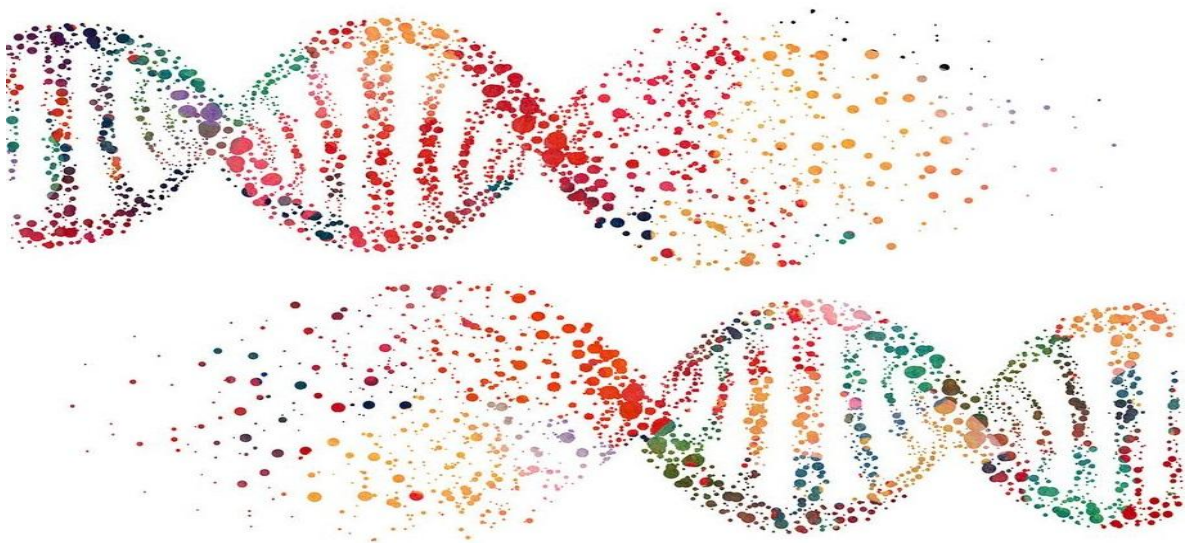


Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιατρική Σχολή, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας

Διπλωματική Εργασία

Αναζήτηση μεταλλάξεων των γονιδίων HESX1, LHX3, και LHX4 σε ασθενείς με Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια και παθολογικά απεικονιστικά ευρήματα από την υποθάλαμο-υποφυσιακή περιοχή.



Προγράμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία»

Αναστασία Τσακίρη

Ιατρός

Αθήνα

Σεπτέμβριος 2017

Τριμελής Επιτροπή

Χριστίνα Κανακά – Geintenbein, MD, PhD, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και Διαβήτη, Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιατρικής Σχολής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αμαλία Σερτεδάκη, PhD, Ε.ΔΙ.Π, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιατρικής Σχολής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μιχάλης Κουτσιλιέρης, MD, Ph.D Καθηγητής, Τμήμα Πειραματικής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αφιερωμένο στα αγγελούδια μου,
Ευτυχία και Άγγελο που με γεμίζουν ευτυχία!

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη «Μοριακή και Εφηρμοσμένη Φυσιολογία» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο σημείο αυτό, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Θα ήθελα να απευθύνω εγκάρδιες ευχαριστίες στους Καθηγητές κ. Κώστα Κωνσταντόπουλο (Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας, Α' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ), Στυλιανό Τσακίρη (Αναπληρωτή Καθηγητή Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ) και στον φίλο και συναθλητή μου Πύρρο Δήμα, οι οποίοι πρόθυμα δέχτηκαν να συντάξουν και να αποστείλουν τις απαραίτητες για την εγγραφή μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών, συστατικές επιστολές.

Στον Διευθυντή και Επιστημονικό Υπεύθυνο του ΠΜΣ Καθηγητή Μιχάλη Κουτσιλιέρη που μου έδωσε την ευκαιρία να παρακολουθήσω το ΠΜΣ αποκομίζοντας ουσιαστικές γνώσεις και εφόδια.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω στην επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου Χριστίνα Κανακά – Geintenbein για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την προσεκτική ανάγνωση, τις πολύτιμες υποδείξεις και παρατηρήσεις της, προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

Αισθάνομαι ιδιαίτερη ανάγκη να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κα Αμαλία Σερετάκη όχι μόνο για τη συνεχή καθοδήγηση, η οποία υπήρξε καταλυτική στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας, τις ουσιώδεις συμβουλές, την εμπιστοσύνη και την ενθάρρυνση που μου έδειξε στο εργαστήριο, αλλά και γιατί με στήριξε σε προσπάθειές μου πέρα από τα πλαίσια αυτής της εργασίας, δείχνοντας κατανόηση όταν η προτεραιότητα περάτωσης άλλων προσωπικών θεμάτων έφερναν σε δεύτερη μοίρα την ανάπτυξη της διπλωματικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου σε αυτό το μεταπτυχιακό Ελένη Γκολφινόπουλου που με έφερε σε επαφή με το εργαστήριο ενδοκρινολογίας και τους καθηγητές και για την προτροπή της να επιλέξω και διεκπεραιώσω μια διπλωματική εργασία σε ένα άγνωστο για μένα μέχρι τότε επιστημονικό πεδίο.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Έλσα Τάτση (Βιολόγος, M.Sc.) για την προθυμία, τη μεταδοτικότητα της, το οργανωτικό της πνεύμα και το χρόνο που διέθεσε απλόχερα, ώστε να μπορέσω να εξοικειωθώ με όλες τις απαραίτητες διαδικασίες και τις τεχνικές του εργαστηρίου, αναγκαίες για να υλοποιηθεί το πειραματικό σκέλος της διπλωματικής εργασίας.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, η οποία μου πρόσφερε απλόχερα αμέριστη συμπαράσταση, αγάπη, στήριξη και υπομονή, πίστη στις δυνατότητές μου, ηθική υποστήριξη, ενθάρρυνση, ψυχική και υλική βοήθεια, σε κάθε στάδιο της ζωής μου αλλά και στην επιτυχή διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Περίληψη

Η υπόφυση, ο σημαντικότερος ενδοκρινής αδένας του οργανισμού, έχει διττή εμβρυολογική προέλευση και η εκκριτική της λειτουργία ρυθμίζεται από τον υποθάλαμο. Οι ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται από την υπόφυση είναι μείζονος σημασίας για την ανάπτυξη και την ομοιόσταση του οργανισμού.

Η πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια (ΠΥΑ) χαρακτηρίζεται από αδυναμία παραγωγής δύο ή περισσότερων υποφυσιακών ορμονών και τα αίτιά της είναι ποικίλα. Το 80% περίπου των περιπτώσεων συγγενούς ΠΥΑ είναι αγνώστου αιτιολογίας και το υπόλοιπο 20% οικογενούς και σποραδικής εμφάνισης ΠΥΑ έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν εξειδικευμένους μεταγραφικούς παράγοντες, απαραίτητους για την πολύπλοκη διαδικασία της οργανογένεσης της υπόφυσης. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται και δρουν με προγραμματισμένη χωροχρονική αλληλουχία, καταστέλλοντας και ενεργοποιώντας γονίδια – στόχους. Σήμερα αναφέρονται περίπου 30 γονίδια τα οποία σχετίζονται με την παθογένεση της υποφυσιακής ανεπάρκειας.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μοριακή διερεύνηση των γονιδίων *HESX1*, *LHX3* και *LHX4* σε έξι ασθενείς με ΠΥΑ και παθολογικά απεικονιστικά ευρήματα από την υποθαλαμο-υποφυσιακή περιοχή. Σε έναν ασθενή ανιχνεύθηκε νέα παρερμηνεύσιμη αλλαγή p.D373E. στο γονίδιο *LHX4* με το ασπαρτικό οξύ της θέσης p.373 να έχει συντηρηθεί για 842 εκατομμύρια χρόνια μεταξύ διαφόρων ειδών (φυλογενετικά) αλλά και μεταξύ των *LIM* γονιδίων.

Η έρευνα των τελευταίων είκοσι περίπου ετών μας έχει βοηθήσει να κατανοήσουμε καλύτερα την συντονισμένη ενεργοποίηση πλειάδας μηχανισμών οι οποίοι απαιτούνται για τη φυσιολογική εμβρυολογική ανάπτυξη της υπόφυσης. Επιπλέον η ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών γονιδίων-στόχων με την μεθοδολογία της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) παρέχει γρήγορα αποτελέσματα και μπορεί να προσφέρει μοριακή διάγνωση σε ασθενείς με ΠΥΑ και αδιευκρίνιστα γενετικά αίτια στο άμεσο μέλλον.

Abstract

The pituitary, the most important gland of the body (organism), has a double embryological origin and its secretory function is regulated by the hypothalamus. The pituitary releases specific hormones that play an important role in the development and homeostasis of the organism.

Combined or Multiple Pituitary Hormone Deficiency (CPHD, MPHD) is a condition characterized by the lack of 2 or more pituitary hormones and its etiology is multifactorial. The etiology of 80% congenital hypopituitarism cases remains unknown, while the etiology of the remaining 20% sporadic or familial cases of congenital hypopituitarism is determined by molecular defects in genes, which code specific transcription factors required for the complex procedure of pituitary organogenesis. Temporal and spatial regulation of these genes, activates or inactivates target genes. A total of about 30 genes has been found to be implicated in the pathogenesis of congenital hypopituitarism today.

In the current study molecular genetic screening for mutations within the *HESX1*, *LHX3* and *LHX4* genes has been performed in six patients with CPHD and abnormal imaging findings of the hypothalamic-pituitary region. A novel missense variant (p.D373E) of *LHX4* gene has been identified in one patient. The aspartic acid at codon 373 is highly conserved through species in among other *LIM* genes.

Over the last two decades, studies of the pituitary development have contributed to the elucidation of a large number of mechanisms involved in pituitary ontogenesis. Furthermore, in the near future, simultaneous screening of multiple target gene by the use of next generation sequencing (NGS) will provide fast results and contribute to a molecular diagnosis in patients with CPHD and still unidentified genetic causes.

Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή	1
2.	Υπόφυση	5
2.1	Αιμάτωση της υπόφυσης.....	5
2.2	Οντογένεση/Οργανογένεση της υπόφυσης	6
2.2.1	<i>BMP4</i>	10
2.2.2	Fibroblast Growth Factors <i>FGF8/10</i>	11
2.2.3	Sonic Hedgehog <i>Shh</i>	11
2.2.4	<i>BMP2</i>	12
2.2.5	<i>SOX2/3</i>	12
2.2.6	<i>HESX1</i>	13
2.2.7	<i>LHX3 / LHX4</i>	14
2.2.8	<i>PROP1</i>	23
2.2.9	<i>POU1F1</i>	24
3.	Σκοπός.....	25
4.	Ασθενείς και Μέθοδοι	25
4.1	Ασθενείς – Ιστορικό	25
4.2	Μέθοδοι.....	28
4.2.1	Απομόνωση DNA	28
4.2.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)	30
4.2.3	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v.....	35
4.2.4	Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger	37
4.2.5	Τεχνική MLPA.....	40
5.	Αποτελέσματα.....	44
5.1	Αλληλούχιση DNA κατά Sanger.....	44
5.2	Μέθοδος MLPA	46
5.3	Αδύναμα Σημεία	47
6.	Συζήτηση – Συμπεράσματα	49
7.	Βιβλιογραφία	54

Πίνακας συντμήσεων-ακρωνύμια

a GSU	α-υποομάδα της Γλυκοπρωτεΐνης
ACTH	(Adrenocorticotrophic Hormone) Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη
ADH	(Antidiuretic Hormone -Vasopressine/AVP) Αντιδιουρητική Ορμόνη – Βαζοπρεσσίνη ή Αγγειοπιεσίνη
Asn	(Asparagine) Ασπαργινίνη
Asp	(Aspartic Acid) Ασπαρτικό Οξύ
ATP	(Adenosine Triphosphate) Τριφωσφορική Αδενοσίνη
BMP 2/4	(Bone Morphogenetic Protein 2/4) Οστεο-Μορφογενετική Πρωτεΐνη 2/4
Ca	(Calcium) Ασβέστιο
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate Τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate Τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη
dCTP	Deoxycytidine Triphosphate Τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη
ddNTP	Τριφωσφορικό Διδεοξυνουκλεοτίδιο
dGTP	Deoxyguanosine Triphosphate Τριφωσφορική γουανοσίνη
dNTP	Τριφωσφορικό Δεοξυνουκλεοτίδιο
e	(Embryonic Day) Εμβρυϊκή Ημέρα
E.coli	(Escherichia coli) Εσσερίχια κόλι
EDTA	(Ethylenediaminetetraacetic acid) Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
FGF 8/10	Fibroblast Growth Factor 8/10
FGR	(Fetal Growth Restriction) Εμβρυϊκή Καθυστέρηση της Ανάπτυξης
FSH	(Follicle-Stimulating Hormone) Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη
FSHβ	(Follicle-Stimulating Hormone beta subunit) β-υποομάδα της Ωοθυλακιοτρόπου Ορμόνης
GH	(Growth Hormone) Αυξητική Ορμόνη
GHRH	(Growth Hormone–Releasing Hormone) Σωματοεκλυτίνη, Εκλυτική Ορμόνη της έκκρισης Αυξητικής Ορμόνης
GHRHR	(Growth Hormone–Releasing Hormone Receptor) Υποδοχέας Εκλυτικής Ορμόνης της έκκρισης Αυξητικής Ορμόνης
GLI 2	Glioma-associated Oncogene 2
Glu	(Glutamine acid) Γλουταμινικό οξύ
GnRH	(Gonadotropin-Releasing Hormone) Εκλυτική Ορμόνη των Γοναδοτροπινών
HD	(Homeodomain) Ομοιοπεριοχή
HESX 1	Homeobox Expressed in Stem Cells 1
HIDI	(Highly Deionized Formamide) Υψηλής ποιότητας απιονισμένο Φορμαμίδιο
IGHD	(Isolated Growth Hormone Deficiency) Μεμονωμένη Ανεπάρκεια της Αυξητικής Ορμόνης
ISL 1	Insulin gene enhancer
LH	(Luteinizing Hormone) Ωχρινοτρόπος Ορμόνη
LHX 3/4	LIM Homeobox ¾
LHβ	(Luteinizing Hormone subunit beta) β-υποομάδα της Ωχρινοτρόπου Ορμόνης
Mg+2	(Magnesium) Μαγνήσιο
MRI	(Magnetic Resonance Imaging) Μαγνητική Τομογραφία
NGS	(Next Generation Sequencing) Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης
POMC	(Proopiomelanocortin) Προοπιομελανοκορτίνη
POU1F1 / Pit1	POU Class 1 Homeobox 1 ή POU Class 1 Transcription Factor 1
PRL	(Prolactin) Προλακτίνη
PROP 1	Prophet of Pit1
PSIS	(Pituitary stalk interruption syndrome) Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης
RDS	(Respiratory Distress Syndrome) Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας
SD	(Standard Deviation) Σταθερή Απόκλιση
Ser	(Serine) Σερίνη
SHH	Sonic Hedgehog
SOX 2	Sry-related HMG box 2

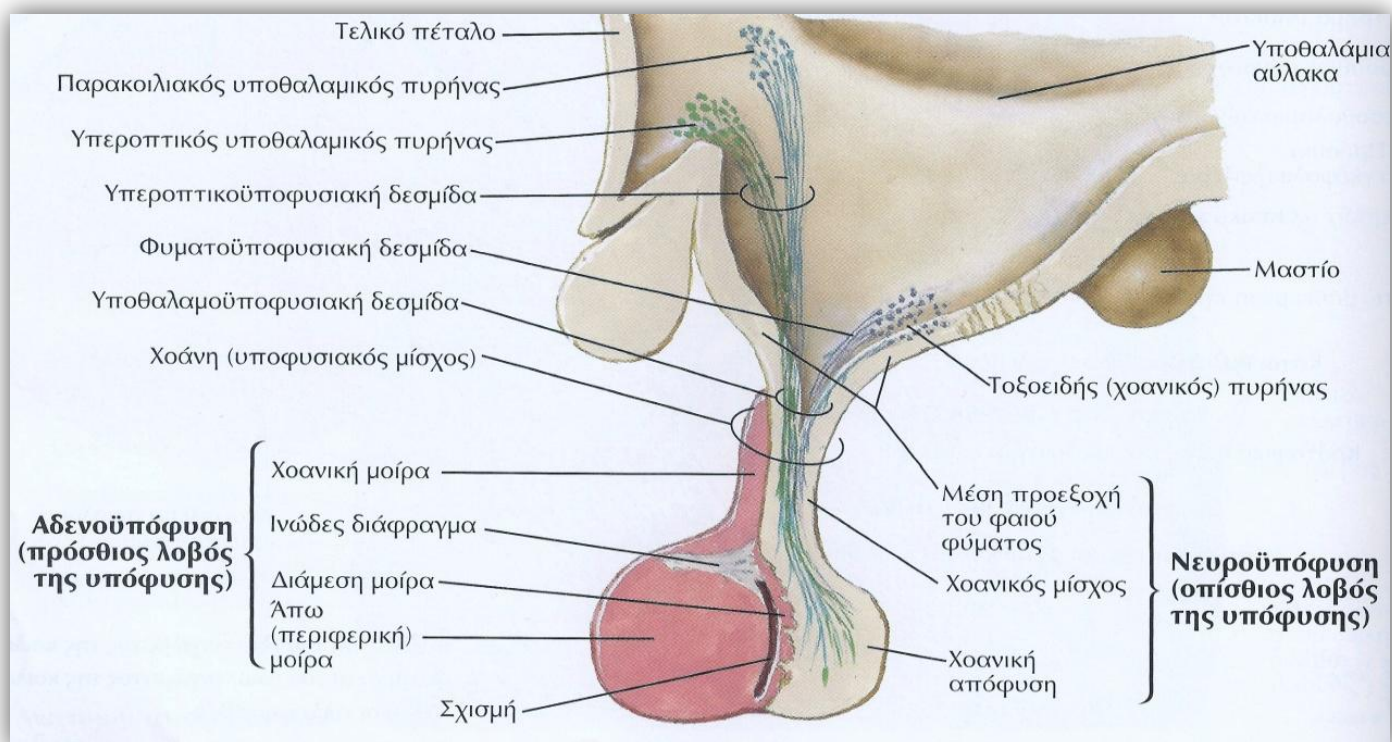
T4	Thyroxine Θυροξίνη
Tm	(Melting Temperatur) Θερμοκρασία Αποδιάταξης
TSH	Θυρεοτρόπος Ορμόνη ή Θυρεοτροπίνη
VD	(Ventral Diencephalon) Κοιλιακός Διεγκεφάλος
VIP	(Vasoactive Intestinal Peptide) Αγγειοδραστικό Εντερικό Πεπτίδιο
WES	(Whole Exome Sequencing) Αλληλούχιση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του Γονιδιώματος
WGS	(Whole Genome Sequencing) Αλληλούχιση ολόκληρου του Γονιδιώματος
Wnt 4/5a	Fusion of the name of the Drosophila segment polarity gene Wingless and the name of the vertebrate homolog, integrated or int-1
YM	Υποπλασία Μεσολόβιου
αGSU	(alpha Glycoprotein Hormone subunit) α-υποομάδα της Γλυκοπρωτεΐνης
AAΥ	Απλασία Αδενοϋπόφυσης
ΑΥ	Αδενοϋπόφυση
ΔΕ	Δεν εκτιμήθηκε/διερευνήθηκε
ΕΝΕ	Έκτοπη Νευροϋπόφυση
ΗΕΓ	Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα
ΜΥ	Μίσχος της Υπόφυσης
ΝΥ	Νευροϋπόφυση
ΟΤ	(Oxytocin) Ωκυτοκίνη
ΠΥΑ	Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια
TSHβ	(Thyroid Stimulating Hormone beta subunit) β-υποομάδα της Θυρεοειδοτρόπου Ορμόνης
ΤΕ	Τουρκικό Εφίπιο
Υ	Υποπλασία
ΥΑΥ	Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης
ΥΜΥ	Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης
ΥπερΑΥ	Υπερπλασία Αδενουπόφυσης
ΥΤΕ	Υποπλασία Τούρκικου Εφίπιου

1. Εισαγωγή

Η υπόφυση είναι ο σημαντικότερος ενδοκρινής αδένας του οργανισμού μέσω του οποίου ο υποθάλαμος, το συντονιστικό κέντρο του ενδοκρινικού συστήματος, ασκεί τις δράσεις του (Μπατρίνος, 2007). Ο υποθάλαμος και η υπόφυση συσχετίζονται ανατομικά και έχουν παράλληλη εμβρυολογική ανάπτυξη και σε συνεργασία ρυθμίζουν τη λειτουργία περιφερικών αδένων, του θυρεοειδούς, του φλοιού των επινεφριδίων και των γονάδων, επιπρόσθετα εμπλέκονται σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και είναι μείζονος σημασίας για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την απάντηση στο stress και την ομοιόσταση του οργανισμού (Davis et al., 2013).

