



**ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΝΩΤΙΑΙΑΣ ΜΥΪΚΗΣ ΑΤΡΟΦΙΑΣ ΜΕ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ PCR ΣΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

**Γ. Κ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΑΣΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΕΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΖΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ. ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ·
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΘΕΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ· ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Κάλβου και Κοντογιάννη 13, Λυκόβρυση 14123, Αθήνα
Τηλ.: +30 210 280 1032, +30 698 982 6110
Φαξ: +30 210 807 4586
e-mail: george.konstantinidis@hotmail.com

Κωνσταντινίδης Γιώργος

Ημερομηνία Γέννησης: 7 Ιαν. 1967.

Οικογενειακή Κατάσταση: Έγγαμος, 1 κόρη.

Επαγγελματική Εμπειρία

MetLife Alico (2012-), Αθήνα.
Ασφαλιστικός Σύμβουλος.

CHOES Ltd. (2011-2012), Αθήνα.
Διευθυντής Πωλήσεων και Υποστήριξης Χρηστών.

Thea-Synapsis ΕΠΕ (2010-2011), Αθήνα.
Επιστημονικός Συνεργάτης.

Zeincro Hellas CRO (2008-2009), Αθήνα.
Προϊστάμενος Ελλάδας, Τμήμα Κλινικών Μελετών Φάσης IV.

Aventis Pharma (2001-2005), sanofi-aventis (2005-2008), Αθήνα.
Επιτηρητής Κλινικών Μελετών, Ιατρικό Τμήμα.

Α' Παιδιατρική Κλινική Παν/μίου Αθηνών-Τμήμα Γενετικής (1998-2001).
Άμισθος Επιστημονικός Συνεργάτης.

Στρατιωτική Θητεία, 1996-1997
Έφεδρος Επιλοχίας, Β' Μοίρα Καταδρομών.

Επιλεγμένη Επαγγελματική Εκπαίδευση

Σεμινάριο Ιατροφαρμακευτικού Μάρκετινγκ, Zeincro Hellas, 16-17 Οκτ. 2008, Αθήνα.

MCE (Management Center Europe): «Βασικές Αρχές του Μάρκετινγκ», 7-10 Δεκ. 2004, Βρυξέλλες, Βέλγιο.

Σπουδές

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής.
Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής.

Florida International University, Miami FL, Η.Π.Α.
B.Sc. Βιολογικών Επιστημών.

Γλώσσες

Άπταιστη γνώση της Αγγλικής
Μέτρια γνώση της Γερμανικής.

Δραστηριότητες ελεύθερου χρόνου

Τέννις, Σκι.

ΗΜ/ΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:03.06.1998

ΗΜ/ΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 12.10.1998

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Αικατερίνη Μεταξωτού, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής-Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΗΜ/ΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 08.02.1999

ΗΜ/ΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 01.02.2013

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Αικατερίνη Μεταξωτού, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής-Διευθυντής Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Χρυσάνθη Τζουμάκα Μπακούλα, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Ανδρέας Φρετζάγιας, Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωνσταντίνος Σπέγγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	8
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. NMA: ΤΟ ΝΟΣΗΜΑ.....	11
1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	11
1.1.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ.....	12
1.1.2.i. ΤΥΠΟΣ I.....	14
1.1.2.ii ΤΥΠΟΣ II.....	16
1.1.2.iii ΤΥΠΟΣ III.....	17
1.1.2.iv ΤΥΠΟΣ IV.....	18
1.1.2.v ΑΤΥΠΗ NMA.....	18
1.1.3. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ SMA.....	22
1.1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	25
1.2. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ SMN.....	26
1.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ.....	35
1.4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ.....	37
1.5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	39
1.6. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ.....	44
1.7. SMN1 de novo ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ.....	45
1.8. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	46
1.9. ΠΡΩΤΕΙΝΗ SMN.....	48
1.10. ΤΟ SMN ΣΥΜΠΛΟΚΟ.....	53
1.10.1. ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	54
1.11. ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	58
1.12. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	61

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	63
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	64
3. ΥΛΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	68
3.1. ΥΛΙΚΟ	68
3.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	68
3.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ,	70
3.3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	72
3.3.1. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA	72
3.3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	75
3.3.3. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ PCR	78
3.3.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	98
3.4. ΣΥΣΤΑΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	99
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	100
4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ	100
4.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ PCR	114
4.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ MLPA ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	116
4.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ MLPA ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ Γ.Π.	120
4.5. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΝΩΣΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ	122
4.6. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ	123
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
5.1. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΗ ΝΟΣΟ NMA	124
5.2. ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ	126
5.3. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	130
5.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ	131
5.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ SMN2	133
5.6. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΦΟΡΕΩΝ	134
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	136

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή είχε στόχο την εφαρμογή και αξιολόγηση μιας αξιόπιστης μεθόδου για την ανίχνευση φορέων νωτιαίας μυϊκής ατροφίας στο γενικό πληθυσμό. Η νωτιαία μυϊκή ατροφία αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα νόσημα στην Ευρώπη και τρίτο στην Ελλάδα που κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η βαρύτητα της νόσου καθώς και η σχετικά μεγάλη συχνότητα των φορέων στο γενικό πληθυσμό ευνοούν την προοπτική εφαρμογής της παρούσας μελέτης σε μεγάλη επιδημιολογική κλίμακα.

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τη μελέτη του θέματος μου ανέθεσε η Καθηγήτρια Γενετικής κ. Αικ. Μεταξωτού στην οποία και από αυτή τη θέση θέλω να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες και την βαθύτατη ευγνωμοσύνη γιατί με δέχτηκε στο Εργαστήριο και μου έδειξε μεγάλη εμπιστοσύνη.

Στην ολοκλήρωση της μελέτης συνέβαλαν οι ακόλουθοι Καθηγητές και συνεργάτες στους οποίους έχω την ηθική υποχρέωση να ευχαριστήσω:

Το Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενετικής Καθηγητή κ. Εμμ. Καναβάκη, ο οποίος ως μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, συνέβαλε καταλυτικά στο σχεδιασμό της διατριβής, με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκειά της και μου έδωσε την ευκαιρία να τη συνεχίσω και να την ολοκληρώσω.

Την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Αρ. Μαύρου, επιβλέπουσα της μελέτης, για τον σχεδιασμό, την αξιολόγηση των ευρημάτων, τα εύστοχα σχόλιά της καθ' όλη

τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης, καθώς επίσης και για τη συμβολή της στη συγγραφή.

Τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τη συμμετοχή στη διαδικασία κρίσης της διατριβής μου.

Την Δρ. κ. Κ. Κέκου, η οποία με εκπαίδευσε στις εξειδικευμένες τεχνικές που απαιτούσε η μελέτη, και συνέβαλε καθοριστικά σε όλη την ερευνητική διαδικασία, στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή της μελέτης.

Τη Δρ. Α. Κολιαλέξη και τη Δρ Χ. Σοφοκλέους για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Ιδιαίτερως θέλω να ευχαριστήσω, το Βιολόγο κ. Ν. Βογιατζάκη και το Χημικό κ. Δ. Πετυχάκη, οι οποίοι με εκπαίδευσαν στην τεχνική MLPA και συνέβαλαν σημαντικά στην τελική πειραματική φάση της μελέτης. Την Επ. Καθηγήτρια κ. Μ. Τζέτη για τη βοήθειά της στην επιλογή των εκκινητών εσωτερικού ελέγχου.

Την Αν. Καθηγ., Κλινική Γενετίστρια κ. Ε. Φρυσίρα, τον Υφηγητή κ. Σ. Γιουρούκο, το Διευθυντή του Νευρολογικού Τμήματος κ. Κ. Σκιαδά, καθώς και όλους τους Νευρολόγους, για την συνεργασία τους στην παραπομπή των ασθενών και των οικογενειών τους που μαζί με την εμπιστοσύνη τους, προσέφεραν υλικό για τη διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της μελέτης.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για το καλό κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια της εκεί θητείας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω σε όσους με υποστήριξαν καθημερινά: Την σύζυγό μου και συνοδοιπόρο στη ζωή μου Ντόρα που παρ' όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα με παρότρυνε να συνεχίσω, τον αδελφό μου κ. Μ. Κωνσταντινίδη, Οικονομολόγο. Τον πεθερό μου κ. Ε. Παπαχρυσάνθου, Βιοτέχνη και την πεθερά μου κ. Α. Παπαχρυσάνθου. Τον αδελφικό και πολυαγαπημένο παιδικό μου φίλο, κ. Γ. Κολιόπουλο, Νομικό Σύμβουλο, για την ειλικρινή, ανιδιοτελή και παντοτινή του φιλία. Τον παιδικό μου φίλο, Δρα Ν. Μαυροειδή για την ηθική του υποστήριξη.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω αυτή τη διατριβή σε τρεις ανθρώπους που χρωστάω την ύπαρξή μου: Την Μητέρα μου Δρ. Α. Μοσχονά-Κωνσταντινίδου, Ιατρό Καρδιολόγο και τον αείμνηστο Πατέρα μου Καθηγητή Κ. Κωνσταντίνιδη, Παθολόγο-Πυρηνικό Ιατρό, οι οποίοι με αμέτρητες θυσίες με μεγάλωσαν. Την κόρη μου Αθηνούλα, που κοιτάζοντάς την, αντλώ καθημερινά τη δύναμη και το κουράγιο που χρειάζομαι για να αγωνιστώ σε όλους τους τομείς της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA: Spinal Muscular Atrophy, SMA) αποτελεί μία από τις πιο συχνές αιτίες βρεφικής θνησιμότητας οφειλόμενη σε γενετικούς παράγοντες και είναι το δεύτερο σε συχνότητα νόσημα στην Ευρώπη που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, μετά την ινοκυστική νόσο. Η νόσος εμφανίζεται στη βιβλιογραφία με συχνότητα ασθενών 1/6000 έως και 1/10000 και συχνότητα φορέων περίπου 1/45. Το νόσημα αποτελεί μια σοβαρή νευρομυϊκή πάθηση που οφείλεται σε εκφυλισμό των προσθίων κεράτων των κινητικών νευρώνων, γεγονός που προκαλεί προοδευτική ατροφία των εγγύς μυών, παράλυση, και αναπνευστική ανεπάρκεια. Οι ασθενείς ανάλογα με την ηλικία έναρξης της ασθένειας, την κλινική βαρύτητα και το χρόνο επιβίωσης, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: Τον τύπο I (Werdnig-Hoffmann, MIM: 253300) με την βαρύτερη κλινική εικόνα και με χρόνο επιβίωσης έως και τα δύο έτη, τον τύπο II (MIM: 253400) με ενδιάμεση βαρύτητα και ηλικία έναρξης μέχρι τους 18 μήνες και το τύπο III (Kugelberg-Welander, MIM: 253400) με την ηπιότερη εικόνα και ηλικία έναρξης μετά τους 18 μήνες.

Οι τρεις κλινικές μορφές της νόσου, οφείλονται στο 95% των περιπτώσεων σε ομόζυγη έλλειψη στο γονίδιο *SMN1* (Survival motor Neuron Gene 1, MIM# 600354) το οποίο εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q13. Στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή εντοπίζεται το γονίδιο *SMN2* (MIM# 601627) που διαφέρει από το *SMN1* μόνο σε 5 βάσεις από τις οποίες οι 2 εντοπίζονται στο εξώνια 7 και 8 και στις οποίες διαφορές βασίζεται η ανάλυση DNA για το

διαχωρισμό των δύο γονιδίων. Οι τεχνικές διάγνωσης της νόσου βασίζονται στην εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction) και περαιτέρω διάκριση των προϊόντων *SMN1* και *SMN2* με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Εξαιτίας της βαρύτητας της νόσου αλλά και της μεγάλης συχνότητας φορέων για ένα γενετικό νόσημα η ανίχνευση φορέων στο γενικό πληθυσμό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πρόληψη του νοσήματος και τη γενετική καθοδήγηση. Επιπλέον το γεγονός ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων ανιχνεύεται μία μόνο γονιδιακή μετάλλαξη που είναι η ομόζυγη έλλειψη των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου *SMN1*, οδήγησε σε προσπάθειες ποσοτικής εκτίμησης των αντιγράφων του γονιδίου. Κάθε ασθενής με SMA διατηρεί όμως και ένα τουλάχιστον ομόλογο αντίγραφο *SMN2* γεγονός που δυσκολεύει την ανίχνευση ετεροζυγωτών. Το ομόλογο γονίδιο *SMN2*, αν και μεταφράζεται, εξαιτίας μιας σημειακής μετάλλαξης στο εξώνιο 7 κωδικοποιεί mRNA με παράλειψη του εξωνίου 7 και ως εκ τούτου η παρουσία του δεν προκαλεί νόσο.

Από το 1995 που ταυτοποιήθηκε το γονίδιο *SMN1* έχουν αναπτυχθεί μια σειρά πρωτοκόλλων για την ανίχνευση φορέων που όμως τα περισσότερα περιλαμβάνουν πολύπλοκα βήματα με πιθανότητα σφάλματος για το καθένα εξ αυτών και ως εκ τούτου απαιτείται η καθιέρωση ενός έγκυρου τρόπου ανίχνευσης φορέων. Πρόσφατα αναφέρονται αυτοματοποιημένη προσέγγιση στην ανίχνευση φορέων (ανίχνευση έλλειψης σε ετεροζυγωτία) με την εφαρμογή σύγχρονων μεθοδολογιών βασισμένα σε αυτοματοποιημένη ανάλυση όπως είναι η τεχνική DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), Real Time PCR και πρόσφατα η τεχνική MLPA (Multiple Ligation-Probe Amplification).

Στην προτεινόμενη εργασία εφαρμόστηκαν και συγκρίθηκαν δύο προσεγγίσεις για την ποσοτική εκτίμηση των αντιγράφων *SMN* α) με τη χρήση ενός εσωτερικού δείγματος ελέγχου που σχεδιάστηκε ειδικά για τη μελέτη με ανάλυση σε αυτόματο αναλυτή και β) εφαρμογή της τεχνικής MLPA συγκρίνοντας και τα δύο εμπορικά προϊόντα που συστήνονται για την ανίχνευση φορέων στην SMA (P021 και P061, SALSA MRC, Holland). Οι τεχνικές εφαρμόστηκαν σε άτομα υποχρεωτικούς φορείς της νόσου (γονείς που απέκτησαν πάνω από ένα παιδί με νόσο SMA) και στη συνέχεια η τεχνική που επιλέχθηκε εφαρμόστηκε σε 156 άτομα του γενικού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η τεχνική MLPA υπερτερεί του απλού συγκριτικού ελέγχου με ένα εσωτερικό προϊόν το οποίο εμφανίζει ως κυριότερο μειονέκτημα τη μη επαναληπτικότητα, εξαιτίας κυρίως της ευαισθησίας που εμφανίζει ως προς το υπόστρωμα (DNA) που πολλαπλασιάζεται. Επίσης το εμπορικό σύστημα P021 εμφανίζεται να υπερτερεί του προϊόντος P061, διότι δίνει χρήσιμες πληροφορίες που αφορούν και τον αριθμό των αντιγράφων *SMN2* τα οποία επηρεάζουν τη βαρύτητα της νόσου.

Η διερεύνηση φορείας στο γενικό πληθυσμό αποκάλυψε 3 φορείς έλλειψης των εξωνίων 7 και 8 σε 156 άτομα μη συγγενικά μεταξύ τους από όλη την Ελλάδα (1,93%), ποσοστό που πλησιάζει τα αντίστοιχα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τους καυκάσιους πληθυσμούς. Επειδή η ίδια τεχνική εφαρμόστηκε και σε 96 γονείς ασθενών προέκυψε ότι η κατανομή των φορέων είναι τυχαία σε όλη την Ελλάδα με μικρές εξαιρέσεις για τα νησιά της Κεφαλονιάς, Ικαρίας και Κρήτης όπου εμφανίζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση

φορέων. Από τη μελέτη προέκυψε επίσης ότι το ποσοστό πολλαπλών αντιγράφων για το γονίδιο *SMN1* είναι 4,6%, γεγονός που μειώνει την ασφάλεια αποτελέσματος. Από την ανίχνευση φορέων στα δείγματα των γονέων προέκυψαν 2 άτομα σε διαφορετικές οικογένειες, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε ποσοστό <2% που αναφέρεται τουλάχιστον στη βιβλιογραφία υπάρχουν και de novo ελλείψεις οι οποίες διαφεύγουν του ελέγχου φορείας (γαμετικός μωσαϊκισμός ή de novo μεταλλάξεις).

Επίσης έγινε προσπάθεια για πρώτη φορά στην Ελλάδα μιας πρώτης καταγραφής της συχνότητας των φορέων και του νοσήματος. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται η αναγκαιότητα του γενετικού ελέγχου σε ζευγάρια Ελλήνων πριν την τεκνοποίηση, έτσι ώστε ο προληπτικός γενετικός έλεγχος να οδηγήσει στην μείωση της συχνότητας γέννησης παθολογικών παιδιών. Σημειώνεται ότι για την Ελλάδα η νωτιαία μυϊκή ατροφία αποτελεί το τρίτο σε συχνότητα μονογονιδιακό υπολειπόμενο νόσημα και ήδη για τα άλλα δύο, τη μεσογειακή αναιμία και την ινοκυστική νόσο υπάρχει δυνατότητα ελέγχου των φορέων από κρατικές υπηρεσίες υγείας.

SUMMARY

Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the most common autosomal recessive disorders worldwide: the carrier frequency is between 1/40 and 1/60 in diverse populations and it affects 1 in 10 000 live births. SMA is caused by the degeneration of anterior horn cells of the spinal cord, which leads to symmetric proximal muscle weakness and atrophy. Based on the age at onset and the clinical course, SMA is subdivided into three types: type I is an infantile acute form and shows the greatest severity; type II is an infantile chronic form with intermediate severity and type III is a childhood and adolescent form and shows the mildest severity.

All three types of SMA are linked mostly to the survival motor neuron (*SMN*) gene at 5q13, which is found as two nearly identical copies: *SMN1* and *SMN2*. Mutations in the telomeric copy of the *SMN* gene (*SMN1*) are responsible for SMA, whereas *SMN2* functions as a disease-modifying gene that can ameliorate the clinical severity of SMA in a copy-dependent manner. Each *SMN* gene encompasses 27 kb and comprises of 9 exons (exons 1, 2a, 2b, and 3–8). Typically, the DNA sequence of *SMN1* differs from that of *SMN2* by only five nucleotides: One in intron 6, one in exon 7, two in intron 7, and one in exon 8. Of the SMA patients whose disorder is linked to 5q13, ~96% are characterized by a homozygous deletion of *SMN1* exon 7, which results from unequal crossover or *SMN1*-to-*SMN2* conversion events. The remaining 4% of cases are caused either by compound heterozygosity, with a point

mutation in one allele and a deletion in the other, or by compound heterozygous point mutations in the *SMN1* gene.

Given that homozygous deletion of exon 7 of *SMN1* is a common genotype and *SMN2* can influence the severity of SMA, it is fundamentally important to directly determine the copy numbers of *SMN1* and *SMN2* for carrier screening and clinical/prenatal diagnosis of SMA. Using quantitative analysis of *SMN1/SMN2* gene dosage, a range of molecular investigations of the incidence of carriers and the genetic burden of SMA in diverse ethnic populations have been carried out. However, a population-based study of SMA prevalence in Greece has not yet been executed. To estimate the future burden of SMA and the requirements for its appropriate treatment, management and prevention in the Greek population, accurate population frequency data are essential. Such data could be obtained through the genotyping of *SMN* genes in a large number of samples.

In the study reported herein, we determined *SMN* copy number in 156 DNA samples and from 44 core families with individuals with SMA, using Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA), which has been proven to be a highly efficient and reliable carrier-screening test. The frequency of SMA carriers in our population appears to be 1 in 52, which indicates that the prevalence of SMA among Greeks is the same as that among individuals in the Western countries. We anticipate that our research will provide a basis for a nationwide program of clinical/prenatal diagnosis to prevent SMA in Greece.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (SMA): Το νόσημα

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία περιγράφηκε πρώτη φορά το 1890 από τον Guido Werdnig, ιατρό από το πανεπιστήμιο της Βιέννης ο οποίος είχε δώσει μια διάλεξη με θέμα “On a case of Muscular Dystrophy with Positive Spinal Cord Findings”(1). Ένα χρόνο μετά ο Johan Hoffmann από το Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης παρουσίασε ένα άρθρο περιγράφοντας ένα σύνδρομο με προοδευτική ατροφία, αδυναμία και θάνατο στην παιδική ηλικία, παιδιών από υγιείς γονείς(2). Και οι δυο ιατροί είχαν κάνει αυτοψία και είχαν παρατηρήσει σοβαρή ατροφία. Επίσης είχαν ιστολογικά ευρήματα που έδειχναν απώλεια των εμπρόσθιων κεράτων των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Ο καθηγητής Hoffmann ονόμασε το σύνδρομο “Spinale Muscelatrophia” δηλαδή νωτιαία μυϊκή ατροφία. Είναι ενδιαφέρον ότι η περιγραφή που δόθηκε δεν αφορούσε τελικά τον τύπο νωτιαίας μυϊκής ατροφίας, ο οποίος σήμερα είναι γνωστός με τα ονόματα των γιατρών που τα περιέγραψαν, δηλαδή τύπος Werdnig-Hoffmann (3). Επιπλέον τουλάχιστον για τους πρώτους ασθενείς που περιέγραψαν, με ηλικία θανάτου τα 5 έτη, ανέφεραν και υδροκεφαλία που σήμερα αποτελεί κριτήριο αποκλεισμού της νόσου (4). Το 1956 οι Kugelberg και Welanders ανέφεραν ασθενείς με κλινική εικόνα SMA με ηλικία έναρξης πιο αργά από το τύπο I και πιο αργή εξέλιξη γνωστό σήμερα ως τύπο III(4). Οι Fried και Emery (1971) υπέθεσαν ότι υπάρχει ένας ενδιάμεσος τύπος σε

σοβαρότητα μεταξύ of Werdnig-Hoffmann (SMA type I) και τον νεανικό τύπο of Kugelberg και Welanders (SMA III) (5).



Εικόνα 1: Ο ιατρός Hugo Werdnig και ένα από τα πρώτα περιστατικά που περιέγραψε

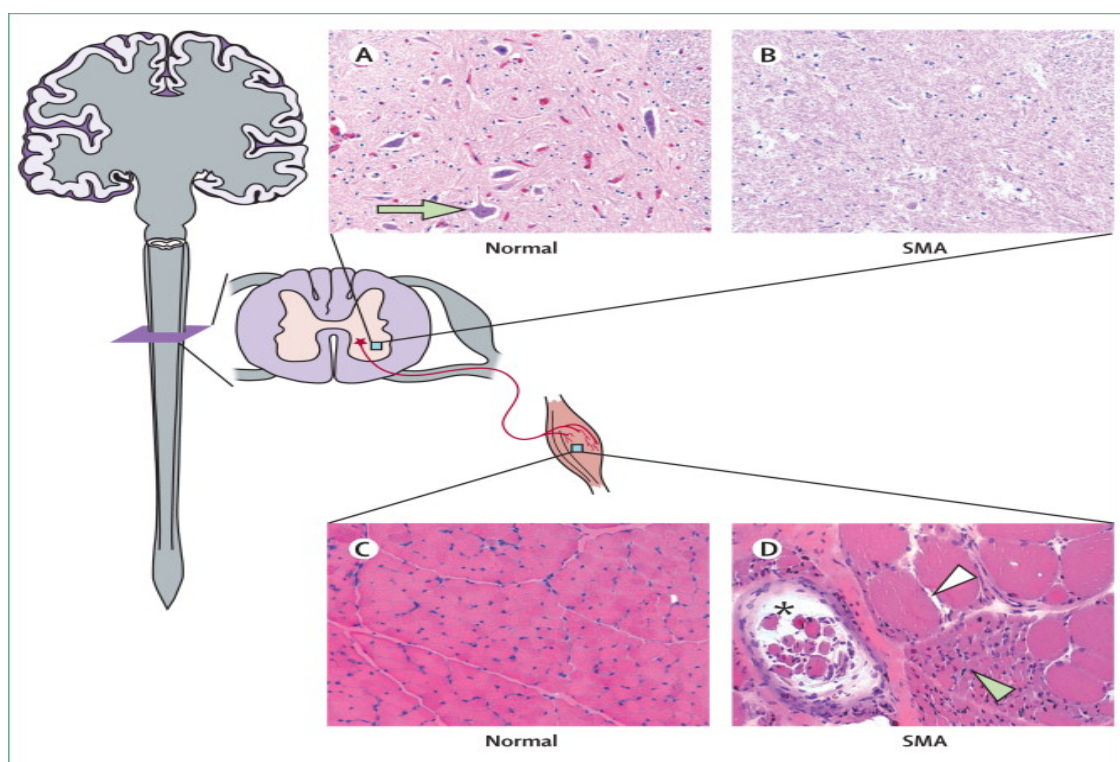
1.1.2 Κλινική εικόνα - Περιγραφή και τύποι του νοσήματος

Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία, (Spinal muscular atrophy, SMA) θεωρείται μία από τις πιο συχνές αιτίες βρεφικής θνησιμότητας γενετικής αιτιολογίας (6). Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό των εμπρόσθιων κεράτων των α-κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού και έχει ως αποτέλεσμα συμμετρική μυϊκή αδυναμία και την εκφύλιση των κινητικών μυών με αποτέλεσμα κεντρομελική μυϊκή αδυναμία. Σπάνια στην εκδήλωση της νόσου εμπλέκονται άλλα όργανα ή άλλο τμήμα του νευρικού συστήματος (7) .

Η κλασσική SMA εμφανίζει αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και μόνο ένας μικρός αριθμός ασθενών εμφανίζει φυλοσύνδετη ή αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα και χαρακτηρίζεται ως άτυπη SMA (8).

Το 1993 πραγματοποιήθηκε μια διεθνής συνάντηση (International SMA Consortium) με σκοπό να καθοριστούν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου, τα οποία αναθεωρήθηκαν το 2001 και συνοψίζονται στα παρακάτω (9, 10) :

- 1) Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται αδυναμία. Η αδυναμία είναι συμμετρική κυρίως κεντρομελική και συνοδεύεται από υποτονία.
- 2) Παρατηρείται απονεύρωση η οποία επιβεβαιώνεται με κλινικά κριτήρια, ηλεκτρομυογράφημα και βιοψία μυός (Εικ. 2)



Εικόνα 2: Ιστοπαθολογική εικόνα της SMA. α-κινητικοί νευρώνες (κόκκινο χρώμα στα πρόσθια κέρατα των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού, με πράσινο βέλος στην εικόνα (A). Στην εικόνα (B) φαίνεται απουσία των κινητικών νευρώνων σε ασθενή συγκριτικά με την εικόνα φυσιολογικού ατόμου (A). Μυϊκός ιστός με φυσιολογικές ίνες με ομοιογενή μορφολογία σε φυσιολογικό μυ νηπίου (C) συγκριτικά με υπερτροφικές ίνες (D) από ασθενή (άσπρο βέλος) που περικλείονται από ομάδες ατροφικών ινών (πράσινο βέλος). Παρά την ατροφία των μυϊκών ινών στη SMA, οι μυϊκές άτρακτοι (μαύρος αστερίσκος) δεν προσβάλλονται και γίνονται πιο διακριτές (D). Όλες οι τομές έχουν επεξεργαστεί με χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης. (11)

- 3) Δεν παρατηρείται συμμετοχή από το κεντρικό νευρικό σύστημα (εκτός από τους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού), αρθρογρύπωση, αδυναμία

προσώπου ή οφθαλμών. Τα παραπάνω θεωρούνται και κριτήρια αποκλεισμού (10).

Οι ασθενείς με SMA κατατάσσονται σε τέσσερις υποομάδες (I-IV), με βάση την ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων και τη βαρύτητα της νόσου (Πίνακας 1) (10).

1.1.2. Ι ΤΥΠΟΣ Ι, ΒΡΕΦΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ SMA (Werdnig-Hoffmann)

Η πιο σοβαρή και συχνή μορφή των SMA είναι ο τύπος Ι (βρεφικός, Werdnig-Hoffmann). Χαρακτηριστικά το βρέφος που γεννιέται φυσιολογικά εμφανίζει μυϊκή αδυναμία και υποτονία (Εικ. 3). Μερικές μητέρες αναφέρουν ότι το έμβρυο είχε μειωμένη κινητικότητα στη μήτρα.

Σε σοβαρές περιπτώσεις παρατηρούνται κατά τη γέννηση υπερξάρθημα ισχύου ή αρθρογρύπωση ποδοκνημικών και καρπών. Η μυϊκή αδυναμία αυτών των παιδιών είναι από την αρχή γενικευμένη και καταλήγουν εντός των δύο πρώτων ετών. Άλλα βρέφη φαίνεται να αναπτύσσονται φυσιολογικά τους πρώτους μήνες και αργότερα γίνεται εμφανής η μυϊκή αδυναμία. Σ' αυτές τις περιπτώσεις οι μύες του κορμού και αυτοί της πυελικής και ωμικής ζώνης προσβάλλονται αρχικά δυσανάλογα, ενώ οι άκρες χείρες, οι άκροι πόδες και τα δάκτυλα διατηρούν την κινητικότητά τους.



Εικόνα 3: Κλινική εικόνα παιδιού με SMA τύπου I

Η υποτονία συνοδεύει τη μυϊκή αδυναμία και στα πρώιμα στάδια μπορεί να είναι πιο έκδηλη. Κατά κανόνα τα τενόντια αντανακλαστικά δεν εκλύονται. Η μυϊκή μάζα μειώνεται αλλά δεν μπορεί να εκτιμηθεί λόγω του λιπώδους ιστού. Σπάνια είναι ορατές οι δεσμιδώσεις εκτός από τις δεσμιδώσεις στη γλώσσα που παρατηρούνται ορισμένες φορές. Η αντίληψη των απτικών και επώδυνων ερεθισμάτων είναι φυσιολογική και η ψυχοκινητική εξέλιξη είναι φυσιολογική.

Με την πάροδο των μηνών η αδυναμία και η υποτονία επεκτείνονται σε όλους τους σκελετικούς μύες με εξαίρεση τους οφθαλμικούς. Κατά κανόνα παρατηρείται παράλυση των μεσοπλευρίων μυών και οι αναπνευστικές κινήσεις γίνονται με προπέτεια της κοιλίας και έλξη του θώρακα). Το κλάμα είναι αδύναμο, ο θηλασμός και η κατάποση ελλιπής.

Τα βρέφη δεν ελέγχουν την κεφαλή, δεν στηρίζουν το βάρος τους και έχουν χαρακτηριστική βατραχοειδή θέση (βραχίονες σε απαγωγή και κάμψη στους αγκώνες, τα κάτω άκρα σε έξω στροφή και απαγωγή στα ισχία και στα γόνατα).

Μέχρι τα προχωρημένα στάδια της νόσου η ψυχοκινητική εξέλιξη και η κοινωνική επαφή διατηρούνται φυσιολογικές. Η πορεία είναι επιδεινούμενη, με πιο βαριά μορφή στους ασθενείς που εκδηλώνουν τη νόσο αμέσως μετά τη γέννηση ή ενδομήτρια και όχι λίγους μήνες μετά. Εάν εκδηλωθεί η νόσος στη νηπιακή ηλικία έχει προσδόκιμο επιβίωσης ακόμα και μέχρι την εφηβεία ή την πρώιμο ενήλικη ζωή.

1.1.2.ii ΤΥΠΟΣ II SMA, ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΣ ΤΥΠΟΣ

Η διάγνωση της SMA τύπου II (Εικ. 4) είναι εφικτή πριν από την ηλικία των 2 ετών (Εικ.4). Οι πάσχοντες χαρακτηρίζονται από κλινικά συμπτώματα ποικίλης βαρύτητας. Εμφανίζονται ηπιότερης μορφής μυϊκές διαταραχές από τους ασθενείς με τύπο I, αρκετά σοβαρές όμως ώστε η αναπνευστική λειτουργία και σίτιση να γίνονται με δυσκολία. Διατηρούν την ικανότητα να κάθονται υποβοηθούμενοι.



Εικόνα 4: Κλινική εικόνα παιδιού με SMA τύπου II

1.1.2.iii ΤΥΠΟΣ III, ΧΡΟΝΙΑ ΠΑΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΑΝΙΚΗ SMA (Kugelberg-Welander)

Στο 1/3 περίπου των περιπτώσεων η έναρξη είναι πριν την ηλικία των 3 ετών, ενώ στο 50% μεταξύ 3 και 18 ετών. Οι άνδρες κυριαρχούν, ιδίως στη νεανική και όψιμη έναρξη (Εικ. 5). Ο συνήθης τρόπος μεταβίβασης είναι με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας αλλά έχουν περιγραφεί και οικογένειες με επικρατητική και φυλοσύνδετη κληρονομικότητα.



Εικόνα 5: Κλινική εικόνα ασθενή με SMA τύπου III

Η νόσος ξεκινά με αδυναμία και ατροφία των κεντρομελικών μυών ιδίως των κάτω άκρων (μύες πυελικής ζώνης), ακολουθούμενη από προσβολή των μυών της ωμικής ζώνης και του βραχίονα. Η προσβολή είναι συμμετρική και αμφοτερόπλευρη, ενώ δεσμιδώσεις παρατηρούνται στις μισές περιπτώσεις. Τελικά προσβάλλονται και οι περιφερικοί μύες των άκρων και καταργούνται τα τενόντια αντανακλαστικά. Ο προμηκικός και τα φλοιονωτιαία δεμάτια διασώζονται. Η νόσος εξελίσσεται πολύ αργά και μερικοί ασθενείς επιβιώνουν μέχρι την προχωρημένη ηλικία χωρίς σημαντική αναπηρία. Έχει παρατηρηθεί ότι όσο πιο πρώιμη είναι η προσβολή τόσο βαρύτερη είναι η πρόγνωση.

Ακόμη και στη βαρύτερη προσβολή οι ασθενείς διατηρούν την ικανότητα να βαδίζουν για τουλάχιστον 10 χρόνια μετά την έναρξη της νόσου. Είναι δύσκολη η διαφορική διάγνωση μεταξύ αυτών των περιστατικών και των ηπιότερων μορφών με έναρξη την όψιμη βρεφική και την πρώιμη παιδική ηλικία και με παρατεταμένη επιβίωση.

1.1.2.iv ΤΥΠΟΣ IV

Οι ασθενείς με SMA τύπου IV εκδηλώνουν τα πρώτα συμπτώματα μετά την ενηλικίωση, τα οποία είναι ήπια και παρατηρείται μια μέτριας μορφής μυϊκή ατροφία.

Πίνακας 1. Κριτήρια ταξινόμησης στη νόσο SMA (10)

Τύπος	Ηλικία Έναρξης Συμπτωμάτων	Εξέλιξη
0	Εμβρυϊκή ηλικία	Μειωμένη εμβρυϊκή δραστηριότητα και ελάχιστη αυτόνομη αναπνευστική ικανότητα αμέσως μετά τη γέννηση, θάνατος από αναπνευστικές επιπλοκές
I	Κατά τη γέννηση ή πριν την ηλικία των 6 μηνών	Δεν έχουν την ικανότητα να κάθονται ποτέ, θάνατος από αναπνευστικές επιπλοκές
II	Πριν τους 18 μήνες	Στέκονται και βαδίζουν μόνο υποβοηθούμενοι
III a	Πριν την ηλικία των 3 ετών	Έχουν την ικανότητα να βαδίζουν χωρίς βοήθεια
III b	Μετά την ηλικία των 3 ετών	
IV	Κατά την ενηλικίωση	Πιθανή μέτριας μορφής μυϊκή αδυναμία

1.1.2.v Άτυπη SMA

Η σύγκριση τυπικής και άτυπης SMA, με εκδήλωση στη νηπιακή ηλικία, τονίζει τις διαφορές όσον αφορά την πρόγνωση. Οι Guillot και συν (2008) σε μια συγκριτική μελέτη 63 παιδιών με SMA (15 παιδιά με άτυπη NMA και 48 με

κλασσική εκδήλωση της νόσου) παρατήρησαν σαφώς καλύτερη κλινική εικόνα στα παιδιά με άτυπη SMA (8). Συγκεκριμένα παρατήρησαν δυνατότητα βάδισης στο 66% των περιπτώσεων, παρά το γεγονός ότι το 50% αυτών των περιπτώσεων εμφάνιζαν συμπτώματα από τη γέννηση, π.χ. αρθρογρύπωση. Η θνησιμότητα ήταν χαμηλότερη (6.5% έναντι 27%) αλλά η εμπλοκή του ΚΝΣ ήταν συχνότερη (33% έναντι 4%).

Οι περιφερικές κληρονομικές παθήσεις των κινητικών νευρώνων (περιφερική HMN ή περιφερική SMA) είναι κλινικά και γενετικά μια ετερογενής ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από αδυναμία και ατροφία μυών στα άκρα χωρίς αισθητήρια συμμετοχή. Δεκατρείς χρωμοσωμικές θέσεις και 7 παθολογικά γονίδια προσδιορίστηκαν να σχετίζονται με αυτοσωμικό επικρατητικό, αυτοσωμικό υπολειπόμενο, και φυλοσύνδετη υπολειπόμενη περιφερική HMN [13,14,15,).

Παρακάτω αναφέρονται οι εξής μορφές άτυπης SMA:

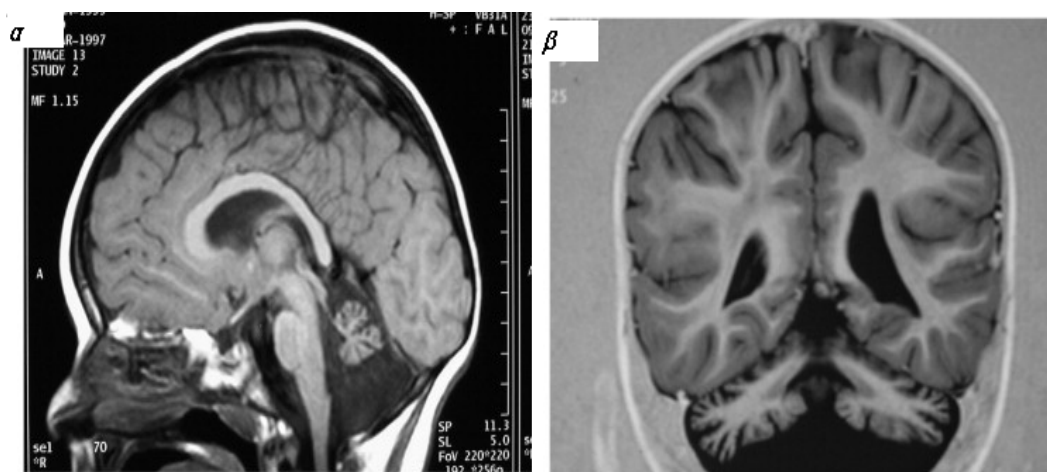
1. Η **ωμοπερόνια SMA** (Scapuloperoneal SMA, SPSMA) (Εικ. 6) χαρακτηρίζεται από προοδευτική αδυναμία και ατροφία στην κατανομή της ωμικής ζώνης και των μυών της περόνης με ή χωρίς λαρυγγική παράλυση. Ο Isozumi και συν. (1996) προσδιόρισαν ένα γενετικό τόπο για την νευρογενή μορφή των ωμοπερονικών συνδρόμων στο χρωμόσωμα 12q24, κοντά στο γενετικό τόπο που περιγράφεται για τη μυοπαθή μορφή του συνδρόμου SP [13].



Εικόνα 6: α) Ασθενής που πάσχει από ωμοπερόνια SMA, με κεντρομελική μυϊκή ατροφία των άνω άκρων. (β) Ασθενής που πάσχει από ωμοπερόνια SMA, με περιφερική μυϊκή ατροφία των κάτω άκρων (περονική ατροφία). (13)

2. Η γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία με βρεφική SMA

(Pontocerebellar hypoplasia, PCH-1) (Εικ. 7) χαρακτηρίζεται από πολύ σοβαρή αδυναμία και υποτονία των μυών που εκδηλώνονται πριν ή κατά τη γέννηση, με μικρό προσδόκιμο επιβίωσης έως τα 4 έτη . Περιγράφονται βαριές αναπνευστικές επιπλοκές, δυσμορφία, υποτονία, έλλειψη αντανακλαστικού των τενόντων, νυσταγμός, και μικροκεφαλία [7] και [8].



Εικόνα 7: (α και β) Ασθενής με νηπιακή SMA, που παρουσιάζει γεφυροπαρεγκεφαλιδική υποπλασία (PCH-1).

3. Η **συγγενής αρθρογρύπωση** με πολλαπλά κατάγματα (Arthrogryposis Multiple Congenita, AMC) (Εικ. 8), χαρακτηρίζεται από τη συγγενή κοινή ακαμψία που περιλαμβάνει τουλάχιστον 2 συνδέσμους σε 2 διαφορετικές περιοχές με συνέπεια τις συσπάσεις. Ο κοινός παράγοντας που προκαλεί τη συγγενή αρθρογρύπωση είναι η απουσία εμβρυϊκής κίνησης ως αποτέλεσμα των εγκεφαλικών, νευρικών ή νευρομυϊκών διαταραχών (15). Στην Εικόνα 8 φαίνεται ασθενής με συγγενή αρθρογρύπωση και συνδακτυλία.



Εικόνα 8: Ασθενής με συγγενή αρθρογρύπωση και συνδακτυλία.

4. Η **SMA με αναπνευστική δυσχέρεια τύπου 1** (Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress type 1, SMARD) ή **αυτοσωμική υπολειπόμενη περιφερική SMA** (autosomal recessive distal spinal muscle atrophy type 1, DSMA1) χαρακτηρίζεται από πρόωρη αναπνευστική ανεπάρκεια η οποία οφείλεται σε παράλυση του διαφράγματος. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται παιδιά με τον φαινότυπο SMARD να συνδέονται με μεταλλάξεις του γονιδίου immunoglobulin

micro-binding protein 2 (*IGHMBP2* gene), το οποίο βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 11q13 και κωδικοποιεί την μι-συνδεόμενη ανοσοσφαιρίνη 2 (16).

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί περιπτώσεις μυοπαθειών με ψευδώς θετικό ΗΜΓ ή/και νευρογενή εικόνα στη βιοψία μυός: συγγενείς μυϊκές δυστροφίες, καλπαϊνοπάθειες, και λαμινοπάθειες (λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο LMNA) των οποίων το φαινοτυπικό φάσμα είναι εξαιρετικά ευρύ (μυοπάθεια, περιφερική νευροπάθεια Emery-Dreifuss, εντοπισμένη καρδιομυοπάθεια, αυτοσωμική κυρίαρχη εγγύτερη SMA ενηλίκων με νευρογενή ατροφία και καρδιακή συμμετοχή (17). Μερικές φορές η διαφορική διάγνωση πρέπει να περιλαμβάνει μεταβολικές διαταραχές, όπως τα σύνδρομα CDG, η νεανική GM2 γαγγλιοσίδωση (42) ή η διαταραχή βιογένεσης υπεροξεισωμάτων καθώς επίσης και με την προμηκικονωτιαία μυϊκή ατροφία (Spinal and Bulbar Spinal muscular atrophy, Kennedy disease)(17).

