



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ " ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ "

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΡΟΥΣΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΕΛΑΠΟΡΤΑ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

ΙΑΤΡΟΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ DIAMOND-
BLACKFAN ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SHWACHMAN-DIAMOND ΣΤΟΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ»**

ΑΘΗΝΑ 2016

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής :

30 Σεπτεμβρίου 2009

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής:

13 Ιανουαρίου 2010

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Αντώνης Καττάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας και Ογκολογίας Α΄ Παιδιατρική Κλινική Παν/μίου Αθηνών, Γ.Ν.Π. «Η Αγία Σοφία» (επιβλέπων)

Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου Καθηγήτρια Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Λυδία Κόσσυβα Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Β΄ Παιδιατρική Κλινική Παν/μίου Αθηνών, Γ.Ν.Π. « Π και Α Κυριακού»

Ημερομηνία Κατάθεσης Διατριβής: 13 Ιουλίου 2016

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Αντώνης Καττάμης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας και Ογκολογίας Α΄ Παιδιατρική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών, Γ.Ν.Π. «Η Αγία Σοφία» (επιβλέπων)

Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου, Καθηγήτρια Γενετικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Λυδία Κόσσυβα Επίκουρη, Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Β΄ Παιδιατρική Κλινική Εθνικού και Καποδιστριακού Παν/μίου Αθηνών, Γ.Ν.Π. « Π και Α Κυριακού»

Χριστίνα Κανακά –Geintenbein, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α΄ Παιδιατρική Κλινική Γ.Ν. "Παίδων Αγία Σοφία"

Πονς-Ροντριγκεθ, Μαρία-Ροζέ, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Νευρολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Α΄ Παιδιατρική Κλινική Γ.Ν. "Παίδων Αγία Σοφία"

Traeger – Συνοδινού Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής , ΕΚΠΑ

Κίτσιου – Τζέλη Σοφία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

Περιεχόμενα

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
SUMMARY	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
<u>ΑΝΑΙΜΙΑ DIAMOND BLACKFAN</u>	17
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ DBA	17
ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ DBA	21
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ DBA	27
ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ DBA	30
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ-ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ DBA	32
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ DBA	32
<u>ΣΥΝΔΡΟΜΟ SHWACHMAN DIAMOND</u>	37
ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ SDS	38
ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ SDS	45
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ SDS	50
ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ SDS	53
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ-ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ SDS	53
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ SDS	56
ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	59
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	60

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	62
ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΣΘΕΝΩΝ	62
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	63
<u>I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA</u>	64
<u>II. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ</u>	66
<u>(Polymerase Chain Reaction, PCR).</u>	
<u>III. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ECMA</u>	75
<u>(Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis)</u>	
<u>IV. ΑΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA</u>	79
<u>(αλληλούχηση, Sequencing)</u>	
<u>V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ</u>	
<u>(RFLPs)</u>	86
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ DBA	89
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ DBA	96
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ SDS	100
ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ SDS	101
ΣΥΝΘΕΤΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΜΕ SDS	104
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
DBA	113
SDS	117
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ ΕΞΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟΓΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΝΤΑΣ, ΕΚΧΛΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΪΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΛΩ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

Όρκος του Ιπποκράτη

"Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέλφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ότι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά"

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα σύνδρομα Κληρονομούμενης Μυελικής Ανεπάρκειας αποτελούν μια ετερογενή ομάδα σπάνιων γενετικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από μυελική ανεπάρκεια, συγγενείς ανωμαλίες και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών. Τα συχνότερα νοσήματα είναι η αναιμία Diamond Blackfan (DBA) (17%), η αναιμία Fanconi (FA) (15.1%), το σύνδρομο Shwachman Diamond SDS)(13.5%), το σύνδρομο Kostmann (6.2%) και η Συγγενής Δυσκεράτωση (3.9%). Καθώς η κλινική τους εικόνα αλληλοεπικαλύπτεται η διάγνωση συχνά στηρίζεται στον γονότυπο και είναι επιτακτική για την σωστή παρακολούθηση και θεραπεία τους, την καθοδήγηση για μεταμόσχευση, την επιλογή του κατάλληλου δότη μυελού, την έγκαιρη διάγνωση επιπλοκών και νεοπλασμάτων καθώς επίσης την γενετική συμβουλευτική και προγεννητική διάγνωση.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής που επικεντρώνεται στην μελέτη των DBA και SDS πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία. Το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής είναι το μοναδικό ερευνητικό κέντρο στην Ελλάδα όπου γίνεται η μοριακή διάγνωση των νοσημάτων αυτών και δέχεται περιστατικά από τα τμήματα των παιδιατρικών νοσοκομείων όλης της χώρας. Η μελέτη τόσο της αναιμίας Diamond Blackfan όσο και του συνδρόμου Shwachman Diamond απασχολεί παγκοσμίως την επιστημονική κοινότητα δεδομένης της μεγάλης ποικιλομορφίας τους, της άγνωστης παθοφυσιολογίας τους καθώς επίσης και των αυξανόμενο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με την αναιμία Diamond Blackfan. Από την έναρξη της εργασίας και μέχρι σήμερα που βρίσκεται στην τελική ευθεία η παρουσία και συμβολή καθηγητών, συναδέλφων και φίλων ήταν ιδιαίτερα καταλυτική και η ανάγκη για θερμές ευχαριστίες σε όλους ιδιαίτερα έντονη.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ομότιμο Καθηγητή Γενετικής κο Εμμανουήλ Καναβάκη και την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Καθηγέτρια Κα Σοφία Κίτσιου Τζέλη που με δέχθηκαν στο Εργαστήριο δίνοντας μου την ευκαιρία να συνεργασθώ με αξιόλογους συνεργάτες του Εργαστηρίου και να διεκπεραιώσω την διατριβή μου.

Είναι μεγάλη μου τιμή που ο Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας Αντώνης Καττάμης ήταν ο επιβλέπων της διατριβής μου. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την ενεργό υποστήριξη και συμμετοχή του καθώς και για την καθοδήγησή του τόσο στη συλλογή και στη διάγνωση των περιστατικών όσο και στο συγγραφικό μέρος της διατριβής. Νιώθω πολύ τυχερή που μου δόθηκε η ευκαιρία να δουλέψω μαζί του και να διδαχτώ από ένα άριστο ιατρό και άνθρωπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου για την εποικοδομητική κριτική της σε όλα τα στάδια της διατριβής καθώς και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Λυδία Κόσσυβα για την ενεργό συμμετοχή της στην επιλογή των περιστατικών και την καταγραφή των κλινικών στοιχείων.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η συμβολή της Επιστημονικής Επιτροπής του Νοσοκομείου Παίδων «Αγ. Σοφία» και συγκεκριμένα τον κο Σταύρο Ντουντουνάκη για την άμεση και έγκαιρη έγκριση του ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Ευχαριστίες οφείλω και στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Κα Joan Traeger-Συνοδινού και στις συναδέλφους της ομάδας Προεμφυτευτικής Γενετικής Διάγνωσης Δρ. Χριστίνα Βρεπού και Δρ Κάκουρου Γεωργία για την άριστη συνεργασία, τις πολύπλευρες παρατηρήσεις τους και τη πολύτιμη καθοδήγηση σε εξειδικευμένα περιστατικά.

Επίσης ευχαριστώ όλους τους γιατρούς των κλινικών από όλα τα παιδιατρικά νοσοκομεία της Ελλάδας για την παραπομπή ασθενών και την άρτια συνεργασία τους και την συμμετοχή τους στην ολοκλήρωση καταγραφής των ασθενών στον ελληνικό πληθυσμό και ιδιαιτέρως τους Επίκουρους Καθηγητές Παιδιατρικής, κα Μαρίνα Οικονόμου και κο Αλέξανδρο Μάκη, καθώς τη διευθύντρια της Παιδιατρικής Κλινικής του Παίδων Πεντέλης Κα Σταυρούλα Κωσταρίδου.

Θα ήθελα επίσης να επισημάνω την ιδιαίτερα σημαντική συμμετοχή στην διεκπεραίωση της εργασίας και να ευχαριστήσω για την άριστη

συνεργασία μας, τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής και ιδιαίτερα την Δρ Κυριακή Κέκκου και τη βιολόγο Δανάη Βέλτρα. Ευχαριστώ θερμά τους Σπύρο Ανδριώτη, Νίκο Βογιατζάκη, Σοφία Βρέττα Έφη Δανιήλ, Άγνη Κολιαλέξη, Ανθή Κοσμά, Κωνσταντίνα Κοσμά, Δέσποινα Μπέλου, Δήμητρα Παλαιοπάνου, Σταυρούλα Παπαδοπούλου, Δημήτρη Πετυχάκη Μυρτώ Πούλου, Μαρία Σβίγγου, Νικολέττα Σελέντη, Μαρία Τσίπη, Γεωργία Τούντα, Ειρήνη Φυλακτού και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην αγαπημένη μου μοριακή βιολόγο Δρ. Σοφοκλέους Χρισταλένα, τόσο για την ανεκτίμητη καθοδήγηση της όσο και για τις συμβουλές και κυρίως για την υπομονή της και τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε για την εκπαίδευση μου στις μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των νοσημάτων. Πάντα με ενθάρρυνε και με βοηθούσε έμπρακτα, αφιερώνοντας αναρίθμητες ώρες για την περαίωση των πειραμάτων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, και κυρίως τον σύζυγό μου Βασίλη και τον μικρό μας Γιωργάκη για την αμέριστη συμπαράστασή τους και την ατελείωτη υπομονή τους μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

ΘΕΜΑ:

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ DIAMOND-BLACKFAN ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ SHWACHMAN-DIAMOND ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ»

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο Δελαπόρτα Πολυξένη
Ημερομηνία γέννησης 28/02/1982
Τηλέφωνο 6972448842
Email polyxenidelaporta@yahoo.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

27/07/2007 Πτυχιούχος Ιατρικής του **Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**
Βαθμός Πτυχίου: Λίαν Καλώς (**8,16** / 10) «οχτώ και δέκα έξι»

13/01/2010 Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στην Α' Παιδιατρική κλινική του
έως Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα: «Μελέτη της γενετικής βάσης της αναιμίας
13/07/2016 Diamond-Blackfan και του συνδρόμου Shwachman-Diamond στον ελληνικό
πληθυσμό»

Επαγγελματική εμπειρία

7/05/2008 – 6/05/2009 Ιατρός υπόχρεη υπηρεσίας υπαίθρου

27/7/2014 έως σήμερα Ειδικευόμενη Παιδιατρικής στην Α' Παιδιατρική Κλινική του
Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία»

Ερευνητική εμπειρία: Συμμετοχή σε κλινικές μελέτες από το 2008-2013

Δημοσιεύσεις

Kanavaki A, Kattamis A, **Delaporta P**, Papassotiriou I, Spengos K. Evaluation of Intracranial Cerebral Blood Flow Velocities in Splenectomised and Non-Splenectomised Patients with β -Thalassemia Intermedia Using Transcranial Doppler Sonography. In Vivo. 2015 Jul-Aug;29(4):501-4.

Kattamis A, **Delaporta P**, Fylaktou I, Vrettou C, Kyriakopoulou D, Stamoulakatou A, Papassotiriou I, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. Hb Souli, a 6 bp in-frame deletion on the HBA2 gene (HBA2: c.[41-46delCCTGGG]) leads to α -thalassemia intermedia, when in trans to a single α -globin gene deletion. Hemoglobin. 2015;39(1):55-7.

Delaporta P, Sofocleous C, Stiakaki E, Polychronopoulou S, Economou M, Kossiva L, Kostaridou S, Kattamis A. Clinical phenotype and genetic analysis of RPS19,

RPL5, and RPL11 genes in Greek patients with Diamond Blackfan Anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec;61(12):2249-55.

Christos Kattamis, **Polyxeni Delaporta**, Maria Dracopoulou, George Paleologos , John Papassotiriou , George Chrousos, Antonios Kattamis Credibility of HbA1c in Diagnosis and Management of Disturbances of Glucose and Diabetes in Transfused Patients with Thalassemia. *Endo-Thal Rivista Italiana di Medicina dell'Adolescenza*-Volume 12,n.2,2014

Patsaoura A, Tatsi E, Margeli A, Kanavaki I, **Delaporta P**, Kyriakopoulou D, Kouraklis-Symeonidis A, Kattamis A, Papassotiriou I. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels are markedly increased in patients with non-transfusion-dependent thalassemia: Lack of association with markers of erythropoiesis, iron metabolism and renal function. *Clin Biochem*. 2014 Apr 8

Delaporta P, Kattamis A, Apostolakou F, Boiu S, Bartzeliotou A, Tsoukas E, Papassotiriou I. Correlation of NT-proBNP levels and cardiac iron concentration in patients with transfusion-dependent thalassemia major. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Jan;50(1):20-4.

Kattamis C, Lazaropoulou C, **Delaporta P**, Apostolakou F, Kattamis A, Papasotiriou I. Disturbances of Biomarkers of Iron and Oxidant-Antioxidant Homeostasis in Patients with beta-Thalassemia Intermedia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2011 Mar; 8 Suppl 2:256-62. Review

Papastamataki M, **Delaporta P**, Premetis E, Kattamis A, Ladis V, Papasotiriou I. Evaluation of liver fibrosis in patients with thalassemia: Important role of hyalouronic acid. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Oct 15;45(3):215-8

I. Papassotiriou, A. Margeli, E. Hantzi, **P.Delaporta**, A. Sergounioti, E. Goussetis, V. Ladis, A. Kattamis. Cystatin C levels in patients with β -thalassemia during deferasirox treatment. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Mar 15;44(3):152-5

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Π. Δελαπόρτα, Μ. Δρακοπούλου, Α. Καττάμης, Γ. Παλαιολόγος, Γ. Χρούσος, Ι. Παπασωτηρίου, Χ. Καττάμης Η αξιοπιστία της μέτρησης της HbA_{1c} στην παρακολούθηση του γλυκαιμικού ελέγχου ασθενών με μεταγγισιοεξαρτώμενη μεσογειακή αναιμία 24^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 14-16 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Theoni Petropoulou, Konstantinos Stokidis, Antonis Kattamis. Complex Findings In a Family With Shwachman Diamond Syndrome (SDS) First International Klaus Betke Symposium on Pediatric Hematology, Munich 1-2 March 2013

Polyxeni Delaporta, Konstantinos Stokidis, Joanne Traeger-Synodinos, Emmanuel Kanavakis, Antonis Kattamis. Clinical and Haematological Phenotype of the -101 C>T Substitution in Greek Beta-Thalassaemia Patients. 3RD PAN-European conference on Hemoglobinopathies and Rare Anemias Limmasol, Cyprus, 24-26 October 2012

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Steiakaki Eftichia, Sophia Polychronopoulou, Marina Economou, Lydia Kossiva, Stavroula Kostaridou, Antonis Kattamis. Molecular analysis of RPS19, RPL5 and RPL11 genes in Greek patient with Diamond Blackfan Anemia. 3RD PAN-European conference on Hemoglobinopathies and Rare Anemias Limmasol, Cyprus, 24-26 October 2012

Π. Δελαπόρτα, Φ. Αποστολάκου, Α. Μπαρτζελιώτου, Α. Καττάμης, Ι. Παπασωτηρίου. Συσχέτιση των επιπέδων του NT-proBNP με την συγκέντρωση του σιδήρου της καρδιάς σε ασθενείς με μεσογειακή αναιμία. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, 19-20 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Stavros Doudounakis, Georgia Tapaki, Marina Economou, Stavroula Kostaridou, Antonis Kattamis Molecular Analysis of SBDS Gene In Greek Patients Evaluated For Shwachman-Diamond Syndrome. Days of Molecular Medicine 2012 The Translational Science of Rare Diseases: From Rare to Care Vienna Austria October 8-10, 2012

G. Kakourou, J. Traeger-Synodinos, C. Vrettou, A. Destouni, S. Davies, G. Kokkali, M. Mastrominas, K. Pantos, A. Kattamis, **P. Delaporta**, C. Sofocleous, E. Kanavakis A generic, fast and flexible protocol for preimplantation HLA-typing alone or in combination with a monogenic disease. European Human Genetics Conference 2012 Nurnberg, Germany, June 23-26, 2012

Π. Δελαπόρτα, Χ. Σοφοκλέους, Σ. Ντουντουνάκης, Γ. Ταπάκη, Μ. Οικονόμου, Σ. Κωσταρίδου, Α. Καττάμης. Μοριακή Ανάλυση του SBDS Γονιδίου και Καταγραφή του Φαινοτύπου των Ασθενών με Σύνδρομο Shwachman-Diamond. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, 10-11 Φεβρουαρίου 2012, Θεσσαλονίκη

Π. Δελαπόρτα, Χ. Σοφοκλέους, Σ. Πολυχρονοπούλου, Μ. Καλμαντή, Ε. Στειακάκη, Μ. Οικονόμου, Λ. Κόσσυβα, Σ. Κωσταρίδου, Α. Καττάμης. Μοριακή Ανάλυση και Καταγραφή του Φαινοτύπου των Ασθενών με Αναιμία Diamond-Blackfan στον Ελληνικό Πληθυσμό. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, 10-11 Φεβρουαρίου 2012, Θεσσαλονίκη

Antonis Kattamis, Konstantinos Stokidis, **Polyxeni Delaporta**, Kyriakopoulou Dimitra, Theoni Petropoulou, Sorina Boiu, and Vassilis Ladis. Longitudinal Changes in Iron Overload Parameters and Iron Chelation Therapy in Young Patients with Thalassemia Major. 53nd ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, December 10-13, 2011

Antonios Kattamis, Filia Apostolakou, **Polyxeni Delaporta**, and Ioannis Papassotiriou Correlation of NT-ProBNP Levels and Cardiac Iron Concentration in Patients with Transfusion-Dependent Thalassemia Major 53nd ASH Annual Meeting and Exposition, 11 San Diego, CA, December 10-13, 2011

Π. Δελαπόρτα, Φ. Αποστολάκου, Α.Μπαρτζελιώτου, Γ. Παλαιολόγος, Σ. Βοΐυ, Κ. Στοκίδης, Α. Καττάμης, Ι. Παπασωτηρίου. Συσχέτιση των επιπέδων του NT-proBNP με την συγκέντρωση του σιδήρου της καρδιάς σε ασθενείς με μεσογειακή αναιμία. 22^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Maria Kalmanti, Sophia Polychronopoulou, Korina Athanassaki, Marina Economou, Lydia Kossiva, Stavroula Kostaridou, Antonis Kattamis. Molecular Analysis and phenotypic characteristics in Greek patients with Diamond Blackfan anemia ESPHI Biennial meeting “Advances in Pediatric Hematology and Immunology” 16-17 September, Barcelona, Spain, 2011

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Maria Kalmanti, Sophia Polychronopoulou, Georgia Tapaki, Korina Athanassaki, Marina Economou, Lydia Kossiva, Stavroula Kostaridou, Antonis Kattamis. Molecular analysis of RPS19 and RPL5 genes in Greek patient with Diamond Blackfan Anemia. 16th Congress of the European Hematology Association 9-12 June 2011, London United Kingdom

Polyxeni Delaporta, Christalena Sofocleous, Stavros Doudounakis, Georgia Tapaki, Marina Economou, Stavroula Kostaridou, Antonis Kattamis. Molecular analysis of SBDS gene in Greek patients evaluated for Shwachman Diamond Syndrome. 16th Congress of the European Hematology Association 9-12 June 2011, London United Kingdom

Π. Δελαπόρτα. Σύνδρομο Μυελικής Ανεπάρκειας-Συγγενής Ερυθροβλαστοπενία (Σύνδρομο Diamond Blackfan) Συνέδριο Πανελλήνιας Ένωσης Σπάνιων Παθήσεων (Π.Ε.Σ.ΠΑ.) «Σπάνιες Παθήσεις με Αιματολογικές Εκδηλώσεις – Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις» Αθήνα Δεκέμβριος 11-12, 2009

Α. Καττάμης, Σ. Πολυχρονοπούλου, Μ. Καλμαντή, **Π. Δελαπόρτα**, Σ. Χατζηνικολάου Φαινοτυπική και Γενετική Μελέτη της Αναιμίας Diamond-Blackfan στον Ελληνικό Πληθυσμό-Πρόδρομα Αποτελέσματα. 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Κρήτη, Νοέμβριος 4-7, 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τόσο η Αναιμία Diamond Blackfan (DBA) όσο και το σύνδρομο Shwachman Diamond (SDS) ανήκουν στα σύνδρομα κληρονομούμενης μυελικής ανεπάρκειας. Η DBA είναι μια σπάνια ριβωσωμοπάθεια που χαρακτηρίζεται από νορμόχρωμη μακροκυτταρική αναιμία, δικτυοερυθροπενία, απουσία ή υποπλασία των πρόδρομων μορφών της ερυθράς σειράς σε νορμοκυτταρικό μυελό των οστών και παρουσία συγγενών ανωμαλιών. Στο 60-70% των περιπτώσεων ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ριβωσωμικές πρωτείνες. Στο σύνδρομο Shwachman-Diamond (SDS) παρατηρείται κυρίως ουδετεροπενία και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης απλαστικής αναιμίας και κακοήθους εξαλλαγής. Επιπλέον εμφανίζονται διαταραχές από πολλαπλά όργανα, περιλαμβανομένων του παγκρέατος, του ήπατος, του σκελετικού και κεντρικού νευρικού συστήματος. Στους περισσότερους ασθενείς ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο Shwachman-Bodian-Diamond γονίδιο (*SBDS*). Το 75% των μεταλλάξεων είναι αποτέλεσμα της γονιδιακής μετατροπής που συμβαίνει μεταξύ του *SBDS* γονιδίου και του *SBDSP* ψευδογονιδίου του, στο χρωμόσωμα 7. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει ευρήματα από 18 και 11 αντίστοιχα ασθενείς που καταγράφονται στα ελληνικά μητρώα DBA και SDS.

Μέθοδοι: Αρχικά έγινε η κλινική αξιολόγηση των ασθενών και η συλλογή των δεδομένων και στη συνέχεια ακολούθησε μοριακή ανάλυση των *RPS19*, *RPL5* και *RPL11* γονιδίων για την DBA και του *SBDS* γονιδίου για το SDS. Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκαν η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), η τεχνική ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch analysis), τα περιοριστικά ένζυμα (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs) καθώς και η αλληλούχηση της πρωτοταγούς δομής του DNA (sequencing). Για να αποδείξουμε ότι οι μεταλλάξεις στο *SBDS* είναι στο ίδιο ή σε διαφορετικό αλληλόμορφο (*cis* / *trans*) σχεδιάστηκε πρωτόκολλο περιοριστικών ενζύμων με διπλή πέψη από τα *Acil* και *Bsu36I* ένζυμα. Η ανίχνευση των δυο συχνότερων μεταλλάξεων στο *SBDS* γονίδιο έγινε με την βοήθεια των *Bsu36I* και *Acil* ενζύμων που ανιχνεύουν τις c.183-184 TA> CT και 258 + 2T> C αντίστοιχα.

Αποτελέσματα:

DBA

Στο 72% των ασθενών με DBA παρατηρήθηκαν συγγενείς ανωμαλίες. Σε τρεις ασθενείς (17%) ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPS19*, σε τρεις ασθενείς (17%) στο γονίδιο *RPL5* και σε έναν ασθενή (6%) στο γονίδιο *RPL11*. Οι c.C390G (p.Y130X) και c.197_198insA (p.Y66X) μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο *RPL5* αναφέρονται για πρώτη φορά.

SDS

Μεγάλη κλινική ετερογένεια καταγράφηκε και στο δικό μας αρχείο και αποδόθηκε τόσο στο μωσαϊκισμό όσο και στο ποσοστό έκφρασης των αλληλομόρφων. Αξιοσημείωτο είναι ένας από τους ασθενείς μας που καταγράφηκε στο Αρχείο ο οποίος διεγνώστη κατά την γέννηση λόγω των σοβαρών αιματολογικών συμπτωμάτων του. Αυτή η ασθενής υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων πολύ νωρίς σε ηλικία 12 μηνών και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται μεταμόσχευση σε ασθενή με SDS τόσο νωρίς κατά την παιδική ηλικία. Σοβαρή ψωρίαση καταγράφηκε για πρώτη φορά σε έναν ασθενή μας με SDS. Μεταλλάξεις στο *SBDS* γονίδιο ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς. Η κυτταρογενετική ανάλυση αποκάλυψε κλωνικές ανωμαλίες σε δύο ασθενείς, η μία εκ των οποίων αναφέρεται για πρώτη φορά.

Συζήτηση: Η κλινική πορεία των ασθενών τόσο με DBA όσο και με SDS ήταν παρόμοια με προηγούμενες αναφορές. Η εμφάνιση καρκίνου θυρεοειδούς σε έναν ενήλικα ασθενή με DBA αναφέρεται για πρώτη φορά. Επίσης τα αποτελέσματα στο SDS υποστηρίζουν ότι οι τρόποι κληρονομικότητας στο SDS μπορεί να είναι περίπλοκοι, κυρίως λόγω φαινομένων γονιδιακής μετατροπής. Ο μωσαϊκισμός δεν φαίνεται να είναι σπάνιος στο SDS σύνδρομο και πρέπει να ελέγχεται, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις με ίδιο γονότυπο αλλά με μεγάλη κλινική ετερογένεια.

SUMMARY

Introduction: Diamond Blackfan Anemia (DBA) and Shwachman Diamond Syndrome (SDS) are inherited bone marrow failure syndromes. DBA is a rare ribosomopathy characterized by normochromic macrocytic anemia, reticulocytopenia and absence or insufficiency of erythroid precursors in normocellular bone marrow, frequently associated with somatic malformations. Mutations in ribosomal genes account for 60% to 70% of DBA cases. Shwachman-Diamond syndrome (SDS) is an inherited neutropenia syndrome associated with a significant risk of aplastic anemia and malignant transformation. Multiple additional organ systems, including the pancreas, liver, and skeletal and central nervous systems, are affected. Mutations in the Shwachman-Bodian-Diamond syndrome (*SBDS*) gene are present in most patients. Seventy five per cent of the causative mutations concern gene recombination events between *SBDS* gene and *SBDSP* pseudogene on chromosome 7. This study presents findings from 18 patients recorded in the Greek DBA registry and from eleven patients recorded in the Greek SDS registry.

Methods: Clinical evaluation of patients and data collection was performed followed by the molecular analysis of *RPS19*, *RPL5*, and *RPL11* genes for DBA and *SBDS* gene for SDS. Mutation detection included PCR amplification, ECMA analysis, RFLPs and direct sequencing. To elucidate cis/ trans configuration of mutations on the *SBDS* gene double digestion with both *Acil* and *Bsu36I* was performed. Restriction Fragment Length Polymorphism assays with *Bsu36I* and *Acil* allowed detection of the two most common mutations (c.183-184 TA>CT and 258+2T>C).

Results:

DBA

Congenital anomalies were observed in 72% of the DBA patients. Three patients (17%) were found to carry mutations on the *RPS19* gene, three patients (17%) on the *RPL5* gene and one patient (6%) on the *RPL11* gene (three patients). Mutations c.C390G (p.Y130X) and c.197_198insA (p.Y66X) detected in the *RPL5* gene were novel.

SDS

Extreme clinical heterogeneity was documented and was attributed to both mosaicism and allelic expression. The most severely affected patient in our registry was diagnosed at birth and it is the first ever reported patient that required bone marrow transplantation so early in life. Severe psoriasis, a feature not previously reported in SDS, was observed in one patient.

Mutations in SBDS gene were found in all patients. Cytogenetic analyses revealed two patients with, clonal abnormalities, one of which was novel.

Discussion: The clinical course both of DBA and SDS patients was similar to previous reports. The occurrence of thyroid carcinoma in an adult patient with DBA is the first to be reported in DBA. Also the results of our data support that SDS mode of inheritance can be very complex, mostly because of complicated gene conversions events. Mosaicism appears not to be rare in SDS and should be considered, especially in cases with clinical heterogeneity in the presence of similar genotypes.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Anaiμία Diamond-Blackfan

Η αναιμία Diamond Blackfan (DBA) (OMIM # 205900) είναι μια σπάνια κληρονομούμενη νόσος που εμφανίζεται συνήθως κατά την βρεφική ηλικία και χαρακτηρίζεται από σοβαρή νορμόχρωμη, μακροκυτταρική αναιμία και δικτυοερυθροπενία. Η πρώτη αναφορά έγινε το 1936 από τον Josephs ενώ το 1938 οι Diamond και Blackfan περιέγραψαν την νόσο ως ξεχωριστή κλινική οντότητα (Diamond and Blackfan 1938). Η νόσος είναι αποτέλεσμα κυτταρικής διαταραχής που συμβαίνει στις πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα την κυτταρική απόπτωση (Lipton et al., 1986; Tsai et al., 1989; Perdahl et al., 1994; Ohene-Abuakwa et al., 2005; Miyake et al., 2008). Ανήκει σε μια ομάδα σπάνιων νοσημάτων γνωστή ως Σύνδρομο Κληρονομούμενης Μυελικής Ανεπάρκειας (Inherited Bone Marrow Failure syndromes IBMFs) (Young and Alter et al. 1994), τα οποία χαρακτηρίζονται από μυελική ανεπάρκεια, συγγενείς ανωμαλίες (Gripp et al., 2001) και καρκινική προδιάθεση (Lipton et al., 2001).

Η επίπτωση υπολογίζεται περίπου σε 5-7 ανά 1.000.000 γεννήσεις ζώντων, με ίδιο ποσοστό εμφάνισης στα δύο φύλα. Οι περισσότερες περιπτώσεις είναι σποραδικές αν και η νόσος φαίνεται να κληρονομείται (10%) με αυτοσωμικό επικρατητικό χαρακτήρα με ατελή διεισδυτικότητα ή πιο σπάνια να σχετίζεται με γαμετικό μωσαϊκισμό σε έναν από τους δύο γονείς. (Cmejla et al., 2000)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ DBA

Από τον εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώνεται νορμόχρωμη μακροκυτταρική αναιμία με μειωμένα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ). Σε ποσοστό 85% οι ασθενείς εμφανίζουν αύξηση της εμβρυική αιμοσφαιρίνης HbF και της δραστηριότητας του ενζύμου αδενοσίνη της δεαμινάσης των ερυθροκυττάρων (eADA), ενός ενζύμου κριτικής σημασίας για το μεταβολικό μονοπάτι των πουρινών (purine salvage pathway). Οι τιμές της eADA δεν επηρεάζονται από

προηγούμενες μεταγγίσεις. Οι αιματολογικές επιπλοκές εμφανίζονται στο 90% των ασθενών κυρίως κατά το πρώτο έτος ζωής. Η μέση ηλικία πρώτης εμφάνισης τους είναι οι δύο μήνες ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης οι τρεις μήνες. Τυπικά παρατηρείται στο μυελό των οστών μείωση των πρόδρομων μορφών της ερυθράς σειράς (<5%) ενώ οι υπόλοιπες μυελικές σειρές εμφανίζονται μειωμένες μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις.

Στο 30-47% των περιπτώσεων οι ασθενείς εμφανίζουν συγγενείς διαμαρτίες (πίνακας 1) που περιλαμβάνουν συνηθέστερα το προσωπικό κρανίο (50%), τα άνω άκρα και τους αντίχειρες (38%), την καρδιά (15%) και το ουρογεννητικό σύστημα (19%) (Ball et al., 1996; Ramenghi et al., 1999; Willig et al., 1999b; Gripp et al., 2001; Vlachos et al., 2001b). Στο 25% των περιπτώσεων ανευρίσκονται περισσότερες από μια ανωμαλίες. Οι ασθενείς με DBA εμφανίζουν χαρακτηριστικό προσώπιο με καθίζηση της ρινικής γέφυρας, μικρή μύτη, λεπτό άνω χείλος και υπερτελορισμό, το λεγόμενο προσώπιο Cathie (Cathie 1950). Το 25% των ασθενών εμφανίζουν χαμηλό βάρος γέννησης και το 30% έχει κοντό ανάστημα (<3^η ΕΘ) μετά την γέννηση που μπορεί να οφείλεται τόσο στην ίδια την νόσο όσο στην αιμοσιδήρωση και στη χορήγηση κορτικοστεροειδών (Vlachos et al, 2008).

Η DBA σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακοηθειών. Σύμφωνα με την μελέτη των Βλάχου και συνεργατών το 2012 η πιθανότητα εμφάνισης συμπαγούς όγκου ή λευχαιμίας είναι 5.4 φορές υψηλότερη στους DBA ασθενείς συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (Vlachos et al, 2012). Αναφέρονται ευρήματα από το «DBA Registry» (1991-2010) της Βορείου Αμερικής που περιελάμβανε 608 ασθενείς από τους οποίους 24 εμφάνισαν περιστατικά κακοηθειών με υπεροχή των συμπαγών όγκων (συχνότερος παρατηρούμενος όγκος το αδενοκαρκίνωμα εντέρου) σε σχέση με τις αιματολογικές κακοήθειες (Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο-ΜΔΣ, Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία-ΟΜΛ). Από αυτούς οι 17 δεν είχαν λάβει μεταμόσχευση (15 συμπαγείς όγκοι και 2 ΜΔΣ) και η μέση ηλικία εμφάνισης ήταν τα 41 έτη. Στην ηλικία των 46 ετών η συνολική αθροιστική επίπτωση (εξαιρούνται τα ΜΔΣ) εμφάνισης καρκίνου ήταν 22%. Η πιθανότητα εμφάνισης συμπαγούς όγκου αυξάνεται ραγδαία μετά την ηλικία των 30 ετών ενώ της

ΟΜΛ αυξάνεται σταδιακά μετά την ηλικία των 40 ετών. Η εμφάνιση κακοηθειών είναι ανεξάρτητη της θεραπείας που λάμβαναν οι ασθενείς. Λόγω του μικρού δείγματος υπήρχε αδυναμία συσχέτισης φαινοτύπου-γονοτύπου. Ο κίνδυνος εμφάνισης κακοηθειών είναι μικρότερος συγκριτικά με την αναιμία Fanconi και τη Συγγενή Δυσκεράτωση. Η χημειοθεραπεία των ασθενών με DBA πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί τα φάρμακα αυτά προκαλούν μυелоκαταστολή σε ένα ήδη κατεσταλμένο μυελό. Η επιβίωση των ασθενών με κακοήθεια φαίνεται να είναι μικρότερη σε σχέση με τους ασθενείς με την ίδια κακοήθεια στο γενικό πληθυσμό (Lipton et al., 2006). Είναι απαραίτητος ο εργαστηριακός έλεγχος των ασθενών με γενική αίματος ανά 4-6 μήνες και μυελόγραμμα ανά έτος ή νωρίτερα επί αιματολογικών ενδείξεων. Σε περιπτώσεις αναφερόμενου άλγους αρθρώσεων ή οστών πρέπει να γίνεται διερεύνηση για αποκλεισμό κακοήθειας (Vlachos et al., 2008).

Ο φαινότυπος των ασθενών με DBA ποικίλει ακόμα και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας με κοινές μεταλλάξεις. Κάποιοι ασθενείς μπορεί να έχουν την κλασσική μορφή με αναιμία, ενώ άλλοι τη μη κλασσική μορφή. Στη μη κλασσική μορφή περιλαμβάνονται περιπτώσεις χωρίς αναιμία με μεμονωμένη μακροκυττάρωση ή αυξημένη HbF ή αυξημένη eADA, όπως επίσης συγγενείς ανωμαλίες χωρίς αναιμία. Η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων στη μη κλασσική μορφή της νόσου είναι συνήθως >12 μήνες.

Σε γυναίκες ασθενείς με DBA που κυοφορούν έχει παρατηρηθεί υψηλό ποσοστό επιπλοκών τόσο στις μητέρες όσο και στα πάσχοντα βρέφη. Συγκεκριμένα αναφέρονται ενδομήτρια καθυστέρηση (IUGR), προεκλαμψία, ενδομήτριος θάνατος εμβρύου και πρόωρος τοκετός (Faivre et al., 2006).

Πίνακας 1. Κλινικά Χαρακτηριστικά ασθενών με Αναιμία Diamond Blackfan

Ανωμαλίες Κρανίου	Λυκόστομα, Λαγώχειλο, Θολωτή υπερώα Μικρογναθία, Μικροκεφαλία, Καθίζηση ρινικής γέφυρας, Μακρογλωσσία , Χαμηλή πρόσφυση τριχωτού κεφαλής
Ανωμαλίες Οφθαλμών	Υπερτελορισμός, Επίκανθος, Βλεφαρόπτωση, Συγγενές Γλάυκωμα, Στραβισμός, Συγγενής Καταρράκτης
Ανωμαλίες Ωτων – Διαταραχές Ακοής	Μείωση ακοής, Χαμηλή πρόσφυση ώτων, Μικροωτία
Ανωμαλίες Αυχένα	Κοντός αυχένas, Πτερύγιο αυχένos, Sprengel (ανύψωση ωμοπλάτης), Ψηλαφητή εξόστωση ΑΜΣΣ, Klippel-Feil
Ανωμαλίες Άκρας Χειρός / Ποδός	Υποπλαστικός αντίχειρας, Τριφαλλαγγικός αντίχειρας, Κλινοδακτυλία , Συνδακτυλία, Ανωμαλίες καρπού, Επιπέδωση μυών θένaros, Δισχιδής κερκίδα, Υπεξάρθρωμα κερκίδας
Ανωμαλίες Νεφρών	Στένωση πυελοουρητηρικής συμβολής, Μονόνεφρος, Υποσπαδίας
Καρδιακές Ανωμαλίες	Μεσοκοιλιακή επικοινωνία, Μεσοκολπική επικοινωνία, Στένωση ισθμού αορτής, Σύνθετες καρδιακές ανωμαλίες
Ανάπτυξη	Καθυστέρηση / Ανεπάρκεια
Μαθησιακές δυσκολίες	Γραφοκινητική ανωριμότητα, Καθυστέρηση ομιλίας/ Διαταραχές λόγου, Μικτές εξελικτικές διαταραχές, Ψυχοκινητική καθυστέρηση
Άλλες	Υποπλασία αδαμαντίνης, Ανώμαλη πρόσφυση οδόντων, Μικροδοντία



Εικόνα 1. Τριφαλαγγικός αντίχειρας, υποπλασία Θέναρος, Προσωπείο Cathie, πτερύγιο αυχένα

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ DBA

Η DBA αποτελεί αναμφισβήτητα μια ριβοσωμοπάθεια. Το πρώτο γονίδιο που πρωτοπεριγράφηκε ότι σχετίζεται με την νόσο είναι το *RPS19* (Draptchinskaia et al., 1999) που κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη *RPS19* της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (40s). Από το 1999 μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ένας μεγάλος αριθμός νέων γονιδίων που σχετίζονται με την νόσο και που συνεχώς ανανεώνεται. Η λίστα αυτή περιλαμβάνει τόσο γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (*RPS24*, *RPS17*, *RPS7*, *RPS26*, *RPS10*, *RPS19*, *RPS27*, *RPS28*, *RPS29*) όσο και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της μεγάλης υπομονάδας (*RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPL15*, *RPL26*, *RPL31*, *RPL27*) (Cmejla et al., 2007; Cmejla et al., 2009; Choesmel et al., 2008; Doherty et al., 2010; Farrar et al., 2008; Gazda et al., 2006; Gazda et al., 2008; Gazda et al., 2012; Landowski et al., 2013; Wang et al., 2015; Mirabello et al., 2014). Όλες οι μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί και για τα 15 γονίδια ανιχνεύονται σε ετεροζυγωτία επιβεβαιώνοντας το πρότυπο κληρονομικότητας (αυτοσωμικό επικρατές) της νόσου.

Το συχνότερο σε εμφάνιση μεταλλάξεων, γονίδιο, αποτελεί το *RPS19* με ποσοστό 25%. Χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19q13.2 και περιλαμβάνει 6 εξώνια μεγέθους 11 kb, που κωδικοποιούν πρωτεΐνη μεγέθους 145

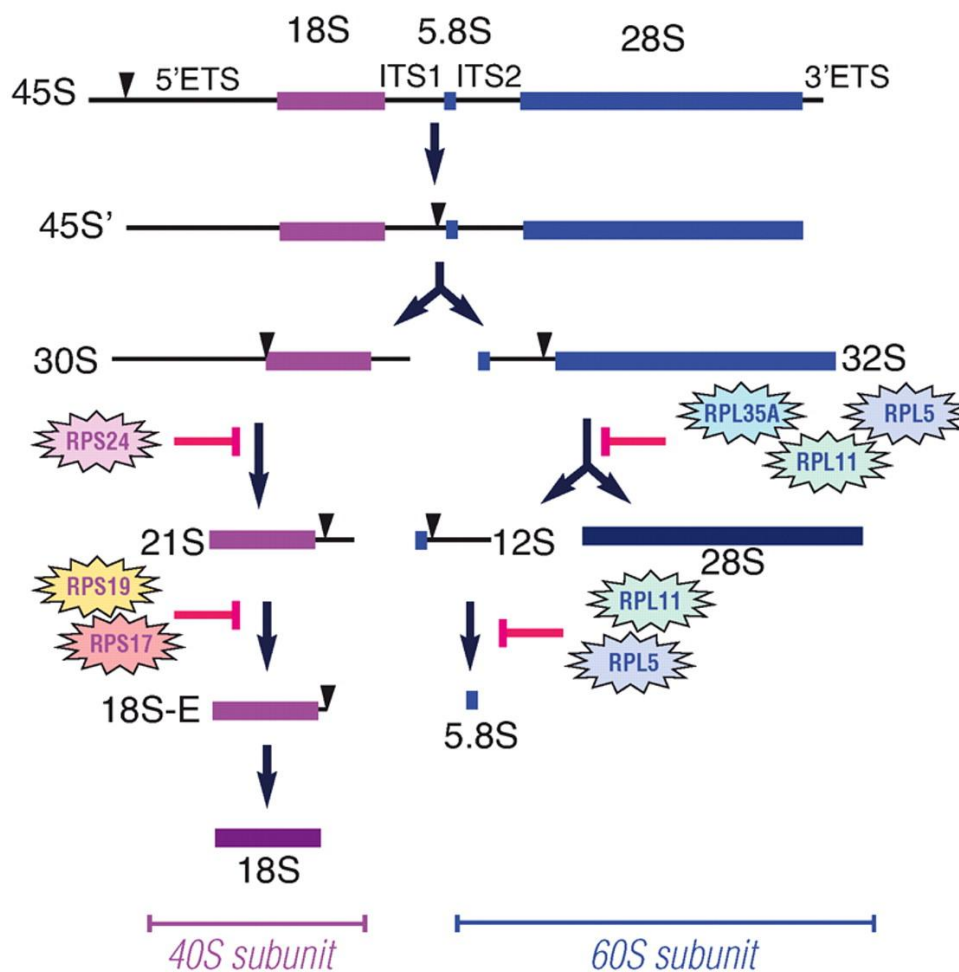
αμινοξέων Έχουν αναφερθεί συνολικά 119 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 219 ασθενείς εκ των οποίων οι 82 ήταν de novo και οι 45 οικογενείς, καθώς και 163 πολυμορφισμοί (Boria et al., 2010). Το δεύτερο σε συχνότητα εμφάνισης, μεταλλάξεων γονίδιο είναι το *RPL5*, όπου η συχνότητα του ποικίλει από 9% μέχρι 21.4%. Χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1p22.1, αποτελείται από 8 εξώνια μεγέθους 9.8 kb και κωδικοποιεί πρωτεΐνη μεγέθους 297 αμινοξέων. Συνολικά έχουν αναφερθεί 58 μεταλλάξεις και 95 πολυμορφισμοί (Cmejla et al., 2009; Gazda et al., 2008; Quarrelo et al., 2010; Boria et al., 2010). Το τρίτο σε συχνότητα εμφάνισης γονίδιο είναι το *RPL11* (1p36.1-p35) με ποσοστό 5%-9%, στο οποίο έχουν βρεθεί 26 μεταλλάξεις και 57 πολυμορφισμοί (Cmejla et al., 2009; Gazda et al., 2008; Quarrelo et al., 2010; Boria et al., 2010). Αποτελείται από 6 εξώνια μεγέθους 4.6kb που κωδικοποιούν πρωτεΐνη μεγέθους 178 αμινοξέων. Ακολουθούν το *RPS26* (12q13) με ποσοστό 6.4% και το *RPS10* (6p21.31) με ποσοστό 2.6% (Doherty et al., 2010). Το *RPL35A* (3q29-qter) γονίδιο έγινε γνωστό το 2008 (Farrar et al., 2008) και έχουν αναφερθεί μόνο 5 μεταλλάξεις. Για το *RPS24* (10q22-q23) γονίδιο έχουν βρεθεί συνολικά 6 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 12 ασθενείς (Gazda et al., 2006; Quarrelo et al., 2010; Boria et al., 2010), ενώ για το *RPS17* (15q), 3 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 3 ασθενείς (Cmejla et al., 2007; Gazda et al., 2008; Song et al., 2010). Για τα υπόλοιπα γονίδια υπάρχουν μία ή δύο αναφορές.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΥΠΟΜΟΝΑΔΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<i>RPS19</i>	40S	25	Draptchinskaia et al (1999)
<i>RPS24</i>	40S	2	Gazda et al (2006)
<i>RPS17</i>	40S	5	Cmejla et al (2007), Farrar et al (2011)
<i>RPL35A</i>	60S	2	Farrar et al (2008)
<i>RPL5</i>	60S	7	Gazda et al (2008)
<i>RPL11</i>	60S	6.5	Gazda et al (2008)
<i>RPS7</i>	40S	1	Doherty et al (2010)
<i>RPS10</i>	40S	2.5	Doherty et al (2010)
<i>RPS26</i>	40S	6.5	Gazda et al (2012)

Πίνακας 2. Γονίδια στα οποία ανιχνεύονται συχνότερα μεταλλάξεις στη DBA (Horos et al., 2012)

Και τα 15 γονίδια κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό και την ωρίμανση των ριβοσωμάτων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα ριβοσώματα συνιστώνται από 4 διαφορετικά ριβοσωμικά RNAs (18S, 28S, 5.8S, και 5S) και 79 ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Το 5S rRNAs μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση I ενώ τα 18S, 28S, 5.8S rRNAs προκύπτουν κατά την μεταγραφή και ωρίμανση του πρόδρομου 45S RNA από την RNA πολυμεράση III με την βοήθεια ενδο- και εξωνουκλεασών που απομακρύνουν τις ενδιάμεσες μεταγραφόμενες αλληλουχίες (internal and external transcribed sequences). Η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα στο πυρήνιο του κυττάρου. Τα τελικά προϊόντα που προκύπτουν είναι η ώριμη μικρή υπομονάδα 40S του ριβοσώματος που αποτελείται από το 18S rRNAs και 33 ριβοσωμικές πρωτεΐνες και η ώριμη μεγάλη υπομονάδα 60S του ριβοσώματος που αποτελείται από τα 28S, 5.8S και 5S rRNAs και 46 ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Η συναρμολόγηση της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας γίνεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες δεν αποτελούν μόνο δομικά συστατικά των ριβοσωμάτων, συμμετέχουν και στην διαδικασία ωρίμανσης των rRNAs καθώς και στη συναρμολόγηση των ριβοσωμάτων. Συγκεκριμένα μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPS19* σχετίζονται με διαταραχή της ωρίμανσης του 18S rRNA με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της 21S πρόδρομης μορφής rRNA. Η πρωτεΐνη RPL5 εμπλέκεται: 1) στην μεταφορά του 5S rRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα πριν τον σχηματισμό της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος 2) στην αναστολή του κατακερματισμού του παράγοντα p53 όταν συνδέεται με τις πρωτεΐνες RPL11 και RPL23 στο μόριο MDM2 και 3) στην αναστολή της παραγωγής των ώριμων 28S και 5.8S rRNAs και την αύξηση της συγκέντρωσης των 32S και 12S rRNAs παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *RPL5*. Τέλος η πρωτεΐνη RPL11 όπως και η πρωτεΐνη RPL5 συμμετέχει 1) στην μεταφορά του 5S rRNA 2) στην αναστολή της λειτουργίας του MDM2 μορίου και 3) στη συγκέντρωση-συσσώρευση των 28S και 5.8S πρόδρομων rRNAs (Boria et al., 2010).