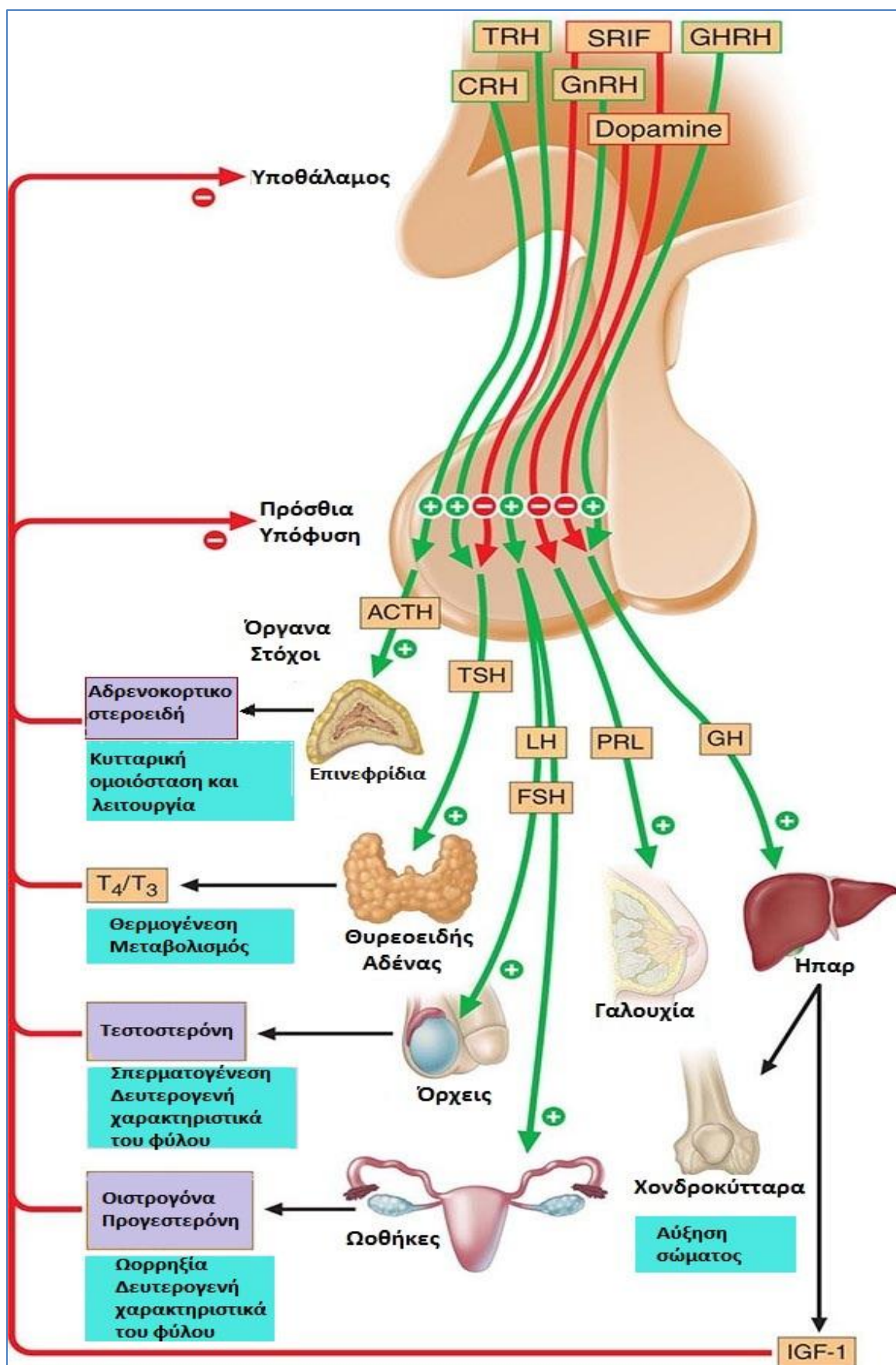
Ο αδένας της υπόφυσης αποτελεί μικρό ωοειδές μόρφωμα που εδράζεται στη βάση του κρανίου σε μία κοιλότητα του σφηνοειδούς οστού, το τουρκικό εφιπίτιο (sella turcica) (Μπατρίνος, 2007). Η υπόφυση περιβάλλεται από τη σκληρή μήνιγγα, η οροφή που δημιουργείται από την αναδίπλωση της σκληρής μήνιγγας, σχηματίζει το διάφραγμα του εφιπίτιου και έτσι χωρίζεται η υπόφυση από τον υπερκείμενο εγκέφαλο και προστατεύεται ο αδένας από την πίεση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και την αραχνοειδή μεμβράνη. Ακριβώς πάνω από το διάφραγμα του εφιπίτιου σε απόσταση 5-10 mm βρίσκεται το οπτικό χίασμα. Στον ενήλικα η υπόφυση ζυγίζει κατά μέσο όρο 0.6 g, έχει διάμετρο εγκάρσια 13-15 mm, προσθοπίσθια 9-10 mm και κατακόρυφη περίπου 6 mm. Οι διαστάσεις και το βάρος διαφοροποιούνται από παράγοντες όπως η ηλικία, η εγκυμοσύνη και η γαλουχία (Greenspan & Gardner, 2010; Φούντας, 2015).

Η υπόφυση συνίσταται από την αδενοϋπόφυση και την νευροϋπόφυση. Η αδενοϋπόφυση που καταλαμβάνει το 75-80% του οργάνου αποτελείται από την πρόσθια μοίρα (ή πρόσθιο λοβό), τη διάμεση μοίρα (ή διάμεσο λοβό) και την χοανική μοίρα. Την νευροϋπόφυση συγκροτούν ο οπίσθιος λοβός, ο χοανικός μίσχος και το μέσο έπαρμα ή μέση προεξοχή του φαιού φύματος (Musumeci et al., 2015; Μπατρίνος, 2007). Η πρόσθια μοίρα αποτελείται από πέντε τύπους ορμονοεκκριτικών κυττάρων: τα σωματοτρόπα, τα οποία εκκρίνουν την αυξητική ορμόνη (GH), τα θυρεοτρόπα, την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), τα κορτικοτρόπα, την αδρενοκορτικοτρόπο ορμόνη (ACTH) και σχετικά με αυτήν πεπτίδια, τα λακτοτρόπα, την προλακτίνη (PRL) και τα γοναδοτρόπα, την θυλακιοτρόπο (FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH). Η διάμεση μοίρα της υπόφυσης αποτελείται από μελανοτρόπα κύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν προοπιομελανοκορτίνη (POMC).



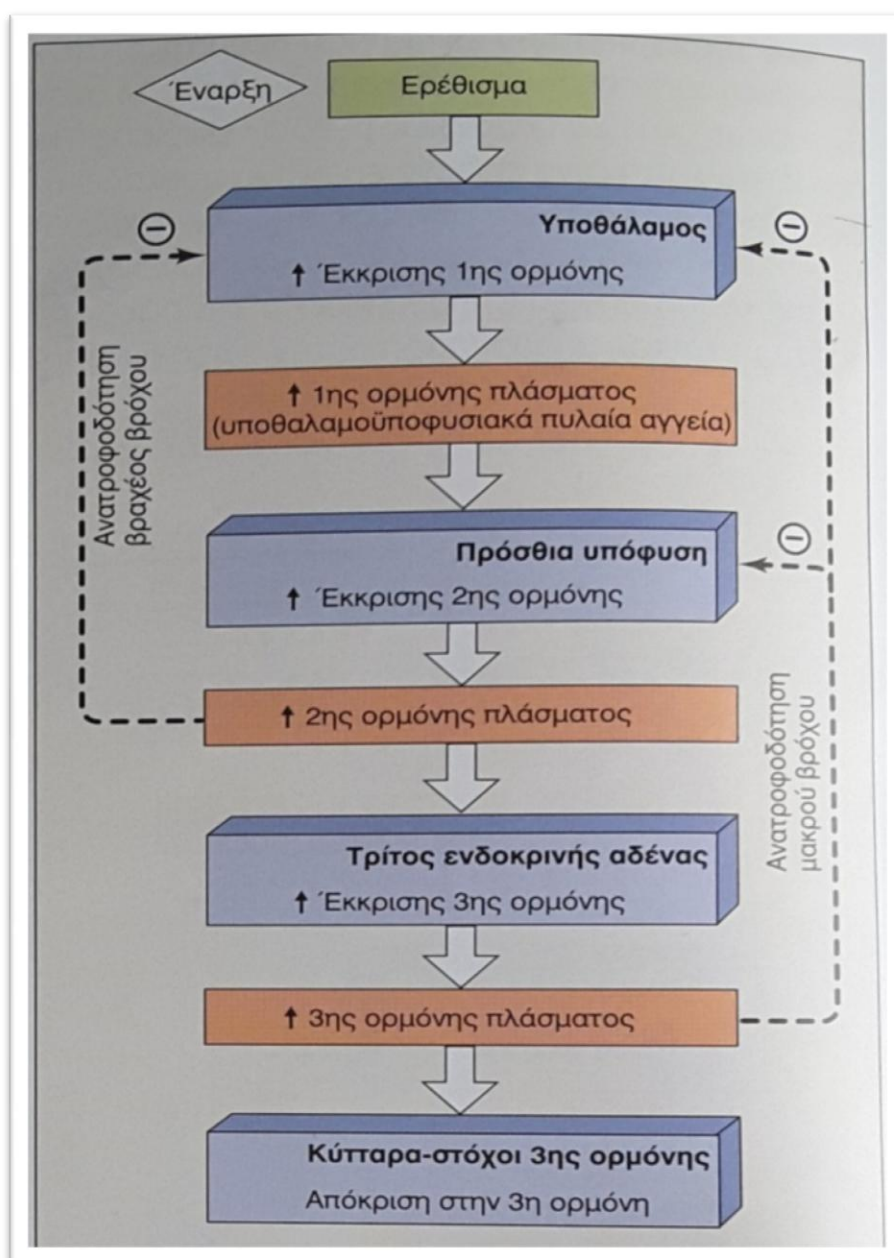
Εικόνα 1: Ανατομία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. {Πηγή: Netter Atlas of Human Anatomy (Adenohypophysis and Neurohypophysis)}

Την εκκριτική λειτουργία της υπόφυσης ρυθμίζει ο υποθάλαμος. Έξι υποθαλαμικοί μικροκυτταρικοί πυρήνες μεταφέρουν με αξονοπλασματική μεταφορά υποφυσιοτρόπες ορμόνες στη μέση προεξοχή του υποθαλάμου, όπου τις εκκρίνουν στην πυλαιοϋποφυσιακή κυκλοφορία (Musumeci et al., 2015). (Εικόνα 2) Από εκεί οι υποφυσιοτρόπες ορμόνες μεταφέρονται με τις μακριές και τις βραχείες υποφυσιακές πυλαίες φλέβες απευθείας στην πρόσθια υπόφυση (Μπαρτίνος, 2007).



Εικόνα 2: Άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-ενδοκρινείς αδένες (TRH: Εκλυτική ορμόνη της έκκρισης θυρεοτροπίνης (Thyrotropin-Releasing Hormone), CRH: Εκλυτική ορμόνη της έκκρισης αδρενοκορτικοτροπίνης (Corticotropin-Releasing Hormone), SRIF ή SS: Σωματοστατίνη ή Ανασταλτικός παράγοντας της έκκρισης αυξητικής ορμόνης (Somatotropin Release-Inhibiting Factor ή Somatostatin), GnRH: Εκλυτική ορμόνη της έκκρισης γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone), GHRH: Εκλυτική ορμόνη της έκκρισης αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone-Releasing Hormone), Dopamine ή DA ή PIF: Ντοπαμίνη ή Ανασταλτικός παράγοντας της έκκρισης προλακτίνης (Dopamine ή Prolactin Inhibitor Factor), TSH: Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Thyroid - Stimulating Hormone), ACTH: Αδρενοκορτικοτρόπος ή Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (Adrenocorticotrophic Hormone) GH: αυξητική ορμόνη (Growth Hormone), FSH: Θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle Stimulating Hormone), LH: Ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone), PRL: Προλακτίνη (Prolactin). (Πηγή: Fang et al., 2008).

Σε απάντηση των υποφυσιακών ορμονών τα όργανα στόχοι (π.χ. θυρεοειδής, επινεφρίδια) παράγουν ορμόνες οι οποίες ασκούν αρνητική ανατροφοδότηση (feedback) στην πρόσθια υπόφυση και/ή στον υποθάλαμο. Αυτός ο τύπος ανατροφοδότησης ονομάζεται ανατροφοδότηση μακρού βρόχου, ισχύει για όλες τις ορμόνες της πρόσθιας υπόφυσης εκτός από την προλακτίνη, η οποία δεν συμμετέχει σε τριπλή ορμονική αλυσιδωτή αλληλουχία αλλά ασκεί η ίδια αρνητική ανατροφοδότηση απευθείας στον υποθάλαμο. Η επίδραση της προλακτίνης και των υπολοίπων υποφυσιακών ορμονών στον υποθάλαμο ονομάζεται ανατροφοδότηση βραχέος βρόχου (Vander, Sherman, & Luciano, 2001). (Εικόνα 3) Την έκκριση δε της προλακτίνης διεγείρει κυρίως η TRH και σε μικρότερο βαθμό το VIP, διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, η ωκυτοκίνη, τα οιστρογόνα, η GnRH και η GHRH (Φούντας, 2015). Τέλος η έκκριση των ορμονών της υπόφυσης ρυθμίζεται και μέσω υποφυσιακών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (Φούντας, 2015).