1.1.3. Παθολογία της SMA

Στο νόσημα υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ ηλικίας έναρξης της νόσου και της βαρύτητας των συμπτωμάτων. Στο 1/3 των περιπτώσεων όπου η μητέρα έχει προηγούμενες υγιείς εγκυμοσύνες παρατηρεί ελαττωμένη κινητικότητα του εμβρύου. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα παιδιά νοσούν πολύ βαριά και είναι σαφής η αδυναμία, μετά τον τοκετό, ήδη από τις πρώτες εβδομάδες ή στους πρώτους μήνες της ζωής (8). Παρουσιάζεται αναπνευστική δυσλειτουργία, συσσώρευση εκκρίσεων, δυσκολία, στην κατάποση και τη σίτιση και αδύναμο

κλάμα. Οι μεσοπλεύριοι και βοηθητικοί αναπνευστικοί μύες παρουσιάζουν μυϊκή αδυναμία αλλά το διάφραγμα δεν επηρεάζεται τόσο αρνητικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παράδοση αναπνοή και έκταση του κατώτερου τμήματος του θωρακικού κλωβού (10). Ινιδισμοί της γλώσσας είναι σύνηθες εύρημα σε ασθενείς με SMA I και λιγότερο σε χρόνιες περιπτώσεις. Υπάρχει μικρός έλεγχος της κεφαλής και μπορεί στις πολύ βαριές περιπτώσεις να παρατηρηθεί μια μέτρια αδυναμία του προσώπου. Η αδυναμία των άκρων συνοδεύεται πάντα από υποτονία ανάλογη της αδυναμίας. Σε πολλούς ασθενείς και κυρίως στις βαριές περιπτώσεις καταργούνται τα αντανακλαστικά (18). Η διανοητική κατάσταση των ασθενών φαίνεται φυσιολογική ενώ συχνά αναφέρεται ότι οι ασθενείς με SMA είναι άτομα κοινωνικά και έξυπνα (19).

Αντίθετα με ότι πιστεύεται υπάρχει πολύ λίγη τεκμηρίωση για την εξελικτική πορεία της νόσου. Εμπειρικά φαίνεται ότι η κλινική επιδείνωση των ασθενών είναι αποτέλεσμα όχι της συνεχιζόμενης απώλειας των κινητικών νευρώνων αλλά δευτερευόντων χαρακτηριστικών όπως είναι η σκολίωση. Στον τύπο I η σοβαρότητα των περιπτώσεων δεν αφήνει περιθώρια για εξέλιξη, ενώ στους υπόλοιπους τύπους η εξέλιξη είναι αργή και μη μετρήσιμη. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν επαναληπτικές μετρήσεις μυϊκής ισχύος υποδηλώνουν ότι, παρ' ότι οι ασθενείς δεν ανακτούν μυϊκή ισχύ εντούτοις δεν φαίνεται να τη χάνουν (18).

Παρ' ότι σε αναλύσεις αίματος η φωσφοκινάση της κρεατίνης είναι φυσιολογική εντούτοις σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατό να παρατηρηθεί μια ελαφριά αύξηση (2 με 3 φορές μεγαλύτερη του

φυσιολογικού), ενώ έχουν βρεθεί και περιπτώσεις, κυρίως με ήπια μορφή, με αρκετά αυξημένα επίπεδα (περίπου 10 φορές) (9).

Μαζί με τη βιοψία μυός η εφαρμογή ηλεκτρομυογραφήματος βοηθά πολύ στην κλινική εκτίμηση του νοσήματος, αν και στα νεογέννητα η εκτίμηση δεν είναι πολύ ακριβής. Στα μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά παρατηρείται ενεργός εκφύλιση καθώς και ινιδισμοί και οξέα θετικά κύματα, ενώ σπανίζει η παρουσία γιγαντιαίων πολυφασικών δυναμικών τα οποία απαντώνται σε άλλα χρόνια εκφυλιστικά νοσήματα. Σε περιπτώσεις σοβαρής βλάβης του μυός παρατηρείται έως και πλήρης απουσία οποιασδήποτε κινητικότητας (9,20).

Η ιστοχημική χρώση υλικού από βιοψία μυός, είναι καθοριστική για τη διάγνωση του νοσήματος (20). Τα ιστολογικά ευρήματα ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο της SMA. Παιδιά που υπόκεινται σε βιοψία μυός νωρίς εμφανίζουν και το μεγαλύτερο πρόβλημα στην εκτίμηση της ιστοπαθολογικής εικόνας γιατί η κατανομή των ατροφικών ινών, χαρακτηριστικό της απονεύρωσης, συγχέονται με το μικρό μέγεθος των ινών που είναι όμως φυσιολογικό για την ηλικία τους. Σε μεγαλύτερα παιδιά η εικόνα είναι πιο σαφής και ένας έμπειρος παθολογοανατόμος μπορεί να διακρίνει τη νόσο από άλλα απονευρωτικά νοσήματα. Η πλειονότητα των ινών και των δύο τύπων, είναι ατροφικές. Επιπλέον παρατηρείται μικρός αριθμός διασκορπισμένων τύπου I μυϊκών ινών, σαν αποτέλεσμα προφανώς φυσιολογικής υπερτροφίας. Σε τομές παραφίνης μπορεί να παρατηρηθούν μάζες σκουρόχρωμων πυρήνων οι οποίοι πιστεύεται να αντιπροσωπεύουν μυϊκές ίνες με σοβαρή ατροφία που έχουν χάσει όλα τα μυϊκά τους ινίδια. Ενδεικτική επίσης είναι η απουσία σημαντικής νέκρωσης, εκφύλισης, συσσώρευσης λιπιδίων ή ανάπτυξης

συνδετικού ιστού. Η βιοψία μυός δεν δίνει πληροφορίες για την εξέλιξη της νόσου. Βιοψίες μυών πασχόντων από βρεφική νωτιαία μυϊκή ατροφία έδειξαν μεγάλο αριθμό κυκλικών ατροφικών ινών και μάζες υπερτροφικών ινών (20).

1.1.4 Επιδημιολογία

Ο Τύπος I αποτελεί την πιο συχνή αιτία βρεφικής θνησιμότητας με συχνότητα 1:25.708 γεννήσεις. Αυτό συνεπάγεται συχνότητα γονιδίου 1:160 και συχνότητα φορέων 1:80. Το ίδιο παρατηρείται και για τον τύπο II ενώ επιπλέον παρατηρείται και στους δύο τύπους μια υπεροχή στον αριθμό των ασθενών στα άρρενα άτομα με αναλογία σχεδόν 2:1 αντίστοιχα (21,22,23,24). Στη Σαουδική Αραβία και γενικά στους μουσουλμανικές χώρες η συχνότητα του νοσήματος φαίνεται μεγαλύτερη, γεγονός που οφείλεται στους ενδοοικογενειακούς γάμους (193/100000 γεννήσεις ζώντων νεογνών) με συχνότητα γονέων που είναι συγγενείς 64%. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες που συναντώνται στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 2: Οι κυριότερες επιδημιολογικές μελέτες SMA/φορείς που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα

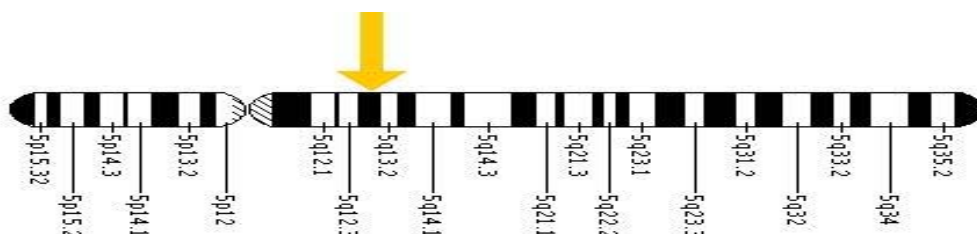
Συχνότητα νοσήματος	Συχνότητα φορέων	Πληθυσμός μελέτης	Βιβλιογραφική αναφορά
1/10000 SMA I	Δεν μελετήθηκε	Ουγγαρία	<u>Czeizel και Hamula ,1989</u> (21)
1/6720	Δεν μελετήθηκε	Η.Π.Α.(Ν. Ντακότα)	<u>Burd και συν. 1991</u> (22)
7.8/100,000	Δεν μελετήθηκε	Ιταλία	<u>Mostacciuolo και συν. , 1992</u> (23)
1/ 11800	Δεν μελετήθηκε	Σουηδία	<u>Arkblad E, 2009</u> (24)
Δεν μελετήθηκε	2.7% Καυκάσιοι 2.2% Εβραίοι Ashkenazi 1.8% Ασιάτες 1.1% Αφροαμερικανοί 0.8% Ισπανόφωνοι	Η.Π.Α.(α)	Hendrickson BC, 2009(25)
1.87/100,000	Δεν μελετήθηκε	Αγγλία (Β. Αγγλία)	Norwood FL και συν. 2009 (26)
1/9,320	1/35	Πολωνία	<u>Jedrzejowska M, 2010, (27)</u>
Δεν μελετήθηκε	1/50	Ν. Κορέα	<u>Yoon S, 2010</u> (28)
	1/42	Κίνα	<u>Sheng-Yuan Z, 2010</u> (29)
1 in 8,968.	1/47,6 (107,611 άτομα)	Ταϊβάν	Su YN, Hung, 2011 (30)
1:6400	1/40	Ισραήλ	<u>Ben-Shachar S, 2011</u> (31)
1/11,000.	1/54 (68,471 άτομα)	Η.Π.Α (β)	Sugarman, 2012 (32)

1.2 Το Γονίδιο SMN

Οι Gilliam και συν. (1990), και οι Melki και συν. (1990) ανεξάρτητα, έδειξαν ότι και οι τρεις μορφές SMA, συνδέονται με τη χρωμοσωμική περιοχή 5q12-q14 (33, 34). Με in situ υβριδισμό οι, Mattei και συν. (1991) περιόρισαν την περιοχή στην 5q12-q13.3 και οι Daniels και συν. (1992) κατέληξαν στη περιοχή 5q12.2-q13 με κοντινό το πολυμορφικό δείκτη D5S6 (35,36). Οι Brzustowicz και συν. (1992) βρήκαν δύο δείκτες, MAP1B και D5S6, που διαχωρίζονται από αλληλουχία 2 cM (37). Ταυτόχρονα δόθηκε η δυνατότητα

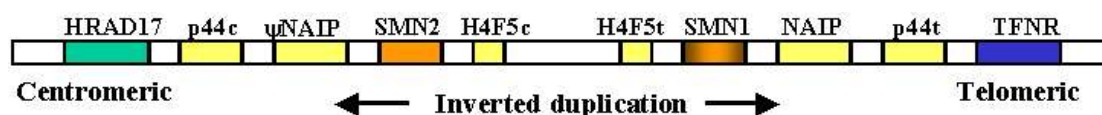
προγεννητικού ελέγχου με τη βοήθεια των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν και στη χαρτογράφηση Wirth και συν. (1993) (38) .

Το γονίδιο *SMN* (spinal motor neuron gene) χαρτογραφήθηκε στην περιοχή 5q13 (Εικ. 9) του χρωμοσώματος 5 το 1995 από τους Lefebvre και συν. (1995), και οι μεταλλάξεις του θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωση της SMA (39). Στην περιοχή αυτή προς το τελομερικό άκρο των μακράν σκελών, βρέθηκε το γονίδιο *SMN1* (περίπου 20-kb) καθώς επίσης και ένα ομόλογο γονίδιο, το *SMN2* (BCD541), που βρίσκεται προς την κεντρομερική περιοχή της αλληλουχίας. Το *SMN1* βρέθηκε να απουσιάζει σε ομόζυγη κατάσταση σε 226 από 229 ασθενείς με SMA I. Στους υπόλοιπους τρεις βρέθηκε σημειακή μετάλλαξη (tyr272-to-cys) ή μικρά ελλείμματα στις περιοχές ματίσματος στο ίδιο γονίδιο. Το γονίδιο του οποίου οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ονομάστηκε αρχικά Spinal Motor Neuron Gene (*SMN*) ή όπως καθιερώθηκε αργότερα *SMN1* και το ομολόγό του κεντρομερικό γονίδιο ονομάστηκε *SMN2*. Οι Lefebvre και συν. που ταυτοποίησαν το γονίδιο *SMN* αναφέρουν 8 εξώνια, αλλά αργότερα αποδείχτηκε ότι είναι 9, για να μην υπάρχει όμως σύγχυση με την προηγούμενη βιβλιογραφία αναφέρεται το δεύτερο και τρίτο εξώνιο ως εξώνια 2α και 2β (40).



Εικόνα 9: Η 5q13 περιοχή του χρωμοσώματος 5 (πηγή: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SMN1>)

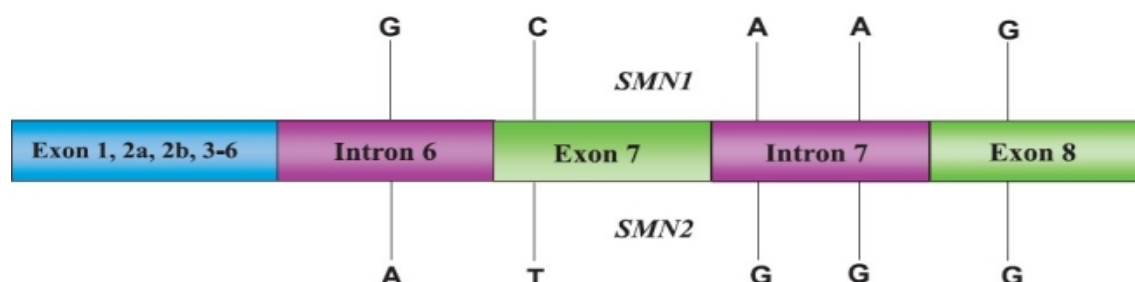
Το γονίδιο *SMN* βρίσκεται σε δύο σχεδόν πανομοιότυπα αντίγραφα, ένα τελομερικό (*SMN1*) και ένα ενσωματωμένο κεντρομερικό αντίγραφο (*SMN2*) στην περιοχή 5q13. Η προαναφερθείσα περιοχή χαρακτηρίζεται από έντονη αστάθεια. Συγκεκριμένα παρατηρούνται διπλασιασμοί εκτεταμένων τμημάτων που περιλαμβάνουν τέσσερα διπλασιασμένα γονίδια: *H4F5*, *SMN*, *NAIP* και *BTFp44* (39,40). Η περιοχή οριοθετείται δεξιά με το *HRAD17* και αριστερά από το *TFNR(7)* (Εικ. 10).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των ανεστραμμένων διπλασιασμών στην περιοχή 5q13 (πηγή: <http://neuromuscular.wustl.edu/synmot.html>)

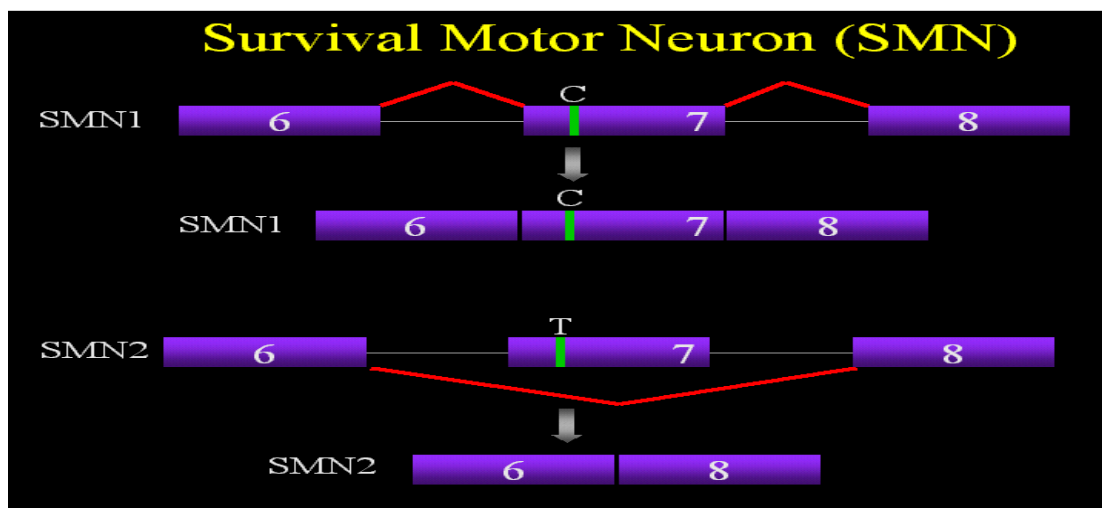
Το κάθε *SMN* γονίδιο έχει μέγεθος 27kb και περιλαμβάνει 9 εξώνια (1, 2a, 2b, 3-8) ενώ τα *SMN* μετάγραφα είναι μεγέθους 1,7kb και κωδικοποιούν πρωτεΐνη 294 αμινοξέων (38kDa). Το γονίδιο καλύπτει 20 kb και το κωδικόνιο λήξης είναι στο εξώνιο 7 καθώς το εξώνιο 8 δεν μεταφράζεται. Μεταξύ των *SMN1* *SMN2* υπάρχει 99% ομολογία και διαφέρουν μόνο σε 5 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες: μία στο εσώνιο 6, μία στο εξώνιο 7, δύο στο εσώνιο 7 και μία στο εξώνιο 8 (Εικ. 11)(39). Όσον αφορά το εξώνιο 7, η αλλαγή είναι C σε T και είναι μία ανενεργή νουκλεοτιδική αντικατάσταση, ενώ εκείνη του εξωνίου 8 βρίσκεται στη 3' αμετάφραστη περιοχή (41). Το πλήρες μήκος των συμπληρωματικών cDNAs των δύο γονιδίων είναι πανομοιότυπο εκτός από τις δύο διαφορές με αυτή την νουκλεοτιδική αντικατάσταση αντίστοιχα στα εξώνια 7 και 8. Μελέτες έδειξαν ότι αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αλλάζει η ικανότητα πρόσδεσης με τον παράγοντα SF2/ASF μια πλούσια σε

αργινίνη/σερίνη περιοχή που δεν επιτρέπει την αναγνώριση του εξωνίου 7 στο pre-mRNA του *SMN2* (42).

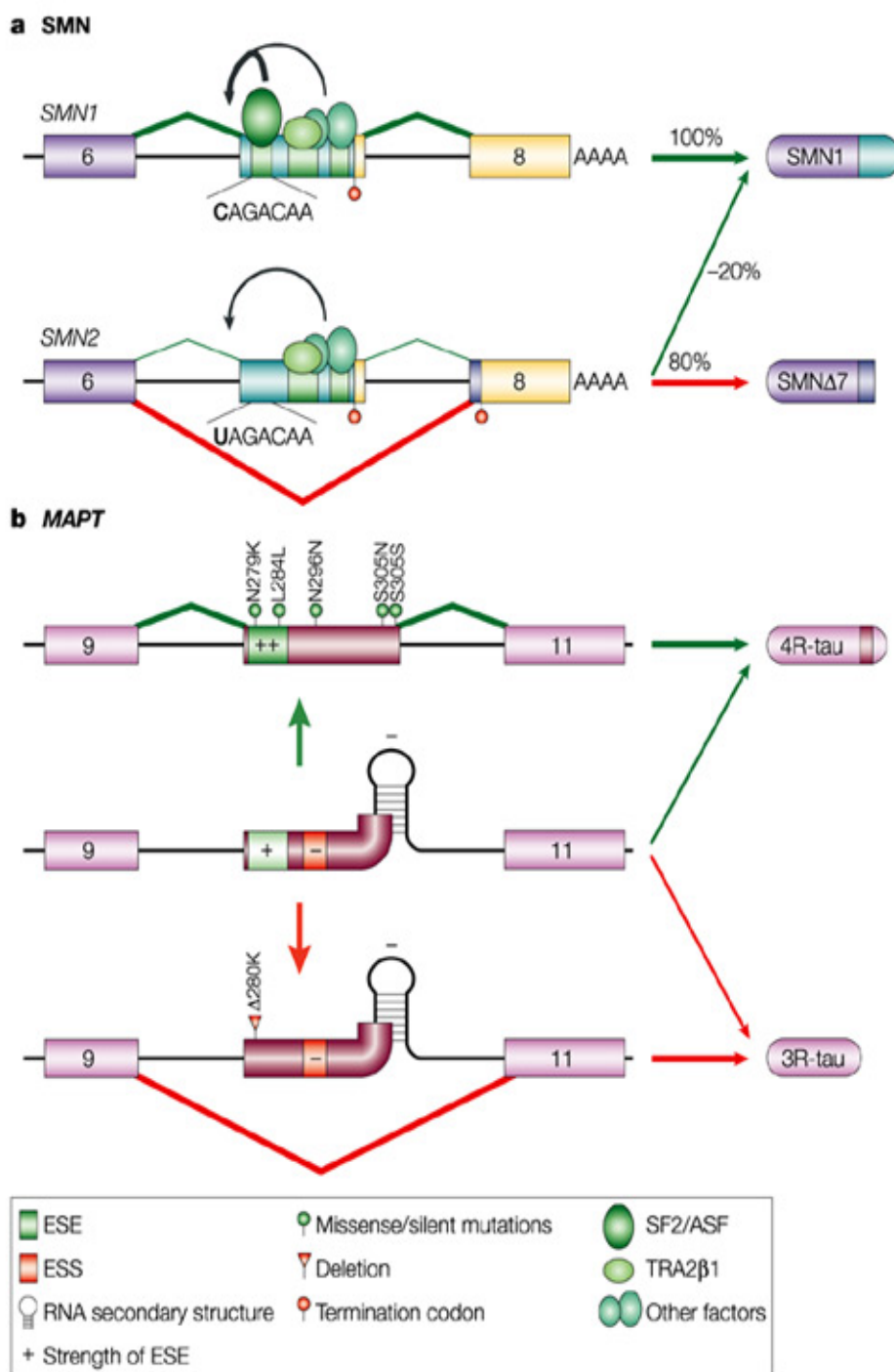


Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των διαφορών μεταξύ *SMN1* (*SMNt*) και *SMN2* (*SMNc*) με βασικότερη την αντικατάσταση μιας βάσης στο εξώνιο 7 (41).

Το *SMN1* κωδικοποιεί σε μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνη πλήρους μήκους, ενώ το *SMN2* σε πρώτη φάση κωδικοποιεί μετάγραφα από τα οποία απουσιάζει το εξώνιο 7 (Εικ. 11) σε ποσοστό περίπου 60% και σε δεύτερη φάση παράγει πλήρους μήκους μετάγραφα σε ποσοστό περίπου 40%. Το παραπάνω γεγονός οφείλεται στην αντικατάσταση από C σε T στο εξώνιο 7 στη θέση +6 που διακόπτει τον ενισχυτή ματίσματος εξωνίων (exonic splicing enhancer, ESE) (Εικ. 12, 13) και προκαλεί εναλλακτικό μάτισμα στο εξώνιο 7 του *SMN2* (43,44). Πρόσφατες όμως μελέτες έδειξαν ότι η αλλαγή 840C>T που συμβαίνει στο *SMN2*, ενεργοποιεί έναν καταστολέα ματίσματος εξωνίων (exonic splicing silencer, ESS) και λειτουργεί ως περιοχή δέσμευσης του καταστολέα hnRNP1, ο οποίος δεσμεύεται ειδικά στο εξώνιο 7 του *SMN2* mRNA και όχι στο *SMN1*(43). Υπάρχει λοιπόν μια διαρκής ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών παραγόντων που ρυθμίζουν την δέσμευση ή μη των Tra2 και πιθανώς και άλλων SR-like πρωτεϊνών και κατ' επέκταση το εναλλακτικό μάτισμα (44).

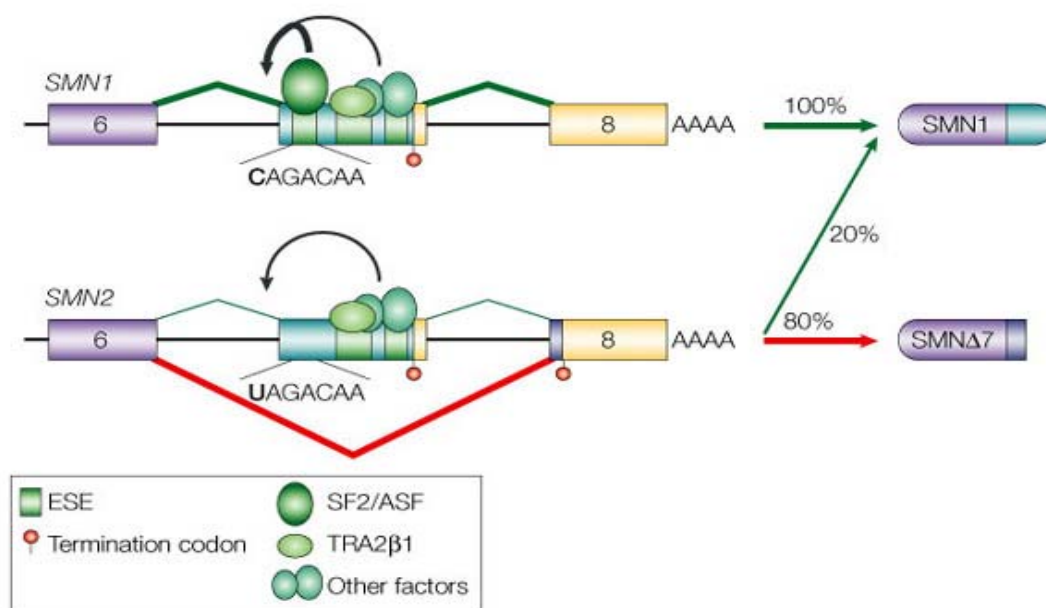


Εικόνα 12: Τα *SMN1* και *SMN2* μετά το εναλλακτικό μάτισμα (πηγή: <http://jeeves.mmg.uci.edu/hertel/SMAweb/SMAgenetics.html>)



Nature Reviews | Genetics

Εικόνα 13: Καταστολέας ματίσματος εξωνίων (exonic splicing silencer, ESS) (44)



Εικόνα 14: Μοντέλο ρύθμισης ματίσματος του εξωνίου 7 στα *SMN1* και *SMN2* πριν τον σχηματισμό των mRNAs (44).

1. Κατά το μάτισμα του *SMN1* οι Tra2 πρωτεΐνες διεγείρουν τη συγκράτηση του εξωνίου 7 (Εικ. 14) και αλληλεπιδρούν με άλλες SR ή SR-related πρωτεΐνες μέσω των Tra2 που εξαρτώνται από τον ESE που βρίσκεται στη μέση του εξωνίου 7. Αυτό σταθεροποιεί γενικότερα τις αλληλεπιδράσεις των παραγόντων ματίσματος στην ανοδική 3' πλευρική ματίσματος (splice site, SS) (43, 44).
2. Κατά το μάτισμα του *SMN2* οι hnRNP A1 (ή A2) πρωτεΐνες προσδένονται στην νεοσχηματισμένη ESS περιοχή που περιλαμβάνει την +6 θέση και προάγει την διαμόρφωση και την σταθεροποίηση του U2snRNP συμπλόκου είτε άμεσα, είτε εμποδίζοντας της Tra2 εξαρτώμενης από την ESE περιοχή καθοδικά (44).

Αν και τα δύο αντίγραφα του *SMN* γονιδίου κωδικοποιούν σχεδόν πανομοιότυπες πρωτεΐνες, το *SMN2* παράγει πρωτεΐνες με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο λόγω της έλλειψης του εξωνίου 7.

Η *SMN2* πρωτεΐνη δεν ολιγομερίζεται επιτυχώς, είναι ιδιαίτερα ασταθής και αποδομείται εύκολα (45). Τα εξώνια 6 και 7 των *SMN* γονιδίων περιέχουν την ίδια λειτουργική περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον αυτο-ολιγομερισμό της *SMN* πρωτεΐνης και επομένως η όποια απομάκρυνση εξωνίου ή μετάλλαξη σε αυτή την περιοχή οδηγεί στην μείωση της αυτοδόμησης. Αυτό δικαιολογεί γιατί ο φαινότυπος της SMA συνδέεται με τον αριθμό αντιγράφων του *SMN2*, αφού όσο περισσότερα είναι τα πλήρους μήκους αντίγραφα τόσο πιο ήπιος είναι και ο φαινότυπος της νόσου.

Η *SMN* πρωτεΐνη είναι ένα πολυπεπτίδιο 38 kDa η οποία εκφράζεται ευρέως αλλά έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα στα νευρικά κύτταρα του νωτιαίου μυελού (46).

Συγκριτικές μελέτες για την ιστορική εξέλιξη των γονιδίων *SMN1/SMN2* καταλήγουν στο ότι οι χιμπατζήδες έχουν 7 με 8 αντίγραφα του *SMN* γονιδίου σε κάθε διπλοειδές γονιδίωμα. Οι δυο νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ *SMN1* και *SMN2* φαίνεται να απουσιάζουν από τα άλλα πρωτεύοντα εκτός του ανθρώπου με το *SMN2* γονίδιο να ανιχνεύεται σε όλους τους ανθρώπινους πληθυσμούς που μελετήθηκαν έως σήμερα, περιλαμβάνοντας πληθυσμούς από Ευρώπη, Κεντρική Αφρική, Κονγκό Ασία. Φαίνεται δηλαδή ότι διπλασιασμός του γονιδίου *SMN* συνέβη περίπου 5 εκατομμύρια έτη πριν το διαχωρισμό της ανθρώπινης σειράς αλλά το *SMN2* εμφανίστηκε για πρώτη φορά στο *Homo sapiens* (47).

Οι DiDonato και συν. (1997) απομόνωσαν το *SMN* γονίδιο στον ποντικό και έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται την 7^η ημέρα χωρίς όμως να διαπιστώνουν εναλλακτικό μάτισμα όπως στον άνθρωπο. Βρήκαν ομολογία 82% και πυρηνική εντόπιση ενώ δεν διαπίστωσαν το διπλασιασμό και ούτε πολλαπλά *SMN* γονίδια (48).

Εκτός από τα *SMN1* και *SMN2*, τα υπόλοιπα γονίδια της περιοχής είναι τα *NAIP* (Neural Apoptosis Inhibitor Protein), *BTF2p44* και *H4F5*.

Το γονίδιο *NAIP* εντοπίζεται στην *SMN* περιοχή γειτονικά του *SMN1* και υπάρχει σε πολλαπλά ψευδογονίδια ανεξάρτητα από τον ενσωματωμένο διπλασιασμό (49). Υπάρχει το κεντρομερικό περικομμένο *NAIP* και το ψ *NAIP* από το οποίο απουσιάζουν τα δύο εξώνια 5 και 6 που φέρουν την κωδικοποιούσα αλληλουχία. Στο γενικό πληθυσμό συναντάται σε 2 έως 5 αντίγραφα αλλά ο λειτουργικός του ρόλος στην παθογένεια της SMA δεν έχει ξεκαθαριστεί (50). Υπάρχουν ωστόσο αναφορές που συνδέουν την έλλειψη του γονιδίου *NAIP* με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της νόσου. Μελέτες επίσης υποστηρίζουν ότι το γονίδιο *NAIP* συμβάλλει στη διαφοροποίηση και στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των κινητικών νευρώνων (50).

Το δεύτερο γονίδιο *BTF2p44*, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BTF2p44, υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIIA που αποτελεί μέρος του συμπλόκου έναρξης μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II, ο οποίος εμπλέκεται στην μεταγραφή, στην επιδιόρθωση του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (51). Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την μεταγραφή της πλειοψηφίας των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα και εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων. Όπως τα *SMN* και

NAIP γονίδια, έτσι και το *BTF2p44* υπάρχει σε τουλάχιστο δύο αντίγραφα, το τελομερικό (p44t) και το κεντρομερικό (p44c) αντίγραφο(52). Η έλλειψη του *BTF2p44* γονιδίου έχει παρατηρηθεί ότι πλησιάζει το 30% σε ασθενείς τύπου I εν σχέσει με αυτούς του τύπου II και III στους οποίους η απουσία του δεν αγγίζει το 10% (52). Η συμμετοχή όμως του *BTF2p44* γονιδίου δεν φαίνεται από τις μέχρι τώρα μελέτες να εμπλέκεται στην εμφάνιση και εξέλιξη της SMA, αφού ασθενείς με έλλειψη έχουν κανονική μεταγραφή. Οι ελλείψεις των *BTF2p44* και *NAIP* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ελλείψεων μεγάλων περιοχών στο 5q13(52).

Το *H4F5* (*SERF1*) βρίσκεται γειτονικά στο *SMN1* πιο κοντά σε σχέση με τα άλλα γνωστά γονίδια. Έλλειψη του γονιδίου βρέθηκε στο 90% των περιπτώσεων των ασθενών με SMA τύπου I, αλλά όπως και στο *NAIP* η ομόζυγη έλλειψη του *H4F5* αντικατοπτρίζει το μέγεθος της έλλειψης στο χρωμόσωμα που περιλαμβάνει το *SMN1* και το *SMN2* (53).

1.3 Μοριακή διαταραχή του νοσήματος

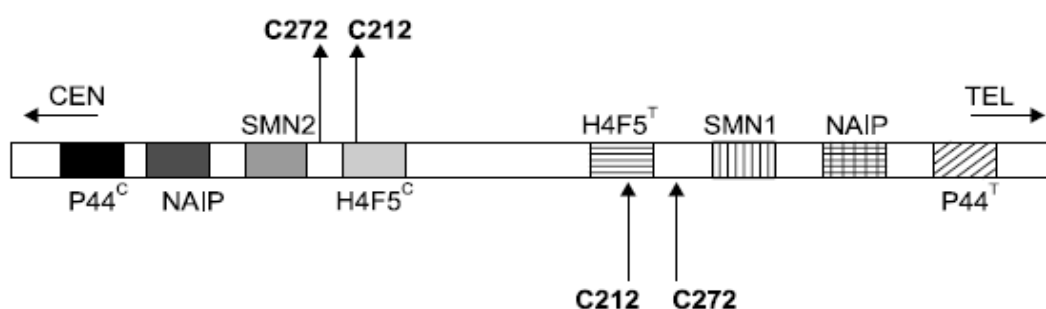
Μετά την ταυτοποίηση του γονιδίου *SMN1* από τους Lefebvre και συν. και την παρατήρηση ότι το νόσημα οφείλεται σε ποσοστό 95 % σε ομόζυγη έλλειψη των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου, ανακοινώθηκαν πολλές μελέτες ανίχνευσης ελλείψεων με παρόμοιο ποσοστό ομόζυγων ελλείψεων (90-98%) (39). Σε μελέτη 280 ασυμπτωματικών μελών SMA οικογενειών για την απουσία ή παρουσία των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου *SMN1* βρέθηκε σε ποσοστό 4%, ομόζυγη έλλειψη, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η ομόζυγη έλλειψη του *SMN1* επιβεβαιώνει κλινική εικόνα SMA αλλά δεν σημαίνει ότι είναι ικανή για εκδήλωση της νόσου (54), (55). Έλλειψη του *SMN2* παρατηρείται στο 5% των

φυσιολογικών ατόμων και δεν θεωρείται όταν υπάρχει το *SMN1* ότι ευθύνεται για τη νόσο παρότι οι αναφέρεται ότι ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου συνδέεται με την εμφάνιση της πλάγιας αμυοατροφικής σκλήρυνσης (ALS) (56,57).

Την ίδια χρονιά που έγινε η ταυτοποίηση του γονιδίου *SMN1* ο Roy και συν. εντόπισαν στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή που εντοπίζεται το *SMN1* ένα διαφορετικό γονίδιο που κωδικοποιεί για την Neuronal Apoptosis Inhibitory πρωτεΐνη *NAIP* (49). Τα πρώτα 2 εξώνια του γονιδίου βρέθηκαν να λείπουν στο 67% των ασθενών με SMA I σε σύγκριση με 2% των φυσιολογικών ατόμων. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι μεταλλάξεις του γονιδίου δεν ευνοούν την παρεμπόδιση της απόπτωσης των νευρώνων, γεγονός που συμβάλει στην ανάπτυξη του παθολογικού φαινοτύπου. Οι Burlet και συν. (1996) σε μια εκτενή μελέτη ελλείψεων των γονιδίων *SMN* και των πολυμορφικών δεικτών C212-C272 και του γονιδίου *NAIP* σε 106 ασθενείς ανίχνευσαν έλλειψη στο 43% των ασθενών και για τα δύο γονίδια (58). Ακολούθησαν μελέτες που αναφέρουν ομόζυγη έλλειψη μόνο στο εξώνιο 7 του γονιδίου *SMN1*, όπου όμως με ένα απλό PCR φάνηκε η ύπαρξη ενός υβριδίου *SMN* γονιδίου που αποτελείται και από το κεντρομερικό (*SMN2*) και από το τελομερικό (*SMN1*) γονίδιο ως αποτέλεσμα γονιδιακής μετατροπής (59). Η ανίχνευση του ίδιου απλοτύπου για τους μισούς ασθενείς με το υβριδικό γονίδιο υποδηλώνει κοινή προέλευση (60).

1.4 Ανάλυση Σύνδεσης

Οι Daniels και συν. (1992) και Melki και συν. (1992) απέδειξαν πρώτοι τη δυνατότητα προγεννητικού ελέγχου στο νόσημα με ανάλυση σύνδεσης(61, 34). Η Wirth και συν. (1995) αναφέρουν εμπειρία με 109 προγεννητικές σε 91 οικογένειες με ιστορικό SMA χρησιμοποιώντας πολυμορφικούς δείκτες της περιοχής 5q11.2-q13.3 με 29 έμβρυα να έχουν >99% κίνδυνο να νοσούν ενώ σε 7 περιπτώσεις η περίπτωση ανασυνδυασμών δεν επέτρεψε τον προγεννητικό έλεγχο (38). Οι πληροφοριακοί δείκτες σύνδεσης που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι τώρα από το κεντρομερικό μέχρι το τελομερικό άκρο φαίνονται στην παρακάτω εικόνα 15 και στον πίνακα 3:



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των πολυμορφικών δεικτών στη γονιδιακή περιοχή *SMN* του χρωμοσώματος 5 (39).

Πίνακας 3: Πολυμορφικοί δείκτες του *SMN1* που βρίσκονται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q11.2-q13.3 (62)

<i>Locus</i>	<i>Location</i>	<i>Recombination</i>	<i>PIC</i>	<i>Size</i>
D5S679	Proximal	3	0.63	180 – 222
D5S680	Proximal	3	0.57	141 – 173
D5S125	Proximal	2	0.38	143 and 147
D5S681	Proximal	2	0.68	142 – 156
D5S435	Proximal	1	0.68	128 – 144
D5S629	Proximal	1	0.81	233 – 253
D5S823	Proximal	1	0.54	128 – 150
D5S1556/	Intragenic/SMN1	0	0.98	90 – 122
D5F150	promoter region			
D5S149	Intragenic/SMN1	0	0.99	166 – 203
	promoter region			
D5S557	Distal	1	0.46	148 – 172
D5S610	Distal	1	0.80	106 – 124
D5S351	Distal	1	0.74	196 – 234
5'-MAP1B	Distal	1	0.76	~100
3'-MAP1B	Distal	1	0.72	212 – 226
D5S112	Distal	3	0.74	94 – 120
D5S127	Distal	5	0.84	96 – 114
D5S39	Distal	7	0.74	212 – 220

Σήμερα μετά την εφαρμογή των τεχνικών εύρεσης της μοριακής διαταραχής, η ανάλυση σύνδεσης χρησιμοποιείται σπανιότερα, κυρίως για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του άμεσου μοριακού ελέγχου σε προγεννητικό ή προεμφυτευτικό έλεγχο. Πολλαπλοί δείκτες όπως οι **C212** και **C272** έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση σύνδεσης, αλλά η ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσιάζει δυσκολίες. Ο έμμεσος αυτός τρόπος εξαρτάται από το πόσο πληροφοριακές είναι οι οικογένειες και από την ύπαρξη ή μη ανασυνδιασμών, ενώ δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε άτομα γενικού πληθυσμού καθώς απαιτείται η ύπαρξη επαναληπτικών αλληλουχιών που να υποδεικνύουν την συσχέτισή τους με τη νόσο (62). Οι Brzustowicz και συν. (1994) αναφέρουν πατρική ισοδισωμία για το χρωμόσωμα 5 σε ένα αγόρι δύο ετών με SMA III (63). Ο καρυότυπος του παιδιού ήταν φυσιολογικός και η κλινική του εικόνα δεν εμφάνισε άλλες διαταραχές εκτός από αυτές της SMA.

1.5 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων

Το 5% των ασθενών με SMA δεν φέρουν ομόζυγη έλλειψη του εξωνίου 7 του *SMN1*, αλλά εσωτερικές σημειακές μεταλλάξεις στο ένα από τα δύο χρωμοσώματα 5 κατά μήκος όλου του γονιδίου (39, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 4, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87). Αναλύσεις για την ανίχνευση μικρών ενδογονιδιακών μεταλλάξεων στο *SMN1* δεν προσφέρονται σε επίπεδο ρουτίνας σε κλινικό εργαστήριο και εφαρμόζονται σε άτομα τα οποία φέρουν συνήθως ετερόζυγη έλλειψη του εξωνίου 7 του *SMN1* και κάποια σημειακή μετάλλαξη στο υπάρχον χρωμόσωμα 5. Οι τεχνικές αυτές ανίχνευσης μικρών ενδογονιδιακών μεταλλάξεων στο *SMN1* εξελίσσονται ώστε στο μέλλον να μπορούν να γίνουν μέρος της πρακτικής ρουτίνας των εργαστηρίων προσφέροντας την ευαισθησία των τεχνικών αυτών.

Οι Wirth και συν. (1999) παρουσίασαν μια μη ραδιενεργή ποσοτική ανάλυση σε DNA από 42 ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν καμία συγγένεια και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 45% των ασθενών έφεραν 1 αντίγραφο του *SMN1* (65). Με ανάλυση αλληλουχιών προϊόντων RT-PCR ή γενομικά κλάσματα του γονιδίου *SMN1*, ανακαλύφθηκαν 9 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 18 από τους 19 ασθενείς, 6 εκ των οποίων περιγράφηκαν για πρώτη φορά. Η πιο συχνή μετάλλαξη, η Y272C, βρέθηκε σε 6 (33%) από τους 18 ασθενείς. Σε 14 από τους 23 ασθενείς με 2 αντίγραφα *SMN1*, βρέθηκε τουλάχιστο 1 ακέραιο αντίγραφο *SMN1*, γεγονός που απέκλειε την εμπλοκή της περιοχής 5q και συνέστησε την ανάμιξη περαιτέρω γονιδίου(ων) τα οποία ευθύνονται για το 4-5% των παθολογικών φαινοτύπων. Σε 4/54 μη συγγενικές οικογένειες

Ισπανών με SMA, αναφέρθηκε έλλειψη 4-bp στο γονίδιο *SMN1* φέροντας όμως τον ίδιο απλότυπο, υποδηλώνοντας κοινή προέλευση (66). Όλοι οι γονείς έφεραν τουλάχιστον ένα αντίγραφο *SMN1*. Σε άλλες μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκε η τεχνική SSCP για να ελεγχθούν ασθενείς με SMA I που είχαν τουλάχιστον ένα ανέπαφο *SMN1* αλληλόμορφο, για σημειακές μεταλλάξεις ανιχνεύτηκε διπλασιασμός 11-bp σε SMA I στο εξώνιο 6 προκαλώντας αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης καθώς επίσης και παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, S262I και T274I, στο εξώνιο 6 του γονιδίου *SMN1* σε τρεις μη συγγενικές SMA οικογένειες υποστηρίζοντας τον παθολογικό ρόλο του *SMN1* (65, 66, 67). Οι δύο τελευταίες μεταλλαγές καθώς επίσης και άλλες δύο προηγούμενες (Y272C, και G279V,) εντοπίζονται σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή από το κωδικόνιο 258 στο κωδικόνιο 279. Αυτή η περιοχή είναι μια πλούσια σε κατάλοιπα τυροσίνης/γλυκίνης. Παρόμοιες περιοχές βρίσκονται και σε άλλες πρωτεΐνες με δυνατότητα πρόσδεσης σε RNA (68, 69).