Εικόνα 2. Απλοποιημένη απόδοση του συστήματος ωρίμανσης του rRNA σε ανθρώπινα κύτταρα.

Αναφέρονται μόνο τα κύρια μονοπάτια και τα σημεία διάσπασης (cleavage). Τα ονόματα των πρόδρομων μορφών rRNAs αναγράφονται δίπλα σε κάθε μορίο. Οι ώριμες μορφές rRNAs (18S, 5.8S, 28S), οι εξωτερικές (5' ETS, 3' ETS) και εσωτερικές (ITS 1, ITS2) μεταγραφόμενες αλληλουχίες αναγράφονται στην αρχική πρόδρομο μορφή (45S). Οι κυριότερες θέσεις διάσπασης υποδεικνύονται από τα μαύρα τρίγωνα. Η διαδικασία ωρίμανσης των πρόδρομων μορφών rRNAs φαίνεται να επηρεάζεται σε κύτταρα ασθενών με DBA από μεταλλάξεις σε γονίδια ριβοσωμικών πρωτεϊνών. (Dianzani et al., 2008)

Το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων μετά απο μελέτη της πρωτοταγούς δομής των γονιδίων αυτών αποκαλύπτει την αιτιολογική βάση μόνο στο 50-53% του συνόλου των ασθενών με DBA. Με την χρήση όμως μεθόδων που ανιχνεύουν ποσοτικές διαταραχές των γονιδίων έχουν παρατηρηθεί ελλείμματα ή διπλασιασμοί τόσο εξωνίων όσο και ολόκληρων γονιδίων αυξάνοντας το ποσοστό διάγνωσης στο 65%-71%. Στα γονίδια που

έχουν αναφερθεί τέτοιου είδους διαταραχές είναι το *RPS19*, *RPS17*, *RPS26*, *RPL35A*, *RPL5*, *RPL11*. (Boria et al., 2010; Kuramitsu et al., 2012; Farrar et al., 2011)

Η DBA θεωρείτο αποκλειστικά νόσος των ριβοσωμάτων, μέχρι τον Ιούλιο του 2012 όταν η νόσος συσχετίστηκε με μεταλλάξεις στο γονίδιο *GATA1* που κωδικοποιεί μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει στην διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα βρέθηκε μετάλλαξη αντικατάστασης στο εξώνιο 2 του *GATA1* γονιδίου (Χρ11.23), που οδηγεί σε διαταραχή της πρωτεΐνης, σε δύο αδέρφια που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για DBA. Από το 2012 μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί μερικοί ακόμα ασθενείς με μεταλλάξεις στο *GATA1*. (Sankaran et al., 2012; Parrella et al., 2014)

Η παθοφυσιολογία και οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί της αναιμίας παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι (εικόνα 3, 4). Επικρατέστερες είναι δύο θεωρίες:

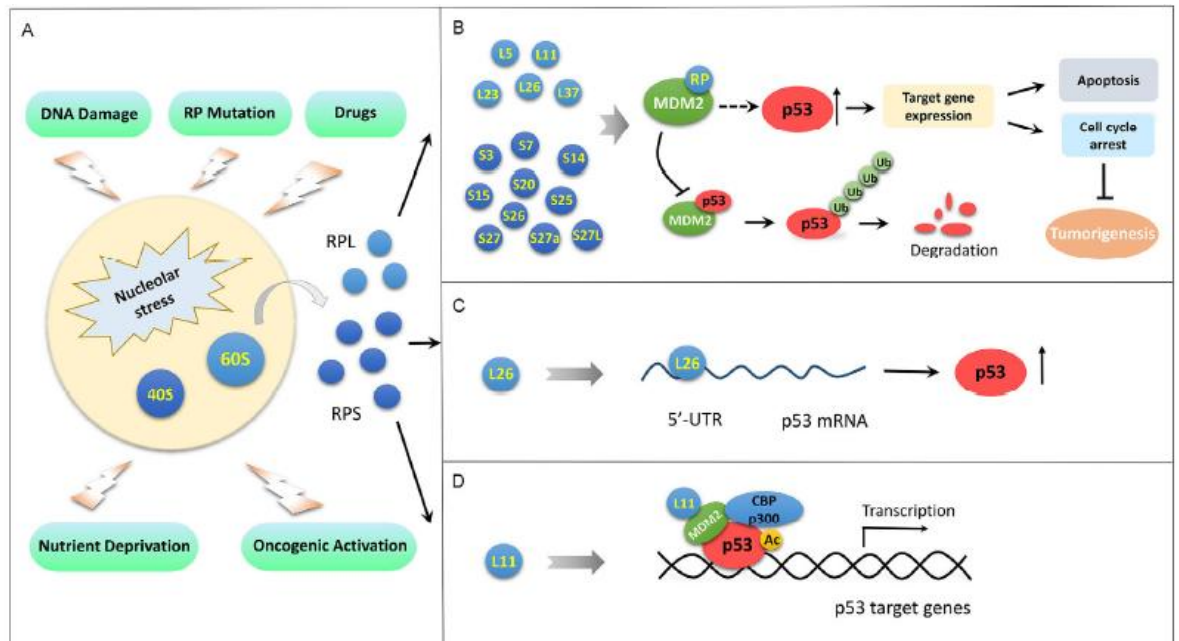
α) «Ενεργοποίηση του παράγοντα p53» ή «Ριβοσωμικό stress» Η απλοανεπάρκεια (haploinsufficiency) των ριβοσωμικών πρωτεϊνών οδηγεί σε διαταραχή της στοιχειομετρίας των ριβοσωμάτων με αποτέλεσμα περίσσεια ελεύθερων ριβοσωμικών πρωτεϊνών L5, L11, L23, L26, S7, S14, που συνδέονται με το μόριο HMD2 και σχηματίζουν σύμπλοκο. Η δημιουργία συμπλόκου αναστέλλει την δράση του HMD2 (διάσπαση p53) με αποτέλεσμα αύξηση του παράγοντα p53, κυτταρική αναστολή και απόπτωση των κυττάρων (Lipton and Ellis, 2009) και

β) «Περίσσεια Ελεύθερης Αίμης Ενδοκυττάρια»

Τα ερυθροκύτταρα των DBA ασθενών εκφράζουν εναλλακτικές ισομορφές ματίσματος του *FLVCR1* γονιδίου που οδηγούν σε μειωμένη έκφραση και λειτουργικότητα της FLVCR πρωτεΐνης. Η FLVCR πρωτεΐνη αποτελεί ένα κυταρροπλασματικό δίαυλο για την εξωκυττάρια μεταφορά της αίμης. Η μειωμένη έκφραση της FLVCR πρωτεΐνης οδηγεί σε υπερσυσσώρευση αίμης, που είναι τοξική για το κύτταρο, και κατά συνέπεια καταλήγει σε ανεπάρκεια στην αιμοποίηση.

Οι δύο θεωρίες είναι συμπληρωματικές αφού η διαταραχή της στοιχειομετρίας των ριβοσωμάτων οδηγεί σε ανεπάρκεια παραγωγής πρωτεϊνών και κατά συνέπεια σφαιρινών με τελικό αποτέλεσμα την υπερσυσσώρευση αίμης. Η στοχευμένη απλασία της ερυθράς σειράς, παρόλο που η ριβοσωμική διαταραχή είναι καθολική και θα έπρεπε να επηρεάζει οποιοδήποτε διαιρούμενο κύτταρο, πιθανόν να οφείλεται στην υπερευαισθησία των ερυθροβλαστών στα αυξημένα επίπεδα του p53 ή στις αυξημένες ανάγκες για πρωτεινοσύνθεση, λόγω σύνθεσης μεγάλης ποσότητας αιμοσφαιρίνης, κατά την ταχύτατη διαίρεση των ερυθροβλαστών. (Horos et al., 2012)

Αναφορικά με την αιτιολογική συσχέτιση της κακοήθειας και της ριβοσωμικής δυσλειτουργίας μελέτες δείχνουν ότι οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες, εκτός από την κύρια λειτουργία τους που είναι η πρωτεινική μετάφραση, συμμετέχουν με επιπλέον ριβοσωμικές λειτουργίες στην ανακατασκευή του DNA, στην απόπτωση και την κυταρρική ομοιοστασία. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες υπερεκφράζονται σε όγκους όπως προστάτη, ήπατος και εντέρου. Η υπερέκφραση τους μπορεί να οδηγεί σε ογκογένεση μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα p53 (εικόνας 3) ή και μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με διάφορα ογκογονίδια και μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι c-Myc, E2F, ATF4, NF-κB, NPM, SP1 (Shenoy et al., 2012,; Xu et al., 2016)



Εικόνα 3. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες (RPs) ρυθμίζουν την ογκογένεση μέσω του παράγοντα p53.

Σε φυσιολογικό κύτταρο, η MDM2 διασπά τον p53 στο πυρηνόπλασμα μέσω της δράσης της ως λιγκάση. Το πυρηνικό στρες που προκαλείται από βλάβες στο DNA, μεταλλάξεις σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες, φαρμακευτικούς παράγοντες και ενεργοποίηση των ογκογονιδίων οδηγεί σε διαταραχή της ομοιοστασίας των ριβοσωμάτων και σε απελευθέρωση RPs από την μικρή και την μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος από το πυρηνίσκο προς το κυτταρόπλασμα. Οι ελεύθερες RPs ενεργοποιούν το p53 παράγοντα μέσω τριών μηχανισμών: 1. συνδέονται με την MDM2 αναστέλοντας την δράση της με αποτέλεσμα τη μη διάσπαση και την συσσώρευση του παράγοντα p53 (b) 2. Η RPL26 συνδέεται με την 5' αμετάφραστη (5'-UTR) περιοχή του p53 mRNA και διεγείρει τη διαδικασία της μετάφρασης (c) 3. Η RPL11 οδηγεί σε σε ακετυλίωση και ενεργοποίηση του παράγοντα p53 μέσω στρατολόγησης μεταγραφικών συνεργιστικών (co-activators) (p300/CBP) παραγόντων (d) (Xu et al., 2016).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ DBA

Η διάγνωση της κλασική μορφής απαιτεί την παρουσία και των τεσσάρων κριτηρίων δηλαδή εμφάνιση μακροκυτταρικής αναιμίας χωρίς παρουσία άλλων σημαντικών κυτταροπενιών σε ηλικία μικρότερη του ενός έτους, με χαμηλά ΔΕΚ και ορθοκυτταρικό μυελό με μείωση των πρόδρομων μορφών της ερυθράς σειράς. Στις μη κλασσικές μορφές της νόσου η πιθανή διάγνωση τίθεται με την βοήθεια των δευτερευόντων κριτηρίων. Συγκεκριμένα

απαιτούνται ή 3 διαγνωστικά κριτήρια και θετικό οικογενειακό ιστορικό ή 2 διαγνωστικά κριτήρια και 3 ελάσσονα ή θετικό οικογενειακό ιστορικό και 3 ελάσσονα κριτήρια. (Vlachos et al., 2008).

Αν και στα διαγνωστικά κριτήρια αναφέρεται ότι οι λοιπές κυτταροπενίες δεν παρατηρούνται, η παρουσία θρομβοπενίας ή λευκοπενίας (Giri et al., 2000) δεν αποτελεί κριτήριο αποκλεισμού καθώς μπορεί να αφορά μη κλασσικές μορφές της νόσου. Η διάγνωση των μη κλασσικών μορφών της νόσου είναι απαραίτητη τόσο κατά τον προγεννητικό έλεγχο και την αναζήτηση δότη για μεταμόσχευση όσο και για την σωστή παρακολούθηση και πρόληψη των ασυμπτωματικών ασθενών για πιθανή εμφάνιση επιπλοκών (π.χ. κακοήθειες). Οι αυξημένες τιμές eADA, HbF και MCV δεν μπορούν να αποτελέσουν ανεξάρτητα ισχυρά κριτήρια, ωστόσο μπορούν να ληφθούν σοβαρά υπόψιν για την διάγνωση των μη κλασσικών μορφών της νόσου και κυρίως κατά την διάρκεια αναζήτησης δότη μυελού των οστών. Όταν από τα διαγνωστικά κριτήρια απουσιάζει η μείωση των πρόδρομων μορφών του μυελού τότε δεν μπορεί να τεθεί η διάγνωση. Κρίνεται όμως απαραίτητη η επανάληψη του μυελογράμματος μετά από μερικούς μήνες καθώς η μυελική απλασία μπορεί να εμφανιστεί μεταγενέστερα της αναιμίας και της δικτυερυθροπενίας.

Είναι απαραίτητος ο έλεγχος της οικογένειας ενός ασθενούς με λεπτομερές ιστορικό (αναιμία, κακοήθεια, επιπλοκές κύησης), γενική αίματος, μέτρηση eADA και επιπέδων εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Όταν έχει ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη θα πρέπει να γίνεται γονιδιακός έλεγχος και των μελών της οικογένειας.

Πίνακας 3. Διαγνωστικά και Δευτερεύοντα κριτήρια διάγνωσης DBA

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

- 1) Ηλικία <1 έτους
- 2) Μακροκυτταρική αναιμία χωρίς παρουσία άλλων σημαντικών κυτταροπενιών
- 3) Χαμηλά ΔΕΚ
- 4) Ορθοκυτταρικό μυελό με μείωση των πρόδρομων μορφών της ερυθράς σειράς

ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

ΜΕΙΖΟΝΑ

- } Μετάλλαξη γονίδιο
- } Θετικό οικογενειακό ιστορικό

ΕΛΑΣΣΟΝΑ

- } ↑ eADA
- } Συγγενείς ανωμαλίες
- } ↑ HbF
- } Αποκλεισμό άλλων κληρονομούμενων ανεπαρκειών του μυελού των οστών

Διάγνωση Κλασικής μορφής DBA: Παρουσία όλων των διαγνωστικών κριτηρίων

‘Πιθανή Διάγνωση’ : 3 διαγνωστικά κριτήρια + θετικό οικογενειακό ιστορικό

2 διαγνωστικά κριτήρια + 3 ελάσσονα

θετικό οικογενειακό ιστορικό + 3 ελάσσονα

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ DBA

Είναι σαφές ότι για να τεθεί η διάγνωση σε ένα ασθενή θα πρέπει να ληφθούν γενική αίματος με ΔΕΚ, eADA, HbF, μυελόγραμμα, γονιδιακός έλεγχος για σημειακές μεταλλάξεις ή/και ελλείματα και διπλασιασμούς εξωνίων αλλά και να έχουν αποκλειστεί νοσήματα με παρόμοια κλινική εικόνα όπως:

1) Παροδική ερυθροβλαστοπενία της παιδικής ηλικίας. Αμιγώς διαταραχή της ερυθράς σειράς η οποία όμως διαφέρει από την DBA γιατί είναι επίκτητη, εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (>12 μηνών), με φυσιολογικό MCV και φυσιολογική εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF, χωρίς παρουσία συγγενών ανωμαλιών. Μόνο το 10% των παιδιών έχουν αυξημένη eADA σε αντίθεση με την DBA όπου το ποσοστό ανέρχεται στο 85%. Η νόσος αυτοιάται μέσα σε μερικούς μήνες και σε λίγες μόνο περιπτώσεις απαιτούνται μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων.

2) Νοσήματα που προκαλούν μυελική ανεπάρκεια

α) Αναιμία Fanconi. Χαρακτηρίζεται από συγγενείς ανωμαλίες, μυελική ανεπάρκεια και αυξημένο κίνδυνο κακοηθειών. Οι συγγενείς ανωμαλίες εμφανίζονται στο 60-75% των ασθενών, και περιλαμβάνουν κοντό ανάστημα, ανωμαλίες αντίχειρα, πήχyu, οφθαλμών, σκελετού, ωτών, γαστρεντερικού, ουροποιητικού, ΚΝΣ, απώλεια ακοής, υπογοναδισμό και ψυχοκινητική καθυστέρηση. Οι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως πανκυττοπενία στην πρώτη δεκαετία της ζωής του, με αρχική εκδήλωση θρομβοκυττοπενία ή λευκοπενία. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εκδηλώσουν και μακροκυτταρική αναιμία. Στην ηλικία των 40-48 ετών η επίπτωση των αιματολογικών κακοηθειών είναι 10-33%, ενώ των μη αιματολογικών κακοηθειών 28-29%. Η διάγνωση της νόσου γίνεται με το θετικό τεστ χρωμοσωμικής ευθραστότητας καθώς επίσης και με το γονιδιακό έλεγχο των γονιδίων FANCA.

β) Σύνδρομο Shwachman Diamond. Κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Χαρακτηρίζεται από παγκρεατική ανεπάρκεια με δυσασπορρόφηση, αιματολογικές επιπλοκές με κυτταροπενίες (κυρίως ουδετεροπενία), κοντό ανάστημα, σκελετικές ανωμαλίες και προδιάθεση για

ΜΔΣ/ΟΜΛ. Το κοντό ανάστημα και οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις παρατηρούνται συχνά. Η κλινική διάγνωση στηρίζεται στην δυσασπορρόφηση και στις αιματολογικές επιπλοκές ενώ η μοριακή διάγνωση περιλαμβάνει ανίχνευση μεταλλάξεων στο *SBDS* γονίδιο. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εκδηλωθεί και με μακροκυτταρική αναιμία

γ) Σύνδρομο Pearson. Χαρακτηρίζεται από σιδηροβλαστική αναιμία της παιδικής ηλικίας, πανκυτταροπενία, παγκρεατική ανεπάρκεια, ανωμαλίες νεφρικών σωληναρίων και νευρολογικές διαταραχές. Η ηπατική ανεπάρκεια και η μεταβολική οξέωση είναι οι κύριες αιτίες θανάτου στα έμβρυα. Προκαλείται από *de novo* ελλείψεις ή/και διπλασιασμούς στο μιτοχονδριακό DNA (Morel et al., 2009)

δ) Συγγενής Δυσκεράτωση: Χαρακτηρίζεται από την διαγνωστική τριάδα υπέρχρωση δέρματος, ονυχοδυστροφία, και λευκοπλακία. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων γίνεται στην εφηβεία όπου τότε τίθεται και η διάγνωση (περίπου σε ηλικία 15 ετών). Από τις αιματολογικές επιπλοκές η συχνότερη είναι η θρομβοκυτταροπενία και στη συνέχεια εκδηλώνεται αναιμία που ακολουθείται από πανκυτταροπενία. Απλαστική αναιμία εμφανίζεται στο 50% κυρίως στη δεύτερη δεκαετία της ζωής. Η μυελική ανεπάρκεια εμφανίζεται στο 94% των ασθενών σε ηλικία 40 ετών. Κακοήθεια αναπτύσσεται στο 10% των περιπτώσεων στην 3^η και 4^η δεκαετία ζωής. Η θεραπεία περιλαμβάνει χορήγηση ανδρογόνων και πιθανή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (Alter and Young 1998; Alter 2007). Η συγγενής δυσκεράτωση κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο, αυτοσωμικό επικρατές ή φυλοσύνδετο τρόπο.

ε) «Cartilage hair hypoplasia». Χαρακτηρίζεται από μικρού μήκους οστών κατά τη γέννηση, λεπτά αραιά ξανθά μαλλιά, αναιμία, μακροκυττάρωση με ή χωρίς αναιμία και διαταραχή των Τ - κυττάρων σε σοβαρή ανοσοανεπάρκεια. Η επίπτωση είναι υψηλότερη στους Amish και τους Φινλανδικούς πληθυσμούς. Η θεραπεία περιλαμβάνει μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και θεραπεία με στεροειδή (Alter & Young 1998; Hermanns et al., 2005). Οφείλεται σε μετάλλαξεις του *RMRP* γονιδίου και κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο .

3) Επίκτητες διαταραχές που προκαλούν μυελική ανεπάρκεια αποτελούν η λοίμωξη από πάρβοιο B19 (θα πρέπει να γίνεται έλεγχος με PCR για παρβοϊό B19 στο μυελό των ασθενών με απλασία ερυθράς σειράς) ή HIV, οι ιογενείς ηπατίτιδες η χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων (αντιεπιληπτικά, αζαθειοπρίμη, χλωραμφενικόλη, σουλφοναμίδες, ισονιαζίδη, προκαιναμίδη), το θύμωμα σε ενήλικες ασθενείς καθώς σπάνια συμβαίνει στα παιδιά, η μυασθένεια Gravis, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και πολλαπλές ενδοκρινοπάθειες.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ-ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΗ DBA

Μελέτες συσχέτισης φαινοτύπου-γονοτύπου ήταν εφικτές για τα γονίδια *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A* και *RPS26*. Ο κίνδυνος εμφάνισης συγγενών ανωμαλιών στους ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια *RPL5* και *RPL11* είναι μεγαλύτερη κατά 7.6- και 2.7- φορές αντίστοιχα σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια. Συγκεκριμένα αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπερωισχιστίας και ανεπαρκής πρόσληψη βάρους (μικρά για την ηλικία κύησης βρέφη - SGA) παρατηρούνται σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPL5*. Ανωμαλίες άκρων εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *RPL11*. Το *RPL35A* έχει συσχετιστεί με ουρογεννητικές ανωμαλίες ενώ το *RPS26* με μειωμένη ανταπόκριση στα στεροειδή. Δεν έχει αναφερθεί καμία συσχέτιση με το *RPS19* γονίδιο. Σύμφωνα με τα ευρήματα αυτά συνιστάται έναρξη του γονιδιακού ελέγχου κατευθυνόμενη από τα κλινικά συμπτώματα του ασθενών. (Boria et al., 2010)

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ DBA

Κορτικοστεροειδή

Πρώτη γραμμή στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών παραμένουν τα κορτικοστεροειδή. Αν και το 80% από το σύνολο των ασθενών που λαμβάνουν κορτιζόνη ανταποκρίνονται στην αρχική δόση

λιγότερο από το 50% είναι δυνατόν να παραμείνουν σε ασφαλή δόση συντήρησης. Συστήνεται έναρξη της αγωγής μετά την ηλικία των 6 μηνών και κυρίως μετά τους 12 μήνες για περιορισμό των επιπλοκών (καθυστέρηση ανάπτυξης, ψυχοκινητικές διαταραχές) και για να έχει ολοκληρωθεί ο εμβολιασμός με ζώντες οργανισμούς. Η έναρξη αγωγής με στεροειδή γίνεται μετά την μετάγγιση με ΣΕΑ όταν η Hb είναι 8-9g/dl. Χορηγούνται πρεδνιζολόνη ή μεθυλπρεδνιζολόνη με 2mg/kg/ημέρα σε μία δόση το πρωί. Η δόση αυτή μπορεί να χορηγηθεί μέχρι 4 εβδομάδες. Επί μη ανταπόκρισης διακόπτεται η χορήγηση και γίνεται επανέναρξη των μεταγγίσεων. Επί ανταπόκρισης στις 4 εβδομάδες, αρχίζει η μείωση της δόσης με 1mg/kg/ημέρα για 8-12 εβδομάδες και στη συνέχεια προσεκτική σταδιακή ελάττωση των κορτικοστεροειδών με στόχο διατήρησης της αιμοσφαιρίνης σε τιμές 8-10g/dl. Η μέγιστη επιτρεπτή δόση συντήρησης είναι ≤ 1 mg/kg μέρα παρά μέρα ή ≤ 0.5 mg/kg καθημερινά.

Σε περιπτώσεις λοίμωξης ή στην εφηβεία που μειώνεται η ευαισθησία στα κορτικοστεροειδή, σποραδικές μεταγγίσεις δεν αντενδείκνυται. Οι DBA ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά για πιθανές επιπλοκές όπως, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, καθυστέρηση της ανάπτυξης, κατάγματα, καταρράκτης, άσηπτη νέκρωση κεφαλής μηριαίου, λοιμώξεις, οστεοπόρωση και καταστολή επινεφριδίων.

Δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης της κορτιζόνης. Πιθανόν οφείλεται στη μη ειδική αντι-αποπτωτική δράση της στις πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων (Jaako et al., 2009) που πιθανολογείται και ως η αιτία της αναιμίας (Perdahl et al., 1994). Από μελέτες φαίνεται ότι η δεξαμεθαζόνη ενισχύει την λειτουργία γονιδίων που εκφράζονται στις πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων ενώ αναστέλει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση αυτών των μορφών (Ebert et al., 2005). Επίσης η δεξαμεθαζόνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου *RPS19* υποδεικνύοντας ότι οι επιδράσεις των κορτικοστεροειδών στην ερυθροποίηση είναι ανεξάρτητες της ριβοσωμικής δυσλειτουργίας.

Μεταγγίσεις

Οι ασθενείς που δεν καταφέρνουν να παραμείνουν σε δόση συντήρησης λαμβάνουν συστηματικά μεταγγίσεις με ταυτόχρονη αποσιδήρωση για αποφυγή δευτεροπαθούς αιμοχρωμάτωσης. Στόχος είναι η διατήρηση της αιμοσφαιρίνης στα 8 g/dl, επίπεδα ικανοποιητικά για την επαρκή ανάπτυξη ενός παιδιού. Αποτελέσματα από μελέτες (Roggero et al, 2009) αποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με αναιμία Diamond-Blackfan συγκριτικά με άλλους ασθενείς που λαμβάνουν χρόνια μεταγγίσεις όπως οι θαλασσαιμικοί είναι περισσότερο επιρρεπείς στην ανάπτυξη δευτεροπαθούς αιμοσιδήρωσης. Αποσιδήρωση συστήνεται όταν ο ηπατικός σίδηρος είναι 6-7 mg/g ξηρού ιστού. Στους ασθενείς με DBA αποφεύγεται η χορήγηση αποσιδήρωσης με διφεριπρόνης λόγω της θανατηφόρου ακοκκιοκυτταραιμίας που έχει παρατηρηθεί σε DBA ασθενή που έλαβε διφεριπρόνη. Εξαιρούνται οι περιπτώσεις με σοβαρή καρδιακή σιδήρωση και συμφορητική καρδιομυοπάθεια όπου τότε χορηγείται όχι ως μονοθεραπεία αλλά σε συνδυασμό με δεσφεριοξαμίνη (Henter et al., 2007).

Μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων

Οριστική θεραπεία των ασθενών αποτελεί η μεταμόσχευση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (August et al., 1976; Willig et al., 1999b; Vlachos et al., 2001a). Κύρια ένδειξη για μεταμόσχευση έχουν οι μεταγγισιοεξαρτώμενοι ασθενείς. Η κύρια αιτία θανάτου μετά την μεταμόσχευση είναι η τοξικότητα της χημειοθεραπείας και όχι η αντίδραση απόρριψη μοχεύματος έναντι ξενιστού. Η επιβίωση μετά από αλλογενή μεταμόσχευση από HLA συμβατό δότη σε ηλικία >5 ετών από αδερφό είναι 72,7% ενώ από μη συγγενή 17,1%, διαφορά στατιστικά σημαντική ($p=0.012$). Η επιβίωση των ασθενών που μεταμοσχεύονται από HLA συγγενή συμβατό δότη σε ηλικία <9 ετών είναι $90. \pm 9.5\%$ (Lipton et al., 2006) ενώ >9 ετών $70 \pm 11.6\%$ (Aghalar et al., 2009).

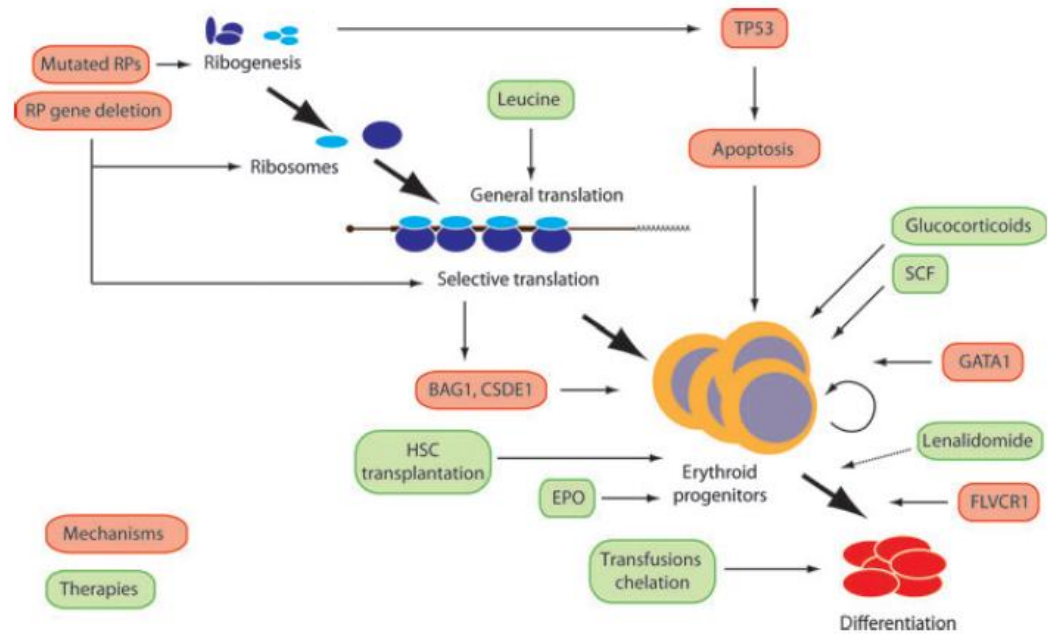
Με βάση τα προηγούμενα συστήνεται να γίνεται μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων όταν υπάρχει συγγενής HLA συμβατός δότης πριν την ηλικία των 10 ετών και κυρίως μεταξύ 2-5 ετών (Vlachos et al., 2008). Ασθενείς που δεν λαμβάνουν ολόσωμη ακτινοβολία κατά την διάρκεια της

μεταμόσχευσης, έχουν καλύτερα αποτελέσματα (Vlachos et al., 2001a). Οι ενδείξεις για αλλογενή μεταμόσχευση από μη συγγενή HLA-συμβατό δότη είναι η εμφάνιση αιματολογικών διαταραχών από την κοκκιώδη ή και την μεγακαρυοκυτταρική σειρά και η εξέλιξη προς ΜΔΣ/ΟΜΛ καθώς επίσης και επιπλοκές από την μετάγγιση (αλλοανοσοποίηση, αντίδραση στους χηλικούς παράγοντες αποσιδήρωσης) σε ασθενείς που δεν έχουν ανταποκριθεί προηγουμένως σε θεραπεία με κορτιζόνη.

Άλλες θεραπείες

Άλλες εναλλακτικές θεραπείες με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα αποτελούν η κυκλοσπορίνη κυρίως σε συνδυασμό με κορτιζόνη και λιγότερο ως μονοθεραπεία σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην κορτιζόνη (Wan et al., 2016), ο συνδυασμός δεξαμεθαζόνης με λεναλιδομίδα (Narla et al., 2012) και η χορήγηση λευκίνης (Narla et al., 2014). Μελλοντικές θεραπείες αποτελούν η γονιδιακή θεραπεία και οι ρυθμιστές του p53 και του m-TOR mRNA (Narla et al., 2011).

Σε ποσοστό 20%, σε ηλικία 25 ετών, με ίσο ποσοστό ανδρών/γυναικών, ανεξάρτητα από την θεραπεία που ελάμβαναν παρατηρείται αυτόματη ύφεση με διατήρηση της αιμοσφαιρίνης σε επιθυμητά επίπεδα για περισσότερο από 6 μήνες και δεν χρήζουν περαιτέρω αγωγή (Narla et al., 2011). Η επιβίωση των ασθενών είναι $75.1 \pm \%$ στην ηλικία των 40 ετών (Lipton et al., 2006) με στατιστικά σημαντική ($p=0.007$) υπεροχή των ασθενών που είναι κορτικοεξαρτώμενοι $86.7 \pm 7\%$ σε σύγκριση με τους μεταγγισιοεξαρτώμενους $57.2 \pm 8.9\%$. Από το DBA Registry της Νοτίου Αμερικής (Lipton et al., 2006) προκύπτει ότι το 70% των θανάτων είναι αποτέλεσμα της θεραπείας των ασθενών (λοιμώξεις, αιμοσιδήρωση, μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων) και μόνο το 30% είναι αποτέλεσμα της νόσου (σοβαρή απλαστική αναιμία και κακοήθεια).



Εικόνα 4. Παθοφυσιολογία της DBA και θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες (RPs) συμμετέχουν στη βιογένεση των ριβοσωμάτων και συγχρόνως αποτελούν δομικές πρωτεΐνες των ριβοσωμάτων. Τα ριβοσώματα ελέγχουν την παραγωγή των mRNAs, αλλά κάποια μετάγραφα είναι υπερευαίσθητα στην περίσσεια των ριβοσωμάτων. Οι FLVCR1, BAG1 και CSDE1 είναι μεταξύ των πρωτεϊνών που απορρυθμίζονται στους ερυθροβλάστες των ασθενών με DBA. Μειωμένη έκφραση του BAG1 και CSDE1 σε ποντίκια μειώνει την ικανότητα διαφοροποίησης των ερυθροβλαστών. Ο FLVCR1 είναι ένας μεταφορέας αίμης και επηρεάζει την υπερφόρτωση σιδήρου σε μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς με DBA. Η απλοανεπάρκεια μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης προκαλεί μια ανισορροπία μεταξύ των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και rRNAs, η οποία ενεργοποιεί τον παράγοντα p53 και μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση και ελάττωση των ερυθροβλαστών. Όταν οι ασθενείς με DBA δεν φέρουν μετάλλαξη σε ριβοσωματικές πρωτεΐνες, μπορούν να φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που δεν κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες και επηρεάζουν την ερυθροποίηση όπως στο γονίδιο GATA1. Οι θεραπείες στην DBA έχει ως στόχο την αύξηση των ερυθροκυττάρων με μεταγγίσεις συμπτωκνωμένων ερυθροκυττάρων, η οποία απαιτεί ταυτόχρονη θεραπεία με χηλικούς παράγοντες αποσιδήρωσης, ή με μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (HSC). Η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή αυξάνει τις προγονικές μορφές των ερυθροβλαστών ενώ η λεναλιδομίδα αυξάνει την ικανότητα των ερυθροβλαστών για διαφοροποίηση. Τα συμπληρώματα λευκίνης μπορεί να είναι μια καλά ανεκτή θεραπεία γιατί ενισχύει γενικά την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω ενεργοποίησης του mTOR. Η θεραπεία με ερυθροποιητίνη (EPO) μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική, επειδή τα επίπεδα EPO είναι ήδη υψηλά (Horos et al., 2012)

Σύνδρομο Shwachman-Diamond (SDS)

Το σύνδρομο Shwachman-Diamond (SDS, OMIM 260400) είναι μια σπάνια κληρονομική πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται κυρίως από ανεπάρκεια εξωκρινούς μοίρας παγκρέατος, διαταραχές στην αιμοποίηση (κυρίως ουδετεροπενία), σκελετικές ανωμαλίες και αυξημένο κίνδυνο για λευχαιμία. Πρωτοπεριγράφηκε το 1964 στο Παιδιατρικό νοσοκομείο της Βοστώνης από τον Harry Shwachman, έναν παιδίατρο με εξειδίκευση στην κυστική ίνωση και τον Louis K. Diamond, έναν παιδίατρο αιματολόγο, κατά την διάρκεια μελέτης μιας ομάδας παιδιών με παγκρεατική ανεπάρκεια και σκελετικές ανωμαλίες με φυσιολογικό τεστ ιδρώτα και χωρίς συμπτώματα από το αναπνευστικό (Shwachman et al., 1964). Ταυτόχρονα στο Λονδίνο στο νοσοκομείο Great Ormond Street, ο Martin Bodian, ο οποίος ήταν παιδίατρος και ανατόμος, ανέφερε 2 περιστατικά με συγγενή παγκρεατική ανεπάρκεια, λιπώδη διήθηση παγκρέατος και αναιμία (Bodian et al., 1964). Για την προσφορά του τελευταίου, στην Ευρώπη το σύνδρομο αναφέρεται και ως σύνδρομο Shwachman-Bodian-Diamond. Το SDS αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία εκ γενετής ανεπάρκειας εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος μετά την κυστική ίνωση και την τρίτη κατά σειρά συχνότερη αιτία κληρονομούμενης ανεπάρκειας του μυελού των οστών μετά την Αναιμία Fanconi και την αναιμία Blackfan-Diamond.

Η νόσος μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο αυτοσωματικό χαρακτήρα. Εκδηλώνεται στην βρεφική ή νωρίς στην παιδική ηλικία με δυσασπορρόφηση και ιστορικό πρόσφατης λοίμωξης. Η επίπτωση υπολογίζεται κατά προσέγγιση σε 1:100.000 με 1:200.000 γεννήσεις ζώντων και το ποσοστό εμφάνισης στα δυο φύλλα, άρρεν προς θήλυ, είναι 1.8:2.4 .



ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ SDS

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Αρκετές ομάδες έχουν μελετήσει τα αιματολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με SDS (Smith et al., 1996; Mack et al., 1996; Aggett et al., 1980; Cipolli et al., 1999). Το σύνδρομο Shwachman Diamond εμφανίζει ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων ακόμα και μεταξύ πασχόντων αδελφών. Η ουδετεροπενία ($<1.500/\text{mm}^3$) είναι η πιο συχνή αιματολογική διαταραχή (88%-100%) των ασθενών με SDS. Στο 75% των ασθενών η ουδετεροπενία είναι διαλείπουσα ενώ στο 25% των ασθενών είναι χρόνια. Έχουν αναφερθεί επίσης και ποιοτικές διαταραχές των ουδετεροφίλων (χημειοταξίας, κινητικότητας, μετανάστευσης) στους περισσότερους ή και σε όλους τους ασθενείς (Rothbaum et al., 1982; Dokal et al., 1997; Dror et al., 2001a; Smith et al., 1996). Ως αποτέλεσμα της διαταραχής των ουδετεροφίλων οι ασθενείς εμφανίζουν επανειλημμένες ιογενείς, μικροβιακές και μυκητιασικές λοιμώξεις (μέση ωτίτις, κολπίτις, βρογχοπνευμονία, σηψαιμία, οστεομυελίτις, λοιμώξεις δέρματος) (Grinspan et al., 2005; Stepanovic et al., 2004). Παρά τον ανεπαρκή αριθμό καθώς και την διαταραχή στη λειτουργικότητα των ουδετεροφίλων οι ασθενείς με SDS είναι ικανοί να σχηματίζουν αποστήματα (Grinspan et al., 2005). Έχουν αναφερθεί διαταραχές τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσία των ασθενών με SDS (Dror et al., 2001a; Dror et al., 2005; Kornfeld et al., 1995). Συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα B, NK και T κυτάρων, χαμηλές τιμές IgG ανοσοσφαιρινών και υποτάξεων καθώς και αναστροφή του ποσοστού CD4:CD8.

Αναιμία νομόχρωμη νορμοκυτταρική ή μακροκυτταρική με μειωμένα δικτυοερυθροκύτταρα έχει περιγραφεί στο 42%-82% των ασθενών. Στο 24%-88% έχει αναφερθεί θρομβοπενία ($<150 \times 10^9 /L$) που μπορεί να οδηγήσει σε θανατηφόρα αιμορραγία. Το 80% των ασθενών έχει αυξημένα επίπεδα HbF αιμοσφαιρίνης που είναι ένας δείκτης στρες της αιμοποίησης. Οι κυτταροπενίες εμφανίζονται συνήθως νωρίς κατά την παιδική ηλικία ωστόσο υπάρχουν και βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρονται σε μεταγενέστερη εκδήλωση (Lesesve et al., 2003). Κατά προσέγγιση το 10%-65% των ασθενών, εμφανίζει πανκυττοπενία με μερικούς ασθενείς να αναπτύσσουν απλαστική αναιμία (Woods et al., 1981). Ο μυελός των οστών μπορεί να είναι νορμοκυτταρικός υποκυτταρικός ή υπερκυτταρικός και σχετίζεται με την αιματολογική εικόνα του ασθενούς.

ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΣΥΝΔΟΜΟ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

Παρόμοια με τα άλλα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας οι ασθενείς με SDS έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (ΜΔΣ) και κακοηθειών κυρίως οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) (Woods et al., 1981; Dror et al., 1998). Το Γαλλικό Μητρώο (Registry) με 55 καταγεγραμμένους ασθενείς αναφέρει ότι το ποσοστό εμφάνισης ΜΔΣ ή ΟΜΛ είναι 18.8% στην ηλικία των 20 ετών και 36.1% σε ηλικία 30 ετών (Donadieu et al., 2005b). Μόνο 4 περιπτώσεις συμπαγών όγκων έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία (καρκίνος μαστού, καρκίνος παγκρέατος, παγκρεατοδωδεκαδακτυλικός καρκίνος και σάρκωμα) (Singh et al., 2012; Dhanraj et al., 2013; Nakaya et al., 2014; Joseph et al., 2015). Κλωνικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες ανευρίσκονται συχνά στο μυελό των οστών και περιλαμβάνουν κυρίως το χρωμόσωμα 7 {μονοσωμία, iso (7)(q10), der[7], del [7]} και το χρωμόσωμα 20 [del(20)(q)]. (Dror et al., 2005; Dror et al., 2002; Pressato et al., 2015; Burroughs et al., 2009). Τόσο η ανωμαλία iso (7)(q10) όσο το έλλειμμα del(20)(q) έχουν συσχετιστεί με καλή πρόγνωση σε αντίθεση με τις άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες αφού οι ασθενείς δεν αναπτύσσουν ΜΔΣ/ΟΜΛ. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η μετάλλαξη c.258+2T>C του SBDS γονιδίου διπλασιάζεται στο iso (7)(q10). Η c.258+2T>C επιτρέπει την παραγωγή μιας μικρής ποσότητας φυσιολογικής SBDS πρωτεΐνης η οποία συμμετέχει στην σταθερότητα της μιτωτικής

ατράκτου και στη ρύθμιση του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συνύπαρξη των iso (7)(q10) και del(20)(q) με άλλους κυταρογενετικούς κλώνους (30%) αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΜΔΣ ή ΟΜΛ. Οι κυταρογενετικές ανωμαλίες μπορεί να παραμένουν σταθερές με τον χρόνο, να εμφανίζουν επιπρόσθετους κλώνους ή να μεταπίπτουν σε απλαστική αναιμία, ΜΔΣ ή ΟΜΛ.

ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Το SDS σύνδρομο χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος λόγω της απουσίας των λοβιακών κυττάρων. Οι ασθενείς με SDS εμφανίζουν νωρίς στη βρεφική ηλικία δυσαπορρόφηση, στεατόρροια, κοντό ανάστημα και ανεπάρκεια λιποδιαλυτών βιταμινών D,E,K,A. Έχουν φυσιολογικό τεστ ιδρώτα, σε αντίθεση με τους ασθενείς με ινοκυστική νόσο όπου η βλάβη του παγκρέατος εντοπίζεται στους εξωκρινείς παγκρεατικούς πόρους. Τα επίπεδα θρυψινογόνου και παγκρεατικής ισοαμυλάσης ορού είναι χαμηλά και εξαρτώνται από την ηλικία του ασθενούς. Συγκεκριμένα το θρυψινογόνου ορού είναι χαμηλό σε ασθενείς ηλικίας <3 ετών ενώ σε μεγαλύτερες ηλικίες αυξάνει σε φυσιολογικές τιμές, σε αντίθεση με την ισοαμυλάση ορού όπου η χρησιμότητα περιορίζεται σε ηλικίες >3 ετών γιατί σε μικρότερες ηλικίες ακόμα και τα φυσιολογικά άτομα μπορεί να έχουν μειωμένα επίπεδα. Επιπλέον τα επίπεδα ελαστάσης κοπράνων είναι χαμηλά καθώς επίσης και η παραγωγή παγκρεατικών ενζύμων μετά από διέγερση με χολοκυστοκίνη και σεκρετίνη είναι χαμηλή (IP et al., 2002).

Απεικονιστικές μελέτες με υπερηχογράφημα, αξονική ή μαγνητική τομογραφία συχνά αναδεικνύει λιπώδη διήθηση του παγκρέατος (Toivaiainen-Salo et al., 2008a) χωρίς διαταραχή των παγκρεατικών πόρων και των νησιδίων. Για άγνωστους λόγους η παγκρεατική δυσλειτουργία σποραδικά επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα στο 50% των ασθενών με την πάροδο της ηλικίας (Mack et al., 1996; Aggett et al., 1980).

Άλλα κλινικά χαρακτηριστικά, που έχουν περιγραφεί σε μερικούς ασθενείς, είναι η ηπατομεγαλία (15%) με αύξηση των τρανσαμινασών πάνω από 2-3 φορές από τις φυσιολογικές τιμές (50%-75%) και με τάση

επαναφοράς στα φυσιολογικά επίπεδα μετά την ηλικία των 5 ετών (Mack et al., 1996; Cipolli et al., 1999; Maki et al., 1978). Μελέτες έχουν δείξει πανλοβώδη λιπώδη διήθηση με μη ειδικές περιπυλαίες και πυλαίες φλεγμονώδεις διηθήσεις, ποικίλου βαθμού περιπυλαίες, πυλαίες και γεφυρικές ινώσεις καθώς και μικρο- και μακροκυψελιδώδη στεάτωση (Maki et al., 1978; Ginzberg et al., 1999; Bodian et al., 1964; Brueton et al., 1977). Σε μια μελέτη από την Φινλανδία, ηπατομεγαλία εμφάνιζαν μόνο οι ασθενείς μικρότεροι από 3 ετών ενώ περισσότερο από το 50% των ασθενών είχαν αυξημένες τιμές χολερυθρίνης, τρεις εκ των οποίων σε ηλικία μεγαλύτερη των 30 ετών ανέπτυξαν ηπατικές μικροκύστες. Από την μελέτη αυτή φαίνεται ότι η ηπατομεγαλία και τρανσαμινασαιμία που εμφανίζονται σε μερικούς ασθενείς μπορούν να επανέλθουν σε φυσιολογικά επίπεδα με την πάροδο του χρόνου σε αντίθεση με την χολόσταση που μπορεί να επιμένει και σε μεγαλύτερες ηλικίες όπως επίσης και οι ηπατικές μικροκύστες που μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερες ηλικίες (Toivaiainen-Salo et al., 2009). Τέλος υπάρχουν αναφορές περιστατικών αυτοάνοσης ηπατίτιδας και κοιλιοκάκης σε ασθενείς με SDS (Veropalumbo et al., 2015).

ΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Συχνά αναφέρονται σκελετικές ανωμαλίες στους ασθενείς με SDS, οι οποίες οφείλονται σε καθυστερημένη εμφάνιση των δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης και ανώμαλη ανάπτυξη των αυξητικών χόνδρων κυρίως στην περιοχή των μεταφύσεων. Η μεταφυσιακή δυσόστωση έχει αναφερθεί στο 50% των ασθενών. Είναι ασυμπτωματική και ενώ αφορά κυρίως την κεφαλή του μηριαίου οστού (Aggett et al., 1980; Ginzberg et al., 1999) έχει αναφερθεί και σε άλλες περιοχές όπως κατα γόνα άρθρωση, κεφαλή βραχιονίου οστού, καρπό, αστράγαλο, σπονδυλική στήλη. Ανωμαλίες θωρακικού κλωβού ανευρίσκονται στο 30-50% των ασθενών και περιλαμβάνουν στενό θωρακικός κλωβό, κοντές πλευρές με αποπλάτυνση των πρόσθιων άκρων τους και πάχυνση πλευροχονδρίων. Υπάρχουν αναφορές περιστατικών στη βιβλιογραφία με αναπνευστική δυσχέρεια σε νεογνήτα λόγω δυστροφίας θωρακικού κλωβού (Danks et al., 1976). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι βλάβες στην ωρίμανση των επιφύσεων εξαφανίζονται με την πάροδο της ηλικίας ενώ οι βλάβες στην μετάφυση τείνουν να χειροτερεύουν (Makitie et al., 2004).

Επίσης έχουν αναφερθεί μετατόπιση επίφυσης μηριαίου, ανωμαλίες δακτύλων (κλινοδακτυλία, συνδακτυλία και υπεράριθμος αντίχειρας), ανωμαλίες σπονδυλικής στήλης (κύφωση, σκολίωση και συνοστέωση σπονδύλων) (Makitie et al., 2004; Ginzberg et al., 1999) καθώς και οστεοπενία ή οστεοπόρωση λόγω έλλειψης βιταμίνης D (Makitie et al., 2004; Toivaiainen-Salo et al., 2007).

ΚΑΡΔΙΑΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Αρκετές αναφορές υπάρχουν στη βιβλιογραφία για καρδιακές εκδηλώσεις σε ασθενείς με SDS. (Savilahti et al., 1984; Sacrez et al., 1969; Nivelon et al., 1978; Nezelof et al., 1979; Graham et al., 1980; Ryan et al., 2015; Myers et al., 2015 Hauet et al., 2013). Μυοκαρδιακή νέκρωση ή ίνωση είχε αρχικά παρατηρηθεί σε ιστοπαθολογικά δείγματα. Οι Savilahti και Rapola ανέφεραν 8 θανάτους από καρδιακή ανεπάρκεια μεταξύ 16 ασθενών με SDS. Η νεκροψία αυτών των ασθενών ανέδειξε μυοκαρδιακή νέκρωση στην αριστερή κοιλία (Savilahti et al., 1984). Οι Toivaiainen-Salo και οι συνεργάτες του μελέτησαν 8 ασθενείς με SDS χωρίς καρδιακά συμπτώματα. Η μελέτη ανέδειξε φυσιολογική καρδιακή ανατομία και μυοκαρδιακές δομές αλλά μειωμένη καρδιακή συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας κατά την διάρκεια της άσκησης καθώς και ήπια διαστολική δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας. (Toivaiainen-Salo et al., 2008b) Στο Γαλλικό Μητρώο του 2012 (Registry) μελετήθηκαν 102 ασθενείς με SDS και σε 12 ασθενείς (11%) καταγράφηκαν καρδιακές ανωμαλίες. Έξι ασθενείς είχαν συγγενή καρδιοπάθεια (στένωση ισθμού αορτής, διπλό αορτικό τόξο, έλλειμα μεσοκοιλιακού ή μεσοκοιλιακού διαφράγματος, τετραλογία fallot) και 6 ασθενείς εμφάνισαν μυοκαρδιοπάθεια (με συχνότερη την διατατική) μετά από λοίμωξη με H1N1 ιό της γρίππης (Hauet et al., 2013). Με βάση την μελέτη αυτή ο επιπολασμός των συγγενών καρδιοπαθειών στον πληθυσμό αυτό, ήταν 5.4 %, ενώ η επίπτωση στις νέες γεννήσεις 0.9%. Οι Ryan TD και συνεργάτες του έδειξαν ότι σε 27 ασθενείς με SDS που μελετήθηκαν μέσω υπερηχογραφικού ελέγχου το 33% είχαν συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας με φυσιολογικό κλάσμα εξώθησης και κλάσμα βράχυνσης πριν την μεταμόσχευση των αιμοποιητικών κυττάρων (Ryan et al., 2015).

Υπάρχουν επίσης αρκετές μελέτες που περιγράφουν καρδιακές επιπλοκές σε ασθενείς με SDS μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί, παροδική συμφορητική καρδιακή μυοπάθεια κατά την φάση εφόδου της χημειοθεραπείας (Fleitz et al., 2002), μακροπρόθεσμη καρδιακή υποκινησία (Donadieu et al., 2005a), συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας (Ryan et al., 2015) και θανατηφόρα πανκαρδίτιδα (Tsai et al., 1990) μετά την μεταμόσχευση.

ΑΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Άλλα χαρακτηριστικά που έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με SDS είναι: ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (Aggett et al., 1980), ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (Kornfeld et al., 1995), υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός (Raj et al., 2003), υποθυρεοειδισμός, εκζεματοειδές εξάνθημα, ιχθύωση, ανωμαλίες οδόντων, επαναλαμβανόμενα στοματικά έλκη (Ho et al., 2007), και ψυχοκινητική καθυστέρηση (Kent et al., 1990)

Η ανεπαρκής ανάπτυξη, είναι κοινό χαρακτηριστικό των ασθενών με SDS, και η αιτιολογία της είναι πολυπαραγοντική περιλαμβάνοντας την παγκρεατική ανεπάρκεια, τις σιτιστικές δυσκολίες, τις επανελκυσμένες λοιμώξεις και τη μεταφυσιακή δυσόστωση. Παρά την θεραπεία με υποκατάστατα παγκρεατικών ενζύμων οι ασθενείς συνεχίζουν να παραμένουν κάτω από την 3^η ΕΘ στο ύψος και στο βάρος. Φυσιολογικό ύψος και βάρος δεν αποκλείει την διάγνωση ασθενών με SDS. Νεφρικές ανωμαλίες όπως διαταραχές της ουροποιητικής οδού και νεφρική σωληναριακή οξέωση έχουν επίσης περιγραφεί (Aggett et al., 1980; Ginzberg et al., 1999).

Πίνακας 4. Κλινικά Χαρακτηριστικά ασθενών με Σύνδρομο Shwachman Diamond

Ανεπάρκεια Εξωκρινούς μούρας παγκρέατος	Δυσαπορρόφηση, στεατόρροια, ανεπάρκεια υδατοδιαλυτών βιταμινών D,E,K,A, ανεπαρκή πρόσληψη βάρους, χαμηλά επίπεδα θρυψινογόνου ορού(<3 ετών), χαμηλά επίπεδα παγκρεατικής ισοαμυλάσης (>3 ετών), test ιδρώτα φυσιολογικό
Σκελετικές Ανωμαλίες	Κοντό ανάστημα, μεταφυσιακή δυσόστωση οστών (κεφαλή μηριαίου) καθυστερημένη οστεοποίηση, οστεοπενία (έλλειψη Vit D), οστεοπόρωση, ανωμαλίες δακτύλων (κλινόδακτυλία, συνδακτυλία, τριφαλαγγικός αντίχειρας), ανωμαλίες θωρακικού κλωβού, κύφωση, σκολίωση
Ανοσολογικό Έλλειμα	Μειωμένες ανοσοσφαιρίνες (IgG και υποτάξεις), μειωμένος αριθμός B-λεμφοκυττάρων, μειωμένος αριθμός T-λεμφοκυττάρων, μειωμένος αριθμός NK, αναστροφή λόγου CD4:CD8
Ηπατικές Διαταραχές	Ηπατομεγαλία, τρανσαμινασαιμία , ηπατική ανεπάρκεια, πανλοβιακή λιπώδη διήθηση, περιπυλαία ίνωση, μικρο- και μακροκυψελιδώδης στεάτωση
Ενδοκρινοπάθειες	Σ.Δ., ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, υποθυρεοειδισμός, υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός
Καρδιακές Διαταραχές	Πανκαρδίτιδα, μειωμένη συσταλτικότητα αριστερής κοιλίας, διαστολική δυσλειτουργία δεξιάς κοιλίας, μυοκαρδιακή ίνωση
Νεφρολογικές Διαταραχές	Νεφρική σωληναριακή οξέωση, ανατομικές ανωμαλίες
Αιματολογικές Διαταραχές	Κυτταροπενίες, οξεία μυελογενή λευχαιμία, μυελοδυσπλαστικό
Δερματολογικές Ανωμαλίες	Ιχθύαση, έκζεμα
Ψυχοκινητική καθυστέρηση και Ανωμαλίες Οδόντων	

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ SDS

Το SDS σύνδρομο μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Περίπου στο 90% των ασθενών που πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια για SDS έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome gene) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q11, κοντά στην περιοχή του κεντρομεριδίου (Boocock et al., 2003). Η συχνότητα της φορείας έχει υπολογιστεί σε 1 στους 110 (Goobie et al., 2001). Το SBDS γονίδιο είναι ένα σχετικά νέο γονίδιο που πρωτοπεριγράφηκε το 2000 στην Ταιβάν από τον Lai και τους συνεργάτες του (Lai et al., 2000). Το SBDS γονίδιο έχει 5 εξώνια μεγέθους 7.9kb και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 250 αμινοξέων, 28.8 kDa. Παρακείμενα του SBDS γονιδίου (5,8Mb) βρίσκεται το ψευδογονίδιο SBDSP που είναι 97% ομόλογο με το SBDS αλλά περιέχει ελλείμματα και αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα να μην κωδικοποιεί λειτουργική πρωτεΐνη (Boocock et al., 2003; Goobie et al., 2001).

Το 75% των ασθενών με SDS έχουν μεταλλάξεις στο SBDS γονίδιο που προκύπτουν από την γονιδιακή μετατροπή (gene conversion) που συμβαίνει μεταξύ του *SBDS* και *SBDSP* κατά την διάρκεια της μίτωσης (Boocock et al., 2003). Η πρωτεΐνη και το mRNA του *SBDS* γονιδίου εκφράζονται ευρέως στους ανθρώπινους ιστούς (Boocock et al., 2003; Austin et al., 2005; Woloszynek et al., 2004). Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του SBDS γονιδίου είναι η αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στο δεύτερο νουκλεοτίδιο στην αρχή του δεύτερου ιντρονίου (c.258+2 T>C) και αντικατάσταση ενός δινουκλεοτιδίου θυμίνης/ αδενίνης από κυτοσίνη/ θυμίνη (c.183-184 TA>CT) στη θέση 183-184 της νουκλεοτιδικής αλυσού στο εξώνιο 2. Η μετάλλαξη 258+2 T>C έχει σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της θέσης ματίσματος στο ιντρόνιο 2 και την ενεργοποίηση μιας κρυφής θέσης ματίσματος στη θέση 251-252. Η επερχόμενη αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης δημιουργεί πρόωρο κωδικώνιο λήξης στη θέση 84 με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερης πρωτεΐνης μεγέθους μόλις 84 αμινοξέων. Η μετάλλαξη 183-184 TA>CT οδηγεί σε δημιουργία πρόωρου κωδικωνίου λήξης με αποτέλεσμα το πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης στο αμινοξύ 62. Η ολική απώλεια έκφρασης του *SBDS* γονιδίου είναι θανατηφόρα σε μοντέλα ποντικών (Zhang et al., 2006) και πιθανολογείται ότι το ίδιο ισχύει και

στον άνθρωπο όπου δεν έχουν παρατηρηθεί ομοζυγωτίες για την μετάλλαξη c.183-184 TA>CT, Ο έλεγχος των μεταλλάξεων περιλαμβάνει είτε την στοχευμένη ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω περιοριστικών ενζύμων είτε τον άμεσο προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του DNA. Πάνω από 90% των ασθενών φέρουν τουλάχιστον σε ένα αλληλόμορφο μία από τις τρεις συχνότερες μεταλλάξεις [c.183-184 TA>CT, c.(183-184 TA>CT,258+2T>C), c.258+2T>C] που είναι αποτέλεσμα γονιδιακής μετατροπής. Πάνω από το 62% των ασθενών υπολογίζεται ότι φέρουν τις δύο από τις τρεις συχνότερες μεταλλάξεις.

Έχουν βρεθεί μειωμένα CD34⁺ αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό των ασθενών με SDS συγκριτικά με αυτά φυσιολογικών ατόμων. Η ικανότητα των μυελικών στρωματικών κυττάρων από τους SDS ασθενείς να προωθούν φυσιολογική ανάπτυξη CD34⁺ κυττάρων σε αποικίες είναι ελλειπτική (Dror et al., 1999). Στο μυελό των ασθενών με SDS έχει παρατηρηθεί αυξημένη απόπτωση (Dror et al., 2001b) και αυξημένα επίπεδα p53 πρωτεΐνης (Elghetany et al., 2002). Μειωμένη έκφραση SBDS πρωτεΐνης σε ποντίκια με την βοήθεια RNAi ιών, επηρεάζει την διαφοροποίηση των κοκκιοκυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro (Rawls et al., 2007). Στο πειραματικό μοντέλο zebrafish στο οποίο καταστέλεται η έκφραση του SBDS γονιδίου με την έκθεση σε μορφολίνο παρατηρούνται ανωμαλίες στην ανάπτυξη των κοκκιοκυττάρων και του παγκρέατος (Venkatasubramani et al., 2008).

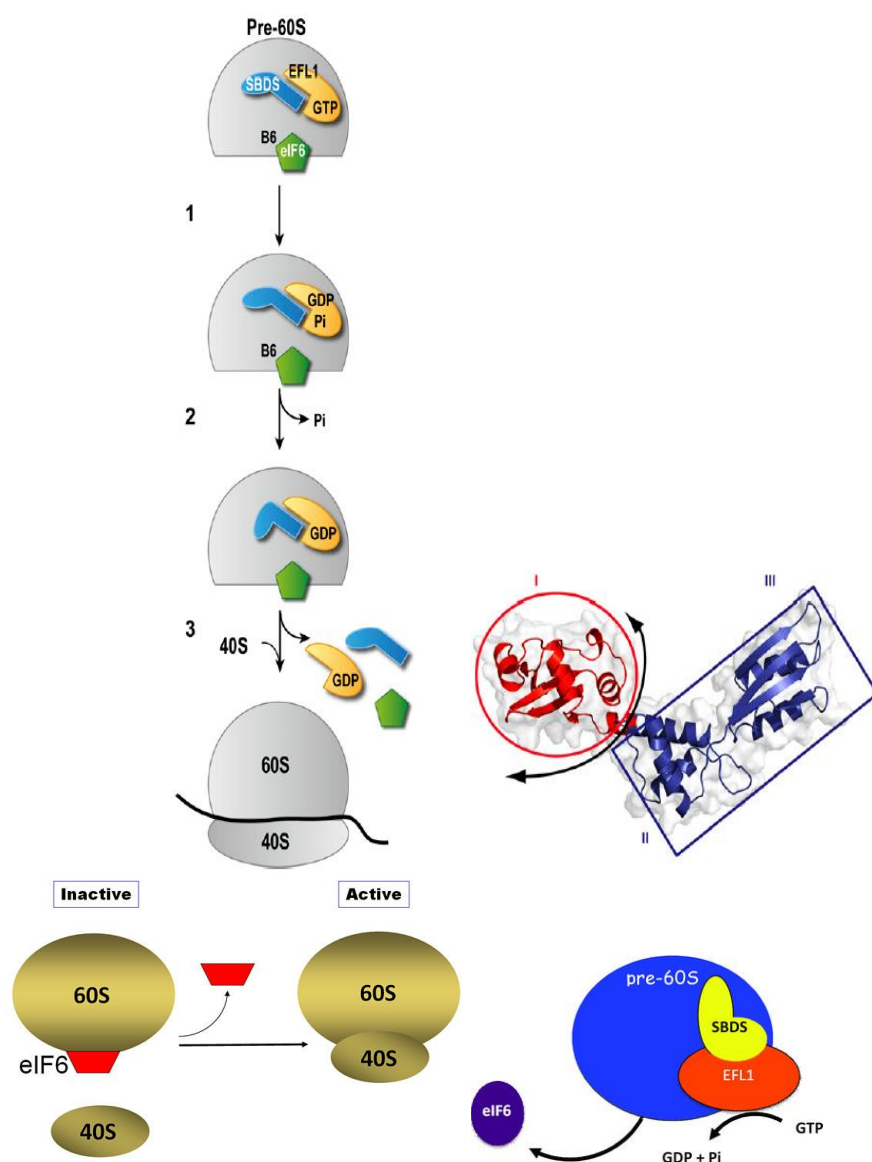
Με τη μελέτη του ορθόλογου γονιδίου του SBDS προκύπτει ότι η αμινο-τερματική περιοχή της SBDS πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με αρκετά γονίδια που εμπλέκονται σε διαδικασίες RNA και rRNA, επομένως φαίνεται να παίζει ρόλο στη βιογένεση των ριβοσωμάτων, μια πολύπλοκη κυτταρική διαδικασία (Boocock et al., 2001; Savchenko et al., 2005). Η SBDS πρωτεΐνη εκφράζεται ευρέως σε πολλούς και διαφορετικούς ιστούς και συγκεντρώνεται κυρίως στο πυρηνίδιο όπου και γίνεται η βιογένεση των ριβοσωμάτων (Austin et al., 2005). Μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα από τους Ganapathi και συνεργάτες του έδειξαν ότι 1) κύτταρα από ασθενείς με SDS είναι υπερευαίσθητα σε χαμηλές δόσεις ακτινομυκίνης D ο οποίος είναι ένας αναστολέας της μεταγραφής του rRNA 2) Η δράση της ακτινομυκίνης D αναστέλει τη συγκέντρωση της SBDS πρωτεΐνης στο πυρηνίδιο 3) Η SBDS πρωτεΐνη

σχηματίζει ιζήματα με την 60S μεγάλη υπομονάδα των ριβοσωμάτων καθώς και με το 28S ριβοσωμικό RNA αλλά όχι με τα ώριμα ριβοσώματα ή με τα πολυσώματα 4) Η SBDS πρωτεΐνη σχηματίζει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα με την νουκλεοφοσμίνη, η οποία είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη βιογένεση των ριβοσωμάτων, στη λευχαιμογένεση και στο διπλασιασμό του κεντρομεριδίου (Ganapathi et al., 2007).

Η SBDS πρωτεΐνη συμμετέχει κατά την διάρκεια της μίτωσης στη διατήρηση της γενομικής σταθερότητας (Austinet al., 2008) μέσω σταθεροποίησης της μιτωτικής ατράκτου καθώς επίσης και στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Σε καλλιέργιες κυττάρων από SDS ασθενείς παρατηρείται αυξημένο ποσοστό μιτωτικών ανωμαλιών. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν από μελέτες σε ανθρώπινες ινοβλάστες όπου έχει γίνει αναστολή έκφρασης της SBDS πρωτεΐνης μέσω siRNAs. Η υψηλή συχνότητα των χρωμοσωμιακών ανωμαλιών που παρατηρείται στο μυελό των οστών των ασθενών με SDS (μονοσωμία του χρωμοσώματος 7 είναι η πιο κοινή) μπορεί να εξηγηθεί από την συσχέτιση του SBDS γονιδίου με την σταθεροποίηση της μιτωτικής ατράκτου. Απώλεια της SBDS πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με αυξημένη απόπτωση. Σε νεώτερες μελέτες έχει φανεί ότι τόσο σε λευκοκύτταρα SDS ασθενών όσο και σε in vitro απενεργοποίηση του γονιδίου SBDS, παρατηρείται υπερενεργοποίηση των μορίων STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) και των μονοπατιών mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin). Ο STAT3 είναι ένας ρυθμιστής αρκετών κυτταρικών διεργασιών όπως η επιβίωση, η διαφοροποίηση και η κακοήθης εξαλλαγή. Η ενεργοποίηση του STAT3 ρυθμίζεται από τον mTOR, που με την σειρά του παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και καρκινογένεση (Bezzetti et al.,2016) (εικόνα 6).

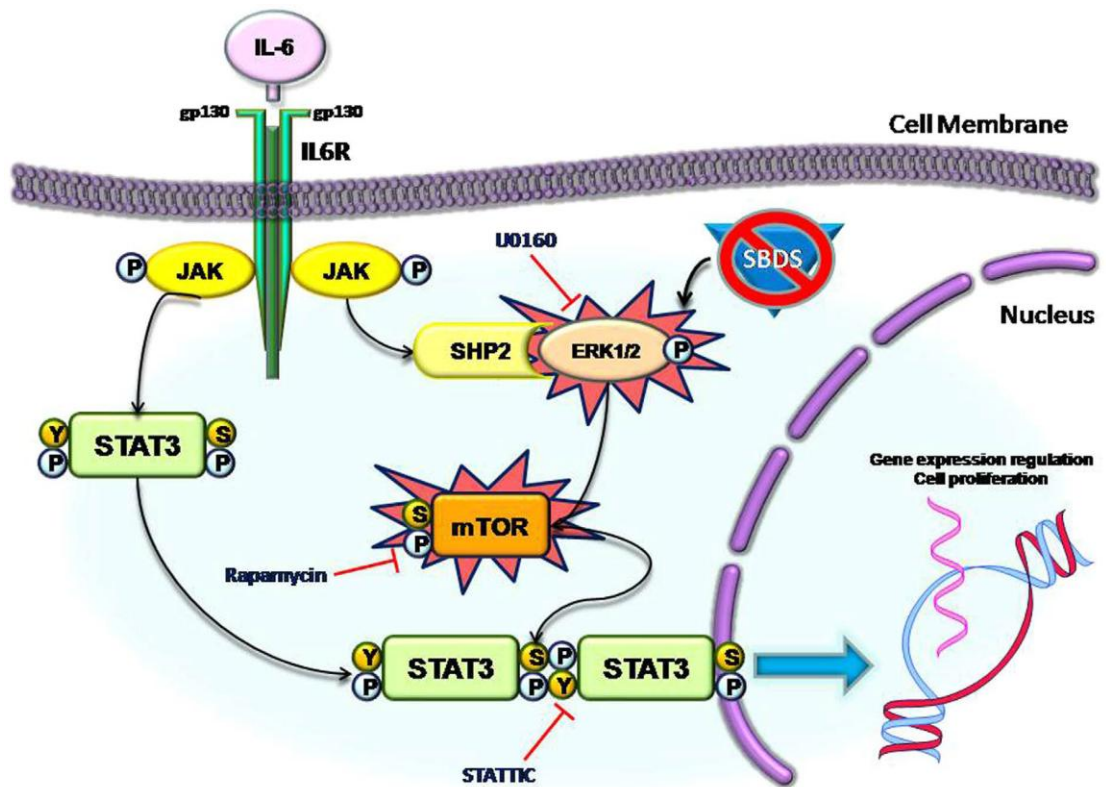
Η SBDS πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την GTPάση EFL1 (elongation factor-like 1). Η αλληλεπίδραση αυτή μετακινεί τον παράγοντα eIF6 (eukaryotic initiation factor 6) από την μεγάλη υπομονάδα 60S του ριβοσώματος επιτρέποντας έτσι την σύνδεση της μικρής 40S και της μεγάλης υπομονάδας 60S του ριβοσώματος σχηματίζοντας ένα ριβόσωμα έτοιμο να επιτελέσει την λειτουργία της μετάφρασης (Finch et al.,2011; Wong et al., 2011) (εικόνα 5). Ωστόσο δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί οι ακριβείς μοριακοί

μηχανισμοί καθώς επίσης και η συσχέτιση της ανεπάρκειας του SBDS γονιδίου με τον κλινικό φαινότυπο των SDS ασθενών.



Εικόνα 5. Ο ρόλος της SBDS πρωτεΐνη

Μοντέλο απελευθέρωσης του eIF6 από τις SBDS και EFL1. (1) Η SBDS πρωτεΐνη διεγείρει την 60S-εξαρτώμενη GTP υδρόλυση του EFL1, δημιουργώντας το EFL1.GDP.Pi σύμπλοκο. (2) Μετά την απελευθέρωση του ανόργανου Pi, ο EFL1 προσαρμόζει το GDP σχηματισμό με αποτέλεσμα την περιστροφή της περιοχής I της SBDS πρωτεΐνης σε σχέση με της περιοχές II και III, άμεσα ή έμμεσα, διαταράσσοντας τη ενδοριβωσμική γέφυρα B6. (3) Η σύνδεση του eIF6 αποσταθεροποιείται και κατά συνέχεια απελευθερώνεται, ενώ το σύμπλοκο EFL1.GDP και η SBDS πρωτεΐνη αποσυνδέονται από το ριβόσωμα. Η απελευθέρωση του eIF6 επιτρέπει τη σύνδεση της μικρής και της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος του και την μετατροπή του σε ενεργό για μετάφραση 80S ριβοσώμα. (Finch et al., 2011)



Εικόνα 6. Μοντέλο απορρύθμισης mTOR / STAT3 μεταγωγής (μεταφοράς) σήματος μονοπατιού που παρατηρείται σε λευκοκύτταρα ασθενών με SDS.

Φυσιολογικά, η IL-6 πυροδοτεί την ενεργοποίηση του JAK 1/2 η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε φωσφορυλίωση του STAT3, κυρίως στο κατάλοιπο Y705, προκαλώντας STAT3 διμερισμό και μετακίνηση του STAT3 εντός του πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως η φλεγμονή και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Μελέτες σε λευκοκύτταρα ασθενών με SDS, δείχνουν υπερ-ενεργοποίηση των ERK1/2, mTOR και STAT3. Ο ERK1/2 είναι γνωστό ότι προωθεί την φωσφορυλίωση του mTOR στο κατάλοιπο S2448, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ενεργοποίηση του mTORC1. Ο mTORC1 ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως την μετάφραση, την αυτοφαγία, την κυτταρική ανάπτυξη και την βιογένεση των ριβοσωμάτων, τα οποία επηρεάζονται στους SDS ασθενείς. Αξιοσημείωτα, ο mTORC1 επάγει ισχυρή φωσφορυλίωση του STAT3 στα κατάλοιπα Y705 και S727 σε διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα. Στην εικόνα αυτή φαίνεται ότι η ραπαμυκίνη ένας mTOR αναστολέας μειώνει την υπερ-ενεργοποίηση του STAT3 σε SDS ασθενείς, αποκαθιστώντας το επίπεδο φωσφορυλίωσης των Y705 και S727. Η απώλεια της SBDS πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει σε mTOR S2448 υπερ-ενεργοποίηση. Η προεπώαση του ERK1/2 αναστολέα U0126 σε EBV-μετασχηματισμένα κύτταρα B από SDS ασθενείς μπορεί να μειώσει σημαντικά την IL-6 που επάγει την φωσφορυλίωση του mTOR S2448. (Bezzetti et al, 2016)

ΔΙΑΓΝΩΣΗ SDS

Η διάγνωση για το Shwachman-Diamond Syndrome (όπως έχει προταθεί από τους Dror and Freedman) περιλαμβάνει τα κλινικά και τα μοριακά κριτήρια (πίνακας 5)

Πίνακας 5. Κριτήρια διάγνωσης SDS

Κλινικά Κριτήρια (τουλάχιστον ένα κριτήριο από την δυσλειτουργία της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος και ένα κριτήριο από τις αιματολογικές διαταραχές)

- 1) Δυσλειτουργία εξωκρινούς μοίρας παγκρέατος: Μειωμένα επίπεδα παγκρεατικών ενζύμων (ελαστάση κοπράνων, θρυψινογόνο ορού, (ισο)αμυλάση ορού, λιπάση ορού)

Εξετάσεις που υποστηρίζουν την παγκρεατική ανεπάρκεια αλλά απαιτούν συνδυασμό είναι:

- Παθολογική ανάλυση (μέτρηση) λίπους κοπράνων 72 ωρών
- Μειωμένα επίπεδα τουλάχιστον 2 υδατοδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K)
- Ένδειξη λιπώδους διήθησης παγκρέατος (μέσω υπερήχου, αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας, ή παθολογική παγκρεατική αυτοψία

- 2) Αιματολογικές ανωμαλίες (τουλάχιστον ένα από τα επόμενα)

- Χρόνια ή διαλείπουσα κυτταροπενία είτε μιας σειράς του μυελού είτε με επηρεασμό περισσότερων σειρών και με ευρήματα διαταραχής της παραγωγής από τον μυελό των οστών

-ουδετεροπενία με απόλυτο αριθμό μικρότερο από $1.500/\text{mm}^3$ σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις σε διάστημα 3 μηνών

-συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης κάτω από δύο σταθερές αποκλίσεις από την μέση τιμή για την ηλικία σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις σε διάστημα 3 μηνών

-θρομβοπενία με αριθμό αιμοπεταλίων μικρότερο από $150.000/\text{mm}^3$ σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις σε διάστημα 3 μηνών

-πανκυτταροπενία

- Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο

Μοριακά Κριτήρια: Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο *SBDS* γονίδιο

Αιματολογικές εξετάσεις που υποστηρίζουν την διάγνωση αλλά απαιτούν συνδυασμό:

- Αυξημένη επίπεδα HbF σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις σε διάστημα 3 μηνών
- Μακροκυττάρωση (σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις σε διάστημα 3 μηνών) μη οφειλόμενη σε άλλες αιτίες όπως αιμόλυση ή διατροφικές ελλείψεις

Επιπλέον υποστηρικτικά δεδομένα υπέρ του συνδρόμου SDS είναι:

- Σκελετικές ανωμαλίες
- Προβλήματα συμπεριφοράς
- Παρουσία στην οικογένεια συγγενή αβαθμού που έχει διαγνωστεί με σύνδρομο SDS

Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζονται στην βρεφική ηλικία με ενδείξεις καθυστέρησης ανάπτυξης, σιτιστικές δυσκολίες και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις. Η κλινική διάγνωση γίνεται συνήθως στα πρώτα χρόνια ζωής. Υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες η διάγνωση γίνεται στην παιδική ακόμα και στην ενήλικη ζωή. Για την κλινική διάγνωση πρέπει όχι μόνο να πληρούνται τα κλινικά κριτήρια (Ginzberg et al., 1999; Thornley et al., 2002; Woloszynek et al., 2004) αλλά να έχουν αποκλειστεί αιτίες που δύναται να προκαλέσουν παγκρεατική και μυελική ανεπάρκεια.

Η κλινική διάγνωση της παγκρεατικής ανεπάρκειας είναι δύσκολη αφού τα περισσότερα διαγνωστικά τεστ έχουν χαμηλή ευαισθησία ή/και ειδικότητα. Η διάγνωση περιπλέκεται ακόμα περισσότερο αφού >50% των ασθενών έχουν βελτίωση της παγκρεατικής λειτουργίας με την πάροδο της ηλικίας και επίσης τα συμπτώματα δυσασπορρόφησης εμφανίζονται μετά από απώλεια >98% της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Ασθενείς με παγκρεατική ανεπάρκεια έχουν χαμηλές τιμές θρυψινογόνου ορού (<6μg/L). Αν και οι χαμηλές τιμές του θρυψινογόνου ορού είναι ενδεικτικές παγκρετικής ανεπάρκειας, οι φυσιολογικές τιμές δεν μπορούν να αποκλείσουν την παγκρεατική ανεπάρκεια. Τιμές ελαστάσης κοπράνων <200μg/g είναι συμβατές με παγκρεατική δυσλειτουργία, ενώ <100μg/g είναι ενδεικτικές δυσασπορρόφησης λόγω παγκρεατικής ανεπάρκειας. Η μέθοδος εκλογής για την διάγνωση της ανεπάρκειας της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι η μέτρηση των παγκρεατικών ενζύμων μέσω διέγερσης με χολοκυστοκίνη

και σεκρετίνη. Η μέθοδος αυτή όμως δεν χρησιμοποιείται γιατί είναι επεμβατική.

Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση των επιπέδων της παγκρεατικής ισοαμυλάσης ορού είναι αξιόπιστη σε ηλικίες μεγαλύτερες από τριών χρονών ενώ του θρυψινογόνου σε ηλικίες μικρότερες από τριών χρονών. Έχει βρεθεί ότι στο 50% των παιδιών, μεγαλύτερα από τριών χρονών που πάσχουν από SDS, τα επίπεδα θρυψινογόνου ορού αυξάνονται στα φυσιολογικά επίπεδα. Η απεικόνιση του παγκρέατος με U/S ή CT αποκαλύπτει ένα μικρού μεγέθους για την ηλικία πάγκρεας και επιπλέον η MRI σε μια σειρά ασθενών SDS θετικοί για μετάλλαξη στο SBDS αποκάλυψε λιπώδη διήθηση του παγκρέατος με διατήρηση αναλλοίωτων των παγκρεατικών νησιδίων και των πόρων. Ο αιματολογικός φαινότυπος των ασθενών περιλαμβάνει κυρίως την ουδετεροπενία χρόνια ή διαλείπουσα καθώς και άλλες κυτταροπενίες, μακροκυττάρωση, αυξημένα επίπεδα HbF και υποκυτταρικό μυελό. Έλεγχος χρωμοσωμικής ευθραστότητας θα πρέπει να γίνεται για αποκλεισμό της αναιμίας Fanconi. Μυελόγραμμα και βιοψία μυελού είναι απαραίτητα για την αρχική εκτίμηση της κυτταροβρίθειας του μυελού (λιπώδης διήθηση, αναστολή ή καθυστέρηση της ωρίμανσης μίας ή περισσότερων σειρών της μυελικής σειράς, μυελοδυσπλασία), για τη διαφορική διάγνωση (π.χ. σύνδρομο Pearson), καθώς για τον έλεγχο των κυτταρογενετικών ανωμαλιών. Κυτταρογενετικά ευρήματα όπως i(7q) και del(20q) έχουν συσχετιστεί σε αυξημένο ποσοστό με SDS. Θα πρέπει να γίνεται ιολόγικος έλεγχος για αποκλεισμό Epstein-Barr, CMV, παρβοϊό B19 που δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν μυελική ανεπάρκεια και ανεπαρκή ανάπτυξη.

Όταν ένας ασθενής εμφανίζει μαζί με τις αιματολογικές και τις παγκρεατικές διαταραχές και σκελετικές ανωμαλίες τότε αυξάνονται πολύ περισσότερο οι πιθανότητες να έχει SDS. Απουσία ουδετεροπενίας ή διάρροιας δεν αποκλείει την διάγνωση αφού μπορούν να εμφανιστούν αργότερα ή και να μην εκδηλωθούν και καθόλου. Έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις ασθενών με SDS στις οποίες η νόσος εκδηλώθηκε 1) με μεμονωμένη ουδετεροπενία χωρίς ιστορικό διαρροιών, ανεπαρκούς πρόσληψης βάρους ή συγγενών ανωμαλιών 2) μεμονωμένη διάρροια χωρίς ουδετεροπενία 3) ανεπαρκής πρόσληψη βάρους χωρίς ουδετεροπενία ή

διάρροια 4) μεμονωμένη ήπια θρομβοκυτταροπενία σε ηλικία 12 ετών με αρχική διάγνωση ΜΔΣ με κυτταρογενετικό κλώνο del(q20) 5) σε ηλικία 17 ετών χωρίς ιστορικό κυτταροπενιών ή στεατόρροιας αλλά με ιστορικό συγγενή α' βαθμού (αδερφός) που πέθανε σε ηλικία 20 ετών από ΟΜΛ (Myers et al., 2014). Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι η κλινική διάγνωση του συνδρόμου SDS να είναι περίπλοκη για αυτό προτείνεται να ελέγχονται για μεταλλάξεις στο γονίδιο *SBDS* ακόμα και «πιθανοί» ασθενείς με SDS που δεν πληρούν τα κριτήρια. Ωστόσο υπάρχει και ένα 10% των ασθενών που αν και πληρούν τα κριτήρια για σύνδρομο SDS δεν φέρει μεταλλάξεις στο γονίδιο *SBDS*.

Προβληματισμοί προκύπτουν όταν ενώ πληρούνται τα κλινικά κριτήρια:

- δεν ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο *SBDS* γονίδιο (στο 10% των ασθενών),
- ανιχνεύεται μετάλλαξη στο ένα μόνο αλληλόμορφο
- ανιχνεύεται μετάλλαξη που δεν είναι ακόμα γνωστό αν είναι παθολογική ή όχι
- ανιχνεύονται μη γνωστοί πολυμορφισμοί σε ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ-ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ SDS

Δεν υπάρχει συσχέτιση των μεταλλάξεων του *SBDS* γονιδίου με τον φαινότυπο των ασθενών (Mäkitie et al., 2004; Orfali et al., 2004; Kawakami et al., 2005; Kuijpers et al., 2005)

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ SDS

Διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνεται από άλλες καταστάσεις που προκαλούν παγκρεατική ανεπάρκεια:

- 1) Κυστική ίνωση που εμφανίζεται με λοιμώξεις από το αναπνευστικό και διαταραχή της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η διαφορική διάγνωση γίνεται με το θετικό τεστ ιδρώτα και την απουσία ευρημάτων μυελικής ανεπάρκειας που παρατηρούνται στη κυστική ίνωση

- 2) Σύνδρομο Johanson-Bizzard η διάκριση γίνεται από τις χαρακτηριστικές ανωμαλίες και την ψυχοκινητική καθυστέρηση που εμφανίζουν οι ασθενείς, καθώς και την απουσία αιματολογικών ανωμαλιών
- 3) Σύνδρομο Pearson, είναι ένα σπάνιο μιτοχονδριακό σύνδρομο που εμφανίζει παγκρεατική ανεπάρκεια και μυελική δυσπλασία που μπορεί να διαφοροδιαγνωστεί από το SDS από το μυελόγραμμα και τις μοριακές μεθόδους.

Άλλα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας που μπορούν να εμφανίζουν παρόμοια συμπτώματα με το SDS είναι:

- Αναιμία Diamond Blackfan. Η **αναιμία Diamond-Blackfan** χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα της ερυθράς σειράς. Οι ασθενείς με DBA παρουσιάζουν συγγενείς ανωμαλίες και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λευχαιμίας και άλλων τύπων καρκίνου.
- Αναιμία Fanconi. Οι ασθενείς με **αναιμία Fanconi** παρουσιάζουν συγγενείς ανωμαλίες, προοδευτική δυσλειτουργία του μυελού των οστών, αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας καθώς επίσης και διαφόρων τύπων μικροκυτταρικού καρκίνου. Η έκθεση των λεμφοκυττάρων των ασθενών ή των ινοβλαστών τους σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες όπως MMC/DEB, καθώς επίσης στην υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση των χαρακτηριστικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών της νόσου (χάσματα, θραύσματα στα σκέλη των χρωμοσωμάτων, δικεντρικά ή δακτυλιοειδή χρωμοσώματα και τριακτινωτοί ή τετρακτινωτοί σχηματισμοί). Μονοσωμία 7, τρισωμία 8, 5q-, 7q-, 20q-, 3q+ , μεταθέσεις και ανασυνδυασμοί των χρωμοσωμάτων 1 και 3, αποτελούν τα συχνότερα κυτταρογενετικά ευρήματα.
- Συγγενής Δυσκεράτωση (DC). Είναι μια κληρονομική ανεπάρκεια του μυελού των οστών, του οποίου η διάγνωση αρχικά βασίστηκε στην κλινική τριάδα ονυχοδυστροφία, λευκοπλακία βλεννογόνου και υπέρχρωση δέρματος. Ο φαινότυπος της εμφανίζει πλέον μεγάλη

ετερογένεια με πολλές άτυπες μορφές. Οι ασθενείς με DC μπορεί να έχουν εκδηλώσεις από διάφορα συστήματα όπως το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό, το σκελετικό, το νευρολογικό, το ανοσολογικό, και τους οφθαλμούς. Κυτταροπενίες μπορεί να περιλαμβάνει οποιαδήποτε μεμονωμένη σειρά ή και πανκυττοπενία. Ο μυελός των οστών είναι τυπικά υποκυτταρικός, με ήπια δυσπλασία στην αρχή. Οι ασθενείς με DC έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση ΜΔΣ, ΟΜΛ, και συμπαγείς όγκους. Η παθοφυσιολογία της νόσου οφείλεται σε πρόωρη βράχυνση των τελομερών. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα (TINF2, TERC, TERT), αυτοσωμικό υπολειπόμενο (TERT, WRAP53 / TCAB1, CTC1, RTEL1, NHP2, NOP10), ή και φυλοσύνδετο χαρακτήρα (DKC1). Μεταλλάξεις σε 9 γνωστά μέχρι σήμερα γονίδια ανιχνεύονται στο 50% περίπου των ασθενών, οι οποίοι πληρούν τα κλινικά κριτήρια για DC. Η ανεπάρκεια του μυελού μπορεί να ανταποκριθεί σε χορήγηση ανδρογόνων ωστόσο η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων είναι η οριστική θεραπεία των αιματολογικών επιπλοκών

Οι παραπάνω καταστάσεις και η απλαστική αναιμία μπορούν να αποκλειστούν με την κλινική εξέταση και το μυελόγραμμα. Αυτές οι καταστάσεις δεν εμφανίζουν παγκρεατική ανεπάρκεια.

