης), αλλά δεν δίνουν περαιτέρω πληροφορίες για την δομή του προτύπου μεθυλίωσης. Είναι, επίσης, απαραίτητη η χρήση γνωστών δειγμάτων control (από φυσιολογικά άτομα και ασθενείς), δεδομένου ότι πιθανή αποτυχία της χημικής τροποποίησης θα δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Υπάρχει τέλος η περίπτωση το MSPCR να μην δώσει αποτελέσματα, παρόλο που έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε όλα τα οποία αναφέρθηκαν. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μετάλλαξης στην περιοχή των εκκινητών , το οποίο να εμπόδιζε την πρόσδεση αυτών στην τροποποιημένη αλληλουχία, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύσουμε προϊόν μετά την εφαρμογή του MSPCR. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η χρησιμοποίηση και δεύτερου εναλλακτικού ζεύγους εκκινητών, προκειμένου να αποκλειστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η πιθανότητα λανθασμένης αξιολόγησης των αποτελεσμάτων.

Λόγω των ιδιαιτεροτήτων της μεθόδου, γίνεται αντιληπτή η ανάγκη εφαρμογής και άλλων μοριακών μεθόδων παρόμοια με το MSPCR (DNRPs ή/και FISH), προκειμένου να εξασφαλίζεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία στην μοριακή διάγνωση των συνδρόμων Prader Willi και Angelman.

7.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ UBE3A

Οι πρώτες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο UBE3A σε ασθενείς με σύνδρομο Angelman αφορούν ένα de novo διπλασιασμό 5 νουκλεοτιδίων, μία μετάλλαξη που μεταβιβάζεται από το μητρικό αλληλόμορφο και αφορά θέση ματίσματος εξωνίων (splice site mutation) και μία de novo αντικατάσταση αμινοξέως (Kishino et al, 1997, Matsuura et al, 1997). Οι τρεις αυτές μεταλλάξεις οδηγούν στην αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης της κωδικής περιοχής (ORF) και σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης.

Ο μεγαλύτερος αριθμός των μεταλλάξεων εντοπίζεται στο εξώνιο 9 του UBE3A γονιδίου, το οποίο είναι και το μεγαλύτερο εξώνιο του γονιδίου καλύπτοντας

περισσότερο από το 50% της συνολικής κωδικής περιοχής (1247bp) (Kishino et al., 1998), (Εικόνα 2.8)

Περίπου 4-6% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A (Malzac et al, 1998, Fang et al, 1999, Baumer et al, 1999, Russo et al, 2000, Lossie et al, 2000, Rapakko et al, 2004, Tsai et al, 1998). Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί περίπου 40 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A που φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με τον φαινότυπο του συνδρόμου (Πίνακας 2.2).

Η απουσία λειτουργικής E6-AP πρωτεΐνης φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση του φαινοτύπου του συνδρόμου Angelman. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να επηρεάζουν είτε τα επίπεδα του UBE3A mRNA είτε να προκαλούν την δημιουργία πρωτεϊνικού προϊόντος το οποίο είναι λειτουργικά ανενεργό (Huibregtse et al, 1995). Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, οι περισσότερες από τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και τις προσθήκες / αφαιρέσεις αμινοξέων, επηρεάζουν την περιοχή hec1 της UBE3A πρωτεΐνης, η οποία φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης (Huang et al, 1999).

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 2.2, το μεγαλύτερο ποσοστό (75 – 80%) των μεταλλάξεων στο UBE3A γονίδιο, εντοπίζεται σε οικογενείς περιπτώσεις, ενώ μόνο το 14 – 23% αφορά σποραδικές μεταλλάξεις (Malzac et al., 1998, Fang et al., 1999).

Στην περίπτωση των οικογενών περιπτώσεων η ανίχνευση μίας μετάλλαξης στο παιδί και στην μητέρα, είναι πολύ σημαντικό εύρημα δεδομένου ότι ο κίνδυνος επανεμφάνισης στην περίπτωση αυτή είναι 50% (όπως ακριβώς συμβαίνει και σε αυτοσωμικά επικρατή γονίδια), και η παροχή γενετικής συμβουλευτικής κρίνεται απαραίτητη. Ο φυσιολογικός φαινότυπος της μητέρας η οποία φέρει την ίδια μετάλλαξη με το παιδί οφείλεται στο γεγονός ότι η ίδια έχει κληρονομήσει την μετάλλαξη αυτή από τον πατέρα της (το πατρικό αλληλόμορφο δεν είναι ενεργό στην κρίσιμη περιοχή για το σύνδρομο Angelman). Επιπλέον, και άλλα μέλη της οικογένειας από την πλευρά της μητέρας ενδέχεται να αποκτήσουν παιδιά με σύνδρομο Angelman (Engel E. and Antonarakis SE).

Η αντικατάσταση βάσης IVS12- 13T> G που εντοπίστηκε σε ασθενή με σύνδρομο Angelman (AS18) είναι πιθανό να σχετίζεται με τον μοριακό μηχανισμό της ασθένειας ιδιαίτερα επειδή ο φαινότυπος είναι ενδεικτικός και η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του ασθενούς δεν αποκάλυψε άλλες μοριακές αλλοιώσεις. Εντούτοις, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι η παραπάνω αντικατάσταση που εντοπίστηκε αφορά πολυμορφική θέση, η οποία δεν επηρεάζει την διαδικασία της

μετάφρασης και την παραγωγή φυσιολογικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Προκειμένου να αποκλειστεί κάτι τέτοιο, είναι απαραίτητος ο έλεγχος ατόμων από το γενικό πληθυσμό (~100), και η κατάλληλη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον μελέτες έκφρασης προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα του mRNA είναι απαραίτητες έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος της συγκεκριμένης πιθανής μετάλλαξης και η σχέση της με την παθογένεια του συνδρόμου Angelman.