Σε μια ανασκόπηση όλων των γνωστών σημειακών αλλαγών στο γονίδιο *SMN1* από τους Alias και συν (2008) αναφέρονται περισσότερες από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις και περιλαμβάνουν ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (nonsense), μεταλλάξεις πλαισίου ανάγνωσης (frameshift, παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense), ελλείψεις, αναστροφές και μεταλλάξεις αποκοπής και συρραφής εξωνίων (splice site mutations) (Πίν 4) (66). Οι πιο συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις είναι οι Y272C και 813ins/dup11 [17% (9/53) και 13% (7/53) αντίστοιχα]. Έχει φανεί από μελέτες ότι οι περισσότερες από τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε μια υψηλά συντηρημένη

περιοχή στα εξώνια 6 και 7 και ότι οι συγκεκριμένες μειώνουν την ικανότητα αυτο-ολιγομερισμού της SMN πρωτεΐνη (65, 86,87,88).

Πίνακας 4: Ανασκόπηση των σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SMN1* σύμφωνα με τους Alias και συν (2008).

Exon/intron	cDNA Mutation	Predicted effect	Also reported as	References	Number of patients	SMA type
<i>Missense mutations</i>						
Ex.1	c.5 C>G	p.Ala2Gly	A2G	Parsons et al. 1998b	3	II, III
Ex.2a	c.88 G>A	p.Asp30Asn	–	Sun et al. 2005	1	II
Ex.2a	c.131 A>T	p.Asp44Val	–	Sun et al. 2005	1	III
Ex.3	c.275 G>C	p.Trp92Ser	–	Kotani et al. 2007	2	I
Ex.3	c.281 T>G	p.Val94Gly	–	Clermont et al. 2004	1	II
Ex.3	c.283 G>C	p.Gly95Arg	–	Sun et al. 2005	1	III
Ex.3	c.332 C>G	p.Ala111Gly	–	Sun et al. 2005	1	I/II
Ex.3	c.346 A>T	p.Ile116Phe	–	Cuscó et al. 2004	1	I
Ex.3	c.389 A>G	p.Tyr130Cys	Y130C	Prior 2007 ^b	1	?
Ex.3	c.400 G>A	p.Glu134Lys	–	Clermont et al. 1997	1	I
Ex.3	c.406 C>G	p.Gln136Glu	–	Cuscó et al. 2004	1	I
Ex.4	c.562 G>T	p.Ala188Ser	–	Zapletalová et al. 2007	1	I
Ex.6	c.734 C>T	p.Pro245Leu	–	Rochette et al. 1997	1	III
Ex.6	c.779 T>C	p.Leu260Ser	–	Clermont et al. 2004	1	III
Ex.6	c.784 A>G	p.Ser262Gly	–	Sun et al. 2005	1	III
Ex.6	c.785 G>T	p.Ser262Ile	818 G>T; S262I	Hahnen et al. 1997; Parsons et al. 1998b; Wirth et al. 1999	3	III
Ex.6	c.788 T>G	p.Met263Arg	–	Clermont et al. 2004	1	I
Ex.6	c.788 T>C	p.Met263Thr	–	This work	1	II
Ex.6	c.796 T>C	p.Ser266Pro	S266P	Prior 2007 ^b	1	?
Ex.6	c.815 A>G	p.Tyr272Cys	Y272C	Lefebvre et al. 1995; Wirth et al. 1999; Rochette et al. 1997; Clermont et al. 2004; Zapletalová et al. 2007; This work	18	I, II
Ex.6	c.818 A>G	p.His273Arg	H273R	Prior 2007 ^b	1	?
Ex.6	c.821 C>T	p.Thr274Ile	854 C>T; T274I	Hahnen et al. 1997; Parsons et al. 1998b; Wirth et al. 1999; Sun et al. 2005; Zapletalová et al. 2007; This work	9	II, III
Ex.6	c.823 G>A	p.Gly275Ser	G275S	Bürglen et al. 1996b; Skordis et al. 2001;	2	III
Ex.7	c.835 G>T	p.Gly279Cys	–	Wang et al. 1998	2	II, III
Ex.7	c.836 G>T	p.Gly279Val	–	Talbot et al. 1997	1	I
<i>Nonsense mutations</i>						
Ex.1	c.43 C>T	p.Gln15X	76 C>T; Q15X	Wirth et al. 1999; Sun et al. 2005;	3	I, III
Ex.3	c.305 G>A	p.Trp102X	–	Sossi et al. 2001; Prior 2007 ^b	3	II, III ^a
Ex.3	c.469 C>T	p.Gln157X	–	Brichta et al. 2008	2	I
Ex.4	c.570 G>A	p.Trp190X	–	This work	1	I
Ex.5	c.683 T>A	p.Leu228X	–	Tsai et al. 2001	1	I
<i>Frameshift mutations</i>						
Ex.1	c.22dupA	p.Ser8LysfsX23	–	Tsai et al. 2001	1	I
Ex.1	c.81dupG	p.Ser28GlufsX3	c.81_82insG; p.Q27fsX3	Skordis et al. 2001	2	I
Ex.2a	c.91dupT	p.Ser31PhefsX2	124insT; c.90_91insT	Wirth et al. 1999; This work	2	II

Πίνακας 4 (συν.): Ανασκόπηση των σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SMN1* σύμφωνα με τους Alias και συν (2008).

Ex. 2a	c.100delT	p.Trp34GlyfsX5	c.98delT; p.133IfsX6	Zapletalová et al. 2007	1	I
Ex. 2a	c.109dupA	p.Thr37AsnfsX8	c.109insA	Prior 2007 ^b	1	?
Ex. 2b	c.198_214del17	p.Pro66fsX5	p.P66fsX71	Clermont et al. 2004	1	I
Ex. 2b	c.208_209insGTGT	p.Pro70ArgfsX3	241-242ins4; p.P70fsX73	Wirth et al. 1999	1	III
Ex. 3	c.312dupA	p. Asn105ArgfsX13	–	This work	1	II–III
Ex. 3	c.314_317dupACGG	p.Gly106fsX13	p.G106fsX119	Clermont et al. 2004	1	III
Ex. 3	c.399_402delAGAG	p.Arg133fsX15	430del4	Bussaglia et al. 1995; Martín et al. 2002; Cuscó et al. 2003; This work	14	I, II, III, IV, A
Ex. 3	c.411delT	p.Asn137fsX11	–	This work	1	I
Ex. 3	c.439_443delGAAGT	p.Glu147SerfsX2	425del5	Brahe et al. 1996; Sossi et al. 2001	2	I
Ex. 4	c.510_511delTGT	p.Ser170ArgfsX9	542delGT; c.509-510delGT	Parsons et al. 1998a; 1998b	3	II, III
Ex. 4	c.558delA	p.Lys186AsnfsX27	591delA	Wirth et al. 1999	1	II
Ex. 4	c.585dupT	p.Pro196SerfsX40	c.618insT; c.585_586insT; p.P196SfsX256	Clermont et al. 1997; 2004	2	I
Ex. 5–6	c.627+?_835+?del	p.Pro210_Met278del	Long deletion 6.6 kb	Wirth et al. 1999; Clermont et al. 2004	3	I, II, III
Ex. 6	c.770_780dup11	p.Gly261LeufsX8	800ins11; 801_811dup11; p.G261fsX269	Parsons et al. 1996; Parsons et al. 1998b; Martín et al. 2002; Clermont et al. 2004; This work	9	I, II
Ex. 6	c.740dupC	p.Pro247fsX9	773insC	Martín et al. 2002	1	III
<i>Splice site mutations</i>						
Int. 4	c.628–140 A>G	c.627_628ins65		Brichta et al. 2008	1	I
Int. 6	c.834+2 T>G	–	c.867+2 T>G	Martín et al. 2002	1	I
Int. 6	c.835–2A>G	–	IVS6-2 A>G	Eggermann et al. 2008	1	I
Int. 6	c.835–12del7	–	–	Lefebvre et al. 1995	1	I
Int. 7 (3'UTR)	c.6 T>G ^c	–	c.922+6 T>G; c.889+6 T>G	Wirth et al. 1999	1	I
Int. 7 (3'UTR)	c.6 delAGTC ^c	–	c.922+3del4; c.888+3 delAGTC	Lefebvre et al. 1995	1	II

1.6 Πολυμορφισμοί

Μέχρι τώρα έχει γίνει αναφορά για 31 πολυμορφισμούς: 12 στον υποκινητή, 1 στο εσώνιο 1, 1 στο εξώνιο 2a, 1 στο εξώνιο 3, και 16 στο εσώνιο 6 όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 5) (85), (88), (89), (90).

Πίνακας 5: Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου *SMN1*

Πολυμορφισμοί που έχουν εντοπιστεί στα γονίδια <i>SMN1</i> και <i>SMN2</i>			
Θέση	Νουκλεοτιδική Θέση	Πολυμορφισμός	Αναφορά
Promotor	-3366	-/G	Monani et al., 1999
	-2052	C/A	Monani et al., 1999
	-2020	C/T	Monani et al., 1999
	-1990	C/T	Monani et al., 1999
	-1805	C/G	Monani et al., 1999
	-1438	A/T	Monani et al., 1999
	-1427	C/G	Monani et al., 1999
	-1317	C/G	Monani et al., 1999
	-1155	G/A	Monani et al., 1999
	-893	A/G	Monani et al., 1999
	-769	GAG/-	Monani et al., 1999
	-318	GCC/-	Monani et al., 1999
Intron 1	+8451	T/C	Monani et al., 1999
Exon 2a	+14035 (codon 28) ^a	C/T	Hahnen and Wirth, 1996
Exon 3	+17739 (codon 154)	A/G	Brahe et al., 1996
Intron 6	+21851	G/T	Monani et al., 1999
	+22872	A/G	Monani et al., 1999
	+23117	G/A	Monani et al., 1999
	+23505	A/G	Monani et al., 1999
	+25239	T/C	Monani et al., 1999
	+25379	G/A	Monani et al., 1999
	+25381	T/C	Monani et al., 1999
	+25519	G/A	Monani et al., 1999
	+25683	G/A	Monani et al., 1999
	+25729	C/G	Monani et al., 1999
	+26156	G/A	Monani et al., 1999
	+26236	-/AGGCA	Monani et al., 1999
	+26287	A/C	Monani et al., 1999
	+26587	G/A	Monani et al., 1999
	+26658	T/C	Monani et al., 1999
Exon 7	+26769	C/A	Monani et al., 1999
	+27092 ^b	G/A	Bürglen et al., 1996a
	+27141 (codon 280) ^b	C/T	Lefebvre et al., 1995
	+27289 ^b	A/G	Bürglen et al., 1996a
Intron 7	+27404 ^b	A/G	Bürglen et al., 1996a
Exon 8	+27869 ^b	G/A	Lefebvre et al., 1995

^aΟ πολυμορφισμός αυτός έχει περιγραφεί μόνο στο *SMN2*

^bΝουκλεοτιδική διαφορά (μη πολυμορφισμός) που διακρίνει το *SMN1* από το *SMN2*

1.7 *SMN1* de novo μεταλλάξεις

Από μελέτες για τη συχνότητα de novo μεταλλάξεων βρήκαν ότι η de novo ανακατάταξη συμβαίνει κυρίως κατά την σπερματογένεση. Βρήκαν αναδιατάξεις σε 7/ 340 οικογένειες με SMA τύπου I και II (2%), έλλειψη του γονιδίου *NAIP* σε 2/7 περιπτώσεις. Σε μια οικογένεια βρέθηκε μωσαϊκή μετάλλαξη σε ποσοστό 25% (91).

Το *SMN1* παρουσιάζει ένα υψηλό ποσοστό de novo μεταλλάξεων και αυτό δικαιολογεί τη μεγάλη συχνότητα φορέων SMA στο γενικό πληθυσμό παρά τη μεγάλη θνησιμότητα της νόσου. Η μεγάλη ανάστροφη επανάληψη στην 5q13 περιοχή καθώς και άλλες μικρότερες επαναλήψεις στην περιοχή των *SMN1* και *SMN2* (Εικ. 10) προδιαθέτουν την περιοχή αυτή σε άνισες διασταυρώσεις και άλλους ανασυνδυασμούς και για αυτό το λόγο το ποσοστό των de novo μεταλλάξεων στο *SMN1* είναι υψηλό (92). Σύμφωνα με την εκτίμηση της Wirth και συν. (1999), η αναλογία των πατρικών και μητρικών de novo μεταλλάξεων υπολογίζονται σε 2.11×10^{-4} και 4.15×10^{-5} αντίστοιχα. Παρόλα αυτά οι παραπάνω εκτιμήσεις βασίζονται σε πολύ μικρό αριθμό ασθενών που παρουσίαζαν de novo μεταλλάξεις και γι' αυτό είναι αναγκαία η διεξαγωγή περαιτέρω μελετών για την πιο ακριβή προσέγγιση των αναλογιών καθώς η πιθανότητα να χαρακτηριστεί μία μετάλλαξη de novo μπορεί να οφείλεται στην πιθανότητα σφάλματος κατά την εφαρμογή μοριακών τεχνικών.

1.8 Παθοφυσιολογία της νόσου

Σε μελέτη ινοβλαστών από ασθενείς που έπασχαν από διαφορετικούς τύπους SMA, οι Coover και συν. (1997) ανακάλυψαν μείωση της ποσότητας της πρωτεΐνης, ειδικά στους ασθενείς που έπασχαν από τύπο I (93). Σύμφωνα με τη μελέτη μετά από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των ινοβλαστών παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του αριθμού των σωματίων GEMS στον τύπο I και συσχέτιση του με την κλινική βαρύτητα της νόσου. Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο, τα νεφρά, το ήπαρ, σε μέτρια επίπεδα στους καρδιακούς και σκελετικούς μυς, και σε χαμηλά επίπεδα στους ινοβλάστες και στα λεμφοκύτταρα. Στα φυσιολογικά άτομα η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο νωτιαίο μυελό ενώ στους ασθενείς με τύπο I παρουσίαζε 100πλάσια μείωση. Η ενδεικτική μείωση της πρωτεΐνης SMN στους ασθενείς με SMA τύπου I ήταν σταθερή με τα χαρακτηριστικά της νόσου. Επομένως η διακοπή του γονιδίου *SMN1* στους ασθενείς τύπου I έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της πρωτεΐνης από τους κινητικούς νευρώνες και τον εκφυλισμό τους. Οι Lorson και συν. (1999) απέδωσαν την παθογένεια της νόσου στην ομόζυγη έλλειψη του *SMN1*, παρά το γεγονός ότι τα γονίδια *SMN1* και *SMN2* κωδικοποιούν σχεδόν ταυτόσημες πρωτεΐνες (94). Το 95% περίπου των ασθενών με SMA, παρουσιάζει ομόζυγη έλλειψη του εξωνίου 7, ή μετατροπή του γονιδίου *SMN1* σε *SMN2*, υποδηλώνοντας ότι τα χαμηλά επίπεδα αμιγούς πρωτεΐνης SMN που παράγονται από το *SMN2* δεν επαρκούν για να αποτρέψουν την εκδήλωση της νόσου (95),(93). Ανάλυση μεταγράφων από υβριδικά γονίδια *SMN1-SMN2* και μιας νέας μετάλλαξης η οποία είχε σαν αποτέλεσμα την παράλειψη του εξωνίου 7, έδειξε άμεση

σχέση μεταξύ της εκδήλωσης της νόσου και της απώλειας του εξωνίου 7. Για τη συστηματική αξιολόγηση του ποιο από τα 5 νουκλεοτίδια τα οποία διαφέρουν ανάμεσα στα δύο γονίδια *SMN1* και *SMN2* επηρεάζουν την εναλλακτική συρραφή του εξωνίου 7, οι Lorson και συν. (1998) δημιούργησαν μια σειρά από μικρογονίδια (minigenes) και μελέτησαν τα μετάγρατά τους (96). Στο εξώνιο 7 βρέθηκε ότι η μετάβαση C-σε-T στο κωδικόνιο 280, μια σιωπηρή μεταφραστικά παραλλαγή, ήταν αναγκαία και επαρκής για να επιβάλλει την εναλλακτική συρραφή στο εξώνιο 7. Σε μια μελέτη για τον προσδιορισμό των λειτουργικών διαφορών μεταξύ του *SMN1* και του *SMN2*, οι Monani και συν. (1999) βρήκαν ότι η παρουσία της κυτοσίνης στην θέση +6 στο εξώνιο 7 είχε σαν αποτέλεσμα την ομαλή αποκοπή και συρραφή του εξωνίου (90). Αντιθέτως, η παρουσία της θυμίνης στην ίδια θέση οδηγούσε στη απώλεια του εξωνίου 7 στην πλειοψηφία των μεταγράφων. Επειδή στην πλειονότητα των ανθρωπίνων μεταγράφων *SMN2* λείπει το εξώνιο 7, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι το 5' μέρος του εξωνίου 7 περιέχει ένα ενισχυτή αποκοπής-συρραφής εξωνίων και ότι χαμηλά επίπεδα φυσιολογικών μεταγράφων είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση του φαινοτύπου SMA.

1.9 Πρωτεΐνη SMN

Χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης SMN, οι Liu και Dreyfuss (1996) ανίχνευσαν μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 38-kD με 294 αμινοξέα, η οποία εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (97). Ανοϊσοοστηχημικά φάνηκε η παρουσία της πρωτεΐνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ποντικού, πιθήκου και ανθρώπου. Η SMN πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και ιδιαίτερα ανιχνεύεται σε κατώτερους κινητικούς νευρώνες των νεογνών και των ενηλίκων (98). Η πρωτεΐνη SMN οργανώνεται κυρίως σε νουκλεόσωμα και κυτταρόπλασμα και σπανίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ιδιαίτερα βρέθηκε σε σύνδεση με κυτταροσκελετικό συστατικό στους δένδριτες και στους άξονες και έντονα εμφανής μετά την γέννηση (99).

Παρ' ότι η πρωτεΐνη SMN εκφράζεται σε όλα τα σωματικά κύτταρα, παραμένει αδιευκρίνιστος ο λόγος που οδηγεί σε διαταραχή μόνο στους κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η πρωτεΐνη SMN παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των κινητικών νευρώνων (100). Ιδιαίτερα βρέθηκε σε σύνδεση με κυτταροσκελετικό συστατικό των δένδριτών και των αξόνων και έντονα εμφανής μετά τη γέννηση (101, 102). Χαμηλές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης SMN συνδέονται με χαμηλές συγκεντρώσεις β-ακτίνης στους νευρικούς άξονες και κώνους, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη SMN συμβάλλει στην ανεπαρκή μεταφορά των mRNA της β-ακτίνης (103). Επίσης βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη SMN απομονώνεται μαζί με την προφιλίνη, μία πρωτεΐνη προσδεμένη σε ακτίνη, σαν ξεχωριστές δομές από τους νευρικούς δένδριτες (104, 105). Επίσης, οι Cettola και συν. Το

2007 ανακοίνωσαν την απομόνωση μιας SMN πρωτεΐνης που περιέχει το εσώνιο 3, χαρακτηρίζοντάς την έτσι ως αξονική πρωτεΐνη (106). Το εσώνιο 3 φαίνεται να παρουσιάζει πολύ χαμηλό ποσοστό πολυμορφικών μεταλλάξεων, συγκριτικά με τα άλλα εσόνια του γονιδίου, ενισχύοντας την υπόθεση για κάποιο λειτουργικό ρόλο στους νευροάξονες (107, 108). Επιπλέον πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η συμμετοχή του παράγοντα πλαστίνη-3 (PLS3) οδηγεί στην οργάνωση F- ακτίνης γεγονός που βελτιώνει την κλινική εικόνα σε ποντίκια- μοντέλα ενώ σε ανθρώπους φαίνεται να επηρεάζει τον κλινικό φαινότυπο, αλλά όχι υποχρεωτικά σε όλα τα άτομα με υπερέκφραση (108, 109, 110)

Η πυρηνική πρωτεΐνη SMN ολιγομερίζεται μέσα σε δομές οι οποίες ονομάζονται 'GEMS' (Gemini of the coiled bodies) (112). Τα σωμάτια GEMS διαφέρουν σε μέγεθος (περίπου 0.2-1.5μm) και σε αριθμό (~1-10) και περιέχουν επίσης μεταξύ άλλων μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNP's) που συμμετέχουν στην ωρίμανση του mRNA και πρωτεΐνες οι οποίες ονομάζονται "gemins". Δεν περιέχουν pre-mRNA, DNA ή rRNA και φαίνεται ότι λειτουργούν ως θέσεις ρύθμισης της παραγωγής και μεταφοράς snRNP's και όχι για το μάτισμα ή την παραγωγή ριβοσωμάτων. Αλλαγές στο μέγεθος των Gems χρησιμοποιούνται ως δείκτες διαφοροποίησης του κυττάρου (113). Η πρωτεΐνη SMN-interacting protein-1 (SIP1), δημιουργεί ένα σύμπλοκο μαζί με την SMN και άλλες πρωτεΐνες αποκοπής-και συρραφής εξωνίων (114). Η SMN πρωτεΐνη έχει δύο σημεία πρόσδεσης, ένα για την SIP1 και ένα άλλο για τις Sm πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που συνήθως συμμετέχουν στα μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια, snRNPs

(115, 116). Ελάττωση της πρωτεΐνης SMN έχει επίδραση στους παράγοντες ματίσματος (117)

Η ανάλυση των αλληλουχιών των ορθόλογων γονιδίων SMN σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου των C. elegans και S. pombe αποκάλυψε κάποιες συντηρητικές περιοχές υποδηλώνοντας τη σημασία τους στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα το εξώνιο 2 θεωρείται ότι βρίσκεται σε πρωτεΐνες με RNA-binding λειτουργία υποδηλώνοντας ένα ρόλο στο μεταβολισμό του RNA. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστές και ως tudor περιοχές επειδή έτσι ονομάστηκαν στη Drosophila melanogaster (118). Η σημασία της περιοχής αυτής φαίνεται και από σημειακές μεταλλάξεις σε ασθενείς που εμποδίζουν την λειτουργικότητά της, όπως η μετάλλαξη S262I και η Y272C (119). Έλλειψη 27 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο (SMN Δ IN27) της πρωτεΐνης εμποδίζει το μάτισμα των pre-mRNA in vitro, αντίθετα με το μη μεταλλαγμένο SMN. Βρέθηκε επίσης ότι SMN μεταλλάξεις από ασθενείς δεν επάγουν τη διαδικασία του ματίσματος (120).

Στον ζαχαρομύκητα Schizosaccharomyces pombe ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη με σημαντική ομολογία με το SMN και η πρωτεΐνη που ονομάζεται Yab8p, συνδέεται με το SMN που ανευρίσκονται στα ανώτερα ευκαρυωτικά (121). Η πρωτεΐνη Yab8p αλληλεπιδρά με μια άλλη νέα πρωτεΐνη των μυκήτων την Yip1p που εμφανίζει αναλογία με το SIP1 (122). Σε μια knockout σειρά μυκήτων καταστολή της Yab8 έκφρασης προκάλεσε πυρηνική συσσώρευση του poly(A) mRNA που αναστέλλει το μάτισμα. Προφανώς η Yab8p είναι μια νέα πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μάτισμα υποθέτοντας ότι η Yab8p η λειτουργία της σχετίζεται με την πυρηνική δεξαμενή του SMN. Η πρωτεΐνη

αυτή στο *S. pombe* που είναι ορθόλογη με το SMN ονομάζεται *SMN1+*. Οι ερευνητές αποφάνθηκαν ότι *SMN1+* είναι σημαντικό για τη επιβίωση του *S. pombe*, και παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο *SMN1+* (*SMN1p*) δείχνουν διαταραχή της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα και μειώνουν τη βιωσιμότητα του μύκητα. Επιπλέον η υπερέκφραση του *SMN1p* καταλήγει σε αύξηση της ταχύτητας ανάπτυξης των κυττάρων.

Μονοκλωνικά αντισώματα για την SMN πρωτεΐνη βρέθηκε ότι εμποδίζουν την ωρίμανση pre-mRNA και χρησιμοποιώντας κυρίως βιοχημική κατακερμάτιση και anti-SMN χρωμοταγραφία συγγένειας, βρήκαν δυο ξεκάθαρα πυρηνικά SMN συμπλέγματα, το NSC1 και το NSC2 (123). Το σύμπλεγμα NSC1 είναι ένα U snRNA-ελεύθερο 20S σύμπλεγμα που περιέχει τουλάχιστον 10 πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της SIP1, της ελικάσης dp103/Gemin3 και της νέας πρωτεΐνης GIP1/Gemin4 που αλληλεπιδρά με την dp103/Gemin3-interacting. Το σύμπλεγμα NSC1 περιέχει επίσης μια υποομάδα από Sm πρωτεΐνες, υποδηλώνοντας ότι η SMN-Sm αλληλεπίδραση δεν περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχει επίσης άμεση σύνδεση με τη συσσώρευση στον πυρήνα των snRNPs και πιθανόν άλλων RNPs (Εικ. 18). Η πρωτεΐνη SMN προσδένεται στις πλούσιες σε αργινίνη-γλυκίνη (RG) περιοχές των πρωτεϊνών snRNP D1 και D3. Η πρόσδεση των άλλων SMN-interacting πρωτεϊνών βρέθηκε να ενισχύονται από μεθυλίωση. Έτσι η μεθυλίωση των αργινινών είναι ένας νέος μηχανισμός που επάγει ειδική πρωτεΐνη-πρωτεΐνη αλληλεπίδραση και φαίνεται να είναι το κλειδί στη μεγάλη συγγένεια με τα υποστρώματα των SMN (123).

Οι Young και συν. (2000) έδειξαν ότι παρατηρείται ο ολιγομερισμός της SMN πρωτεΐνης μέσω περιοχών που κωδικοποιούνται από τα εξώνια 2b και 6. Το

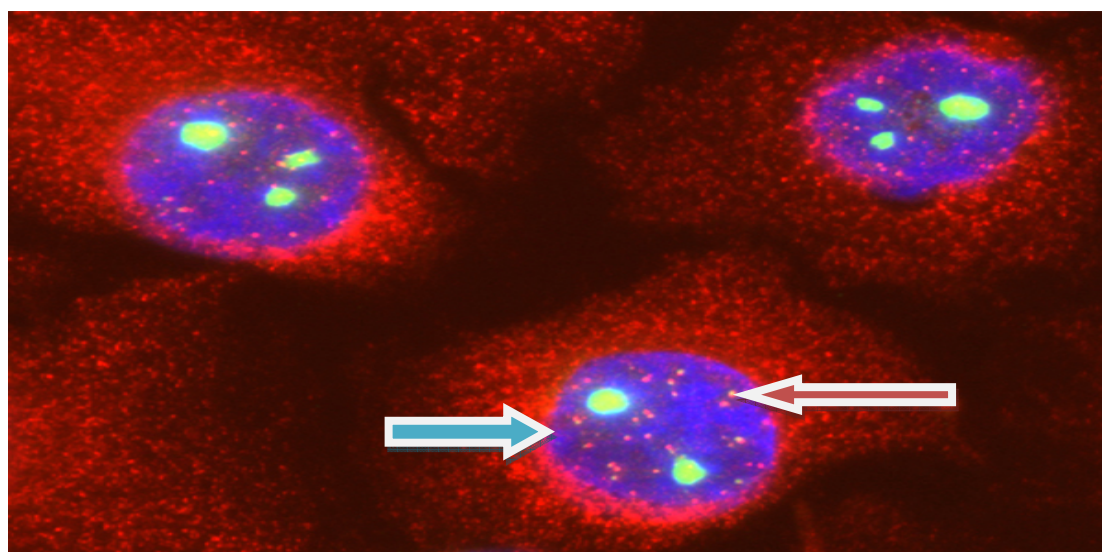
εξώνιο 2b κωδικοποιεί μια περιοχή πρόσδεσης της SIP1 (124). Επίσης παρατηρείται μια αλληλεπίδραση των περιοχών που κωδικοποιούνται από τα εξώνια 2 και 4 με τα SMN μονομερή. Τα συμπλέγματα snRNPs μεταφέρονται στον πυρήνα δια μέσου της πρωτεΐνης importin-beta (KPNB1). Τα snRNPs φέρουν ένα πυρηνικό οδηγό που αποτελείται από μια 2,2,7-τριμεθυλγουανουσίνη (TMG) cap και τον πυρήνα του με τις πρωτεΐνες Sm.

Σε κυτταρικές μελέτες η πρωτεΐνη ZPR1 (ZNF259) αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη SMN και αυτές οι δυο πρωτεΐνες εντοπίζονται μαζί σε μικρές υποπυρηνικές δομές μέσα στα σωμάτια GEMS (125). Ανάλυση ελλείψεων έδειξε ότι η C-τελική περιοχή και των 2 περιοχών που αντιστοιχούν στη B περιοχή του ZPR1 και του εξωνίου 7 του SMN, που απαιτούνται για αλληλεπίδραση και τον εντοπισμό μαζί στον πυρήνα. Διαταραχές στις πρωτεΐνες αυτές καταλήγουν σε καταστολή του ματίσματος *in vitro*. SMN ινοβλάστες ασθενών με SMA τύπου I έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του ZPR1 με SMN διακόπτεται (126).

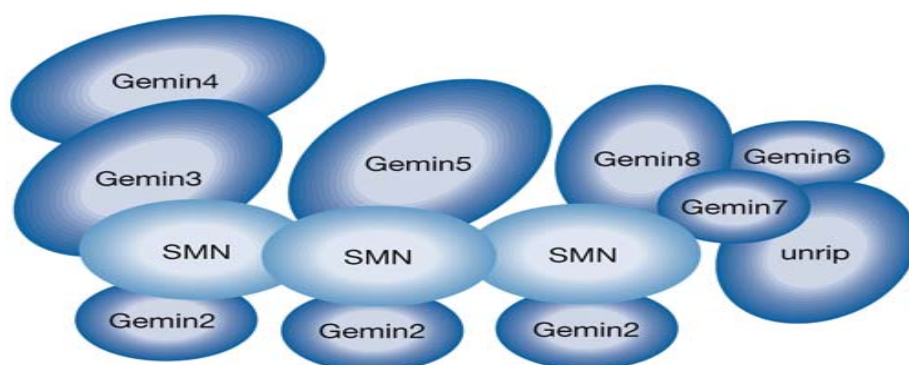
Η SMN πρωτεΐνη συνδέεται στα σωμάτια GEMS με την Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin5, Gemin6 και Gemin7 (Εικ. 16) (113, 127). *In vitro* πειράματα αποκάλυψαν κάποιες προϋποθέσεις για την σύνδεση Sm πρωτεϊνών και των U snRNAs στο SMN σύμπλεγμα. Το πιο σημαντικό είναι ότι το SMN σύμπλεγμα είναι απαραίτητο για να επιβεβαιώσει ότι η συσσώρευση του Sm πυρήνα γίνεται σε συγκεκριμένο RNA στόχο και προλαμβάνει σύνδεση με άλλα RNAs (113, 128). Έτσι το σύμπλεγμα SMN ως ειδικός παράγοντας είναι σημαντικός για τη συγκέντρωση των Sm πρωτεϊνών στο U snRNAs και προστατεύει τα κύτταρα από μη ειδική πρόσδεση και επιζήμια πρόσδεση των Sm στο RNAs (129).

1.10 Το SMN σύμπλοκο

Το SMN σύμπλοκο δημιουργείται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης SMN με άλλες υπομονάδες (SMN-interacting proteins, αναφέρονται και ως Gemin2-8, η Gemin2 γνωστή και ως SIP1) και έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά παροδικά με τα σύμπλοκα των σωματιδίων συρραφής (Sm) που περιέχουν τα U1, U2, U4 και U5 snRNPs (113, 127, 129).



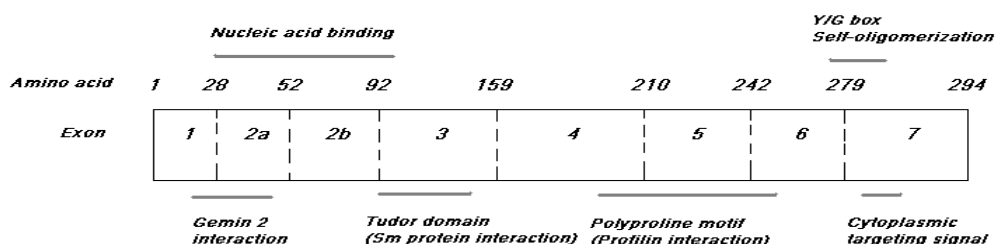
Εικόνα 16: Η SMN πρωτεΐνη συναντάται από ευδιάκριτα πυρηνικά οργανίδια σε καλλιέργεια κινητικών νευρώνων. Με συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και με χρήση ειδικών αντισωμάτων, η SMN φαίνεται με πορτοκαλί (κόκκινο βέλος) και ανιχνεύεται σε πυρηνικά οργανίδια (μπλε βέλος) τα οποία έχουν ωοειδές σχήμα. (130)



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του SMN συμπλόκου. Τα Gemin 2,3,5,7 δεσμεύονται κατευθείαν στο SMN, το Gemin 4 δεσμεύεται μέσω του Gemin 3, και τα Gemin 6, 8, unrip μέσω του Gemin 7 (131).

Μελέτες έδειξαν ότι το SMN σύμπλοκο μεσολαβεί στη σωστή διαμόρφωση των U snRNPs συμπλόκων σε μια ATP-εξαρτώμενη αντίδραση και λειτουργεί έτσι ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικός συνοδός (RNP-chaperone) (131). Αν και η μοριακή βάση αυτού του υποβοηθούμενου σχηματισμού των RNPs δεν είναι επαρκώς κατανοητός, μερικές σημαντικές αλληλεπιδράσεις στο SMN σύμπλοκο έχουν γίνει γνωστές.

Ο βασικός παράγοντας SIP1 (Gemin2) δεσμεύεται άμεσα στο N-τελικό άκρο της SMN (Εικ. 16). Το SMN σύμπλοκο έρχεται επίσης σε επαφή με τις Sm πρωτεΐνες μέσω της κεντρικής Tudor περιοχής, μια αλληλεπίδραση που ενισχύεται από τη δυνατότητα του SMN να ολιγομερίζεται (Εικ. 17) (131, 132).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση των εξωνίων του γονιδίου *SMN* και των περιοχών που κωδικοποιούν με γνωστό λειτουργικό ρόλο. Στο *SMN2*, το εξώνιο 7 έχει απομακρυνθεί με αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης από την οποία απουσιάζουν 16 αμινοξέα από την καρβοξυτελική περιοχή (131).

1.10.1 Ρόλος και μηχανισμός δράσης του συμπλόκου SMN

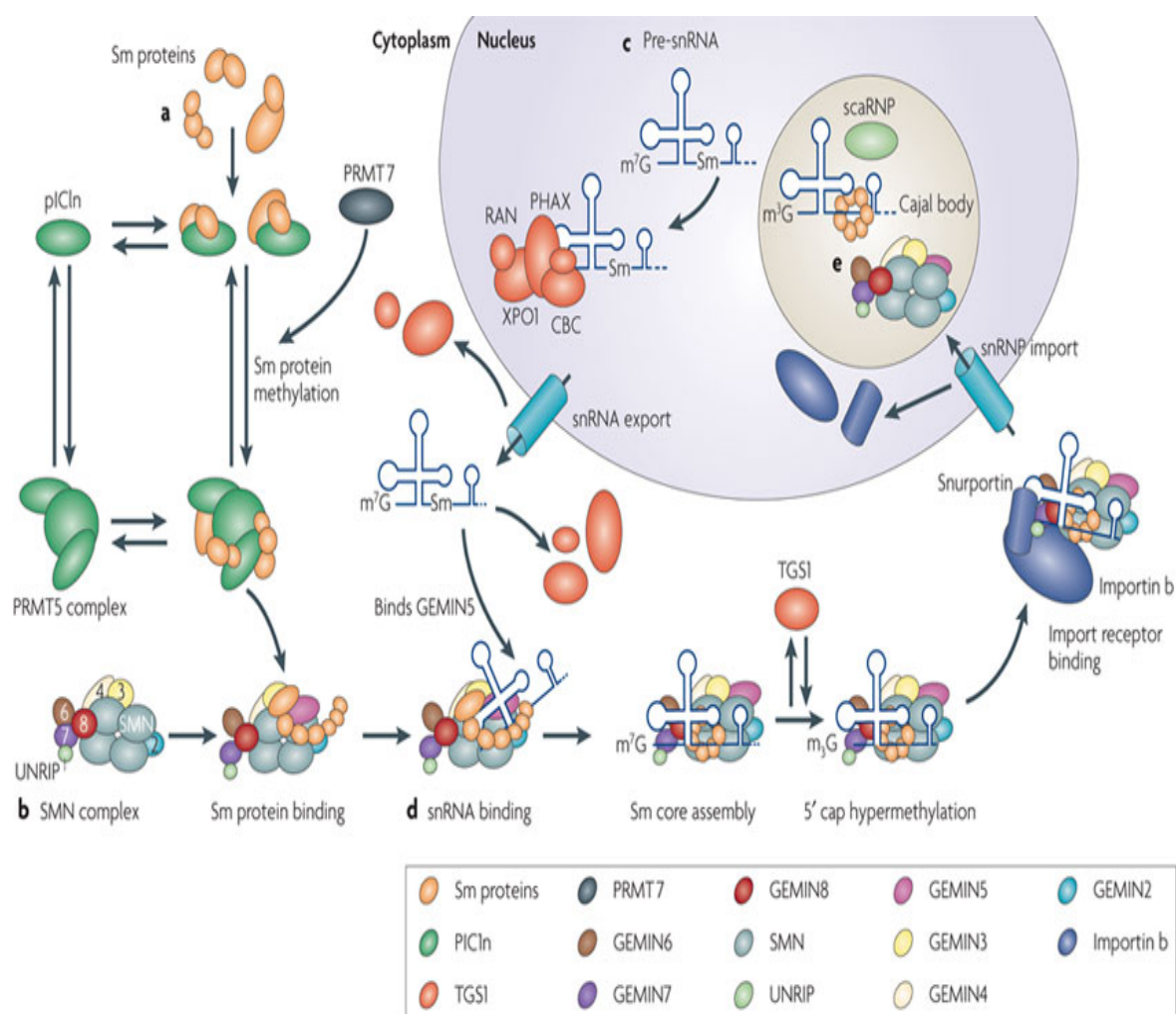
Τα περισσότερα από τα γνωστά υποστρώματα του SMN συμπλόκου είναι διάφοροι τύποι ενός RNP συμπλόκου τα οποία έχουν ποικίλους ρόλους σχετικά με το μεταβολισμό του RNA. Η μετάλλαξη στο *SMN* γονίδιο (*SMN*

ΔN27) αναστέλλει το μάτισμα του pre-mRNA σε *in vitro* συνθήκες υποδεικνύοντας την άμεση εμπλοκή του SMN γονιδίου στο μάτισμα του pre-mRNA (133). Ο μηχανισμός ματίσματος του pre-mRNA μέσω του οποίου συμμετέχει το SMN σύμπλοκο είναι ο ακόλουθος όπως φαίνεται στην εικόνα 18 (131):

Τα UsnRNAs με εξαίρεση το U6, μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Τα pre-UsnRNAs περιλαμβάνουν επιπρόσθετα νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο και μονομεθυλιωμένο κάλυμμα (cap) m⁷GpppG (m⁷G) στο 5'-άκρο. Αυτή η cap δομή αναγνωρίζεται από το CBC (nuclear –cap binding σύμπλοκο), ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από το CBP20 και το CBP80, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δέσμευση στη m⁷G-cap δομή (131). Η πρωτεΐνη Phax που εφαρμόζει στο RNA (phosphorylated adaptor for RNA export) δεσμεύει τις CBP20 και CBP80 μαζί με το UsnRNA και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα εξόδου CRM1/Exportin 1 (Χρο1) (134). Ο CRM-1 μαζί με την Ran-GTP μεταφέρει τα UsnRNAs στο κυτταρόπλασμα. Μετά τη μεταφορά των UsnRNAs ακολουθεί η GTP-υδρόλυση της πρωτεΐνης Ran και η αποφωσφορυλίωση της Phax, ενώ στο κυτταρόπλασμα τα UsnRNAs δεσμεύονται στο SMN σύμπλοκο το οποίο φέρει τις πρωτεΐνες: SmD1, SmD3 και SmB, οι οποίες είναι ήδη μεθυλιωμένες από τα μεθυλιοσώματα. Τα μεθυλιοσώματα παράγουν συμμετρικές δομές, τις διμεθυλαργινίνες που είναι υπεύθυνες για τη μεθυλίωση των Sm πρωτεϊνών(131). Το SMN σύμπλοκο μεταφέρει τις μεθυλιωμένες Sm πρωτεΐνες στην ειδική περιοχή συνάθροισης των UsnRNAs και το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει υποβάλλεται σε υπερμεθυλίωση της m⁷G-cap περιοχής του 3'-άκρου με αποτέλεσμα την

ωρίμανση των UsnRNAs και το σχηματισμό του m³G-cap στο 3'-άκρο. Η m³G-cap περιοχή αποτελεί θέση πρόσδεσης για την Snurportin, πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα εισόδου importin-β (IP-β)(Εικ. 18).

Το SMN σύμπλοκο δεν αποδεσμεύεται από τα UsnRNPs και είναι παρόν τόσο κατά την συνάθροιση των Sm, όσο και μετά την cap υπέρ-μεθυλίωση και απελευθερώνεται μόνο μετά την είσοδο των UsnRNPs στον πυρήνα, γεγονός που δηλώνει ότι ίσως η είσοδος αυτή να είναι SMN σύμπλοκο-εξαρτώμενη. Στον πυρήνα το SMN σύμπλοκο σχηματίζει της πυρηνικές δομές που ονομάζονται gem bodies.



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης του SMN συμπλόκου (131).

Έτσι το SMN σύμπλοκο διευκολύνει τη σωστή διαμόρφωση των UsnRNAs μέσω της πρόσδεσης του στον Sm-πυρήνα σε αυτό με δύο τρόπους:

1. Εξασφαλίζει την επιτυχή τοποθέτηση του Sm-πυρήνα στην περιοχή αυτή,
2. Μειώνει τη διαθεσιμότητα των Sm πρωτεϊνών σε μη ειδικές συναθροίσεις, απομονώνοντας τις Sm πρωτεΐνες, με την πρόσδεση των πλούσιων περιοχών σε αργινίνη και γλυκίνη.

1.11 ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Το γονίδιο *SMN* εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, όπως την καρδιά, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ήπαρ, τους πνεύμονες, τους μυς, τους νεφρούς, το πάγκρεας (93). Στο ΚΝΣ, η *SMN* δεν είναι ομαλά κατανεμημένη, γιατί στο νωτιαίο μυελό και συγκεκριμένα στους κινητικούς νευρώνες βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα, σε αντίθεση π.χ. με τον υποθάλαμο και τα εγκεφαλικά κύτταρα (99).

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι κινητικοί νευρώνες απαιτούν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης *SMN* για τη σωστή τους ανάπτυξη και λειτουργία, επομένως είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην μείωση των επιπέδων της. Η *SMN* πρωτεΐνη πιθανολογείται ότι απαιτείται για το μάτισμα των pre-mRNA τα οποία προαπαιτούνται για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κινητικών νευρώνων (131).