Παροδική ουδετεροπενία μπορεί να είναι αποτέλεσμα από φάρμακα ή λοιμώξεις. Κλινικά ευρήματα, επαναλαμβανόμενος εργαστηριακός έλεγχος και μοριακά διαγνωστικά τεστ μπορούν να διαφοροδιαγνώσουν το SDS από το σύνδρομο Kostmann (συγγενής ουδετεροπενία) και την ELA2- σχετιζόμενη ουδετεροπενία.

Όσον αφορά τις σκελετικές δυσπλασίες το σύνδρομο Cartilage-hair υποπλασία έχει γαστρεντερικά, σκελετικά, αιματολογικά και ανοσολογικά χαρακτηριστικά. Οι σκελετικές ανωμαλίες του συνδρόμου είναι χαρακτηριστικές και οι γαστρεντερικές διαταραχές είναι αποτέλεσμα λοιμώξεων και όχι παγκρεατικής ανεπάρκειας

ΘΕΡΑΠΕΙΑ-ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ SDS

Οι κύριες αιτίες θανάτου στα βρέφη είναι η δυσασπορρόφηση, οι λοιμώξεις, και η θωρακική δυστροφία. Σε μεγαλύτερους ασθενείς η κύρια αιτία θανάτου είναι η αιμορραγία και οι λοιμώξεις που σχετίζονται με αιματολογικές διαταραχές όπως η μυελική απλασία, η ουδετεροπενία, το ΜΔΣ και η οξεία λευχαιμία. Η θεραπεία είναι κυρίως υποστηρικτική και περιλαμβάνει μεταγγίσεις, παγκρεατική ένζυμα, αντιβιοτικά και παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυτάρρων (G-CSF). Η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με SDS πρέπει να γίνεται συλλογικά από παιδίατρο, παιδογαστρεντερολόγο, αιματολόγο, οδοντίατρο, ψυχολόγο και διαιτολόγο.

Οι ασθενείς με SDS πρέπει να παρακολουθούνται κάθε 3-4 μήνες με γενική αίματος καθώς και μια φορά τον χρόνο ή συχνότερα, αν υπάρχουν ενδείξεις, με μυελόγραμμα και οστεομυελική βιοψία με κυτταρογενετικό έλεγχο (Rothbaum et al., 2002). Σε συμπτωματική αναιμία απαιτούνται μεταγγίσεις με συμπυκνωμένα ερυθρά ενώ σε συμπτωματική θρομβοπενία (σοβαρή αιμορραγία) με αιμοπετάλια $<10.0000/L$ μεταγγίσεις με αιμοπετάλια. Σε περίπτωση χειρουργικής επέμβασης ή επεμβατικών μεθόδων μπορεί να απαιτηθούν μεταγγίσεις με φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα όταν οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχές πήξης λόγω ανεπάρκειας βιταμίνης Κ. Για την σοβαρή ουδετεροπενία, ειδικά σε ασθενείς με επαναλαμβανόμενες βακτηριακές ή μυκητιασικές λοιμώξεις χορηγούμε G-CSF. Οι ασθενείς συνήθως ανταποκρίνονται σε μικρές δόσεις (2-3 $\mu g/kg$ ανά 3 ημέρες) υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στις οποίες χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις και καθημερινή χορήγηση του παράγοντα. Ο σκοπός χορήγησης του G-CSF είναι να μειωθεί ο αριθμός των λοιμώξεων και όχι να επιτύχουμε φυσιολογικές αιματολογικές παραμέτρους.

Η οριστική θεραπεία της μυελικής απλασίας, του ΜΔΣ ή της λευχαιμίας είναι η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αν και φαίνεται ότι οι ασθενείς με SDS έχουν αυξημένο κίνδυνο θνητότητας μετά από μεταμόσχευση. Είναι ακόμα αδιευκρίνιστο αν ο αυξημένος κίνδυνος θνητότητας οφείλεται σε επιπλοκές από δυσλειτουργία των οργάνων ή σε αδιευκρίνιστη αντίδραση γενετικά καθορισμένη στα χημειοθεραπευτικά

φάρμακα. Ενδείξεις για μεταμόσχευση είναι η σοβαρή κυτταροπενία (αιμοσφαιρίνη $< 7 \text{ g/L}$, απόλυτος αριθμός πολυμορφοκυττάρων < 500 με επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και αιμοπετάλια $< 20.000/\text{L}$), το ΜΔΣ με αυξημένο αριθμό βλαστών (5-20%) και η εκδήλωση της λευχαιμίας. Δεν υπάρχουν ακόμα καθορισμένες οδηγίες για το πότε πρέπει οι ασθενείς να υποβάλλονται σε μεταμόσχευση, αν και υπάρχει σημαντική αύξηση της επιβίωσης όταν η μεταμόσχευση πραγματοποιείται στα αρχικά στάδια της νόσου (Yusuf et al., 2004). Ασθενείς με SDS που έχουν εμφανίσει ΜΔΣ ή λευχαιμία και υποβάλλονται σε μεταμόσχευση φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν μόνο μυελική ανεπάρκεια (Donadieu et al., 2005a). Έτσι φαίνεται λογικό οι ασθενείς με SDS να υποβάλλονται σε μεταμόσχευση πριν την εμφάνιση αιματολογικών επιπλοκών. Επιπλοκές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μετά από την μεταμόσχευση είναι η απόρριψη μοσχεύματος, παρενέργειες από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και υποτροπή της λευχαιμίας.

Οι ασθενείς με λοίμωξη που εκδηλώνονται με πυρετό ή οξέα συμπτώματα πρέπει να εκτιμούνται άμεσα κλινικά. Ανάλογα με την κλινική βαρύτητα η λοίμωξη μπορεί να αντιμετωπιστεί είτε με από του στόματος είτε ενδοφλέβια αντιβιοτική αγωγή.

Η θεραπεία της παγκρεατικής ανεπάρκειας περιλαμβάνει χορήγηση υποκατάστατων παγκρεατικών ενζύμων, δίαιτα με χαμηλά λιπαρά και λιποδιαλυτές πρωτεΐνες. Η αρχική δόση των παγκρεατικών ενζύμων πρέπει να είναι 2000 μονάδες λιπάσης /kgBσ / ημέρα. Οι οδηγίες για την μέγιστη δόση των παγκρεατικών ενζύμων (10.000 μονάδες λιπάσης /kgBσ / ημέρα) είναι ίδιες με της ινοκυστικής νόσου (Borowitz et al., 2009). Για την αύξηση της οστικής πυκνότητας μπορεί να χορηγηθούν ασβέστιο, βιταμίνη D, καθώς και να ακολουθούν οι ασθενείς συγκεκριμένο πρόγραμμα ασκήσεων. Η παγκρεατίνη υπάρχει σε όλα τα γεύματα και τις τροφές που περιέχουν πρωτεΐνη, λίπος ή υδατάνθρακες. Σε ασθενείς με επίμονη δυσαπορρόφηση παρά την επαρκή ποσότητα των παγκρεατικών ενζύμων μπορεί να χορηγηθεί ένας ανταγωνιστής των H_2 υποδοχέων ή αναστολέας αντλίας πρωτονίων. Επί παραμονής των συμπτωμάτων θα πρέπει να τίθεται η υποψία συνυπάρχουσας εντεροπάθειας. Οι κάψουλες θα πρέπει να καταπίνονται

ολόκληρες και όχι να μασιούνται γιατί το γαστρικό υγρό της διασπά. Η παγκρεατίνη αδρανοποιείται επίσης σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα επίπεδα των λιποδιαλυτών βιταμινών θα πρέπει να ελέγχονται κάθε 6-12 μήνες. Το ύψος και το βάρος των ασθενών πρέπει να ελέγχεται σε κάθε επίσκεψη. Αν παρά την σωστή διατροφή και την επαρκή ποσότητα των παγκρεατικών ενζύμων ο ασθενής δεν αυξάνει το βάρος του τότε θα πρέπει να αναζητηθούν άλλες αιτίες όπως γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, αλλεργία στο φαγητό ή εντεροπάθεια (Shah et al., 2010). Σε βαριές περιπτώσεις ανεπαρκούς πρόσληψης βάρους ή σιτιστικών δυσκολιών χρησιμοποιείται η τοποθέτηση γαστροστομίας.

Οι οστικές ανωμαλίες μπορούν να χρήζουν είτε ορθοπαιδική καθοδήγηση είτε χειρουργική παρέμβαση. Για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της οστεοπενίας χορηγείται βιταμίνη D και ασβέστιο καθώς επίσης ενθαρρύνονται οι ασθενείς να ακολουθούν ασκήσεις που οδηγούν σε αύξηση της οστικής πυκνότητας. Για την χρήση διφοσφωνικών σε ασθενείς με οστεοπόρωση δεν υπάρχουν δεδομένα. Συστήνεται για την διάγνωση αλλά και για την παρακολούθηση της οστεοπόρωσης έλεγχος με DEXA πριν την εφηβεία, στην εφηβεία αλλά και περιοδικά μετά την εφηβεία. Είναι σημαντικό να αποκλείονται σε ασθενείς με οστεοπενία άλλα ενδοκρινολογικά προβλήματα που δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν οστεοπενία όπως υποθυρεοειδισμός ή υποπαραθυρεοειδισμός.

Μελλοντικές θεραπείες (εικόνα 6) στοχεύουν σε εκλεκτική αναστολή των mTOR/STAT3 μονοπατιών τα οποία υπερεκφράζονται σε λευκοκύτταρα ασθενών με SDS. Έχει φανεί ότι η ραπαμυσίνη , ένας γνωστός mTOR αναστολέας, είναι ικανός να μειώσει την φωσφορυλίωση του STAT3 σε σημαντικά επίπεδα (Bezzetti et al., 2016).

ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σε περίπτωση που σε μία οικογένεια υπάρχει ιστορικό με άτομα νοσούντα από DBA ή SDS, είτε πρόκειται για παιδί είτε για κάποιο συγγενικό πρόσωπο, και οι γονείς έχουν διαγνωστεί ως φορείς αντίστοιχων μεταλλάξεων, τότε είναι απαραίτητη η προγεννητική διάγνωση προκειμένου να αποφευχθεί το ενδεχόμενο πιθανής κύησης ατόμου με DBA ή SDS.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι διάγνωσης της νόσημάτων είναι:

1. Η μοριακή διερεύνηση. Εάν έχουν ήδη ταυτοποιηθεί οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στους γονείς, γίνεται στοχοκατευθυνόμενη διερεύνησή τους αξιοποιώντας τις αντίστοιχες μοριακές μεθόδους που διατίθενται για ανάδειξη ελλείψεων, διπλασιασμών, ή σημειακών μεταλλάξεων (MLPA, PCR, ECMA, Sequencing).

2. Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD). Η μέθοδος PGD προαπαιτεί την εξωσωματική γονιμοποίηση (In vitro fertilization/IVF). Δεδομένου ότι θα έχει ταυτοποιηθεί το είδος της μετάλλαξης στους γονείς, μπορεί να γίνει διερεύνηση σε επίπεδο βλαστομεριδίων (πριν την εμφύτευση σε κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης) ώστε να γίνει προεπιλογή και να αποφευχθεί το ενδεχόμενο κύησης εμβρύου με DBA ή SDS. Κατά την μοριακή διερεύνηση, ελέγχονται τόσο η παρουσία της γνωστής για την οικογένεια μετάλλαξης, όσο η κατά HLA συμβατότητα με το πάσχον παιδί σε περίπτωση που χρειαστεί να αποτελέσει δότη μυελού των οστών για αυτό.

ΣΚΟΠΟΣ:

Τόσο σε διαγνωστικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο η μελέτη της αναιμίας Diamond Blackfan όσο και του συνδρόμου Shwachman Diamond απασχολεί παγκοσμίως την επιστημονική κοινότητα δεδομένης τόσο της μεγάλης ετερογένειας των νοσημάτων, όσο και της σοβαρότητας των κλινικών συμπτωμάτων τους. Όσον αφορά στον ελληνικό πληθυσμό, η συστηματική μελέτη τους γίνεται για πρώτη φορά. Η γονιδιακή μελέτη των ασθενών και των οικογενειών τους κρίνεται απαραίτητη για την κατανόηση της νόσου και την εξέλιξη των θεραπευτικών μεθόδων. Η συγκεκριμένη έρευνα σκοπεύει και επιθυμεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη μεθοδολογικών προσεγγίσεων καθώς επίσης να προσπαθήσει να απαντήσει σε σημαντικά και επίκαιρα για την επιστήμη ερωτήματα, δεδομένου ότι η έγκαιρη διάγνωση των νοσημάτων είναι απαραίτητη τόσο για τους ασθενείς, οι οποίοι πιθανόν να χρειαστεί να υποβληθούν σε μεταμόσχευση μυελού, όσο και για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Αν κάποιος από τους συγγενείς πάσχει (αφορά την DBA) ή είναι φορέας (αφορά το SDS) μιας μοριακής βλάβης, θα πρέπει σε περίπτωση ενδεχόμενης εγκυμοσύνης να κάνει τον απαραίτητο προγεννητικό έλεγχο. Η παρούσα μελέτη, περιλαμβάνει ασθενείς οι οποίοι παραπέμπονται από τα παιδιατρικά νοσοκομεία όλης της χώρας. Το ερευνητικό πρωτόκολλο και το έντυπο συγκατάθεσης των ασθενών εγκρίθηκαν από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γ.Ν.Π. 'Η Αγία Σοφία'.

Σκοποί της μελέτης είναι :

1. Η φαινοτυπική μελέτη και η ανάλυση του γονότυπου των Ελλήνων ασθενών με αναιμία Diamond-Blackfan και σύνδρομο Shwachman Diamond. Στην αναιμία Blackfan-Diamond θα πραγματοποιηθεί μοριακός έλεγχος των *RPS19*, *RPL5* και *RPL11* γονιδίων που είναι τα συχνότερα σε εμφάνιση, ενώ για το σύνδρομο Shwachman-Diamond θα πραγματοποιηθεί ανάλυση του *SBDS* γονιδίου.
2. Η ταυτοποίηση των πιο συχνών μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό.

3. Η ανίχνευση πασχόντων ή φορέων των παθολογικών μεταλλάξεων των γονιδίων με εξέταση των γονέων των ασθενών και άλλων μελών της οικογένειας,

Υλικό και Μέθοδοι

Συλλογή Ασθενών:

Όπως προαναφέρθηκε σκοπός είναι η καταγραφή όλων των ασθενών (παιδιατρικοί-ενήλικες) στον ελληνικό χώρο. Οι περισσότεροι παιδιατρικοί ασθενείς παρακολουθούνται στα μεγάλα παιδιατρικά κέντρα. Για την διευκόλυνση στη συλλογή των ασθενών αυτών ενημερώθηκε η Ελληνική Παιδιατρική Αιματολογία Ογκολογία και η Ελληνική Παιδιατρική Γαστρεντερολογική Εταιρεία. Επίσης για την προσέγγιση των ενηλίκων ασθενών έγινε ενημέρωση των κέντρων Μεσογειακής Αναιμίας και Αιμολυτικών αναιμιών όπου παρακαλούνται οι μεταγγισοεξαρτώμενοι ασθενείς. Τέλος αναρτήθηκαν δύο ιστοσελίδες, μία για κάθε νόσημα με σκοπό να προσεγγισθούν ασθενείς που δεν παρακολουθούνται συστηματικά σε κάποιο κέντρο. Η ιστοσελίδα για την αναιμία Diamond-Blackfan ανευρίσκεται στη διεύθυνση: <http://www.dba-greece.webs.com/> ενώ για το σύνδρομο Shwachman-Diamond: <http://www.sds-greece.webs.com/>.

Καταγραφή ασθενών:

Για την καταγραφή των ασθενών και την συλλογή των φαινοτυπικών και γονοτυπικών τους χαρακτηριστικών σχεδιάστηκε δελτίο καταγραφής ξεχωριστό για τα δύο νοσήματα καθώς και ηλεκτρονική βάση δεδομένων με την χρήση λογισμικού Microsoft Access.

Το δελτίο καταγραφής περιλαμβάνει:

- } Διαγνωστικά κριτήρια
- } Στοιχεία ασθενούς (ονοματεπώνυμο, μητρώνυμο, πατρώνυμο, διεύθυνση, τηλέφωνο)
- } Στοιχεία γέννησης
- } Μαιευτικό, ατομικό και οικογενειακό ιστορικό
- } Ευρήματα από την αντικειμενική εξέταση

- } Στοιχεία από την διάγνωση (εργαστηριακός έλεγχος, μυελόγραμμα διάγνωσης)
- } Κυτταρογενετικός έλεγχος και τεστ ιδρώτα
- } Παρούσα κατάσταση, παρούσα θεραπεία και πρόσφατος εργαστηριακός έλεγχος
- } Προηγούμενη Θεραπεία
- } Επιπλοκές
- } Μοριακός έλεγχος

Μεθοδολογία

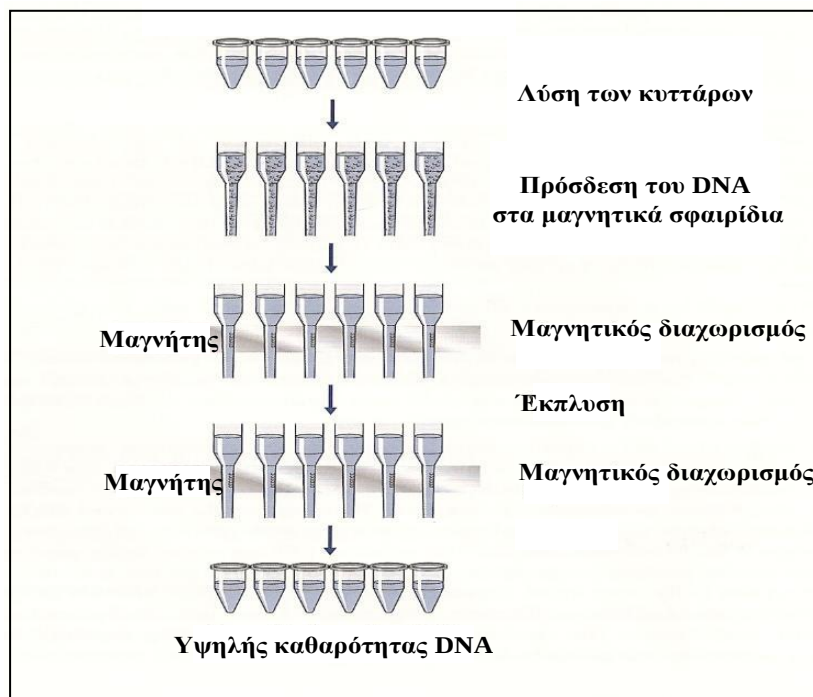
Η_Εργαστηρική μεθοδολογία περιλαμβάνει:

- Λήψη δειγμάτων περιφερικού αίματος
- Απομόνωση του DNA
- Μοριακή ανάλυση με τις κλασσικές μεθόδους και πιο συγκεκριμένα με:
 - Ενίσχυση της αλληλουχίας των γονιδίων *SBDS*, *RPS19*, *RPL11* και *RPL5* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).
 - Εφαρμογή τεχνικής ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων
 - Εφαρμογή τεχνικής RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) για την ανίχνευση των δύο συχνότερων 'hot spots' μεταλλάξεων στο *SBDS* γονίδιο
 - Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής των γονιδίων (Sequencing) *SBDS*, *RPS19*, *RPL11* και *RPL5*

I. Λήψη δειγμάτων περιφερικού αίματος και απομόνωση του DNA

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιούνται δείγματα αίματος που συλλέγονται σε σωληνάρια όγκου 2-4 cc που εμπεριέχουν EDTA. Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιείται αυτόματα με χρήση του MagAttract® DNA Blood Biorobot M48 της Qiagen® και του συστήματος του MagAttract DNA Blood Midi M48 Kit, Cat No 951356 (Qiagen®, USA)® σύμφωνα με το πρωτόκολλο και τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται βασίζεται στην πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K σε συνδυασμό με διαδικασίες εξαλάτωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών με αφυδάτωση και χρήση χαοτροπικών αλάτων (άλατα οξικού καλίου και οξικού αμμωνίου). Η διαφορά της αυτοματοποιημένης αυτής μεθόδου είναι η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στην επιφάνεια των οποίων προσδένεται το μόριο του DNA αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη φυγοκεντρήσεων για την απομόνωσή του. Μετά την πρόσδεση του DNA στα σφαιρίδια πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις ακολουθούμενες από μια τελική έκπλυση με απεσταγμένο νερό προκειμένου να αυξηθεί η καθαρότητα του DNA. Το έτοιμο προς επεξεργασία DNA διατηρείται σε θερμοκρασίες από 4°C έως -80°C (Εικόνα 7).

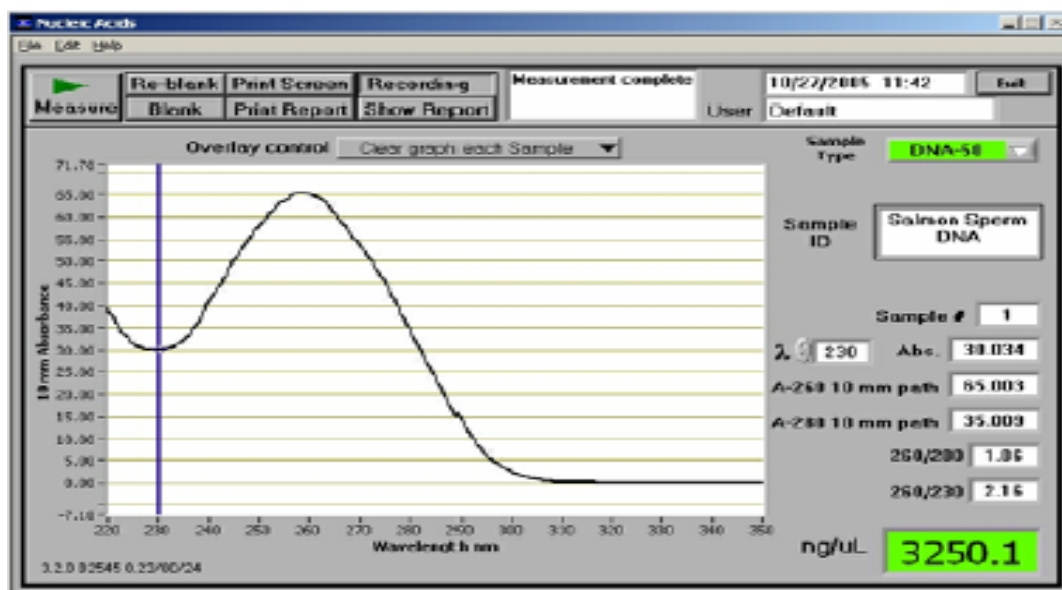


Εικόνα 7: Η διαδικασία απομόνωσης στο MagAttract Biorobot Blood M48



Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του ολικού DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιείται σε ένα φασματοφωτόμετρο (220-275nm) το Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). Η διαδικασία απαιτεί 1μl δείγματος και το όριο ανίχνευσης είναι 2 ng/μl. Η αναλογία της απορρόφησης στα 260 nm και στα 280nm χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της καθαρότητας του DNA και RNA. Μια αναλογία ~ 1,8 είναι αποδεκτή για το DNA, ενώ μια αναλογία ~ 2,0 είναι αποδεκτή για το RNA. Αν η αναλογία είναι μικρότερη, μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων ουσιών που απορροφούν ισχυρά στα 280 nm. Ο λόγος A260/A280 επηρεάζεται σημαντικά και από το pH, με το χαμηλότερο pH να οδηγεί σε χαμηλότερο λόγο. Για τον λόγο A260/A230 τιμές μεγαλύτερες από 2, αντιπροσωπεύουν καθαρό DNA από οργανικούς διαλύτες. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Χαρακτηριστικό γράφημα φωτομετρικού προσδιορισμού DNA στο όργανο Nanodrop-1000 Spectrophotometer.

II. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε για την «*in vitro*» ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή και πολλαπλασιασμός μέχρι και 10^6 πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η τεχνική PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών σταδίων, τα οποία διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Αρχικά γίνεται αποδιάταξη των αλυσίδων σε υψηλές θερμοκρασίες ($>95^{\circ}\text{C}$) και ακολουθεί επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία που ρυθμίζεται ανάλογα με το T_m των εκκινητών (θερμοκρασία υβριδισμού, *annealing*). Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται πρόσδεση των εκκινητών στις ομόλογες περιοχές της αλληλουχίας-στόχου. Στο τρίτο στάδιο επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων τμημάτων (επιμήκυνση) με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για 20-40 κύκλους ανάλογα με το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.

Πειραματική πορεία

Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια για την επιτυχία του PCR. Ο σχεδιασμός της αλληλουχίας των εκκινητών (πρόσθιος και ανάστροφος) έγινε με την βοήθεια λογισμικού προγράμματος (IDT Intergrated DNA Technologies - SciTools - PrimerQuest) που διατίθεται δωρεάν στον ιστοχώρο (<http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>). Ένα δεύτερο σημαντικό βήμα για την επιτυχία του PCR είναι η εύρεση του T_m των εκκινητών. Ο υπολογισμός του T_m έγινε με βάση τον τύπο: $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ όπου A, T, C, G ο αριθμός των αντίστοιχων βάσεων στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή. Για κάθε ζεύγος εκκινητών προκύπτουν δύο διαφορετικά T_m που υποδηλώνουν το εύρος με τις μεγαλύτερες πιθανότητες που μπορούν να δουλέψουν οι εκκινητές, παρέχοντας το βέλτιστο προϊόν. Τέλος απαραίτητο για κάθε ζεύγος εκκινητών, που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο εξώνιο, είναι και ο προσδιορισμός στην αντίδραση του PCR της συγκέντρωσης του $[Mg]^{2+}$. Στους πίνακες 6, 7, 8 και 9 αναγράφονται οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων, των τεσσάρων γονιδίων (*RPS19*, *RPL5*, *RPL11* και *SBDS*) καθώς και οι θερμοκρασίες υβριδισμού και οι συγκεντρώσεις $[Mg]^{2+}$ που προσδιορίστηκαν για κάθε ζεύγος εκκινητών.

Τα μείγμα της αντίδρασης της συμβατικής PCR περιλαμβάνει τα εξής διαλύματα: Multiplex Taq DNA πολυμεράση, διάλυμα Q, $[Mg]^{2+}$, H_2O , πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή και DNA του δείγματος προς εξέταση. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι συνολικού όγκου 20 μ l. Η Taq πολυμεράση αποτελεί το $\frac{1}{2}$ (10 μ l) του συνολικού όγκου της αντίδρασης, το Qsl το 1/10 (2 μ l) του συνολικού όγκου της αντίδρασης και η συγκέντρωση του $[Mg]^{2+}$ αναγράφεται στους πίνακες 6, 7, 8 και 9. Η ποσότητα του DNA που προστίθεται ποικίλει συνήθως από 1-3 μ l και διαμορφώνεται στα 50-150ng όπως προκύπτει από την συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογιζόμενη με βάση την φωτομέτρηση. Η ποσότητα των εκκινητών ποικίλει από 1-2 μ l ανά αντίδραση από αρχικό διάλυμα αποθήκευσης (Stock) συγκέντρωσης 5 ή 10

mM. Η αντίδραση συμπληρώνεται σε τελικό όγκο 20 μ l με H₂O. Όλοι οι όγκοι λαμβάνονται με πιπέτες ακριβείας. Η παρασκευή και η ανάμιξη του μίγματος της αντίδρασης πραγματοποιούνται σε μικρού μεγέθους (0.2 ή 0.5ml) θερμοανθεκτικά σωληνάρια. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη παρασκευή και χρήση των αντιδραστηρίων για την αποφυγή ενδεχόμενης επιμόλυνσης. Οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Έγινε προσπάθεια ομαδοποίησης των συνθηκών με βάση τα διαφορετικά T_m που προκύπτουν, με σκοπό τη μείωση του αριθμού των αντιδράσεων.

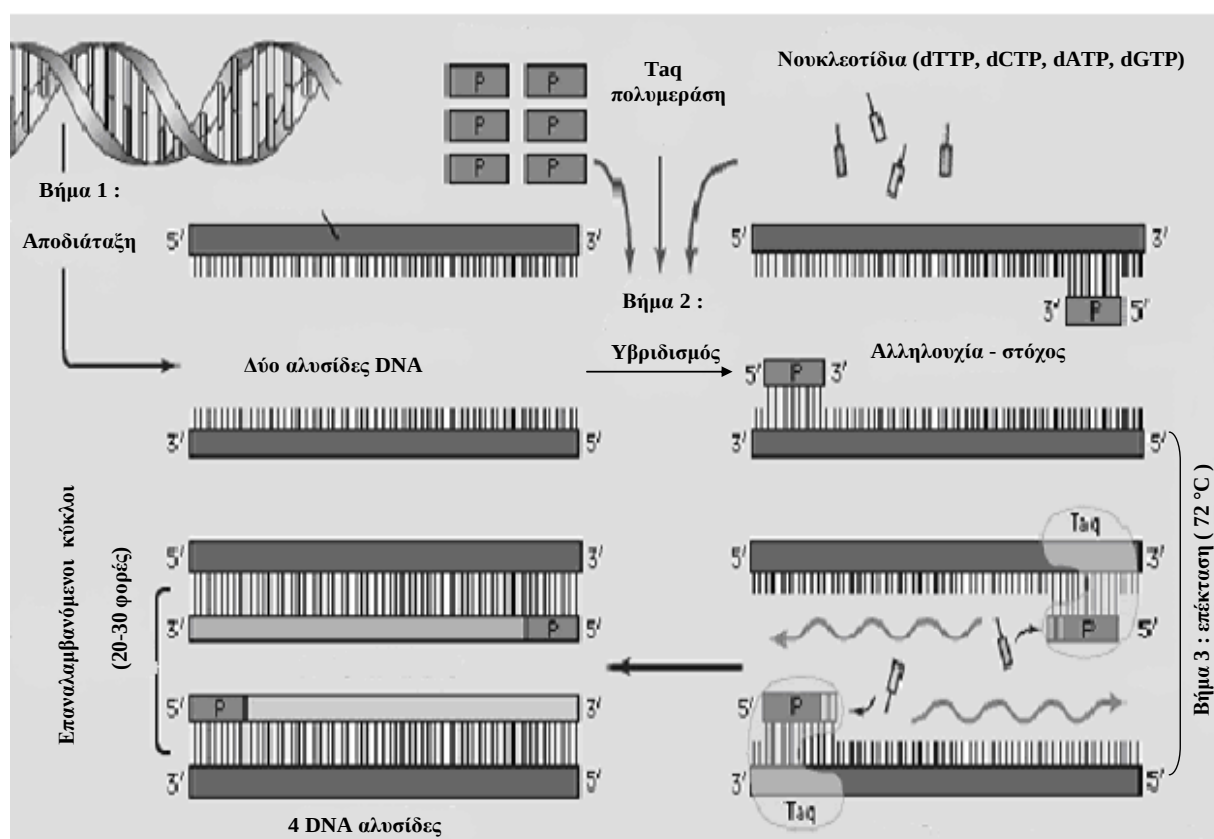
Οργανολογία συμβατικής PCR

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν οι θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers) Biometra T3000 Thermocycler (Biometra, Germany), Techne TC-412 (Techne[®] Incorporated) και Applied Biosystems (Veriti[®] 96- Well Thermal Cycler). Οι μονάδες αυτές διαθέτουν υποδοχείς για σωληνάρια των 0,2 ml και μπορούν να υποβάλλουν τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των 3°C και 99°C έτσι ώστε να επιτρέπουν τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεθόδου PCR τα προϊόντα της αντίδρασης παραλαμβάνονται και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (Certified Molecular Biology Agarose/ Bio-Rad Laboratories), η οποία αποτελεί την κυριότερη μέθοδο για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου των βάσεων τους. Εκτός από το μοριακό μέγεθος του DNA, η συγκέντρωση της αγαρόζης, η εφαρμοζόμενη τάση ρεύματος, η παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών, καθώς και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA στην πηκτή αγαρόζης. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε

ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (παρασκευάζεται με αραιώση 1/20 του διαλύματος παρακαταθήκης 20X TBE και περιέχει 242 gr Tris, 125,4 gr Boric Acid και 14,88gr EDTA) υπό σταθερή τάση 125 V για 20-25 min. Παράλληλα ηλεκτροφορείται και δείγμα δείκτη μοριακών βαρών DNA (1 kb DNA ladder, Promega ή φάγο φX174 New England Biolabs), για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης. Η αгарόζη εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων και αυτά διαχωρίζονται σε «ζώνες» με βάση το διαφορετικό τους μήκος. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία στα 312 nm λόγω εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού, από χημικές ουσίες, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide/ 10 mg/ml), που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με αυτό. Η απεικόνιση των προϊόντων επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ψηφιακή κάμερα.



Εικόνα 9: Τυπικός κύκλος μιας αντίδρασης PCR

Η PCR εφαρμόσθηκε για τον ποιοτικό προσδιορισμό των εξωνίων των γονιδίων *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* και *SBDS*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το κάθε εξώνιο δίνονται στους πίνακες 6, 7, 8, 9. Οι πρόσθιοι εκκινητές φέρουν την κοινή αλληλουχία M13 η οποία είναι η 5'gtaaaacgacggccagt 3' και οι ανάστροφοι εκκινητές την κοινή αλληλουχία M13 5'caggaaacagctatgac 3'.

Πίνακας 6. Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων *RPS19* γονιδίου

ΕΞΩΝΙΑ RPS19	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	Μέγεθος προϊόντων (bp)	Tm	[Mg] ²⁺
ΕΞΩΝΙΟ 1	RPS19 - 1 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT GTGAAGGACGGAAGATGAT-3'	603	60	0
	RPS19- 1 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC TCTGAGGCTTCGGCGTCCG-3'			
ΕΞΩΝΙΑ 2+3	RPS19-2+3 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT GCTCTGTTAGTGCGATCCAG-3'	814	60	2,5
	RPS19- 2+3 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC GGAGTACCAAGTTATCGAATG-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 4	RPS19- 4 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT TGGGTGTTAGTGTGTGTT-3'	403	58	2,5
	RPS19- 4 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC GCTGGGCAGACTATGCAG-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 5	RPS19- 5 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT AGCTCGTTAGAATGCACC-3'	321	58	0
	RPS19- 5 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC CACCTGGGCTGTGCCCT-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 6	RPS19- 6 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT CCCTTGAGACCCAGTTTCCA -3'	355	62	0
	RPS19- 6 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC CATTTGAACCCAGAAGGCGG-3'			

Πίνακας 7. Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών *RPL5* γονιδίου

ΕΞΩΝΙΑ RPL5	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	Μέγεθος προϊόντων (bp)	Tm	[Mg] ²⁺
ΕΞΩΝΙΟ 1	RPL5 – 1 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT GCCCTCTCTCTTTACACGTCAC-3'	220	62	0
	RPL5- 1 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC TAGGCTGGCATACGGGCAAGAAA-3'			
ΕΞΩΝΙΑ 2+3	RPL5-2+3 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT AGTTTGGCACAATTACCGGTGCTG-3'	727	52	1,5
	RPL5-2+3 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC ACACCATGTGCTTTGCTTCCCAAG-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 4	RPL5-4 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT TGTCTTCCTCCGTACCCAAGTTCA-3'	540	52	0
	RPL5-4 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC AACTGGAAGCAAGCACTCTCCTGA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 5	RPL5-5 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT AGCAAGTGGATCTGGTGAAAGGGT- 3'	472	60	0
	RPL5-5 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC ACCTAGGCATACAGCAGGCATTCA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 6	RPL5-6 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT ACGGGACTGATGGCAGCTACTAAA-3'	439	58	1,5
	RPL5-6 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC CTTGAAGTCTCCACACTTGAGCA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 7	RPL5-7 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT ATGAAACCAAGTACTGTTTGCT-3'	233	58	0
	RPL5-7 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC TCACGCAGAGCTAGTCGAGTT-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 8	RPL5-8 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT AAATTAAATATTCTATTCTCTTC-3'	257	52	3,5
	RPL5-8 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC TATAAGGTTTCATAAGAATAAGAGC-3'			

Πίνακας 8. Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων *RPL11* γονιδίου

ΕΞΩΝΙΑ RPL11	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	Μέγεθος προϊόντων (bp)	Tm	[Mg] ²⁺
ΕΞΩΝΙΟ 1	RPL11- 1 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT ATGCGCCTCTCTTCCTCGT-3'	173	62	0
	RPL11- 1 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC CCTGCCATGGATGGCGACG-3'			
ΕΞΩΝΙΑ 2	RPL11-2 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT CATTCAAGGTCTTCGTTACGA-3'	411	62	0
	RPL11-2 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC CACCTCTTGGCCGGCTCATGA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 3	RPL11- 3 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT CTGTGCTGTGGATGAAATCTTAT -3'	359	62	3,5
	RPL11- 3 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC AAATGTAACTTATCTACATGTGT-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 4	RPL11- 4 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT AGTTTCATTGACTTCTGTT-3'	351	56	0
	RPL11- 4 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC AGCTGCAACTCAACATGTG-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 5	RPL11- 5 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT CTCCAGAATCCATTGGGCTG-3'	360	56	0
	RPL11- 5 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC GTCAAGATGCCCAATATTCT-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 6	RPL11- 6 F (πρόσθιος)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT CATGTATCAATCAGATGTGAA-3'	283	62	0
	RPL11- 6 R (ανάστροφος)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC AGGATGACGGGGTTGTTACCA-3'			

Πίνακας 9. Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών SBDS γονιδίου

ΕΞΩΝΙΑ SBDS	ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5'-3')	Μέγεθος προϊόντων (bp)	Tm	[Mg] ²⁺
ΕΞΩΝΙΟ 1a	SBDS – 1a F (πρόσθιος)	5'-GGCGTGGAAGATGGCGTA-3'	411	60	0
	SBDS – 1a R (ανάστροφος)	5'-CTACTCACACGCCGCTCC-3'			
ΕΞΩΝΙΑ 1b	SBDS -1b F (πρόσθιος)	5'-GCGGAGCGGCGTGTGAGTA-3'	360	60	1,5
	SBDS -1b R (ανάστροφος)	5'-CACCAGATGTACCCACAAC-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 2	SBDS -2 F (πρόσθιος)	5'-TTGGGGGGTAAGAAA -3'	442	52	3,5
	SBDS -2 R (ανάστροφος)	5'-ACCAAGTTCTTTATTATTAGA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 3	SBDS -3 F (πρόσθιος)	5'-TTTCTCTCCATCCAGTTAC-3'	324	52	2,5
	SBDS -3 R (ανάστροφος)	5'-TTTGATGACATGAGAA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 4	SBDS -4 F (πρόσθιος)	5'-GAAGAAATTGCATTCT-3'	291	54	3,5
	SBDS -4 R (ανάστροφος)	5'-GACGTTTACAACATCTAAA-3'			
ΕΞΩΝΙΟ 5	SBDS -5 F (πρόσθιος)	5'-GGAAGTTAAAGCTGAGTT-3'	265	54	0
	SBDS -5 R (ανάστροφος)	5'-ATGAAACAGTGCCGTC-3'			

Πίνακας 10. Κατηγοριοποίηση των συνθηκών PCR για την ενίσχυση του DNA με βάση τα εξώνια

ΕΞΩΝΙΑ	ex1a SBDS, ex1b SBDS, ex2 SBDS, ex3 SBDS, ex4 SBDS, ex5 SBDS		ex1 RPL5, ex2+3 RPL5, ex4 RPL5, ex5 RPL5, ex6 RPL5, ex8 RPL5		Ex1-6 RPL11, ex2+3 RPS19, ex4 RPS19, ex5 RPS19, ex6 RPS19		ex7 RPL5, ex1 RPS19	
Στάδιο PCR								
Ενεργοποίηση της Multiplex Taq DNA πολυμεράσης	95° C	15min	95° C	15min	95° C	15min	95° C	15min
Αποδιάταξη του DNA	95° C	1min	95° C	1min	95° C	1min	95° C	1min
Υβριδισμός εκκινητών	52° C	1min	52° C	1min	54° C	1min	58° C	1min
Επέκταση εκκινητών	72° C	1min	72° C	1min	72° C	1min	72° C	1min
Τελική επέκταση των εκκινητών	72° C	10min	72° C	10min	72° C	10min	72° C	10min
Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι	33		32		32		35	

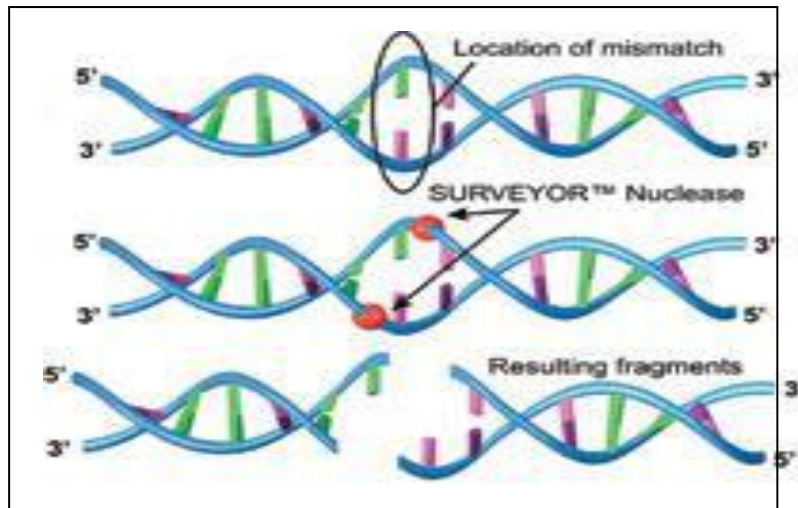
III. Ανίχνευση μεταλλάξεων μέσω πρωτοκόλλου ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis)

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα για την μελέτη ασθενειών που οφείλονται σε αλλοιώσεις του μορίου του DNA (όπως προσθήκες, ελλείψεις, αντικαταστάσεις βάσεων και διπλασιασμούς) είναι κυρίως η DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε γέλη ακρυλαμίδης με χρήση αποδιατακτικού), όπως και η SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση με βάση τον πολυμορφισμό της διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA), η οποία μάλιστα τα τελευταία χρόνια κατέστη πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση με τη χρήση συστημάτων φθορισμού. Επίσης η DHPLC (Denaturing High- Performance Liquid Chromatography, Αποδιατακτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) χρησιμοποιείται

ευρύτητα. Οι τεχνικές αυτές και ιδιαίτερα η SSCP και η DHPLC δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις χαρτογράφησης πολλαπλών μεταλλάξεων στο προς ανάλυση τμήμα DNA, και δεν βοηθούν στον εντοπισμό της θέσης της μετάλλαξης. Αναφορά θα πρέπει να γίνει επίσης και στην τεχνική PTT (Protein Truncation Test, Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης), η οποία όμως απαιτεί δείγμα RNA ως αρχικό υλικό και είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις ανίχνευσης μεταλλάξεων που διαταράσσουν τη συνέχεια της μετάφρασης (nonsense mutations).

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση μεταλλάξεων είναι και αυτές που βασίζονται σε τεχνολογίες με τη χρήση ενζύμων. Ήδη από τη δεκαετία του 1970 είναι γνωστή στην επιστημονική κοινότητα η ύπαρξη της οικογένειας των νουκλεασών S1, οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να διασπούν ετεροδιμερή που φέρουν λανθασμένο ζευγάρωμα βάσεων. Η εφαρμογή τους ωστόσο είναι περιορισμένη, δεδομένου ότι το όξινο περιβάλλον που απαιτούν για να δράσουν οδηγεί σε ξεδίπλωμα περιοχών πλούσιων σε A+T και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μη-ειδική αποικοδόμηση του μορίου του DNA Shenk et al, 1975.

Σημαντική πρόοδος στον τομέα των ενζυμικών τεχνικών για την ανίχνευση μεταλλάξεων αποτέλεσε η ανακάλυψη μιας καινούριας ενδονουκλεάσης που απομονώθηκε από το σέλινο και στην οποία δόθηκε το όνομα CEL I. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει οποιοδήποτε λάθος στην αλληλουχία του DNA (mismatch) και να διασπά ετεροδιμερή στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας στο σημείο της αλλαγής. Η CEL I έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων τόσο σε ποικιλία φυτών, όσο και στο γονίδιο *BRCA1* (Yang 2000, Oleykowski 1998). Στην οικογένεια των CEL I νουκλεασών ανήκει και το ένζυμο Surveyor[™] το οποίο έχει την ικανότητα να κόβει και τις δύο αλυσίδες DNA ενός ετεροδιμερούς μεταξύ φυσιολογικού και μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την πέψη παρατηρούνται σε συμβατικές πηκτές αγαρόζης. (Εικόνα 15)



Εικόνα 10 : Δράση του ενζύμου Surveyor™
(www.transgenomic.com)

Το 2007 στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Χωρεμίου Ερευνητικού Κέντρου αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatch Analysis) βασισμένο στη χρήση του ενζύμου Surveyor™. Η τεχνική βελτιστοποιήθηκε αναφορικά με τις συνθήκες των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται (θερμοκρασία, χρόνος επώασης των δειγμάτων, συγκέντρωση Mg^{2+} , μήκος τμημάτων DNA προς ανάλυση, τύπος μετάλλαξης). Ήταν η πρώτη φορά που μια ενζυμική μέθοδος εφαρμόστηκε για την μελέτη των μεταλλάξεων μονογονιδιακών ασθενειών και προσφέρει μια εναλλακτική βάση που μπορεί να υιοθετηθεί από οποιοδήποτε μοριακό εργαστήριο (Vogiatzakis et al., 2007). Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση αλλοιώσεων στα γονίδια *RPL5*, *RPL11*, *RPS19* και *SBDS*.