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΕ INTRONIA – ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μία περίπτωση μετάλλαξης στο γονίδιο UBE3A, η οποία αφορά μη κωδική περιοχή. Συγκεκριμένα, οι Kishino et al. (1997), αναφέρουν ότι σε δύο αδέρφια με σύνδρομο Angelman, βρέθηκε μετάλλαξη στο ιντρόνιο 9 του UBE3A γονιδίου. Πρόκειται για αντικατάσταση αδενίνης (A) από γουανίνη (G) στην θέση 8 του ιντρονίου 9 (IVS9- 8A>G). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η μετάλλαξη αυτή δημιουργεί καινούρια θέση ματίσματος στο 3' άκρο (3' prime splice junction), 7bp αριστερά από το σημείο ματίσματος της φυσιολογικής πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη αυτή φαίνεται να προκαλεί πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης και την δημιουργία μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Μελέτη στους γονείς των παιδιών αυτών αποκάλυψε την ύπαρξη της ίδιας μετάλλαξης στην μητέρα. Ο φυσιολογικός φαινότυπος της μητέρας φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της κληρονόμησης της συγκεκριμένης μετάλλαξης από τον πατέρα της.

Η μελέτη γύρω από τις μη κωδικές περιοχές των γονιδίων έχει αποκαλύψει τα τελευταία χρόνια μία μεγάλη ποικιλία μεταλλάξεων στις περιοχές αυτές οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν την διαδικασία ωρίμανσης του mRNA (mRNA splicing). Περίπου 100 σημειακές μεταλλάξεις κοντά στις θέσεις ματίσματος του mRNA οι οποίες έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια ασθενειών αναφέρονται στην βιβλιογραφία (Krawczak et al., 1992). 62 από αυτές έχουν εντοπιστεί στην 5' θέση ματίσματος, 26 στην 3' θέση ματίσματος και 13 είναι υπεύθυνες για την δημιουργία καινούριας θέσης ματίσματος. Στην 5' θέση ματίσματος, 60% των μεταλλάξεων αφορούν το δινουκλεοτίδιο GT (θέση δότη -donor splice site), ενώ αντίστοιχα στην 3' θέση ματίσματος, 87% των μεταλλάξεων έχουν εντοπιστεί στο δινουκλεοτίδιο AG (θέση δέκτη-acceptor splice site).

Έχει υπολογιστεί ότι 15% όλων των σημειακών μεταλλάξεων που ευθύνονται για την ανάπτυξη γενετικών ασθενειών στον άνθρωπο, προκαλούν βλάβη στην

διαδικασία της ωρίμανσης του mRNA. Σχεδόν όλες οι αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν είτε την απομάκρυνση ενός εξωνίου (exon skipping) είτε την χρησιμοποίηση μίας παρόμοιας με την φυσιολογική θέση ματίσματος, με αποτέλεσμα την ουσιαστική μείωση ή και απώλεια του φυσιολογικού mRNA. Η συνεχής ανακάλυψη τέτοιων μεταλλάξεων στις περιοχές των ιντρονίων των γονιδίων, έχει δείξει ότι αυτές συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένα σημεία στο ιντρόνιο περισσότερο από ότι σε κάποια άλλα (στα σημεία +3, +4, +5, +6 και -1 στην θέση δότη- donor splice site-, και στο σημείο -3 στην θέση δέκτη- acceptor splice site). Η σοβαρότητα της βλάβης στην διαδικασία της ωρίμανσης του mRNA φαίνεται να σχετίζεται με την θέση στην οποία εντοπίζεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Η αντικατάσταση IVS12- 13T> G που εντοπίστηκε στο ιντρόνιο 12 του UBE3A γονιδίου δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Αφορά την αντικατάσταση θυμίνης από γουανίνη και την πιθανή δημιουργία (ή αποκάλυψη) μίας θέσης δότη (donor splice site), (φυσιολογική αλληλουχία στο σημείο της μετάλλαξης: 5'- T T T T T- 3', μεταλλαγμένη αλληλουχία: 5'- T **G T** T T T- 3'). Η δημιουργία μιας καινούριας θέσης ματίσματος θα μπορούσε να σημαίνει την παραγωγή ενός μη φυσιολογικού ώριμου mRNA , το οποίο συχνά οδηγεί στο σχηματισμό μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος (Antonarakis S. and Cooper D.)

7.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ – ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ/ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ PRADER WILLI ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Ασθενείς με μοριακά ευρήματα για το σύνδρομο Prader Willi παρουσιάζουν μια ποικιλόμορφη κλινική εικόνα. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν κάποια τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου, εκδηλώνοντας όμως παράλληλα και κάποια άτυπα κλινικά στοιχεία, που δυσκολεύουν συχνά την κλινική διάγνωση.

Όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία (Gillissen- Kaesbach et al, 1995, Cassidy , 1997), ασθενείς με ελλείμματα και μητρική μονογονεϊκή δισωμία εμφανίζουν τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου. Αναφέρεται επίσης

ότι οι ασθενείς με μονογονεϊκή δισωμία εκδηλώνουν πιο ήπια κλινική εικόνα από τους αντίστοιχους ασθενείς με έλλειμμα στην χρωμοσωμική περιοχή 15q11-q13.