Όντως, μελέτες με σπονδυλωτά και ασπόνδυλα μοντέλα SMA υποδεικνύουν το ρόλο της *SMN* πρωτεΐνης στην ανάπτυξη και καθοδήγηση των νευρώνων αλλά και στη διαμόρφωση των νευρομυϊκών συνάψεων, αφού χαμηλά επίπεδα της *SMN* επιδρούσαν στην ανάπτυξη τους χωρίς όμως να επηρεάζονται άμεσα η βιωσιμότητά τους (103). Οποιαδήποτε μείωση, λοιπόν των επιπέδων της φαίνεται ότι επιδρά στην αναπτυξιακή κίνηση του εκφυτικού κώνου. Η δε αποτυχία να έρθει σε επαφή με τον στοχευόμενο μυ είναι καθοριστική για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (130). Συγκεκριμένα όπως απεικονίζεται στην εικόνα 19, η έλλειψη του *SMN1* γονιδίου προκαλεί (135):

A. Την αποτυχία σωστής κατανομής της ακτίνης στις συνάψεις με αποτέλεσμα να επηρεάζεται:

1. η διαφοροποίηση και διατήρηση των συνάψεων
2. η δομική στοιχειοθέτηση των ρυθμιστικών μορίων (π.χ. συνάψεις)
3. η διακίνηση και απελευθέρωση των κυστιδίων στις συνάψεις

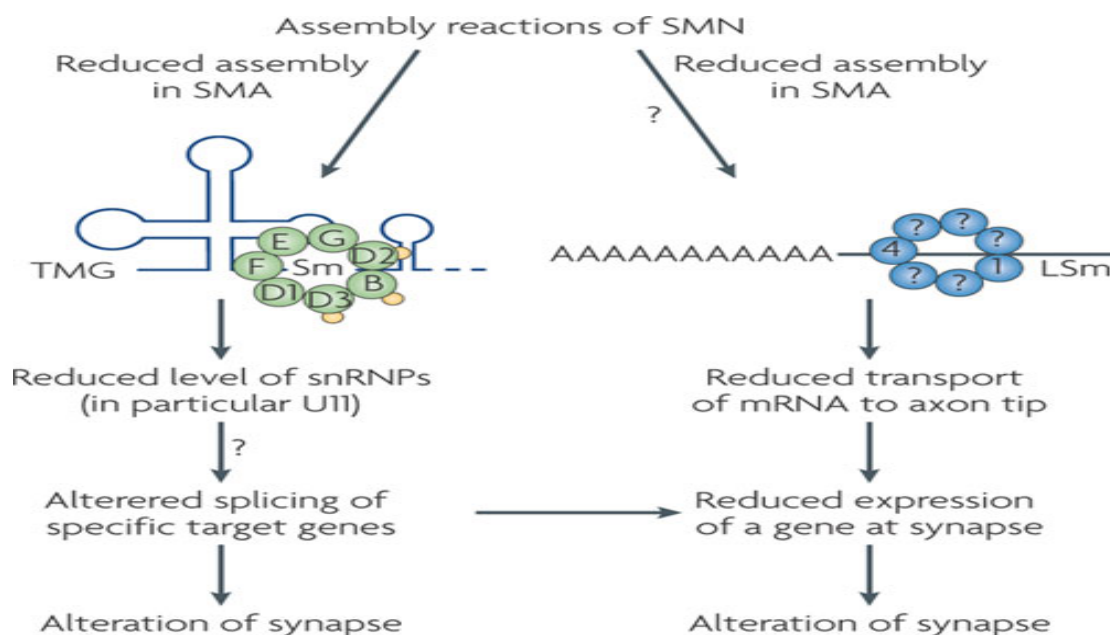
B. Την ατελή διαφοροποίηση και διατήρηση των νευραξόνων με επιπτώσεις:

1. στην ανάπτυξη των νευριτών, την καθοδήγηση των νευρικών αξόνων και την κινητικότητα των εκφυτικών κόνων
2. στη μεταφορά του mRNA σε απομακρυσμένους νευράξονες και συνάψεις
3. στη διαμόρφωση των νευρομυϊκών συνάψεων και της σταθερότητάς τους
4. στο μεταβολισμό των νευρικών ινών

Τα δύο παραπάνω οδηγούν στην απονέυρωση και στην αποικοδόμηση των κινητικών νευρώνων με αποτέλεσμα τη μυϊκή ατροφία. Παράλληλα η έλλειψη του *SMN1* φαίνεται ότι προκαλεί αποδιάταξη του κυτταροπλάσματος και των πυρηνικών λειτουργιών όπως (131):

1. της βιογένεσης των snRNPs και των snRNPs
2. της διαδικασίας του pre-mRNA
3. των μεταγραφικών ρυθμίσεων

Ωστόσο διατηρούνται επιφυλάξεις αν και κατά πόσο οδηγούν στην εκφύλιση των κινητικών νευρώνων και κατ' επέκταση στην μυϊκή ατροφία.



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 20: Επιπτώσεις από τη μείωση της ενεργητικότητας της SMA πρωτεΐνης που έχουν ως αποτέλεσμα την παθολογία των κινητικών νευρώνων στην SMA (135).

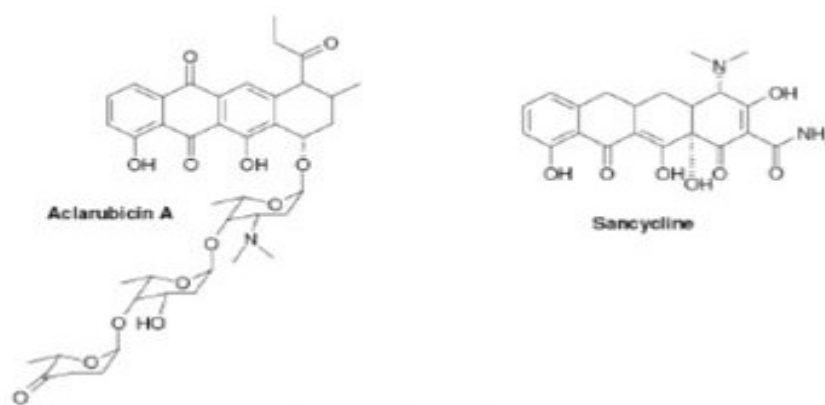
Η SMN πρωτεΐνη συμμετέχει σ' ένα μεγάλο αριθμό πυρηνικών και κυτταροπλασματικών λειτουργιών στις οποίες συμπεριλαμβάνεται η διαμόρφωση των σωματιδίων συρραφής και η μεταγραφή πολλών γονιδίων. Η διαταραχή των λειτουργιών αυτών από τη μείωση της έκφρασης της SMN οδηγεί στην εμφάνιση της παθογένειας της SMA. Η απώλεια της λειτουργικότητας της SMA πρωτεΐνης στους μυς έχει άμεση συνέπεια στο φαινότυπο των σκελετικών μυών. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι επιδρά στο περιφερικό νευρικό σύστημα όπως στους νευρίτες και στον εκφυτικό κώνο, αφού ατελής SMN πρωτεΐνη έχει σαν αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο στους κινητικούς νευρώνες (131).

1.12 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η ανάπτυξη υποψήφιων θεραπευτικών μεθόδων αποτελεί μία ουσιαστική συνέπεια της αποκάλυψης της μοριακής γενετικής της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας. Η ιδιαίτερη γενομική διάταξη των γονιδίων SMN επιτρέπει μια νέα θεραπευτική προσέγγιση: Να αυξήσει τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMN2, που απαντάται σε όλους τους ασθενείς, έτσι ώστε να αναπληρώσει την έλλειψη του γονιδίου SMN1. Αυτή η ιδέα προέτρεψε την διεξαγωγή ερευνών στην αύξηση της συγκράτησης των mRNA μεταγράφων του εξωνίου 7 του SMN2, την ενίσχυση της μεταγραφής του SMN2 μέσω ενεργοποίησης υποκινητών τη διαμόρφωση της έκφρασης της SMN πρωτεΐνης και την αποσόβηση της αποδόμησής της (136, 137, 138).

Οι πλούσιες σε σερίνη-αργινίνη πρωτεΐνες αποτελούν παράγοντες ματίσματος οι οποίοι αλληλεπιδρούν με ενισχυτές ματίσματος εξωνίων και επηρεάζουν το μάτισμα του mRNA. Ο παράγοντας ματίσματος Htra2-β1, ο οποίος είναι πλούσιος σε σερίνη-αργινίνη, βρέθηκε να διεγείρει την έκφραση φυσιολογικού SMN2 όταν αλληλεπιδρά με ενισχυτές ματίσματος εξωνίων, ειδικά με στοιχεία πλούσια σε αργινίνη-γλυκίνη, όπως ο θετικός ενισχυτής ματίσματος 2 (139). Η κατάργηση (απουσία, έλλειψη) τέτοιων μηχανισμών έχει σαν αποτέλεσμα την παράλειψη του εξωνίου 7 (140, 141). Ελάχιστα είναι γνωστά για τη σημασία του Htra2-β1, και τα γονίδια SMN είναι τα μόνα γνωστά ανθρώπινα γονίδια των οποίων το μάτισμα ρυθμίζεται αποκλειστικά από το Htra2-β1. Άλλα ισομορφή στον άνθρωπο (π.χ. Htra2-β3 και Htra2-α) δεν διεγείρουν σε επαρκή βαθμό το μάτισμα των εξωνίων στο SMN2 (141). Η χρήση φαρμακευτικών συμπλόκων στη ενίσχυση του Htra2-β1 μπορεί να αποδειχθεί

ως μία πολύτιμη στρατηγική στη ρύθμιση του ματίσματος του *SMN2*. Μια από τις πρώτες υποψήφιες θεραπείες για τη νωτιαία μυϊκή ατροφία ήταν η ακλαρουμπικίνη (aclarubicin, aclacinomycin A), ένας συνδυασμός ανθρακυκλίνης και καταστολέας της τοποϊσομεράσης II που χρησιμοποιούνταν σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους ή λευχαιμία (139). Η ακλαρουμπικίνη ανακαλύφθηκε μέσω δοκιμασίας 960 συμπλόκων από χημική βιβλιοθήκη όταν αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε μία ημιποσοτική εκτίμηση βασισμένη στην τεχνική RT-PCR για το προσδιορισμό συγκράτησης του εξωνίου7(141).



Εικόνα 21: Δομική σύγκριση της ακλαρουμπικίνης με παράγωγο της τετρακυκλίνης (142)

Όμως η τοξικότητα της Ακλαρουμπικίνης απαγόρευσε την διεξαγωγή περεταίρω ερευνών για την ανάπτυξη της ουσίας για κλινική χρήση. Εντούτοις, φάνηκε χρήσιμη στο να καταδείξει ουσίες που μπορεί να τροποποιήσουν το μάτισμα του *SMN2* και να εδραιωθεί ως μία έγκυρη προσέγγιση στην αναζήτηση υποψήφιων θεραπειών (142).

Με την ακετυλίωση των ιστονών, το περιβάλλον DNA χαλαρώνει και καθίσταται προσβάσιμο σε μεταγραφικούς μηχανισμούς. Η αποτροπή της ακετυλίωσης των ιστονών μπορεί να ενισχύσει περίπου την έκφραση του 2%

των ανθρωπίνων γονιδίων (139,140). Το βουτυρικό νάτριο ήταν ο πρώτος αναστολέας της δεακετυλάσης ιστονών που βρέθηκε να ενισχύει την έκφραση του *SMN2* και την συγκράτηση του εξωνίου 7 σε λεμφατικές κυτταρικές σειρές από ασθενείς με SMA. Η θεραπεία αυτή ενίσχυε την έκφραση της πρωτεΐνης SMN στο νωτιαίο μυελό, και επίσης μία ομάδα ερευνητών από την Ταιβάν μπόρεσε να αναπτύξει κινητικούς νευρώνες σε ποντίκια SMA (143). Όπως ήταν αναμενόμενο, αυξήθηκε και η έκφραση άλλων γονιδίων όπως η σφαιρίνη. Εντούτοις, ο σύντομος χρόνος ημιζωής στον ανθρώπινο ορό (περίπου 6 λεπτά), απαγόρευσε την ουσιαστική κλινική ανάπτυξη του βουτυρικού νατρίου.

Η επίδραση του βουτυρικού νατρίου ενθάρρυνε και άλλες προσπάθειες αναζήτησης υποθετικών αναστολέων της δεακετυλάσης ιστονών. Το 2003, δύο ερευνητικές ομάδες ανέφεραν ότι το βαλπροϊκό οξύ, ένας άλλος αναστολέας της δεακετυλάσης ιστονών που έλαβε έγκριση για την θεραπεία της επιληψίας, ενίσχυε την παραγωγή πλήρους μήκους *SMN* mRNA. Το βαλπροϊκό οξύ ενεργοποίησε τον υποκινητή *SMN2* και προκάλεσε την έκφραση θετικών παραγόντων ματίσματος όπως οι SF2/ASF και Htra2-β1 (137,138,140). Οι Andreassi και συν. (2004), ανέφεραν ότι ένα παράγωγο του βουτυρικού νατρίου, το φαινυλβουτυρικό, αύξησε την παραγωγή πλήρους μήκους πρωτεΐνης SMN από το *SMN2*, και τον αριθμό των gems στον κυτταρικό πυρήνα (141). Το φαινυλβουτυρικό χρησιμοποιείται ακόμα και για τη θεραπεία παιδιών με ελαττωματική απέκκριση της ουρίας και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής (0.8-1.0 ώρες στον ανθρώπινο ορό) από το βουτυρικό νάτριο (143).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η νωτιαία μυϊκή ατροφία, NMA (SMA: Spinal Muscular Atrophy) είναι μια από τις βασικές αιτίες βρεφικής θνησιμότητας γενετικής αιτιολογίας, ενώ στις περιπτώσεις όπου τα παιδιά επιβιώνουν, αντιμετωπίζουν μια σοβαρή και χρόνια αναπηρία. Στην Ευρώπη αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα (1:10.000 γεννήσεις) νόσημα μετά την ινοκυστική νόσο που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Οι ασθενείς ανάλογα με την ηλικία έναρξης της ασθένειας, την κλινική βαρύτητα και το χρόνο επιβίωσης, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: το τύπο I (Werdnig-Hoffmann), τον τύπο II με ενδιάμεση βαρύτητα και το τύπο III (Kugelberg-Welander) με την ηπιότερη εικόνα. Οι τρεις κλινικές μορφές οφείλονται σε ομόζυγη έλλειψη στο γονίδιο SMN1 (Survival motor Neuron Gene 1) το οποίο εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q13.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κόστος για την υποστήριξη μετά τη γέννηση των παθολογικών ατόμων επιβαρύνει παρα πολύ τις οικογένειες και τα ασφαλιστικά τους ταμεία γιατί είναι νόσημα που εξελίσσεται και απαιτεί συνεχή ιατρική, φαρμακευτική και φυσιοθεραπευτική παρακολούθηση για τουλάχιστον 2-30 χρόνια. Σε πολλές περιπτώσεις απαιτείται παρακολούθηση από εξειδικευμένο νευρολόγο, αναπνευστική υποστήριξη, ειδικά βοηθήματα μετακίνησης καθώς και ορθοπεδικός εξοπλισμός με επακόλουθο το οικονομικό και ψυχολογικό κόστος.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει δυνατότητα ίασης των ασθενών και ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης αυτού του σοβαρού γενετικού νοσήματος είναι η

πρόληψη, κυρίως με την ανίχνευση φορέων καθώς η συχνότητα των φορέων εκτιμάται σε 1:45 περίπου άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

Σήμερα είναι αποδεκτό ότι είναι δυνατή η πρόληψη του νοσήματος με την εφαρμογή μοριακού ελέγχου για αποκάλυψη φορέων, γιατί συντρέχουν τρεις βασικοί λόγοι: α) η μεγάλη συχνότητα της νόσου (1:1000) β) η βαρύτητα του φαινοτύπου και (γ) η εφαρμογή μιας τεχνικής για τη ανίχνευση φορέων καθώς το μεγαλύτερο ποσό των ασθενών φέρουν κοινή μετάλλαξη (ομοζυγη έλλειψη στο στα εξώνια 7 και 8 του γονιδίου SMN1 στη χρωμοσωμική περιοχή 5q13. Ο έλεγχος αυτός δεν επιτρέπει την ανίχνευση της έλλειψης σε ετεροζυγωτία η οποία αναμένεται στην πλειονότητα των φορέων (περίπου 94%). Ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι ο προσδιορισμός ποσοτικών διαφορών του DNA που όμως απαιτεί ειδικό οργανολογικό εξοπλισμό. Ένα δεύτερο σημαντικό πρόβλημα στην ανίχνευση φορέων είναι η ύπαρξη του κεντρομερικού γονιδίου SMN2, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με το τελομερικό SMN1, και μπορεί να εντοπιστεί μόνο με ειδικές τεχνικές, όπως με την τεχνική SSCP ή με την χρήση περιοριστικών ενζύμων. Επίσης, μια άλλη πιθανότητα που θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν είναι η εύρεση πολλών αντιγράφων του SMN1, γεγονός που καθιστά αναγκαία περαιτέρω διερεύνηση για την διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Στη βιβλιογραφία έχει περιγραφεί ένας αριθμός σημειακών μεταλλάξεων σε ασθενείς με SMA.

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό τη αναζήτηση της καταλληλότερης τεχνικής προσέγγισης για την ανίχνευση φορέων καθώς επίσης και για πρώτη φορά την επιδημιολογική εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με το γενικό πληθυσμό στην Ελλάδα. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για το εάν

συντρέχουν οι λόγοι στην Ελλάδα που καθιστούν αναγκαίο τον έλεγχο φορέων και είναι: α) η μεγάλη συχνότητα της νόσου β) η βαρύτητα του φαινοτύπου και (γ) η εφαρμογή μιας τεχνικής για τη ανίχνευση φορέων καθώς το μεγαλύτερο ποστό των ασθενών φέρουν κοινή μετάλλαξη. Ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι ο προσδιορισμός ποσοτικών διαφορών του DNA που όμως απαιτεί ειδικό οργανολογικό εξοπλισμό. Ένα δεύτερο σημαντικό πρόβλημα στην ανίχνευση φορέων είναι η ύπαρξη του κεντρομερικού γονιδίου SMN2, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με το τελομερικό SMN1, και μπορεί να εντοπιστεί μόνο με ειδικές τεχνικές, όπως με την τεχνική SSCP ή με την χρήση περιοριστικών ενζύμων. Επίσης, μια άλλη πιθανότητα που θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν είναι η εύρεση πολλών αντιγράφων του SMN1, γεγονός που καθιστά αναγκαία περαιτέρω διερεύνηση για την διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Στη βιβλιογραφία έχει περιγραφεί ένας αριθμός σημειακών μεταλλάξεων σε ασθενείς με SMA.

Απότερος στόχος της εργασίας ήταν να γίνει εφικτή η πρόληψη του νοσήματος με την χρήση μιας αξιόπιστης τεχνικής, αρχικά στις οικογένειες με ήδη ένα πάσχον παιδί και στην συνέχεια στο γενικό πληθυσμό. Η μελέτη ξεκίνησε με την μελέτη ζευγαριών που είχαν ήδη ένα πάσχον παιδί γιατί κρίθηκε αναγκαίο αρχικά να διευκρινιστεί εάν τα άτομα αυτά ήταν φορείς, ή εάν η μεταλλαγή εκδηλώθηκε μόνο στον πάσχοντα (de novo), ή εάν ήταν αποτέλεσμα μωσαϊκισμού στα γεννητικά κύτταρα των γονέων. Επίσης η πιθανότητα απόκτησης πάσχοντος παιδιού από συγγενείς πρώτου βαθμού των ζευγαριών με ήδη ένα πάσχον παιδί εκτιμάται σε 1:330 αντί για 1:10000 που ισχύει για τον γενικό πληθυσμό. Επίσης λόγω του γεγονότος ότι ο

αριθμός των αντιγράφων τόσο του SMN1, όσο και του SMN2 ποικίλει στο φυσιολογικό πληθυσμό, και του ότι έχουν αναφερθεί φυσιολογικά άτομα με παντελή έλλειψη του γονιδίου SMN, κρίθηκε σημαντική για την ολοκλήρωση της μελέτης η σύγκριση του αριθμού των αντιγράφων SMN1 και SMN2 που παρατηρήθηκαν στις οικογένειες των ασθενών με τον αριθμό που παρατηρήθηκε στον γενικό πληθυσμό.

3. ΥΛΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΥΛΙΚΟ

3.1.1 Επιλογή Ασθενών

- I. Για την τιτλοποίηση των παραγόντων που επηρεάζουν το ποσοτικό PCR
 1. DNA από γονείς πασχόντων - μάρτυρες φορείς (n=6)
 2. DNA από υγιή άτομα μη φορείς όπως προέκυψε έπειτα από μελέτη πολυμορφικών δεικτών-φυσιολογικοί μάρτυρες (n=5)
 3. Δείγματα DNA (n=230) τα οποία φυλάσσονταν στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Παν/μίου Αθηνών
- II. Με την τεχνική του ποσοτικού PCR μελετήθηκαν δείγματα DNA (n=110) από τον γενικό πληθυσμό
- II. Με την τεχνική MLPA μελετήθηκαν:
 1. DNA από γονείς πασχόντων - μάρτυρες φορείς (n=6)
 2. DNA από γνωστά υγιή άτομα μη φορείς -φυσιολογικοί μάρτυρες (n=5)
 3. DNA από συγγενείς πασχόντων (n=96)
 4. DNA από άτομα του γενικού πληθυσμού (n=156)

Για την επιλογή μαρτύρων επιλέχθηκαν οικογένειες στις οποίες υπήρχε ένα πάσχον παιδί, δηλαδή και οι δύο γονείς ήταν υποχρεωτικοί φορείς. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του PCR με ραδιοσημασμένους εκκινητές για πολυμορφικές θέσεις πολύ στενά συνδεδεμένες με την περιοχή του γονιδίου *SMN*. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται εκατέρωθεν των γονιδίων *SMN* και *NAIP* και

με κατεύθυνση 5'→3': D5S125, D5S681, D5S435, Ag1CA, D5S112, D5S127, MAP1B. Οι πολυμορφικές θέσεις που μελετήθηκαν ανήκουν στην ομάδα των μικροδορυφορικών αλληλουχιών (επαναλήψεις του δινουκλεοτιδίου CA). Με τον τρόπο αυτό, χαρακτηρίζονταν και συγκρίνονταν οι απλότυποι των υπό έλεγχο δειγμάτων με αυτούς των πασχόντων, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί έμμεσα αν ήταν φορείς ή όχι.

3.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

1. Θερμικοί κυκλοποιητές (συσκευές PCR):
 - a. Techne PHC-3,
 - b. Hybaid OmniGene TR3 SM2,
 - c. ABI verity 9700 96 θέσεων (Applied Biosystems)
2. Φυγόκεντροι:
 - a. Sorvall της Dupont με κεφαλή SS-34
 - b. Eppendorf 5410
 - c. ψυχόμενη Koolspin-Burkard
3. Αυτοματοποιημένο σύστημα ανίχνευσης φθορισμού DNA Vistra™ DNA Sequencer 725
4. Αυτοματοποιημένος αναλυτής Megabase
5. Συσκευές τροφοδοσίας ηλεκτρικού ρεύματος:
 - a. Apparatus E-C 105
 - b. Electrophoresis power unit PPS 500-200 HEK,
 - c. Consort E752 (Fisher Biotech)
6. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης Nugene Eration Sequencing (Owl Scientific Inc.), 30 x 40 cm
7. Συσκευές οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Owl Scientific Inc.,
 - a. HB-G3 (Maxi Gel),
 - b. HB-G2 (Midi Gel)
8. Φωτόμετρα:
 - a. Ultrospec IILKB (Biochrom)
 - b. NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
9. Καταψύκτης -80 ° C (Advantage)

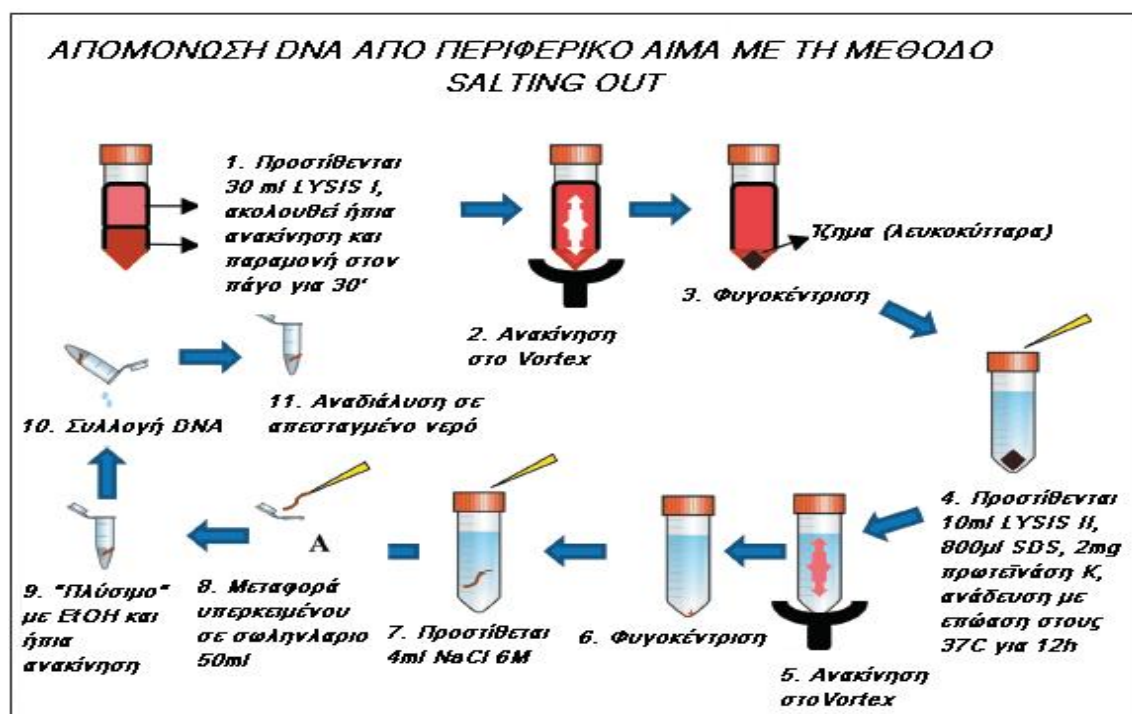
10. Συσκευή ξήρανσης πηκτωμάτων ακρυλαμίδης Heto-Dry GD-I με αντλία
11. Αντλία νερού SUE 30 Q
12. Υδατόλουτρα 30 ° -100 ° C Kottermann Labortechnik
13. Μαγνητικός θερμικός αναδευτήρας Shijders τύπος 34532
14. Θερμενόμενη πλάκα 80 ° -110 ° C της Bioblock Scientific τύπος 92617, για σωληνάρια τύπου erpendorf
15. Αυτόκαυστο υγρής αποστείρωσης Tuttnauer 2340 M
16. Ηλεκτρονικό pHμετρο Beckman FHSPH Meter
17. Συστήματα φωτογράφισης πηκτωμάτων αгарόζης
 - a. GDS 8000 UVPs Ultra-Violet Products Ltd UVP Inc.
 - b. UV Polaroid CV-S 88-46
18. Ηλεκτρονικός ζυγός τύπου Libror EB-32000 Shimadzu

3.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.3.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

3.3.1.i από περιφερικό αίμα

Για την εξαγωγή DNA από περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκαν 10 – 20 cc αίμα σε αντιπηκτικό EDTA, που μετά την αιμοληψία καταψύχθηκαν στους – 20° C για χρονικό διάστημα έως και 4 χρόνια. Η απομόνωση του DNA έγινε με τη μέθοδο του άλατος, η οποία ολοκληρώνεται σε 2 ημέρες.



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου απομόνωσης DNA "Salting Out" από περιφερικό αίμα

Πειραματική Διαδικασία

1^η ΗΜΕΡΑ

1. Το κατεψυγμένο αίμα (10 – 20 ml) αποψύχεται και μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου Bell Art (50 ml).
2. Προστίθενται 30 ml υπότονου διαλύματος (Lysis I), ακολουθεί ήπια ανακίνηση και παραμονή στο πάγο για 30΄.
3. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 15΄΄ στις 5000 στροφές (4° C) σε φυγόκεντρο Sorvall.
4. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ στο ίζημα περιέχονται τα λευκοκύτταρα.
5. Το ίζημα επαναιωρείται σε 30 ml Lysis I.
6. Επανάληψη των σταδίων (3) και (4).
7. Το ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml Lysis I και ακολουθεί επανάληψη των σταδίων (3) και (4).
8. Στο ίζημα προστίθενται 10 ml Lysis II, 800μl SDS 10% και 2mg πρωτεΐνάση K.
9. Το μείγμα επωάζεται με ανάδευση για 12 ώρες στους 37° C.

2^η ΗΜΕΡΑ

1. Συνεχίζεται η επώαση με ανάδευση στους 55° C, για 60΄. Στο στάδιο αυτό με τη βοήθεια του SDS και της πρωτεΐνάσης πραγματοποιείται ο κατακερματισμός των κυτταρικών μεμβρανών και η απομάκρυνση των ενδοπυρηνικών πρωτεϊνών από το DNA.

2. Προστίθενται 4ml NaCl 6M και ακολουθεί ισχυρή ανακίνηση για 15΄΄.
3. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 15΄ στις 5000 στροφές (4° C).
4. Το υπερκείμενο που περιέχει το διαλυτοποιημένο DNA μεταφέρεται σε σωληνάριο των 50 ml και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση κατακρατώντας πάλι το υπερκείμενο. Οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες βρίσκονται στο ίζημα.
5. Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης στα σωληνάρια με το υπερκείμενο και ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
6. Το DNA παρατηρείται στην επιφάνεια του σωληναρίου σε νηματοιδή μορφή, συλλέγεται με γυάλινο ραβδάκι και στη συνέχεια αναδιαλύεται σε σωληνάριο erpendorf με περίπου 500μl δισαπεσταγμένο νερό.

Η συγκέντρωση του DNA ελέγχεται με φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 260nm (A260), όπου 1 μονάδα απορρόφησης αντιστοιχεί σε 50 mg DNA. Η καθαρότητα του DNA ελέγχεται μετρώντας την απορρόφηση των πρωτεϊνών του διαλύματος στα 280nm (A280), όπου θα πρέπει ο λόγος A260/A280 να κυμαίνεται μεταξύ 1,2 – 2.

3.3.1.ii Από τροφοβλάστη ή αμνιακά κύτταρα

1^η ΗΜΕΡΑ

1. Το δείγμα (λάχνες σε 0.9% NaCl) φυγοκεντρείται στις 2000 σ.α.λ. για 10΄.
2. Αφαιρείται το υπερκείμενο.

3. Προστίθενται 1000μl Chorium buffer και το μείγμα καταψύχεται στους -20 ° C έως την επόμενη ημέρα.

2^η ΗΜΕΡΑ

1. Το μείγμα αποψύχεται και φυγοκεντρείται στις 2000 σ.α.λ. για 10'.
2. Προστίθεται STE (1ml για τροφοβλάστη ή 0.5ml για αμνιακό υγρό) και το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάριο 1.5ml.
3. Προστίθενται SDS 20% (15μl για τροφοβλάστη ή 10μl για αμνιακό υγρό) και πρωτεΐνάση K.
4. Το μείγμα επωάζεται στους 55 ° C για 2 ώρες μέχρι να γίνει διαφανές.
5. Προστίθεται ½ του συνολικού όγκου φαινόλη (pH7) και το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 10000 σ.α.λ. για 10'.
6. Κρατείται το υπερκείμενο και προστίθεται ½ του συνολικού όγκου χλωροφόρμιο. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 σ.α.λ. για 10'.
7. Κρατείται το υπερκείμενο και προστίθεται διπλάσιος όγκος εθανόλης. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 σ.α.λ. για 10'.
8. Κρατείται το ίζημα και αφήνεται να στεγνώσει.
9. Το ίζημα επαναιωρείται σε 100μl απεσταγμένο νερό.

3.3.2 Παρασκευή πηκτωμάτων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης και ακρυλαμίδης σε οριζόντιες και κάθετες ηλεκτροφορήσεις αντίστοιχα με σκοπό τον διαχωρισμό τμημάτων DNA.

3.3.2.i Πηκτώματα αγαρόζης

Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές το οποίο απομονώνεται από βρύα. Οι αγαρόζες του εμπορίου περιέχουν και άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και άλατα. Με τη βοήθεια της σύγχρονης τεχνολογίας παρασκευάζονται αγαρόζες υψηλής καθαρότητας οι οποίες ελέγχονται για την παρουσία νουκλεασών, καταστολέων και συστατικών που προσδίδουν μη ειδική σήμανση σε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Η αγαρόζη βράζει σε ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια αφήνεται να πήξει σε ειδικά διαμορφωμένες κατασκευές (trays), στις οποίες έχουν τοποθετηθεί κατάλληλες χτένες για τη δημιουργία θέσεων υποδοχής του προϊόντος προς ηλεκτροφόρηση κατά τη στερεοποίηση του πηκτώματος.

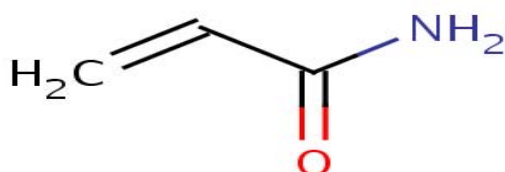
Τα πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή για τον έλεγχο προϊόντων και για την απομόνωση των προϊόντων PCR από τις αντιδράσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντιες δεξαμενές, που περιείχαν το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευής του πηκτώματος. Η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα ενός τμήματος DNA εξαρτάται από το μέγεθός του, τη διαμόρφωσή του, τη συγκέντρωση της αγαρόζης και τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Στον πιν. δίνεται το φάσμα των μεγεθών που διαχωρίζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Σε όλες τις διαδικασίες ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται κλίμακα μεγέθους.

Η ανίχνευση των προϊόντων PCR γίνεται με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας ($\lambda=254$ nm). Με τον τρόπο αυτό ανιχνεύονται νουκλεϊκά οξέα μονής και διπλής αλυσίδας (DNA, RNA). Το βρωμιούχο αιθίδιο

παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 10 mg/ml σε νερό, διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος.

3.3.2.ii Πηκτώματα ακρυλαμίδης

Η ακρυλαμίδα είναι ένα μονομερές με την εξής συντακτική δομή



Με τη παρουσία ελεύθερων ριζών, που συνήθως παρέχονται από υπερθειικό αμμώνιο και σταθεροποιούνται από TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθυλοδιαμίνη) αρχίζει μια αλυσιδωτή αντίδραση, κατά την οποία τα μονομερή της ακρυλαμίδης πολυμερίζονται σε μακρές αλυσίδες. Όταν ο διλειτουργικός παράγοντας N,N'-μεθυλενοδιακρυλαμίδα παρέχεται στην προηγούμενη αντίδραση πολυμερισμού, οι πολυμερισμένες αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας ένα πήκτωμα, του οποίου το πορώδες καθορίζεται από το μήκος και το βαθμό διασύνδεσης των αλυσίδων. Το μήκος των αλυσίδων καθορίζεται από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στη αντίδραση πολυμερισμού.

Τα πηκτώματα ακρυλαμίδης χρησιμεύουν στο διαχωρισμό τμημάτων DNA με μήκος μικρότερο από 1 kb. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αποδιατακτικά πηκτώματα (περιέχουν ουρία) στις τεχνικές προσδιορισμού πολυμορφισμών CA και μη αποδιατακτικά πηκτώματα για τη τεχνική του ποσοτικού PCR. Για όλα τα πηκτώματα στα οποία ηλεκτροφορήθηκαν

ραδιενεργά προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν ζευγάρια τζαμιών με διαστάσεις 30cm x 40cm και με πάχος 0.3mm που αντιστοιχούν και σε ανάλογες διαστάσεις πηκτωμάτων. Για τα μη ραδιενεργά πηκτώματα ακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν διαστάσεις τζαμιών 20 cm x 30 cm και με πάχος 3 mm.

Οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πηκτώματα ακρυλαμίδης έδωσαν τη δυνατότητα ελέγχου της ταχύτητας μετακίνησης στο πήκτωμα.

3.3.3 Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

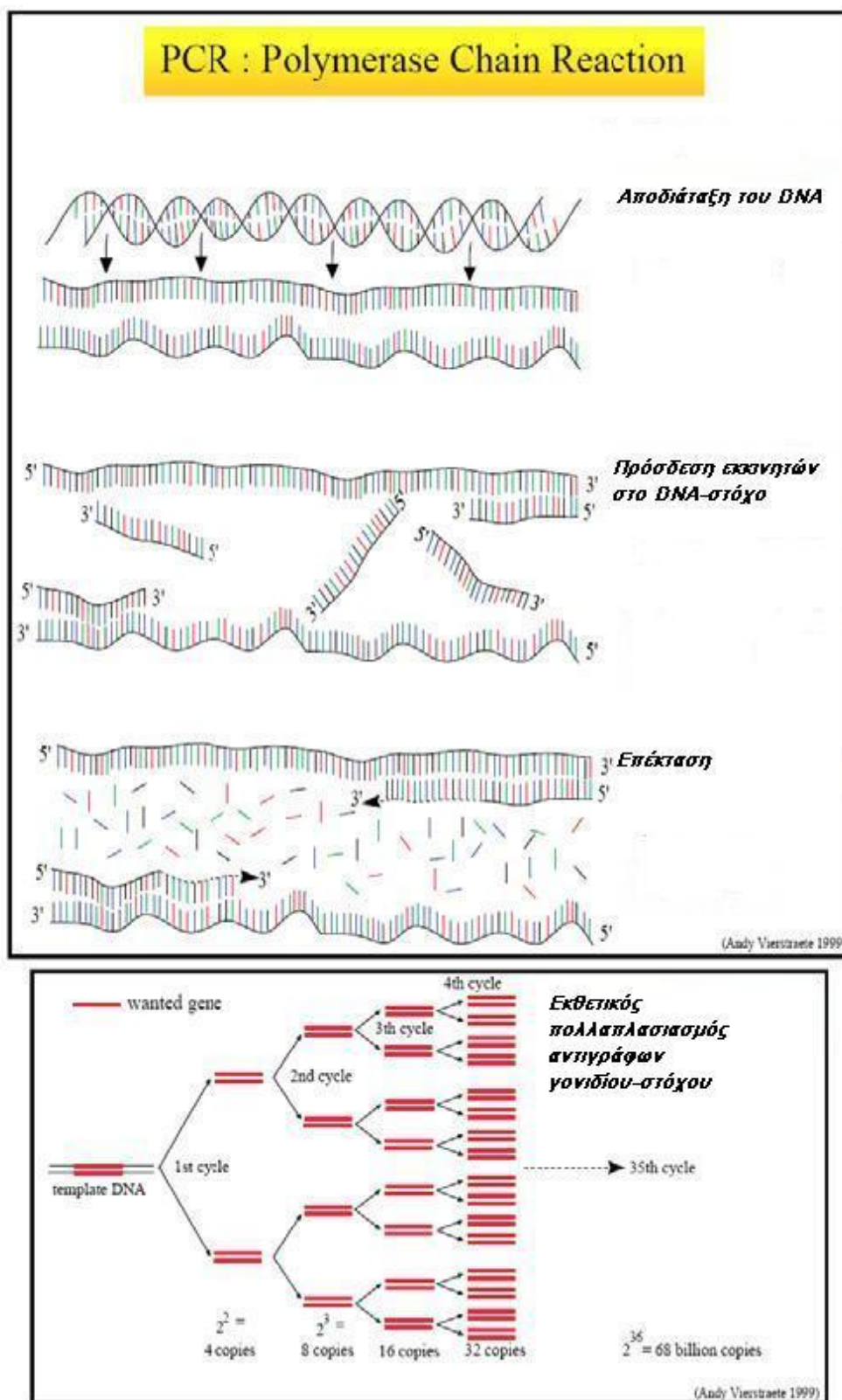
3.3.3.i Απλό PCR

Με την τεχνική PCR (η αρχή της οποίας παρουσιάζεται στην Εικ., επιτυγχάνεται σε ένα τεχνητό σύστημα που μιμείται τη βιολογική διαδικασία της αντιγραφής, να αυξηθεί η ποσότητα του DNA έως και 10^9 φορές μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών. Η αντιγραφή είναι επιλεκτική και δεν απαιτούνται οι βοηθητικοί παράγοντες όπως αυτοί της αποέλιξης του DNA . Ο μόνος περιοριστικός παράγοντας είναι το μήκος των μορίων που πολλαπλασιάζονται. Η τεχνική πρωτοπεριγράφηκε από τους Saki και συν. (1985) και στηρίζεται στη χρήση της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης που απομονώνεται από τον μικροοργανισμό *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν χρειάζεται να αντικατασταθεί σε κάθε βήμα της αντίδρασης όπως γίνεται με τη θερμοευαίσθητη Klenow πολυμεράση, έχει αυτοματοποιήσει την τεχνική.

Για την αντίδραση PCR απαιτούνται: τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, η Taq DNA πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει στο ένζυμο ιόντα μαγνησίου και καλίου. Επίσης απαιτείται ένα ζευγάρι εκκινητών (primers), συνήθως 18-25 βάσεων, που υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη θέση DNA και βοηθούν στην έναρξη του πολλαπλασιασμού της αντίστοιχης περιοχής από την πολυμεράση.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή (θερμικός κυκλοποιητής) ακολουθώντας 25-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιγραφής. Οι απλές αντιδράσεις PCR γίνονται σε όγκο 25 µl, σε σωληνάρια erpendorf του 0,5 ml, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. 3µl ρυθμιστικό διάλυμα 10X (1X στον τελικό όγκο)
2. 3µl dNTPs (από διάλυμα 5 mM για τελική συγκέντρωση 0,5 mM)
3. 1l από κάθε εκκινητή (συνήθως 23 pmol)
4. 0,3 µl Taq πολυμεράση (0,5 U)
5. x µl DNA (10-20 ngr)
6. (25- x) µl H₂O



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης



Εικόνα 25: Θερμικός κυκλοποιητής Hybaid OmniGene παλαιότερης τεχνολογίας



Εικόνα 26: Θερμικός κυκλοποιητής νέας τεχνολογίας ABI 96 θέσεων

Το παραπάνω διάλυμα καλύπτοταν με περίπου 50 μl παραφινέλαιο ούτως ώστε να μην εξατμιστεί στη συσκευή PCR με τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας. Στα σύγχρονα μηχανήματα όπως ταυτό στην εικόνα υπάρχει ειδικό θερμομονωτικό κάλυμα και έτσι δεν χρειάζεται προσθήκη λαδιού στην αντίδραση.

3.3.3.ii Πολλαπλό PCR (Multiplex PCR-RFLP)

Στο πολλαπλό (multiplex) PCR επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος (στην ίδια αντίδραση) πολλαπλασιασμός πολλών διαφορετικών περιοχών στο γονιδίωμα ή στο ίδιο το γονίδιο με τη χρήση περισσότερων από ένα ζεύγη εκκινητών.

Ο όγκος της αντίδρασης αυξάνεται σε 30 µl και η προσθήκη πολλών ζευγών εκκινητών βοηθά στην εξοικονόμηση χρόνου αλλά και αντιδραστηρίων.

Στη περίπτωση των γονιδίων SMN1, SMN2 και NAIP χρησιμοποιούνται 2 ζεύγη εκκινητών για των έλεγχο έλλειψης των εξωνίων 7,8 και 5 αντίστοιχα.

Αυτές οι ελλείψεις ευθύνονται για την εκδήλωση της νόσου.

Οι συνθήκες στη συσκευή PCR είναι:

Για την ανίχνευση ελλείψεων στα εξώνια 7 και 8 του γονιδίου SMN:

94 ° C για 5' και 33 κύκλοι με 94 ° C για 1', 54 ° C για 1' και 72 ° C για 1'.

Για την ανίχνευση ελλείψεων στα εξώνια 5 του γονιδίου NAIP:

95 ° C για 1' και 30 κύκλοι με 94 ° C για 1', 60 ° C για 1' και 72 ° C για 1' 30''.