Η χρήση του ενζύμου Surveyor™ για την ανίχνευση μεταλλάξεων περιλαμβάνει τέσσερα στάδια :

1. Πολλαπλασιασμό της προς μελέτη αλληλουχίας, καθώς και μιας γνωστής αλληλουχίας μέσω αντίδρασης PCR
2. Υβριδισμός και δημιουργία ετεροδιμερών

Στο στάδιο αυτό αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη των αλυσίδων DNA των δειγμάτων και σχηματισμός ετεροδιμερών σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne® TC-412). Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Οι συνθήκες για την αποδιάταξη και το σχηματισμό των ετεροδιμερών.

Στάδιο	Συνθήκες	
Διαχωρισμός αλυσίδων DNA	95° C	2 min
Σταδιακή δημιουργία ετεροδιμερών	85° C	1 min
	50° C	1 min
Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι	2	

Πίνακας 12. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την πέψη με το ένζυμο Surveyor™.

Διαλύματα	Προστιθέμενος Όγκος (μl)
Surveyor Nuclease W	0.5
Surveyor Nuclease Enhancer W	0.5
BSA 10% (v/v)	0.5
Προϊόν PCR	10
Συνολικός όγκος	11.5

Για την αντίδραση απαιτείται όγκος δείγματος (προϊόντος PCR) 10μl (πίνακας 12) εκτός από την περίπτωση φυλοσύνδετων κληρονομικών νοσημάτων, οπότε και για δείγματα αρρένων ασθενών απαιτείται ανάμιξη 5 μl του προς εξέταση δείγματος με 5 μl προϊόντος PCR φυσιολογικού αρρένου ατόμου.

3. Πέψη των ετεροδιμερών που προέκυψαν στο 2^ο στάδιο με το ένζυμο Surveyor™.

Μετά το στάδιο της αποδιάταξης και του σχηματισμού των ετεροδιμερών τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο και ακολουθεί το στάδιο της πέψης με το ένζυμο Surveyor™. Τα συστατικά τα οποία προστίθενται στον αρχικό όγκο 10μl του προϊόντος PCR είναι i) 0,5 μl Surveyor Nuclease W (Surveyor Mutation Detection Kit/ Transgenomic®, UK), ii) 0,5 μl Surveyor Nuclease Enhancer W (Surveyor Mutation Detection Kit/ Transgenomic®, UK) και iii) 0,5 μl BSA 10% (v/v) (Bovine Serum Albumin/ Παρασκευάζεται από διάλυμα παρακαταθήκης Bovine Serum Albumin Acetylated 10mg/ml, Promega USA). Μετά την ανάμιξη των συστατικών τα δείγματα επωάζονται στους 46°C για περίπου 35 min. Ακολούθως τα προϊόντα διαχωρίζονται σε πηκτή αγαρόζης 2% (w/v). Τα δείγματα αναμιγνύονται με 4 μl χρωστικής Orange G (Παρασκευάζεται από διάλυμα παρακαταθήκης 6X Orange Loading Dye Solution/ Fermentas, Canada) και κατάλληλος όγκος δείγματος (7 μl) φορτώνεται στην πηκτή

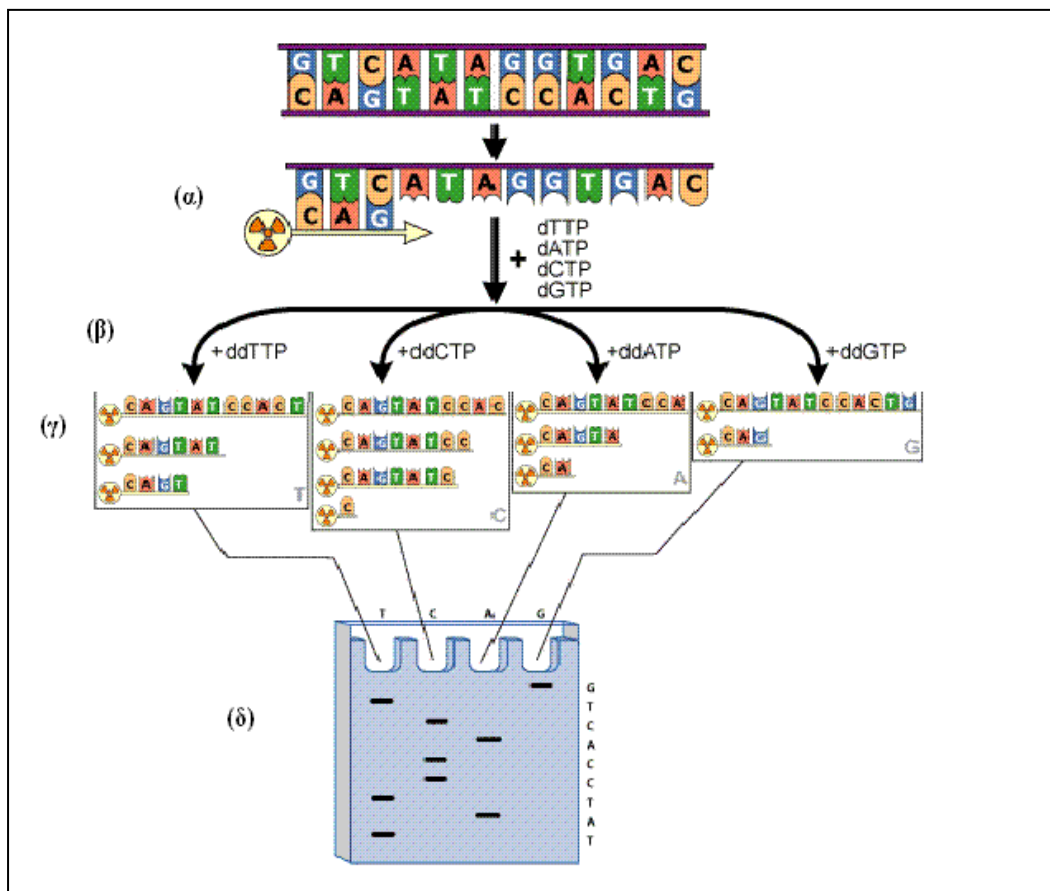
IV. Άμεσος προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA (αλληλούχηση, Sequencing)

Το 1977 οι Fred Sanger και Alan R. Coulson δημοσίευσαν δύο εργασίες σχετικά με μια τεχνική για τον ταχύ προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA παρέχοντας στην παγκόσμια ερευνητική κοινότητα ένα σημαντικό εργαλείο για την αποκρυπτογράφηση γονιδίων και αργότερα ολόκληρων γονιδιωμάτων.

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger, είναι μια τροποποιημένη τεχνική PCR η οποία βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), και τα

2', 3' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα (Εικόνα 11). Για την πραγματοποίηση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο Sanger, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας-εκκινητής υβριδίζεται στον 3' → 5' κλάδο του προς προσδιορισμό μορίου και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης, επεκτείνεται με κατεύθυνση 5' → 3', συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3' άκρου του εκκινητή και του 5' άκρου του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου (dNTP) που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα τέσσερις αντιδράσεις στις οποίες το ένα από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα dNTPs είναι ραδιοσημασμένο (συνήθως με ³⁵S). Κάθε μια από τις τέσσερις αντιδράσεις φέρει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα από τα τέσσερα ddNTPs το οποίο εξαιτίας της έλλειψης της 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊκής αντίδρασης και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Το συγκεκριμένο ddNTP είναι και αυτό που δίνει το όνομα της κάθε αντίδρασης. Τελικά τα σχηματιζόμενα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υψηλής διακριτικής ικανότητας (τα προϊόντα κάθε αντίδρασης σταματούν σε διαδοχικές θέσεις εντός της πηκτής ανάλογα με το μοριακό τους βάρος) και η αλληλουχία του ελεγχόμενου DNA μπορεί να "διαβαστεί" απευθείας από την πηκτή. Ειδική προσοχή κατά την πραγματοποίηση της μεθόδου Sanger δίνεται στην αναλογία ddNTP : dNTP που χρησιμοποιείται σε κάθε μια από τις τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις, ώστε να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση και να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας DNA.

Σταθμό στην τεχνολογία αλληλούχησης του DNA αποτέλεσε η ανάπτυξη και η χρήση αυτόματων αναλυτών (DNA sequencers) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων. Η χρήση αυτής της τεχνολογίας σε συνδυασμό με την ανάπτυξη εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων αλληλούχησης DNA περιορίζει τις αντιδράσεις από 4 σε μία και αυτοματοποιεί α) την ηλεκτροφόρηση, β) την ανίχνευση του σήματος και γ) την ανάγνωση της αλληλουχίας. Η μεγάλη καινοτομία οφείλεται στην κατάργηση της ραδιενεργούς σήμανσης και στη χρήση φθορίζουσών ουσιών αντί αυτής. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται αποτελεί τροποποίηση της ενζυμικής μεθόδου του Sanger.



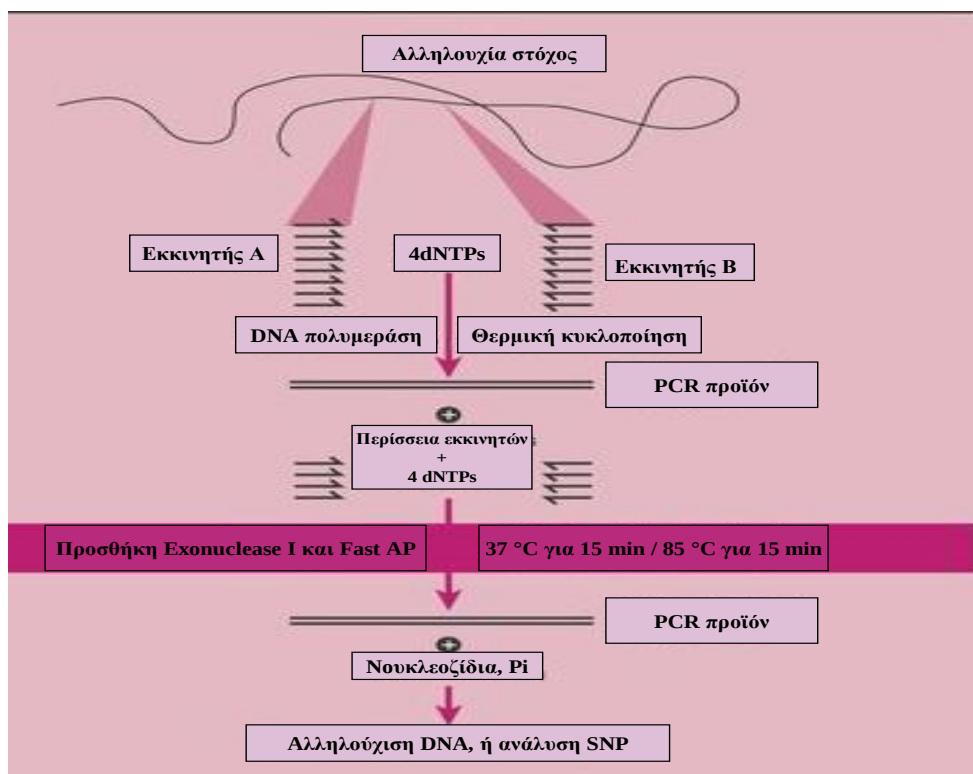
Εικόνα 11: Αρχή ενζυμικής μεθόδου αλληλούχισης του DNA κατά Sanger.

Καθαρισμός προϊόντων PCR

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα προϊόντα PCR για την αλληλούχιση των δειγμάτων, γίνεται ενζυμικός καθαρισμός ενός σταδίου που περιλαμβάνει την αποικοδόμηση και απομάκρυνση τυχόν περίσσειας εκκινητών και την αποφωσφορυλίωση των dNTPs κατόπιν προσθήκης του ενζύμου Exostar-Illustra.

Αναμιγνύονται 2,5 μl PCR προϊόντος με 1 μl Exostar-1. Το μίγμα επωάζεται σε θερμικό κυκλοποιητή Techne TC-412 στους 37°C για 15 min προκειμένου να καταστραφεί η περίσσεια εκκινητών και dNTPs και στη

συνέχεια στους 85°C για 15 min προκειμένου να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα που συμμετέχουν. Τα προϊόντα που έχουν υποστεί την διαδικασία αυτή μπορούν στη συνέχεια να φυλαχτούν στους - 20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Καθαρισμός PCR προϊόντων. (www.transgenomic.com)

Μετά το πέρας της διαδικασίας καθαρισμού τα προϊόντα PCR τοποθετούνται σε πάγο και προετοιμάζεται το μίγμα της αντίδρασης PCR-sequencing το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά. (Πίνακας 13). Όλοι οι όγκοι λαμβάνονται με πιπέττες ακριβείας και το μίγμα της αντίδρασης μοιράζεται σε σωληνάρια ίσου αριθμού με τον αριθμό των προσδιοριζόμενων δειγμάτων. Οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Η διαδικασία της μεθόδου των θερμικών κύκλων παρουσιάζεται στην εικόνα 13. Για την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το DYEnamic™ ET dye terminator kit, US 81090 B (MegaBACE™ - GEHealthcare, UK Ltd)

Πίνακας 13 : Συστατικά της αντίδρασης PCR – sequencing.

Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μl)
Πρόσθιος εκκινητής 5μM (εκκινητής m13)	0,2μM (Συγκέντρωση)
H ₂ O	6,6
Reagent premix	2
Προϊόν PCR	1
Συνολικός όγκος	10
Ανάστροφος εκκινητής 10 μM	0,2μM (Συγκέντρωση)
H ₂ O	6,8
Reagent premix	2

Προϊόν PCR	1
------------	---

Πίνακας 14 : Συνθήκες της αντίδρασης PCR – sequencing	
Στάδιο	Συνθήκες
Αποδιάταξη του DNA	96°C / 10 sec
Υβριδισμός εκκινητών	55°C / 5 sec
Επέκταση εκκινητών	60°C / 4min

} 25 κύκλοι

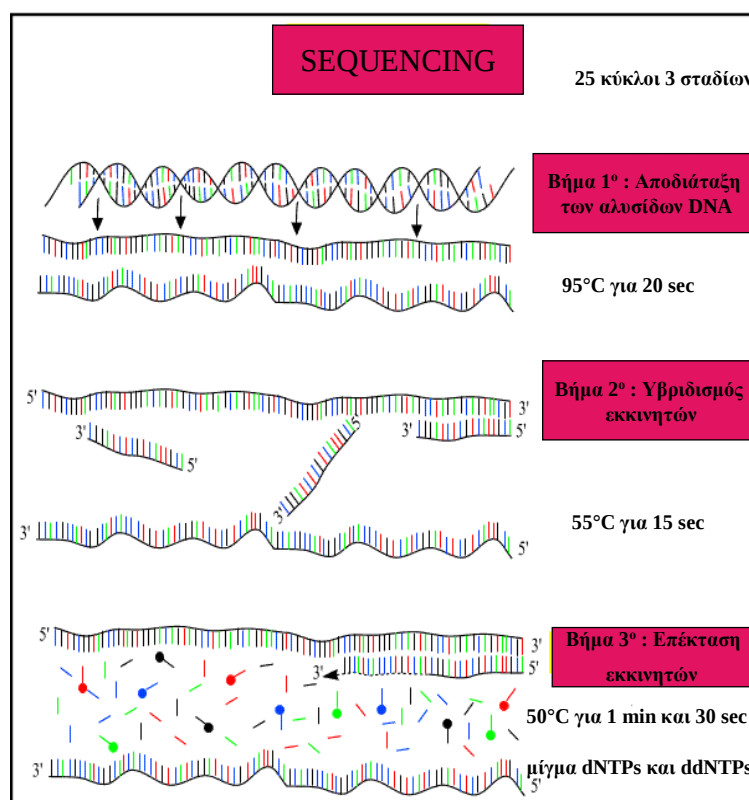
Καθαρισμός της αντίδρασης sequencing με αιθανόλη

1. Σε σωληνάριο “universal” των 15 ml, προετοιμάζεται το μίγμα αιθανόλης (απόλυτη αιθανόλη 100%)/ οξικού αμμωνίου (NH_4Ac / 7,5 M) 4% για την καταβύθιση του DNA προϊόντος της αντίδρασης «sequencing». Σε κάθε δείγμα προστίθενται 29 μl μίγματος και το πιάτο των 96 θέσεων τοποθετείται στην ψύξη για 30 min.
2. Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στα 2210 rpm για 30 min.
3. Φυγοκέντρηση του πιάτου σε ανάποδη θέση στις 200 rpm για 2 min στους 4 °C.
4. Προσθήκη 50 μl αιθανόλης 70%.
5. Φυγοκέντρηση στις 2200 rpm για 3 min στους 4°C.

6. Φυγοκέντρωση του πιάτου σε ανάποδη θέση στις 200 rpm για 3 min στους 4 °C.

7. Αφήνεται το πιάτο σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει για περίπου 10 min και μετά προστίθενται 10 μl φορμαμίδιο.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον αυτόματο αναλυτή MegaBACE 1000 της εταιρείας GE Healthcare. Ο αναλυτής έχει τη δυνατότητα ανάγνωσης 96 δειγμάτων ταυτόχρονα. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων που παράγονται από την ενζυμική σύνθεση επιτυγχάνεται μετά από τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis). Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται μέσω της μέτρησης της ακτινοβολίας φθορισμού που εκπέμπουν τα επισημασμένα τμήματα DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, όταν περνούν από ορισμένο σημείο έπειτα από διέγερση με κατάλληλη πηγή laser. Τα φάσματα εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλοεπικαλύπτονται.



Εικόνα 13 : Συνοπτική περιγραφή της αντίδρασης PCR- sequencing.

V. Αξιολόγηση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων

Τα περιοριστικά ένζυμα είναι βιοχημικά "ψαλίδια" που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων στη διπλή έλικα του DNA και κόβουν και τις δυο αλυσίδες της σε συγκεκριμένες θέσεις. Πολλά από αυτά αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής. Οι περισσότερες από τις θέσεις περιορισμού έχουν συμμετρία γύρω από έναν άξονα δευτέρας τάξεως, δηλαδή η αλληλουχία που αναγνωρίζεται είναι παλίνδρομη και οι θέσεις διάσπασης είναι τοποθετημένες συμμετρικά. Οι τομές σε αντίποδα σημεία δίνουν συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα, που έχουν ειδική συγγένεια το ένα για το άλλο και είναι γνωστά ως συνεκτικά ή κολλώδη άκρα.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα Acil, Bsu36I και HindIII για το χαρακτηρισμό των τριών πιο συχνών αλλοιώσεων στο *SBDS* γονίδιο. Συγκεκριμένα το Acil αναγνωρίζει την μετάλλαξη c.258+2 T<C στο ιντρόνιο 2-3, το Bsu36I αναγνωρίζει την μετάλλαξη c.183-184 TA<CT στο εξώνιο 2 και το HindIII αναγνωρίζει την μετάλλαξη c.460-1 G<A στο ιντρόνιο 3-4.

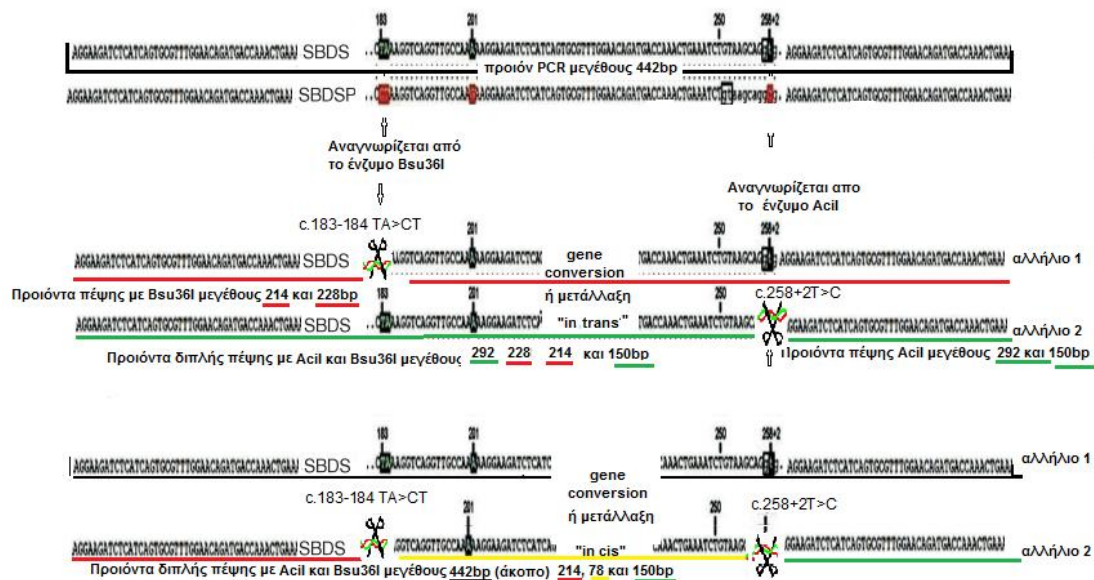
Αντιδραστήρια και οργανολογία

- ♦ Περιοριστικό ένζυμο Acil 10,000U/ml (1000u) (Biolabs, New England). Το kit περιλαμβάνει και ρυθμιστικό διάλυμα Buffer B 10X (pH 7.9).
- ♦ Περιοριστικό ένζυμο Bsu36I 10,000U/ml (1000u) (Biolabs, New England). Το kit περιλαμβάνει και ρυθμιστικό διάλυμα Buffer B 10X (pH 7.9).
- ♦ Περιοριστικό ένζυμο HindIII 10,000U/ml (1000u) (Biolabs, New England). Το kit περιλαμβάνει και ρυθμιστικό διάλυμα Buffer B 10X (pH 7.9).

- ♦ Επωαστικός κλίβανος Incucell Convention Incubator 55L (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Germany) (Εικόνα 15).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι απλή και περιλαμβάνει πέψη των δειγμάτων (προϊόντα PCR) με με το αντίστοιχο κατά περίπτωση ένζυμο και επώασή σε θερμοκρασία 37° C σε επωαστικό κλίβανο (Εικόνα 15) για περίπου 4 ώρες για τα ένζυμα Acil και Bsu36I και 24 ώρες για το ένζυμο Hind III με βάση τις οδηγίες του πρωτοκόλλου. Για να καθορίσουμε αν οι μεταλλάξεις c.183-184 TA>CT και c.258+2T>C ήταν στο ίδιο (cis) ή σε διαφορετικό αλληλόμορφο (trans) σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη των προϊόντων του PCR του εξωνίου 2, ταυτόχρονα από τα ένζυμα Acil και Bsu36I.. Αρχικά έγινε πέψη με το Acil ένζυμο για 24 ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε πέψη με την προσθήκη του Bsu36I και τον υπόλοιπων συστατικών για 24 ώρες ακόμα. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης μετά από μονή και διπλή πέψη με τα ένζυμα Acil και Bsu36I αναγράφονται στην εικόνα 14.)

Τα προϊόντα που προκύπτουν από την πέψη των περιοριστικών ενζύμων Acil και Bsu36I ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης 2%(Certified PCR Low Melt Agarose , BioRad) ενώ από το ένζυμο Hind III σε πηκτή αгарόζης LE (1,5% :1,5%)(Agarose LE , Analytical Grade , Promega εταιρεία και χαρακτηριστικά



Εικόνα 14. Αναμενόμενα αποτελέσματα πέψης μετά από μονή και διπλή πέψη με τα ένζυμα AcilI και Bsu36I.

Το AcilI αναγνωρίζει την μετάλλαξη c.258+2 T<C και το Bsu36I αναγνωρίζει την μετάλλαξη c.183-184 TA<CT. α) Το αρχικό προϊόν πριν την πέψη με τα ένζυμα β) Πέψη του αρχικού προϊόντος (442 bp) με μονή και διπλή πέψη όταν οι μεταλλάξεις c.183-184 TA<CT και c.258+2 T<C είναι σε διαφορετικά αλληλόμορφα "in trans". Τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν είναι 292bp, 228bp, 214 bp και 150 bp γ) Πέψη του αρχικού προϊόντος (442 bp) με διπλή πέψη όταν οι μεταλλάξεις c.183-184 TA<CT και c.258+2 T<C είναι στο ίδιο αλληλόμορφο "in cis". Τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν είναι 442bp, 214 bp, 150 bp και 78bp



Εικόνα 15. Ο επωαστικός κλίβανος Incucell Convention Incubator 55L

(MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Germany).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DBA

Χαρακτηριστικά ασθενών

Συνολικά 20 ασθενείς παραπέμφθηκαν για έλεγχο DBA. Από τους 20 ασθενείς οι 18 (11 αγόρια, 7 κορίτσια) πληρούσαν τα κριτήρια για DBA και ακολούθησε μοριακή ανάλυση. Οι ασθενείς δεν εμφανίζουν μεταξύ τους συγγένεια. Όλοι οι ασθενείς ήταν Ελληνικής καταγωγής με εξαίρεση ένα ασθενή από την Αλβανία. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών καταγράφονται στον πίνακα 15. Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 3.94 ± 3.13 μηνών.

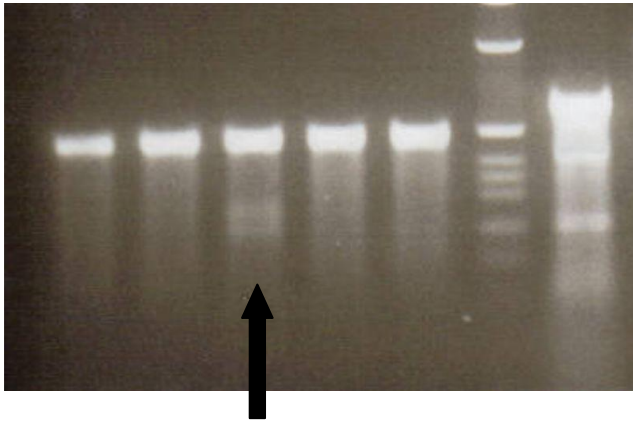
Μοριακή Ανάλυση

Σε 7 από τους 18 ασθενείς ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις (πίνακας 15). Συγκεκριμένα 3 ασθενείς φέρουν μοριακές αλλοιώσεις στο γονίδιο *RPS19* (c.3G>A, c.13_14Ins A, c.384-385 delAA), 3 ασθενείς στο γονίδιο *RPL5* (c.169-172 delAACA, c.197_198 insA, c. C390G) και ένας ασθενής στο γονίδιο *RPL11* (c.223C>T). Οι μεταλλάξεις c.197_198insA (p.Y66X) και c.C390G (p.Y130X) δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Θεωρήθηκαν όμως παθολογικές γιατί και οι δύο έχουν ως αποτέλεσμα δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης (εικόνα 17, 24). Από τις 7 περιπτώσεις, μόνο σε 4 (c.13_14Ins και c.3G>A στο *RPS19*, c.197_198 insA στο *RPL5* και η c.223C>T στο *RPL11*) υπήρξε δυνατότητα μοριακού ελέγχου των γονέων, ο οποίος ανέδειξε ότι οι μεταλλάξεις (προέκυψαν «de novo» χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η πιθανότητα ύπαρξης γαμετικού μωσαϊκισμού).

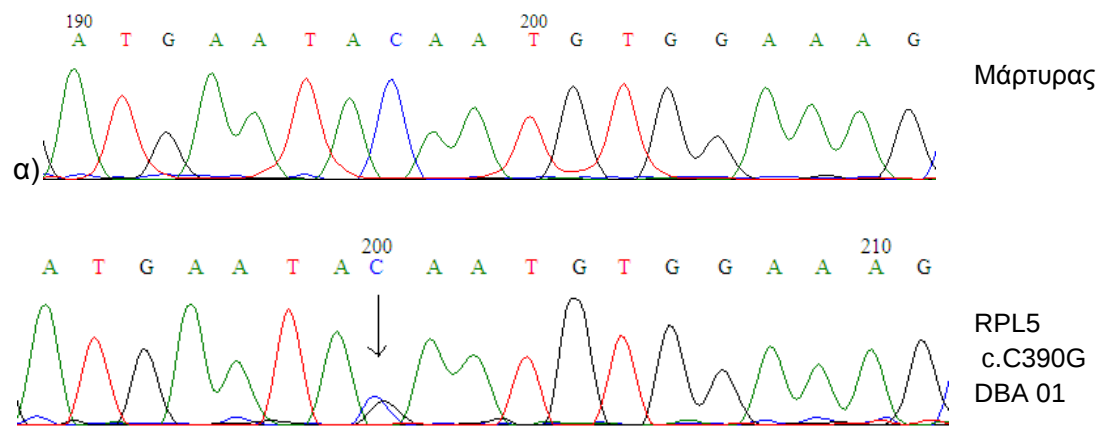
Στις εικόνες 16 και 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεχνικών ECMA και αλληλούχησης για τον ασθενή DBA01 που φέρει την μετάλλαξη c. C390G (p.Y130X) στο εξώνιο 5 του γονιδίου *RPL5*. Ο ίδιος ασθενής φέρει και μια δεύτερη μη παθολογική νουκλεοτιδική αλλαγή την c.71+81 ins C στο ιντρόνιο 2-3 στο γονίδιο *RPS19*. Ο κληρονομικός χαρακτήρας της μετάλλαξης δεν ήταν δυνατόν να αξιολογηθεί καθώς δεν ήταν εφικτό να μελετηθούν οι γονείς του.

ECMA

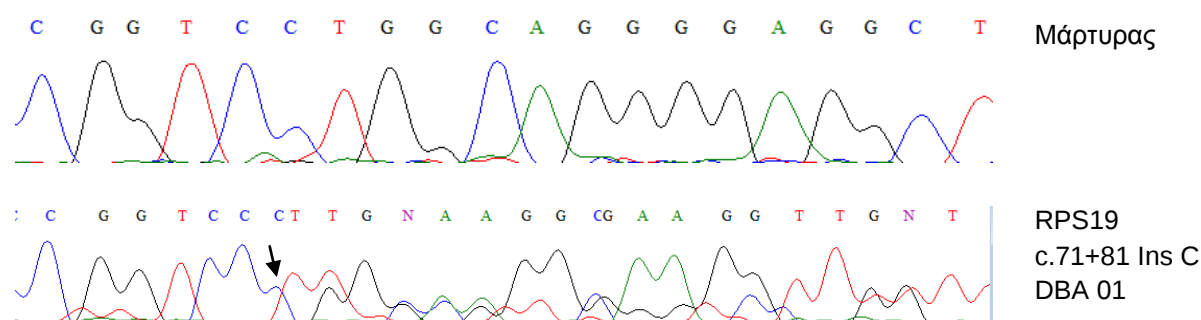
S03 S04 S02 WT2 S11 SL



Εικόνα 16 : Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την εφαρμογή πρωτοκόλλου ECMA στον ασθενή DBA 01, σε τρεις ακόμα ασθενείς (DBA 03, DBA04, DBA 11) καθώς επίσης και σε ένα φυσιολογικό μάρτυρα (WT2) για το εξώνιο 5 του *RPL5* γονιδίου.



β)

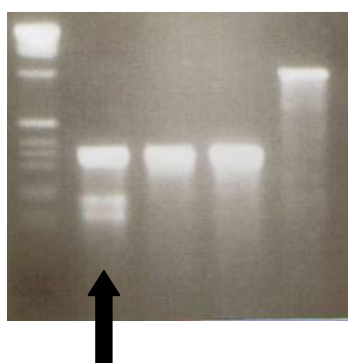


Εικόνα 17 : α) Αλληλούχηση του εξωνίου 5 του *RPL5* γονιδίου για τον ασθενή DBA 01 και του μάρτυρα, όπου παρατηρείται η μετάλλαξη c. C390G στο εξώνιο 5 (p.Y130X). β) Αλληλούχηση του ιντρονίου 2-3 του γονιδίου *RPS19* για τον ασθενή DBA 01 και του μάρτυρα, όπου παρατηρείται η μη παθολογική νουκλεοτιδική αλλαγή την c.71+81 ins C.

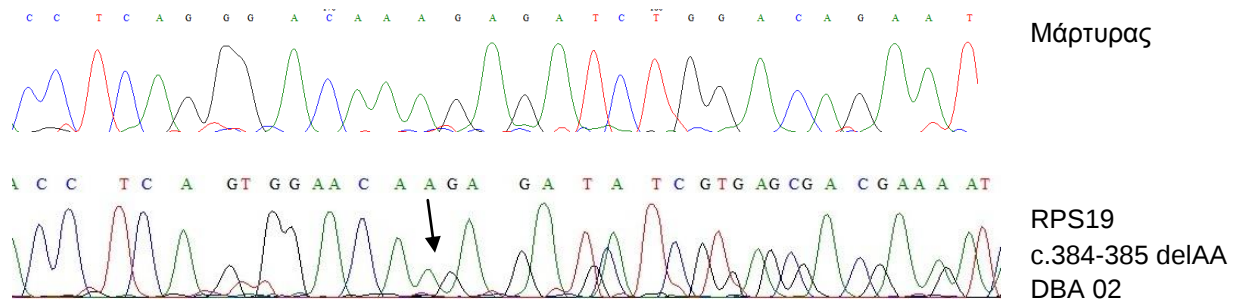
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τον ασθενή DBA 02 που φέρει την μετάλλαξη c.384-385 delAA (p.Asp130SerfsX23) στο εξώνιο 5 του γονιδίου *RPS19*. (Εικόνα 18, 19)

ECMA

SL S02 S01 WT3



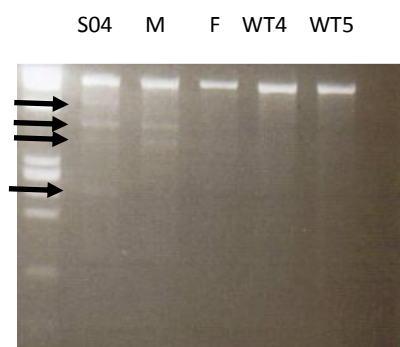
Εικόνα 18 : Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την εφαρμογή πρωτοκόλλου ECMA στον ασθενή DBA 02, στον ασθενή DBA 01 καθώς επίσης και σε ένα φυσιολογικό μάρτυρα (WT3) για το εξώνιο 5 του *RPS19* γονιδίου.



Εικόνα 19 : Αλληλούχηση του εξωνίου 5 για την ασθενή DBA 02 και έναν φυσιολογικό μάρτυρα, όπου παρατηρείται η μετάλλαξη c.384-385 delAA (p.Asp130SerfsX23) στο εξώνιο 5 του γονιδίου *RPS19*.

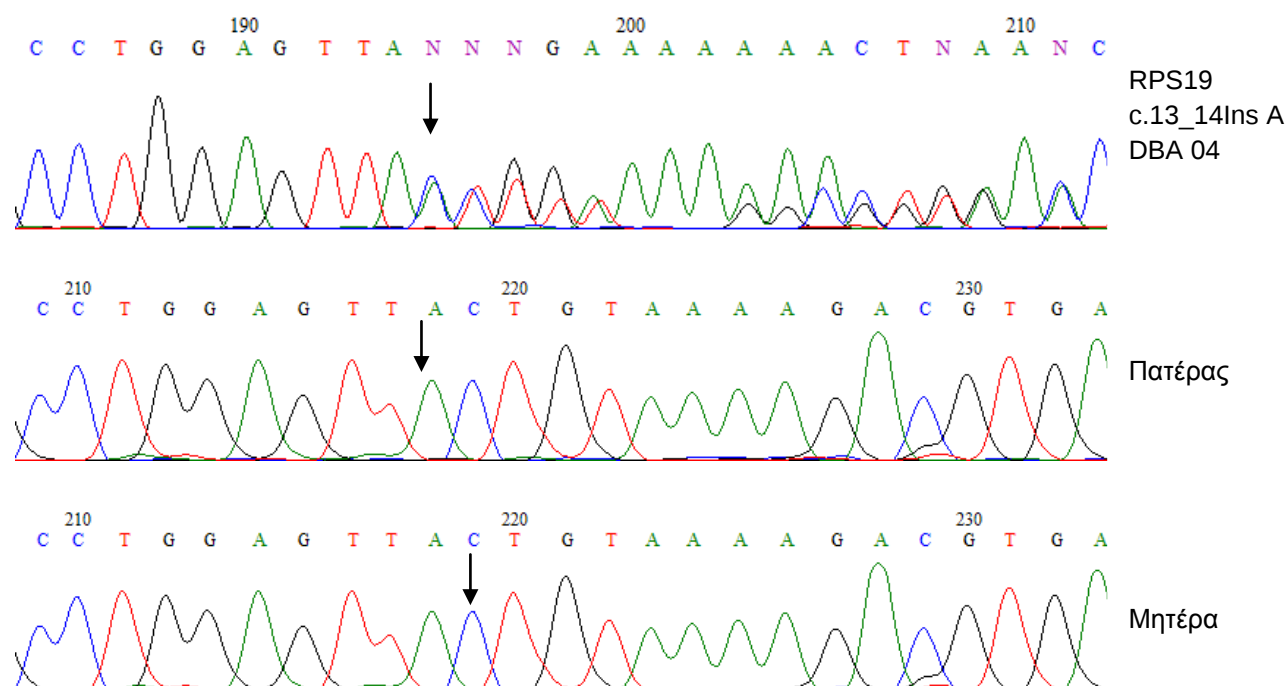
Η ασθενής DBA 04 φέρει την μετάλλαξη *RPS19*: c.13_14Ins A (p.Thr5AsnfrX46), στο εξώνιο 2 του γονιδίου καθώς επίσης και τις νουκλεοτιδικές *RPS19* αλλαγές c.71+81 ins C και c.71+89 G>C στο ιντρόνιο 2-3 του γονιδίου. Από τη μελέτη των γονεϊκών δειγμάτων υποδείχθηκε ο ‘de novo’ χαρακτήρας της μετάλλαξης c.13_14Ins A ενώ επιτρέπει και ο χαρακτηρισμός των νουκλεοτιδικών αλλαγών c.71+81 ins C και c.71+89 G>C στο ιντρόνιο 2-3 του γονιδίου *RPS19* ως μητρικής προέλευσης. (Εικόνα , 20, 21)

ECMA

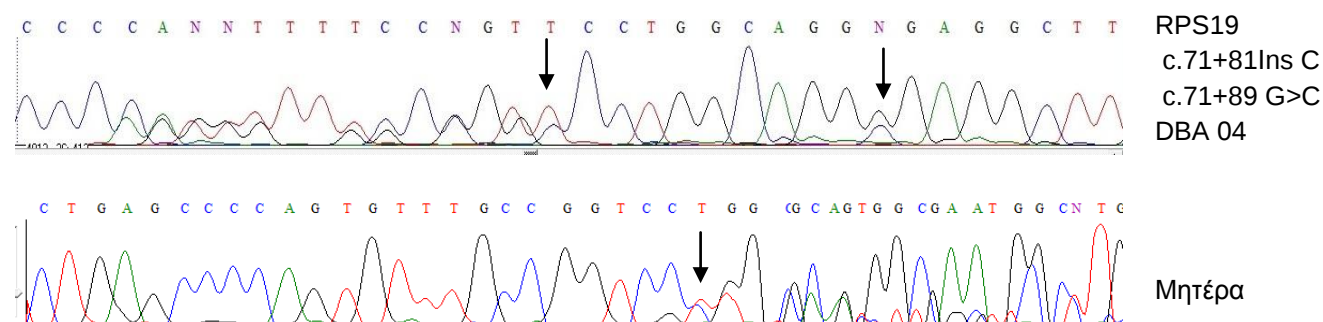


Εικόνα 20: Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων ECMA στην ασθενή DBA 04 για το εξώνιο 2 του *RPS19* γονιδίου. Η μητέρα (M) του ασθενούς φέρει επίσης αλλοιώσεων στο ECMA με διαφορετικό όμως πρότυπο από το παιδί γιατί φέρει μόνο τις νουκλεοτιδικές αλλαγές c.71+81 ins C και c.71+89 G>C στο ιντρόνιο 2-3 του *RPS19*. Ο πατέρας (F) του παιδιού δεν φέρει καμία ένδειξη μετάλλαξης.

α)

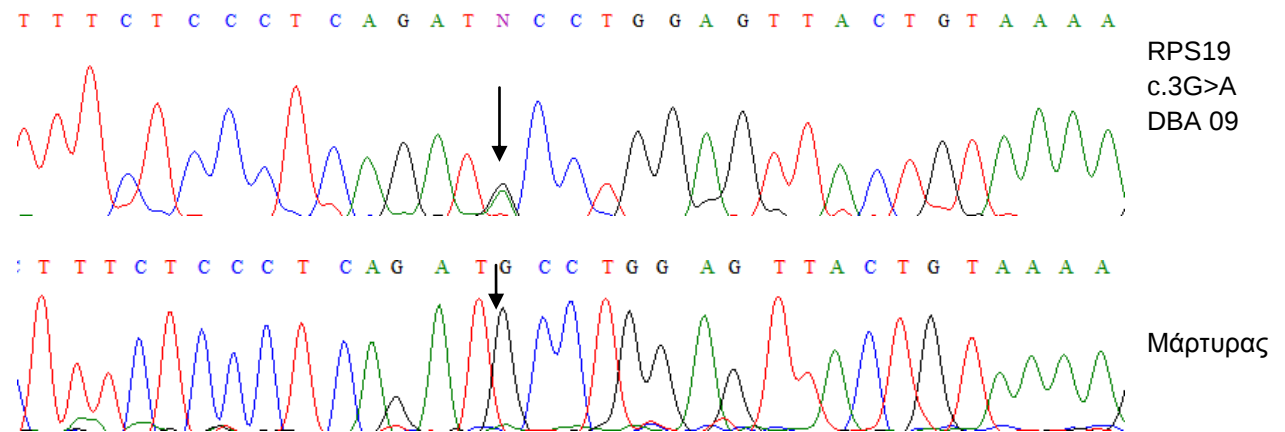


β)



Εικόνα 21 : α) Αλληλούχηση του εξωνίου 2 του *RPS19* για την ασθενή DBA 04 στην οποία παρατηρείται η μετάλλαξη c.13_14Ins A (p.Thr5AsnfrX46) και τους γονείς της οι οποίοι φέρουν φυσιολογική αλληλουχία β) Αλληλούχηση του ιντρωνίου 2-3 του *RPS19* γονιδίου για την ασθενή DBA 04 στην οποία παρατηρούνται οι μη παθολογικές νουκλεοτιδικές αλλαγές στο ιντρόνιο 2 του *RPS19* γονιδίου, (c.71+81Ins C, c.71+89 G>C) τις οποίες έχει κληρονομήσει από την μητέρα της. Η παρουσία δύο μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης στα ομόλογα αλληλόμορφα της ασθενούς αναιρούν την αναμενόμενη εικόνα αλλαγής του πλαισίου με την ταυτόχρονη ανάγνωση διαφορετικών νουκλεοτιδίων επαναφέροντας εικόνα φυσιολογικού προτύπου αλληλούχησης σε σύγκριση με της μητέρα.

Η μετάλλαξη *RPS19*: c.3G>A (p. Met1Ile), ταυτοποιήθηκε στο εξώνιο 2 του γονιδίου *RPS19* στον ασθενή DBA 09 και χαρακτηρίστηκε ως de novo. (Εικόνα 22)

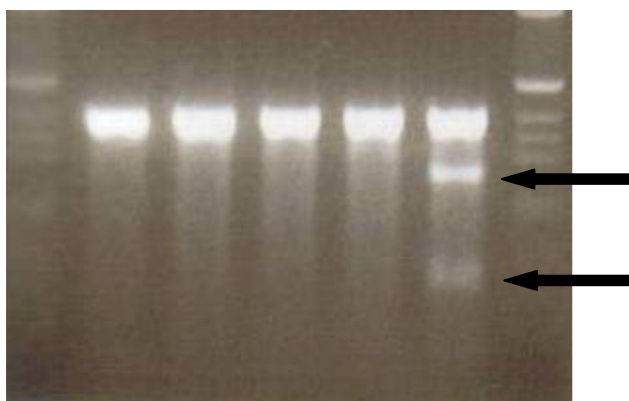


Εικόνα 22 : Αλληλούχηση του εξωνίου 2 του γονιδίου *RPS19* για τον ασθενή DBA 09 στην οποία παρατηρείται η μετάλλαξη c.3G>A.