Εικόνα 3: Ανατροφοδότηση βραχέος και μακρού βρόχου. {Πηγή: (Vander, Sherman, & Luciano, 2001)}.

Η οπίσθια μοίρα της υπόφυσης εκκρίνει δύο ορμόνες, την αντιδιουρητική ορμόνη ή βαζοπρεσσίνη ή αγγειοπρεσσίνη (Vasopressine ή Antidiuretic Hormone, ADH) και την ωκυτοκίνη (Oxytocin, OT). Οι ορμόνες αυτές μαζί με πρωτεΐνες-μεταφορείς ειδικές για κάθε ορμόνη, τις νευροφυσίνες συντίθενται στα κυτταρικά σώματα των νευροεκκριτικών κυττάρων του παρακοιλιακού και υπεροπτικού πυρήνα του υποθαλάμου, μεταφέρονται δε μέσω νευραξόνων στην οπίσθια μοίρα της υπόφυσης, αποθηκεύονται σε κυστίδια στις τελικές νευρικές απολήξεις και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μετά από ερέθισμα (Μπατρίνος, 2007). (Εικόνα 1)

2. Υπόφυση

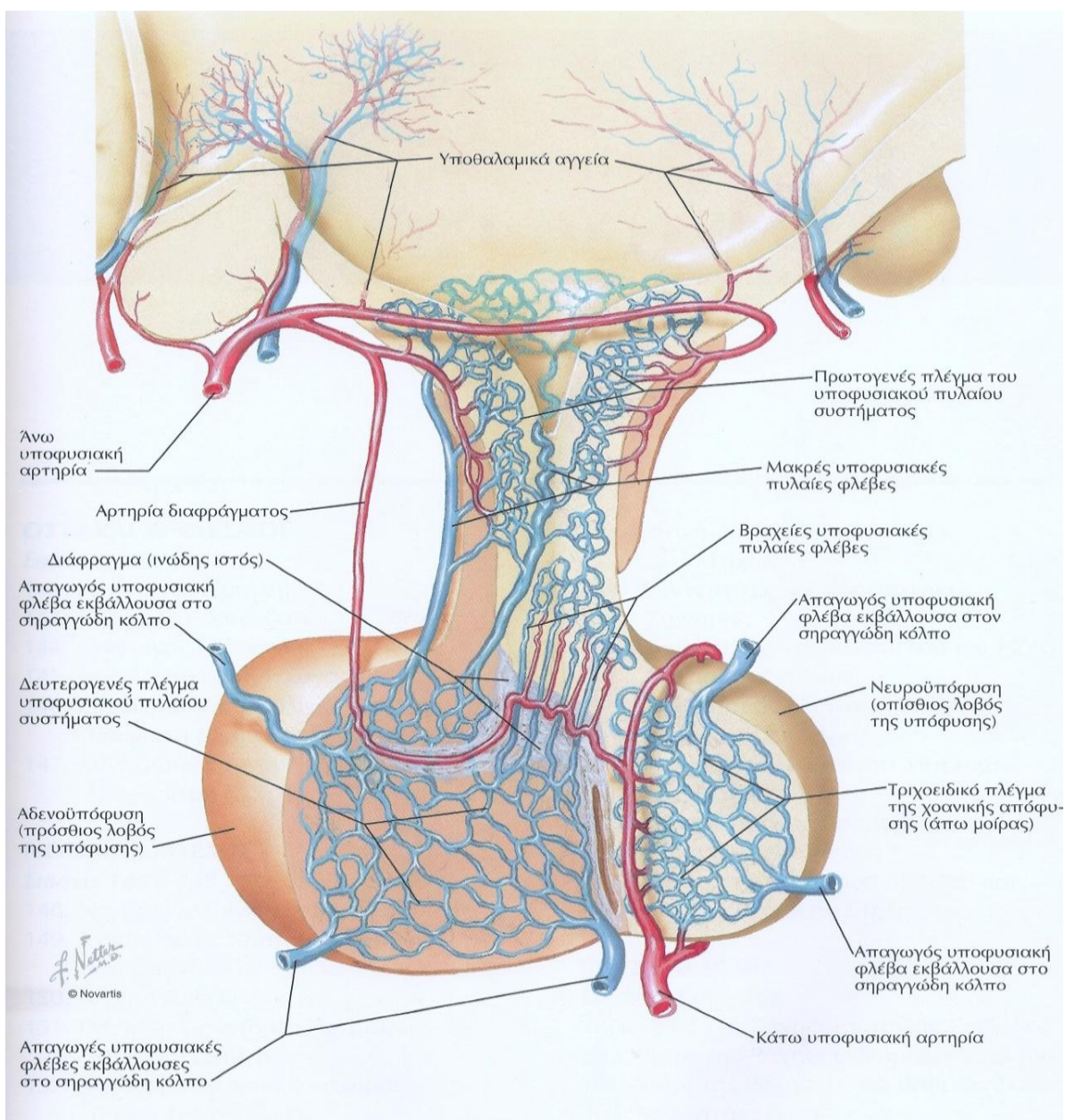
2.1 Αιμάτωση της υπόφυσης

Η αιμάτωση της υπόφυσης εξασφαλίζεται από κλάδους των έσω καρωτίδων, δύο ζεύγη αρτηριών, τις άνω και κάτω υποφυσιακές αρτηρίες (Εικόνα 4). Οι άνω υποφυσιακές αρτηρίες σχηματίζουν το πρωτογενές πλέγμα της υποφυσιακής πυλαίας κυκλοφορίας στο μέσο έπαρμα του υποθαλάμου και κυκλοτερώς στο άνω τμήμα του μίσχου. Κλάδοι των κάτω υποφυσιακών αρτηριών σχηματίζουν τριχοειδικό δίκτυο στο κάτω τμήμα του μίσχου. Από τα τριχοειδικά αυτά πλέγματα δημιουργούνται οι μακριές και οι βραχείες υποφυσιακές πυλαίες φλέβες οι οποίες κατερχόμενες διαμέσου του μίσχου σχηματίζουν το δευτερογενές πλέγμα του υποφυσιακού πυλαίου συστήματος (Φούντας, 2015).

Απευθείας αγγείωση στην αδενοϋπόφυση παρέχει η αρτηρία του διαφράγματος που είναι κατιών κλάδος της άνω υποφυσιακής αρτηρίας. Επιπρόσθετα υφίσταται παλίνδρομη αιματική ροή προς το μέσο έπαρμα του υποθαλάμου (Φούντας, 2015).

Ο οπίσθιος λοβός της νευροϋπόφυσης αγγειούται από τις δύο κάτω υποφυσιακές αρτηρίες οι οποίες σχηματίζουν δακτύλιο γύρω του και δίνουν κλάδους στην περιφέρειά του. (Εικόνα 4)

Η φλεβική παροχέτευση της υπόφυσης αποτελεί οδό διοχέτευσης υποφυσιακών ορμονών στον οργανισμό και πραγματοποιείται μέσω των απαγωγών υποφυσιακών φλεβών που εκβάλλουν στους σηραγγώδεις κόλπους, από εκεί στις σφαγίτιδες φλέβες και στη συνέχεια στη συστηματική κυκλοφορία (Φούντας, 2015). (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Αγγείωση της υπόφυσης {Πηγή: Netter Atlas of Human Anatomy (Adenohypophysis and Neurohypophysis)}

2.2 Οντογένεση/Οργανογένεση της υπόφυσης

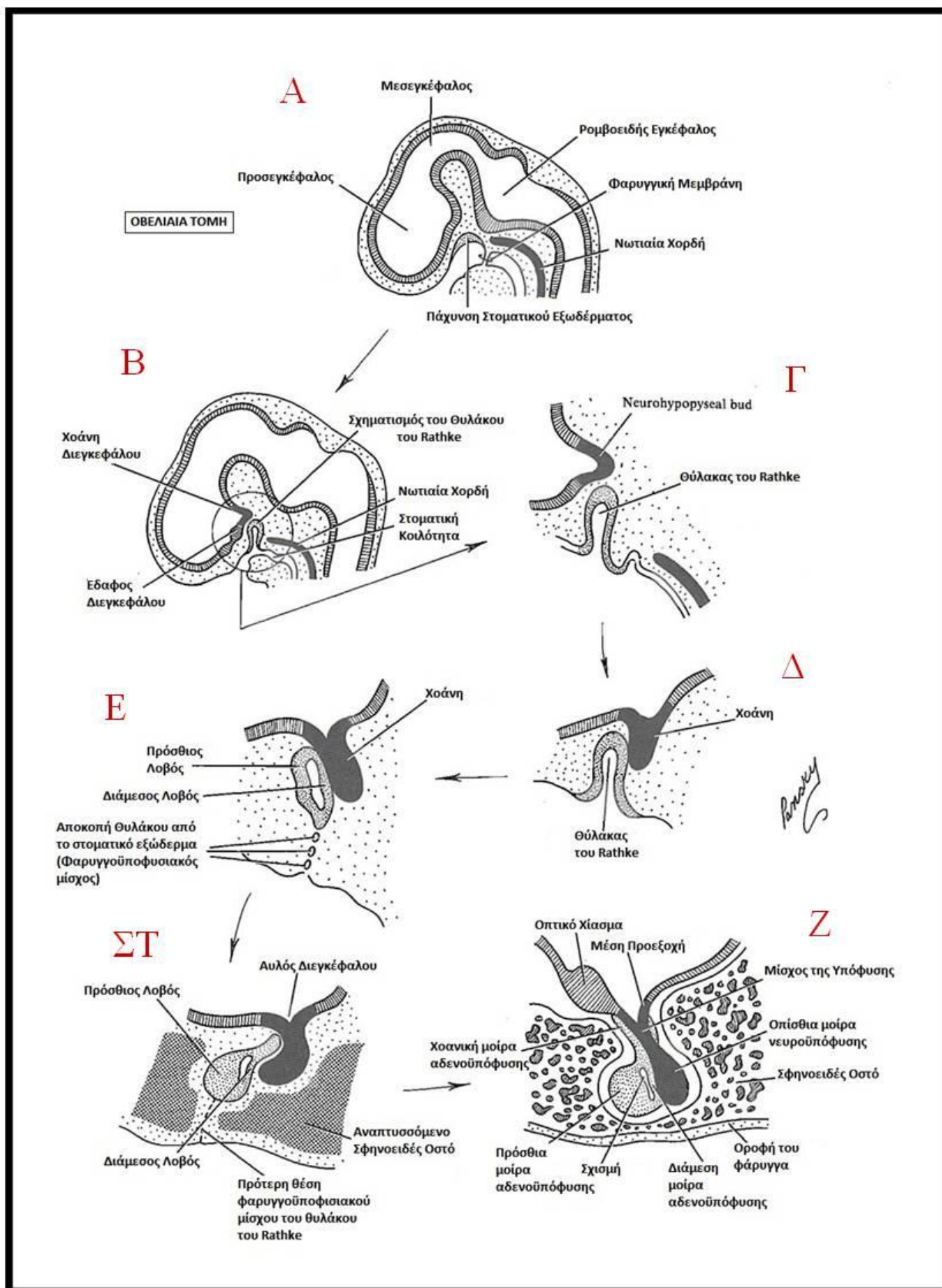
Η εμβρυολογική ανάπτυξη της υπόφυσης έχει μελετηθεί εκτενέστερα στα τρωκτικά όπως στους μυς και στους επίμυς είναι όμως παρόμοια σε όσα σπονδυλωτά έχει μελετηθεί (D. Kelberman & Dattani, 2007). Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η οργανογένεση της υπόφυσης του μυ.