Από την άλλη, τα χαρακτηριστικά των ασθενών με σύνδρομο Prader Willi με άτυπη κλινική εικόνα και μοριακά ή κυτταρογενετικά ευρήματα, που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, ποικίλουν. Έχουν περιγραφεί παιδιά με ψυχοκινητική καθυστέρηση, δυσπλασίες των ώτων και των οφθαλμών, νευρολογικές διαταραχές (υποτονία κατά την νεογνική περίοδο), υπογοναδισμό και σκελετικές ανωμαλίες, χωρίς κανένα από αυτά να εμφανίζει παχυσαρκία (Schwartz et al, 1985). Ακόμη, πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν την ύπαρξη υποομάδας ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Prader Willi και μοριακά ευρήματα συνδρόμου Angelman (De Molfetta GA, 2002).

Στην παρούσα μελέτη, αξίζει να σημειωθεί η ανάγκη της ανάλυσης του προτύπου μεθυλίωσης στον ασθενή PW19, λόγω της βαρύτητας της κλινικής εικόνας. Ο ασθενής αυτός εκδήλωσε από μικρή ηλικία (5.5 μηνών) τυπικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Prader Willi, όπως μεγάλη υποτονία, μικροκεφαλία, στραβισμό καθώς και ανωμαλίες δερματογλυφικών. Όμως η μη διαθεσιμότητα βιολογικού υλικού από τους γονείς του ασθενούς, καθιστά αδύνατη την μελέτη πολυμορφικών θέσεων για τον έλεγχο ελλείμματος και μονογονεϊκής δισωμίας. Στην περίπτωση αυτή η μοριακή διάγνωση έγινε με την μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης της θέσης 15q11-q13, η οποία έδωσε θετικά ευρήματα, επιβεβαιώνοντας την κλινική εικόνα του ασθενούς.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η περίπτωση του ασθενούς PW16 στον οποίο η μοριακή μελέτη έδειξε την ύπαρξη μητρικής μονογονεϊκής δισωμίας σε ένα τμήμα του χρωμοσώματος 15 (segmental maternal UPD). Το τυπικό κλινικό χαρακτηριστικό του ασθενούς που παραπέμπει σε έλεγχο για σύνδρομο Prader Willi, αποτελεί η ήπια διανοητική καθυστέρηση που εκδηλώθηκε με την ύπαρξη μαθησιακών δυσκολιών. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ασθενούς αυτού δεν παραπέμπουν σε σύνδρομο Prader Willi, καθώς δεν υπήρχαν στοιχεία παχυσαρκίας και καθυστέρηση ανάπτυξης σε ηλικία 10 ετών. Εξάλλου όπως υποστηρίζεται από βιβλιογραφικά δεδομένα (Gunay- Aygun et al, 1997) η μέση ηλικία διάγνωσης του συνδρόμου σε ασθενείς με μονογονεϊκή δισωμία, είναι αρκετά μεγαλύτερη από την ομάδα των ασθενών με μοριακό εύρημα χρωμοσωμικό έλλειμμα (9 ετών έναντι 2 ετών για τα αγόρια). Όπως υποστηρίζεται από τους Gunay- Aygun et al, το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης τυπικών κλινικών χαρακτηριστικών στην κατηγορία των ασθενών με μονογονεϊκή δισωμία. Παρολαυτά, ασθενείς με

μονογονεϊκή δισωμία, εμφανίζουν υποτονία κατά την νεογνική ηλικία, χαρακτηριστικό που εμφανίστηκε και στον ασθενή PW16.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Οι ασθενείς της παρούσας μελέτης με χρωμοσωμικό έλλειμμα στην περιοχή 15q11-q13 στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο (ασθενείς AS3, AS4, AS5, AS6) είναι παιδιά ηλικίας από 15 μηνών έως 9 χρονών, τα οποία φέρουν τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman.

Μελέτες συσχέτισης γονοτύπου – φαινοτύπου για το σύνδρομο Angelman, έχουν δείξει ότι ασθενείς στους οποίους έχει ανιχνευθεί χρωμοσωμικό έλλειμμα, εμφανίζουν τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου και τον πιο βαρύ φαινότυπο. Μέσα σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η καθυστέρηση στη βάδιση, η απουσία ομιλίας και η μικροκεφαλία. Επίσης, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν την υψηλότερη συχνότητα σπασμών (90%) και υπομελάγχρωσης (90%) (Lossie et al, 2001). Ασθενείς στους οποίους έχει ανιχνευθεί πατρική μονογονεϊκή δισωμία και αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης, εμφανίζουν λιγότερο τυπικά χαρακτηριστικά και πιο ήπιο φαινότυπο (Lossie et al, 2001). Έχουν μικρότερη συχνότητα εμφάνισης υπομελάγχρωσης, μικροκεφαλίας και σπασμών ενώ έχουν καλύτερη ανάπτυξη (βάρους και ύψος).

Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς AS8 και AS50, στους οποίους ανιχνεύθηκε αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης, φέρουν τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου και εμφανίζουν βαρύ φαινότυπο. Η ανάλυση πολυμορφικών δεικτών για την ανίχνευση πιθανών ελλειμμάτων στην περιοχή 15q11-q13 δεν ήταν δυνατόν να δώσει αποτελέσματα (μη πληροφοριακή οικογένεια). Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να υποτεθεί ότι η μοριακή διαταραχή που εξηγεί το αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης, είναι χρωμοσωμικό έλλειμμα στην περιοχή 15q11-q13, το οποίο δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του ασθενούς AS7. Πρόκειται για ένα αγόρι ηλικίας 7 ετών, το οποίο εμφανίζει βαριά ψυχοκινητική καθυστέρηση που συνοδεύεται από τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου (ιδιόμορφο πρόσωπο). Η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη πατρικής μονογονεϊκής δισωμίας η οποία προέκυψε από ισοζυγισμένη μετάθεση των

χρωμοσωμάτων 15 {καρυότυπος ασθενούς: 45, XY, t (15; 15)}. Η περίπτωση αυτή υπογραμμίζει την ανάγκη συνδυαστικής μοριακής διάγνωσης. Η διαγνωστική προσέγγιση με την μέθοδο FISH {Fluorescence In Situ Hybridization, στην οποία πραγματοποιείται υβριδισμός κατάλληλου φθορίζον ανιχνευτή (SNRPN ONCOR) με την περιοχή SNRPN και μικροσκοπική παρατήρηση των σημάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού} στην περίπτωση του ασθενούς αυτού, έδωσε φυσιολογικό πρότυπο, δεδομένου ότι αποκάλυψε την «φυσιολογική» ύπαρξη δύο σημάτων στον πυρήνα των κυττάρων. Όμως, τα δύο σήματα προέρχονται από το μετατοπισμένο αλληλόμορφο 15, το οποίο αποκαλύφθηκε με την ανάλυση DNRP και το MSPCR.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ANGELMAN ΧΩΡΙΣ ΜΟΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ

Είκοσι ασθενείς με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman, για τους οποίους η ανάλυση πολυμορφικών δεικτών και η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης για την περιοχή 15q11-q13 δεν αποκάλυψε καμία μοριακή διαταραχή, μελετήθηκαν περαιτέρω προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A. Οι ασθενείς της παρούσας μελέτης εμφάνιζαν τυπικό φαινότυπο Angelman, με έμφαση που δόθηκε κυρίως στο ιστορικό σπασμών, στην διανοητική καθυστέρηση με προβλήματα λόγου, και στην μικροκεφαλία. Επίσης 2 / 20 ήταν παχύσαρκα (βλέπε παρακάτω Lossie et al, 2001).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.3β, 4-6% των ασθενών με σύνδρομο Angelman φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A ενώ το πρότυπο μεθυλίωσης στην περιοχή του SNRPN γονιδίου είναι φυσιολογικό. Υπάρχει και ένα σημαντικό ποσοστό (10-14%) ασθενών χωρίς μοριακά ευρήματα ακόμη και μετά την μελέτη του γονιδίου UBE3A. Ο μηχανισμός παθογένεσης στις περιπτώσεις αυτές παραμένει αδιευκρίνιστος. Πρόσφατη μελέτη από τους Lossie et al., έδειξε ότι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A, εμφανίζουν στατιστικά παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τους ασθενείς με χρωμοσωμικό έλλειμμα, εκδηλώνοντας τυπική κλινική εικόνα συνδρόμου Angelman (Lossie et al, 2001). Συγκεκριμένα έμφαση δίνεται στο ιστορικό σπασμών, στην σοβαρή διανοητική καθυστέρηση με προβλήματα λόγου, και στην μικροκεφαλία. Σε αντίστοιχη μελέτη, οι Moncla et al αναφέρουν ότι από τα τυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Angelman, οι ασθενείς

αυτοί εμφάνισαν ψυχοκινητική καθυστέρηση, χαρούμενη διάθεση, και διανοητική καθυστέρηση με σοβαρά προβλήματα λόγου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η πλειοψηφία των παραπάνω ασθενών, όπως αναφέρεται και στις δύο μελέτες, εμφάνισαν υψηλή συχνότητα παχυσαρκίας. Οι Lossie et al., προτείνουν τον έλεγχο για μεταλλάξεις στο γονίδιο UBE3A σε ασθενείς χωρίς άλλα μοριακά ευρήματα, οι οποίοι έχουν ιστορικό σπασμών και υψηλό BMI (Body Mass Index, Δείκτης Σωματικού Βάρους).

Σε κανέναν από τους ασθενείς αυτούς δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στα τέσσερα εξόνια του γονιδίου UBE3A που μελετήθηκαν. Ο ασθενής (AS18) στον οποίον ανιχνεύθηκε η αντικατάσταση IVS12- 13T > G παρουσιάζει τυπικά χαρακτηριστικά συνδρόμου Angelman. Συγκεκριμένα, εμφανίζει βαριά ψυχοκινητική καθυστέρηση με σοβαρά προβλήματα ομιλίας. Κινείται με στερεότυπες κινήσεις των χεριών ενώ εμφανίζει την χαρακτηριστική χαρούμενη διάθεση. Έχει μεγάλο στόμα, ανωμαλίες δερματογλυφικών και ανοικτό χρώμα ματιών. Η αντικατάσταση IVS12- 13T > G που εντοπίστηκε στον ασθενή αυτόν, θα μπορούσε να σχετίζεται με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Χρειάζεται όμως επιπλέον μελέτη, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν πρόκειται για κάποια πολυμορφική θέση που συναντάται στον γενικό πληθυσμό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Η μοριακή μελέτη των συνδρόμων Prader Willi και Angelman απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή τόσο στην επιλογή των μεθόδων που χρησιμοποιούνται όσο και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι απαραίτητη η συνδυαστική εφαρμογή τουλάχιστον δύο μεθόδων για την αξιόπιστη μοριακή διάγνωση των συνδρόμων. Η μέθοδος MSPCR μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Όμως, οι ιδιαιτερότητες της μεθόδου και η εξαιρετικά ευαίσθητη διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA, απαιτούν συχνά την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτής με την χρήση και κάποιας άλλης μοριακής μεθόδου (ανάλυση δινουκλεοτιδικών πολυμορφικών θέσεων – DNTPs-, FISH). Η προσπάθεια βελτίωσης των συνθηκών της μεθόδου MSPCR και η δυνατότητα χρησιμοποίησης εναλλακτικών ζευγών εκκινήτων, θα βελτίωνε σε σημαντικό βαθμό την αξιοπιστία της μεθόδου.