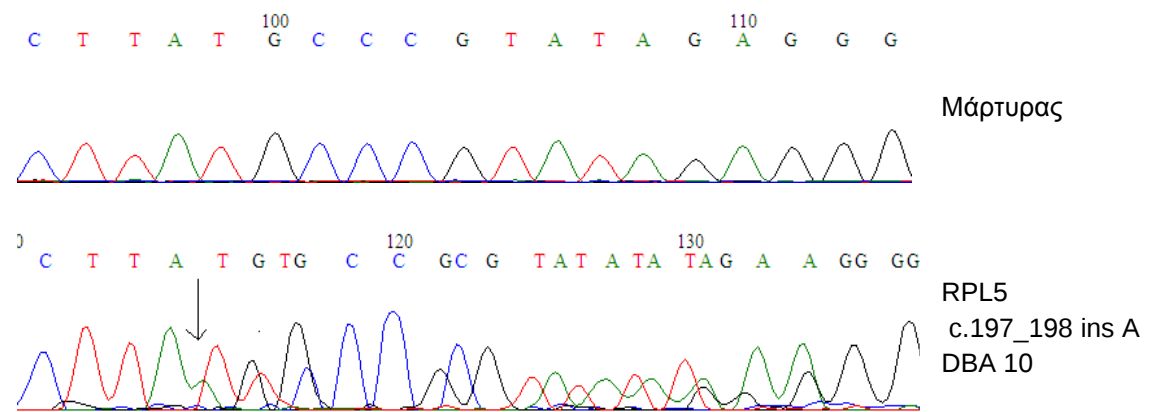
Στην ασθενή DBA 10 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη *RPL5*: c.197_198 ins A (p.Y66X) στο εξώνιο 4 και μια νουκλεοτιδική αλλαγή c.71+81 ins C στο ιντρόνιο 2-3 του γονιδίου *RPS19*. (Εικόνα 23, 24)

ECMA

SL S01 S02 S03 WT1 S10 SL



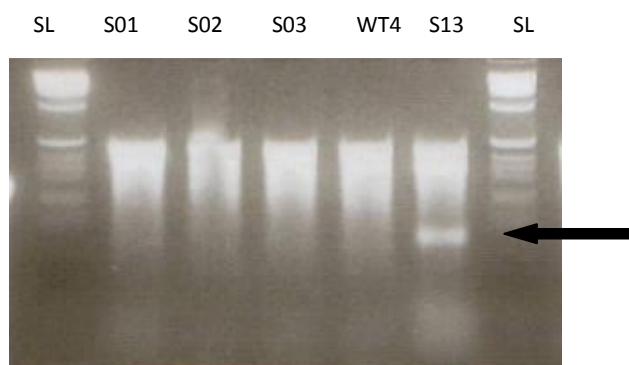
Εικόνα 23 : Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την εφαρμογή πρωτοκόλλου ECMA στον ασθενή DBA 10 (S10), στους γονείς του (S02 και S03), στον ασθενή DBA 01(S01) και σε ένα φυσιολογικό μάρτυρα (WT1) για το εξώνιο 4 του γονιδίου *RPL5*.



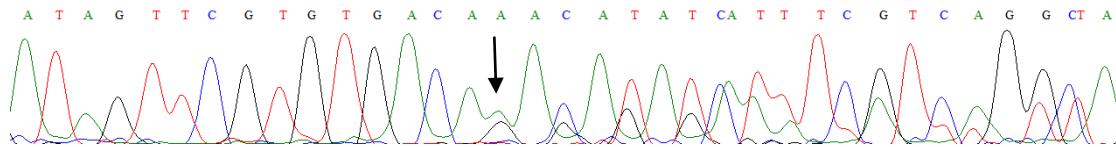
Εικόνα 24 : Αλληλούχηση του εξωνίου 4 του γονιδίου *RPL5* για την ασθενή DBA 10 στην οποία παρατηρείται η μετάλλαξη c.197_198 ins A.

Στην ασθενή DBA 13 ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη *RPL5*: c.169-172 delAACA(p.Asn57GlufsX12) στο εξώνιο 3 του γονιδίου. (Εικόνα 25, 26)

ECMA

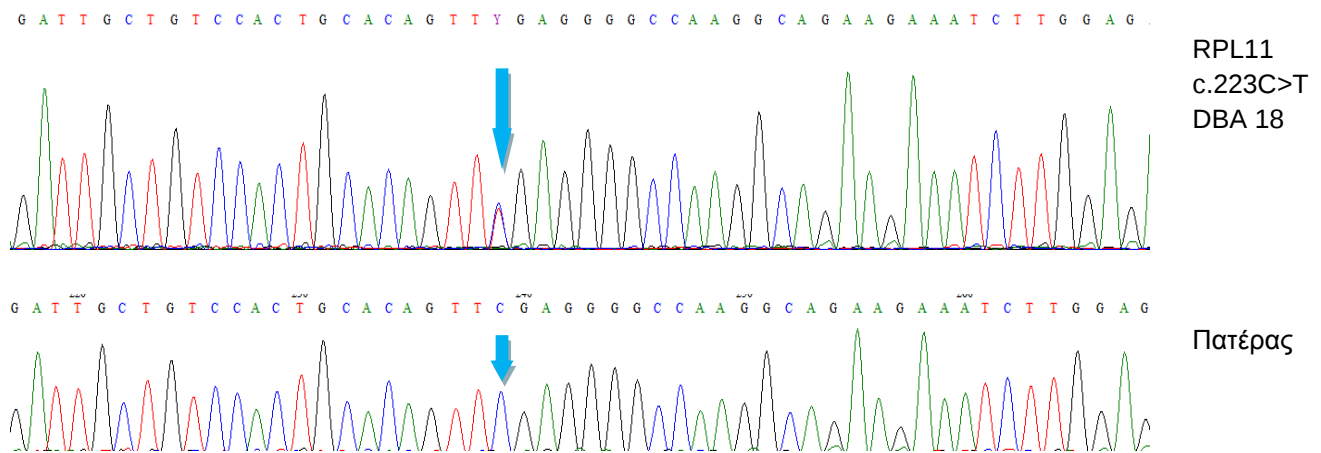


Εικόνα 25 : Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την εφαρμογή πρωτοκόλλου ECMA στον ασθενή DBA 13 (S 13), καθώς επίσης στους ασθενείς DBA 01, 02, 03(S01, S02, S03) και σε ένα φυσιολογικό μάρτυρα (WT4) για το εξώνιο 3 του *RPL5* γονιδίου.



Εικόνα 26: Αλληλούχηση του εξωνίου 3 του *RPL5* γονιδίου για τον ασθενή BDA 13, όπου παρατηρήθηκε η μετάλλαξη c.169-172 delAACA (p.Asn57GlufsX12).

Στην ασθενή 18 ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη *RPL11*:c.223C>T (p.Arg75X) στο εξώνιο 3 του γονιδίου η οποία από τον έλεγχο των γονέων προκύπτει ως de novo.



Εικόνα 27 : Αλληλούχηση του εξωνίου 3 του γονιδίου *RPL11* για τον ασθενή DBA18 και ένα φυσιολογικό μάρτυρα (πατέρας), όπου παρατηρείται η μετάλλαξη c.223C>T (p.Arg75X).

Στον πίνακα 16 καταγράφονται οι μη παθολογικές νουκλεοτιδικές αλλαγές που ταυτοποιήθηκαν στους ασθενείς με αναιμία Diamond Blackfan.

Φαινότυπος-Συγγενείς ανωμαλίες DBA

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεταλλάξεις στα γονίδια *RPS19*, *RPL5* και *RPL11* αναφέρονται στον πίνακα 17. Συγγενείς ανωμαλίες παρατηρήθηκαν στο 72% (13/18) των ασθενών. Μόνο ένας από τους 3 ασθενείς στους οποίους ταυτοποιήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPS19* είχε συγγενείς ανωμαλίες. Αντιθέτως και οι τρεις ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPL5* εμφάνιζαν συγγενείς ανωμαλίες όπως και ο ασθενής 13 που είχε μετάλλαξη στο γονίδιο *RPL11*.

Κλινική πορεία

Η χορήγηση κορτικοστεροειδών και οι μεταγγίσεις με συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι η κύρια θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με DBA (Vlachos et al., 2008; Alter and Young, 1998). Από τους 18 ασθενείς το 83,3% αρχικά ανταποκρίθηκε στα στεροειδή, 5,6% δεν ανταποκρίθηκε στα στεροειδή και 11,1% δεν έλαβαν ποτέ αγωγή με κορτικοστεροειδή. Οι 16 από τους 18 παρέμειναν σε παρακολούθηση, από τους οποίους το 37,5% (6 ασθενείς) ήταν κορτικοεξαρτώμενοι, το 37,5% (6 ασθενείς) ήταν μεταγγισιοεξαρτώμενοι και το 6,2% (1 ασθενής) είχε υποβληθεί σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Τρεις από τους 16 ασθενείς (DBA 04, 09 and 15) απεβίωσαν σε ηλικίες 6, 20 και 8 ετών αντίστοιχα. Η ασθενής DBA 04 και ενώ ήταν σε θεραπεία με συστηματικές μεταγγίσεις ανά 15νήμερο, λόγω μη ανταπόκρισης στα στεροειδή, υπόκειται σε αλλογενή μεταμόσχευση σε ηλικία 6 ετών, από την απόλυτα HLA συμβατή και μη πάσχουσα αδερφή της, όταν η δότρια έγινε 1 έτους. Απεβίωσε 6 μήνες μετά την μεταμόσχευση λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας λοιμώδους αιτιολογίας. Ο ασθενής DBA 09 ήταν μεταγγισιοεξαρτώμενος και απεβίωσε λόγω καρδιακής ανεπάρκειας οφειλόμενης σε αιμοσιδήρωση. Ο ασθενής DBA 15 απεβίωσε 7 μήνες μετά την αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων λόγω οξείας απόρριψης μοσχεύματος έναντι ξενιστή.

Η ασθενής DBA 13, που διαγνώστηκε κλινικά ως DBA από τους πρώτες μήνες ζωής το 1962 εμφάνισε καρκίνο θυρεοειδούς σε ηλικία 46 ετών.

Η μοριακή ανάλυση ανέδειξε την γνωστή c.169-172 delAACA μετάλλαξη στο γονίδιο *RPL5* (Gazda et al., 2008). Η ασθενής παρουσίαζε κρανιοπροσωπικές συγγενείς ανωμαλίες όπως μικρογναθία, καθίζηση ρινικής γέφυρας και λυκόστομα το οποίο αποκαταστάθηκε χειρουργικά σε μικρή ηλικία. Δεν ανταποκρίθηκε στην χορήγηση των στεροειδών και για αυτό ετέθη σε συστηματική χορήγηση στεροειδών. Οι μεταγγίσεις οδήγησαν σε υπερφόρτωση σιδήρου με αποτέλεσμα έναρξη αποσιδήρωσης σε ηλικία 17 ετών αρχικά με υποδόρια χορήγηση δεσφεριοξαμίνης και στη συνέχεια από του στόματος αγωγής με δεφερασιρόξη. Η ασθενής είχε αιμοσιδήρωση για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στην ηλικία των 46 ετών, είχε μέτρια αιμοσιδήρωση όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της MRI καρδιάς και ήπατος (ηπατική σιδήρωση LIC: 10.8 mgFe/gdw και καρδιακή σιδήρωση T2*:11.7 msec). Σε αυτή την ηλικία διεγνώστη με θηλώδες καρκίνο του θυρεοειδούς (PCT) με τοπικές λεμφαδενικές μεταστάσεις. Ακολούθησε ολική θυρεοειδεκτομή και θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ¹³¹I, η οποία επαναλήφθηκε 9 μήνες αργότερα λόγω υποτροπής του όγκου. Έκτοτε παραμένει σε ύφεση και συνεχίζει να λαμβάνει μεταγγίσεις κάθε 3-4 μήνες.

PT (φύλο)	Έτος Γέννησης	Ηλικία διάγνωσης	Συγγενείς Ανωμαλίες	Επιπλοκές	Απάντηση στα στεροειδή	Status	Μεταλλάξεις	Predicted effect on protein	Κληρονομικότητα
DBA01 (A)	2003	2 m	Στένωση ισθμού αορτής		R	LF	RPL5 Exon 5: c. C390G (*)	p.Y130X	NA
DBA02 (A)	2001	2 m	-	Νέκρωση κεφαλής μηριαίου	R	SD	RPS19 Exon 5 :c.384-385 delAA	p.Asp130SerfsX23	NA
DBA03 (A)	2000	Γέννηση	Καθίζηση ρινικής γέφυρας, υπερτελορισμό, λυκόστομα	Κοντό Ανάστημα, βαρηκοία	R	TD	ND		
DBA04 (Θ)	2007	2 m	-	Αιμοσιδήρωση	R	SCT,DIED	RPS19 Exon 2: c.13_14ins A	p.Thr5AsnfrX46	Σποραδική
DBA05 (A)	1999	4 m	Τοξοειδής υπερωία, διάσπαση προσοχής	Cushing	R	SD	ND		
DBA06 (A)	2003	9 m	Ευρύ μετωπιαίο, ευρεία άπω φάλλαγα αντίχειρα		R	SD	ND		
DBA07 (Θ)	2009	Γέννηση	Ευρύ μετωπιαίο, ευρεία πηγή, έλλειμμα μεσοκοιλιακού διαφράγματος, συστρωφή εντέρου	Κοντό ανάστημα	R	SD	ND		
DBA08 (Θ)	2006	29 d	Στένωση μιτροειδούς βαλβίδας, έλλειμμα μεσοκοιλιακού διαφράγματος	Επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, κοντό ανάστημα, ΨΚΚ	NR	TD	ND		
DBA09 (A)	1992	10 d	Λαγώχειλο, μικρογναθία, θολωτή υπερωία, μικρογναθία, καθίζηση ρινικής γέφυρας, χαμηλή πρόσφυση τριχωτού, μακρογλωσσία, επίκανθο, χαμηλή πρόσφυση ώτων, νεφρικές ανωμαλίες, μικρό μεσοκοιλιακό έλλειμμα, κοντός αυχένas, σκελετικές ανωμαλίες	Κοντό ανάστημα, σπληνεκτομή, αιμοσιδήρωση, βαρηκοία	R	TD DIED	RPS19 Exon 2: c.3G>A	p. Met1Ile	Σποραδική
DBA10 (Θ)	1996	5 m	Λυκόστομα, ευρύ μετωπιαίο, χαμηλή πρόσφυση τριχωτού κεφαλής, χαμηλή πρόσφυση ώτων, κοντός αυχένas, κλινοδακτυλία, υπολαστική κερκίδα, υπερεκτασιμότητα αρθρώσεων, οδοντικές ανωμαλίες	Κοντό Ανάστημα, Επαναλαμβανόμενες ωτίτιδες		LF	RPL5 Exon 4: c.197_198 insA (*)	p.Y66X	Σποραδική
DBA11 (A)	1998	3 m	Καθίζηση ρινικής γέφυρας, υπερτελορισμό, επίκανθο, εξόστωση ΑΜΣΣ, κοντός αυχένas, μεσοκοιλιακό έλλειμμα, κρυφορχία, υποπλασία αδαμαντίνης	Κοντό Ανάστημα, μαθησιακές δυσκολίες, αιμοσιδήρωση βαρηκοία	R	TD	ND		
DBA12(A)	1989	4 m	-	Κοντό Ανάστημα, Χαρακτηριστικά Cushing	R	TD	ND		
DBA13 (Θ)	1962	5 m	Μικρογναθία, καθίζηση ρινικής γέφυρας, λυκόστομα	Κοντό Ανάστημα, αιμοσιδήρωση καρκίνος θυρεοειδούς	R	TD	RPL5 Exon 3: c.169-172 delAACA	p.Asn57GlufrX12	NA
DBA14 (A)	1993	8 m	Υπεξάρθρωμα Αντίχειρα	Υπέρταση, παχυσαρκία, οστεοπενία, αντίσταση στην ινσουλίνη	R	SD	ND		
DBA15 (Θ)	2003	10 m	-	Σύνδρομο Trali	R	SCT, DIED	ND		
DBA16 (A)	2011	2 m	Θολωτή υπερωία, κρανιοσυνωστέωση, υποσπαδίας, καθίζηση ρινικής γέφυρας	Αιμοσιδήρωση	R	SCT	ND		
DBA17 (A)	2012	2 m	-		R	SD	ND		
DBA18 (Θ)	2014	8m	Υπερτελορισμό, καθίζηση ρινικής γέφυρας		TD	TD	RPL11 Exon 3: c.223C>T	p.Arg75X	Σποραδική

Πίνακας 15. Χαρακτηριστικά ασθενών με Αναιμία Diamond Blackfan

ΨΚΚ: ψυχοκινητική καθυστέρηση, Α: άρρεν, Θ: θήλυ, m: μήνες, d: ημερών, R: απάντηση στη θεραπεία με τα στεροειδή, NR: μη απάντηση στη θεραπεία με τα στεροειδή, SD: εξαρτώμενοι από τα στεροειδή, TD: εξαρτώμενοι από μεταγγίσσεις (*) novel μετάλλαξη, SCT: μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, ND: μη ανιχνεύσιμη, NA: μη διαθέσιμος

Πίνακας 16. Μη παθολογικές νουκλεοτιδικές αλλαγές ασθενών με Αναιμία Diamond Blackfan

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΓΟΝΙΔΙΑ		
	RPS19	RPL5	RPL11
DBA 01	intr 2 c.71+81 Ins C		
DBA 05			int3-4 c.264+49 A>G
DBA 11	ex5 c.C357T		ex5 c.507+39 A>G
DBA 15			ex5 c.507+39 A>G
DBA 17	intr 2 c.71+81 Ins C, c.71+89 G>C		ex4 c.339 C>T p.I113I

Αποτελέσματα συνδρόμου Shwachman Diamond:

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αναφέρονται στον πίνακα 17. Συνολικά 11 ασθενείς (9 οικογένειες) καταγράφηκαν και αναλύθηκαν. Μεταξύ των 9 περιπτώσεων 2 ήταν οικογένειες με 2 παιδιά ασθενείς. Υπάρχει μια μικρή υπεροχή των γυναικών έναντι των ανδρών (6 γυναίκες 55,5%). Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 1.3 έτη (εύρος 0,2-17 ετών). Η μέση ηλικία γέννησης είναι 38.5 εβδομάδες (εύρος 32-40 εβδομάδες) και το μέσο βάρος γέννησης είναι 2850g (εύρος: 1700-3650g). Καταγράφεται μόνο ένας πρόωρος (<37 εβδομάδες κύησης) τοκετός (0.9%). Κοντό ανάστημα (ύψος ≤ 3 ΕΘ) παρατηρήθηκε σε 9 ασθενείς (82%), τρεις εκ των οποίων είχαν ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης. Σκελετικές ανωμαλίες διαπιστώθηκαν σε 7 ασθενείς (63.6%) με συχνότερη την μεταφυσιακή δυσπλασία. Καρδιακές ανωμαλίες παρουσιάζουν 3 ασθενείς (27.3%), δύο έχουν ανοιχτό ωοειδές τρήμα και ένας καρδιομυοπάθεια. Ποσοστό 27.3% (3/11) παρουσίασαν τουλάχιστον 1 επεισόδιο σοβαρής λοίμωξης. Ως σοβαρή λοίμωξη καταγράφηκε η σηψαιμία, η κυτταρίτιδα, η πνευμονία, η οστεομυελίτιδα και το ηπατικό απόστημα.

Μέτρια προς σοβαρή παγκρεατική ανεπάρκεια (ελαστάση κοπράνων <200μg/g) διαπιστώθηκε σε επτά από τους έντεκα ασθενείς. Σε 4 ασθενείς διαπιστώθηκε μέσω υπερηχογραφικού ελέγχου λιπώδη διήθηση παγκρέατος (SDD 02, 04, 07, 08). Ο ασθενής SDS 02 δεν είχε παγκρεατική ανεπάρκεια.

Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν ουδετεροπενία (απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων <1500/mL σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές μετρήσεις). Σε δύο (SDS 05, SDS 07) ασθενείς κατά την αρχική καταγραφή παρατηρήθηκε πανκυττοπενία, σε δύο ασθενείς ουδετεροπενία και αναιμία (SDS 06, SDS 11) ενώ σε ένα ασθενή (SDS 08) ουδετεροπενία με θρομβοκυτταροπενία.

Δυο ασθενείς εμφάνισαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Η ασθενής SDS 05 εμφάνισε ισοχρωμόσωμα 7 i(7)(q10) στο 32% των μυελικών κυττάρων από την ηλικία των 2 μηνών. Στην ασθενή SDS 05 διαπιστώθηκε σε ηλικία 16 ετών κλωνική ανωμαλία (46,X,del(X)(q24→qter)) στο 36% των μυελικών κυττάρων της, η οποία παραμένει σταθερή τα τελευταία 11 έτη.

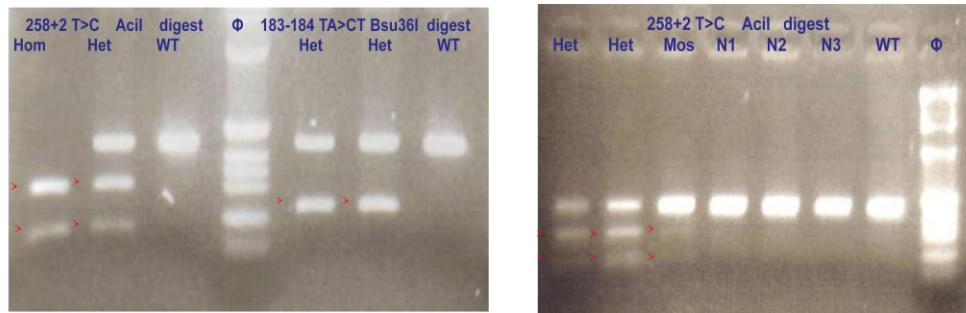
Αναφορικά με την θεραπεία των ασθενών: 1 ασθενής υπεβλήθη σε αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων από την HLA-συμβατή αδερφή της, 2 ασθενείς με χρόνια σοβαρή ουδετεροπενία έλαβαν αγωγή με παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων, 3 ασθενείς έλαβαν αγωγή με αυξητική ορμόνη και 6 ασθενείς λαμβάνουν παγκρεατικά ένζυμα ένας από τους οποίους κατά την διάρκεια των πρώτων μηνών ζωής έλαβε και παρεντερική διατροφή λόγω της βαριάς κλινικής εικόνας από το γαστρεντερικό. Τρεις ασθενείς δεν χρειάστηκαν να λάβουν ποτέ αγωγή.

Μοριακή Ανάλυση Ασθενών με SDS

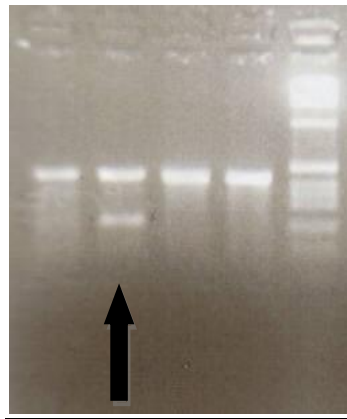
Όλοι οι ασθενείς ήταν σύνθετοι ετεροζυγώτες. Έξι ασθενείς ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για τις συχνές μεταλλάξεις c.183-184 TA>CT and c.258+2T>C. Σε δύο από τους έξι παρατηρήθηκε εικόνα μωσαικισμού (SDS 02, SDS 11) ευρήματα συμβατά με την ήπια κλινική εικόνα των ασθενών. Ένας ασθενής (SDS 03) ήταν ετεροζυγώτης για την c.183-184 TA>CT και ομοζυγώτης για την c.258+2T>C. Οι υπόλοιποι 4 ασθενείς (SDS 06, SDS 08, SDS 09, SDS 10) ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για την c. 258+2T>C και την γνωστή μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία c.460-1G>A (Faber et al.,1999).

RFLPS results

Hom:homozygote; Het: Heterozygote; Mos :Mosaic; N1-N2: samples tested normal; WT: normal control; Φ: ΦX 174 sizer



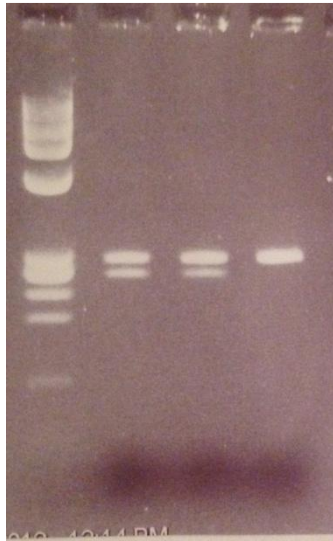
Εικόνα 28. Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά τη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα Acil και Bsu36I. Hom:ομοζυγώτης Het: ετεροζυγώτης, Mos: μωσαικό, N1-N3:φυσιολογικά δείγματα, WT: μάρτυρας



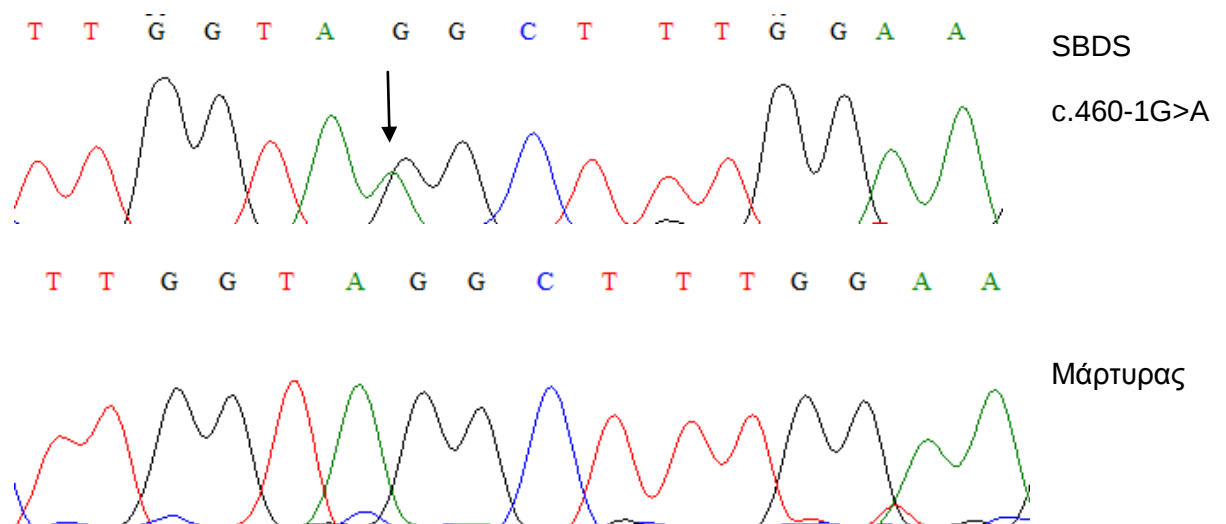
Εικόνα 29. Χαρακτηριστική φωτογραφία πηκτής αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την εφαρμογή πρωτοκόλλου ECMA για το εξώνιο 2 του SBDS γονιδίου.

Hind III

SL SDS80 SDS09 WT1



Εικόνα 30. Χαρακτηριστική φωτογραφία των προϊόντων που λήφθηκαν μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII για το εξώνιο 4 του SBDS γονιδίου σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με αγαρόζη nusieve 1,5%.



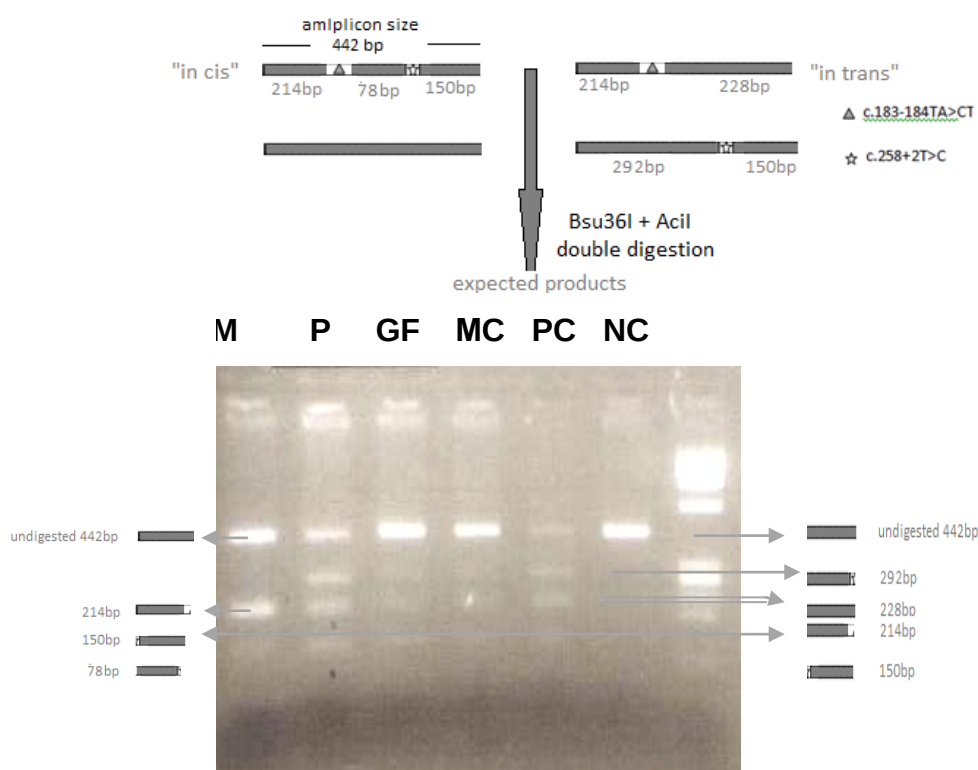
Εικόνα 31 : Αλληλούχηση του εξωνίου 4 του *SBDS* γονιδίου για τους ασθενείς SDS 06, SDS 08, SDS 09, SDS 10 και ένα φυσιολογικό μάρτυρα, όπου παρατηρείται η μετάλλαξη c.460-1G>A.

Περιγραφή σύνθετων SDS περιστατικών

α) Η ασθενής SDS 04 διεγνώσθη κλινικά με SDS νωρίς στη βρεφική ηλικία λόγω εκδήλωσης δυσσπορρόφησης, στεατόρροιας, ανεπαρκούς ανάπτυξης, σκελετικών ανωμαλιών, ουδετεροπενίας (WBC: $4900/\text{mm}^3$, ουδετερόφιλα (ANC): $390/\text{mm}^3$) και διαταραχών στη χημειοταξία των ουδετεροφίλων. Γεννήθηκε την 39^η εβδομάδα κύησης με φυσιολογικά σωματομετρικά απο μη συγγενείς γονείς που κατάγονται από το ίδιο χωριό. Η μητέρα πάσχει από σύνδρομο Sjogren. Μετά την κλινική διάγνωση έγινε έναρξη αγωγής με παγκρεατικά ένζυμα. Παρουσιάζει επαναλαμβανόμενες μικροβιακές λοιμώξεις, κυρίως βαρθολινίτιδα. Σε ηλικία 16 ετών διεγνώσθη οστεοπόρωση, η οποία έχει βελτιωθεί σε οστεοπενία (DEXA Αριστερή κεφαλή Μηριαίου BMD: 0.764 g/cm^2 , T-score: -2 SD, Z-score: -1.6 SD) με την κατάλληλη αγωγή. Από την ηλικία των 17 ετών παρουσίασε ψωρίαση. Σε ηλικία 19 ετών ανέπτυξε και θρομβοκυτταροπενία ενώ από την ηλικία των 16 ετών διαπιστώθηκε στο μυελόγραμμα κλωνική ανωμαλία ((46,X,del(X)(q24→qter)) η οποία παραμένει σταθερή τα τελευταία 11 έτη.

Η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι είναι σύνθετη ετεροζυγώτης των c.183-184 TA>CT and c.258+2T>C μεταλλάξεων. Επιπλέον ανάλυση όλων των εξωνίων και των περιοχών ματίσματος εξωνίων/εσωνίων τόσο της ασθενούς όσο και της ευρύτερης οικογένειας της (γονείς, μητρική θεία, μητρική γιαγιά και μητρικός παππούς) αποκάλυψε ένα σύνθετο πρότυπο κληρονόμησης. Πλήρης και λεπτομερής ανάλυση των ευρημάτων αναφέρονται στις εικόνες 30-31. Εκτός από τον πολυμορφισμό c.258+54T>G δεν καταγράφηκαν άλλοι πολυμορφισμοί που θα επέτρεπαν την καλύτερη κατανόηση του τρόπου κληρονομικότητας. Τα ίδια ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από το σάλιο και τις τρίχες της ασθενούς αποκλείοντας τον ιστοειδικό μωσαικισμό.

Εικόνα 32. Αποτελέσματα RFLPs. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% των προϊόντων μετά τη διπλή πέψη με τα ένζυμα Acil και Bsu36I

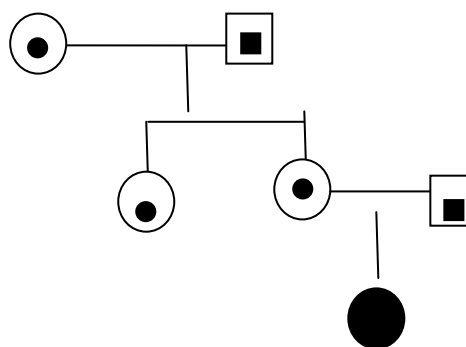


M: Μητέρα, **P:** ασθενής, **GF:** παππούς, **MC:** σύνθετος ετεροζυγώτης για τις c.183-184 TA>CT και c.258+2T>C μωσαικό για την c.183-184 TA>CT (ο μωσαικισμός έχει επιβεβαιωθεί και σε δεύτερο εργαστήριο, το δείγμα χρησιμοποιείται ως μάρτυρας), **PC:** θετικός μάρτυρας διπλός ετεροζυγώτης για τις c.183-184 TA>CT and c.258+2T>C **NC:** φυσιολογικός μάρτυρας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα θραύσματα 228 και 214bp συμπίπτουν σε μία μπάντα ενώ το θραύσμα 78bp δεν ανιχνεύεται πιθανόν λόγω του μικρού μεγέθους. Η παρουσία του άπεπτου προϊόντος 442bp στους σύνθετους ετεροζυγώτες μπορεί να αποδοθεί είτε σε πιθανό μωσαικισμό ή σε μη πλήρη πέψη.

Για να καθορίσουμε αν οι μεταλλάξεις c.183-184 TA>CT και c.258+2T>C ήταν στο ίδιο (cis) ή σε διαφορετικό αλληλόμορφο (trans) σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη. Τα προϊόντα του PCR του εξωνίου 2 και των περιοχών ματίσματος υποβλήθηκαν σε διπλή πέψη ταυτόχρονα και με τα δύο ένζυμα Bsu36I και Acil και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%. Όπως φαίνεται και στο σχήμα το αρχικό προϊόν 442bp παραμένει άπεπτο όταν το δείγμα δε φέρει μεταλλάξεις ενώ όταν φέρει μεταλλάξεις προκύπτουν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους ανάλογα με μεταλλάξεις και την θέση των μεταλλάξεων (cis/trans). Διαφορετικά μεγέθη

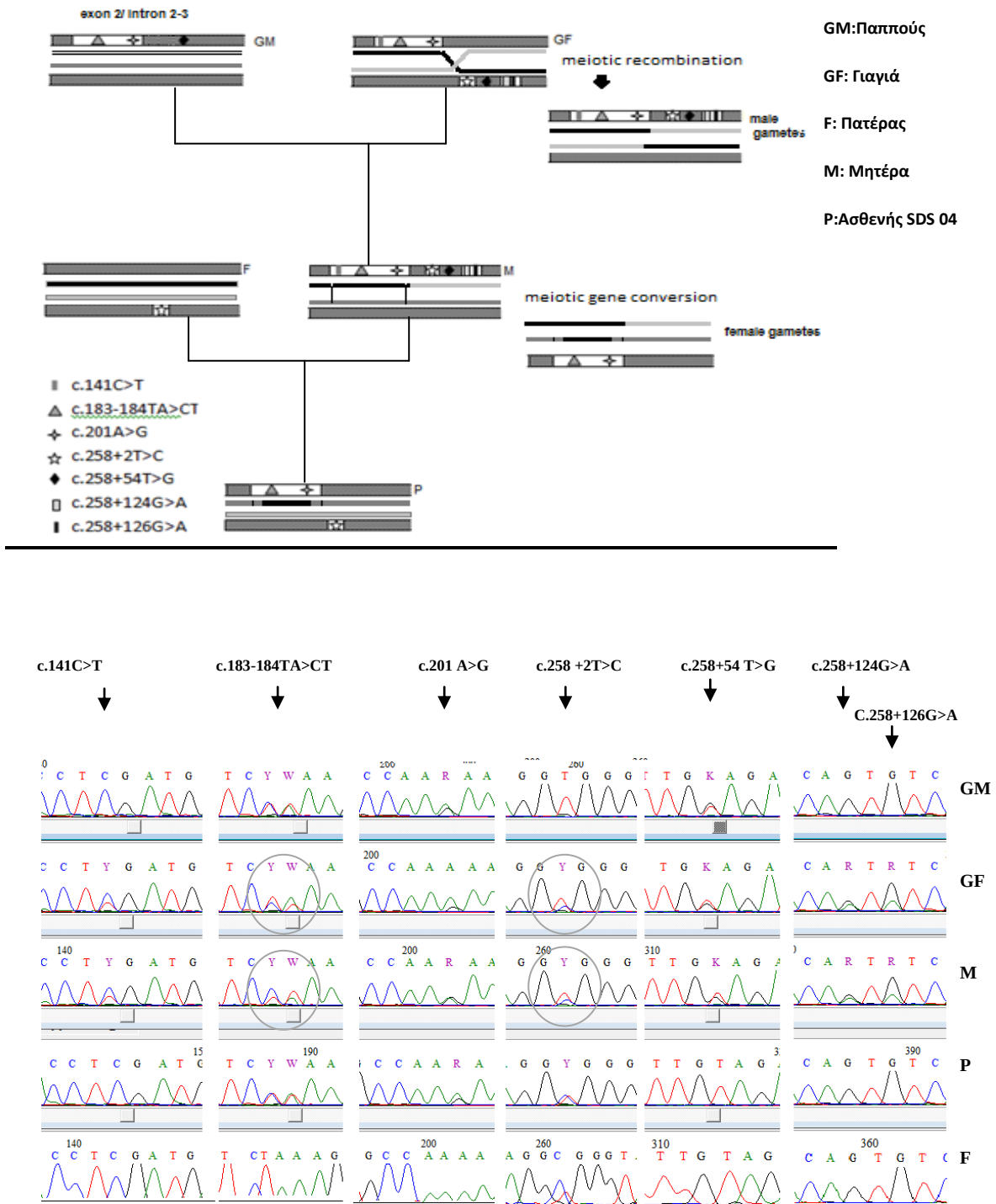
θραυσμάτων προκύπτουν όταν οι c.183-184 TA>CT και c.258+2T>C είναι σε “cis” ή “trans” προσανατολισμό υποδεικνύοντας με έμμεσο τρόπο αν οι μεταλλάξεις είναι στο ίδιο αλληλόμορφο ή σε διαφορετικά. Οι σημαντικές διαφορές μεταξύ έντασης του κάθε προϊόντος- όπως αυτά που φαίνονται στο MC- πιστεύεται ότι οφείλεται στην παρουσία των διαφόρων επιπέδων μωσαϊκισμού.

Εικόνα 33,Περιστατικό 1. Α.Οικογενειακό δέντρο και απλότυποι



	<u>GM</u>	<u>MS</u>	<u>GF</u>	<u>M</u>	<u>Ch</u>	<u>F</u>
<u>c.141C>T (SBDSP)</u>	<u>-/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>	<u>-/-</u>
<u>c.183-184TA>CT (SBDSP)</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>
<u>C.201 A>G (SBDSP)</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>
<u>C.258 +2T>C (SBDSP)</u>	<u>-/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/+</u>	<u>+/-</u>	<u>-/+</u>	<u>+/-</u>
<u>C.258+54 T>G (Polymorfism)</u>	<u>+/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/+</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>	<u>-/-</u>
<u>C.258+124G>A (SBDSP)</u>	<u>-/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/+</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>	<u>-/-</u>
<u>C.258+126G>A (SBDSP)</u>	<u>-/-</u>	<u>+/-</u>	<u>-/+</u>	<u>+/-</u>	<u>-/-</u>	<u>-/-</u>

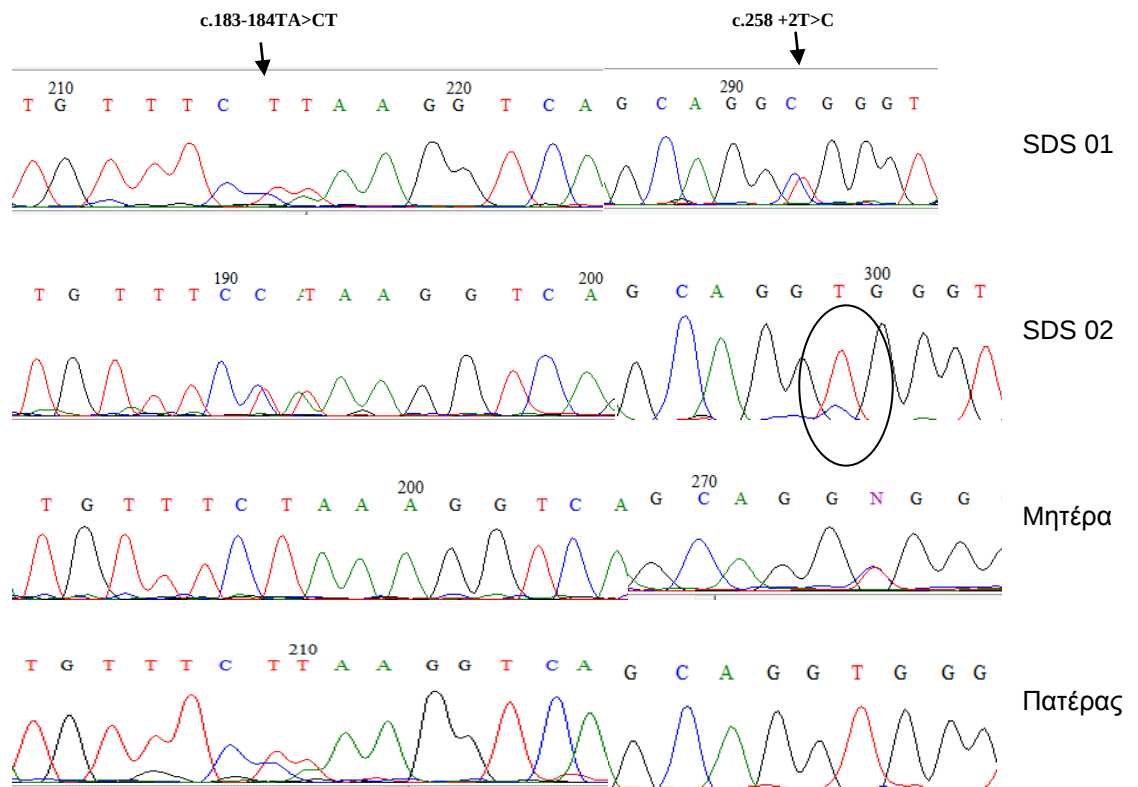
B. Πιθανοί τρόποι κληρονομικότητας: με βάση τα μοριακά ευρήματα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι συνέβει μειωτικός ανασυνδυασμός στα γαμετικά κύτταρα του μητρικού παππού το οποίο οδήγησε στη δημιουργία ενός νέου αλληλόμορφου (γοναδικός μωσαικισμός) το οποίο κληρονόμησαν η μητέρα και η μητρική θεία της ασθενούς. Στη συνέχεια ακολούθησε φαινόμενο γονιδιακής μετατροπής κατά την διάρκεια της μείωσης στα φυσιολογικό αλληλόμορφο της μητέρας, η οποία μεταβίβασε τις c.183-184TA>CT και c.201A>G στην κόρη της ενώ η c.258+2T>C είναι πατρικής προέλευσης. Ωστόσο η πιθανότητα το αλληλόμορφο της ασθενούς που φέρει τις c.183-184TA>CT και c.201A>G να έχει προκύψει από de novo φαινόμενο γονιδιακής μετατροπής στο μητρικό αλληλόμορφο του παιδιού δεν μπορεί να αποκλειστεί.



Εικόνα 34 . Αποτελέσματα αλληλούχισης του εξωνίου 2 του SBDS γονιδίου στην οικογένεια της ασθενούς SDS 04. Ενδείξεις μωσαικισμού για τις μεταλλάξεις c.183-184TA>CT και c.258 +2T>C παρατηρούνται στα δείγματα DNA της μητέρας (M) και του μητρικού παππού (GF) (κύκλος)

β) Η ασθενής SDS 01 είναι το δεύτερο παιδί φαινοτυπικά υγιών και μη συγγενών γονέων. Γεννήθηκε την 37^η βδομάδα κύησης με οριακά χαμηλό βάρος γέννησης 2600g. Η κλινική διάγνωση ετέθη σε ηλικία 17 μηνών λόγω ουδετεροπενίας, παγκρεατικής ανεπάρκειας, κοντού αναστήματος, σκελετικών διαταραχών, καρδιακών ανωμαλιών (ανοιχτό ωοειδές τρήμα) και επαναλαμβανόμενων λοιμώξεων. Λόγω της ανεπάρκειας της αυξητικής ορμόνης έλαβε αγωγή με αυξητική ορμόνη από την ηλικία των 10 ετών και για 18 μήνες με μερική ανταπόκριση. Το τελικό της ύψος είναι 147 cm (<3^η ΕΘ). Είναι σε θεραπεία με παγκρεατικά ένζυμα. Η μεγαλύτερη σε ηλικία αδερφή (SDS 02) της διεγνώσθη με SDS σε ηλικία 17 ετών σε τυχαίο έλεγχο κατά τον μοριακό έλεγχο της SDS 01. Από το ιστορικό της SDS02 ασθενούς προκύπτει ήπια ουδετεροπενία, χωρίς λοιμώξεις, αυξημένο MCV ερυθροκυττάρων (103,7fl), ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές (αίσθημα μετεωρισμού κοιλιακής χώρας), και λιπώδη διήθηση παγκρέατος χωρίς παγκρεατική ανεπάρκεια. Η SDS 02 ασθενής δεν χρειάζεται να λαμβάνει καμία αγωγή.