Η υπόφυση προέρχεται από το στοματικό εξώδερμα και το νευροεξώδερμα, τα οποία συμπλησιάζουν, έρχονται σε επαφή σχηματίζοντας έτσι τον θύλακα του Rathke και μία μικρή προς τα κάτω κωνοειδή προσεκβολή του εδάφους του διεγκεφάλου, τη χοάνη (infundibulum). Ο θύλακας του Rathke αποτελεί εγκόλπωμα του ραχιαίου τοιχώματος του αρχέγονου στόματος. Απαιτείται συνεχής επαφή και αλληλεπίδραση

των δύο αυτών καταβολών για την ανάπτυξη της υπόφυσης δηλαδή τον σχηματισμό των πέντε ορμονοεκκριτικών κυτταρικών τύπων της αδενούπόφυσης και των νευροεκκριτικών κυττάρων της νευροϋπόφυσης (Amar & Weiss, 2003; D. Kelberman & Dattani, 2007; Musumeci et al., 2015; Takuma et al., 1998).

Κατά το πρώιμο στάδιο της οντογένεσης (εμβρυϊκή ημέρα 8.5 - e.8.5) στο μυ παρατηρείται η πάχυνση της οροφής του στοματικού εξωδέρματος, το οποίο σχηματίζεται από την αναδίπλωση της πρόσθιας νευρικής ακρολοφίας (Εικόνα 5.Α). Την e9.5, το πεπλατυσμένο τμήμα στοματικού εξωδέρματος εγκολπώνεται ραχιαία, για να σχηματίσει τον θύλακα του Rathke την e.10.0 (Εικόνα 5.Β,Γ). Από την μέση προεξοχή του κοιλιακού διεγκεφάλου (VD) εκτείνεται η χοάνη, έρχεται σε επαφή με τον θύλακα την e9.5 και τον περιβάλλει ως χοανικός μίσχος με την πρόσθια και τις πλάγιες επιφάνειές της την e.10.5. (Rahilly & Muller, 2000) (Εικόνα 5.Δ). Η επαφή και αλληλεπίδραση των δύο αυτών καταβολών διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης είναι δε καθοριστικής σημασίας για την φυσιολογική ολοκλήρωσή της (Couly & Le Douarin, 1987; McCabe & Dattani, 2014; Mollard, Hodson, Lafont, Rizzoti, & Drouin, 2012). Μεταξύ e.10.5 και e.12.5 πολλαπλασιάζεται το επιθήλιο του θυλάκου η εγκόλπωση κλείνει την e.12.5 και αποκόπτεται από το στοματικό εξώδερμα (Εικόνα 5. Ε, ΣΤ). Ο έντονος πολλαπλασιασμός που παρατηρείται έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή σμίκρυνση της κοιλότητας του θυλάκου του Rathke, η οποία οδηγεί στην εξαφάνισή της ή παραμένει ως σχισμή ή κυστίδια (Schoenmakers et al., 2015; Ward, Stone, Raetzman, & Camper, 2006; Schoenmakers, Alatzoglou, Chatterjee, & Dattani, 2015). (Εικόνα 5.Ζ)

Από την e.12.5 έως την e.17.5 τα κύτταρα του ώριμου θυλάκου διαφοροποιούνται και εξειδικεύονται στους διάφορους τύπους ορμονοεκκριτικών κυττάρων της υπόφυσης. Πιο αναλυτικά την e11.5 τα κύτταρα του κοιλιακού τμήματος του θυλάκου του Rathke εκφράζουν αρχικά την α-υποομάδα της γλυκοπρωτεΐνης (αGSU) δηλαδή την κοινή υποομάδα των TSH, FSH, LH και την e12.5 έχουν πλήρως διαφοροποιηθεί σε θυρεοτρόπα εκφράζοντας την β-υποομάδα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSHβ), έχουν όμως σύντομο βίο, σταδιακά ατροφούν και κατά τη γέννηση δεν υπάρχουν. Την e12.5 παρατηρείται διαφοροποίηση των αδρενοκορτικοτρόπων κυττάρων που εκφράζουν POMC. Την e14.5 διαφοροποιούνται τα θυρεοτρόπα κύτταρα στην πρόσθια μοίρα της υπόφυσης και μελανοτρόπα κύτταρα στην ενδιάμεση μοίρα τα οποία εκκρίνουν προοπιομελανοκορτίνη. Την e15.5 διαφοροποιούνται τα σωματοτρόπα και τα λακτοτρόπα κύτταρα τα οποία εκκρίνουν αυξητική ορμόνη και προλακτίνη αντίστοιχα. Την e16.5 διαφοροποιούνται τα γοναδοτρόπα κύτταρα και εκκρίνουν την FSHβ και την επόμενη μέρα την LHβ. (Bancalari et al., 2012; J. Dasen & Rosenfeld, 1999; Daniel Kelberman, Rizzoti, Lovell-Badge, Robinson, & Dattani, 2009; McCabe & Dattani, 2014).



Εικόνα 5: Τα στάδια της εμβρυογένεσης της υπόφυσης

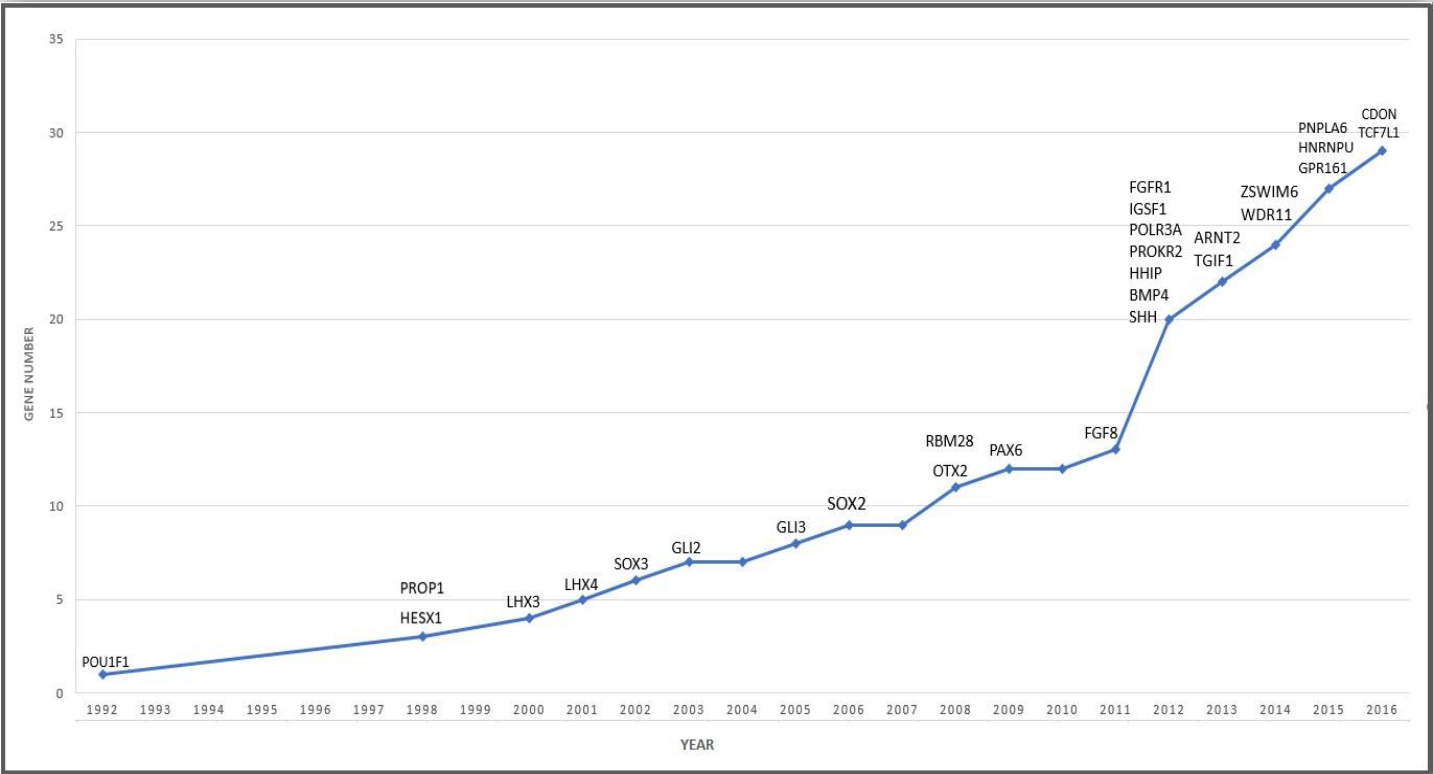
Στον άνθρωπο ο θύλακας του Rathke σχηματίζεται την 3^η εβδομάδα της εμβρυογένεσης. Την 6^η εβδομάδα εμφανίζονται τα αδρενοκορτικοτρόπα κύτταρα και εκκρίνουν ACTH την 7^η. Τα σωματοτρόπα εμφανίζονται την 8^η εβδομάδα ενώ τα θυρεοτρόπα και τα γοναδοτρόπα αργότερα την 12^η εβδομάδα κατά την οποία εκφράζουν την κοινή α υποομάδα και τις TSH, LH και FSH β υποομάδες. Τα λακτοτρόπα

διαφοροποιούνται πλήρως κατά τη γέννηση και η προλακτίνη ανιχνεύεται νωρίτερα μόνο στα μεικτά σωματοτρόπα-λακτοτρόπα.

Οι γενικές αρχές οργάνωσης και μορφοποίησης του αδένου καθώς και οι υπεύθυνοι μοριακοί μηχανισμοί για την ανάπτυξη και την λειτουργία των διαφοροποιημένων κυττάρων του, είναι σχεδόν όμοιοι μεταξύ των διαφόρων ειδών σπονδυλωτών, ενώ παρατηρούνται μικρές διαφοροποιήσεις ως προς την οργάνωση και την μορφολογία του (Zhu, Gleiberman, & Rosenfeld, 2007).

Εξωγενή και ενδογενή σήματα αλλά και εξειδικευμένοι μεταγραφικοί παράγοντες καθοδηγούν την πολύπλοκη διαδικασία της οργανογένεσης της υπόφυσης. Οι παράγοντες αυτοί εκφράζονται και δρουν με προγραμματισμένη χωροχρονική αλληλουχία κατά την οποία η διαδοχική καταστολή και ενεργοποίηση των γονιδίων – στόχων είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη της υπόφυσης.