3.3.3.iii Ραδιενεργό PCR με εσωτερική ή τελική σήμανση

Το ραδιενεργό PCR δημιουργείται με δύο τρόπους:

- Με εσωτερική σήμανση και
- με τελική σήμανση εκκινητή.

Η εσωτερική σήμανση γίνεται με ραδιενεργό φώσφορο α^{32} P-[CTP] (3000 Ci/mmol, Amersham) dCTP όπου αντικαθίσταται το ένα dCTP νουκλεοτίδιο από το αντίστοιχο ραδιενεργό. Η εισαγωγή του ραδιενεργού νουκλεοτιδίου στις αλυσίδες DNA γίνεται κατά την αντίδραση του PCR. Το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει:

2,5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος, 1 μ l dCTP, 1 μ l dNTPs (ATP, GTP TTP)

0,5 ml από κάθε εκκινητή (περίπου 13 pmol), 0,3 μ l Taq πολυμεράση (Promega)

50 ngr DNA και H₂O έως τα 25 μ l.

Στη τελική σήμανση σημαίνεται ο ένας από τους δύο εκκινητές (είτε ο 5' είτε ο 3' εκκινητής) με τη χρήση ραδιοϊσοτόπου και του ενζύμου T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μεταφορά ενός γ φωσφορικού του γ^{32} P-[ATP] στην 5' υδροξυλομάδα του DNA. Για την αντίδραση ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

Παρασκευή ραδιοσημασμένου εκκινητή (10 αντιδράσεις) :

1 μ l εκκινητή (50 pmol/ml), 2,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου, 1 μ l γ^{32} P-[ATP] (3000 Ci/mmol, Amersham), 2 μ l πολυνουκλεοτιδική κινάση (10U/ μ l) (Biolab), 18 μ l H₂O.

Το διάλυμα επωάζεται στους 37 ° C για 60'.

Παρασκευή αντίδρασης PCR (10 αντιδράσεις) :

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα της αντίδρασης με το μη ραδιοσημασμένο εκκινητή: 0,5 µl εκκινητή (50pmol), 25 µl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου, 10 µl dNTPs (5mM), 3 µl Taq πολυμεράση (5U/ µl) και 210,5 µl H₂O.

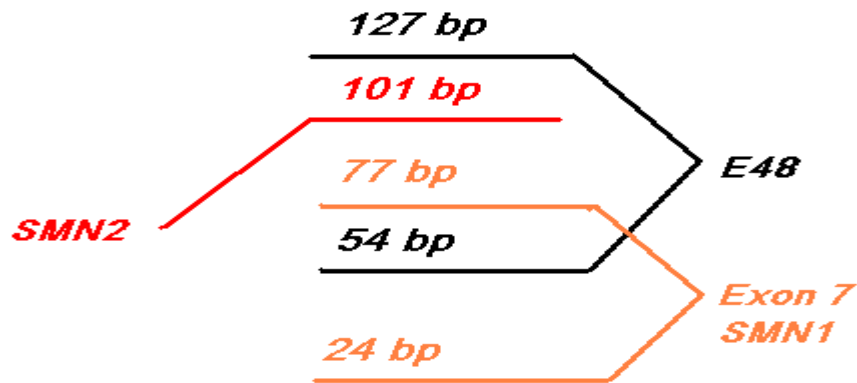
Στη συνέχεια για την αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται 5 µl από το διάλυμα του ραδιοσημασμένου εκκινητή, 20 µl από το το διάλυμα που περιέχει τον μη ραδιοσημασμένο εκκινητή και 50 ngr DNA.

3.3.3.iv Ανίχνευση ομόζυγης έλλειψης στο γονίδιο SMN1

Η διάγνωση της SMA γίνεται σε ποσοστό 95% των ασθενών με ανάλυση του DNA που απομονώνεται από περιφερικό αίμα με την ανίχνευση της ομόζυγης έλλειψης του εξωνίου 7 ή/και του εξωνίου 8 του γονιδίου SMN1. Συγκεκριμένα εφαρμόζεται η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για τον ειδικό πολλαπλασιασμό των εξωνίων 7 και 8 των γονιδίων SMN1 και SMN2. Επειδή όμως τα γονίδια αυτά διαφέρουν σε δύο μόνο βάσεις στα εξώνια 7 και 8 αντίστοιχα, ακολοθεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Hinf1 που κόβει σε ειδική θέση RFLP το εξώνιο 7 του SMN1 και με το Dde1 για το εξώνιο 8 του SMN2 προκειμένου να διαγνωστεί η έλλειψη ή όχι του εξωνίου 7 από το SMN1 και του εξωνίου 8 από το SMN2. Τα δείγματα ακολούθως ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης Nusieve.

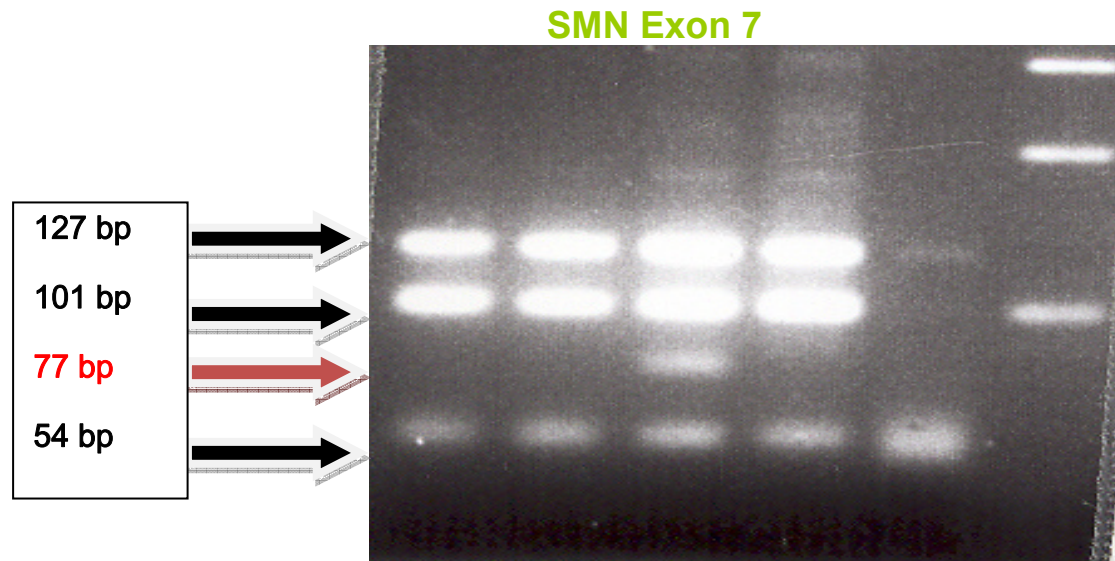
Οι ζώνες από τα θραύσματα που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο Hinf1 συμπεριλαμβανομένου και του εξωνίου 48 του γονιδίου της

δυστροφίνης που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό προϊόν ελέγχου, έχουν μοριακά βάρη όπως περιγράφονται στην εικόνα 16:



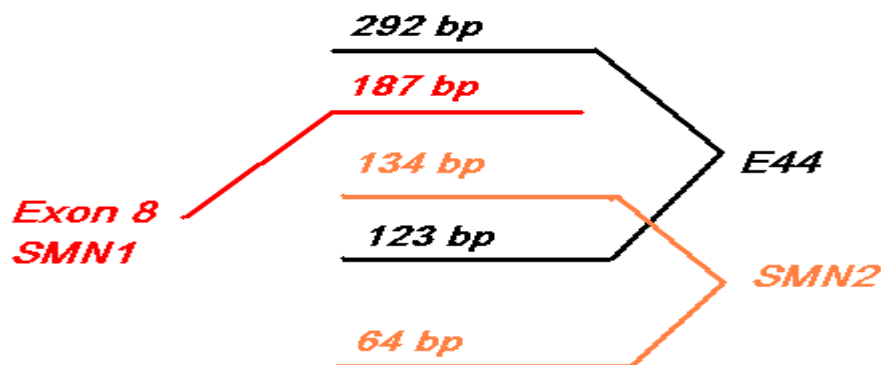
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφορητικού προτύπου νουκλεοτιδικών θραυσμάτων που προκύπτουν ύστερα από πέψη των ενισχυμένων περιοχών των *SMN1*, *SMN2* και του *E48* με το περιοριστικό ένζυμο *Hinf1* σε φυσιολογικά δείγματα

Από το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των παθολογικών δειγμάτων απουσιάζει η τρίτη ζώνη (77 bp) που αντιστοιχεί σε τμήμα του εξωνίου 7 του *SMN1* (Εικ. 27).



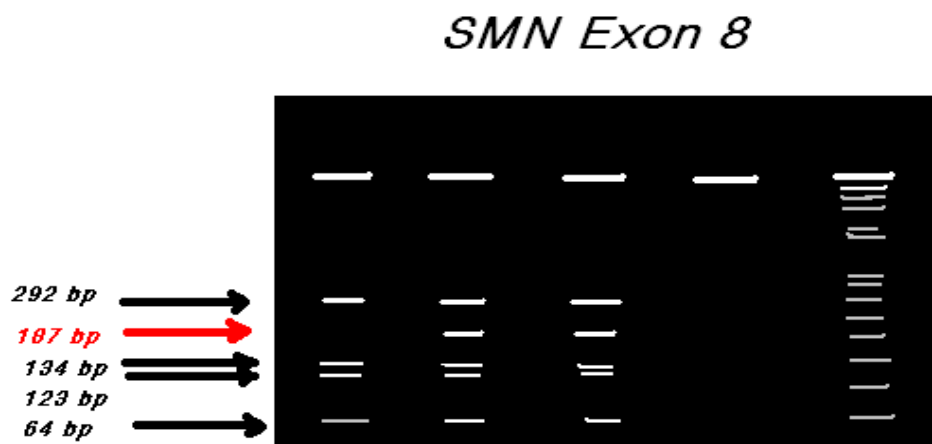
Εικόνα 28: Τα ηλεκτροφορηθέντα δείγματα είναι τα προϊόντα που προκύπτουν από το PCR μετά την πέψη με Hinf1 στα οποία είναι ορατή τόσο η απουσία του εξωνίου 7 στα δείγματα 1,2,4, όσο και η παρουσία του στο δείγμα 3.

Τα μοριακά βάρη των νουκλεοτιδικών θραυσμάτων που προκύπτουν μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Dde1 συμπεριλαμβανομένου και του εξωνίου 44 του γονιδίου της δυστροφίνης που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό προϊόν ελέγχου περιγράφονται στην εικόνα 18.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφορητικού προτύπου νουκλεοτιδικών θραυσμάτων που προκύπτουν ύστερα από πέψη των ενισχυμένων περιοχών των SMN1, SMN2 και του E44 με το περιοριστικό ένζυμο Dde1 σε φυσιολογικά δείγματα

Από το ηλεκτροφορητικό πρότυπο των παθολογικών δειγμάτων απουσιάζει η δεύτερη ζώνη (187 bp) που αντιστοιχεί σε τμήμα του εξωνίου 8 του SMN1 (Εικ. 30).



Εικόνα 30: Τα ηλεκτροφορηθέντα δείγματα είναι τα προϊόντα που προκύπτουν από το PCR μετά την πέψη με Dde1 στα οποία είναι ορατή τόσο η απουσία του εξωνίου 8 στο δείγμα 1 όσο και η παρουσία του στα δείγματα 2 και 3.

3.3.3.ν Εφαρμογή προγεννητικού ελέγχου

Ο προγεννητικός έλεγχος για ανίχνευση ομόζυγης έλλειψης του SMN1 πραγματοποιείται με ανάλυση του DNA που απομονώνεται από κύτταρα που λαμβάνονται από τροφοβλάστη (την 11^η εβδομάδα κύησης) ή αμνιακό υγρό (την 17^η εβδομάδα κύησης). Προκειμένου να αποφευχθούν λανθασμένα αποτελέσματα λόγω μητρικής πρόσμιξης, η ποσότητα του μητρικού DNA πρέπει να διαφοροποιείται από το εμβρυϊκό με τη μελέτη απλοτύπων που χρησιμοποιούν πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς δείκτες.

Η μεγαλύτερη ασφάλεια του αποτελέσματος εξασφαλίζεται όταν στην οικογένεια υπάρχει ήδη ένα άτομο στο οποίο έχει ανιχνευθεί ομόζυγη έλλειψη του εξωνίου 7 του SMN1, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η κλινική διάγνωση.

3.3.3.νι Μελέτη πολυμορφικών δεικτών στενά συνδεδεμένων με το γονίδιο SMN

Για την έμμεση ανίχνευση φορέων χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμορφικοί δείκτες που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα

Marker	Συνθήκες PCR	Μέγεθος
D5S125	1,5 mM, 58°C	143 και 147
D5S681	2,5 mM, 55°C	142-156
D5S435	1,5 mM, 55°C	128-144
AG1-CA	2,5 mM, 60°C	106-130
MAP1B	1,5 mM, 55°C	212-226
D5S112	2,5 mM, 55°C	94-120
D5S127	1,5 mM, 55°C	96-114

Πίνακας 6: Πολυμορφικοί δείκτες για την έμμεση ανίχνευση φορέων NMA (Daniels *et al* 1992: Morrison *et al*, 1993: Wirth *et al*, 1994: Burghes *et al* 1994)

3.3.3.vii Ποσοτικό PCR με χρήση σημασμένων εκκινητών

3.3.3.vii(a) Τυποποίηση της τεχνικής Ποσοτικού PCR

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος αναλυτής ανίχνευσης φθορισμού (Vistra DNA Sequencer 725) και εκκινητές (5' και 3') του γονιδίου SMN1 σημασμένοι με τη φθορίζουσα ομάδα Texas Red.

Η ευαισθησία του οργάνου επέτρεψε τη μείωση των κύκλων της αντίδρασης PCR στους 23 (μετά από τιτλοποίηση 30, 25, 23, και 20 κύκλων). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων PCR έγινε στο ενσωματωμένο σύστημα ηλεκτροφόρησης του οργάνου με μη αποδιατακτικό διάλυμα ακρυλαμίδης (6%) μετά από απιονισμό με ρητίνη και επέτρεψε το σαφή διαχωρισμό των προϊόντων και την εντόπισή τους μέσω της ανίχνευσης φθορισμού (Vistra DNA Sequencer 725). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού πακέτου Image Quant (Molecular Dynamics/Amersham Life Science).

Εκτός από το γονίδιο SMN1, υπάρχει ένα αντίγραφο στο ίδιο χρωμόσωμα κοντά στο κεντρομερίδιο. Για αυτό το λόγο, ο εκκινητής προσδένεται και στο αντίγραφο αυτό που ονομάζεται SMN2 δημιουργώντας ένα προϊόν του ίδιου μεγέθους και πρέπει να γίνει διαχωρισμός των δύο προϊόντων. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με τη χρήση του περιοριστικών ενζύμων Hinf I και Dde I που ξεχωρίζει μια διαφορά βάσης στα εξώνια 7 και 8 των γονιδίων SMN1 και SMN2 αντίστοιχα.



Εικόνα 31: Ο αυτόματος αναλυτής DNA Vistra 725 που χρησιμοποιήθηκε στα πρώτα στάδια της παρούσας εργασίας

3.3.3.vii(b) Επιλογή εσωτερικών προϊόντων ελέγχου

Για να έχει αξιοπιστία ένας ποσοτικός έλεγχος προϊόντων DNA θα πρέπει να υπάρχει ένα εσωτερικό προϊόν ελέγχου για τη περίπτωση που υπάρχει πρόβλημα με το υπόστρωμα (DNA) του ατόμου που μελετάται. Ο σημαντικότερος λόγος όμως είναι πως πρέπει να υπάρχει μια ποσότητα προϊόντος PCR σταθερή για όλα τα άτομα που θα αποτελεί εσωτερικό προϊόν για τη σύγκριση της έντασης των προϊόντων μεταξύ τους. Δηλαδή η ένταση φθορισμού της ζώνης που θα αντιστοιχεί στο εξώνιο 8 του τελομερικού γονιδίου θα συγκρίνεται κάθε φορά με την ένταση φθορισμού του εσωτερικού . Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να συγκριθεί και το εξώνιο 8 του κεντρομερικού γονιδίου με το προϊόν ελέγχου, γεγονός που το καθιστά επίσης χρήσιμο για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου.

Ως εσωτερικό προϊόν ελέγχου αναζητήθηκε εξώνιο από το γονίδιο της κυστικής ινώδους νόσου (CFTR) το οποίο κληρονομείται με αυτοσωμικό χαρακτήρα και στη πλειονότητά τους οι ασθενείς ή οι φορείς φέρουν

σημειακές μεταλλαγές που δεν επηρεάζουν την ποσοτική εκτίμηση του προϊόντος. Από τα εξώνια που ελέγχθηκαν, τελικά επιλέχθηκε το εξώνιο 13 του CFTR επειδή πολλαπλασιάζεται στις ίδιες συνθήκες PCR του εξωνίου 8 του γονιδίου SMN και επιπλέον έχει θέση περιορισμού για το ένζυμο Dde I. Για τον έλεγχο του εξωνίου 7 του γονιδίου SMN επιλέχθηκε το εξώνιο 15 του γονιδίου (CFTR) με θέση περιορισμού για το ένζυμο Hinf I . Έτσι ελέγχθηκε και η απόδοση του περιοριστικού ενζύμου.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

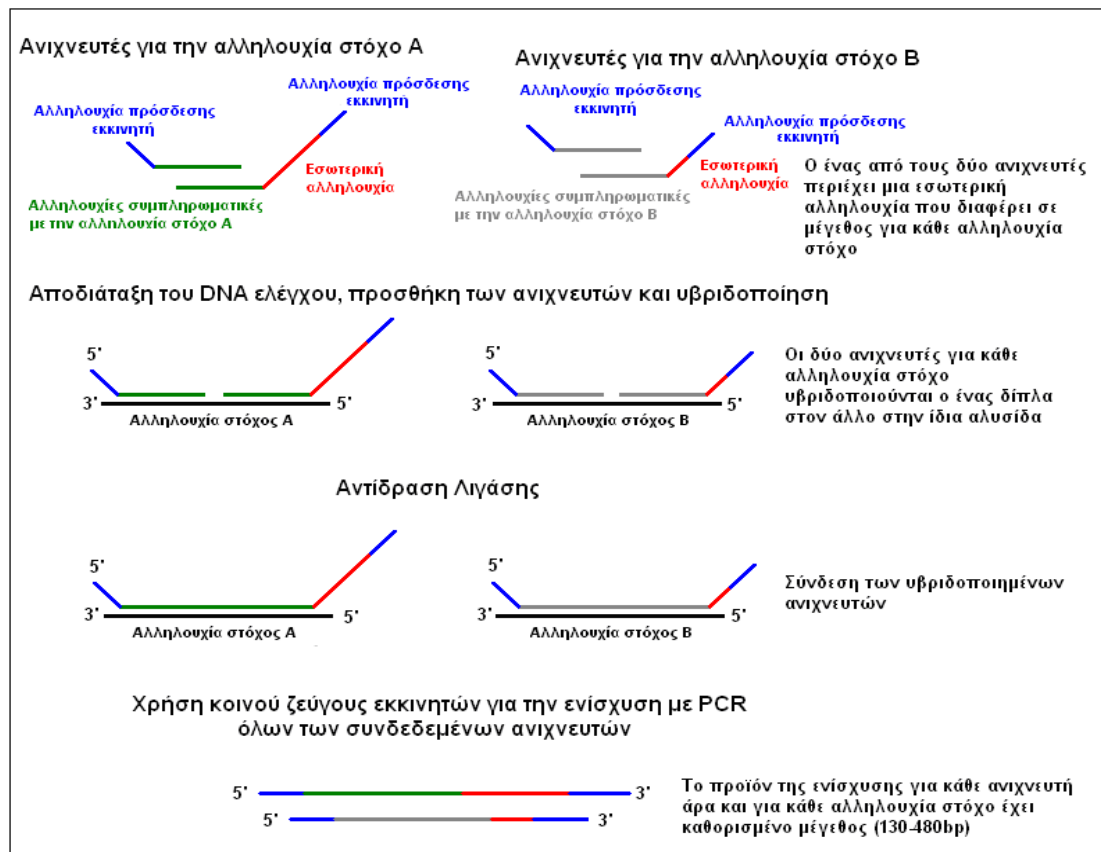
- **SMN7F** (27bp, scale 0.02, 5' σήμανση με Texas Red):
5'-CTT CCT TTT ATT TTC CTT ACA ggg ATT-3'
- **SMN7R** (24bp, scale 0.02, 5' σήμανση με Texas Red):
5'-CAC TTT CAT AAT gCT ggC AgA CTT-3'
- **CF15GF** (22bp, scale 0.02, 5' σήμανση με Texas Red):
5'-CAC TCC TCT TCA AgA CAA Agg g-3'
- **CF15GR** (22bp, scale 0.02, 5' σήμανση με Texas Red):
5'-CTg CTT TCA ACg TgT TgT TgA ggg T-3'

3.3.3.viii Πολλαπλή ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο της λιγάσης (Multiplex Ligation –dependant Probe Amplification, MLPA)

Οι τεχνική της εξαρτώμενης από την αντίδραση της λιγάσης, πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών υβριδοποιημένων στο γονιδίωμα (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) είναι ποσοτική μέθοδος που βασίζεται

στην τεχνολογία της PCR και επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών αλληλουχιών σε ολόκληρο το γονιδίωμα σε μια αντίδραση με τη χρήση ενός μόνο ζεύγους εκκινητών (Schouten και συν. 2002). Με την χρήση των ίδιων εκκινητών η απόδοση της αντίδρασης είναι ίδια για κάθε αλληλουχία στόχο.

Στην τεχνική της MLPA (Εικόνα 6), για κάθε αλληλουχία στόχο προς ανάλυση χρησιμοποιούνται δύο μονόκλωνα τμήματα DNA (ανιχνευτές), τα οποία σχεδιάζονται έτσι ώστε να υβριδοποιούνται το ένα δίπλα στο άλλο στην ίδια αλυσίδα της αλληλουχίας στόχου. Και οι δύο ανιχνευτές αποτελούνται από ένα μονόκλωνο τμήμα DNA συμπληρωματικό με την αλληλουχία στόχο, μήκους 22-43 νουκλεοτιδίων και μια ειδική αλληλουχία πρόσδεσης εκκινητή. Επίσης, ένας από τους δύο ανιχνευτές εμπεριέχει μια επιπλέον εσωτερική αλληλουχία μήκους 19-364 νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί υβριδοποίηση των συμπληρωματικών ανιχνευτών στις αλληλουχίες στόχους. Στη συνέχεια, οι ανιχνευτές που έχουν υβριδοποιηθεί ο ένας δίπλα στον άλλο στην ίδια αλυσίδα της αλληλουχίας στόχου, ενώνονται μεταξύ τους με αντίδραση της λιγάσης. Ακολουθεί πρόσδεση των εκκινητών στις καθορισμένες αλληλουχίες των υβριδοποιημένων ανιχνευτών και ενίσχυση με PCR του τμήματος DNA που προκύπτει από την ένωση των ανιχνευτών με την αντίδραση της λιγάσης. Ο ένας από τους δύο εκκινητές είναι συνδεδεμένος με φθοριόχρωμα. Στη συνέχεια τα φθοριοσημασμένα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και τα σήματα που εκπέμπουν ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται σε αναλυτή DNA με το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα με την μορφή καμπύλων σε γράφημα.



Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής της MLPA

Το σχετικό σήμα για κάθε ανιχνευτή υπολογίζεται διαιρώντας το εμβαδόν της καμπύλης που καταγράφεται για το προϊόν της PCR του συγκεκριμένου ανιχνευτή, με το σύνολο των εμβαδών των καμπύλων που καταγράφονται για όλους τους ανιχνευτές στο δείγμα, και εκφράζεται ως πολλαπλάσιο του σχετικού σήματος του ίδιου ανιχνευτή σε ένα φυσιολογικό δείγμα ελέγχου. Έτσι, η αναμενόμενη τιμή για ένα φυσιολογικό ευπλοειδικό δείγμα είναι περίπου 1.0, για ένα δείγμα με ομόζυγη έλλειψη είναι περίπου 0, ενώ για ένα δείγμα με ετερόζυγη έλλειψη είναι περίπου 0.5.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο kit ανιχνευτών MLPA:

- Το P060-A2 που έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει τον αριθμό αντιγράφων στο γονίδιο SMN1 μόνο.

- Το P021-A1 που έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει τον αριθμό αντιγράφων στα γονίδια SMN1 και SMN2.

Και τα δύο kit μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση φορέων NMA.

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΤΟΥ SALSA MLPA P060 kit

Μέγεθος (nt)	Ανιχνευτής SALSA MLPA	Χρωμοσωμική θέση
64-70-76-92	Θραύσματα Q: ποσότητα DNA, ορατά με ποσότητα DNA του δείγματος < 100 ng	
88-92-96	Θραύσματα D: χαμηλό σήμα θραύσματος 88 ή 96 nt υποδηλώνει ελλειπή αποδιάταξη	
100	Θραύσμα X: ειδικό για το χρωμόσωμα X	
105	Θραύσμα Y: ειδικό για το χρωμόσωμα Y	
148	Ανιχνευτής αναφοράς 1472-L00946	17p13
154	Ανιχνευτής αναφοράς 2409-L03789	16q22
160	Ανιχνευτής αναφοράς 2291-L01782	3p14
166	Ανιχνευτής αναφοράς 2978-L02409	4q25
174*	Ανιχνευτής SMN1 2622-L00966	Εντοπίζει το εξώνιο 7
184	Ανιχνευτής αναφοράς 0559-L00128	11q22
193	Ανιχνευτής αναφοράς 1780-L01344	13q14
202	Ανιχνευτής αναφοράς 7643-L07328	8p23
211±	Ανιχνευτής SMN1 2623-L01373	Εντοπίζει το εξώνιο 8
220	Ανιχνευτής αναφοράς 3596-L02963	8q11
229	Ανιχνευτής αναφοράς 2334-L01820	12q23
238§	Ανιχνευτής BIRC1 1259-L00811	Εντοπίζει το εξώνιο 2
247	Ανιχνευτής αναφοράς 2478-L01971	1q21
256	Ανιχνευτής αναφοράς 7630-L07315	10p26

* Στους φορείς υπάρχει 1 αντίγραφο ενώ στους πάσχοντες 0

± Επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα στο εξώνιο 7 που απαντάται στο 95% των φορέων

§ Συχνά παρουσιάζει έλλειψη ταυτόχρονα με το SMN1

Πίνακας 7: Ανιχνευτές του kit SALSA-MLPA p060

Οι ανιχνευτές του P060 τοποθετούνται σύμφωνα με την χρωμοσωμική θέση

Μέγεθος (nt)	Ανιχνευτής SALSA MLPA	Εξώνιο	Τμήμα αλληλουχίας (20 nt από το σημείο πρόσδεσης)	Απόσταση από τον επόμενο ανιχνευτή
174	2622-L00966	SMN1 εξ. 8	ACAGGGTTTC-AGACAAAATC	0.7 Kb
211	2623-L01373	SMN1 εξ. 8	ACCCCCACCC-CAGTCTTTTA	58.7 Kb
238	1259-L00811	BIRC1 εξ. 8	CATATATAGG-TAAACAGGAC	Kb

Πίνακας 8: Ανιχνευτές του kit SALSA-MLPA p060 βάσει χρωμοσωμικής θέσης

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΤΟΥ SALSA MLPA P021 kit

Μέγεθος (nt)	Ανιχνευτής SALSA MLPA	Χρωμοσωμική θέση
64-70-76-92	Θραύσματα Q: ποσότητα DNA, ορατά με ποσότητα DNA του δείγματος < 100 ng	
88-92-96	Θραύσματα D: χαμηλό σήμα θραύσματος 88 ή 96 nt υποδηλώνει ελλιπή αποδιάταξη	
139	Ανιχνευτής αναφοράς 1061-L0727	12q14
148	Ανιχνευτής GDH6 1254-L0815	
157	Ανιχνευτής αναφοράς 1112-L0549	3q12
166	Ανιχνευτής αναφοράς 1448-L0932	17p11.2
175	Ανιχνευτής αναφοράς 0808-L0638	18q21
184	Ανιχνευτής GTF2H2 1256-L0972	Εντοπίζει την αντικατάσταση C>G
193	Ανιχνευτής αναφοράς 1115-L0005	7q21
202	Ανιχνευτής RAD17 1257-L0184	
211	Ανιχνευτής αναφοράς 1220-L0689	10p15
220	Ανιχνευτής GTF2H2 1813-L0818	Εντοπίζει την αντικατάσταση G>A
229	Ανιχνευτής αναφοράς 1120-L0060	11q13
238	Ανιχνευτής BIRC1 1259-L0811	Εντοπίζει ολόκληρο το NAIP
247	Ανιχνευτής αναφοράς 0816-L0334	21q11
256	Ανιχνευτής αναφοράς 0807-L0325	18p11

270	Ανιχνευτής SMN1 1260-L0966	Υποδηλώνει αριθμό αντιγράφων SMN1 εξ. 7
276	Ανιχνευτής SMN 2 1260-L0967	Υποδηλώνει αριθμό αντιγράφων SMN2 εξ. 7
286	Ανιχνευτής αναφοράς 0824-L0970	3q21
295	Ανιχνευτής SMN1 1812-L1373	Υποδηλώνει αριθμό αντιγράφων SMN1 εξ. 8
301	Ανιχνευτής SMN 2 1812-L1372	Υποδηλώνει αριθμό αντιγράφων SMN2 εξ. 8
310	Ανιχνευτής αναφοράς 0871-L0461	13q34
319	Ανιχνευτής αναφοράς 1042-L0791	8q24
328	Ανιχνευτής GTF2H2 1262-L0971	Εντοπίζει και τις δύο μορφές του GTF2H2
337	Ανιχνευτής αναφοράς 0812-L0330	21q21
346	Ανιχνευτής BIRC1-D01 1263-L0812	Εντοπίζει μια BIRC1 αλληλουχία στο εξ. 13
355	Ανιχνευτής αναφοράς 0965-L0552	2p24
364	Ανιχνευτής SMN1/2 1814-L0807	Προσδιορίζει # αντιγράφων SMN1 + SMN2
373	Ανιχνευτής αναφοράς 1046-L0624	8
382	Ανιχνευτής SMN1/2 1265-L0808	Προσδιορίζει # αντιγράφων SMN1 + SMN2
391	Ανιχνευτής αναφοράς 1160-L0716	3p26
400	Ανιχνευτής SMN1/2 1816-L0809	Προσδιορίζει # αντιγράφων SMN1 + SMN2
409	Ανιχνευτής αναφοράς 0963-L0934	2p16.1
418	Ανιχνευτής SMN1/2 1815-L0810	Προσδιορίζει # αντιγράφων SMN1 + SMN2
427	Ανιχνευτής αναφοράς 1108-L0679	8q24
436	Ανιχνευτής αναφοράς 1057-L0630	17q12
445	Ανιχνευτής αναφοράς 0802-L0320	13q34
454	Ανιχνευτής N-Cadherin-like 1269-L0813	Εντοπίζει το εξ. 1 (κοντά στο SMN1)
463	Ανιχνευτής αναφοράς 0846-L0377	12q24

Πίνακας 9: Ανιχνευτές του kit SALSA-MLPA p021



Εικόνα 33: Ο αυτόματος αναλυτής Megabace που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των προϊόντων MLPA

Τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν σε αυτόματο αναλυτή MegaBace 1000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gene-Marker, έκδοση 1.6 (Softgenetics, State College, PA, USA).

Η τεχνική MLPA έχει την δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης έως και 40 αλληλουχιών του δείγματος DNA σε μια αντίδραση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην προγεννητική διάγνωση των πιο σημαντικών ανευπλοειδιών αλλά και συνδρόμων με μικροελλείψεις. Η μεθοδολογία είναι αξιόπιστη και παρουσιάζει υψηλή αυτοματοποίηση και απόδοση (Slater et al, 2003). Επίσης είναι:

- Ειδική: μπορεί να διακρίνει αλληλουχίες που διαφέρουν σε μία μόνο βάση.
- Απλή: Για την εκτέλεσή της χρειάζεται ένα σωληνάριο (αντίδραση πρόσθεσης)
- Υψηλής απόδοσης: Η επεξεργασία 96 δειγμάτων DNA πραγματοποιείται σε λιγότερο από 3 ώρες.

- Χαμηλού κόστους: Με βάση των αριθμό δειγμάτων που μπορούν να επεξεργαστούν ταυτόχρονα
- Απαιτεί οργανολογικό εξοπλισμό που συναντάται στην πλειονότητα εργαστηρίων μοριακής διάγνωσης.

Σημαντικός παράγοντας για την σωστή ανάλυση ενός δείγματος με την τεχνική MLPA είναι η ποιότητα του DNA στο δείγμα.

3.3.4 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

3.3.4.i Γεωγραφική κατανομή φορέων

Έπειτα από μελέτη των ιστορικών των ασθενών, καταγράφηκαν οι καταγωγές τους καθώς επίσης και των φορέων που βρέθηκαν από το γενικό πληθυσμό.

3.3.4.ii Συσχέτιση Γονοτύπου-φαινοτύπου

Από τα δείγματα των ασθενών που μελετήθηκαν, έγινε εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων, SMN1, SMN2, NAIP και NAIPψ. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παραπάνω εκτίμησης, με τον τύπο κάθε ασθενούς που αναφέρονταν στο ιστορικό του.

3.3.4.iii Συχνότητα αλληλόμορφων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο τύπος Hardy-Weinberg για την εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης φορέων.

3.4 Σύσταση Διαλυμάτων

Lysis I: 155 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA pH 7,4

Lysis II: 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA pH 8,2

Αντιπηκτικό: 4,5%, 0,7% NaCl

20 x TBE: 1 mM Tris, 1 mM βορικό οξύ, 0,01 mM EDTA

6% ακρυλαμίδη

(100 ml) : 50 gr ουρία, 10 ml 20 x TBE, 15 ml ακρυλαμίδης 40%, 40 ml H_2O

(ανάδευση και φιλτράρισμα με 3 MM χαρτί)

6% Long Ranger

(30 ml): 30 ml Long Ranger, 300 μl APS, 30 μl TEMED

Χρωστική φυκόλης: 15% φυκόλη, 0,005% μπλε βρωμοφαινόλης

Διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης: 670 mM Tris-HCl (pH: 8,8), 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,7 mg/ml BSA, 45mM MgCl_2

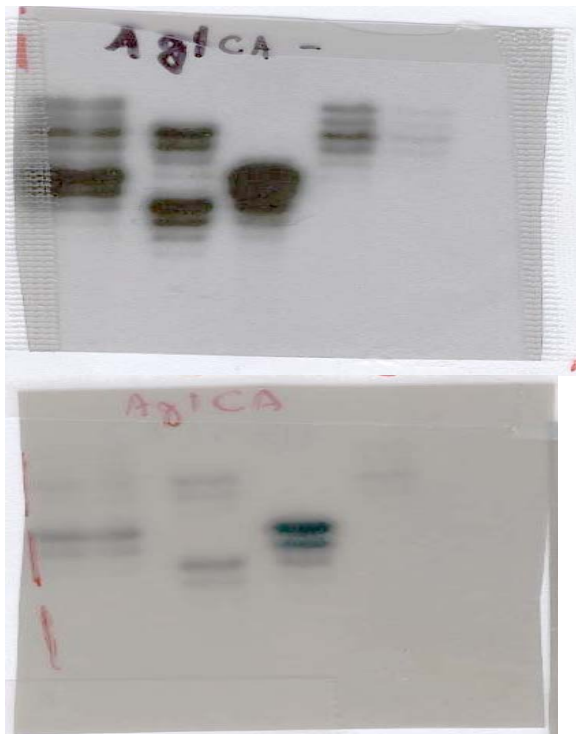
Διάλυμα dNTPs για εσωτερική σήμανση: 0,02 mM CTP, 2mM ATP, GTP, TTP.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΟ PCR

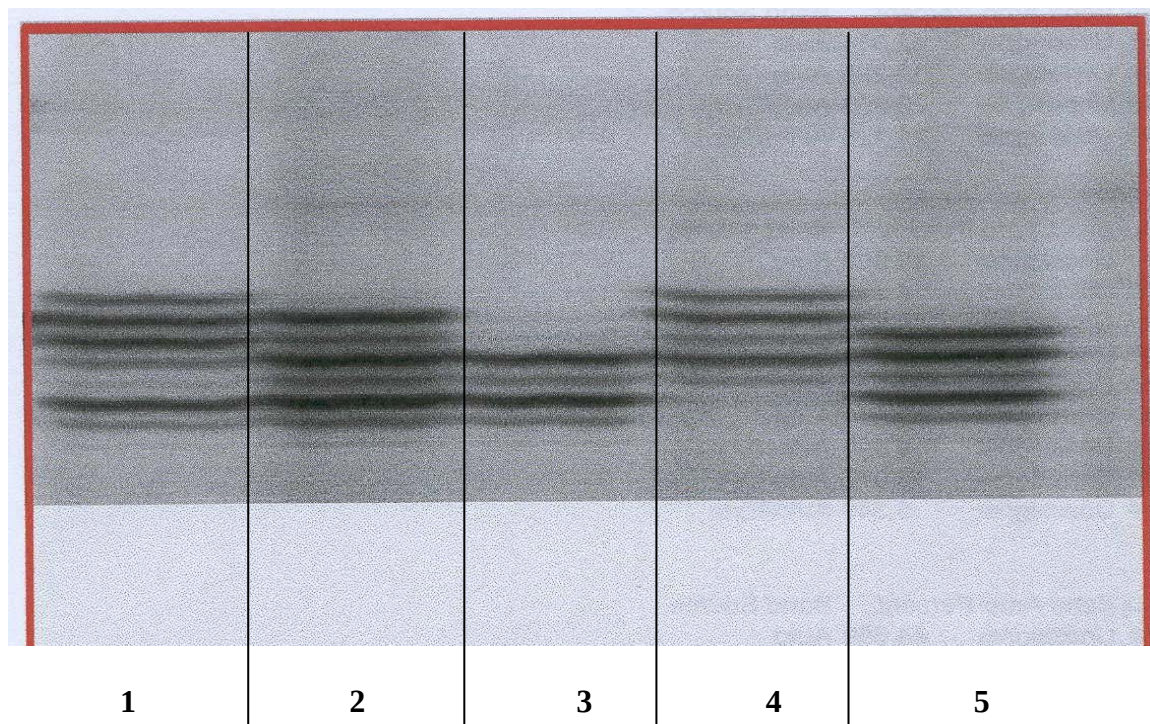
4.1.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΜΕ CAs

Η θέση Ag1CA επέτρεψε τη διαπίστωση απώλειας ορισμένων αλληλομόρφων από τους πάσχοντες, γεγονός που καθιστούσε ενδεικτική την παρουσία μεγάλου ελλείμματος στην περιοχή που αφαιρούσε και κάποια αλληλόμορφα (Εικ. 34). Με τον τρόπο αυτό διαπιστώθηκαν με άμεσο τρόπο υποχρεωτικοί φορείς ελλείψεων. Επιπλέον με τη σύγκριση άλλων πολυμορφικών δεικτών διαπιστώθηκαν με έμμεσο τρόπο αδέρφια-φορείς των πασχόντων (Εικ. 35-36)



Εικόνα 34: Απεικόνιση οικογένειας SMA σε γέλη πολυακρυλαμίδης με την εφαρμογή PCR με ραδιοσημασμένους εκκινητές (με έκθεση της αυτοραδιογραφίας 24 και 4 ώρες αντίστοιχα). Στη συγκεκριμένη φωτογραφία απεικονίζεται ο πολυμορφικός δείκτης Ag1CA. Οι στήλες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τον πατέρα και την μητέρα αντίστοιχα, η στήλη 3 το πάσχον παιδί, και οι στήλες 4 και 5 τα αδέρφια του πάσχοντος. Από την αξιολόγηση της ραδιογραφίας συμπεραίνεται ότι η μητέρα είναι υποχρεωτικός φορέας.

Επιπλέον με τη σύγκριση άλλων πολυμορφικών δεικτών διαπιστώθηκαν με έμμεσο τρόπο αδελφια-φορείς των πασχόντων (Εικ. 35-37)

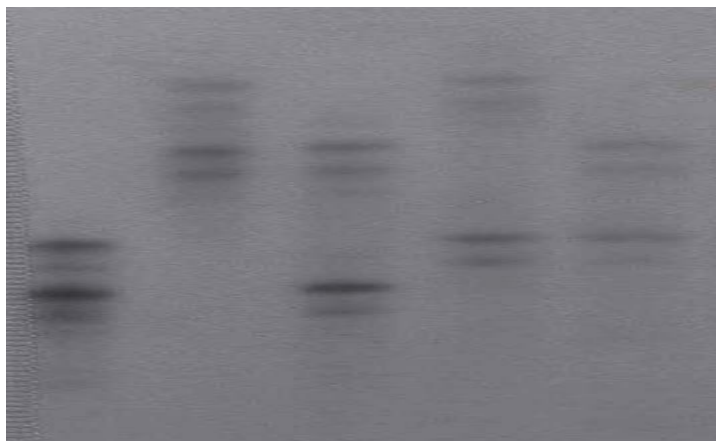


Εικόνα 35

Απεικόνιση οικογένειας SMA σε γέλη Long Ranger με την εφαρμογή PCR με ραδιοσημασμένους εκκινητές. Στη συγκεκριμένη φωτογραφία αποικονίζεται ο πολυμορφικός δείκτης Ag1CA. Οι στήλες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τον πατέρα και την μητέρα αντίστοιχα, η στήλη 3 το πάσχον παιδί, και οι στήλες 4 και 5 τα αδέρφια του πάσχοντος.



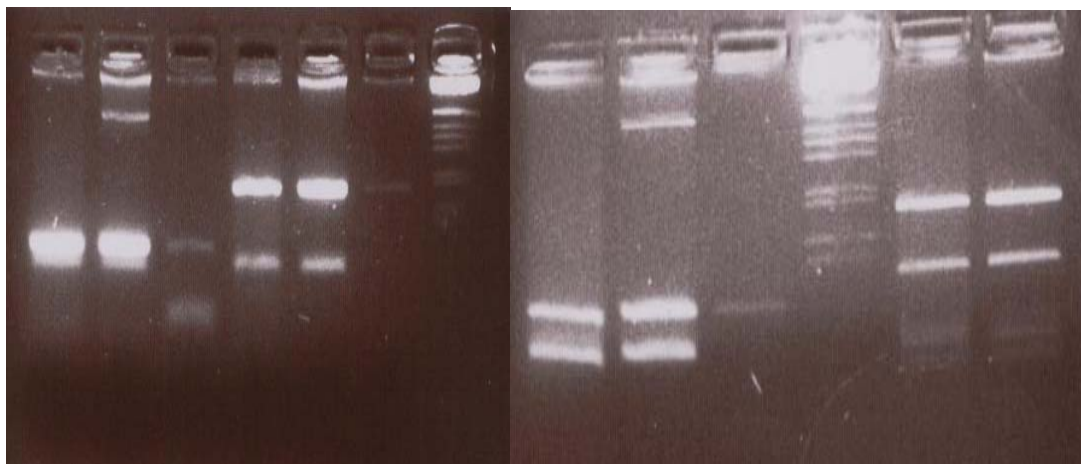
Εικόνα 36: Μελέτη οικογένειας SMA σε γέλη πολυακρυλαμίδης με την εφαρμογή PCR με ραδιοσημασμένους εκκινητές. Στη συγκεκριμένη φωτογραφία αποικονίζεται ο πολυμορφικός δείκτης D5S127. Οι στήλες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τον πατέρα και την μητέρα αντίστοιχα, οι στήλες 3 και 4 το πάσχον παιδί, και η στήλη 5 τον αδελφό του πάσχοντος.