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του UBE3A γονιδίου είναι απαραίτητη σε εκείνες τις περιπτώσεις των ασθενών με πιθανό σύνδρομο Angelman, στους οποίους δεν έχει ανιχνευθεί κάποια άλλη μοριακή διαταραχή (έλλειμμα, μονογονεϊκή δισωμία ή αλλοιωμένο πρότυπο μεθυλίωσης).

Η περαιτέρω μελέτη των αδιευκρίνιστων περιπτώσεων συνδρόμου Angelman , θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό παθογένεσης του συνδρόμου. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να προσανατολισθεί προς την εξέταση και άλλων γονιδίων της περιοχής 15q11-q13, όπως στο γονίδιο ATP10C, για το οποίο πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν πιθανή συσχέτιση με το σύνδρομο Angelman.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα θηλαστικά, και οι δύο γονείς συνεισφέρουν ισότιμα στην μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας στους απογόνους. Τα περισσότερα αυτοσωμικά γονίδια εκφράζονται από το μητρικό και από το πατρικό αλληλόμορφο.

Υπάρχει όμως μια κατηγορία γονιδίων που εκφράζονται από το ένα μόνο αλληλόμορφο (μητρικό ή πατρικό) με έναν γονεϊκό εξαρτώμενο τρόπο. Τα γονίδια αυτά ονομάζονται αποτυπωμένα γονίδια (imprinted genes) και αποκτούν την γονιδιακή αποτύπωση κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Κύριο ρόλο στην διαδικασία της γονιδιακής αποτύπωσης παίζει η μεθυλίωση του DNA. Διαταραχή στην εδραίωση (establishment) ή την διατήρηση (maintenance) του γονιδιακού αποτυπώματος έχει σοβαρές συνέπειες στην γονιδιακή έκφραση και ευθύνεται για έναν αριθμό γενετικών διαταραχών (Mellissa et al., 1999).

Τα σύνδρομα Prader Willi και Angelman αποτελούν δύο, κλινικά, διαφορετικές αναπτυξιακές και νευρολογικές διαταραχές, οι οποίες προκύπτουν από την απώλεια έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων της χρωμοσωμικής περιοχής 15q11-q13. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των δύο συνδρόμων διαφοροποιούνται ανάλογα με την γονεϊκή προέλευση του αλλοιωμένου αλληλομόρφου. Απώλεια της γονιδιακής έκφρασης της περιοχής 15q11-q13 του πατρικού αλληλομόρφου οδηγεί στην εκδήλωση του συνδρόμου Prader Willi, ενώ αντίστοιχα απώλεια των αποτυπωμένων γονιδίων της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής στο μητρικό αλληλόμορφο, αποτελεί την αιτία εμφάνισης του συνδρόμου Angelman.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την απώλεια της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων στην περιοχή 15q11-q13, είναι σχεδόν πανομοιότυποι στα δύο σύνδρομα και αφορούν μεγάλα χρωμοσωμικά ελλείμματα (70% των ασθενών με σύνδρομο Prader Willi και 65- 70% των ασθενών με σύνδρομο Angeman), μονογονεϊκή δισωμία (μητρική μονογονεϊκή δισωμία 15- mUPD15- σε 25-30% ασθενών με Prader Willi, και πατρική μονογονεϊκή δισωμία 15 - pUPD15- σε 3- 5% ασθενών με Angelman), μεταλλάξεις ή μικρά χρωμοσωμικά ελλείμματα στην περιοχή του κέντρου γονιδιακής αποτύπωσης (1- 3% σε ασθενείς με Prader Willi, και 7- 9% σε ασθενείς με Angelman) και χρωμοσωμικές ανακατατάξεις (<1% σε ασθενείς με Prader Willi και Angelman).