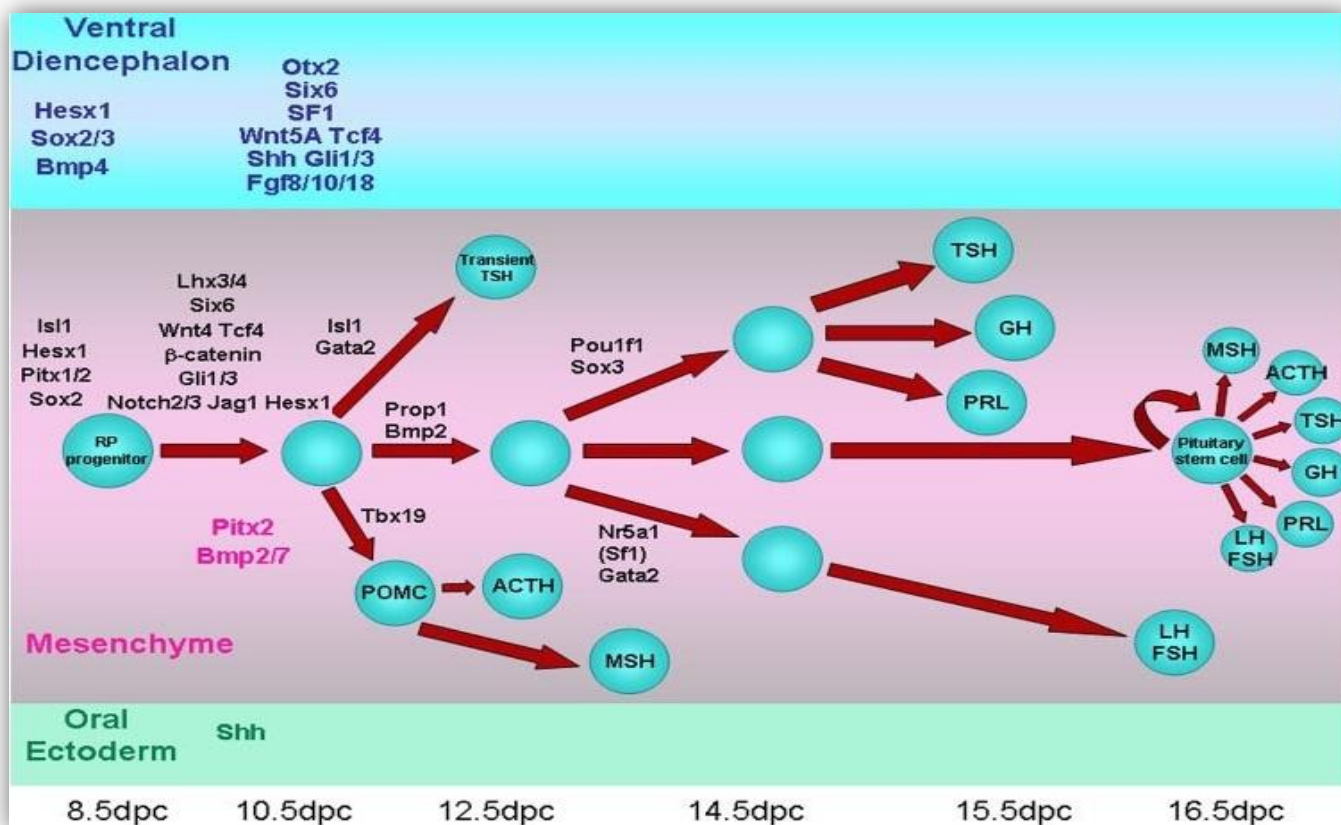
Σήμερα αναφέρονται περίπου 30 γονίδια τα οποία σχετίζονται με την παθογένεση της πολλαπλής υποφυσιακής ανεπάρκειας (ΠΥΑ) (Fang et al., 2016). (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Το χρονολόγιο αναγνώρισης των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση της πολλαπλής υποφυσιακής ανεπάρκειας {Πηγή και τροποποίηση: (Fang et al., 2016)}.

Κατά το πρώιμο στάδιο της οργανογένεσης της υπόφυσης, ο διεγκεφαλος παράγει παράγοντες όπως οι *Bmp 4*, *Fgf 8/10*, *Wnt5a*, το εξώδερμα τους παράγοντες *Isl1*, *Bmp 2*, *Sonic Hedgehog*, *Wnt 4*, το κοιλιακό μεσόδερμα (δηλαδή ο μεσεγχυματικός ιστός) τους παράγοντες *Chordin* και *Bmp2* (Castinetti et al., 2015; Gleiberman, Fedtsova, & Rosenfeld, 1999) και τα κύτταρα του θυλάκου του Rathke εκκρίνουν παράγοντες όπως οι *Hesx1*, *Gli 2*, *Otx2* και *Sox2*. Κατά τη φάση της διαφοροποίησης και της εξειδίκευσης

των υποφυσιακών κυττάρων εκφράζονται παράγοντες όπως οι *Prop1* και *Pou1f1* (Prince, Walvoord, & Rhodes, 2011). Στη συνέχεια περιγράφονται ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες (Εικόνα 7). Η μοριακή διαταραχή των γονιδίων των παραγόντων αυτών σε μύες (πειραματικά μοντέλα) και σε ανθρώπους προκαλεί μεμονωμένη ή πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια.



Εικόνα 7: Απλοποιημένη σχηματική παρουσίαση της χωροχρονικής αλληλουχίας των ενδογενών και εξωγενών σημάτων τα οποία ρυθμίζουν την πολύπλοκη διαδικασία της οργανογένεσης της υπόφυσης (Πηγή: Kelberman et al., 2009).

2.2.1 BMP4

Η οστεο-μορφογενετική πρωτεΐνη 4 *BMP4* (Bone Morphogenetic Protein 4) είναι ένα πρώιμο σηματοδοτικό μόριο που παράγεται από τμήμα του κοιλιακού διεγκεφάλου, την μελλοντική χοάνη (infundibulum) την εμβρυϊκή ημέρα 8.5 στο μυ, όταν αυτή αγγίζει το σχηματιζόμενο θύλακο. Εμφανίζεται συγχρόνως με την πάχυνση της οροφής του στοματικού εξωδέρματος, επάγει το στοματικό εξώδερμα να εγκολπωθεί ραχιαία προς σχηματισμό του θυλάκου του Rathke (Davis & Camper, 2007; Davis, Mortensen, & Camper, 2011) και η έκφρασή του διατηρείται μέχρι και την e 14.5 (McCabe et al., 2011). Ο παράγοντας *BMP4* είναι απαραίτητος για την προτύπωση και την εξειδίκευση διαφόρων οργάνων, για την κυτταρική διαίρεση στο θύλακο του Rathke και η απουσία του λόγω απάλειψης του γονιδίου σε γενετικά τροποποιημένους μύες, έχει ως αποτέλεσμα τον πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο ενώ οι μύες που επιζούν ως την 10^η εμβρυϊκή μέρα δεν σχηματίζουν το θύλακο του Rathke (Davis et al., 2013; Daniel Kelberman et al., 2009; McCabe & Dattani, 2014; Takuma et al., 1998). Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BMP4* παρουσιάζουν ποικίλους φαινότυπους όπως ανοφθαλμία/μικροφθαλμία,

συγγενές γλαύκωμα και σκληροκερατοειδή, υδροκεφαλία, υποπλασία του μεσολόβιου, πνευματική και σωματική υστέρηση, πολυδακτυλία, συνδακτυλία και βραχυδακτυλία (McCabe & Dattani, 2014).

2.2.2 Fibroblast Growth Factors *FGF8/10*

Οι παράγοντες *Fgf 8/10* είναι μέλη της οικογένειας Fibroblast Growth Factors που αποτελείται από 25 μέλη και εκφράζεται την e 9.5 στην χοάνη (infundibulum). Η έκφραση των *Fgf 8/10* είναι απαραίτητη για την αύξηση και ανάπτυξη του θυλάκου του Rathke (Davis et al., 2013; McCabe et al., 2011) και ο *Fgf 8* δρα μέσω της επαγωγής των μεταγραφικών παραγόντων *lhx3* και *lhx4* (Bancalari et al., 2012; McCabe & Dattani, 2014). Επιπλέον είναι σημαντικός για την ανάπτυξη του κοιλιακού διεγκέφαλου και του υποθαλάμου (McCabe & Dattani, 2014). Ο *Fgf10* είναι απαραίτητος για τη συνέχιση του πολλαπλασιασμού του επιθηλίου του θύλακα του Rathke.

Σε γενετικά τροποποιημένους μύες που δεν εκφράζουν τον παράγοντα *Fgf 8* ή τον υποδοχέα του, τα κύτταρα του θυλάκου του Rathke αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν, αποπίπτουν και έως την e

14.5 έχει εξαφανιστεί η υπόφυση (McCabe et al., 2011). Αντίθετα στους γενετικά τροποποιημένους μύες που εκφράζουν τον *Fgf8* πέραν της χοάνης και στη σχηματιζόμενη αδενοϋπόφυση, παρατηρείται υπερπλασία των αδρενοκορτικοτρόπων και μελανοτρόπων κυττάρων, ενώ οι κυτταρικές σειρές που προέρχονται από την κοιλιακή (πρόσθια) και ενδιάμεση περιοχή του θυλάκου δεν αναπτύσσονται (Treier et al., 1998).

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του *FGF8* ενοχοποιούνται για την παθογένεση συνδρόμων όπως το Kallmann, η ολοπροσεγκεφαλία (HPE, Holoprosencephaly) και η σεπτο-οπτική δυσπλασία (SOD, Septo-optic Dysplasia) στον άνθρωπο (McCabe et al., 2011).

2.2.3 Sonic Hedgehog *Shh*

Ο παράγοντας *Shh* (Sonic Hedgehog) ανήκει στην οικογένεια των μορφογόνων, εκκρίνεται στο μυ την e 8.5 από τον κοιλιακό διεγκέφαλο έως την e 14.5 και από το στοματικό εξώδερμα με εξαίρεση το τμήμα στοματικού εξωδέρματος που θα σχηματίσει τον θύλακο του Rathke έως την e 12.5 (Daniel Kelberman et al., 2009; McCabe & Dattani, 2014). Μαζί με τους παράγοντες *Fgfs* δρουν στο πρώιμο στάδιο του σχηματισμού του θυλάκου Rathke και στέλνουν σήματα από αντίθετες κατευθύνσεις για την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των υποφυσιοκυττάρων (Musumeci et al., 2015). Στη συνέχεια είναι απαραίτητη η εξασθένηση της έκφρασης αυτών των αυξητικών παραγόντων για την διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών της υπόφυσης και στην διαδικασία αυτή συμμετέχουν παράλληλα αρκετοί παρακρινείς και αυτοκρινείς μοριακοί παράγοντες (Musumeci et al., 2015). Διαγονιδιακοί knock out

μύες παρουσιάζουν φαινότυπους όπως κυκλωπεία και αγενεσία των δομών της μέσης γραμμής του εγκεφάλου. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *SHH* παρουσιάζουν ολοπροσεγκεφαλία (HPE) που συνοδεύεται συχνά από κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες και πνευματική υστέρηση (Bancalari et al., 2012; McCabe & Dattani, 2014).

2.2.4 BMP2

Ο παράγοντας οστεο-μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (*Bmp2*) εκκρίνεται από τα κύτταρα της αναπτυσσόμενης υπόφυσης και συγκεκριμένα από το πρόσθιο (κοιλιακό) τμήμα του θυλάκου του Rathke στην περιοχή δηλαδή που έχει αποκλειστεί η έκφραση του παράγοντα *Shh* την e 9.5 στο μυ. Ακολούθως την e 12.5 ο *Bmp2* εκφράζεται σε όλο το θύλακο του Rathke ως ενδογενές σήμα (Treier et al., 1998). Ο παράγοντας *Shh* επάγει την έκφραση του παράγοντα *Bmp2* (de Moraes, Vaisman, Conceicao, & Ortiga-Carvalho, 2012). Οι παράγοντες *Bmp2* και *Fgfs* αποκλείουν τα αντίθετα σήματα πλησίον των εκκριτικών τους κέντρων και επάγουν την έκφραση διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων. Τα προγονικά υποφυσιοκύτταρα που βρίσκονται πλησιέστερα στο εκκριτικό κέντρο του παράγοντα *Bmp2* εξελίσσονται προς γοναδοτρόπα, σε αντίθεση με αυτά που βρίσκονται πλησιέστερα στο εκκριτικό κέντρο του παράγοντα *Fgf* και εξελίσσονται προς σωματοτρόπα (J. S. Dasen & Rosenfeld, 2001; Davis et al., 2013; Scully & Rosenfeld, 2002).