Εικόνα 37: Μελέτη οικογένειας SMA σε γέλη πολυακρυλαμίδης με την εφαρμογή PCR με ραδιοσημασμένους εκκινητές. Στη συγκεκριμένη φωτογραφία αποικονίζεται ο πολυμορφικός δείκτης D5S127. Οι στήλες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τον πατέρα και την μητέρα αντίστοιχα, η στήλη 3 το πάσχον παιδί, και οι στήλες 4 και 5 τα αδέλφια του πάσχοντος. Εδώ παρατηρείται ότι ο ένας αδελφός (5) είναι φορέας από την μητέρα ενώ ο άλλος (4) δεν είναι.

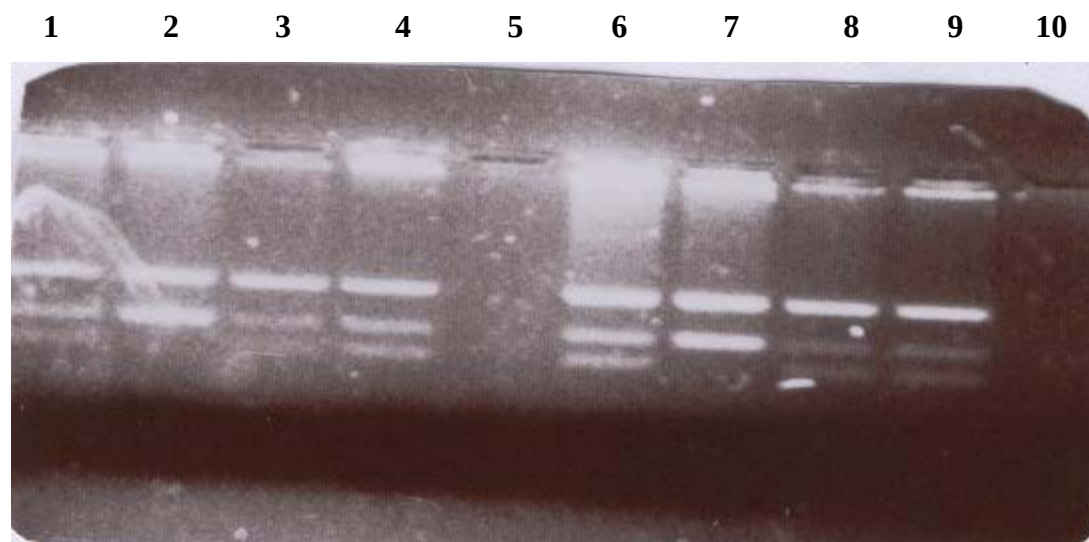
Για τη ποσοτική μελέτη των αντιγράφων γονιδίων *SMN1* και *SMN2* αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες διάγνωσης της νόσου με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων *Hinf*7 και *Dde*1 (Εικ. 38).

<i>SMN7</i>	<i>SMN8</i>	<i>SMN7</i>	<i>SMN8</i>
ΑΚΟΠΟ	ΑΚΟΠΟ	<i>Hinf</i> 1	<i>Dde</i> 1

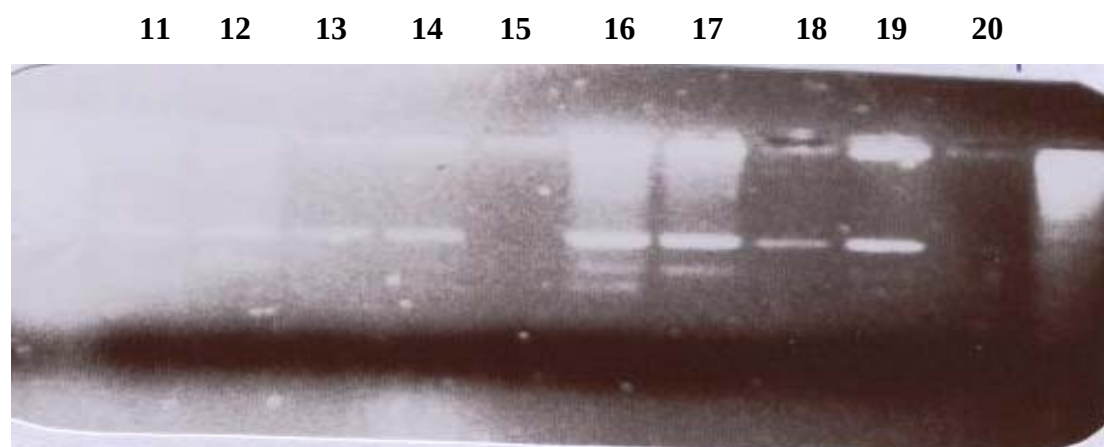


Εικόνα 38: Τιτλοποίηση για τον καθορισμό των κύκλων του PCR για το *SMN7/ SMN 8* χωρίς και με την χρήση περιοριστικού ενζύμου. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 30 κύκλους.

Στη συνέχεια έγινε τιτλοποίηση των κύκλων και της ποσότητας εκκινητών, έτσι ώστε να λαμβάνεται ποσότητα προϊόντος με τους ελάχιστους κύκλους PCR (Εικ. 39, 40).

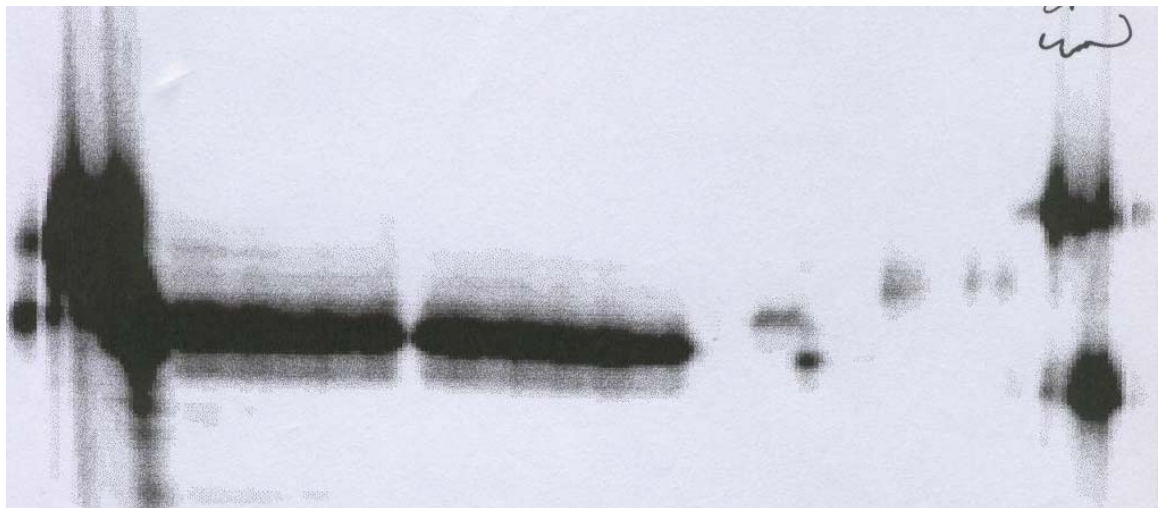


Εικόνα 39: Τιτλοποίηση του PCR για το *SMN7/CF9*. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 26 κύκλους με θερμοκρασία ανασύστασης του DNA στους 54°C. Στα προϊόντα που προέκυψαν στις στήλες 1-5 χρησιμοποιήθηκαν 0,5μl εκκινητή, ενώ στις στήλες 6-10 χρησιμοποιήθηκαν 1,0μl εκκινητή.

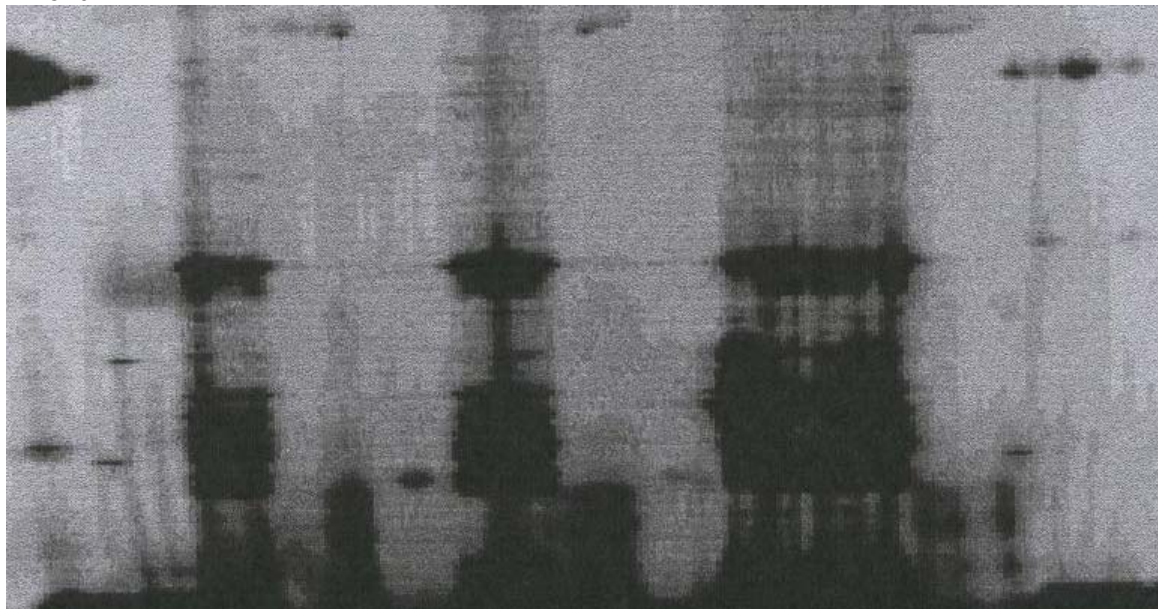


Εικόνα 40: Τιτλοποίηση του PCR για το *SMN7/CF9*. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 26 κύκλους με θερμοκρασία ανασύστασης του DNA στους 58°C. Στα προϊόντα που προέκυψαν στις στήλες 11-15 χρησιμοποιήθηκαν 0,5μl εκκινητή, ενώ στις στήλες 16-20 χρησιμοποιήθηκαν 1,0μl εκκινητή.

Τα τελικά προϊόντα με σήμανση ελέγχθηκαν σε γέλη ακρυλαμίδης σε κάθετη ηλεκτροφόρηση (Εικ. 41,42).



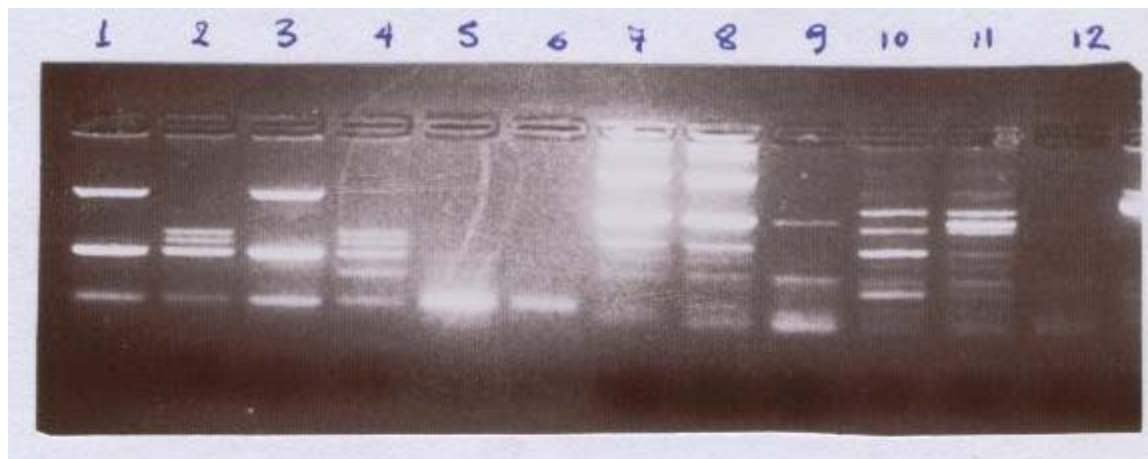
Εικόνα 41



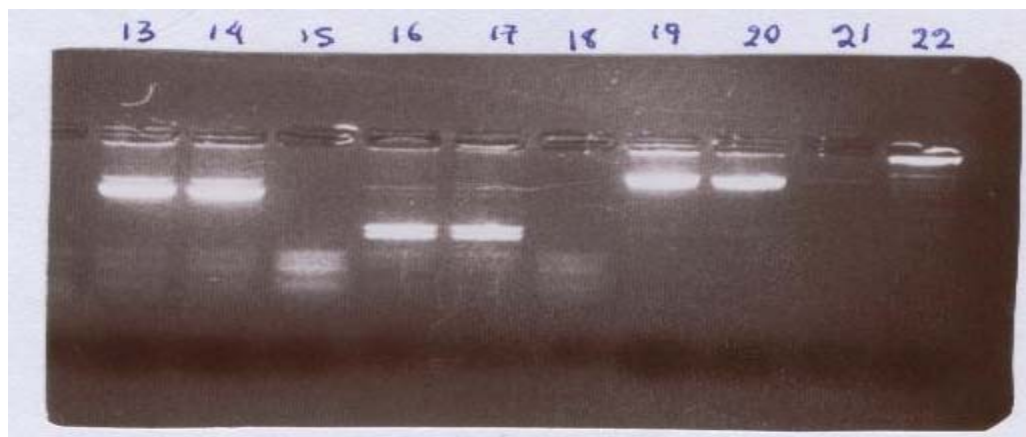
Εικόνα 42.

Εικόνες 41, 42: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε γέλη Long Ranger 6% για την τιτλοποίηση της τεχνικής. Η απεικονιζόμενες ηλεκτροφορήσεις δεν ήταν επιτυχείς διότι στην πρώτη δεν υπήρξε προϊόν ενώ στη δεύτερη υπήρξαν πολλά παραπροϊόντα.

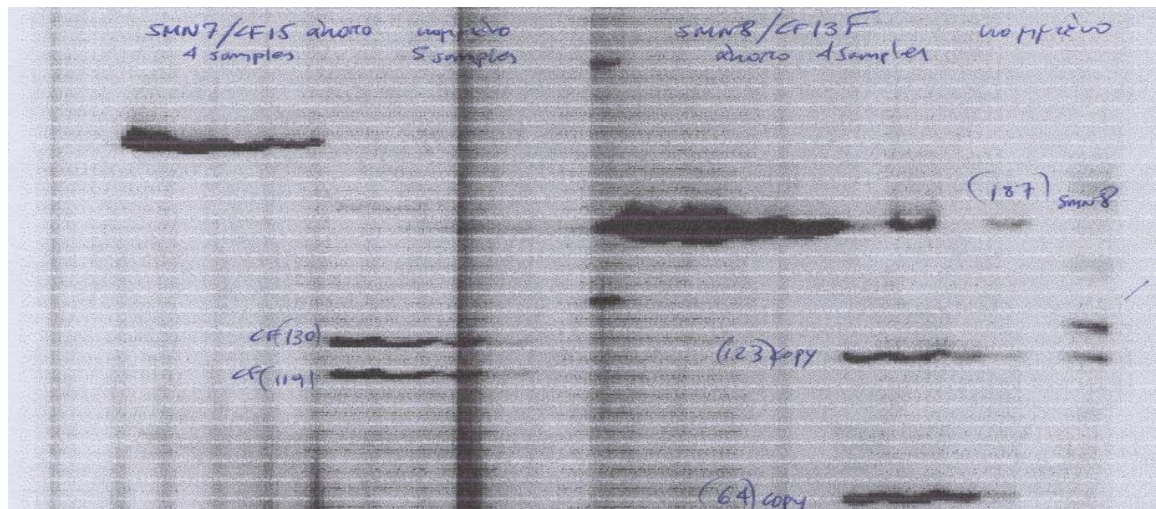
Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια πορεία τιτλοποιήσεων χρησιμοποιώντας εκκινητές από το γονίδιο *CF* που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή προϊόντων ως εσωτερικούς εκκινητές (Εικ. 43-46).



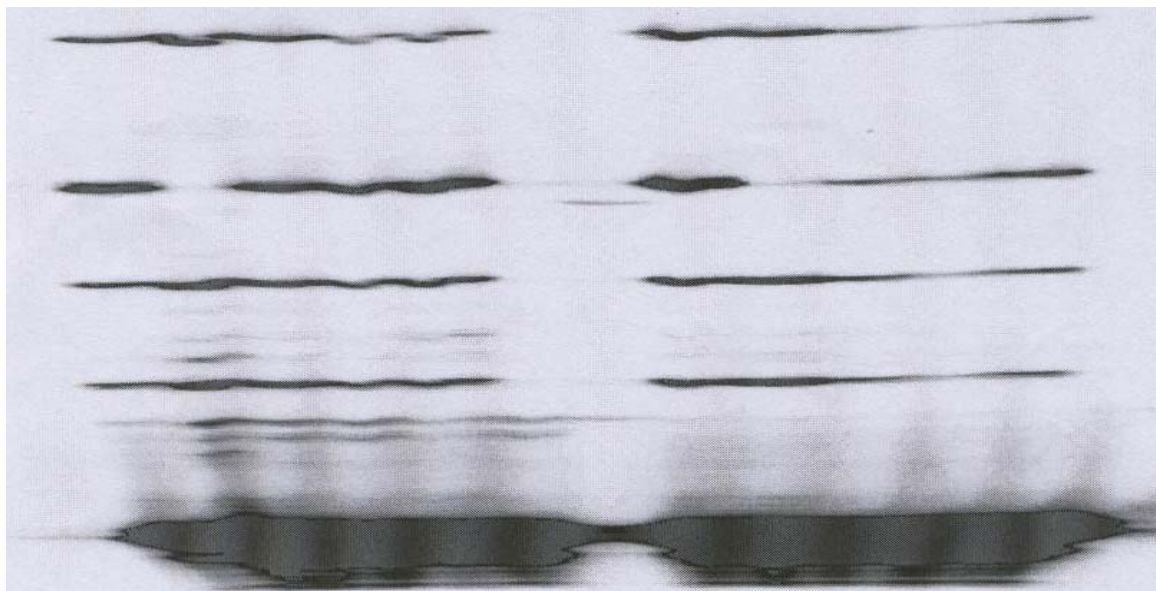
Εικόνα 43.



Εικόνα 43, 44: Τιτλοποίηση του PCR για το *SMN7/CF15* και το *SMN8/CF13*. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε στους 26 κύκλους με θερμοκρασία ανασύστασης του DNA στους 58°C και με ρυθμιστικό διάλυμα 2,5μM MgCl₂. Τα προϊόντα που απεικονίζονται στις στήλες 1-6 αντιπροσωπεύουν: 1-2 *SMN7/CF15* SMA με χρήση/χωρίς χρήση περιοριστικού ενζύμου Hinf1, 3-4 *SMN7/CF15* Normal με χρήση/χωρίς χρήση περιοριστικού ενζύμου Hinf1, 5-6 *SMN7/CF15* (-) με χρήση/χωρίς χρήση περιοριστικού ενζύμου Hinf1, 7 *SMN8/CF13* SMA, 8 *SMN8/CF13* Normal, 9 *SMN8/CF13* (-) χωρίς τη χρήση περιοριστικού ενζύμου Dde1, 10 *SMN8/CF13* SMA, 11 *SMN8/CF13* Normal, 12 *SMN8/CF13* (-) με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου Dde1, 13 *CF15* SMA, 14 *CF15* Normal, 15 *CF15* (-) χωρίς τη χρήση περιοριστικού ενζύμου Hinf1, 16 *CF15* SMA, 17 *CF15* Normal, 18 *CF15* (-) με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου Hinf1, 19 *CF13* SMA, 20 *CF13* Normal, 21 *CF13* (-) χωρίς τη χρήση περιοριστικού ενζύμου Dde1.

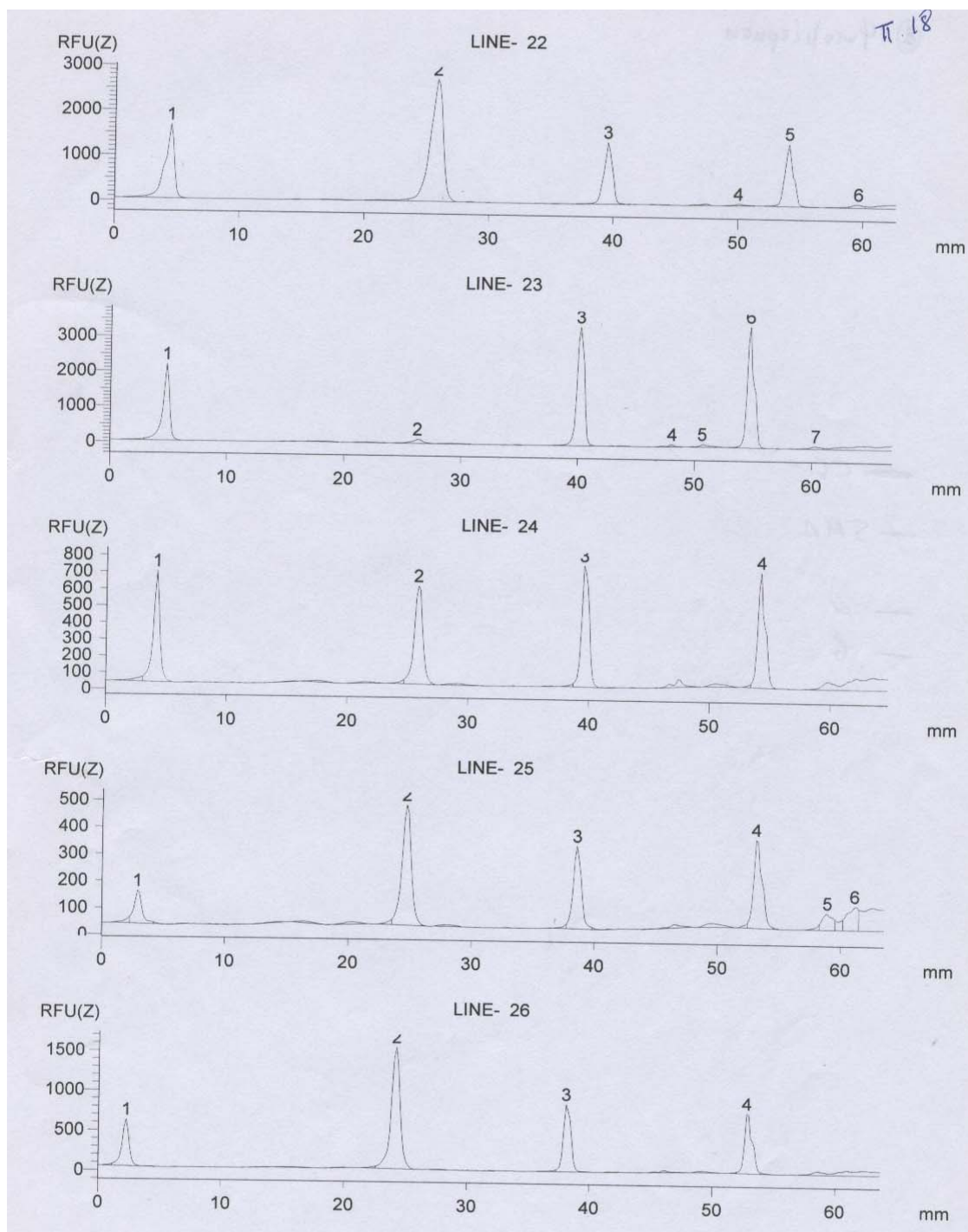


Εικόνα 45: Μεταφορά και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR του προαναφερθέντος πειράματος σε γέλη Long Ranger για την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Τα σήματα από τις μπάντες ήταν έντονα γεγονός που επέτρεψε την δοκιμή ελάττωσης των κύκλων του PCR.

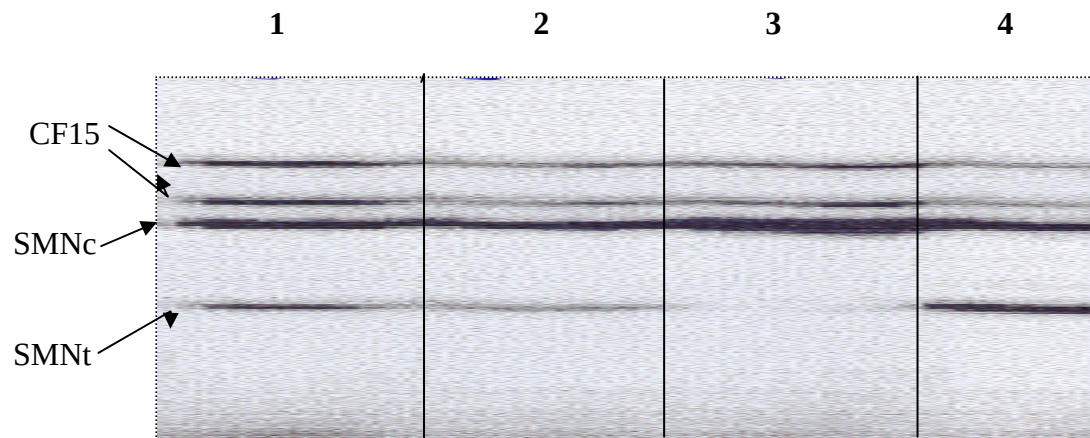


Εικόνα 46: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για το SMN8/CF13 σε γέλη Long Ranger για την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνονται σήματα από προϊόντα PCR στους 26 κύκλους και στο δεξιό μέρος της εικόνας στους 23 κύκλους. Οι τιτλοποίησης της τεχνικής συνεχίστηκε με την εφαρμογή PCR στους 23 κύκλους.

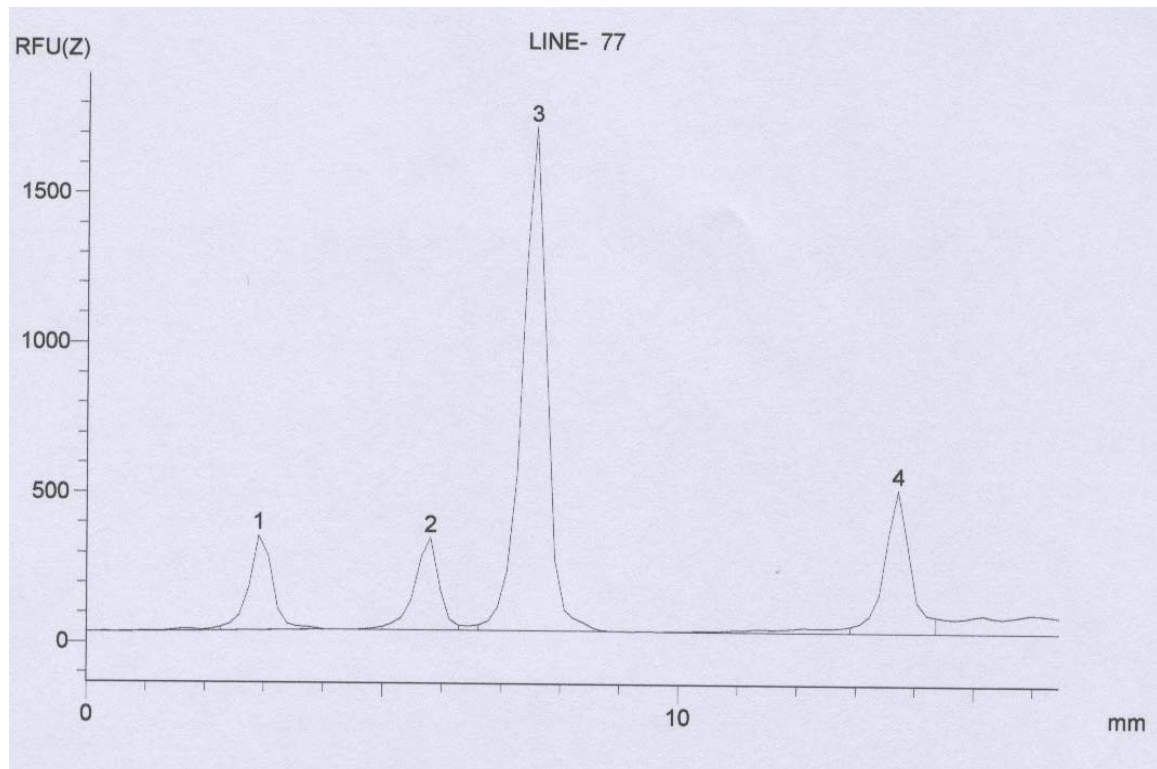
Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR για το *SMN8/CF13* με τη χρήση του λογισμικού πακέτου Image Quant (Εικ. 47-53).



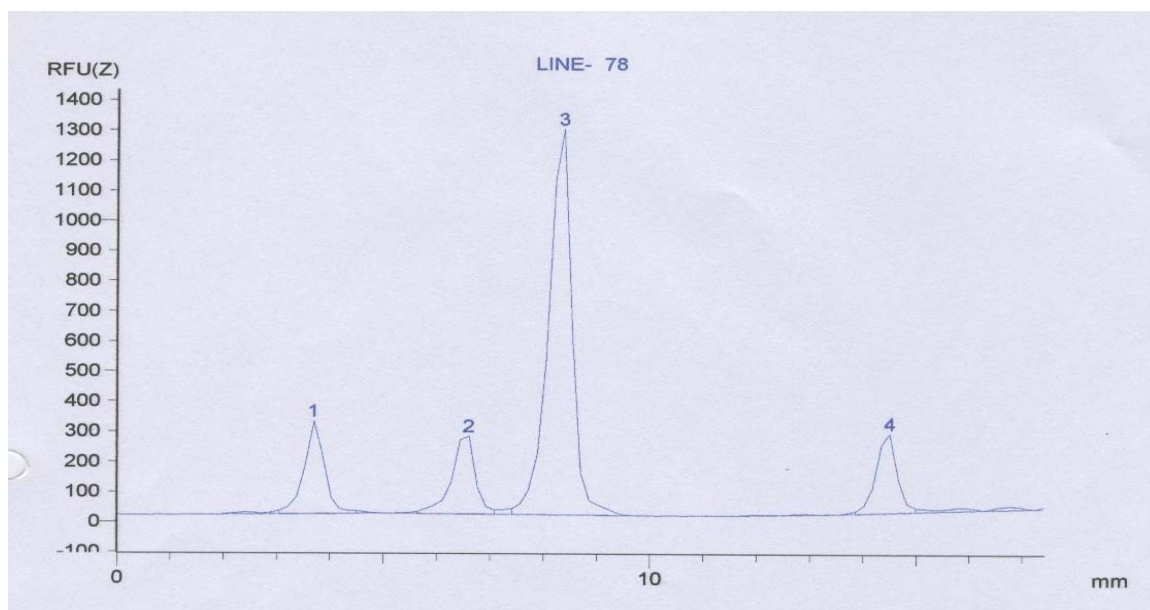
Εικόνα 47: Ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR για το *SMN8/CF13* με τη χρήση του λογισμικού πακέτου Image Quant. Στα διαγράμματα 22, 23, 24 απεικονίζονται ο πατέρας, το πάσχον παιδί και η μητέρα αντίστοιχα, ενώ στα διαγράμματα 25 και 26 απεικονίζονται φυσιολογικοί μάρτυρες.



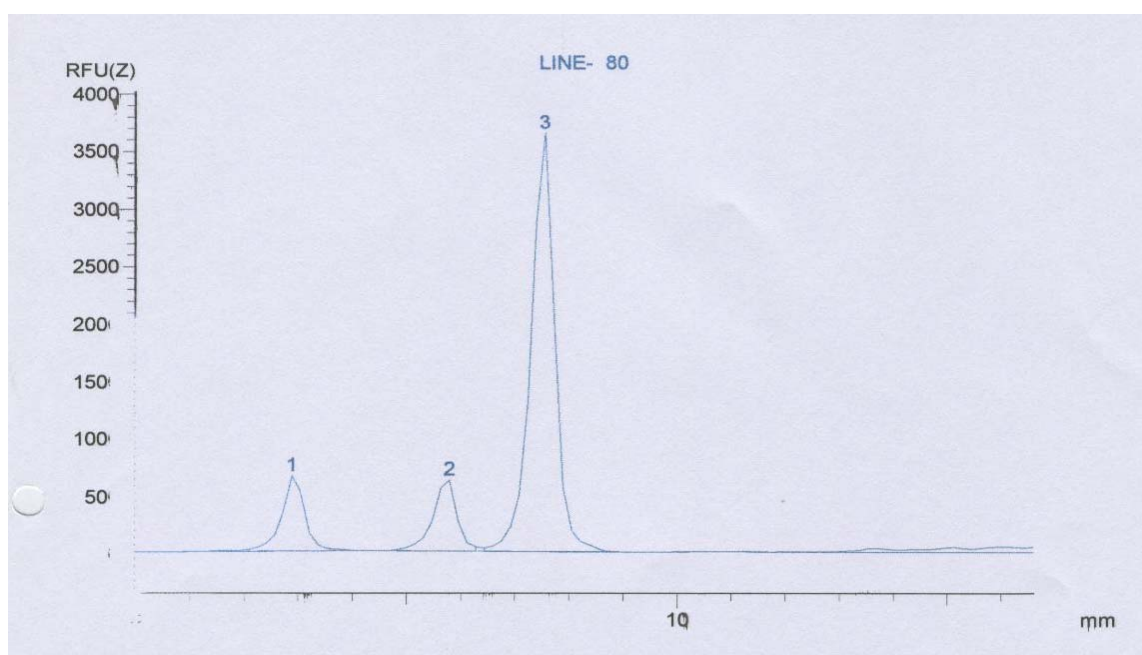
Εικόνα 48: Απεικόνιση οικογένειας SMA σε γέλη Long Ranger για την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι στήλες 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τον πατέρα και την μητέρα αντίστοιχα, η στήλη 3 το πάσχον παιδί, και η στήλη 4 φυσιολογικό μάρτυρα.



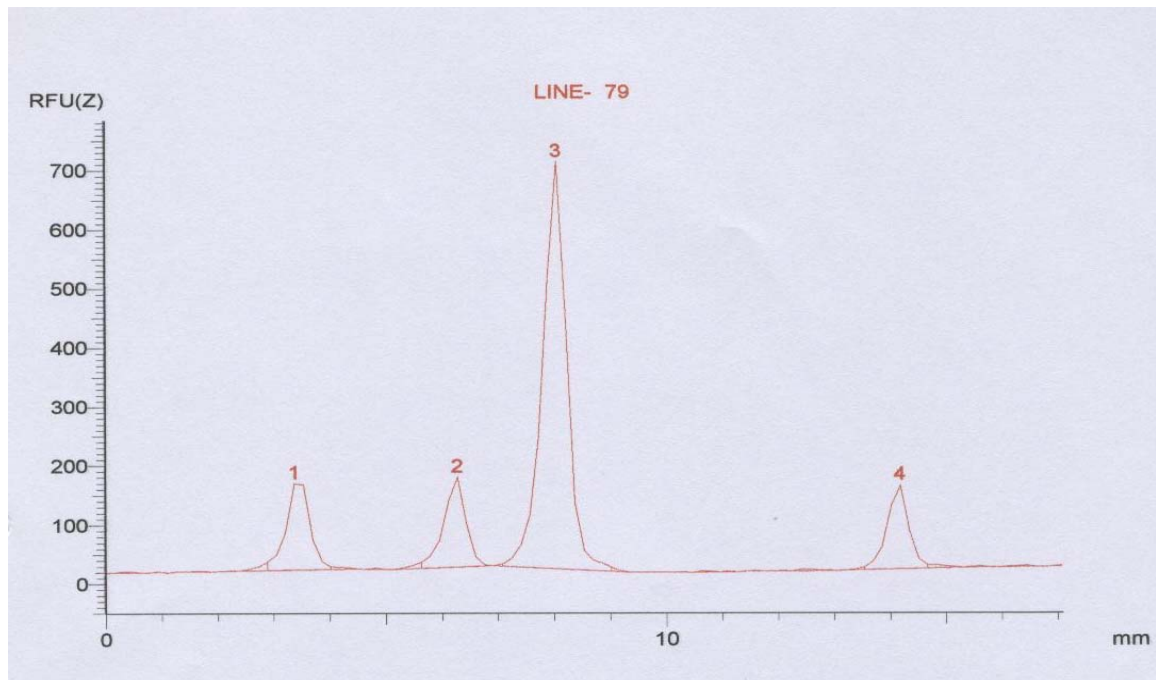
Εικόνα 49



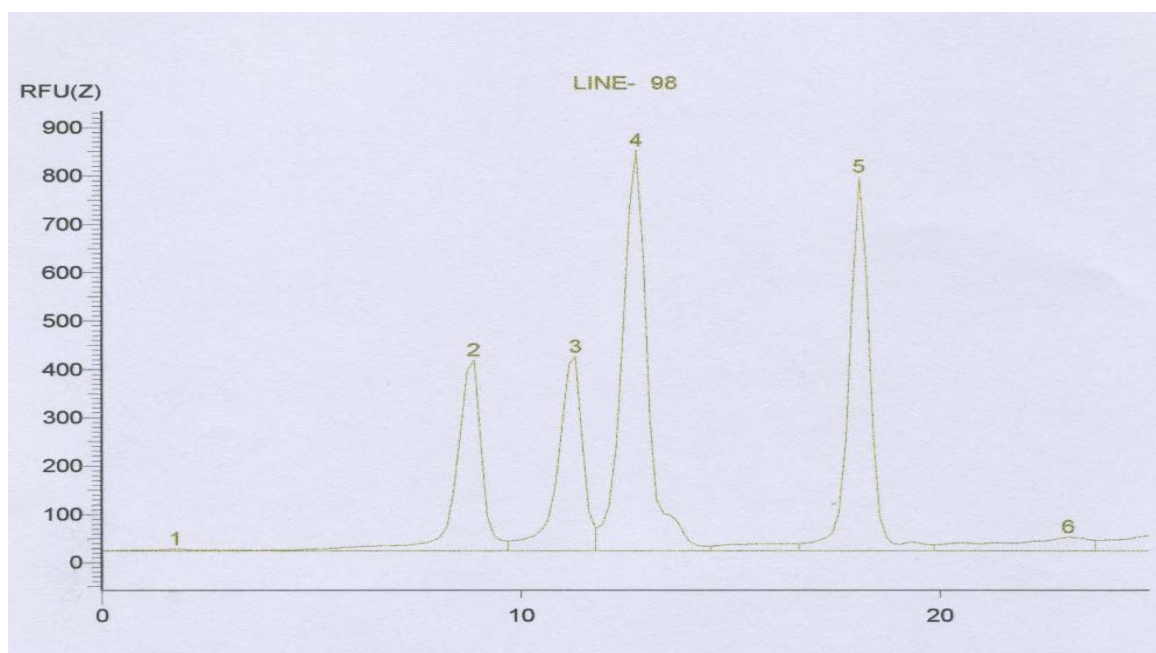
Εικόνα 50



Εικόνα 51



Εικόνα 52



Εικόνα 53

Εικόνες 49-53: Απεικόνιση οικογένειας SMA με την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι εικόνες 16-19 απεικονίζουν μέλη της οικογένειας (πατέρας, μητέρα, πάσχον παιδί, εξάδελφος) και η εικόνα 20 απεικονίζει φυσιολογικό άτομο. Οι δύο πρώτες κορυφές αντιπροσωπεύουν το CF15, η τρίτη το *SMN2* και η τέταρτη το *SMN1*. Στο πάσχον παιδί η τέταρτη κορυφή λείπει τελείως ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι το ίδιο άτομο παρουσιάζει αυξημένη κορυφή του κεντρομερικού γονιδίου *SMN2*.

4.1.2 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΙΜΩΝ ΛΟΓΟΥ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ *SMN1/CFTR*

4.1.2.i ΓΙΑ ΦΟΡΕΙΣ

Οι γονείς των πασχόντων (controls) μελετήθηκαν συγκριτικά με τα παιδιά τους που είχαν ομόζυγη έλλειψη και βρέθηκε ότι η αναλογία του τελομερικού εξωνίου ως προς το εσωτερικό control είχε μέση τιμή λόγου 0.49 (εύρος τιμής 0.27-0.70).

4.1.2.ii ΓΙΑ ΜΗ ΦΟΡΕΙΣ

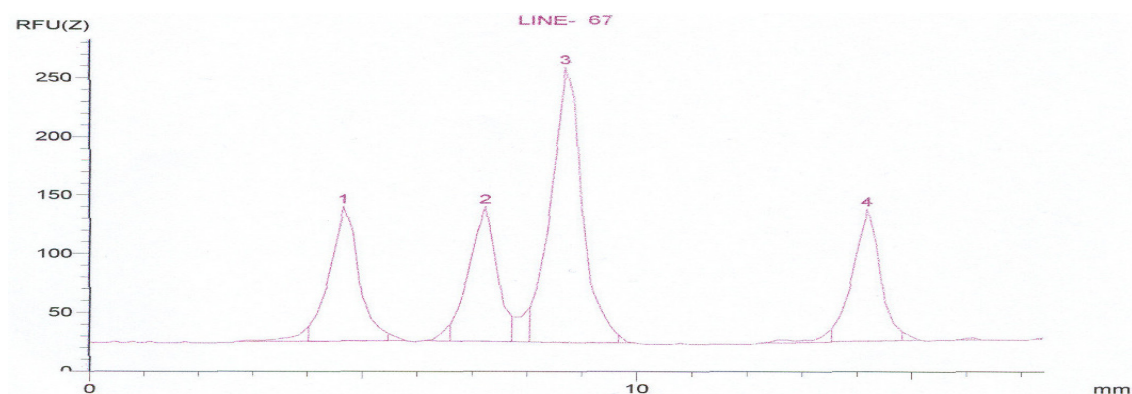
Σε 5 φυσιολογικούς μη φορείς, που δεν είχαν στην οικογένειά τους περιστατικό SMA παρατηρήθηκε μέση τιμή λόγου 1.4 (εύρος τιμής 0.8-1.9).

Τα αποτελέσματα των μελετών διασταυρώθηκαν με τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από μελέτες έμμεσης ανίχνευσης φορέων στις ίδιες οικογένειες με τη χρήση της πολυμορφικής θέσης Ag1CA, η οποία είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με το γονίδιο *SMN*.