Η μοριακή ανάλυση όλης της οικογένειας αποκάλυψε ότι η ασθενής SDS01 είναι σύνθετος ετεροζυγώτης για την c.183-184 TA>CT πατρικής προέλευσης και την c.258+2T>C μητρικής προέλευσης. Η μεγαλύτερη αδερφή της SDS 02 είναι επίσης διπλός ετεροζυγώτης για την c.183-184 TA>CT και την c.258+2T>C με εικόνα μωσαικισμού για την c.258+2T>C. Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε δείγμα DNA από σάλιο αποκλείοντας τον ιστοειδικό μωσαικισμό. Επίσης και οι δύο ασθενείς SDS01, SDS02 είναι φορείς του πολυμορφισμού c.651C>T (p.PHE 216 PHE) στο εξώνιο 5 του *SBDS* γονιδίου τον οποίο έχουν κληρονομήσει από την μητέρα τους (εικόνα 28, 35).

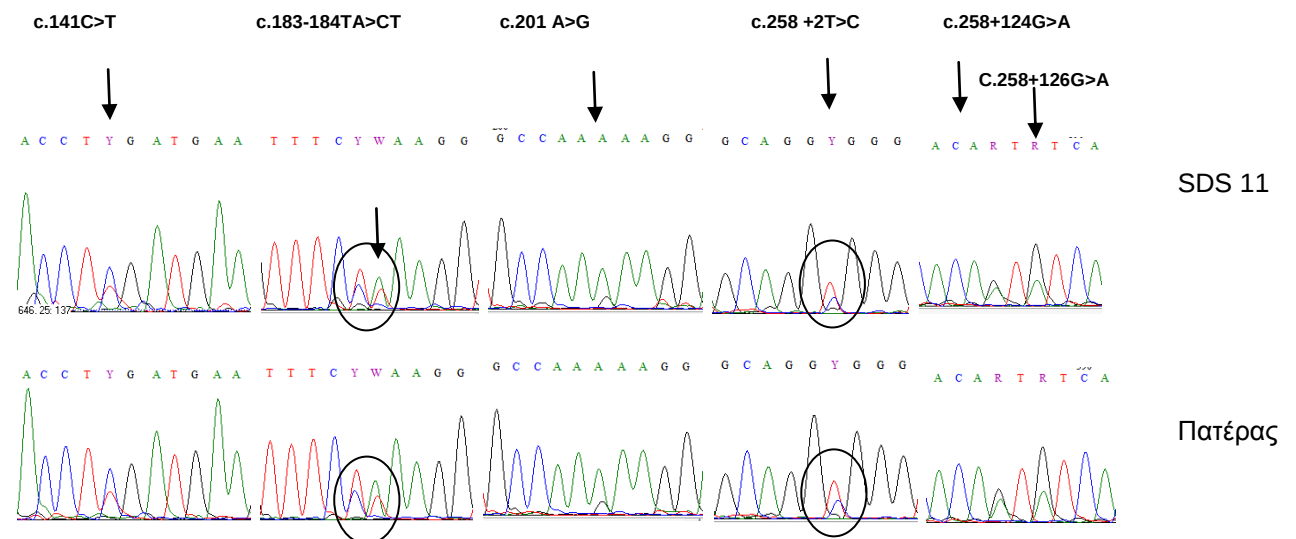


Εικόνα 35. Αποτελέσματα αλληλούχισης του εξωνίου 2 του *SBDS* γονιδίου στην οικογένεια της ασθενούς SDS 01. Ενδείξεις μωσαικισμού για την μετάλλαξη c.258 +2T>C παρατηρείται στο δείγμα DNA της αδερφής SDS02

γ) Ο ασθενής SDS 11 γεννήθηκε από φαινοτυπικά υγιείς και μη συγγενείς γονείς. Από το ατομικό του ιστορικό εμφανίζει επαναλαμβανόμενες και σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις όπως πνευμονία και μαστοειδίτιδα από την ηλικία των 2 ετών. Έχει διαλείπουσα ουδερετοπενία με ήπια αναιμία, μειωμένα ΔΕΚ και αυξημένη HbF. Αυξημένες τιμές ηπατικών ενζύμων (AST: 81U/L, ALT:116 U/L, γ-GT:100 U/L) χωρίς ηπατομεγαλία έχουν διαπιστωθεί από την ηλικία των 5 ετών. Οι παγκρεατικές δοκιμασίες ήταν φυσιολογικές. Έχει κοντό ανάστημα (ύψος<3^η ΕΘ) για την ηλικία του και μεταφυσιακή δυσόστωση. Δεν λαμβάνει αγωγή.

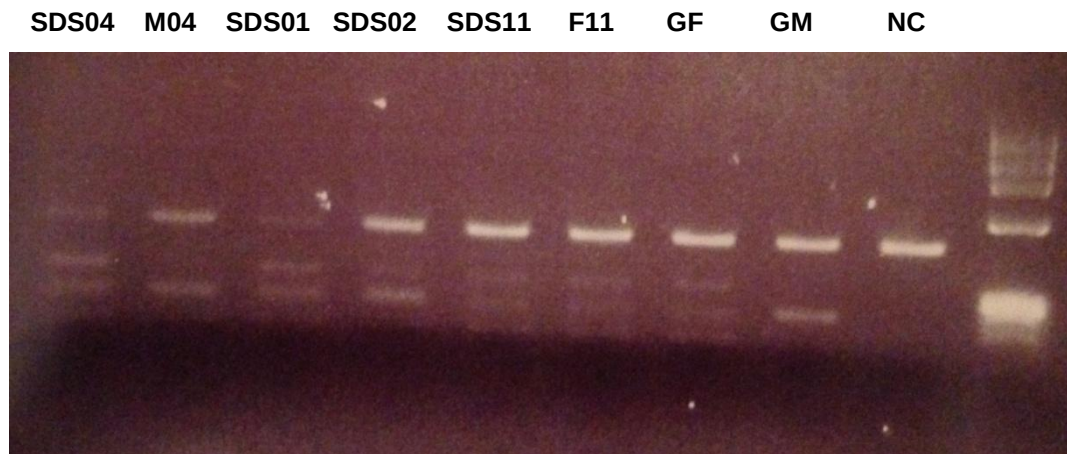
Η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε ότι ο ασθενής είναι σύνθετος ετεροζυγώτης αλλά μωσαικό και για τις δύο μεταλλάξεις c.183-184 TA>CT και 258+2T>C. Το ενυπωσιακό είναι ότι ο πατέρας του έχει τον ίδιο γονότυπο με τον ασθενή SDS11 ενώ η μητέρα και η αδερφή του δεν φέρουν καμία

μετάλλαξη στο *SBDS* γονίδιο. Τόσο ο ασθενής όσο και ο πατέρας φέρουν επίσης σε ετεροζυγωτία τις c.141C>T, c.201A>G, c.258+124G>A και c.258+126G>A που προέρχονται από το ψευδογονίδιο. Το ECMA όσο και η αλληλούχηση των υπολοίπων εξωνίων του *SBDS* γονιδίου ήταν φυσιολογικά (εικόνα 36, 37)



Εικόνα 36 . Αποτελέσματα αλληλούχησης του εξωνίου 2 του *SBDS* γονιδίου στην οικογένεια του ασθενούς SDS 11. Ενδείξεις μωσαικισμού για τις μεταλλάξεις c.183-184TA>CT και c.258+2T>C παρατηρούνται στα δείγματα DNA του παιδιού (SDS11) και του πατέρα (κύκλος).

Εικόνα 37. Αποτελέσματα RFLPs. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% των προϊόντων μετά τη διπλή πέψη με τα ένζυμα *Acil* και *Bsu36I*



M04: μητέρα της ασθενούς SDS04

GF μητρικός παππούς της ασθενούς SDS04

GM: μητρικός γιαγιά της ασθενούς SDS04

F11: πατέρας του ασθενούς SDS11

NC: φυσιολογικός μάρτυρας

Ασθενείς (φύλο)	Έτος Γέν- νησης	Ηλικία Διάγ- νωσης	Αιματο- λογικά Διάγ- νωσης	Αιματο- λογικά Επανε- λέγχου	Φαινότυπος	Κλωνικές Ανωμαλίες Μυελού	Θερα- πεία	Μοριακή Ανάλυση Ασθενούς	Μοριακή Ανάλυση Μητέρας	Μοριακή Ανάλυση Πατέρα
SDS 01 (Θ)	1999	16 m	N	T,N	PI, SS, GHD, υπερτρανσαμινασαιμία μεταφυσιακή δυσόσωση, επιπέδωση πρόσθιας πλευρικής απόληξης, ανοιχτό ωοειδές τρήμα, λοιμώξεις, ΨΚΚ	-	C, GH	[258+2T>C]+[183-184TA>CT]	258+2T>C	183-184TA>CT
SDS 02 (Θ)	1991	17 y	N	N	PS, SS, μεταφυσιακή δυσόσωση	-	-	Μωσαικό [258+2T>C]+[183-184TA>CT]	258+2T>C	183-184TA>CT
SDS 03 (Θ)	2001	2 m	N	A,N,T	PI, SS, ελλατωμένη IgA, ηπατομεγαλία, υπερτρανσαμινασαιμία, λοιμώξεις	-	GCSF	[258+2T>C;183-184TA>CT]+[258+2T>C]	NA	NA
SDS 04 (Θ)	1989	7 m	T	T,N	PI, σκελετικές ανωμαλίες, ψωρίαση, ηπατομεγαλία, υπερτρανσαμινασαιμία, οστεοπενία, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις	46,X,del(X) (q24->qter)	C	[258+2T>C]+[183-184TA>CT]	258+2T>C, 183-184 TA>CT	258+2T>C
SDS 05 (Α)	2006	4 m	A, N, T	Φυσιο- λογικά μετά την SCT	PI, SS, GHD, ανωμαλίες δακτύλων, δυστροφία θωρακικού κλωβού, ανοιχτό ωοειδές τρήμα, μεταφυσιακή δυσπλασία, ραιβογονία γονάτων, υπερτελορισμό, υπερτρανσαμινασαιμία, σοβαρές λοιμώξεις, ΨΚΚ	i(7q)	SCT , C, GH	[258+2T>C]+[183-184TA>CT]	183-184TA>CT	258+2T>C
SDS 06 (Α)	2001	10 m	N, A	A,N	PI, SS, υπερτρανσαμινασαιμία, έκζεμα, οστεοπόρωση, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, ΨΚΚ	-	C	[258+2T>C]+[c.460-1 G>A]	-	c.460-1 G>A
SDS 07 (Α)	1987	3 y	A,N,T	A,N,T	PI, SS, GHD, ηπατομεγαλία, κύφωση, ελλατωμένη IgM, ελλατωμένα Β λεμφοκύτταρα, έκζεμα, λοιμώξεις, ΨΚΚ	-	C, GH	[258+2T>C]+[183-184TA>CT]	183-184TA>CT	-
SDS 08 (Α)	1995	12 m	N,T	N	PI, SS, ελλατωμένη IgM και IgA, οστεοπενία, καρδιακές ανωμαλίες, καρδιομυοπάθεια, σοβαρές λοιμώξεις	-	C	[c.258+2T>C] +[C.460-1 G>A]	258+2 T>C	c.460-1 G>A
SDS 09 (Θ)	1986	1,5 y	N	N,T,A	PS, SS, GHD, κλινοδακτυλία, μεταφυσιακή δυσόσωση γονάτων, ανωμαλίες δακτύλων, λοιμώξεις	-	GCSF	[c.258+2T>C] +[C.460-1 G>A]	258+2 T>C	c.460-1 G>A
SDS 10 (Θ)	1990	15 y	N	N	PS, λοιμώξεις	-	-	[c.258+2T>C] +[C.460-1 G>A]	258+2T>C	c.460-1 G>A
SDS 11 (Α)	2005	5 y	N,A	N	PS, SS, υπερτρανσαμινασαιμία, ηπατομεγαλία, μεταφυσιακή δυσόσωση, σοβαρές λοιμώξεις	-	-	Μωσαικό [258+2T>C]+[183-184TA>CT]	[258+2T>C] + [183-184TA>CT]	-

Πίνακας 17. Χαρακτηριστικά ασθενών με σύνδρομο Shwachman Diamond

A: άρρεν, Θ:θήλυ, μ: μηνών, γ: ετών, N: ουδετεροπενία, T: θρομβοπενία, A: αναιμία, PI: παγκρεατική ανεπάρκεια, PS: παγκρεατική επάρκεια, SS: κοντό ανάστημα, ΨΚΚ, ψυχοκινητική καθυστέρηση, GHD:ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, C: υποκατάστατα παγκρεατικών ενζύμων, SCT: μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, GH:αυξητική ορμόνη, GCSF: παράγοντας διέγερσης κοκκιοκυττάρων

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αναιμία DBA

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη καταγραφής του φαινοτύπου και γενετικής ανάλυσης των ασθενών με αναιμία Diamond Blackfan στον Ελληνικό πληθυσμό. Παρά τους περιορισμούς της μελέτης, όπως το μικρό δείγμα και η αδυναμία της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε να ταυτοποιεί μεγάλα ελλείματα ή/και αναδιατάξεις των εξωνίων ενός γονιδίου, η συχνότητα των μεταλλάξεων που καταγράφηκε στα τρία γονίδια, που (*RPS19*, *RPL5* και *RPL11*) μελετήθηκαν, ήταν σύμφωνη με τη διεθνή βιβλιογραφία. Στο γονίδιο *RPL5* καταγράφηκαν 3 μεταλλάξεις (οι 2 είναι novel) (εικόνες 17, 24), που αντιστοιχούν σε ποσοστό 16,7% παρόμοιο με το ποσοστό που έχει παρατηρηθεί στη Τσέχικη Κοινότητα (Cmejla et al., 2009). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *RPS19* έχουν αναφερθεί στο 25% των ασθενών στις Δυτικές χώρες, 13% στους Ιαπωνέζους και 31.2% στους Κινέζους (Wan et al., 2016) ενώ στον Ελληνικό πληθυσμό το ποσοστό είναι 16.7% (3/18) (Campagnoli et al., 2008; Campagnoli et al., 2004; Konno et al., 2010). Ένας μόνο ασθενής ταυτοποιήθηκε με μετάλλαξη στο γονίδιο *RPL11* ποσοστό 5,6% παρόμοιο με προηγούμενων αναφορών (Gazda et al., 2008; Cmejla et al., 2009; Konno et al., 2010; Quarello et al., 2010; Wan et al., 2016). Επίσης στον ασθενή DBA 18 ανιχνεύθηκε ο φυσιολογικός πολυμορφισμός c.339 C>T (p.I113I) στο γονίδιο *RPL11*. Μοριακή ανάλυση όλης της οικογένειας συμπεριλαμβανομένου και του μητρικού θείου αποκάλυψε ότι μόνο η μητέρα φέρει τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Το τελευταίο σε συνδυασμό με την φυσιολογική κλινική εικόνα της μητέρας και του μητρικού θείου επιβεβαιώνει ότι η αλλαγή c.339 C>T είναι πολυμορφισμός. Στις οικογένειες που ανευρέθηκαν μεταλλάξεις έγινε γενετική καθοδήγηση και συζητήθηκε η δυνατότητα προεμφυτευτικής διάγνωσης (PGD). Για την ασθενή DBA04 έγινε προεμφυτευτική διάγνωση και σχεδιάστηκε ειδικό πρωτόκολλο από το οποίο προέκυψε δίδυμη κύηση με HLA-απόλυτα συμβατά προς την ασθενή και φυσιολογικά έμβρυα (δεν φέρουν την μετάλλαξη c.13_14InsA *RPS19*).

Από μεθοδολογικής πλευράς θα θέλαμε να επισημάνουμε την χρησιμότητα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου ECMA ως διαγνωστικό

εργαλείο ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων για την διάγνωση ασθενών με DBA. Το ECMA βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου Surveyor να ανιχνεύει και να διασπά τις αναντιστοιχίες σε δύο αλυσίδες του DNA (Vogiatzakis et al., 2007), προσφέροντας έτσι ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο σημειακών μεταλλάξεων, εξοικονομώντας χρόνο, για οποιαδήποτε μοριακό εργαστήριο ακόμη και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από το υψηλό ποσοστό συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων του ECMA και της άμεση αλληλούχισης προκύπτει ότι το ECMA είναι μια φθηνή, απλή και αποτελεσματική μέθοδος η οποία επιτρέπει τον έλεγχο και την ταυτοποίηση όλων των νουκλεοτιδικών αλλαγών που αναφέρθηκαν. Νεότερες τεχνικές, όπως το Next Generation Sequencing (NGS), προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στην ανίχνευση μεταλλάξεων, αλλά δεν είναι ευρέως διαθέσιμο. Το NGS είναι επίσης πιο κατάλληλη μέθοδος για την αναζήτηση νέων γενετικών τόπων μεταξύ ασθενών με παρόμοιο φαινότυπο. Επομένως, είναι ζωτικής σημασίας να εφαρμοστεί ένα εύκολο και ευπροσάρμοστο πρωτόκολο, όπως το ECMA, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συμβατικά κλινικά εργαστήρια με περιορισμένους πόρους στα οποία ακόμη και η ανάλυση της αλληλουχίας μπορεί να είναι δύσκολο να εφαρμοστεί.

Οι συγγενείς ανωμαλίες (Πίνακας 15) παρατηρήθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (72%) στο ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με αυτά που αναφέρονται από άλλες χώρες (Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Vlachos et al., 2008; Alter and Young, 1998; Wan et al., 2016). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ασθενείς με συγγενείς ανωμαλίες και αναιμία παραπέμπονται συχνότερα για γονιδιακό έλεγχο. Περίπου οι μισοί ασθενείς (50%) εμφάνισαν καθυστέρηση της ανάπτυξης που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Ball et al., 1996; Willig et al., 1999b; Vlachos et al., 2008; Alter and Young, 1998). Προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *RPL5* είναι πιθανότερο να έχουν σωματικές δυσπλασίες και κυρίως κρανιοπροσωπικές, ανωμαλίες αντίχειρα, και καρδιακές ανωμαλίες (Gazda et al., 2008; Cmejla et al., 2009; Konno et al., 2010; Quarello et al., 2010). Αξιοσημείωτα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο *RPL5* τείνουν να έχουν λαγώχειλο ή / και λυκόστομα μεμονωμένες ή σε συνδυασμό με άλλες φυσικές ανωμαλίες (Gazda et al., 2008; Cmejla et al., 2009; Konno et al., 2010;

Quarello et al., 2010). Η βάση δεδομένων αναφορών από όλο τον κόσμο για τους ασθενείς με DBA, LOVD (<http://www.lovd.nl/3.0/home>), μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα ισχυρό εργαλείο κατά τον γονιδιακό έλεγχο και κυρίως σε σπάνιες ασθένειες, γιατί στη βάση αυτή καταγράφονται όλες οι μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί μαζί με τον αντίστοιχο φαινότυπο του κάθε ασθενούς για όλα τα γνωστά γονίδια που σχετίζονται με την DBA. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LOVD, η μετάλλαξη c.384-385 delAA στο *RPS19* έχει καταγραφεί σε 8 ακόμα ασθενείς, οι οποίοι, όπως και ο ασθενής μας, δεν είχε άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Η *RPS19*: c.13_14InsA μετάλλαξη έχει αναφερθεί σε 2 ασθενείς, ο πρώτος ασθενής όπως και ο δικός μας δεν παρουσιάζει ανωμαλίες, ενώ στον δεύτερο έχουν καταγραφεί μεσοκολπικό έλλειμα και θολωτή υπερωά. Η *RPS19*: c.3G> A περιγράφεται σε 4 ασθενείς, οι οποίοι δεν έχουν συγγενείς ανωμαλίες, ενώ ασθενής μας παρουσίαζε ένα πολύ σύνθετο φαινότυπο. Η *RPL5*: c.169-172 delAACA μετάλλαξη παρατηρήθηκε σε 5 ακόμα ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν παρόμοιες εκδηλώσεις με τον ασθενή μας. Τέλος η *RPL11*: c.223C>T μετάλλαξη αναφέρεται σε ένα ακόμα ασθενή ο οποίος εμφανίζει τριφαλαγγικό αντίχειρα σε αντίθεση με το δικό μας ασθενή που δεν παρατηρούνται ανωμαλίες από την άκρα χείρα και έχει μόνο κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες όπως υπερτελορισμό και καθίζηση ρινικής γέφυρας. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παθογένεση των συγγενών ανωμαλιών είναι περιπλοκή και δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά σε μετάλλαξη ενός γονιδίου.

Η ανταπόκριση των ασθενών με DBA στην πρώτη θεραπεία με στεροειδή ήταν εξίσου καλή (83,3%) όσο και στις δυτικές χώρες (Vlachos et al., 2008, Alter and Young, 1998). Επιπλέον, τόσο το ποσοστό των ασθενών που είναι μεταγγισιοεξαρτώμενοι (37,5%) όσο και το ποσοστό των ασθενών που είναι κορτιζονο-εξαρτώμενοι (37,5%) μετά την αρχική θεραπεία με κορτικοστεροειδή είναι σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές (Sakamoto et al., 2010)

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεγαλύτερος σε ηλικία ασθενής με DBA (DBA13) παρουσίασε καρκίνο θυρεοειδούς, εύρημα που δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία. Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται ότι στους ασθενείς με DBA οι συχνότεροι συμπαγείς όγκοι είναι το αδενοκαρκίνωμα του

παχέος εντέρου, το οστεοσάρκωμα, και ο καρκίνος των γυναικείων γεννητικών οργάνων (Vlachos et al., 2008; Vlachos et al., 2012; Alter et al., 2010; Lipton et al., 2001; Shimamura et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 44% των ασθενών, που εμφανίζουν κακοήθειες ήταν μεταγγισιο-εξαρτώμενοι (Vlachos et al., 2012). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι σχετικά σπάνιος και αντιπροσωπεύει σχεδόν το 1% όλων των κακοηθειών. Η ετήσια συχνότητα του καρκίνου του θυρεοειδούς, ποικίλλει σημαντικά και κυμαίνεται από 1,2 έως 2,6 ανά 100.000 άτομα σε άνδρες και από 2,0 έως 3,8 ανά 100.000 στις γυναίκες (Sherman et al., 2009). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ αυξημένης επίπτωσης καρκίνου θυρεοειδούς σε θαλασσαιμικούς ασθενείς με υπερφόρτωση σιδήρου (Gononi et al., 2011; Roggi et al., 2011). Υπάρχουν αρκετές αναφορές στον καρκινογόνο ρόλο του σιδήρου. Η ιδιοπαθής αιμοχρωμάτωση σχετίζεται με αυξημένο ποσοστό ηπατοκυτταρικού καρκίνου, καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού. Ο σίδηρος συμμετέχει στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονος καθώς και στην εμφάνιση καρκίνου ωοθηκών στην ενδομητρίωση (Toyokuni et al., 2009; Osborne et al., 2010; Edgren et al., 2008; Fargion et al., 2010). Έχει δειχθεί ότι η περίσσεια ενδοκυττάριου σιδήρου οδηγεί στην παραγωγή οξειδωτικών ριζών, η οποία προκαλεί σοβαρή βλάβη στα κυτταρικά συστατικά και μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη μεταλλαγή (Messa et al., 2010). Η πιθανότητα κάποιων χηλικών ενώσεων σιδήρου να έχουν αντινεοπλασματική δράση είναι υπό συζήτηση (Whitnall et al., 2006). Ο πιθανός ρόλος της χρόνιας αιμοσιδήρωσης στην ανάπτυξη θηλώδους καρκίνου θυρεοειδούς στην ασθενή μας χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Καθώς η DBA θεωρείται μία νόσος με καρκινική προδιάθεση, παράγοντες, όπως η υπερφόρτωση σιδήρου που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται επιθετικά. Ο επιζήμιος ρόλος της περίσσειας σιδήρου καταδεικνύεται επίσης από τον πρόωρο θάνατο ενός από τους ασθενείς σε αυτή την καταγραφή. Έτσι, στενή παρακολούθηση της υπερφόρτωσης σιδήρου και επιθετική αποσιδήρωση πρέπει να ενσωματωθούν για το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα των ασθενών με DBA.

Με βάση την αναφερόμενη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (5-7 ασθενείς / 1.000.000 γεννήσεις), θα περίμενε κανείς ~ 40-60 ασθενείς με DBA

στον Ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν μόνο 18 ασθενείς μέχρι τώρα, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός των περιπτώσεων που δεν κατάφεραν να προσδιοριστούν. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που καταγράφονται σε αυτή την μελέτη είναι σε μικρές ηλικίες, πράγμα που σημαίνει ότι οι ενήλικες ασθενείς είτε δεν έχουν διαγνωστεί λόγω και της ατελούς διεισδυτικότητας του νοσήματος (Vlachos et al., 2008), είτε δεν παρακολουθούνται από τις μονάδες αιματολογίας / θαλασσαιμίας οι οποίες προσεγγίστηκαν για την καταγραφή των ασθενών .

Σύνδρομο Shwachman Diamond

Όπως προαναφέρθηκε και για την DBA έτσι για το σύνδρομο Shwachman Diamond είναι η πρώτη φορά που γίνεται γενετική ανάλυση και καταγραφή του φαινοτύπου των ασθενών με SDS στον Ελληνικό πληθυσμό. Αποτελεί μια σπάνια πολυσυστηματική γενετική νόσος που οφείλεται σε συχνά φαινόμενα γονιδιακής μετατροπής μεταξύ του γονιδίου *SBDS* και του ψευδογονιδίου *SBDSP*. Η επίπτωση του SDS κυμαίνεται από 1/76,563 έως 1/200,000 (Minelli et al., 2012) ενώ ο ρυθμός γεννήσεων στην Ελλάδα ανά έτος υπολογίζεται σε 100.000–110.000/ έτος. Ωστόσο μόνο 11 ασθενείς εκτιμήθηκαν στην ελληνική καταγραφή που σημαίνει είτε ότι ένας αριθμός ασθενών έχει διαφύγει της διάγνωσης λόγω της μεγάλης κλινικής ετερογένειας της νόσου είτε ότι η επίπτωση της νόσου είναι μικρότερη στον Ελληνικό πληθυσμό. Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν οι γονότυποι όλων των ασθενών με SDS. Δεν βρέθηκε κανένας ασθενής ομοζυγώτης για την c.183-184 TA> CT μετάλλαξη, όπως έχει προαναφερθεί και στη βιβλιογραφία (Boocock et al., 2003; Nakashima et al., 2004). Το 64% των ασθενών είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες για τις c.183-184TA>CT και c.258+2T>C μεταλλάξεις, που είναι αποτέλεσμα γονιδιακής μετατροπής και συμφωνεί με τις προηγούμενες μελέτες (Boocock et al., 2003) ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για την c. 258 + 2T>C και την c.460-1G>A η οποία είναι γνωστή στη βιβλιογραφία (Faber et al., 1999). Από μεθοδολογικής πλευράς η απόλυτη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων του ECMA και του

sequencing και για το SDS επεκτείνει το διαγνωστικό εύρος του ECMA και στο σύνδρομο Shwachman Diamond για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων.

Η μελέτη αυτή αναδεικνύει τη σημασία του γονιδιακού ελέγχου των ασυμπτωματικών μελών μιας οικογένειας. Σε δύο από τους ασθενείς μας (SDS02, SDS 10) με ήπια κλινική εικόνα, ετέθη η διάγνωση σε τυχαίο έλεγχο μετά την διάγνωση των αδερφών τους που είχαν βαρύτερη κλινική εικόνα, και κατά την διάρκεια γονιδιακής ανάλυσης των μελών της οικογένειας για ύπαρξη πιθανών φορέων των μεταλλάξεων. Η έγκαιρη αναγνώριση των ασθενών με SDS έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη παρακολούθηση και τον εντοπισμό επιπλοκών σε πρώιμο στάδιο καθώς επίσης και την κατάλληλη γενετική συμβουλευτική.

Οι ασθενείς με SDS έχουν αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης κυτταροπενιών δευτεροπαθώς λόγω της μυελικής ανεπάρκειας. Η συχνότερη αιματολογική εκδήλωση της νόσου είναι η ουδετεροπενία, στο 88% -98% των ασθενών (Ginzberg et al., 1999; Mack et al., 1996) και αποτελεί, μαζί με τα λευχαιμική προδιάθεση την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στους SDS ασθενείς (Shwachman et al., 1964; Myers et al., 2014; Dror et al., 2005; Donadieu et al., 2012). Στην καταγραφή μας η πιο συχνή αιματολογική ανωμαλία, στο 100% των ασθενών, στη αρχική κλινική εκδήλωση της νόσου, ήταν η ουδετεροπενία. Ανάγκη χορήγησης παράγοντα διέγερσης κοκκιοκυττάρων (G-CSF) είχαν δύο ασθενείς. Πανκυτταροπενία σχεδόν από την γέννηση, η οποία εμφανίζεται πολύ σπάνια (Alter et al., 1996), παρουσίασαν 2 ασθενείς (SDS 05, SDS07).

Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με SDS μπορεί να αναπτύξουν χαρακτηριστικούς κυτταρογενετικούς μυελικούς κλώνους χωρίς να έχουν ΜΔΣ ή ΟΜΛ και ότι αυτές οι ανωμαλίες μπορεί να παραμείνουν σταθερές χωρίς αλλαγή ή κακοήγη εξέλιξη προς ΜΔΣ ή ΟΜΛ (Crescenzi et al., 2009; Maserati et al., 2009). Μία χαρακτηριστική κυτταρογενετική ανωμαλία στο SDS που μπορεί να εμφανιστεί και να παραμείνει σταθερή χωρίς εξέλιξης σε ΜΔΣ / ΟΜΛ είναι το ισοχρωμόσωμα 7 [i(7) (q10)] (Cunningham et al., 2002). Η καλοήγη πρόγνωση του i(7) (q10) οφείλεται στο γεγονός ότι στο i(7) (q10) η μετάλλαξη c.258 + 2T> C του SBDS γονιδίου διπλασιάζεται επιτρέποντας την

παραγωγή μιας μικρής ποσότητας SBDS πρωτεΐνης, που δρα προστατευτικά προς την κακοήγη εξέλιξη (Minelli et al., 2009). Οι Pressato και οι συνεργάτες του (Pressato et al., 2015) κατέγραψαν κλωνικές αλλαγές σε 22 ασθενείς με συχνότερες το $i(7)(q10)$ σε 11 ασθενείς και η έλλειψη στο χρωμόσωμα 20 [$del(20)(q)$] σε 9 ασθενείς ενώ ακολουθούν η μη ισορροπημένη μετατόπιση $t(4;7)$ σε ένα ασθενή και η διαγραφή του χρωμοσώματος 7 σε ένα άλλο ασθενή. Τα συμπεράσματα από την μελέτη του Pressato et al είναι ότι οι βλάβες $i(7)(q10)$ και η $del(20)(q)$ μπορεί να είναι θετικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες αναφορικά με τον κίνδυνο εκδήλωσης ΜΔΣ/ΟΜΛ. Η εμφάνιση κλωνικών ανωμαλιών σχετίζεται με την ηλικία. Με αυξημένη συχνότητα κλωνικών αλλαγών να παρατηρείται με την αύξηση της ηλικίας. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Maserati και οι συνεργάτες του, οι οποίοι αναφέρθηκαν σε κλωνικές αλλαγές 16 ασθενών, που περιλάμβαναν είτε το χρωμόσωμα 7 είτε το 20 (Maserati et al., 2009).

Η δική μας καταγραφή αποκαλύπτει κυτταρογενετικές κλωνικές ανωμαλίες του μυελού των οστών μόνο σε δύο ασθενείς. Η ασθενής SDS05 παρουσίαζε ήδη από την γέννηση την ανωμαλία $i(7)(q10)$ στο 32% των προγονικών κυττάρων του μυελού ενώ από την γενική αίματος παρατηρήθηκε πανκυτταροπενία. Με βάση την βιβλιογραφία είναι η πρώτη αναφορά τόσο εμφάνισης κυτταρογενετικών ανωμαλιών μυελού σε τόσο μικρή ηλικία όσο και ο συνδιασμός της με πανκυταροπενία (Dror et al., 2011). Αξιοσημείωτο είναι ότι η ασθενής αυτή έχει και τον πιο βαρύ κλινικό φαινότυπο με βαριές σκελετικές ανωμαλίες, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σιτιστικές διαταραχές και ψυχοκινητική καθυστέρηση. Η ασθενής έχει μεταμοσχευθεί με επιτυχία από την HLA-συμβατή αδελφή της σε ηλικία 12 μηνών και παραμένει εν ζωή, εννέα χρόνια αργότερα, χωρίς αιματολογικές επιπλοκές. Επίσης η ασθενής SDS 04, εμφανίζει κλωνική διαταραχή ($46, X, del(X)(q24 \rightarrow qter)$) σε περίπου 36% (4 από 11 μιώσεις) των προγονικών μυελικών κυττάρων, εμφανή από την ηλικία των 16 ετών. Καθώς αυτή η κλωνική ανωμαλία δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία χαρακτηρίζεται ως άγνωστης κλινικής σημασίας. Η ασθενής έχει ήπια αναιμία και θρομβοπενία χωρίς να εξελίσσεται προς ΜΔΣ ή ΟΜΛ τα τελευταία 11 έτη.

Καθυστέρηση στην ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε υψηλό ποσοστό (82%) στον ελληνικό πληθυσμό, το οποίο είναι παρόμοιο με εκείνο που αναφέρεται στην Βορειοαμερικανική καταγραφή SDS (Myers 2014). Η μέση εκατοστιαία θέση του ύψους όλων των ασθενών είναι <3^η ΕΘ. Ενδοκρινικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν μόνο σε 3 ασθενείς (27%) (SDS01, 05, 07) και αφορούσαν την ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης. Μόνο 4 ασθενείς, με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν (Goeteyn et al., 1991; Kornfeld et al., 1995; Myers et al., 2013a). Η ασθενής SDS 05 εξακολουθεί να λαμβάνει θεραπεία με αυξητική ορμόνη, ενώ οι ασθενείς 01 και 07 δεν απάντησαν επαρκώς και διεκόπη η χορήγηση της. Καρδιακές ανωμαλίες εμφανίζονται σε 3 ασθενείς (27,3%), οι δύο έχουν ανοιχτό ωοειδές τρήμα και ο τρίτος μυοκαρδιοπάθεια, ποσοστό συμβατό με την βιβλιογραφία (Ryan et al., 2015; Myers et al., 2014). Γνωστική δυσλειτουργία, προκαλώντας σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής, περιορίζοντας την ανεξαρτησία και την κοινωνικοποίηση των ασθενών, έχει αναφερθεί σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με SDS, (Kent et al., 1990; Kerr et al., 2010; Perobelli et al., 2012). Τέσσερις από τους 11 ασθενείς παρουσίασαν αναπτυξιακή καθυστέρηση στη μελέτη μας.

Απεικόνιση του παγκρέατος ήταν διαθέσιμη για 8 από τους 11 ασθενείς. Από αυτούς, οι 6 ασθενείς είχαν αρχικά λιπώδη διήθηση του παγκρέατος σε υπερηχογραφική μελέτη. Στους μισούς ασθενείς (SDS 02, 06, 07) σε επανάληψη του υπερήχου παρέμεινε η λιπώδης διήθηση. Μόνο σε 1 ασθενή (SDS 05) απεικονίστηκε ρικνό το πάγκρεας. Τρανσαμινασαιμία διαπιστώθηκε κατά την αρχική διάγνωση σε 6 από τους 11 (55%) ασθενείς. Μόνο σε έναν από τους 6 ασθενείς παραμένουν τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων αυξημένα με την πάροδο της ηλικίας ευρήματα συμβατά με προηγούμενες αναφορές (Dror et al., 2011, Toivainen-Salo et al., 2009).

Αν και η συμμετοχή του δέρματος αναφέρεται ως συχνή κλινική εκδήλωση στους ασθενείς με SDS ~65% από τους Aggett και τους συνεργάτες του (Aggett 1980; Scalais et al., 2016) και ~ 30% από τους Myers και συνεργάτες του (Myers et al., 2014)- λίγα είναι γνωστά. Δερματολογικές εκδηλώσεις έχουν αναφερθεί είτε ως ιχθυόμορφη μορφή (Goeteyn et al.,

1991) είτε ως εκζεματοειδείς βλάβες (Mortureux et al., 1992; Myers et al., 2014). Δερματικές βλάβες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1964 (Shwachman et al., 1964) ως γενικευμένη ερυθηματώδης, απολέπιση. Στο 65% των 21 ασθενών η παρουσία ενός "ιχθυωτικού κηλιδοβλατιδώδους εξάνθηματος" (sic) περιλάμβανε ολόκληρο το σώμα, και ιδιαιτέρως το πρόσωπο, το κεφάλι και τον κορμό (Aggett 1980), ενώ στη μελέτη από τους Myers et al (Myers et al., 2013b) 11/37 ασθενείς παρουσίασε έκζεμα. Τα δερματικά συμπτώματα στο σύνδρομο Shwachman Diamond θα μπορούσαν ίσως να αποδοθούν στη παγκρεατική ανεπάρκεια και στη επακόλουθη δυσαπορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών, των απαραίτητων λιπαρών οξέων, καθώς και των θρεπτικών συστατικών όπως ο ψευδάργυρος. Η ανεπάρκεια των παραπάνω θα μπορούσε να προκαλέσει ερυθηματώδεις, εκζεματοειδείς και ιχθυσιόμορφες βλάβες, θυλακιώδη κεράτωση και συμμετοχή των βλεννογόνων με περιστοματική δερματίτιδα. Η ασθενής SDS 04 έχει κατά πλάκας ψωρίαση που δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία. Θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτές οι δερματικές βλάβες είναι χρόνιες και παραμένουν ακόμα και παρά την επαρκή λήψη υποκατάστατων λιποδιαλυτών βιταμινών και παγκρεατικών ενζύμων, αποκαλύπτοντας έτσι ότι η ψωρίαση δεν σχετίζεται με διατροφικές ελλείψεις.

Χαρακτηριστικές σκελετικές ανωμαλίες παρατηρούνται σε όλους τους ασθενείς με μεταλλάξεις στο SBDS γονίδιο (Mäkitie et al., 2004; Levin et al., 2015). Ωστόσο οι σκελετικές εκδηλώσεις ποικίλουν μεταξύ των ατόμων αλλά και στο ίδιο το άτομο με την πάροδο της ηλικίας. Σκελετικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν στο 64% των ασθενών στον ελληνικό πληθυσμό με πιο συχνή την μεταφυσιακή δυσπλασία. Δεδομένα από τη μελέτη των Mäkitie και των συνεργατών του 2004 αποκάλυψαν ότι συχνές σκελετικές ανωμαλίες στους ασθενείς με SDS και SBDS μεταλλάξεις αποτελούν η ανώμαλη ενδοχόνδρινη και ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση του σκελετού, η καθυστερημένη εμφάνιση αλλά το κανονικό σχήμα των επιφύσεων, η μεταβαλλόμενη διεύρυνση και οι ανωμαλίες των μεταφύσεων στην πρώιμη παιδική ηλικία (π.χ. μεταφυσιακών χονδροδυσπλασία), που ακολουθείται από την προοδευτική πάχυνση και τις ανωμαλίες των επιφυσιακών πλακών καθώς επίσης οι ανωμαλίες στα πλευρά και στις αρθρώσεις. Σε ορισμένους ασθενείς

τα σκελετικά ευρήματα μπορεί να είναι υποκλινικά όπως στον SDS 04 ασθενή που παρουσιάζει εκφυλιστική σπονδυλοαρθροπάθεια οσφυϊκής μοίρας σπονδυλικής στήλης με καλοήθεις όζους του Schmorl στην πλάκα επιφύσεων των σπονδυλικών σωμάτων. Τα ανωτέρω σκελετικά ευρήματα αποκαλύφθηκαν κατά τη διάρκεια μαγνητικής τομογραφίας της ΟΜΣΣ που διενεργήθηκε λόγω οσφυαλγίας. Οι πιο σοβαρές σκελετικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν στην ασθενή SDS 05. Εκτός από ανωμαλίες του θωρακικού κλωβού, εμφανίζει σοβαρή ραιβογονία και μεταφυσιακή δυσπλασία μηριαίων και κνημών για τα οποία απαιτούνται πολλαπλές επεμβάσεις για χειρουργική διόρθωση των ανωμαλιών.

Η γονιδιακή μετατροπή είναι μια μορφή γενετικού ανασυνδυασμού, στην οποία ένα τμήμα ενός αλληλομόρφου (δέκτης) αντικαθίσταται από ένα άλλο τμήμα (δότης) χωρίς όμως να γίνεται ανταλλαγή του γενετικού υλικού. Η διαφορά μεταξύ της γονιδιακής μετατροπής και του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι ότι στη γονιδιακή μετατροπή το αντίγραφο αλληλομόρφου του δέκτη χάνεται ενώ του δότη παραμένει αμετάβλητο και ανιχνεύεται στο δέκτη, σε αντίθεση με τον ομόλογο ανασυνδυασμό που γίνεται ανταλλαγή του γενετικού υλικού μεταξύ του δέκτη και του λήπτη και διατηρούνται και τα δύο γενετικά υλικά αλλά σε διαφορετικές θέσεις. Με τον τρόπο αυτό οι γενετικές πληροφορίες θα μπορούσαν να μεταφερθούν μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, ομόλογων χρωμοσωμάτων, ή μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών στην ίδια χρωματίδα ή σε διαφορετικά χρωμοσώματα (Chen et al., 2007)

Το 2003 οι Boocock και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν μεταλλάξεις στο *SBDS* γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 στη θέση q11. Αποτελείται από 5 εξώνια με ένα μεταγράφο 1,6 kb και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 28,8 kDa με 250 αμινοξέα. Το *SBDSP* ψευδογονίδιο του εμφανίζει 97% ομολογία με το *SBDS*, βρίσκεται 5,8 Mb περιφερικότερα. Μεταξύ των *SBDS* και *SBDSP* υπάρχει 97% ομολογία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, η οποία, όπως έχει παρατηρηθεί και σε πολλά άλλα γονίδια και ασθένειες, διευκολύνει φαινόμενα γονιδιακής μετατροπής, λαθεμένων μειωτικών συνδυασμών (ζευγών) και χασματυπίες μεταξύ των αδελφών χρωματίδων

(Nakasima et al., 2004; Chen et al., 2007). Στο ~ 90% των SDS ασθενών, ανιχνεύονται μεταλλάξεις ως αποτέλεσμα γονιδιακής μετατροπής στις οποίες περιλαμβάνονται και οι δύο πιο κοινές οι c.183-184 TA>CT και c.258+ 2T>C του εξωνίου 2. Ωστόσο, οι Nakashima και συνεργάτες του έδειξαν επίσης ότι φαινόμενα γονιδιακής μετατροπής μπορούν να γίνουν τόσο στο εξώνιο 1 όσο και στο εξώνιο 3 (Nakasima et al., 2004).

Σε αυτή τη μελέτη περιγράφονται αναλυτικά τρεις περιπτώσεις (SDS 02, SDS 04, SDS 11) ασθενών με SDS παρέχοντας περαιτέρω στοιχεία για τους παθογενετικούς μηχανισμούς που διέπουν τη φαινοτυπική έκφραση του SDS. Αυτό που έχει μεγάλο ενδιαφέρον είναι ότι και στις 3 περιπτώσεις ο μωσαικισμός φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας για την σοβαρότητα του φαινοτύπου. Υψηλή κλινική ετερογένεια που παρατηρείται ακόμη και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας που φέρουν πανομοιότυπο γονότυπο φαίνεται να μπορεί να αποδοθεί στο ποσοστό των κυττάρων που φέρουν τις μεταλλάξεις.