Τελευταία έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο αποτυπωμένο γονίδιο UBE3A οι οποίες φαίνεται να συσχετίζονται άμεσα με την κλινική εικόνα του συνδρόμου Angelman, και ευθύνονται για ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών (4-6%). Αντίστοιχες μεταλλάξεις που να αφορούν το σύνδρομο Prader Willi δεν έχουν βρεθεί. Η μοριακή διάγνωση των συνδρόμων βασίζεται στην μελέτη πολυμορφικών δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων (DNRPs)- μέθοδος με την οποία αποκαλύπτονται ελλείμματα και μονογονεϊκή δισωμία- στην ανίχνευση χρωμοσωμικών ανακατάξεων και μικρών ελλειμμάτων με την μεθοδο FISH , και στην μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης με την μέθοδο της χημικής τροποποίησης του DNA και του methylation specific PCR (MSPCR).Όπως προκύπτει από την μοριακή ανάλυση των δύο συνδρόμων, **η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης μπορεί να ανιχνεύσει όλες τις περιπτώσεις του συνδρόμου Prader Willi και το 80% περίπου των ασθενών με σύνδρομο Angelman, ενώ μπορεί να παρέχει ασφαλή μοριακή διάγνωση στις περιπτώσεις που οι υπόλοιπες μέθοδοι αδυνατούν.**

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε μία αντικατάσταση βάσης στο ιντρόνιο 12 του UBE3A γονιδίου σε έναν ασθενή με σύνδρομο Angelman, χωρίς έλλειμμα, μονογονεϊκή δισωμία ή άλλη χρωμοσωμική διαταραχή. Η αλλαγή **IVS2650- 13T > G**, αφορά αντικατάσταση θυμίνης (T) από γουανίνη (G) στην θέση 13 του ιντρονίου 12. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τέτοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί για διάφορα γονίδια, και προκαλούν την παραγωγή ενός μη φυσιολογικού ώριμου mRNA , το οποίο συχνά οδηγεί στο σχηματισμό μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος (Antonarakis S. and Cooper D.) Περαιτέρω μελέτη απαιτείται γύρω από την αλλαγή **IVS2650- 13T > G**, προκειμένου να αποκλεισθεί η περίπτωση να πρόκειται για κάποιον γενετικό πολυμορφισμό, ενώ μελέτες έκφρασης θα δώσουν πληροφορίες για το πρωτεϊνικό προϊόν που προκύπτει και πιθανόν είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση του συνδρόμου Angelman.

ABSTRACT

In mammals, both parents contribute equal genetic information to their offspring. Most autosomal genes will be expressed from both the maternal and paternal alleles. Instead, there is a group of genes that are expressed from only one of the two alleles in a parent-of-origin-dependent manner. These genes are designated as **imprinted** since they retain the parental identity they acquired during gametogenesis. Major role in imprinting procedure plays the methylation of DNA. Deviation from appropriate parent-of-origin-dependent expression may have dire consequences for the organism (Mellissa et al, 1999).

The Prader-Willi (PWS) and Angelman (AS) syndromes are clinically distinct development and neurobehavioural entities that result from the **loss of imprinted gene expression within chromosome region 15q11-q13**: deletions on the paternal chromosome cause PWS, whereas those on the maternal chromosome cause AS.

The molecular mechanisms responsible for the loss of imprinted gene expression in 15q11-q13 region are quite similar for the two syndromes, including large deletions (70% of Prader Willi patients and 65- 70% of Angelman patients), uniparental disomy (maternal uniparental disomy 15 in 25-30% of Prader Willi patients and paternal uniparental disomy 15 in 1-3% of Angelman patients), and rare chromosomal rearrangements (< 1% in Prader Willi and Angelman syndrome patients). Lately, mutations in the UBE3A gene have been found and have been correlated with the clinical manifestations of Angelman syndrome. Such mutations concerning Prader Willi have not been reported.

Molecular diagnosis of the two syndromes includes the study of dinucleotide repeat polymorphisms (DNRPs)- method that determines large deletions and uniparental disomy- , the detection of chromosomal rearrangements and small deletions using FISH method (Fluorescence in situ hybridization), and the study of methylation imprinting pattern using the bisulfite DNA modification method followed by methylation specific PCR (MSPCR). Molecular analysis of the two syndromes has revealed that MSPCR can detect the whole of the Prader Willi cases and 80% of Angelman syndrome cases, while it can provide safe molecular diagnosis for the cases where the other molecular methods cannot.

In the present study, we identified a base substitution in intron 12 of the UBE3A gene in one Angelman syndrome patient, with no deletion, no UPD or chromosomal

rearrangements. The substitution is a T to G change, IVS2650- 13T> G, and results in the formation of a possible new donor splice site. According to the bibliography, such mutations have been found in several genes and result in the formation of an abnormal mRNA, which can lead to the production of a non- functional protein product (Antonarakis S. and Cooper D.) Further analysis of this substitution should be performed in order to exclude the possibility of a genetic polymorphism; additional expression studies would provide information on the protein product of this mutated gene, its function, and its possible relation to the Angelman syndrome phenotype.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997). Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* 17 (1): 75- 78
2. Amir RE, Van dVI, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X- linked MECP-2, encoding methyl- CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23: 185- 1888
3. Amos- Landgraf JM, Ji Y, GottliebW, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999).Chromosome breakage in the Prader Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints.*Am J Hum Genet* 65 (2):370-386
4. Angelman H (1965). “Puppet children”: a report of three cases. *Dev Med Child Neurol* 7: 681- 688
5. Antequera F, Bird A (1993). Number of CpG islands and genes in humans and mouse. *PNAS* 90: 11995- 11999
6. Antonarakis S and Cooper D. Mutation in Human Genetic Disease. *Encyclopedia of the human genome/ 2003 Macmillan publishers Ltd (www.ehgonline.net)*
7. Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395- 2402
8. Bruniquel D, Scwartz RH (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin- 2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol* 4: 235-240