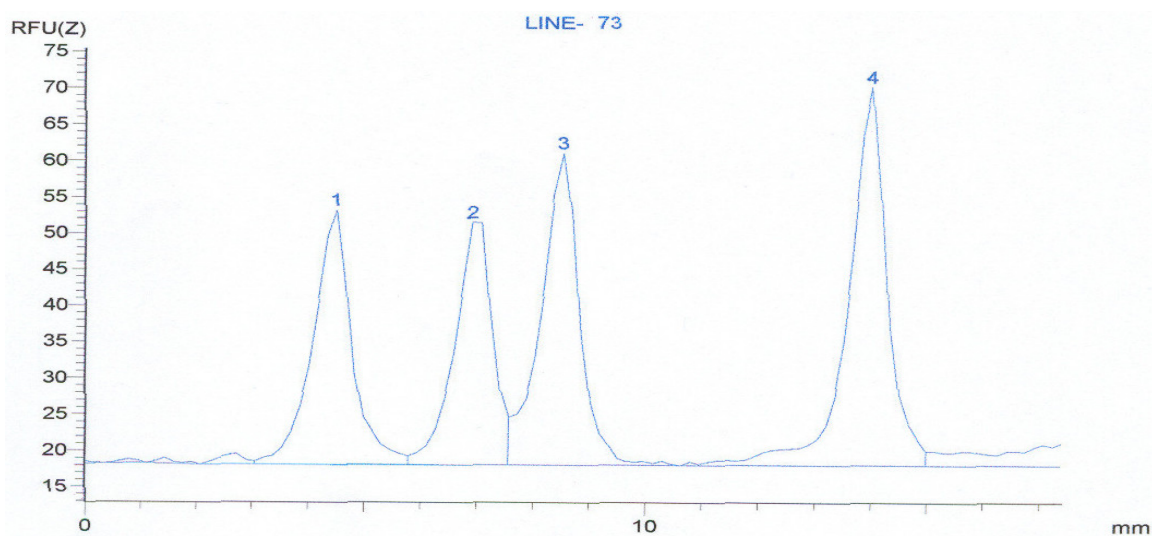
Μετά από επαναληπτικά περάματα οι λόγοι καθορίστηκαν ως εξής:

Φορείς SMA: Τιμή < 1.3

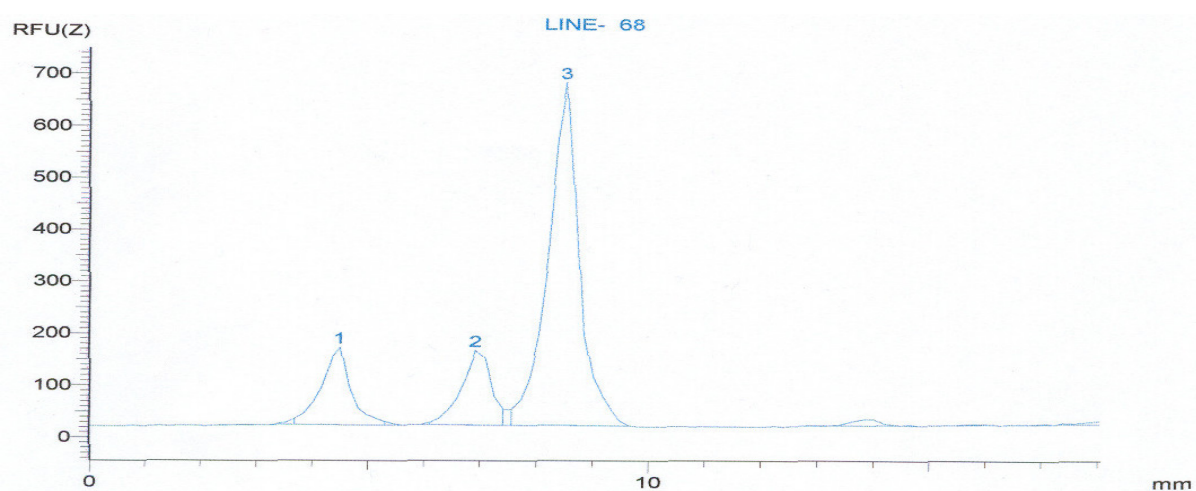
Μη φορείς SMA: Τιμή > 1.3



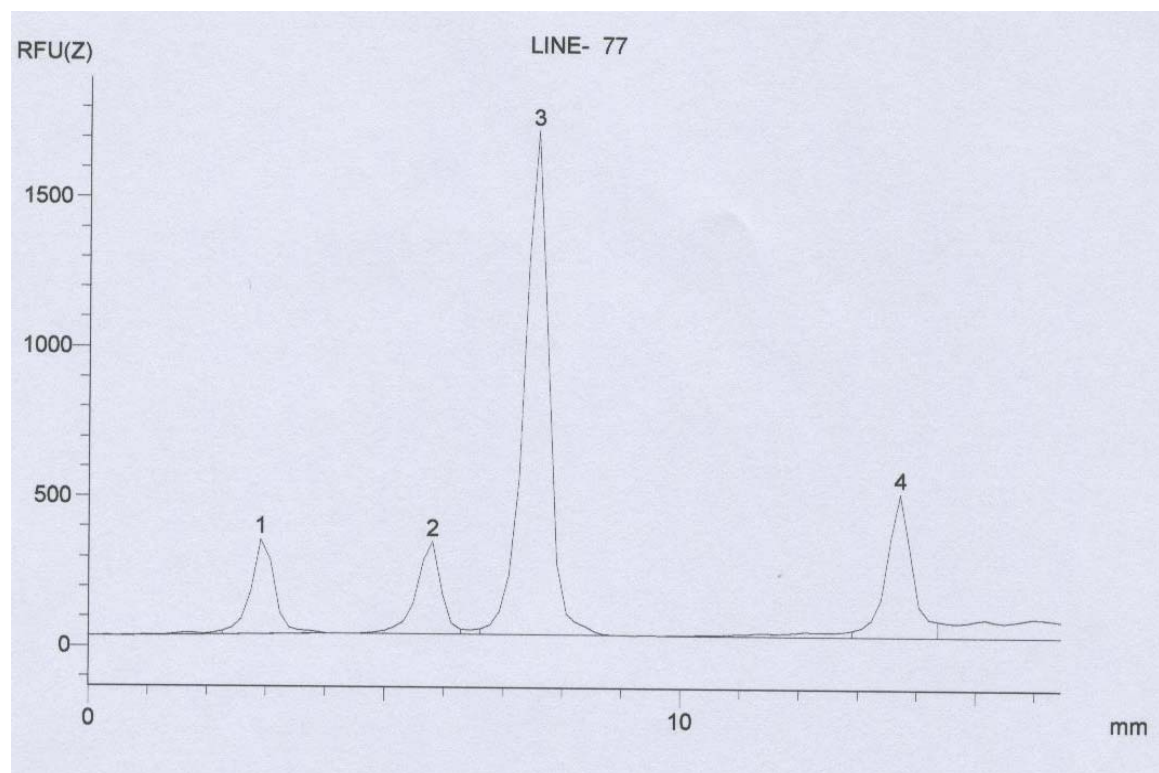
Εικόνα 54: Απεικόνιση φορέα SMA με την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι κορυφές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν το εσωτερικό control του εξωνίου 15 του γονιδίου *CF*, η κορυφή 3 το κεντρομερικό γονίδιο *SMN2* και η κορυφή 4 το τελομερικό γονίδιο *SMN1*. Στο συγκεκριμένο άτομο ο λόγος $SMN1/CF15 = 1.01$



Εικόνα 55: Απεικόνιση μη φορέα SMA με την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι κορυφές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν το εσωτερικό control του εξωνίου 15 του γονιδίου *CF*, η κορυφή 3 το κεντρομερικό γονίδιο *SMN2* και η κορυφή 4 το τελομερικό γονίδιο *SMN1*. Στο συγκεκριμένο άτομο ο λόγος $SMN1/CF15 = 1.32$



Εικόνα 56: Απεικόνιση πάσχοντα SMA με την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι κορυφές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν το εσωτερικό control του εξωνίου 15 του γονιδίου *CF*, η κορυφή 3 το κεντρομερικό γονίδιο *SMN2*. Η κορυφή 4 που αντιπροσωπεύει το τελομερικό γονίδιο *SMN1* λείπει διότι το συγκεκριμένο άτομο παρουσιάζει ομόζυγη έλλειψη του *SMN1*.



Εικόνα 57: Απεικόνιση μη φορέα SMA με την εφαρμογή ποσοτικού PCR. Οι κορυφές 1 και 2 αντιπροσωπεύουν το εσωτερικό control του εξωνίου 15 του γονιδίου *CF*, η κορυφή 3 το κεντρομερικό γονίδιο *SMN2* και η κορυφή 4 το τελομερικό γονίδιο *SMN1*. Στο συγκεκριμένο άτομο ο υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του *SMN2*.

4.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ PCR ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΓΝΩΣΤΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ

4.2.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΣΕ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 233 άτομα. Από αυτά τα 123 ανήκαν σε οικογένειες στις οποίες υπήρχε τουλάχιστον ένα πάσχον άτομο. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν 90 άτομα μη πάσχοντα από τα οποία τα 44 ήταν γονείς πασχόντων και τα 46 συγγενείς πρώτου ή δεύτερου βαθμού. Χρησιμοποιώντας την τεχνική του ποσοτικού PCR, βρέθηκε ότι από τους 44 γονείς πασχόντων οι 41 ήταν φορείς και από τα 46 συγγενή άτομα, οι 39 ήταν φορείς. Παράλληλα, μελετήθηκαν και τα 30 πάσχοντα άτομα αυτών των οικογενειών από τα οποία 25 έπασχαν από SMA Τύπου Ι, 2 από Τύπου ΙΙ και 3 από τύπου ΙΙΙ.

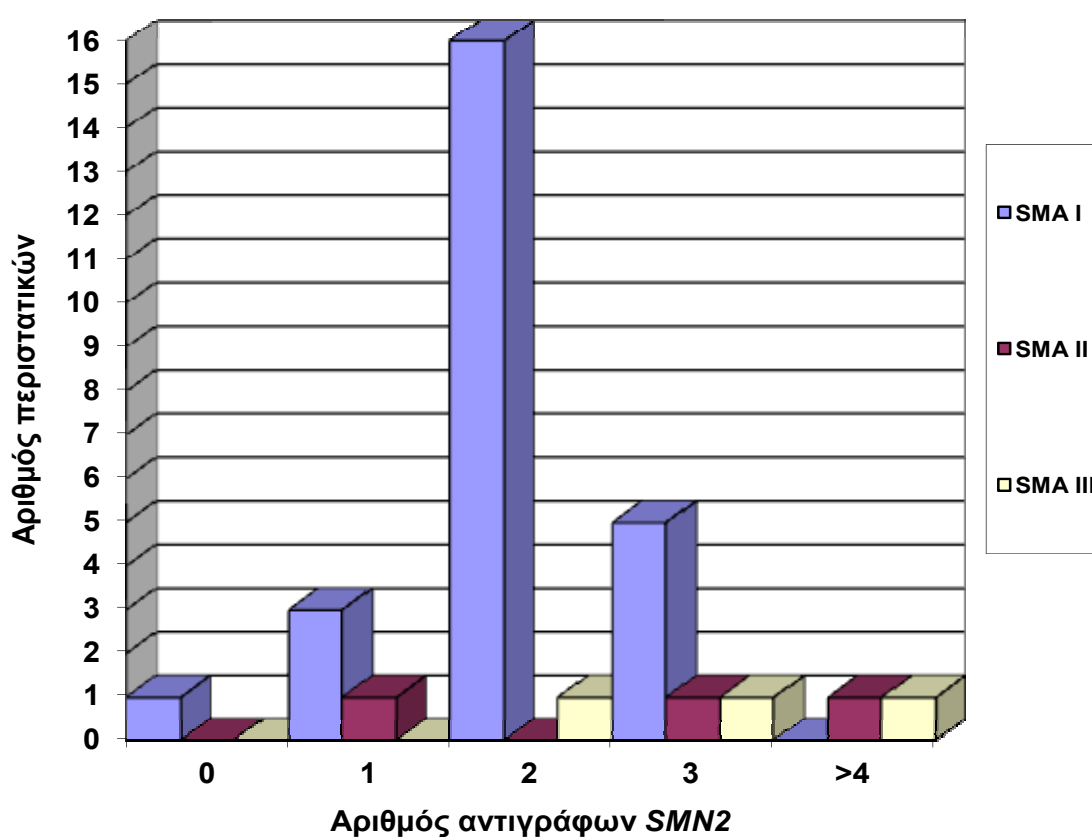
Πίνακας 10: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΙΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ

	ΦΟΡΕΙΣ	ΜΗ ΦΟΡΕΙΣ	ΣΥΝΟΛΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
ΓΟΝΕΙΣ	41	3	44	93% / 7%
ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ	39	7	46	85% / 15%

4.2.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΟΝ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Πίνακας 11: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΟΝ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

	ΦΟΡΕΙΣ	ΜΗ ΦΟΡΕΙΣ	ΣΥΝΟΛΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ
Γ. Π.	4	106	110	3,63%

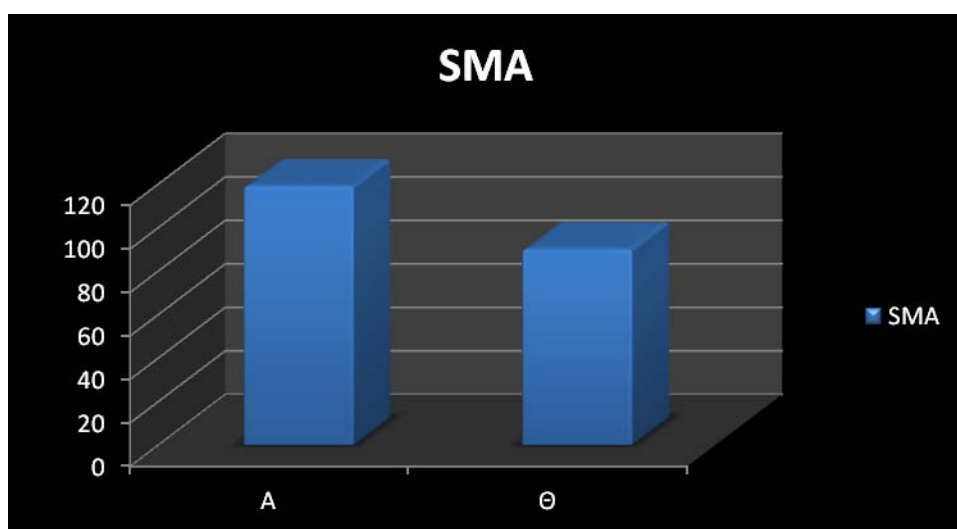
Πίνακας 12: Συσχέτιση Φαινοτύπου-αριθμού αντιγράφων *SMN2*Πίνακας 13: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΑΡΙΘΜΟ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ *SMN2*

	0	1	2	3	>4	ΣΥΝΟΛΟ
SMA I	1	3	16	5	0	25
SMA II	0	1	0	0	1	2
SMA III	0	0	1	1	1	3

4.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ MLPA ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ

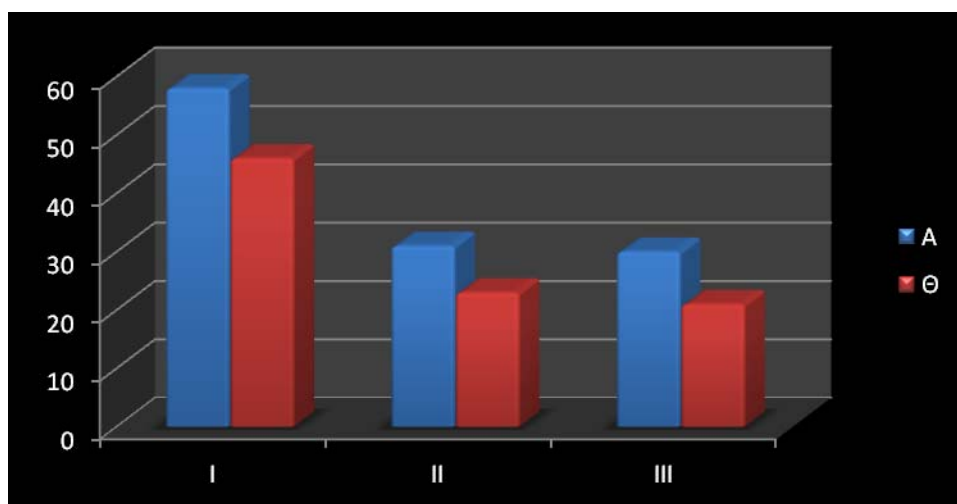
Από τα περίπου 398 περιστατικά που έχουν παραπεμφθεί στο Τμήμα Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών τα τελευταία 15 χρόνια, τα 209 διαγνώστηκαν με μοριακή βλάβη, ποσοστό 52,5% επί του συνόλου.

Από αυτά τα περιστατικά 119 (57%) ήταν άρρενα και τα 90 (43%) ήταν θήλεα.



Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση συσχέτισης νόσου-φύλου

Από αυτά στα 202 διαπιστώθηκε ομόζυγη έλλειψη στα εξώνια 7 και 8 του γονιδίου *SMN1* (50,7%) και ομόζυγη έλλειψη του εξωνίου 7 σε μόνο 7 περιστατικά.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση πασχόντων ανά τύπο και ανά φύλο

Από αυτά τα περιστατικά 104 (49,7%) ήταν τύπου I, 54 (25,8%) τύπου II και 51 (24,4%) τύπου III.

Αντίστοιχα από τα 104 περιστατικά τύπου I τα 58 (55,7%) ήταν άρρενα και τα 46 (44,2%) θήλεα.

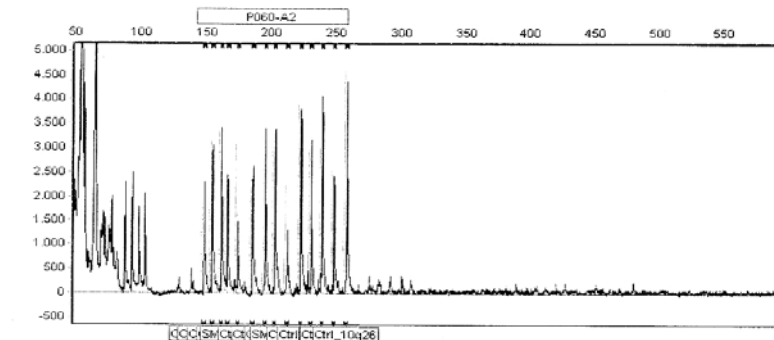
Από τα 54 περιστατικά τύπου II τα 31 (57,4%) ήταν άρρενα και τα 23 (42,5%) ήταν θήλεα.

Τέλος από τα 51 περιστατικά τύπου III τα 30 (58,8%) ήταν άρρενα και τα 21 (41,1%) θήλεα.

Προκειμένου να δοκιμαστεί η τεχνική μελετήθηκαν 3 δείγματα πασχόντων, 6 δείγματα επιβεβαιωμένων φορέων-γονείς των παραπάνω, 5 δείγματα επιβεβαιωμένων μη φορέων.

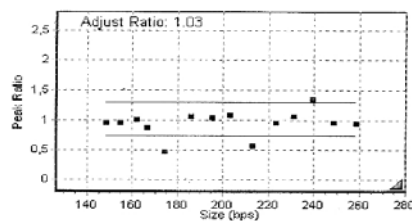
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.80	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization (Adjusted)
Report Time: 09/23/2009 - 10:50:02	Quantification By: Peak Height
Panel: P060-A2	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: A04.rsd /// B02.rsd /// B04.rsd /// D02.rsd /// E04.rsd /// F04.rsd /// G04.rsd	

B04.rsd



Sample Name: B04
Machine: CZC72400Q8
Run Time: 09/22/2009 - 15:59:59 -> 09/22/2009 - 17:15:00

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

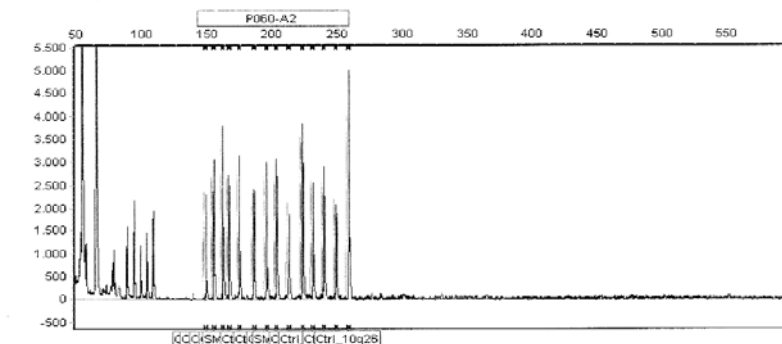


Probe Name	Bin Size	B04
1 BIRC1	239.4	1.358
2 Ctrl_01q21	248.6	0.971
3 Ctrl_03p14	161.7	1.015
4 Ctrl_08q11	223.1	0.967
5 Ctrl_10q26	258.3	0.949
6 Ctrl_11q22	185.8	1.063
7 Ctrl_12q23	231.0	1.061
8 Ctrl_13q14	195.4	1.041
9 Ctrl_16q22	154.8	0.971
10 Ctrl_17p13	148.6	0.971
11 Ctrl_4q25	166.5	0.873
12 Ctrl_8p23	202.9	1.073
13 SMN1_ex07	174.4	0.479
14 SMN1_ex08	212.6	0.571

Εικόνα 60: Απεικόνιση φορέα SMA (ετερόζυγη έλλειψη των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1) με την τεχνική MLPA. Ο λόγος της έντασης του σήματος των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 ως προς αυτής των προϊόντων ελέγχου είναι στο 0.5

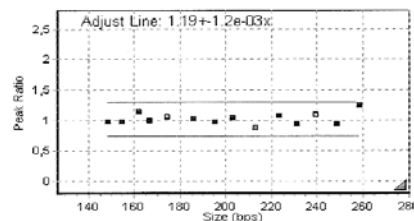
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.80	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Population Normalization (Adjusted)
Report Time: 09/23/2009 - 10:50:03	Quantification By: Peak Height
Panel: P060-A2	Classification: Loss < 0.75 <= Equivalent <= 1.30 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Peak Ratio
Synthetic Used: A04.rsd /// B02.rsd /// B04.rsd /// D02.rsd /// E04.rsd /// F04.rsd /// G04.rsd	

E04.rsd



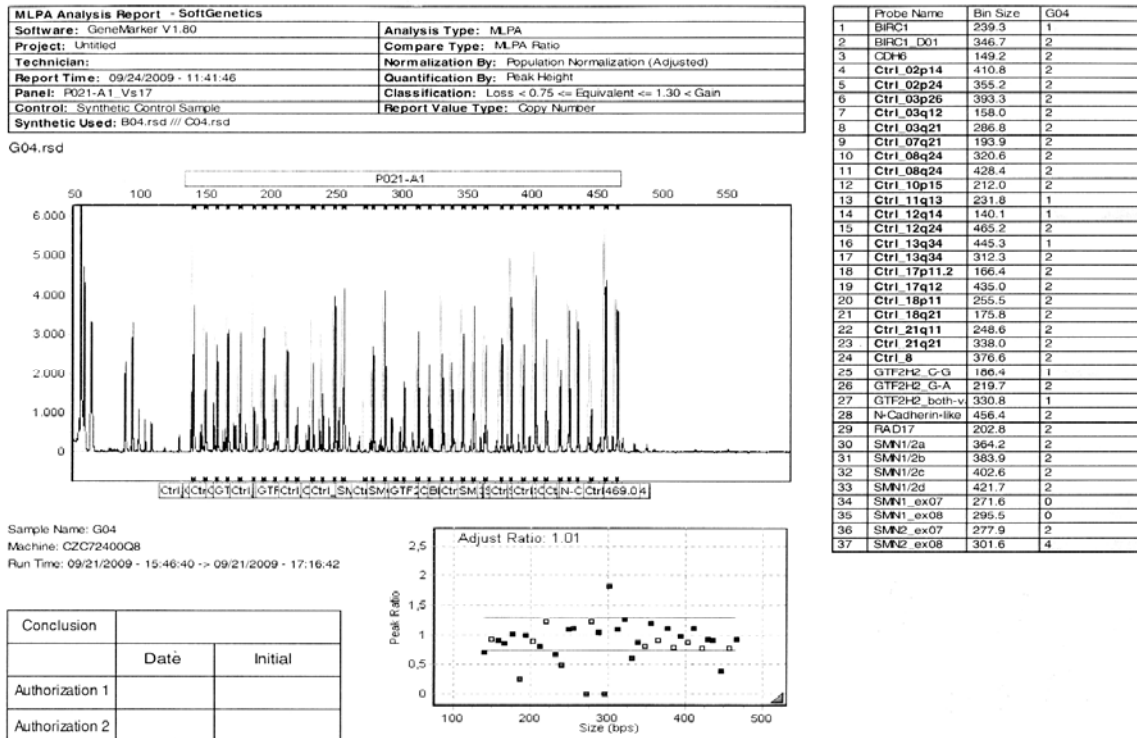
Sample Name: E04
Machine: CZC72400Q8
Run Time: 09/22/2009 - 15:59:59 -> 09/22/2009 - 17:15:00

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		



Probe Name	Bin Size	E04
1 BIRC1	239.4	1.096
2 Ctrl_01q21	248.6	0.946
3 Ctrl_03p14	161.7	1.157
4 Ctrl_08q11	223.1	1.083
5 Ctrl_10q26	258.3	1.247
6 Ctrl_11q22	185.8	1.033
7 Ctrl_12q23	231.0	0.953
8 Ctrl_13q14	195.4	0.983
9 Ctrl_16q22	154.8	0.968
10 Ctrl_17p13	148.6	0.972
11 Ctrl_4q25	166.5	0.995
12 Ctrl_8p23	202.9	1.047
13 SMN1_ex07	174.4	1.061
14 SMN1_ex08	212.6	0.883

Εικόνα 61: Απεικόνιση μη φορέα SMA (φυσιολογικού ατόμου) με την τεχνική MLPA. Ο λόγος της έντασης του σήματος των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 ως προς αυτής των προϊόντων ελέγχου είναι στο



Εικόνα 62: Απεικόνιση πάσχοντα SMA (ομόζυγη έλλειψη των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1) με την τεχνική MLPA. Ο λόγος της έντασης του σήματος των εξωνίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 ως προς αυτής των προϊόντων ελέγχου είναι στο 0.

Με την τεχνική MLPA μελετήθηκαν 96 πάσχοντα άτομα από τα παραπεφθέντα περιστατικά ως προς τα γονίδια SMN2 και NAIP σε συσχέτισμό με τον τύπο της νόσου.

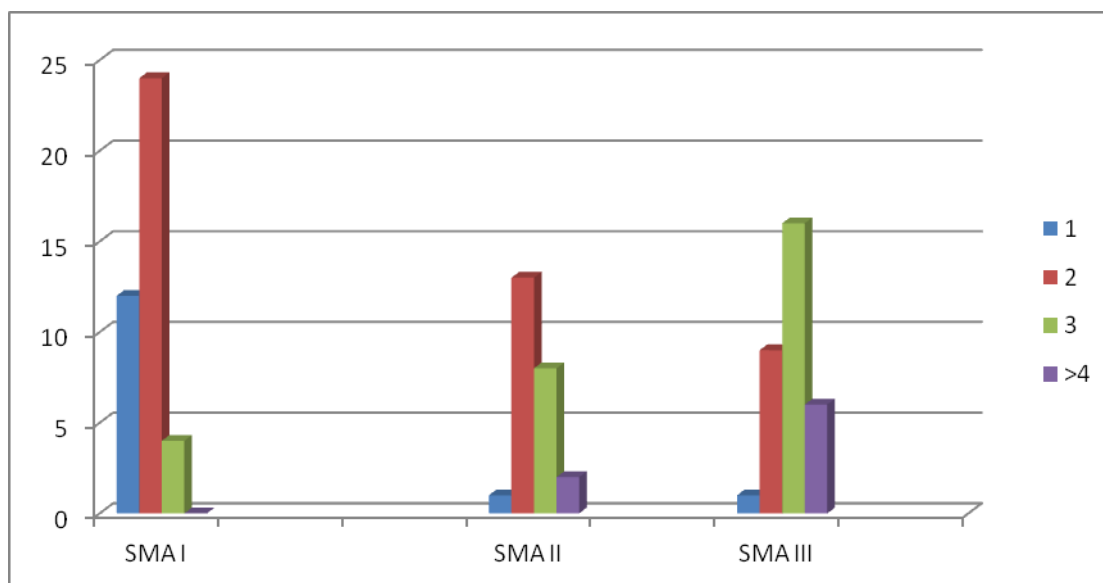
Από αυτά 40 ήταν τύπου I (41,66%), 34 τύπου II (25%), και 32 τύπου III (33.3%).

31 ασθενείς παρουσίασαν έλλειψη στο γονίδιο NAIP και πιο συγκεκριμένα, 25 περιστατικά με ομόζυγη έλλειψη στο NAIP με νόσο τύπου I, 2 με νόσο τύπου II και 4 με νόσο τύπου III.

Όσον αφορά το συσχέτισμό βαρύτητας της νόσου με τον αριθμό των αντιγράφων SMN2, βρέθηκαν τα ακόλουθα τα οποία αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 14: MLPA ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΑΡΙΘΜΟ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ *SMN2*

	1	2	3	>4	ΣΥΝΟΛΟ
SMA I	12	24	4	0	40
SMA II	1	13	8	2	24
SMA III	1	9	16	6	32

**Εικόνα 63:** Απεικόνιση συσχέτισης του τύπου της νόσου με τον αριθμό αντιγράφων *SMN2* με την τεχνική MLPA.

4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ MLPA ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΙΚΟΥ

ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Η εφαρμογή της τεχνικής MLPA που ελέγχθηκε τόσο σε δείγματα ελέγχου, όσο και σε μεγάλο δείγμα πασχόντων από NMA, χρησιμοποιήθηκε σε δείγμα του γενικού πληθυσμού. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο kit ανιχνευτών MLPA:

- Το P060-A2 που έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει τον αριθμό αντιγράφων στο γονίδιο *SMN1* μόνο και χρησιμοποιήθηκε σε 62 δείγματα.

- Το P021-A1 που έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει τον αριθμό αντιγράφων στα γονίδια *SMN1* και *SMN2* και χρησιμοποιήθηκε σε 94 δείγματα.

Από τη μελέτη με τη χρήση του P060-A2 προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα που αναγράφονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα μελέτης των γονιδίων *BIRC1* και *SMN* στο Γενικό Πληθυσμό χρησιμοποιώντας το SALSA-MLPA kit p060-A2

<i>P060</i>	<i>BIRC1</i>	<i>SMN1 E7</i>	<i>SMN1 E8</i>
ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ	N=62	N=62	N=62
1	4 (6.45%)	2 (3.22%)	3 (4.83%)
2	55 (88.7%)	59 (95.16%)	58 (93.54%)
3	3 (4.83%)	1 (1.61%)	1 (1.61%)

Από τη μελέτη με τη χρήση του P021-A1 προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα μελέτης των γονιδίων *BIRC1* και *SMN* στο Γενικό Πληθυσμό χρησιμοποιώντας το SALSA-MLPA kit p021-A1

<i>P021</i>	<i>BIRC1</i>	<i>BIRC1_D0 1</i>	<i>SMN1 E7</i>	<i>SMN1 E8</i>	<i>SMN2_E 7</i>	<i>SMN2_E 8</i>
ΑΝΤΙΓΡΑΦ Α	N=94	N=94	N=94	N=94	N=94	N=94
0	0	0	0	0	4 (4.24%)	4 (4.24%)
1	4 (4.24%)	2 (2.12%)	2 (2.12%)	2 (2.12%)	33 (35.1%)	32 (34.04%)
2	81 (86.17%)	90 (95.74%)	86 (91.48%)	85 (90.42%)	52 (55.32%)	51 (54.25%)
3	8 (8.48%)	2 (2.12%)	6 (6,36%)	7 (7,44%)	4 (4.24%)	5 (5.32%)
>3	1 (1.06%)	0	0	0	1 (1.06%)	2 (2.12%)

Από τη συνολική μελέτη των 156 δειγμάτων DNA του γενικού πληθυσμού βρέθηκαν 3 φορείς NMA. Η συχνότητα των φορέων στο δείγμα που μελετήθηκε προκύπτει στους 1:52.

4.5 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΓΝΩΣΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος καταγωγής των γονέων των παραπεφθέντων περιστατικών. Αυτό κρίθηκε σημαντικό γιατί παρουσιάστηκαν περιοχές στην Ελλάδα στις οποίες υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα της νόσου σε σχέση με άλλες περιοχές. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα περιστατικά φορείας ανάλογα με τον τύπο και τον τόπο καταγωγής.

Πίνακας 17: Γεωγραφική κατανομή φορέων-μαρτύρων

	SMA I	SMA II	SMA III	ΣΥΝΟΛΟ
ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	19	5	16	40
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	16	21	10	47
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	7	7	1	15
ΗΠΕΙΡΟΣ	4	1	1	7
ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	15	3	6	24
ΘΡΑΚΗ	0	0	1	1
ΝΗΣΙΑ ΙΩΝΙΟΥ	7	0	2	9
ΝΗΣΙΑ Β. ΑΙΓΑΙΟΥ	4	2	2	8
ΔΩΔΕΚΑΝΗΣΑ	2	0	6	8
ΚΥΚΛΑΔΕΣ	4	3	3	10
ΚΡΗΤΗ	7	14	7	28
Μ. ΑΣΙΑ	8	2	2	12
ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	2	0	0	2
ΑΛΒΑΝΙΑ	16	8	0	24



Εικόνα 64: Γεωγραφική κατανομή γνωστών φορέων από τα παραπεφθέντα περιστατικά.

4.6 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Δεδομένου ότι το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής αποτελεί για τα τελευταία 15 χρόνια κέντρο αναφοράς για την επιβεβαίωση της νόσου, θεωρείται ότι η πλειονότητα των ασθενών με SMA του Ελλαδικού χώρου στο διάστημα αυτό έχει ελεγχθεί μοριακά στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Από τα δεδομένα του εργαστηρίου προκύπτει ότι ο μέσος όρος ανά έτος είναι 12 διαγνώσεις, δηλαδή συχνότητα νόσου τουλάχιστον 1/8333 (με δεδομένο ότι προσήλθαν οι περισσότεροι ασθενείς). Εφαρμόζοντας το νόμο Hardy-Weinberg όπου $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, $p = 0.98905$, $q = 0.01095$ προκύπτει ότι η συχνότητα φορέων $2pq = 0.217$ (2.17%) αναμένεται να είναι τουλάχιστον 1/ 46.15.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Περιορισμοί στην ανίχνευση φορέων στη νόσο NMA

Η ανίχνευση φορέων με SMA παρουσιάζει αρκετά προβλήματα λόγω τις ιδιαιτερότητας της γονιδιακής περιοχής η οποία συνδέεται με τη νόσο (30). Πρόκειται για μία περιοχή που επιδεικνύει υψηλή αστάθεια οδηγώντας σε συχνές απαλειφές και μετατροπές γονιδίων (62). Ο αριθμός αντιγράφων των γονιδίων στην περιοχή αυτή (*SMN1*, *SMN2*, *BIRC1*, *BTF44*) μπορεί να ποικίλλει από 0-4 ανά χρωμόσωμα (30, 32). Η κύρια αιτία αυτής της παραλλαγής είναι ο άνισος επιχiasμός μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων κατά τη διάρκεια της μείωσης, που οδηγεί σε απαλειφές τμημάτων μεταβλητού μεγέθους (38). Στην SMA, το σημαντικότερο γονίδιο σε αυτήν την επαναλαμβανόμενη περιοχή είναι το γονίδιο *SMN*, το οποίο καθορίζεται ως *SMN1* για το τελομερικό αντίγραφο και ως *SMN2* για το κεντρομερικό αντίγραφο (39). Τα πλήρους μήκους cDNAs *SMN1* και *SMN2* είναι απολύτως ίδια, εκτός από δύο νουκλεοτιδικές διαφορές στα εξόνια 7 και 8. Η διαφορά στο εξώνιο 7 διαταράσσει την λειτουργία ενός υποτιθέμενου ενισχυτή ματίσματος στο *SMN2*. Κατά συνέπεια, τα περισσότερα *SMN2* αντίγραφα στερούνται του εξωνίου 7 και είναι ελαττωματικά, ενώ το *SMN1* παράγει πρωτίστως πλήρη αντίγραφα. Η απουσία οποιονδήποτε λειτουργικών αντιγράφων *SMN1* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μη επαρκή αριθμού αντιγράφων πλήρους μήκους, και αποτελεί την αιτία εκδήλωσης του 95% όλων των περιπτώσεων SMA (39). Η παρουσία *SMN2* οδηγεί στην παραγωγή μικρής ποσότητας αντιγράφων πλήρους μήκους.

Επομένως, όσο περισσότερα *SMN2* αντίγραφα έχει κάποιος ασθενής τόσο περισσότερη πρωτεΐνη *SMN2* παράγει και οδηγεί σε ηπιότερο φαινότυπο (144, 145).

Ως εκ τούτου τα προβλήματα που προκύπτουν στην ανίχνευση φορέων είναι (30,31,62):

1. Εμφάνιση νέων μεταλλάξεων (de novo) στο γονίδιο *SMN1* (ελλείψεις ή σημειακές μεταλλάξεις)
2. Η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων στο ίδιο χρωμόσωμα που συνυπάρχουν με έλλειψη στο ομόλογο χρωμόσωμα
3. Το μεγάλο ποσοστό ομολογίας των γονιδίων *SMN1* και *SMN2* που απαιτεί εξειδικευμένες τεχνικές για το σαφή διαχωρισμό τους. Η πλειοψηφία των ασθενών με SMA τύπου I φέρει τις ομόζυγες ελλείψεις στο *SMN1* και φέρει φυσιολογικό ή μειωμένο αριθμό αντιγράφων του *SMN2*. Η πλειοψηφία των ασθενών SMA τύπου II και III παρουσιάζει ομόζυγη έλλειψη του *SMN1* σε συνδυασμό με περισσότερα των 2 αντιγράφων του γονιδίου *SMN2*. Ομόζυγη έλλειψη του *SMN2* παρατηρείται σε περίπου 5% των περιστατικών, αλλά δεν παρουσιάζει κανένα κλινικό φαινότυπο. Επομένως, μεταλλάξεις στο γονίδιο *SMN1*, και όχι στο *SMN2*, είναι αυτό που καθορίζει την εκδήλωση της νόσου αλλά και τη φορεία στην SMA και η διάκριση μεταξύ των δύο γονιδίων παίζει καθοριστικό ρόλο.
4. Η παρουσία σημειακών μεταλλάξεων που σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ανέρχονται σε ποσοστό περίπου 2% και απαιτούν σχολαστικό τρόπο προσέγγισης (66).

5.2 Αναγκαιότητα εφαρμογής ανίχνευσης φορέων στο γενικό πληθυσμό:

Ο σκοπός μεγάλων προγραμμάτων ανίχνευσης φορέων για αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα είναι ο εντοπισμός ασυμπτωματικών ζευγαριών-φορέων έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός προσβεβλημένων από τη νόσο εμβρύων στα αρχικά στάδια της κύηση (146). Αν στην και για την Ελλάδα θεωρείται ότι οι πιο συχνοί φορείς μονογονιδιακών νοσημάτων είναι οι φορείς της μεσογειακής αναιμίας, της κυστικής ίνωσης και της νωτιαίας μυϊκής ατροφίας, η παροχή υπηρεσιών από το εθνικό σύστημα υγείας γίνεται μόνο για το πρώτο νόσημα (147, 148).

Σύμφωνα με κριτήρια που έχουν τεθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για να εφαρμοστεί ανίχνευση φορέων στο γενικό πληθυσμό πρέπει να ισχύουν οι παρακάτω προϋποθέσεις (146):

1. Η νόσος να προκαλεί μεγάλου βαθμού αναπηρία ή θάνατο
2. Να υπάρχει δυνατότητα σαρωτικού (screening) ελέγχου
3. Να υπάρχει δυνατότητα θεραπείας του εμβρύου ή δυνατότητες επιλογών σχετικές με την κύηση (όπως διακοπή της ή επιλεκτική στείρωση) οι οποίες να είναι αποδεκτές από τους γονείς.

Για τη νόσο SMA και τα τρία παραπάνω κριτήρια ισχύουν. Συγκεκριμένα:

Κριτήριο 1. Σοβαρότητα της νόσου:

Η SMA θεωρείται μαζί με τη μυϊκή δυστροφία Duchenne από τα σοβαρότερα νοσήματα της παιδικής ηλικίας. Ιδιαίτερα ο τύπος I εκδηλώνεται από την γέννηση των ατόμων με γενικευμένη υποτονία και πολλές φορές παρατηρείται αναπνευστική ανεπάρκεια ενώ τα άτομα καταλήγουν πριν συμπληρώσουν το

1^ο έτος της ηλικίας τους. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η πλειονότητα των παιδιών έπασχαν από τον τύπο I (41,66%), τύπο II (25%) και τύπο II (33,3%). Αυτό όμως δεν σημαίνει σε μια οικογένεια με ηπιότερο φαινότυπο (SMA τύπου II ή III) δεν μπορεί α αποκτήσει παιδί με βαρύ φαινότυπο διότι εξαρτάται το μέγεθος της έλλειψης στον άλλο γονέα. Από τα στατιστικά αποτελέσματα της εργασίας δεν προκύπτουν άμεσος συσχετισμός φύλου το οποίο μπορεί να επηρεάσει την εκδήλωση της νόσου. Επιπλέον όπως φαίνεται και στους πίνακες 13 και 14 όπου μελετώνται ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου *SMN2* των ασθενών, μπορεί ο αριθμός αντιγράφων να συσχετιστεί με βαρύτερη πρόγνωση αλλά ούτε και αυτό δεν αποτελεί όμως τον κανόνα.

Κριτήριο 2: Συχνότητα φορέων της νόσου.

Η SMA είναι μία από τις συχνότερες θανατηφόρες γενετικές παθήσεις, με συχνότητα φορέων 1/40 με 1/60 στο γενικό πληθυσμό. Η συχνότητα αυτή είναι αρκετά υψηλή ώστε να καθιστά την εφαρμογή προγραμμάτων ανίχνευσης φορέων στο γενικό πληθυσμό αναγκαία σε παγκόσμια κλίμακα (30, 31, 32). Πρόσφατα ανακοινώθηκε μια σημαντική μελέτη που περιελάμβανε τυχαίο έλεγχο για φορεία της νόσου σε 107.611 έγκυες κατά την περίοδο 2005 έως 2009 κυρίως από περιοχές της Ταϊβάν (30). Η τακτική που ακολουθήθηκε ήταν η εξής α) ανίχνευση φορέων στις έγκυες γυναίκες β) ανίχνευση φορέων στους συντρόφους των φορέων εγκύων και γ) εάν και οι δύο γονείς εμφανιζόταν φορείς τότε εφαρμοζόταν προγεννητικός έλεγχος. Η μελέτη αυτή έδειξε 2.262 φορείς SMA (συχνότητα 1 στα 48 άτομα ή 2.10% του γενικού πληθυσμού). Ανάμεσα σε αυτούς 47 ζευγάρια διαπιστώθηκαν και οι δύο φορείς ενώ η νόσος διαγνώστηκε τελικά σε 12 έμβρυα (27.91%).

Σύμφωνα με τον έλεγχο φορέων η συχνότητα της νόσου βρέθηκε 1 στις 8,968 γεννήσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με δεύτερη μεγάλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ σε 6936 άτομα του γενικού πληθυσμού που έδειξε συχνότητα φορέων επίσης 1:40.

Στην Ελλάδα, οι εγκυμοσύνες κάθε χρόνο ανέρχονται στις 100.000 περίπου (147). Σύμφωνα με τη παραπάνω συχνότητα, οι εγκυμοσύνες με κίνδυνο γέννησης πάσχοντος βρέφους από SMA είναι περίπου 20 ανά έτος.

Παρόλο που το Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής συνιστά η ανίχνευση φορέων SMA να γίνεται σε επίπεδο ρουτίνας, το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων έχει αντίθετη άποψη λόγω έλλειψης επαρκών δεδομένων από πιλοτικές και οικονομοτεχνικές μελέτες (<http://www.acog.org>). Συνεπώς, προκύπτει η ανάγκη εφαρμογής μεγάλης κλίμακας προοπτικών πιλοτικών μελετών για την ανίχνευση φορέων SMA στο γενικό πληθυσμό έτσι ώστε να εκτιμηθεί κατά πόσο ένα τέτοιο πρόγραμμα θα είναι εφικτό (32).