Η ασθενής SDS04 από τον αρχικό γονιδιακό έλεγχο διαπιστώθηκε ότι είναι σύνθετος ετεροζυγώτης για τις c.183-184 TA>CT και c.258+2T>C μεταλλάξεις. Λεπτομερής γενετική ανάλυση όλων των εξωνίων καθώς και των περιοχών ματίσματος ιντρονίων / εξονίων του SBDS γονιδίου σε επιπλέον μέλη της οικογένειας αποκάλυψε ένα σύνθετο τρόπο κληρονομικότητας πιθανώς ως αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων επεισοδίων γονιδιακής μετατροπής ή ένα πολύπλοκο συνδυασμό γονιδιακής μετατροπής και ανασυνδιασμού (εικόνα 32, 33). Από τον γονιδιακό έλεγχο των γονέων προκύπτει ότι και οι δύο γονείς είναι φορείς της c.258 + 2T>C, επομένως θα περίμενε κανείς ομοζυγωτία αυτής της μετάλλαξης στον ασθενή. Ωστόσο η c.258 + 2T>C φαίνεται να είναι παρούσα μόνο στο ήμισυ των κυττάρων και από τους τέσσερις ιστούς που ελέγχθηκαν (αίμα, μυελό των οστών, στοματικά κύτταρα και βολβούς από τριχωτό κεφαλής) επιβεβαιώνοντας την ετεροζυγωτία και αποκλείοντας ιστοειδικό μωσαικισμό. Αντίθετα, η γενετική ανάλυση του μητρικού παππού αποκάλυψε ότι είναι διπλός ετεροζυγώτης για τις c.183-184 TA>CT και c.258 + 2T>C μεταλλάξεις οι οποίες, ωστόσο, δεν ήταν παρούσες σε ίσες εκατοστιαίες αναλογίες με τα φυσιολογικά αλληλόμορφα. Επομένως αν και κανονικά η παρουσία αυτών των

μεταλλάξεων δύναται να προκαλέσει την κλινική εκδήλωση του SDS, η αριθμητική υπεροχή των φυσιολογικών αλληλομόρφων (όπως φαίνεται στην αλληλούχηση και τα αποτελέσματα της διπλής πέψης) μπορεί να εξηγήσει την απουσία κλινικών εκδηλώσεων SDS στον παππού. Από το γενετικό προφίλ και των έξι μελών της οικογένειας η ασθενής SDS04 και η μητέρα της φαίνεται να έχουν κληρονομήσει διαφορετικά αλληλόμορφα. Ο πιο πιθανός μηχανισμός που μπορεί να προταθεί περιλαμβάνει ένα φαινόμενο ανασυνδιασμού που συνέβη στους γαμέτες του παππού και οδήγησε στη δημιουργία αλληλομόρφου όπου όλες οι νουκλεοτιδικές αλλαγές βρίσκονται in cis στη μητέρα και μετέπειτα ακολουθούμενη από ένα συμβάν γονιδιακής μετατροπής οδηγούν στο σχηματισμό ενός θηλυκού γαμέτη (μητρικό αλληλόμορφο), όπου μόνο η c.183-184 TA> CT και c.201A> G παραλλαγές ανιχνεύονται στον ασθενή. (Εικόνες 32-34)

Η ασθενής SDS01 είναι διπλός ετεροζυγώτης για την c.183-184 TA> CT μετάλλαξη την οποία έχει κληρονομήσει από τον πατέρα της και την c.258 + 2T>C την οποία έχει κληρονομήσει από την μητέρα της. Ο μεταγενέστερος γονιδιακός έλεγχος της μεγαλύτερης σε ηλικία αδερφή της SDS02 αποκάλυψε ότι είναι επίσης διπλός ετεροζυγώτης για τις c.183-184 TA> CT και c.258 + 2T>C αλλά με μωσαικό πρότυπο για την c.258 + 2T>C πιθανότητα λόγω γεγονότων γονιδιακής μετατροπής εξηγώντας και την ήπια κλινικής της εικόνα.

Τόσο ο ασθενής SDS11 όσο και ο πατέρας του φαίνονται να είναι διπλοί ετεροζυγώτες για τις c.183-184 TA> CT και c.258 + 2T> C, ενώ η μητέρα και η αδελφή του δεν φέρουν καμία μετάλλαξη. Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανάλυσης από την διπλή πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα AclI και Bsu36I παρατηρείται ότι ένα μεγάλο ποσοστό από το αρχικό προϊόν δεν έχει υποστεί πέψη υποδεικνύοντας μια ακόμα φορά την ύπαρξη μωσαικισμού τόσο για τον πατέρα όσο και για τον ασθενή. Ο ασθενής πληρεί τα διαγνωστικά κριτήρια για SDS (Dror et al., 2011), παρά την απουσία της παγκρεατικής ανεπάρκειας (Myers et al., 2014; Andolina et al., 2013), ενώ ο πατέρας του δεν έχει ιστορικό λοιμώξεων, δυσλειτουργίας του μυελού των οστών, σκελετικών ανωμαλίων ή δυσσπορρόφησης. Η ασυμφωνία αυτή

μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου μπορεί να αποδοθεί μόνο στο ποσοστό του φυσιολογικού SBDS προς το παθολογικό υβρίδιο SBDS/SBDSP.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την παρούσα μελέτη έγινε δυνατή η καταγραφή ενός σημαντικού αριθμού ασθενών με DBA στην Ελλάδα. Ο παρατηρούμενος φαινότυπος και γονότυπος αναδεικνύει την ετερογένεια της νόσου και την πολυπλοκότητα της παθογένεσης της. Για την ολοκλήρωση της γενετικής διερεύνησης σε μερικούς ασθενείς, απαιτούνται περαιτέρω γενετικές ανάλυσεις και άλλων γονιδίων και χρήση νεωτέρων μεθόδων (MLPA). Η εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς σε ένα από τους ασθενείς που μεταγγίζεται συστηματικά τα τελευταία χρόνια μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς, καθώς και στην τοξικότητα της χρόνιας αιμοσιδήρωσης.

Παράλληλα, καταγράφηκε ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με SDS στην Ελλάδα με μεγάλη κλινική ετερογένεια που περιλαμβάνει σοβαρό φαινότυπο που χρήζουν οι ασθενείς μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ήδη από την γέννηση μέχρι και σε φυσιολογικό φαινότυπο όπου η διάγνωση έγινε τυχαία. Ο τύπος κληρονομικότητας του SDS μπορεί να είναι πολύ περίπλοκος και αυτό οφείλεται κυρίως στα φαινόμενα γονιδιακής μετατροπής που συμβαίνουν. Ο μωσαϊκισμός δεν φαίνεται να είναι σπάνιος και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κυρίως σε περιπτώσεις στην ίδια οικογένεια με κλινική ετερογένεια και ίδιο γονότυπο. Σε όλους τους ασθενείς ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στο SBDS γονίδιο. Οι συχνότερες μεταλλάξεις που καταγράφηκαν όπως και σε προηγούμενες αναφορές ήταν οι c.258+2T>C και c.183-184TA>CT. Η τροποποίηση του αρχικού RFLP πρωτοκόλλου με την ταυτόχρονη πέψη και των δύο ενζύμων, συμβάλλει στην αναγνώριση της θέσης των δύο συχνότερων μεταλλάξεων c.183-184 TA> CT και c.258+2T> C και συγκεκριμένα αν συνυπάρχουν στο ίδιο αλληλόμορφο ή σε διαφορετικά. Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του φαινοτύπου και του γονοτύπου των ασθενών με SDS.

Από την μελέτη αυτή αναδεικνύεται η ανάγκη συστηματικής καταγραφής των ασθενών με σπάνια νοσήματα, όπως η DBA και SDS, μέσω ανάπτυξης μητρώων. Η ανάλυση των δεδομένων, που συλλέγονται επιτυγχάνει καλύτερο καθορισμό διαγνωστικών κριτηρίων, την καταγραφή όλων των πιθανών φαινοτύπων, των επιπλοκών που εμφανίζουν αλλά και των θεραπευτικών αποτελεσμάτων, συμβάλλοντας στη βελτίωση της ιατρικής φροντίδας των ασθενών με το σπάνια νοσήματα. Η ανάπτυξη μητρώων σε συνδυασμό με την ανάπτυξη πρωτοκόλλων εργαστηριακής διερεύνησης είναι απαραίτητο στοιχείο για την οργάνωση κέντρων αναφοράς για σπάνια νοσήματα, όπως η DBA και SDS. Η χρήση νεώτερων μοριακών τεχνικών (Next Generation Sequencing) αναμένεται να απλουστεύσει την αποτύπωση της γενετικής βάσης των αιματολογικών αυτών νοσημάτων, συμβάλλοντας στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών.

Βιβλιογραφία

Aggett P, Cavanagh NP, Matthew DJ, Pincott JR, Sutcliffe J, Harries JT. Shwachman's syndrome A review of 21 cases. Arch Dis Child 1980;55:331–347.

Aghalar J, Atsidaftos E, Lipton JM, Vlachos A. Improved outcomes in Diamond Blackfan anemia treated via stem cell transplantation since the year 2000. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).2009

Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, Carr AG, Greene MH, Rosenberg PS. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. Br J Hematol 2010;150:179-188.

Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007:29–39.

Alter BP, Young NS. The bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin HS, editors. Hematology of Infancy and Childhood. Volume 1. Saunders; Philadelphia, PA: 1998. pp. 237-335.

Andolina JR, Morrison CB, Thompson AA, Chaudhury S, Mack AK, Proytcheva M, Corey SJ. Shwachman-Diamond syndrome: diarrhea, no longer required? J Pediatr Hematol Oncol. 2013;35:486-489.

August CS, King E, Githens JH, McIntosh K, Humbert JR, Greensheer A, Johnson RB. Establishment of erythropoiesis following bone marrow transplantation in a patient with congenital hypoplastic anemia (Diamond-Blackfan syndrome). Blood 1976;48:491–498.

Austin KM, Gupta ML, Coats SA, et al Mitotic spindle destabilization and genomic instability in Shwachman-Diamond Syndrome J Clin. Invest. 2008;118:1511-1518.

Austin KM, Gupta ML Jr, Coats SA, Tulpule A, Mostoslavsky G, Balazs AB, Mulligan RC, Daley G, Pellman D, Shimamura A. The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. Blood 2005;106:1253–1258.

Ball SE, McGuckin CP, Jenkins G, Gordon-Smith EC. Diamond-Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. *Br J Hematol* 1996;94:645–653.

Bezzerri V, Vella A, Calcaterra E, Finotti A, Gasparello J, Gambari R, Assael BM, Cipolli M, Sorio C. New insights into the Shwachman-Diamond Syndrome-related haematological disorder: hyper-activation of mTOR and STAT3 in leukocytes. *Sci Rep* 2016;6:33165.

Bodian M, Sheldon W, Lightwood R. Congenital hypoplasia of the exocrine pancreas. *Acta Paediatr* 1964;53:282–293.

Boocock GR, Morrison JA, Popovic M, Richards N, Ellis L, Durie PR, Rommens JM.. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003;33:97–101.

Boria I, Garelli E, Gazda HT, Aspesi A, Quarello P, Pavesi E, Ferrante D, Meerpohl JJ, Kartal M, Da Costa L, Proust A, Leblanc T, Simansour M, Dahl N, Fröjmark AS, Pospisilova D, Cmejla R, Beggs AH, Sheen MR, Landowski M, Buros CM, Clinton CM, Dobson LJ, Vlachos A, Atsidaftos E, Lipton JM, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat.* 2010 ;31:1269-1279

Boria I, Quarello P, Avondo F, Garelli E, Aspesi A, Carando A, Campagnoli MF, Dianzani I, Ramenghi U.. A new database for ribosomal protein genes which are mutated in Diamond Blackfan anemia. *Human Mutation* 2008;29:263-270.

Borowitz D, Robinson KA, Rosenfeld M, Davis SD, Sabadosa KA, Spear SL, Michel SH, Parad RB, White TB, Farrell PM, Marshall BC, Accurso FJ.. Cystic Fibrosis Foundation evidence-based guidelines for management of infants with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2009;155(6 Suppl):S73-93.

Brueton MJ, Mavromichalis J, Goodchild MC, Anderson CM.. Hepatic dysfunction in association with pancreatic insufficiency and cyclical neutropenia Shwachman-Diamond syndrome. *Arch Dis Child* 1977;52:76–78.

Burroughs L, Woolfrey A and Shimamura A. Shwachman-Diamond Syndrome: A Review of the clinical presentation, molecular, pathogenesis, diagnosis and treatment *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:233-248.

Campagnoli MF, Ramenghi U, Armiraglio M, Quarello P, Garelli E, Carando A, Avondo F, Pavesi E, Fribourg S, Gleizes PE, Loreni F, Dianzani I.. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2008;29:911-920.

Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, Longoni D, Pecile V, Zecca M, Dufour C, Ramenghi U, Dianzan I.. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Hematologica* 2004;89:480–489.

Cathie IA. Erythrogenesis imperfecta. *Arch Dis Child* 1950;25:313–324.

Choesmel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, Pinaud N, Legrand P, Gazda HT, Gleizes PE Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet.* 2008 1;17:1253-63.

Cipolli M, D'Orazio C, Delmarco A, Marchesini C, Miano A, Mastella G.. Shwachman's syndrome: pathomorphosis and long-term outcome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 1999;29:265–272.

Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Férec C, Patrinos GP. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet* 2007 ;8(10):762-75

Choesmel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, Pinaud N, Legrand P, Gazda HT, Gleizes PE. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1253-1263.

Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Petrtlyova K, Mihal V, Stary J, Cerna Z, Jabali Y, Pospisilova D. Identification of mutations in the ribosomal

protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2009;30:321-327

Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2007;28:1178–1182.

Cmejla R, Blafkova J, Stopka T, Zavadil J, Pospisilova D, Mihal V, Petrtlylova K, Jelinek J. Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with diamond-blackfan anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:124–132.

Crescenzi B, La Starza R, Sambani C, Parcharidou A, Pierini V, Nofrini V, Brandimarte L, Matteucci C, Aversa F, Martelli MF, Mecucci C Totipotent stem cells bearing del(20q) maintain multipotential differentiation in Shwachman Diamond syndrome. *Br J Haematol* 2009;144:116-119.

Crétien A, Hurtaud C, Moniz H, Proust A, Marie I, Wagner-Ballon O, Choesmel V, Gleizes PE, Leblanc T, Delaunay J, Tchernia G, Mohandas N, Da Costa L. Study of the effects of proteasome inhibitors on ribosomal protein S19 (RPS19) mutants, identified in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hematologica* 2008;93:1627-1634.

Cunningham J, Sales M, Pearce A, Howard J, Stallings R, Telford N, Wilkie R, Huntly B, Thomas A, O'Marcaigh A, Will A, Pratt N. Does isochromosome 7q mandate bone marrow transplant in children with Shwachman-Diamond syndrome? *Br J Haematol*. 2002;119:1062-1069.

Danks DM, Haslam R, Mayne V, Kaufmann HJ, Holtzapple PG. Metaphyseal chondrodysplasia, neutropenia, and pancreatic insufficiency presenting with respiratory distress in the neonatal period. *Arch Dis Child* 1976;51:697–702.

Dhanraj S, Manji A, Pinto D, Scherer SW, Favre H, Loh ML, Chetty R, Wei AC, Dror Y.. Molecular characteristics of a pancreatic adenocarcinoma associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 754–760.

Diamond LK, Blackfan K. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child* 1938;56:464–467.

Dianzani I, Loreni F. Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle. *Haematologica* 2008;93:1601-1604.

Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Clinton C, Schneider HE, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Arceci RJ, Farrar JE, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Gazda HT. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2010;86:222-228.

Dokal I, Rule S, Chen F, Potter M, Goldman J. Adult onset of acute myeloid leukemia (M6) in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1997;99:171–173.

Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beaufils S, Bellanger F, Mahlaoui N, Lambilliotte A, Aladjidi N, Bertrand Y, Mialou V, Perot C, Michel G, Fouyssac F, Paillard C, Gandemer V, Boutard P, Schmitz J, Morali A, Leblanc T, Bellanné-Chantelot C; Associated investigators of the French Severe Chronic Neutropenia Registry*. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica* 2012;97:1312-1319

Donadieu J, Michel G, Merlin E, Bordigoni P, Monteux B, Beaupain B, Leverger G, Laporte JP, Hermine O, Buzyn A, Bertrand Y, Casanova JL, Leblanc T, Gluckman E, Fischer A, Stephan JL. Hematopoietic stem cell transplantation for Shwachman-Diamond syndrome: experience of the French neutropenia registry. *Bone Marrow Transplant* 2005a;36:787–792.

Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, Barkaoui M, Fenneteau O, Bertrand Y, Maier-Redelsperger M, Micheau M, Stephan JL, Phillipe N, Bordigoni P, Babin-Boilletot A, Bensaid P, Manel AM, Vilmer E, Thuret I, Blanche S, Gluckman E, Fischer A, Mechinaud F, Joly B, Lamy T, Hermine O, Cassinat B, Bellanné-Chantelot C, Chomienne C;. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with

Congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica* 2005b; 90:45–53.

Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N.. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999;21:169–175.

Dror Y, Donadieu J, Koglmeyer J, Dodge J, Toiviainen-Salo S, Makitie O, Kerr E, Zeidler C, Shimamura A, Shah N, Cipolli M, Kuijpers T, Durie P, Rommens J, Siderius L, Liu JM. Draft consensus guidelines for diagnosis and treatment of Shwachman-Diamond syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 ;1242:40-55

Dror Y. Shwachman-Diamond syndrome (Review). *Pediatric Blood and Cancer* 2005;45:892–901.

Dror Y, Durie P, Ginzberg H, Herman R, Banerjee A, Champagne M, Shannon K, Malkin D, Freedman MH.. Clonal evolution in marrows of patients with Shwachman-Diamond syndrome: a prospective 5-year follow-up study. *Exp Hematol* 2002;30:659–669.

Dror Y, Ginzberg H, Dalal I, Cherepanov V, Downey G, Durie P, Roifman CM, Freedman MH. Immune function in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 2001a;114:712–717.

Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome marrow cells show abnormally increased apoptosis mediated through the Fas pathway. *Blood* 2001b;97:3011–3016.

Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome: An inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty marrow microenvironment. *Blood* 1999;94:3048–3054.

Dror Y, Squire J, Durie P, Freedman MH.. Malignant myeloid transformation with isochromosome 7q in Shwachman-Diamond syndrome. *Leukemia* 1998;12:1591–1595.

Ebert BL, Lee MM, Pretz JL, Subramanian A, Mak R, Golub TR, Sieff CA.. An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond-Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood* 2005; 105:4620–4626.

Edgren G, Nyren O, Melbye M. Cancer as a ferrotoxic disease: are we getting hard stainless evidence? *J Natl Cancer Inst* 2008;100:976-977.

Elghetany MT, Alter BP. p53 protein overexpression in bone marrow biopsies of patients with Shwachman-Diamond syndrome has a prevalence similar to that of patients with refractory anemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:452–455.

Faber J, Lauener R, Wick F, Betts D, Filgueira L, Seger RA, Güngör T. Shwachman-Diamond syndrome: early bone marrow transplantation in a high risk patient and new clues to pathogenesis. *Eur J Pediatr*. 1999 Dec;158(12):995-1000

Faivre L, Meerpohl J, Da Costa L, Marie I, Nouvel C, Gnekow A, Bender-Götze C, Bauters F, Coiffier B, Peaud PY, Rispal P, Berrebi A, Berger C, Flesch M, Sagot P, Varet B, Niemeyer C, Tchernia G, Leblanc T. High-risk pregnancies in Diamond-Blackfan anemia: a survey of 64 pregnancies from the French and German registries. *Haematologica* 2006;91:530–533.

Fargion S, Valenti L, Fracanzani AL. Hemochromatosis gene (HFE) mutation and cancer risk: expanding the clinical manifestation of hereditary iron overload. *Hepatology* 2010;51:1119-1121.

Farrar JE, Vlachos A, Atsidaftos E, Carlson-Donohoe H, Markello TC, Arceci RJ, Ellis SR, Lipton JM, Bodine DM. Ribosomal protein gene deletions in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2011;118:6943-6951

Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, Talbot CC Jr, Meltzer P, Esposito D, Beggs AH, Schneider HE, Grabowska A, Ball SE, Niewiadomska E, Sieff CA, Vlachos A, Atsidaftos E, Ellis SR, Lipton

JM, Gazda HT, Arceci RJ.. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2008;112:1582-1592.

Finch AJ, Hilcenko C, Basse N, Drynan LF, Goyenechea B, Menne TF, González Fernández A, Simpson P, D'Santos CS, Arends MJ, Donadieu J, Bellanné-Chantelot C, Costanzo M, Boone C, McKenzie AN, Freund SM, Warren AJ.. Uncoupling of GTP hydrolysis from eIF6 release on the ribosome causes Shwachman-Diamond syndrome. *Genes Dev.* 2011;25:917-929.

Fleitz J, Rumelhart S, Goldman F, Ambruso D, Sokol RJ, Pacini D, Quinones R, Holida M, Lee N, Tannous R, Giller R. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for Shwachman-Diamond syndrome . *Bone Marrow Transplant* 2002;29:75–79.

Ganapathi KA, Austin KM, Lee CS, Dias A, Malsch MM, Reed R, Shimamura A. The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood* 2007;110:1458–1465.

Gasser C. Aplastische Anämie (chronische Erythroblastophthise) und Cortison. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift. Journal Suisse de Medecine* 1951;81:1241–1242.

Gazda HT, Preti M, Sheen MR, O'Donohue MF, Vlachos A, Davies SM, Kattamis A, Doherty L, Landowski M, Buros C, Ghazvinian R, Sieff CA, Newburger PE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH.. Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat* 2012;33:1037-1044.

Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 2008;83:769-780.

Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, Vlachos A, Atsidaftos E, Ball SE, Orfali KA, Niewiadomska E, Da Costa L, Tchernia G, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Stahl J, Schratt G, Glader B, Backer K, Wong C, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA.. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond Blackfan Anemia. *Am J Hum Genet* 2006;79:1110-1118.

Gazda H, Lipton JM, Willig TN, Ball S, Niemeyer CM, Tchernia G, Mohandas N, Daly MJ, Ploszynska A, Orfali KA, Vlachos A, Glader BE, Rokicka-Milewska R, Ohara A, Baker D, Pospisilova D, Webber A, Viskochil DH, Nathan DG, Beggs AH, Sieff CA.. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease. *Blood* 2001;97: 2145-2150.

Ginzberg H, Shin J, Ellis L, Morrison J, Ip W, Dror Y, Freedman M, Heitlinger LA, Belt MA, Corey M, Rommens JM, Durie PRShwachman syndrome: phenotypic manifestations of sibling sets and isolated cases in a large patient cohort are similar. *J Pediatr* 1999 ;135:81-88.

Giri N, Kang E, Tisdale JF, Follman D, Rivera M, Schwartz GN, Kim S, Young NS, Rick ME, Dunbar CE. Clinical and laboratory evidence for a trilineage haematopoietic defect in patients with refractory Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2000;108:167–175.

Glader BE, Backer K, Diamond LK. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med* 1983;309 :1486-1490.

Graham AR, Walson PD, Paplanus SH, Payne CM.. Testicular fibrosis and cardiomegaly in Shwachman's syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1980;104:242–244.

Grinspan ZM, Pikora CA. Infections in patients with Shwachman-Diamond syndrome . *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:179–181.

Gripp KW, McDonald-McGinn DM, La Rossa D, McGain D, Federman N, Vlachos A, Glader BE, McKenzie SE, Lipton JM, Zackai EH. Bilateral microtia

and cleft palate in cousins with Diamond- Blackfan anemia. *Am J Med Genet* 2001;101:268–274.

Goeteyn M, Oranje AP, Vuzevski VD, de Groot R, van Suijlekom-Smit LW. Ichthyosis, exocrine pancreatic insufficiency, impaired neutrophil chemotaxis, growth retardation, and metaphyseal dysplasia (Shwachman syndrome). Report of a case with extensive skin lesions (clinical, histological, and ultrastructural findings) *Arch Dermatol*. 1991;127:225-230..

Goobie S, Popovic M, Morrison J, Ellis L, Ginzberg H, Boocock GR, Ehtesham N, Bétard C, Brewer CG, Roslin NM, Hudson TJ, Morgan K, Fujiwara TM, Durie PR, Rommens JM.. Shwachman-Diamond syndrome with exocrine pancreatic dysfunction and bone marrow failure maps to the centromeric region of chromosome 7. *Am J Hum Genet* 2001;68:1048–1054.

Govoni MR Sprocati M, Fabbri E, Zanforlin N, De Sanctis V.. Papillary thyroid cancer in thalassaemia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2011;8 Suppl 2:314-321.

Gustavsson P, Garelli E, Draptchinskaia N, Ball S, Willig TN, Tentler D, Dianzani I, Punnett HH, Shafer FE, Cario H, Ramenghi U, Glomstein A, Pfeiffer RA, Goringe A, Olivieri NF, Smibert E, Tchernia G, Elinder G, Dahl N.. Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1998;63:1388-1395.

Hauet Q, Beaupain B, Micheau M, Blayo M, Gandemer V, Gottrand F, Blin N, Fouyssac F, Lethor JP, Bellanné-Chantelot C, Bonnet D, Donadieu J. Cardiomyopathies and congenital heart diseases in Shwachman-Diamond syndrome: a national survey. *Int J Cardiol*. 2013;167:1048-1050.

Henter JI, Karlen J. Fatal agranulocytosis after deferiprone therapy in a child with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2007; 109:5157–5159.

Ho W, Cheretakis C, Durie P, Kulkarni G, Glogauer M. Prevalence of oral diseases in Shwachman-Diamond syndrome. *Spec Care Dentist*. 2007; 27: 52–58.

Horos R, von Lindern M. Molecular mechanisms of pathology and treatment in Diamond Blackfan Anaemia. *Br J Haematol* 2012;159:514-527.

Ip WF, Dupuis A, Ellis L, Beharry S, Morrison J, Stormon MO, Corey M, Rommens JM, Durie PR. Serum pancreatic enzymes define the pancreatic phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *J Pediatr* 2002;141:259–265.

Jaako P, Flygare J, Olsson K, et al. A Novel Mouse Model for RPS19-Deficient Diamond-Blackfan Anemia Locates the Erythroid Defect at CFU-E/Proerythroblast Transition. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts). 2009

Joseph JR, Wilkinson DA, Bailey NG, Lieberman AP, Tsien CI, Orringer DA. Aggressive Myeloid Sarcoma Causing Recurrent Spinal Cord Compression. *World Neurosurg* 2015;84:866.

Karthik A, Ganapathi and Shimamura A. Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure *BJ Hematology* 2008;141:376-387.

Kawakami T, Mitsui T, Kanai M, Shirahata E, Sendo D, Kanno M, Noro M, Endoh M, Hama A, Tono C, Ito E, Tsuchiya S, Igarashi Y, Abukawa D, Hayasaka K. Genetic analysis of Shwachman-Diamond Syndrome: Phenotypic Heterogeneity in Patients Carrying identical SBDS mutations *Tohoku J Exp Med* 2005;206:253-259.

Kent A, Murphy GH, Milla P. Psychological characteristics of children with Shwachman syndrome. *Arch Dis Child* 1990; 65:1349–1452.

Kerr, E.N., Ellis, L., Dupuis, A., Rommens, J.M. , Durie, P.R.,. The behavioral phenotype of school-age children with Shwachman Diamond syndrome indicates neurocognitive dysfunction with loss of Shwachman–Bodian–Diamond syndrome gene function. *J Pediatr* 2010;156 (3):433–438.

Kornfeld SJ, Kratz J, Diamond F, Day NK, Good RA.. Shwachman-Diamond syndrome associated with hypogammaglobulinemia and growth hormone deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:247–250.

Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E.. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hematologica* 2010;95:1293-1299.

Kuijpers TW, Alders M, Tool AT, Mellink C, Roos D, Hennekam RC. Hematologic abnormalities in Shwachman Diamond syndrome: lack of genotype-phenotype relationship. *Blood* 2005;106: 356–361.

Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2012;119:2376-2384.

Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W.. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 2000;10:703–713.

Landowski M¹, O'Donohue MF, Buros C, Ghazvinian R, Montel-Lehry N, Vlachos A, Sieff CA, Newburger PE, Niewiadomska E, Matysiak M, Glader B, Atsidaftos E, Lipton JM, Beggs AH, Gleizes PE, Gazda HT.. Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet* 2013;132:1265-1274.

Levin TL, Mäkitie O, Berdon WE, Lachman RS. Shwachman-Bodian-Diamond syndrome: metaphyseal chondrodysplasia in children with pancreatic insufficiency and neutropenia. *Pediatr Radiol*. 2015;4):1066-1071.

Lesesve JF, Dugué F, Grégoire MJ, Witz F, Dror Y.. Shwachman-Diamond syndrome with late-onset neutropenia and fatal acute myeloid leukaemia without maturation: a case report. *Eur J Haematol* 2003;71:393–395.

Lipton JM, and Ellis S. Diamond-Blackfan anemia: Diagnosis, treatment and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:261-282.

Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:558–564.

Lipton JM, Federman N, Khabbaze Y, Schwartz CL, Hilliard LM, Clark JI, Vlachos A. Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan Anemia Registry. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:39–44.

Lipton JM, Kudisch M, Gross R, Nathan DG. Defective erythroid progenitor differentiation system in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *Blood* 1986;67:962–968.

Mack DR, Forstner GG, Wilschanski M, Freedman MH, Durie PR.. Shwachman syndrome: exocrine pancreatic dysfunction and variable phenotypic expression. *Gastroenterology* 1996;111:1593–1602.

Mäki M, Sorto A, Hällström O, Visakorpi JK.. Hepatic dysfunction and dysgammaglobulinaemia in Shwachman-Diamond syndrome. *Arch Dis Child* 1978;53:693–694.

Mäkitie O, Ellis L, Durie PR, Morrison JA, Sochett EB, Rommens JM, Cole WG. Skeletal phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome and mutations in SBDS. *Clin Genet* 2004;65:101–112.

Maserati E, Pressato B, Valli R, Minelli A, Sainati L, Patitucci F, Marletta C, Mastronuzzi A, Poli F, Lo Curto F, Locatelli F, Danesino C, Pasquali F. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br J Haematol* 2009;14:190-197.

Messa E, Carturan S, Maffè C, Pautasso M, Bracco E, Roetto A, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Rosso V, Zanone C, Rotolo A, Greco E, Pellegrino RM, Alberti D, Saglio G, Cilloni D.. Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell

iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. *Hematologica* 2010;95:1308-1316.

Minelli A, Nicolis E, Cannioto Z, Longoni D, Perobelli Sandra. Incidence of Shwachman Diamond Syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(7):1334-1335.

Minelli A, Maserati E, Nicolis E, Zecca M, Sainati L, Longoni D, Lo Curto F, Menna G, Poli F, De Paoli E, Cipolli M, Locatelli F, Pasquali F, Danesino C. The isochromosome i(7)(q10) carrying c.258+2t>c mutation of the SBDS gene does not promote development of myeloid malignancies in patients with Shwachman syndrome. *Leukemia* 2009;23:708-711.

Mirabello L, Macari ER, Jessop L, Ellis SR, Myers T, Giri N, Taylor AM, McGrath KE, Humphries JM, Ballew BJ, Yeager M, Boland JF, He J, Hicks BD, Burdett L, Alter BP, Zon L, Savage SA. Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood*. 2014 ;124:24-32.

Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J, Karlsson S. Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells* 2008;26:323–329.

Morel AS, Joris N, Meuli R, Jacquemont S, Ballhausen D, Bonafe L, Fattet S, Tolsa JF. Early neurological impairment and severe anemia in a newborn with Pearson syndrome. *Eur J Pediatr*. 2009;168:311–315.

Mortureux P, Taïeb A, Bazeille JE, Hehunstre JP, Maleville . Shwachman syndrome: a case report. *J Pediatr Dermatol* 1992;9:57-61.

Myers K. Abnormal circumferential strain measured by echocardiography is present in patients with Shwachman-Diamond syndrome despite normal shortening fraction. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:1228-1231.

Myers KC, Bolyard AA, Otto B, Wong TE, Jones AT, Harris RE, Davies SM, Dale DC, Shimamura A. Variable clinical presentation of Shwachman-

Diamond syndrome: update from the North American Shwachman-Diamond Syndrome Registry. *J Pediatr*. 2014;164:866-870

Myers KC, Rose SR, Rutter MM, Mehta PA, Khoury JC, Cole T, Harris RE. Endocrine evaluation of children with and without Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene mutations and Shwachman-Diamond syndrome. *J Pediatr*. 2013a;162:1235-1240

Myers KC, Davies SM, Shimamura A. Clinical and molecular pathophysiology of Shwachman-Diamond syndrome: an update. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013b;27:117-128

Nakashima E, Mabuchi A, Makita Y, Masuno M, Ohashi H, Nishimura G, Ikegawa S. Novel SBDS mutations caused by gene conversion in Japanese patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Hum Genet* 2004;114:345-348.

Nakaya T, Kurata A, Hashimoto H, Nishimata S, Kashiwagi Y, Fujita K, Kawashima H, Kuroda M. Young-age-onset pancreatoduodenal carcinoma in Shwachman-Diamond syndrome. *Pathol Int*. 2014;64:75-80.

Narla A, Payne EM, Abayasekara N, Hurst SN, Raiser DM, Look AT, Berliner N, Ebert BL, Khanna-Gupta A. L-Leucine improves the anaemia in models of Diamond Blackfan anaemia and the 5q- syndrome in a TP53-independent way. *Br J Haematol*. 2014;167(4):524-528.

Narla A, Vlachos A, Nathan DG. Diamond Blackfan anemia treatment: past, present, and future. *Semin Hematol*. 2011;48:117-123.

Nezelof C, LeSec G. Multifocal myocardial necrosis and fibrosis in pancreatic diseases of children. *Pediatrics* 1979;63:361–368.

Nicolis E, Bonizzato A, Assael BM, Cipolli M. Identification of novel mutations in patients with Shwachman-Diamond Syndrome *Human Mutation* 2005;25:410.

Nivelon JL, Michiels R, Martres-Lassaunière MN, Passavy-Trouche AM, Petit A, Lorenzini JL. Myocardial fibrosis in Shwachman's syndrome: pathogenic discussion of cardiac complications. *Pediatric* 1978;33:461–469.

Ohene-Abuakwa Y, Orfali KA, Marius C, Ball SE. Two-phase culture in Diamond Blackfan anemia: localization of erythroid defect. *Blood* 2005;105:838–846.

Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT.: Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(:4597-4602.

Orfali KA, Ohene-Abuakwa Y, Ball SE. Diamond Blackfan anaemia in the UK: clinical and genetic heterogeneity. *Br J Hematol* 2004;125:243-252.

Osborne NJ, Gurrin LC, Allen KJ, Constantine CC, Delatycki MB, McLaren CE, Gertig DM, Anderson GJ, Southey MC, Olynyk JK, Powell LW, Hopper JL, Giles GG, English DR. HFE C282Y homozygotes are at increased risk of breast and colorectal cancer. *Hepatology* 2010;51:1311-1318.

Parrella S, Aspesi A, Quarello P, Garelli E, Pavesi E, Carando A, Nardi M, Ellis SR, Ramenghi U, Dianzani I. Loss of GATA-1 full length as a cause of Diamond-Blackfan anemia phenotype. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:1319-1321.

Payne EM, Virgilio M, Narla A, Sun H, Levine M, Paw BH, Berliner N, Look AT, Ebert BL, Khanna-Gupta. AL-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood* 2012;120:2214-2224.

Perdahl EB, Naprstek BL, Wallace WC, Lipton JM. Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood* 1994;83:645–650.

Perobelli S, Nicolis E, Assael BM, Cipolli M.,. Further characterization of Shwachman–Diamond syndrome: psychological functioning and quality of life in adult and young patients. *Am J Med Genet* 2012;158A(3):567-573.

Poggi M, Sorrentino F, Pascucci C, Monti S, Lauri C, Bisogni V, Toscano V, Cianciulli P.. Malignancies in β -thalassemia patients: first description of two cases of thyroid cancer and review of the literature. *Hemoglobin* 2011;35:439-446.

Pressato B, Valli R, Marletta C, Mare L, Montalbano G, Curto FL, Pasquali F, Maserati E. Cytogenetic monitoring in Shwachman-Diamond syndrome: a note on clonal progression and a practical warning. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37:307-310.

Quarello P, Garelli E, Carando A, Brusco A, Calabrese R, Dufour C, Longoni D, Misuraca A, Vinti L, Aspesi A, Biondini L, Loreni F, Dianzani I, Ramenghi U. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Hematologica* 2010;95:206-213.

Raj AB, Bertolone SJ, Barch MJ, Hersh JH. Chromosome 20q deletion and progression to monosomy 7 in a patient with Shwachman-Diamond syndrome without MDS/AML. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:508–509.

Ramenghi U, Garelli E, Valtolina S, Campagnoli MF, Timeus F, Crescenzo N, Mair M, Varotto S, D'Avanzo M, Nobili B, Massolo F, Mori PG, Locatelli F, Gustavsson P, Dahl N, Dianzani I. Diamond-Blackfan anaemia in the Italian population. *Br J Haematol* 1999;104: 841-848.

Rawls AS, Gregory AD, Woloszynek JR, Liu F, Link DC.. Lentiviral-mediated RNAi inhibition of Sbds in murine hematopoietic progenitors impairs their hematopoietic potential. *Blood* 2007;110:2414–2422.

Roggero S, Quarello P, Vinciguerra T, Longo F, Piga A, Ramenghi U. Severe iron overload in Blackfan-Diamond anemia: a case-control study. *Am J Hematol*. 2009;84:729-732.

Rothbaum RJ, Williams DA, Daugherty CC. Unusual surface distribution of concanavalin A reflects a cytoskeletal defect in neutrophils in Shwachman's syndrome. *Lancet* 1982;2:800–801.

Ryan TD, Jefferies JL, Chin C, Sticka JJ, Taylor MD, Harris R, Moore J, Goodridge E, Mount L, Bolyard AA, Otto B, Jones A, Shimamura A, Davies S, Myers K. Abnormal circumferential strain measured by echocardiography is present in patients with Shwachman-Diamond syndrome despite normal shortening fraction. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(7):1228-1231.

Sacrez R, Klein F, Hoffmann B, Lévy JM, Geisert J, Korn R.. Hypoplasia of exocrine pancreas Associated myoendocardial fibrosis in 1 of 2 brothers]. *Annales de Pédiatrie* 1969;16:43–48.

Sakamoto KM, Shimamura A, Davies SM. Congenital disorders of ribosome biogenesis and bone marrow failure. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:S12-17

Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, Sieff CA, Orkin SH, Nathan DG, Lander ES, Gazda HT.. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 2012;122:2439-2443.

Savchenko A, Krogan N, Cort JR, Evdokimova E, Lew JM, Yee AA, Sánchez-Pulido L, Andrade MA, Bochkarev A, Watson JD, Kennedy MA, Greenblatt J, Hughes T, Arrowsmith CH, Rommens JM, Edwards AM.. The Shwachman-Bodian diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *J Biol Chem* 2005;280:19213–19220.

Savilahti E, Rapola J. Frequent myocardial lesions in Shwachman's syndrome. Eight fatal cases among 16 Finnish patients. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1984;73:642–651.

Scalais E, Connerotte AC, Despontin K, Biver A, Ceuterick-de Groote C, Alders M, Kolivras A, Hachem JP, De Meirleir L. Shwachman-Diamond syndrome presenting with early ichthyosis, associated dermal and epidermal intracellular lipid droplets, hypoglycemia, and later distinctive clinical SDS phenotype. *Am J Med Genet A*. 2016 ;170:1799-1805.

Shah N, Cambrook H, Kogelmeier J, Mason C, Ancliff P, Lindley K, Smith VV, Bajaj-Elliott M, Sebire NJ... Enteropathic histopathological features may be associated with Shwachman-Diamond syndrome. *J Clin Pathol* 2010;63:592–594.

Sherman SI. National Comprehensive Cancer Network, Clinical Practice Guidelines in Oncology, Thyroid Cancer V.I. 2009 (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/thyroid.pdf)

Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* 2010;24:101-122.

Shenoy N, Kessel R, Bhagat TD, Bhattacharyya S, Yu Y, McMahon C, Verma A. Alterations in the ribosomal machinery in cancer and hematologic disorders. *J Hematol Oncol*. 2012;18;5:32.

Shwachman DH, Diamond LK, Oski FA, Khaw KT. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J Pediatr* 1964;65:645-663.

Singh SA, Vlachos A, Morgenstern NJ, Ouansafi I, Ip W, Rommens JM, Durie P, Shimamura A, Lipton JM. Breast cancer in a case of Shwachman Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59: 945–946.

Smith OP, Hann IM, Chessells JM, Reeves BR, Milla P.. Haematological abnormalities in Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol* 1996;94:279–284.

Song MJ, Yoo EH, Lee KO, Kim GN, Kim HJ, Kim SY, Kim SH. A novel initiation codon mutation in the ribosomal protein S17 gene (RPS17) in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:629-631.

Stepanovic V, Wessels D, Goldman FD, Geiger J, Soll DR.. The chemotaxis defect of Shwachman-Diamond Syndrome leukocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2004;57:158–174.

Thornley I, Dror Y, Sung L, Wynn RF, Freedman MH. Abnormal telomere shortening in leucocytes of children with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol*. 2002;117:189-192.

Toiviainen-Salo S¹, Durie PR, Numminen K, Heikkilä P, Marttinen E, Savilahti E, Mäkitie O. The natural history of Shwachman–Diamond syndrome-associated liver disease from childhood to adulthood. *J Pediatr* 2009;155:807-811.

Toiviainen-Salo S, Raade M, Durie PR, Ip W, Marttinen E, Savilahti E, Mäkitie O. Magnetic resonance imaging findings of the pancreas in patients with Shwachman-Diamond syndrome and mutations in the SBDS gene. *J Pediatr* 2008a;152:434–436.

Toiviainen-Salo S, Pitkänen O, Holmström M, Koikkalainen J, Lötjönen J, Lauerma K, Taskinen M, Savilahti E, Smallhorn J, Mäkitie O, Kivistö S.. Myocardial function in patients with Shwachman-Diamond syndrome: aspects to consider before stem cell transplantation. *Pediatric Blood and Cancer* 2008b;51:461–467.

Toiviainen-Salo S, Mäyränpää MK, Durie PR, Richards N, Grynpas M, Ellis L, Ikegawa S, Cole WG, Rommens J, Marttinen E, Savilahti E, Mäkitie O. Shwachman-Diamond syndrome is associated with low-turnover osteoporosis. *Bone* 2007;41:965–972.

Tsai PH¹, Sahdev I, Herry A, Lipton JM.. Fatal cyclophosphamide-induced congestive heart failure in a 10-year-old boy with Shwachman-Diamond syndrome and severe bone marrow failure treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990;12:472–476.

Tsai PH, Arkin S, Lipton JM. An intrinsic progenitor defect in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 1989;73:112–120.

Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci* 2009;100:9-16.

Venkatasubramani N, Mayer AN. A zebrafish model for the Shwachman-Diamond syndrome (SDS). *Pediatr Res* 2008;63:348–352.

Veropalumbo C, Campanozzi A, De Gregorio F, Correra A, Raia V, Vajro P. Shwachman-Diamond syndrome with autoimmune-like liver disease and enteropathy mimicking celiac disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015;39(1): e1-4

Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM.. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 2012;119:3815-3819.

Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, Meerpohl J, Karlsson S, Liu JM, Leblanc T, Paley C, Kang EM, Leder EJ, Atsidaftos E, Shimamura A, Bessler M, Glader B, Lipton JM. Diagnosing and treating Diamond Blackfan Anemia: Results of an Clinical Concensus Conference. *Br J Haematol* 2008;142:859-876.

Vlachos A, Federman N, Reyes-Haley C, Abramson J, Lipton JM. Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Bone Marrow Transplant* 2001a;27:381–386.

Vlachos A, Klein GW, Lipton JM. The Diamond Blackfan Anemia Registry: tool for investigating the epidemiology and biology of Diamond-Blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001b;23:377–382.

Vogiatazakis N, Kekou K, Sophocleous C, Kitsiou S, Mavrou A, Bakoula C, Kanavakis E.. Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol. *Mol Biotechnol* 2007;37:212-219.

Wan Y, Chen X, An W, Ruan M, Zhang J, Chang L, Zhang R, Zhu S, Zhang Y, Yang W, Guo Y, Yuan W, Zou Y, Chen Y, Zhu X. Clinical features, mutations and treatment of 104 patients of Diamond-Blackfan anemia in China: a single-center retrospective study. *Int J Hematol*. 2016;104(4):430-439.

Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168:854-864.

Whitnall M, Howard J, Ponka P, Richardson DR. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:14901-14906.

Williams MS, Ettinger RS, Hermanns P, Lee B, Carlsson G, Taskinen M, Mäkitie O. The natural history of severe anemia in cartilage-hair hypoplasia. *Am J Med Genet A* 2005;138:35-40.

Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, Ball S, Niemeyer C, Ramenghi U, Orfali K, Gustavsson P, Garelli E, Brusco A, Tiemann C, Pérignon JL, Bouchier C, Cicchiello L, Dahl N, Mohandas N, Tchernia G. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood* 1999;94:4294–4306.

Willig TN, Niemeyer CM, Leblanc T, Tiemann C, Robert A, Budde J, Lambiliotte A, Kohne E, Souillet G, Eber S, Stephan JL, Girot R, Bordigoni P, Cornu G, Blanche S, Guillard JM, Mohandas N, Tchernia G. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond-Blackfan anemia patients. DBA group of Societe d'Hematologie et d'Immunologie Pediatrique (SHIP), Gesellschaft fur Padiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res* 1999b;46:553–561.

Woloszynek JR, Rothbaum RJ, Rawls AS, Minx PJ, Wilson RK, Mason PJ, Bessler M, Link DC. Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 2004;104:3588–3590.

Wong CC, Traynor D, Basse N, Kay RR, Warren AJ. Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 2011;118:4305-4312.

Woods WG, Krivit W, Lubin BH, Ramsay NK.. Aplastic anemia associated with the Shwachman syndrome In vivo and in vitro observations. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1981;3:347–351.

Woods WG, Roloff JS, Lukens JN, Krivit W.. The occurrence of leukemia in patients with the Shwachman syndrome. *J Pediatr* 1981;99:425–428.

Xu X, Xiong X, Sun Y. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci China Life Sci.* 2016 ;59(7):656-672.

Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, Besack D, Yeung JA, Kowalski D, Yeung AT. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry* 2000;39:3533-3541.

Young, NS.; Alter, B. Bone Marrow Failure Syndromes: Introduction. WB Saunders Company; Philadelphia, PA: 1994. Aplastic Anemia Acquired and Inherited; p. 271-274.

Yusuf U, Frangoul HA, Gooley TA, Woolfrey AE, Carpenter PA, Andrews RG, Deeg HJ, Appelbaum FR, Anasetti C, Storb R, Sanders JE. Allogeneic bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia: the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:805–814.

Zhang S, Shi M, Hui CC, Rommens JM. Loss of the mouse ortholog of the shwachman-diamond syndrome gene (*Sbds*) results in early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2006;26:6656-6663.