9. Buiting K, Dittrich B, Gross S, et al. (1998). Sporadic imprinting defects in Prader- Willi and Angelman syndrome: Implications for imprint- switch models, genetic counseling, and prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet* 63: 170- 180
10. Buiting K, Gross S, Lich C, Gillissen- Kaesbach G, RI- Maarri O, Horsthemke B (2003). Epimutations in Prader- Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 72: 571- 577
11. Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B (1999). A 5- Kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880bp. *Hum Genet* 105: 665- 666
12. Burger J, Buiting K, Dittrich B, Gross S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, et al (1997). Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 88- 93
13. Cassidy SB (1997). Prader Willi syndrome. *J Med Genet* 34: 917- 923
14. Cattanach B, Jacquelin B, Evans E, Burtenshaw M, Beechey C, Leff S, Brannan C, Copeland N, Jenkins N, Jones J (1992). A candidate mouse model for Prader Willi syndrome which shows an absence of Snrpn expression. *Nat Genet* 2: 270- 274
15. Clayton-Smith J, Pembrey ME (1992). Angelman syndrome. *J Med Genet* 29: 412- 415
16. Cooper EM, Hudson AW, Amos J, Wagstaff J, Howley M (2004). Biochemical analysis of Angelman syndrome- associated mutations in the E3 Ubiquitin Ligase E6- associated protein. *J Biol Chem* 279 (39): 41208- 41217
17. De Molfetta GA, Felix TM, Riegel M, Ferraz VE, de Pina Neto JM (2002). A further case of a Prader Willi syndrome phenotype in a patient with Angelman syndromemolecular defect. *Arq Neuropsiquiatr* 60(4): 1011- 1014

18. Engel Eric (1980). A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6: 137- 143
19. Engel E and Antonarakis SE. Genomic imprinting and uniparental disomy in Medicine: Clinical and Molecular aspects (Text book)
20. Fang P, Lev- Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliff JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers- Heijboer H, Langlois S, Graham Jr JM, Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH, Beaudet AL (1999). The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Human Mol Genet* 8 (1): 129- 135
21. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hyghes- Davies L, Kouzarides T (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genet* 24: 88- 91
22. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31: 175- 179
23. Gillissen- Kaesbach G, Robinson W, Lohmann D, Kaya- Westrlöh S, Passarge E, Horsthemke B (1995). Genotype- phenotype correlation in a series of 167 deletion and non- deletion patients with Prader Willi syndrome. *Hum Genet* 96: 638- 643
24. Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, Nicholls RD (1997). Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader- Willi and Angelman syndromes. *Molecular Human Reproduction* 3 (4): 321- 332
25. Glenn CC, Porter KA, Jong MT, Nicholls RD, Driscoll DJ (1993). Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene. *Hum Mol Genet* 2 (12): 2001- 2005

26. Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999). An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *PNAS* 96 (10):5616- 5621
27. Gunay- Aygun M, Heeger S, Schwartz S, Cassidy SB (1997). Delayed diagnosis in patients with Prader Willi syndrome due to maternal uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* 71 (1): 106- 110
28. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996). Methylation- specific PCR: A novel PCR approach for methylation status of CpG islands. *PNAS* 93: 9821- 9826
29. Herzing LB, Kim SJ, Cook EH Jr, Ledbetter DH (2001). The human aminophospholipid- transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibit similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* 68 (6) :1501- 1505
30. Hsien CL (1994). Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 14: 5
31. Hsien CL (1999). Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. *Mol Cell Biol* 19 (1): 46- 56
32. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10: 4129- 4135
33. Jaenish R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 (Suppl): 245- 254
34. Jiang Y, Tsai TF, Bressler J, Beaudet AL (1998). Imprinting in Angelman and Prader Willi syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 8: 334- 342
35. Jiang YH, Lev- Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL (1999).

36. Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, et al (1999b). Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* 8: 795- 803
37. Jong MT, Gray TA, Ji Y, et al (1999a). A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 8: 783- 793
38. Kantor B, Kaufman Y, Makedonski K, Razin A, Shemer R (2004). Establishing the epigenetic status of the Prader- Willi/ Angelman imprinting centre in the gametes and embryo. *Hum Mol Genet* 13 (22): 2767- 2779
39. Kantor B, Makedonski K, Green- Finberg Y, Shemer R, Razin A (2004). Control elements within the PWS/ AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet* 13 (7): 751- 762
40. Killian K. Genomic imprinting: parental differentiation of the genome. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* (2005)
41. Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J (1997). UBE3A/ E6- AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 15: 70- 73
42. Kishino T, Wagstaff J (1998). Genomic organization of the UBE3A/ E6-AP gene and related pseudogenes. *Genomics* 47: 101- 107
43. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH (1997).
44. Methylation- specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nature Genet* 16: 16- 17
45. Leff S, Brannan C, Reed M, Ozcelik T, Francke U, Copeland N, Nancy J (1992). Maternal imprinting of the mouse Snrpn gene and conserved linkage homology with the human Prader Willi region. *Nat Genet* 2: 259- 264