Κριτήριο 3: Δυνατότητα εφαρμογής τεχνικής σάρωσης για την πλειονότητα των μεταλλάξεων

Εξαιτίας της παρουσίας του ομόλογου αντιγράφου γονιδίου *SMN2* και της ανίχνευσης ομόζυγης έλλειψης για την πλειονότητα των ασθενών (95%) για το λόγο αυτό ο μόνος τρόπος προσέγγισης είναι η εφαρμογή μια ευαίσθητης, αξιόπιστης και γρήγορης ποσοτικής τεχνικής.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι τεχνικές DHPLC και MLPA αποτελούν αξιόπιστες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγράφων *SMN1/SMN2*, την εκτίμηση ετεροζυγωτίας για ελλείψεις του *SMN1* ή γονιδιακών μετρατροπών σε φορείς.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε δύο προσεγγίσεις

1. Η τεχνική του ποσοτικού PCR με χρήση εσωτερικού control,
2. η τεχνική MLPA.

Η τεχνική του ποσοτικού PCR με χρήση εσωτερικού control δεν κρίθηκε αξιόπιστη γιατί τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν επαναληψιμότητα. Η μέθοδος είχε άμεση εξάρτηση από την ποιότητα του DNA και από την υποκειμενικότητα στη χρήση του λογισμικού προγράμματος επεξεργασίας.

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολλαπλασιάζονταν ανταγωνιστικές γονιδιακές περιοχές. Επίσης αποδείχτηκε ιδιαίτερα δύσκολη τυποποίηση συγκεκριμένων κύκλων αντίδρασης PCR καθώς οι ποσοτικές διαφορές αναδεικνύονταν σε διαφορετικό αριθμό κύκλων ανάλογα με το δείγμα.

Η δεύτερη τεχνική (MLPA) έδωσε αξιόπιστα και επαναληπτικά αποτελέσματα διότι τα εσωτερικά δείγματα ελέγχου δίνουν πληροφορίες για την ποιότητα του DNA αποκλείοντας δείγματα με ακατάλληλο υπόστρωμα DNA. Αντίθετα στην πρώτη τεχνική αυτή η δυνατότητα δεν υπήρχε διότι στηριζόταν μόνο στη συγκέντρωση του δείγματος. Επιπλέον η επεξεργασία των αποτελεσμάτων απαιτούσε ελάχιστη παρεμβολή από το χρήστη εξασφαλίζοντας την αντικειμενικότητα του αποτελέσματος.

Η παρούσα μελέτη αν και μικρής κλίμακας, πληρεί τις βασικές προϋποθέσεις που προτείνονται από το Αμερικανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων, προτείνοντας μέθοδο διάγνωσης οι οποίες είναι, υψηλής ευαισθησίας και εξειδικευμένη (<http://www.acog.org>).

Στην εκπονηθείσα μελέτη βρέθηκε ότι η συχνότητα φορέων *SMN1* στο γενικό πληθυσμό (1/52) συμβαδίζει με το εύρος τιμών που έχει αναφερθεί σε

γενετικές επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες διεξήχθησαν τόσο σε δυτικές χώρες όσο και σε πληθυσμιακή μελέτη στη Νότια Κίνα.

Η τεχνική MLPA μπορεί να ανιχνεύσει το 95% περίπου των περιπτώσεων που προκύπτουν από έλλειψη (28, 30, 31, 32).

5.3 Περιορισμοί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων με την τεχνική MLPA

Οι περιορισμοί στον έλεγχο φορέων για SMA με την τεχνική MLPA είναι οι παρακάτω:

Πρώτον, η ανάλυση αυτή δεν μπορεί να προσδιορίσει φορείς στους οποίους υπάρχουν 2 αντίγραφα *SMN1* στο ίδιο χρωμόσωμα και κανένα αντίγραφο στο δεύτερο χρωμόσωμα (2+0 φορείς) (29, 30, 31). Αυτό αποτελεί μεγάλη πηγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Άτομα τα οποία φέρουν 2 αντίγραφα *SMN1* στο ένα χρωμόσωμα έχουν 50% πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί το οποίο θα φέρει αλληλόμορφο με μη λειτουργικό *SMN1* γονίδιο. Ένας τρόπος αποφυγής του ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος αποτελεί η μελέτη γονέων ενός ατόμου οπότε θεωρητικά εάν υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα του *SMN1* θα πρέπει ο γονέας να έχει παραπάνω από δύο αντίγραφα του γονιδίου. Από μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη στο Ισραήλ προέκυψε ότι σε σύνολο ατόμων του γενικού πληθυσμού αυξημένα αντίγραφα στο γονίδιο *SMN1* βρέθηκαν σε (1/49) (31). Το ποσοστό αυτό φαίνεται ότι παρουσιάζει πληθυσμιακές διαφορές πχ σε πληθυσμό της Αμερικής σε άτομα με καταγωγή από Αφρική φάνηκε ότι το ποσοστό των πολλαπλών αντιγράφων στο γονίδιο

SMN1 είναι 1/54 (32). Στην παρούσα εργασία επιπλέον αντίγραφα εμφανίστηκαν σε 3 άτομα (1/31.3 ή 3.19 %).

Δεύτερος περιορισμός στην ανάλυση φορέων είναι το γεγονός ότι το 2% των περιπτώσεων SMA προκύπτουν από νέες μεταλλάξεις (de novo μεταλλάξεις) ως εκ τούτου είναι χρήσιμο να μελετώνται ζευγάρια υποψήφιων γονέων έτσι ώστε εάν υπάρξει de novo μετάλλαξη στον ένα ένα υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης παθολογικού παιδιού μόνο εάν ο άλλος είναι φορέας (91).

Τρίτος περιοριστικός παράγοντας που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αφορά το 1.7% των φορέων μπορεί να φέρουν ενδογονιδιακές μεταλλάξεις σε άλλα εξώνια του γονιδίου *SMN1* που όμως παρατηρούνται σπάνια (<2%) (66). Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις το αποτέλεσμα της εξέτασης για φορεία είναι δυνατό να είναι ψευδώς αρνητικό σε ποσοστό περίπου 8% (66).

Η παροχή υπηρεσιών συμβουλευτικής γενετικής έχει καθοριστική σημασία για άτομα που δύνανται να αποκτήσουν παιδί με SMA. Τα ζευγάρια θα πρέπει να λαμβάνουν επαρκή και υπεύθυνη πληροφόρηση κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Θα πρέπει να γνωρίζουν για την ασθένεια, τη συχνότητα φορείας, τον τρόπο που κληρονομείται, την πρόγνωση βαρύτητας της νόσου, και όλες τις σχετικές πληροφορίες με την απόδοση του ελέγχου (146).

5.4 Ο Ρόλος της Γενετικής συμβουλευτικής στην ανίχνευση φορέων

Η παροχή υπηρεσιών συμβουλευτικής γενετικής έχει καθοριστική σημασία για άτομα που δύνανται να αποκτήσουν παιδί με SMA (16). Τα ζευγάρια θα πρέπει να λαμβάνουν επαρκή και υπεύθυνη πληροφόρηση κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Θα πρέπει να γνωρίζουν για την ασθένεια, τη συχνότητα

φορείας, τον τρόπο που κληρονομείται, την πρόγνωση βαρύτητας της νόσου, και όλες τις σχετικές πληροφορίες με την απόδοση του ελέγχου (147).

Τα προγράμματα ελέγχου παρουσιάζουν και ηθικά διλλήματα. Παρόλο που η SMA είναι μία νόσος η οποία δεν προκαλεί πνευματική υστέρηση, οι ασθενείς υποφέρουν από μία βαριά προοδευτική νόσο και επικίνδυνη για τη ζωή μυϊκή αναπηρία. Μελέτες ποσοτικού προσδιορισμού του γονιδίου *SMN* αποκάλυψαν ότι υπάρχει μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση των αντιγράφων *SMN2* και την βαρύτητα της νόσου. Ωστόσο, ένα σημαντικό πρόβλημα στην ανίχνευση φορέων είναι το γεγονός ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί ο φαινότυπος από τον μοριακό έλεγχο φορείας (149). Στη περίπτωση που ανιχνευθούν δύο φορείς σε ζευγάρι που δύναται να τεκνοποιήσει, δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί η πιθανότητα απόκτησης παιδιού με βαρύ φαινότυπο (τύπος I, II) ή ηπιότερο (τύπος III). Αυτό αποτελεί μέγιστο περιορισμό σε αυτού του τύπου έλεγχο. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές ατόμων με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου *SMN1* χωρίς συμπτωματολογία της νόσου (0-*SMN1/4-SMN2*) εξαιτίας της παρουσίας άλλων ρυθμιστικών γονιδίων. Μετά από λήψη αμερόληπτων γενετικών συμβουλών τα ζευγάρια με προσβεβλημένα από τη νόσο έμβρυα προχώρησαν στον τερματισμό των κυήσεων ανεξαρτήτως κλινικού τύπου.

Επειδή η SMA εκδηλώνεται σε όλους τους πληθυσμούς, ο έλεγχος φορέων θα πρέπει να προσφέρεται σε όλα τα ζευγάρια ανεξαρτήτου φυλής ή εθνικότητας (29,30,31). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνιστούν ότι θα πρέπει να ενσωματωθεί στην υπηρεσία προγεννητικού ελέγχου στον Ελλαδικό χώρο και όχι μόνο.

5.5 Ο ρόλος του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου *SMN2*

Αν και την κύρια πληροφορία για την ανίχνευση φορέων την παρέχει η μελέτη των αντιγράφων των εξωνίων 7 και 8 του *SMN1*, εν τούτοις η ανίχνευση των αντίστοιχων εξωνίων στο γονίδιο *SMN2* δίνουν πληροφορίες για το μέγεθος της έλλειψης καθώς κατά κανόνα μεγάλες ελλείψεις συνδέονται με βαρύτερο φαινότυπο (144, 152). Επίσης ην πρόγνωση της νόσου αλλά δίνουν πληροφορίες και για την ύπαρξη φαινομένου της γονιδιακής μετατροπής.

Η γονιδιακή μετατροπή δείχνει ότι απουσιάζει το εξώνιο 8 από το *SMN1* αλλά αυτό δεν σημαίνει ότι υπάρχει έλλειψη στο γονίδιο γιατί μπορεί να έχουν αντικατασταθεί από το εξώνιο 8 του γονιδίου *SMN2* (153, 154). Αντίστοιχα ανίχνευση ομόζυγης έλλειψης στο εξώνιο 7 σημαίνει μεταφορά εξωνίου 8 από γονίδιο *SMN1* στο γονίδιο *SMN2*. Στην παρούσα εργασία βρέθηκαν 4 οικογένειες με γονιδιακή μετατροπή (ομόζυγη έλλειψη στο γονίδιο *SMN1*) ενώ σε μια περίπτωση παρατηρήθηκε ομόζυγη έλλειψη μόνο του εξωνίου 8 σε γονιδιακή μετατροπή του εξωνίου 8 από το γονίδιο *SMN2* στο γονίδιο *SMN1*. Στο γενικό πληθυσμό παρατηρήθηκε γονιδιακή μετροπή σε δύο περιπτώσεις. Είναι επίσης ενδιαφέρον και το γεγονός ότι 4 άτομα εμφάνισαν ομόζυγη έλλειψη στο γονίδιο *SMN2* συμβατό με το 5% της βιβλιογραφίας ενώ στους ασθενείς δεν παρατηρήθηκε σε κανένα ομόζυγη έλλειψη και για τα δύο γονίδια ενισχύοντας την υπόθεση ότι έλλειψη και των δύο γονιδίων δεν είναι συμβατή με τη ζωή (32).

5.6 Συχνότητα νοσήματος με βάση τη συχνότητα φορέων

Στην εκπονηθείσα εργασία η συχνότητα φορέων βρέθηκε στο 1/52. Με βάση τα δεδομένα της εργασίας υπολογίστηκε συχνότητα νοσήματος 1/12000. Δεδομένου ότι το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής αποτελεί για τα τελευταία 15 χρόνια κέντρο αναφοράς για την επιβεβαίωση της νόσου θεωρείται ότι η πλειονότητα των ασθενών με SMA του Ελλαδικού χώρου στο διάστημα αυτό έχει εξετασθεί το Τμήμα. Όντως, από τα δεδομένα του εργαστηρίου προκύπτει ότι ο μέσος όρος ανά έτος είναι 12 διαγνώσεις, δηλαδή συχνότητα νόσου 1/8333 (με δεδομένο ότι προσήλθαν όλοι οι ασθενείς). Εφαρμόζοντας το νόμο Hardy-Weinberg όπου $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, $p = 0.98905$, $q = 0.01095$ προκύπτει ότι η συχνότητα φορέων $2pq = 0.0217$ (2.17%) αναμένεται να είναι τουλάχιστον 1/ 46.15. Επειδή όμως κάποιες διαγνώσεις γίνονται σε ιδιωτικά κέντρα, συνάγεται ότι η συχνότητα φορέων που προκύπτει από τη μελέτη ενδεχομένως να είναι λίγο μεγαλύτερη και άρα συμβατή με τη συχνότητα που προκύπτει από τη μελέτη του αριθμού των ασθενών. Επιπλέον η συχνότητα αυτή εάν και έχει προκύψει από τη μελέτη μικρού δείγματος, παραμένει στο εύρος τιμών που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για Καυκάσιους πληθυσμούς.

Από την κατανομή των γνωστών φορέων γεωγραφικά προκύπτει μια σχετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση φορέων (π.χ. Ν. Αργολίδας, Λακωνίας, Δωδεκάνησων, Κρήτης). Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι στις περιοχές αυτές υπάρχουν «κλειστές» κοινωνίες. Δηλαδή, η γονιδιακή δεξαμενή στους πληθυσμούς αυτούς δεν ανανεώνεται με αποτέλεσμα να υπάρχουν σε αρκετές περιπτώσεις γάμοι μεταξύ συγγενικών προσώπων. Εν τούτοις, όπως προκύπτει και από την καταγωγή των φορέων που ανιχνεύτηκαν στο γενικό

πληθυσμό δεν υπάρχει ιδιαίτερος λόγος για ανίχνευση φορέων σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας.

Συμπερασματικά η τεχνική MLPA αποτελεί μία αξιόπιστη τεχνική χαμηλού κόστους για την ανίχνευση φορέων SMA διότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για:

1. έλεγχο φορέων σε οικογένειες με άτομο που έπασχε ή πάσχει από τη νόσο
2. έλεγχο πιθανότητας φορέα σε άτομα που παντρεύονται άτομα οικογενειών με πάσχοντες από SMA
3. έλεγχο σε άτομα που παντρεύονται πάσχοντα από SMA
4. δότες ωαρίων ή σπερματοζωαρίων για εξωσωματική γονιμοποίηση
5. έλεγχο του γενικού πληθυσμού με ελέγχους σάρωσης υπό μορφή μελέτης ευρείας κλίμακας (screening)

Οι ερευνητικές προοπτικές συμπεριλαμβάνουν την επέκταση της μεθοδολογίας στα παρακάτω:

1. έλεγχο περισσότερων ατόμων στο γενικό πληθυσμό
2. επιδημιολογική μελέτη στον Ελλαδικό χώρο
3. στη δημιουργία εκτεταμένης βάσης δεδομένων (registry)

Συμπερασματικά είναι πολύ σημαντικό να τονισθεί ή σημασία της πρόληψης για τη νόσο SMA δεδομένου ότι θεωρείται χρονικά εξελισσόμενη και μέχρι σήμερα ανίατη.

III. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Granger H. Guido Werdnig In Ashwels (ed)(2001). The founders of child neurology. Medical History, 45, 523-32.
2. Johann Hoffmann, Über chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter auf familiärer Basis(1893). Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 3: 427-470.
3. Dubowitz, V. (2009). "Ramblings in the history of spinal muscular atrophy". Neuromuscular Disorders 19(1): 69–73.
- 4.Kugelberg, E, Welander L (1956). Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. Archives of Neurology and Psychiatry, 75, 500-509. Cambetti P., and Giovannardi-Rossi P.
5. Fried K, Emery AE. Spinal muscular atrophy type II (1971). A separate genetic and clinical entity from type I (Werdnig-Hoffmann disease) and type 3 (Kugelberg-Welander disease). Clin Genet.;2(4):203–209.
6. Emery AE. (1971) The nosology of the spinal muscular atrophies. J Med Genet. Dec;8(4):481–495.
7. Lunn MR, Wang CH. (2008) Spinal muscular atrophy. Lancet. 371:2120–33.
8. Guillot N, Cuisset JM, Cuvellier JC, Hurtevent JF, Joriot S, Vallee L. 2008 Unusual clinical features in infantile Spinal Muscular Atrophies.Brain Dev. Mar;30(3):169-78.
9. Munsat TL, Davies KE.International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). Neuromuscul Disord. 1992;2(5-6):423-8.
10. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Röhrig D, Wirth B. [Spinal muscular atrophy in childhood. Possibilities and limits of clinical and molecular genetic diagnosis]. 1993 Nov;141(11):848-54.
- 11 Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. Lancet. 2008 Jun 21;371(9630):2120-33. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60921-6. Review.
12. Oates EC, Reddel S, Rodriguez ML, Gandolfo LC, Bahlo M, Hawke SH, Lamandé SR, Clarke NF, North KN Autosomal dominant congenital spinal muscular atrophy: a true form of spinal muscular atrophy caused by early loss of anterior horn cells. Brain. 2012

13. Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papić L, Kremer H, McEntagart ME, Uhrig S, Fischer C, Fröhlich E, Bálint Z, Tang B, Strohmaier H, Lochmüller H, Schlotter-Weigel B, Senderek J, Krebs A, Dick KJ, Petty R, Longman C, Anderson NE, Padberg GW, Schelhaas HJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Pieber TR, Crosby AH, Guelly C. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapulooperoneal SMA and HMSN2C. Barry S Nat Genet. 2010 Feb;42(2):160-4. doi: 10.1038/ng.508. Epub 2009 Dec 27.
14. Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, King MC, Levy-Lahad E. Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. Am J Hum Genet. 2009 Aug;85(2):281-9
15. Kalampokas E, Kalampokas T, Sofoudis C, Deligeoroglou E, Botsis D. Diagnosing arthrogryposis multiplex congenita: a review. ISRN Obstet Gynecol. 2012;2012:264918
16. Messina MF, Messina S, Gaeta M, Rodolico C, Salpietro Damiano AM, Lombardo F, Crisafulli G, De Luca F. . Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type I (SMARD 1): an atypical phenotype and review of the literature. Eur J Paediatr Neurol. 2012 Jan;16(1):90-4. Review.
17. Prior TW, Russman B. Spinal Muscular Atrophy GeneReviews. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™. διαθέσιμο στη διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>
- 18 . Montes J, Gordon AM, Pandya S, De Vivo DC, Kaufmann P. . Clinical outcome measures in spinal muscular atrophy. J Child Neurol. 2009 Aug;24(8):968-78.
19. von Gontard A, Backes M, Laufersweiler-Plass C, Wendland C, Lehmkuhl G, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S. Psychopathology and familial stress - comparison of boys with Fragile X syndrome and spinal muscular atrophy. J Child Psychol Psychiatry. 2002
20. Rabie M, Jossiphov J, Nevo Y. Electromyography (EMG) accuracy compared to muscle biopsy in childhood. J Child Neurol. 2007 Jul;22(7):803-8
21. Czeizel A, Hamula J. A Hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. . J Med Genet. 1989 Dec;26(12):761-3
22. Burd L, Short SK, Martsolf JT, Nelson RA. Prevalence of type I spinal muscular atrophy in North Dakota.Am J Med Genet. 1991 Nov 1;41(2):212-5.

23. Mostacciuolo ML, Danieli GA, Trevisan C, Müller E, Angelini C. Epidemiology of spinal muscular atrophies in a sample of the Italian population. *Neuroepidemiology*. 1992;11(1):34-8.
24. Arkblad E, Tulinius M, Kroksmark AK, Henricsson M, Darin N. A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr*. 2009 May;98(5):865-72.
25. Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L, Flynn K, Rohlf s EM, Walker A, Allitto B, Sears C, Scholl T. Differences in *SMN1* allele frequencies among ethnic groups within North America. *J Med Genet*. 2009 Sep;46(9):641-4.
26. Norwood FL, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*. 2009 Nov;132(Pt 11):3175-86.
27. Jedrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, Zagozdzon P, Kostera-Pruszczyk A, Borkowska J, Sielska D, Jurek M, Hausmanowa-Petrusewicz. Incidence of spinal muscular atrophy in Poland--more frequent than predicted? *Neuroepidemiology*. 2010;34(3):152-7.
28. Yoon S, Lee CH, Lee KA. Determination of *SMN1* and *SMN2* copy numbers in a Korean population using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Korean J Lab Med*. 2010 Feb;30(1):93-6.
29. Sheng-Yuan Z, Xiong F, Chen YJ, Yan TZ, Zeng J, Li L, Zhang YN, Chen WQ, Bao XH, Zhang C, Xu XM. Molecular characterization of *SMN* copy number derived from carrier screening and from core families with SMA in a Chinese population. *Eur J Hum Genet*. 2010 Sep;18(9):978-84.
30. Su YN, Hung CC, Lin SY, Chen FY, Chern JP, Tsai C, Chang TS, Yang CC, Li H, Ho HN, Lee CN. Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study. *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17067.
31. Ben-Shachar S, Orr-Urtreger A, Bardugo E, Shomrat R, Yaron Y. Large-scale population screening for spinal muscular atrophy: clinical implications. *Genet Med*. 2011 Feb;13(2):110-4.
32. Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf s EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allitto BA. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens. *Eur J Hum Genet*. 2012 Jan;20(1):27-32.

33. Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature*. 1990 Jun 28;345(6278):823-5.
34. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet*. 1990 Aug 4;336(8710):271-3.
35. Mattei MG, Melki J, Bachelot MF, Abdelhak S, Burlet P, Frézal J, Munnich A. In situ hybridization of two markers closely flanking the spinal muscular atrophy gene to 5q12----q13.3. *Cytogenet Cell Genet*. 1991;57(2-3):112-3.
36. Morrison KE, Daniels RJ, Suthers GK, Flynn GA, Francis MJ, Buckle VJ, Davies KE. High-resolution genetic map around the spinal muscular atrophy (SMA) locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet*. 1992 Mar;50(3):520-7.
37. Brzustowicz LM, Kleyn PW, Boyce FM, Lien LL, Monaco AP, Penchaszadeh GK, Das K, Wang CH, Munsat TL, Ott J, et al. Fine-mapping of the spinal muscular atrophy locus to a region flanked by MAP1B and D5S6. *Genomics*. 1992, Aug;13(4):991-8.
38. B. Wirth, E. Pick, A. Leutner, A. Dadze, B. Voosen, M. Knapp, B. Iechaczek-Wappenschmidt, S. Rudnik-Schöneborn, J. Schönling, S. Cox, N.K. Spurr, K. Zerres. Large linkage analysis in 100 families with autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) and 11 CEPH families using 15 polymorphic loci in the region 5q11.2-q13.3. *Genomics*. 1994 Mar 1;20(1):84-93.
39. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Paslier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of aspalinal muscular atrophy-determining Cell 1995; 80: 155-165
40. Bürglen L, Amiel J, Viollet L, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Raclin V, Landrieu P, Verloes A, Munnich A, Melki J. Survival motor neuron gene deletion in the arthrogryposis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1130-2.
41. Mittal B. Rapid molecular diagnosis of spinal muscular atrophy *Indian J Med Res*. 2012 January; 135(1): 6–8.
42. Marquis J., Meyer K., Angehrn L., Kampfer S.S., Rothen-Rutishauser B., Schumperli D. Spinal muscular atrophy: *SMN2* pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *er*. 2007, Mol. Th15:1479–1486.

43. Luca Cartegni, Michelle L. Hastings, John A. Calarco, Elisa de Stanchina, and Adrian R. Krainer Determinants of Exon 7 Splicing in the Spinal Muscular Atrophy Genes, *SMN1* and *SMN2* Am J Hum Genet. 2006 January; 78(1): 63–77. Published online 2005 November 16.
44. Luca Cartegni, Shern L. Chew & Adrian R. Krainer Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing Nature Reviews Genetics 3, 285-298 (April 2002).
45. Briese M., Esmaeili B., Sattelle D.B. Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes? Bioessays 2005;27:946-957.
46. Coovert D.D., Le T.T., McAndrew P.E., Strasswimmer J., Crawford T.O., Mendell J.R., Coulson S.E., Androphy E.J., Prior T.W., Burghes A.H. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. Hum. Mol. Genet. 1997;6:1205-1214.
47. Yu Zhang, Giltae Song, Tomáš Vinař, Eric D. Green, Adam Siepel, and Webb Miller Evolutionary History Reconstruction for Mammalian Complex Gene Clusters J Comput Biol. 2009 August; 16(8): 1051–1070.
48. DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. Genome Res. 1997 Apr;7(4):339-52.
49. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitor protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Cell 80:167–1785.
50. N R Rodrigues, N Owen, K Talbot, S Patel, F Muntoni, J Ignatius, V Dubowitz, K E Davies Gene deletions in spinal muscular atrophy. J Med Genet. 1996.
51. Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, Bonaldo M, Ross BM, et al (1997) A multicopy transcription-repair gene, *BTF2p44*, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. Hum Mol Genet 6: 229–236
52. Extensive Evan Reid DNA deletion associated with severe disease alleles on spinal muscular atrophy homologues J Med Genet. 1997 December; 34(12): 1037.
53. Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet. 2000;24:66–70.
54. Hahnen E, Forkert R, Merke C, Rudnik-Schöneborn S, Schönling J, Zerres K, Wirth B. Molecular analysis of SMA candidate genes on

chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the *SMN* gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995;4:1927–33

55. Clermont O, Bürglen L, Burlet P, Lefebvre S, Viollet L, Hausmanowa-Petrusewicz I, Munnich A Melki J. Genetics analysis of unusual SMA pedigrees using *SMN*, *NAIP* genes and markers C212-C272. *Am J Hum Genet* 1995;57:A237.

56. Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, Stulp RP, De Jong JM, Vogels OJ, et al. Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS. *Neurology*. 2001;56:749–752.

57. Corcia P, Mayeux-Portas V, Khoris J, et al. Abnormal *SMN1* gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2002; 51: 243– 246.

58. Burlet P, L Bürglen, O Clermont, S Lefebvre, L Viollet, A Munnich, J Melki Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet*. 1996 April; 33(4): 281–283.

59. E. Hahnen, J. Schönling, S. Rudnik-Schöneborn, K. Zerres, B. Wirth Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet*. 1996 November; 59(5): 1057–1065.

60. Phenotypic variability in siblings with type III spinal muscular atrophyM Muqit, J Moss, C Sewry, R Lane *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 December; 75(12): 1762–1764. doi: 10.1136/jnnp.2003.018614.

61. R J Daniels, G K Suthers, K E Morrison, N H Thomas, M J Francis, C G Mathew, S Loughlin, A Heiberg, D Wood, V Dubowitz, et al. *J Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. J Med Genet*. 1992 March; 29(3): 165–170.

62. Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G, Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2001 Jul;9(7):484-91. Review.

63. Brzustowicz LM, Allitto BA, Matseoane D, Theve R, Michaud L, Chatkupt S, Sugarman E, Penchaszadeh GK, Suslak L, Koenigsberger MR, et al. Paternal isodisomy for chromosome 5 in a child with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 1994 Mar;54(3):482-8.

64. Brichta L, Garbes L, Jedrzejowska M, Grellscheid SN, Holker I, Zimmermann K, Wirth B (2008) Nonsense-mediated messenger RNA decay of survival motor neuron 1 causes spinal muscular atrophy. *Hum Genet* 123:141–153

65. Wirth B An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37.
66. Alías L, Bernal S, Fuentes-Prior P, Barceló MJ, Also E, Martínez-Hernández R, Rodríguez-Alvarez FJ, Martín Y, Aller E, Grau E, Peciña A, Antiñolo G, Galán E, Rosa AL, Fernández-Burriel M, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Baiget M, Tizzano EF. Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the *SMN1* gene. *Hum Genet.* 2009 Feb;125(1):29-39. doi: 10.1007/s00439-008-0598-1. Epub 2008 Dec 3.
67. Clermont O, Burlet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, Cusin V. Molecular analysis of SMA patients without homozygous *SMN1* deletions using a new strategy for identification of *SMN1* subtle mutations. *Hum Mutat.* 2004 Nov;24(5):417-27.
68. Kotani T, Sutomo R, Sasongko TH, Sadewa AH, Gunadi, Minato T, Fujii E, Endo S, Lee MJ, Ayaki H, Harada Y, Matsuo M, Nishio H. A novel mutation at the N-terminal of *SMN* Tudor domain inhibits its interaction with target proteins. *J Neurol.* 2007 May;254(5):624-30. Epub 2007 Apr 6.
69. Fraidakis MJ, Drunat S, Maissonobe T, Gerard B, Pradat PF, Meininger V, Salachas F. Genotype-phenotype relationship in 2 SMA III patients with novel mutations in the Tudor domain. *Neurology.* 2012 Feb 21;78(8):551-6.
70. Parsons DW, McAndrew PE, Allinson PS, Parker WD Jr, Burghes AH, Prior TW (1998a) Diagnosis of spinal muscular atrophy in an *SMN* non-deletion patient using a quantitative PCR screen and mutation analysis. *J Med Genet* 35:674–676
71. Parsons DW, McAndrews PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1998b) Intragenic tel*SMN* mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cen*SMN* copy number. *Am J Hum Genet* 63:1712–1723 Pearn J (1978)
72. Sun Y, Grimmmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B (2005) Molecular and functional analysis of intragenic *SMN1* mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat* 25:64–71
73. Cuscó I, López E, Soler-Botija C, Barceló MJ, Baiget M, Tizzano EF (2003) A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with c.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the *SMN1* gene. *Hum Mutat* 22:136–143
74. Cuscó I, Barceló MJ, del Rio E, Baiget M, Tizzano EF (2004) Detection of novel mutations in the *SMN* Tudor domain in type I SMA patients. *Neurology* 63:146–149.

75. Prior TW (2007) Spinal muscular atrophy diagnostics. *J Child Neurol* 22:952–956.
76. Zapletalová E, Hedvicáková P, Kozák L, Vondráček P, Gaillyová R, Maríková T, Kalina Z, Jüttnerová V, Fajkus J, Fajkusová L (2007) Analysis of point mutations in the *SMN1* gene in SMA patients bearing a single *SMN1* copy. *Neuromuscul Disord* 17:476–481.
77. Tsai CH, Jong YJ, Hu CJ, Chen CM, Shih MC, Chang CP, Chang JG (2001) Molecular analysis of *SMN*, *NAIP* and *p44* genes of SMA patients and their families. *J Neurol Sci* 190:35–40.
78. Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Bürglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M, Melki J (1995) A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 11:335–337.
79. Rochette CF, Surch LC, Ray PN, McAndrew PE, Prior TW, Burghes AHM, Vanasse M, Simard LR (1997) Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of *SMN* exon 7. *Neurogenetics* 1:141–147.
80. Rochette CF, Surch LC, Ray PN, McAndrew PE, Prior TW, Burghes AHM, Vanasse M, Simard LR (1997) Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of *SMN* exon 7. *Neurogenetics* 1:141–147.
81. Hahnen E, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S, Raschke H, Zerres K, Wirth B (1997) Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mol Genet* 6:821–825.
82. Martín Y, Valero A, del Castillo E, Pascual SI, Hernández-Chico C (2002) Genetic study of SMA patients without homozygous *SMN1* deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic *SMN1* mutations. *Hum Genet* 110:257–263.
83. Eggermann T, Eggermann K, Elbracht M, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S (2008) A new splice site mutation in the *SMN1* gene causes discrepant results in *SMN1* deletion screening approaches. *Neuromuscul Disord* 18:146–149.
84. Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neurone gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15:228–237
85. Bürglen L, Patel S, Dubowitz V, Melki J, Muntoni F (1996) A novel point mutation in the *SMN* gene in a patient with type III spinal muscular atrophy. In: First Congress of the World Muscle Society. Elsevier, Amsterdam, p. S39
85. Skordis LA, Dunckley MG, Burglen L, Campbell L, Talbot K, Patel S, Melki J, Davies KE, Dubowitz V, Muntoni F (2001) Characterisation of novel point

mutations in the survival motor neuron gene *SMN*, in three patients with SMA. *Hum Genet* 108:356–357

86. Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A, Neri G, Brahe C (2001) Premature termination mutations in exon 3 of the *SMN1* gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet* 9:113–120

87. Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE (1997) Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet* 6:497–500.

88. Hahnen ET, Wirth B. Frequent DNA variant in exon 2a of the survival motor neuron gene (*SMN*): a further possibility for distinguishing the two copies of the gene. *Hum Genet.* 1996 Jul;98(1):122-3.

89. Brahe C, Bertini E. Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med (Berl)*. 1996 Oct;74(10):555-62. Review.

90. Monani UR, McPherson JD, Burghes AH. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (*SMNC* and *SMNT*). *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jun 9;1445(3):330-6.

91. Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Krawczak M, Müller-Myhsok B, Schönling J, Zerres K. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*. 1997 Nov;61(5):1102-11.

92. T.W. Prior. Spinal muscular atrophy diagnostics *J Child Neurol*, 22 (2007), pp. 952–956

93. Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 1997 Aug;6(8):1205-14.

94. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum Mol Genet*. 1999 Jul;8(7):1177-83.

95. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. Correlation between severity and *SMN* protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, 16 (1997), pp. 265–269.

96. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. *SMN* oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet*. 1998 May;19(1):63-6.

97. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*. 1996 Jul 15;15(14):3555-65.
98. Battaglia G, Princivale A, Forti F, Lizier C, Zeviani M. Expression of the *SMN* gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet*. 1997 Oct;6(11):1961-71.
99. Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (*SMN*) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet*. 2000 Jan 1;9(1):47-56.
100. Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J Neurosci*. 2006.
101. Garcera A, Mincheva S, Gou-Fabregas M, Caraballo-Miralles V, Lladó J, Comella JX, Soler RM. A new model to study spinal muscular atrophy: neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-X(L) Overexpression in motoneurons. *Neurobiol Dis*. 2011 Jun;42(3):415-26. doi: 10.1016/j.nbd.2011.02.003.
102. Todd AG, Shaw DJ, Morse R, Stebbings H, Young PJ. *SMN* and the Gemin proteins form sub-complexes that localise to both stationary and dynamic neurite granules. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 26;394(1):211-6.
103. Todd AG, Morse R, Shaw DJ, McGinley S, Stebbings H, Young PJ. *SMN*, Gemin2 and Gemin3 associate with beta-actin mRNA in the cytoplasm of neuronal cells in vitro. *J Mol Biol*. 2010 Sep 3;401(5):681-9.
104. Ackermann B, Kröber S, Torres-Benito L, Borgmann A, Peters M, Barkooie SM, Tejero R, Jakubik M, Schreml J, Milbradt J, Wunderlich TF, Riessland M, Tabares L, Wirth B. Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Hum Mol Genet*. 2013 Jan 11.
105. Nölle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tönges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D, Jablonka S, O'mer J, Srivastav RK, Baasner A, Lingor P, Wirth B, Ponimaskin E, Niedenthal R, Grothe C, Claus P. The spinal muscular atrophy disease protein *SMN* is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 15;20(24):4865-78.
106. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein *SMN*. Profilins bind to and colocalize with *smn* in nuclear gems. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31;274(53):37908-14.

107. Setola, V., Terao, M., Locatelli, D., Bassanini, S., Garattini, E. & Battaglia, G. (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1959–64.
108. Gunadi, Sasongko TH, Yusoff S, Lee MJ, Nishioka E, Matsuo M, Nishio H. Hypomutability at the polyadenine tract in *SMN* intron 3 shows the invariability of the a-SMN protein structure. *Ann Hum Genet.* 2008 Mar;72(Pt 2):288-91.
109. Sharma, A., Lambrechts, A., Hao Le, T., Le, T. T., Sewry, C. A., Ampe, C., Burghes, A. H. & Morris, G. E. (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (*SMN*) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res*, 309, 185–97.
110. Bowerman M, Anderson CL, Beauvais A, Boyl PP, Witke W, Kothary R. *SMN*, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2009 Sep;42(1):66-74.
111. Stratigopoulos G, Lanzano P, Deng L, Guo J, Kaufmann P, Darras B, Finkel R, Tawil R, McDermott MP, Martens W, Devivo DC, Chung WK. Association of plastin 3 expression with disease severity in spinal muscular atrophy only in postpubertal females. *Arch Neurol.* 2010 Oct;67(10):1252-6. doi: 10.1001/archneurol.2010.239.
112. Hao le T, Wolman M, Granato M, Beattie CE. Survival motor neuron affects plastin 3 protein levels leading to motor defects. *J Neurosci.* 2012 Apr 11;32(15):5074-84.
113. Coiled Matera AG, Frey MR. bodies and gems: Janus or gemini? *Am J Hum Genet.* 1998 Aug;63(2):317-21. Review.
114. Ponicsan SL, Kugel JF, Goodrich JA. Genomic gems: SINE RNAs regulate mRNA production. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Apr;20(2):149-55. doi: 10.1016/j.gde.2010.01.004. Epub 2010 Feb 20. Review.
115. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for *SMN*, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell.* 1998 Nov 25;95(5):615-24.
116. Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M. The spinal muscular atrophy disease gene product, *SMN*: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol.* 1999 Nov 15;147(4):715-28.
117. Marquis J, Meyer K, Angehrn L, Kämpfer SS, Rothen-Rutishauser B, chümperli D. Spinal muscular atrophy: *SMN2* pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol Ther.* 2007 Aug;15(8):1479-86. Epub 2007 Jun 5.

118. Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B. Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced *SMN* level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet.* 2003 Dec;114(1):11-21. Epub 2003 Oct 1
119. Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M. *SMN* tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol.* 2001 Jan;8(1):27-31.
120. Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, *SMN*, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 22;9(19):2869-77. Erratum in: *Hum Mol Genet* 2001 Jan 1;10(1):88.
121. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length *SMN* expression to survival motor neuron 2 (*SMN2*). Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9618-23.
122. Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE. Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet.* 1997 Mar;6(3):497-500.
123. Hannus S, Bühler D, Romano M, Seraphin B, Fischer U. The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins *SMN* and SIP1. *Hum Mol Genet.* 2000 Mar 22;9(5):663-74.
124. Meister G, Bühler D, Laggenbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U. Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (*SMN*) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet.* 2000 Aug 12;9(13):1977-86.
125. Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, *SMN*, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 22;9(19):2869-77.
126. Gangwani L, Flavell RA, Davis RJ. ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (*SMN*) protein to Cajal bodies. *Mol Cell Biol.* 2005 Apr;25(7):2744-56.
127. Ahmad S, Wang Y, Shaik GM, Burghes AH, Gangwani L. The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2012 Jun 15;21(12):2745-58.

128. Feng W, Gubitz AK, Wan L, Battle DJ, Dostie J, Golembe TJ, Dreyfuss G. Gemins modulate the expression and activity of the *SMN* complex. *Hum Mol Genet*. 2005 Jun 15;14(12):1605-11.
129. Cauchi RJ. *SMN* and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein *SMN*. *Bioessays*. 2010 Dec;32(12):1077-89. Review.
130. Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G. Essential role for the *SMN* complex in the specificity of snRNP assembly. *Science*. 2002 Nov 29;298(5599):1775-9.
131. Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH Jr. Proc Natl Acad Sci U S A. Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (*SMN*) protein in mammalian neural cells and tissues. 1998 May 26;95(11):6492-7.
132. Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep*. 2007 Apr;8(4):340-5. Review.
133. Helmken C, Wetter A, Rudnik-Schöneborn S, Liehr T, Zerres K, Wirth B. An essential *SMN* interacting protein (SIP1) is not involved in the phenotypic variability of spinal muscular atrophy (SMA). *Eur J Hum Genet*. 2000 Jul;8(7):493-9.
134. Cobb MS, Rose FF, Rindt H, Glascock JJ, Shababi M, Miller MR, Osman EY, Yen PF, Garcia ML, Martin BR, Wetz MJ, Mazzasette C, Feng Z, Ko CP, Lorson CL. Development and characterization of an *SMN2*-based intermediate mouse model of Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet*. 2013 Feb 13.
135. Renvoisé B, Colasse S, Burlet P, Viollet L, Meier UT, Lefebvre S. The loss of the snoRNP chaperone Nopp140 from Cajal bodies of patient fibroblasts correlates with the severity of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2009 Apr 1;18(7):1181-9.
136. Arthur H. M. Burghes & Christine E. Beattie. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature Reviews Neuroscience* 10, 597-609 (August 2009)
137. Xu C, Chen X, Grzeschik SM, Ganta M, Wang CH. Hydroxyurea enhances *SMN2* gene expression through nitric oxide release. *eurogenetics*. 2011 Feb;12(1):19-24. doi: 10.1007/s10048-010-0268-z. Epub 2010 Dec 22.
138. Lorson MA, Lorson CL. *SMN*-inducing compounds for the treatment of spinal muscular atrophy. *Future Med Chem*. 2012 Oct;4(16):2067-84.
139. Rigo F, Hua Y, Krainer AR, Bennett CF. Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Cell Biol*. 2012 Oct 1;199(1):21-5

140. Sleigh JN, Grice SJ, Davies KE, Talbot K. Spinal muscular atrophy at the crossroads of basic science and therapy. *Neuromuscul Disord*. 2013 Jan;23(1):96.
141. Therapeutic strategies for the treatment of spinal muscular atrophy. Cherry JJ, Androphy EJ. *Future Med Chem*. 2012 Sep;4(13):1733-50.
142. Katsuno M, Tanaka F, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Watanabe H, Sobue G. Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Prog Neurobiol*. 2012 Dec;99(3):246-56.
143. Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH. Aclarubicin treatment restores *SMN* levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet*. 2001 Nov 15;10(24):2841-9.
144. Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C. Phenylbutyrate increases *SMN* expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2004 Jan;12(1):59-65.
145. Amara A, Adala L, Ben Charfeddine I, Mamaï O, Mili A, Lazreg TB, H'mida D, Amri F, Salem N, Boughammura L, Saad A, Gribaa M. Correlation of *SMN2*, *NAIP*, *p44*, *H4F5* and Occludin genes copy number with spinal muscular atrophy phenotype in Tunisian patients. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Mar;16(2):167-74. doi: 10.1016/j.ejpn.2011.07.007. Epub 2011 Aug 6.
146. Zheleznyakova GY, Kiselev AV, Vakharlovsky VG, Rask-Andersen M, Chavan R, Egorova AA, Schiöth HB, Baranov VS. Genetic and expression studies of *SMN2* gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III. *BMC Med Genet*. 2011 Jul 15;12:96.
147. Prior TW, Nagan N, Sugarman EA, Batish SD, Braastad C. Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genet Med*. 2011 Jul;13(7):686-94.
148. Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Kanavakis E. Rapid detection of fetal Mendelian disorders: thalassemia and sickle cell syndromes.. *Methods Mol Biol*. 2008;444:133-45.
149. Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet*. 2003 May;63(5):400-9.
150. Essawi ML, Al-Attribi GM, Gaber KR, El-Harouni AA. Molecular prenatal diagnosis of autosomal recessive childhood spinal muscular atrophies (SMAs). *Gene*. 2012 Nov 1;509(1):120-3

151. He J, Zhang QJ, Lin QF, Chen YF, Lin XZ, Lin MT, Murong SX, Wang N, Chen WJ. Molecular analysis of *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2*, and *H4F5* genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. *Gene*. 2013 Jan 23.

152. Guillot N, Cuisset JM, Cuvellier JC, Hurtevent JF, Joriot S, Vallee L. Unusual clinical features in infantile Spinal Muscular Atrophies. *Brain Dev*. 2008 Mar;30(3):169-78. Epub 2007 Sep 4.

153. Mazzei R, Gambardella A, Conforti FL, Magariello A, Patitucci A, Gabriele AL, Sprovieri T, Labate A, Valentino P, Bono F, Bonavita S, Zappia M, Muglia M, Quattrone A. Gene conversion events in adult-onset spinal muscular atrophy. *Acta Neurol Scand*. 2004 Feb;109(2):151-4.