2.2.5 SOX2/3

Οι παράγοντες *SOX2/3* ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων *SRY-related high mobility group (HMG) box (Sox)*, η έκφρασή τους παρατηρείται κατά το πρώιμο στάδιο της οργανογένεσης σε όλα τα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης, ενώ κατά το στάδιο της διαφοροποίησης η έκφρασή τους περιορίζεται (Bancalari et al., 2012; Daniel Kelberman et al., 2009; McCabe & Dattani, 2014). Συγκεκριμένα η έκφραση του παράγοντα *Sox2* διατηρείται μέχρι και την ενήλικη ζωή και παρατηρείται σε ειδικούς υποπληθυσμούς μη ορμονοεκκριτικών κυττάρων εκ των οποίων κάποια κύτταρα βρίσκονται γύρω από τον αυλό του θυλάκου του Rathke και είναι πιθανότατα απευθείας απόγονοι των κυττάρων αυτών ενώ άλλα βρίσκονται διασκορπισμένα στον παρακείμενο ιστό της αδενοϋπόφυσης (Daniel Kelberman et al., 2009).

Ο παράγοντας *Sox3* εκφράζεται στον κοιλιακό διεγκέφαλο ενώ από την e 12.5 εκφράζεται μόνο στους μικροκυτταρικούς πυρήνες του υποθαλάμου και στο μέσο έπαρμα. Υπενθυμίζεται ότι οι υποφυσιοτρόπες ορμόνες που παράγονται στους μικροκυτταρικούς πυρήνες, απελευθερώνονται στο μέσο έπαρμα και από εκεί μεταφέρονται με το υποθαλαμοϋποφυσιοπυλαίο σύστημα στην πρόσθια μοίρα της υπόφυσης (McCabe & Dattani, 2014). Η ανάπτυξη της αδενοϋπόφυσης και της χοάνης

είναι ιδιαίτερα δοσοεξαρτώμενη από τον παράγοντα *Sox3* με αποτέλεσμα ο διπλασιασμός του *Sox3* αλλά και η απουσία του λόγω απάλειψης του γονιδίου σε γενετικά τροποποιημένους μύες να σχετίζεται με υποπλασία της αδενοϋπόφυσης και της χοάνης, έκτοπη νευροϋπόφυση και ανεπάρκειες των υποφυσιακών ορμονών (D. Kelberman et al., 2006).

2.2.6 HESX1

Ο μεταγραφικός παράγοντας *HESX1* (*Homeobox Expressed in Stem Cells 1*) γνωστός και ως *RPX* (*Rathke Pouch Homeobox*) (Prince et al., 2011) είναι μέλος της ομάδας γονιδίων ομοιοπεριοχής (*Homeobox genes*) και εδράζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 3p14.3 (Romero, Pine-Twaddell, & Radovick, 2011). Το γονίδιο κωδικοποιεί 185 αμινοξέα και αποτελείται από 4 εξόνια (Romero et al., 2011). Ο παράγοντας *Hesx1* αρχικά εκφράζεται στο σπλαχνικό ενδόδερμα και το νευροεξώδερμα (Dattani et al., 1998; Romero et al., 2011) σε περιοχές που θα σχηματίσουν τον πρόσθιο εγκέφαλο και τον κοιλιακό διεγκέφαλο, η έκφρασή του περιορίζεται την e 9.0 – 9.5 στον θύλακο του Rathke όπου παραμένει ως την e 13.5 (Daniel Kelberman et al., 2009; Romero et al., 2011; Zhu et al., 2007). Ο παράγοντας *Lhx3* είναι απαραίτητος για να διατηρηθεί η έκφραση του *Hesx1* (Zhu et al., 2007). Από την e 11 έως και την e 13 παρατηρείται ένα διάστημα παράλληλης έκφρασης των παραγόντων *Hesx1* και *Prop1*. Ο παράγοντας *Hesx1* δεσμεύεται ως ομοδιμερές σε αλληλουχία (τμήμα) του DNA και προκαλεί ισχυρή αναστολή της μεταγραφής. Παρουσία του παράγοντα *Prop1* δεσμεύονται στο ίδιο τμήμα DNA και οι δύο παράγοντες ως ετεροδιμερή με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής. Ο παράγοντας *Prop1* δεσμεύεται στο τμήμα του DNA ως ομοδιμερές, ενεργοποιεί την μεταγραφή και καταστέλλει (*downregulation*) τον παράγοντα *Hesx1* μετά την e 12.5 (Hermesz, Mackem, & Mahon, 1996). Η προοδευτική καταστολή του *Hesx1* είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του αδένα (McCabe & Dattani, 2014) και την εξειδίκευση των υποφυσιακών κυττάρων της αδενοϋπόφυσης (Prince et al., 2011). Επιπλέον οι αλληλεπιδράσεις του παράγοντα *Hesx1* με άλλους υποφυσιακούς παράγοντες υποδηλώνει τον πολύπλοκο ρόλο που διαδραματίζει ο *Hesx1* στην ανάπτυξη της υπόφυσης (Romero et al., 2011).

Σε γενετικά τροποποιημένους *knock out* μύες σχηματίζονται κυρίως πολλαπλά θυλάκια ενώ η υπόφυση απουσιάζει σε μικρό ποσοστό (5%) (D. Kelberman & Dattani, 2007).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου στον άνθρωπο κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατή ή υπολειπόμενο χαρακτήρα με ελαττωμένη διεισδυτικότητα. Συνδέονται με μεμονωμένη ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης (IGHD) ή πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια (MPHD Multiple Pituitary Hormone Deficiency) και με διαφραγματο-οπτική δυσπλασία (SOD) η οποία χαρακτηρίζεται από την κλασική τριάδα: υποπλασία του οπτικού νεύρου, υποπλασία της υπόφυσης και αγενεσία των δομών της μέσης γραμμής

του εγκεφάλου. Τα απεικονιστικά ευρήματα των ασθενών αυτών ποικίλουν. Απεικονίζεται φυσιολογική ή υποπλαστική η αδενοϋπόφυση, έκτοπη η νευροϋπόφυση, υποπλασία του οπτικού νεύρου και αγενεσία του μεσολόβιου (Bancalari et al., 2012).

2.2.7 *LHX3/LHX4*

Τα γονίδια *LHX3* και *LHX4* είναι μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων *LIM- HD (Homedomain)* και αποτελούνται από δύο περιοχές *LIM* και μία ομοιοπεριοχή πρόσδεσης στο DNA (*DNA binding Homedomain*). Το ακρώνυμο *LIM* προέρχεται από τα ονόματα των τριών αρχικών μελών της οικογένειας *Lin-11*, *Isl-1*, *Mec-3*).

LHX3

Το *LHX3* εδράζεται στο χρωμόσωμα 9q34.3, αποτελείται από 7 εξόνια και έχει δύο ισομορφές την *LHX3a* και την *LHX3b*. Οι δύο ισομορφές διαφέρουν μόνο στο αμινοτελικό τους άκρο και ενεργοποιούν διαφορετικά διαφορετικά γονίδια της υπόφυσης (Sloop et al., 1999) ενώ η πρώτη είναι η πιο ενεργή. Ο παράγοντας *Lhx3* εκφράζεται στον θύλακα του Rathke την e 9.5, επάγεται από τους παράγοντες *Fgf8/10* και διατηρεί την έκφρασή του χάρη του παράγοντα *Shh*. Η έκφραση του *Lhx3* διατηρείται στην ενήλικη ζωή και φαίνεται να είναι απαραίτητη σε έναν ή περισσότερους υποφυσιικούς κυτταρικούς τύπους (Bach et al., 1995; Bancalari et al., 2012).

Στους γενετικά τροποποιημένους μύες με απουσία του παράγοντα *Lhx3* λόγω απάλειψης του γονιδίου (*Lhx3^{-/-}*) σχηματίζεται μεν ο θύλακας του Rathke, αποτυγχάνουν δε να διαφοροποιηθούν φυσιολογικά όλοι οι ορμονοεκκριτικοί κυτταρικοί τύποι της υπόφυσης τους και οι μύες πεθαίνουν σύντομα μετά την γέννηση τους (Bancalari et al., 2012; Kelberman et al., 2009).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *LHX3* στον άνθρωπο κληρονομούνται με τον υπολειπόμενο χαρακτήρα και οι ασθενείς παρουσιάζουν ανεπάρκεια GH, TSH, FSH/LH, και σε ορισμένες περιπτώσεις δύσκαμπτο αυχένα με μειωμένη περιστροφή της κεφαλής ή και νευροαισθητήρια διαταραχή της ακοής (Bancalari et al., 2012; Cohen, 2012; Daniel Kelberman et al., 2009; McCabe & Dattani, 2014; Pfaeffle et al., 2007; Ramzan et al., 2017), σκελετικές ανωμαλίες, υπερεκτασημότητα συνδέσμων και χαλάρωση της επιδερμίδας (Kriström et al., 2009). Απεικονιστικά παρατηρείται υποπλασία ή υπερπλασία της αδενοϋπόφυσης, φυσιολογική νευροϋπόφυση και σε ορισμένους ασθενείς μικροαδένωμα (Netchine et al., 2000). Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται μπορεί

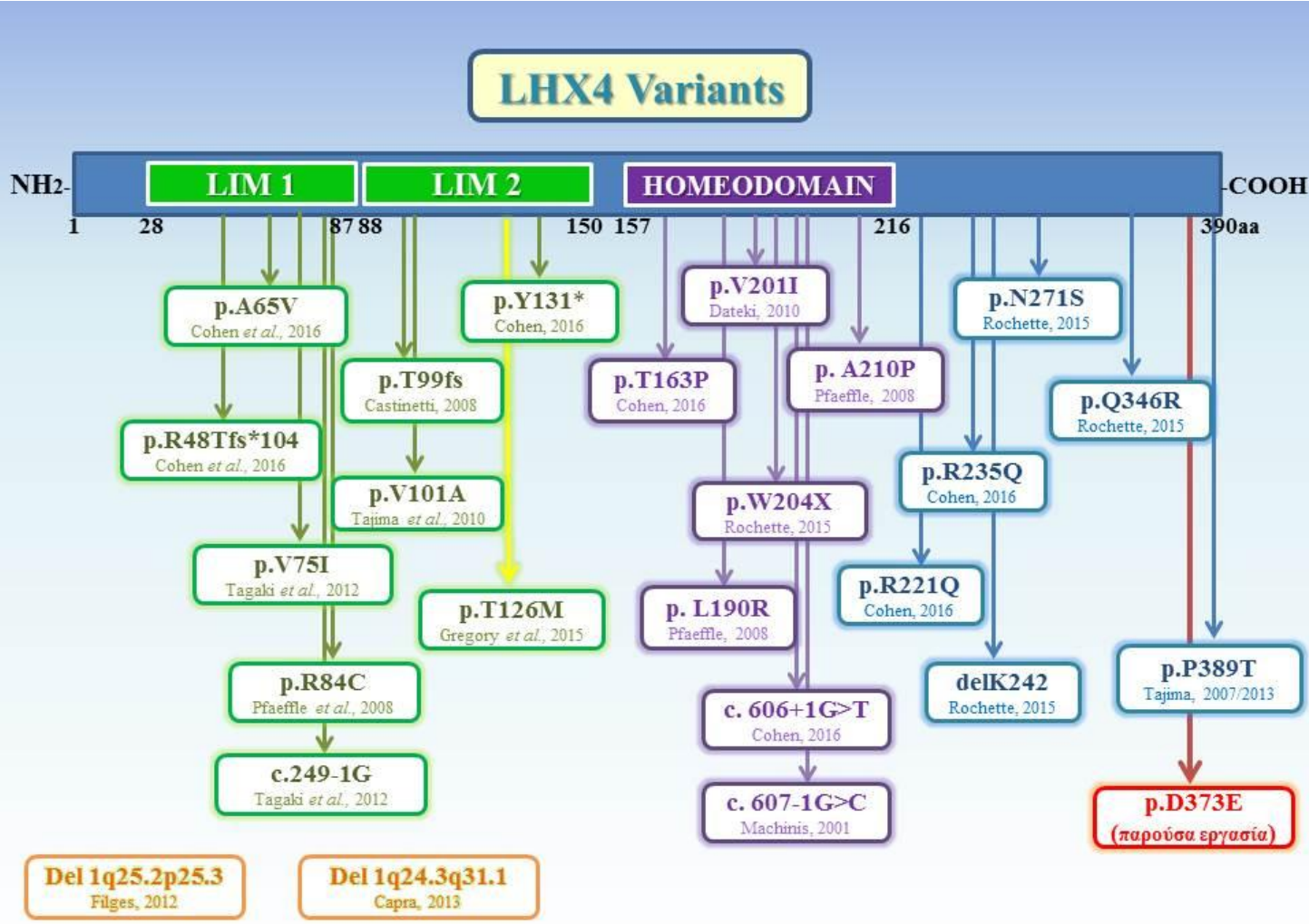
να αφορούν την αλλαγή μιας βάσης σε θέση ματίσματος (splice site) ενός εξονίου ή την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift) του γονιδίου (McCabe & Dattani, 2014).