46. Li E, Beard C, Jaenish R (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366: 362- 365
47. Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, Dong HJ, Chen P, Theriaque D, Hutson A, Nicholls RD, Zori RT, Williams CA, Driscoll DJ (2001). Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* 38: 834- 845
48. Malzac P, Webber H, Moncla A, Graham JM, Jr., Kukolich M, Williams C, Pagon RA, Ramsdell LA, Kishino T, Wagstaff J (1998). Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1353- 1360
49. Mann MRW, Bartolomei MS (1999). Towards a molecular understanding of Prader- Willi and Angelman syndromes (Review). *Hum Mol Genet* 8 (10): 1867- 1873
50. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjard RJ, Jiang Y, Benton CS, Rommens JM, Beaudet LA (1997). De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin- protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nature Genet* 15: 74- 77
51. Mattei J, Mattei M, Ayme S, Giraud F (1979). Origin of the extra chromosome in trisomy 21. *Hum Genet* 46: 107- 110
52. Mayer W, Nivelau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501- 502
53. McGrath J and Solter D (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37 (1):179- 183
54. Meehan RR (2003).DNA methylation in animal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14: 53- 65
55. Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M (2001). A novel maternally expressed gene , ATP10C, encodes a putative

aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* 28 (1): 19- 20

56. Moncla A, Malzac P, Livet MO, Voelckel MA, Mancini J, Delaroziere JC, Philip N, Mattei JF (1999). Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counseling. *J Med Genet* 36: 554- 560

57. Monk M, Boubelic M, Lehnert S (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99: 371- 382

58. Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG (2005). A census of mammalian imprinting. *Trends in GENETICS* 21 (8): 457- 465

59. Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1999). The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 19: 1182- 1189

60. Neumann B, Barlow DP (1996). Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development* 6: 159- 163

61. Neumann B, Kubicka P, Barlow DP (1995). Characteristics of imprinted genes. *Nature Genet* 9: 12- 13

62. NEUROGENETICS '99, Genetics of Angelman syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1- 6

63. Nicholls R, Knoll J, Butler M, Karam S, Lalande M (1989). Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader Willi syndrome. *Nature* 342: 281- 285

64. Nicholls R, Pai GS, Gottlieb W, Cantu ES (1992). Paternal uniparental disomy of chromosome 15 in a child with Angelman syndrome. *Ann Neurol* 32 (4): 512- 518
65. Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll J, Cassidy SB, Horsthemke, Nicholls R (1999). Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* 64: 385- 396
66. Oswald J, Engemann S, Lane N, et al (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10: 475- 478
67. Paulsen M, Ferguson- Smith AC (2001). DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease (Review). *J Pathol* 195: 97- 110
68. Pembrey M, Fennell SJ, Berghe JVD, Fitchett M, Summers D, Butler L, Clarke C, Griffiths M, Thompson E, Super M, Baraitser M (1989). The association of Angelman' s syndrome with deletions within 15q11-q13. *J Med Genet* 26: 73- 77
69. Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R (2002). The imprinting mechanism of the Prader Willi/ Angelman regional control center. *Embo J* 21(21): 5807- 5814
70. Rapakko K, Kokkonen H, Leisti J (2004). UBE3A gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by Conformation Sensitive Gel Electroforesis. *American Journal of Medical Genetics* 126A: 248248- 252
71. Razin A, Riggs AD (1980). DNA methylation nd gene function. *Science* 210: 604- 610
72. Razin A, Shemer R (1995). DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 4: 1751- 1755
73. Reik W, Dean W, Walter J (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089- 1093

74. Reik W, Walter J (2001). Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2: 21- 32
75. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefman M, Horsthemke B, Buiting K (2001). 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* 10 (23): 2687- 2700
76. Runte M, Kroisel PM, Gillessen- Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2004). SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 114: 553- 561
77. Russo S, Cogliati F, Viri M, Cavalleri F, Selicorni A, Turolla L, Belli S, Romeo A, Larizza L (2000). Novel mutations of Ubiquitin protein ligase 3A gene in Italian patients with Angelman syndrome.
78. Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, Konig R, et al. (1996). Minimal definition of the imprinting centre and fixation of a chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *PNAS* 93: 7811- 7815
79. Saitoh S, Harada N, Jinno Y, Hashimoto K, Imaizumi K, et al. (1994). Molecular and clinical study of 61 Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* 52: 158- 163
80. Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J (1987). DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev* 1: 1039- 1046
81. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D' Esposito M (2005). DNA Methylation 40 years later: its role in human health and disease. *J Cell Physiol* 204: 21- 35

82. Schwartz S, Max S, Panny S, Cohen M (1985). Deletions of proximal 15q and non- classical Prader- Willi syndrome phenotypes. *Am J Med Genet* 20: 255- 263
83. Schweizer J, Zynger D, Francke U (1999). In vivo nuclease hypersensitivity studies reveal multiple sites of parental origin- dependent differential chromatin conformation in the 150Kb SNRPN transcription unit. *Human Mol Genet* 8: 555- 566
84. Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548- 550
85. Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, et al. (1994). Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 8: 52- 58
86. Tate PH, Bird AP (1993). Effects of DNA methylation on DNA- binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 226- 231
87. Tsai TF, Raas- Rothschild A, Ben- Neriah Z, Beaudet AL (1998). Prenatal diagnosis and carrier detection for a point mutation in UBE3A causing Angelman syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1561- 1563
88. Ward A, Dutton JR (1998). Regulation of the Wilms tumor suppressor (WT1) gene by an antisense RNA: a link with genomic imprinting? *J Pathol* 185: 342- 344
89. Wevrick R, Kerns JA, Francke U (1994). Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader- Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* 3: 1877- 1882
90. Williams CA, Angelman H, Clayton- Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J et al., (1995). Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* 56 (2): 237- 238

91. Williams CA, Angelman H, Clayton- Smith J, et al. (1995). Angelman syndrome: consensus for diagnosis criteria. *Am J Med Genet* 56: 237- 243

92. Yamamoto Y, Huibregtse JM, Howley PM (1997). The human E6- AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* 41: 263- 266

93. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335- 340