LHX4

Το γονίδιο *LHX4* **εδράζεται** στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 1q25, αποτελείται από έξι εξόνια και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 390 αμινοξέων. Στο μυ, ο παράγοντας *Lhx4* εκφράζεται την e 9.5 στο σχηματιζόμενο θύλακα του Rathke και μέχρι την e 12.5 η έκφρασή του έχει περιοριστεί στην πρόσθια μοίρα της αδενοϋπόφυσης όπου παραμένει ως την e 15.5 (Bancalari et al., 2012; McCabe & Dattani, 2014; Sheng et al., 1997). Ο παράγοντας *Lhx4* σε συνεργασία με τον συγγενικό του παράγοντα *Lhx3* ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση όλων των ορμονοεκκριτικών κυτταρικών τύπων της αδενοϋπόφυσης (σωματοτρόπων, λακτοτρόπων, θυρεοειδοτρόπων, αδρενοκορτικοτρόπων, γοναδοτρόπων) (Cohen et al., 2016; H. Li et al., 1994). Μοριακές μελέτες δείχνουν ότι μέσω της ομοιοπεριοχής του ο παράγοντας *LHX4* ενεργοποιεί τα ειδικά για την υπόφυση γονίδια *Pou1f1*, *GH*, *Prl*, *αGSU*, *FSHβ* και *TSHβ* (Cohen et al., 2016).

Η φυσιολογική έκφραση του *Lhx4* δεν είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη μόνο της υπόφυσης αλλά και άλλων οργάνων, όπως οι πνεύμονες. Η απουσία του παράγοντα *Lhx4* λόγω απάλειψης του γονιδίου σε γενετικά τροποποιημένους μύες (*Lhx4*^{-/-}) έχει ως αποτέλεσμα τον πρώιμο θάνατο των μυών (Bancalari et al., 2012; Cohen, 2012; McCabe & Dattani, 2014) λόγω ανωριμότητας των πνευμόνων (H. Li et al., 1994; Rochette et al., 2015). Η υποπλαστική αδενοϋπόφυση των μυών αυτών, περιέχει μειωμένου αριθμού υποφυσιακούς κυτταρικούς τύπους (Bancalari et al., 2012; Cohen et al., 2016; H. Li et al., 1994; McCabe & Dattani, 2014). Επίσης συνυπάρχουν μορφολογικές ανωμαλίες του σφηνοειδούς οστού (Cohen et al., 2016) (το οποίο περιβάλλει και προστατεύει την υπόφυση (Greenspan & Gardner, 2010; Φούντας, 2015)). Αντίθετα οι διαγονιδιακοί μύες με ετερόζυγη απάλειψη του γονιδίου (*Lhx4*^{+/-}) παρουσιάζουν φυσιολογικό φαινότυπο (Bancalari et al., 2012; Cohen et al., 2016; H. Li et al., 1994; Rochette et al., 2015).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *LHX4* στον άνθρωπο μεταβιβάζονται με τον επικρατούντα χαρακτήρα. Έχουν ανιχνευθεί 25 μεταλλάξεις του *LHX4* οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις στο γονίδιο, δεδομένο που δείχνει ότι δεν υφίστανται περιοχές ευάλωτες για μεταλλάξεις (hot spots) (Castinetti et al., 2008) (*Εικόνα 8*).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου LHX4 και οι αλλαγές που έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με ΠΥΑ. Τα Πράσινα βέλη αντιστοιχούν στις LIM περιοχές, τα μοβ βέλη στην ομοιοπεριοχή, τα μπλε βέλη στο καρβοξυτελικό άκρο και το κίτρινο βέλος δείχνει ομόζυγη αλλαγή στην LIM 2 περιοχή. Κάτω αριστερά σε πλαίσιο φαίνονται απαλείψεις του γονιδίου LHX4 σε ασθενείς με ΠΥΑ. Το κόκκινο βέλος δείχνει στην αλλαγή που ανιχνεύθηκε στο εργαστήριό μας.

Οι αλλαγές (μεταλλάξεις) του LHX4 συνίστανται από παρερμηνεύσιμες ή ανερμηνεύσιμες αλλαγές, μικρές απαλείψεις ή ενθέσεις που προκαλούν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης ή και μεγαλύτερες απαλείψεις (Πίνακας 1).

1 ^ο ΜΕΡΟΣ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΑΛΛΑΓΗ (Πρωτεΐνη/ Νουκλεοτίδιο)	ΗΛΙΚΙΑ (& σχέση με άλλον ασθενή)	ΥΨΟΣ σε SD ή cm κατά τη ΔΙΑΓΝΩ ΣΗ	ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Βιβλιογραφία
1.A	A	Γαλλία	c.607-1G>C (IVS,G>C-1)	Παιδί		GH, TSH, ACTH, FSH/LH	MY απών/YAY, ENY, YMY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα, Κρανιοφαρυγγικός πόρος	(Castinetti et al., 2008; Machinis et al., 2001)
1.B	Θ	Γαλλία	c.607-1G>C	Παιδί (αδελφή του 1.A)		GH, TSH, ACTH, ΔΕ:FSH/LH	YAY, ENY YMY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα	(Castinetti et al., 2008; Machinis et al., 2001)
1.Γ/ Α	Θ & A	Γαλλία	c.607-1G>C	Ενήλικας, (Μητέρα του 1.A) (Παππούς του 1.A)	Μητέρα (148cm) & Παππούς (150cm)	GH		1.Γ/Δ: Χαμηλό Ανάστημα	(Machinis et al., 2001)
2.	A	Ισπανία	p.P389T	Βρέφος, 14 ημερών	-2.2 SD	GH, TSH, ACTH, PRL, FSH/LH	YAY, ENY	Χαμηλό Ανάστημα	(Toshihiro Tajima et al., 2007; Toshihiro Tajima, Ishizu, & Nakamura, 2013)
3.	A	Μακεδονία	p.R84C	Παιδί, 5,75 ετών	-5.3 SD	GH, TSH, FSH/LH		Χαμηλό Ανάστημα, Παχυσαρκία	(Pfaeffle et al., 2008)
4.	Θ	ΗΠΑ	p.L190R	Βρέφος, 2,5 μηνών		GH, TSH, ACTH	YAY, ENY	Υπογλυκαιμία, Παρατεταμένος Ίκτερος Επιληπτικές Κρίσεις	(Pfaeffle et al., 2008)
5.A	Θ	Ελβετία	p.A210P	Παιδί, 7 ετών	-4.8 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	YAY, Κύστες ΑΥ	Πρόσωπο κούκλας, mild frontal bossing κεντρική Παχυσαρκία, Χαμηλό Ανάστημα	(Pfaeffle et al., 2008)
5.B	Θ	Ελβετία	p.A210P	Παιδί, 7,8 ετών	-4 SD	GH, (partial)TSH	YAY, Κύστες ΑΥ	Πρόσωπο κούκλας, mild frontal bossing, Κεντρική Παχυσαρκία	(Pfaeffle et al., 2008)
5.Γ	A	Ελβετία	p.A210P	Ενήλικας (πατέρας των 5.A & 5.B)	-2.4 SD	Χαμηλή GH			(Pfaeffle et al., 2008)

Πίνακας (Μέρος 1^ο) Α: Άρρεν, **Θ:** Θήλυ, **GH:** Αυξητική Ορμόνη, **TSH:** Θυρεοτρόπος Ορμόνη, **ACTH:** Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη, **FSH:** Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη, **LH:** Ωχρινοτρόπος Ορμόνη, **PRL:** Προλακτίνη **ΔΕ:** Δεν εκτιμήθηκε/διερευνήθηκε, **Y:** Υποπλασία, **ΑΥ:** Αδενοϋπόφυση **YAY:** Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης, **ΑΑΥ:** Απλασία Αδενοϋπόφυσης, **ΥπερΑΥ:** Υπερπλασία Αδενουπόφυσης, **NY:** Νευροϋπόφυση, **ENE:** Έκτοπη Νευροϋπόφυση, **MY:** Μίσχος της Υπόφυσης, **YMY:** Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης, **PSIS (Pituitary stalk interruption syndrome):** Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης, **TE:** Τουρκικό Εφίππιο, **YTE:** Υποπλασία Τούρκικου Εφίππιου, **YM:** Υποπλασία Μεσολόβιου, **SD (standard deviation):** Σταθερή απόκλιση, **RDS (respiratory distress syndrome):** Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, **Δε:** Δεξιά **Αρ:** Αριστερά

2 ^ο ΜΕΡΟΣ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΑΛΛΑΓΗ (Πρωτεΐνη/ Νουκλεοτίδιο)	ΗΛΙΚΙΑ (& σχέση με άλλον ασθενή)	ΥΨΟΣ σε SD ή cm κατά τη ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Βιβλιογραφία
6.A	A		p.T99fs (c.293_294 insC)	Παιδί, 9 μηνών	-4 SD	GH, TSH, ΔΕ:FSH/LH	YAY, ENE, YMY, YTE, YM	Μικροπείσμος	(Castinetti et al., 2008)
6.B	A		p.T99fs	Παιδί, 4 ετών	-2 SD	GH, TSH, ΔΕ:FSH/LH	YAY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα	(Castinetti et al., 2008)
6.Γ	A		p.T99fs	Ενήλικας (πατέρας 6.A & 6.B)	.	GH, FSH/LH	ΥπερAY	Παχυσαρκία	(Castinetti et al., 2008)
7.	A	Ιαπωνία	p.V101A	Παιδί, 3,6 ετών	-3.5 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	YAY, ENY	Χαμηλό Ανάστημα, Υπογλυκαιμικά επεισόδια, Μικροπείσμος, Υποσπαδίας	(Castinetti et al., 2008)
8	Θ	Ιαπωνία	p.V201I 0,5MB Ετερόζυγος Έλλειψη	Παιδί, 18 μηνών	-5.1 SD	GH, TSH, PRL	YAY, Κύστες AY, ENY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα, Παρατεταμένος Ίκτερος , Παροδική Αναπνευστική Δυσχερέρεια, Υπογλυκαιμία	(Dateki et al., 2010)
9	Θ	Ιαπωνία	c. 249-1G>A αποκοπή εξονίου	Παιδί, 5 ετών	-3,6 SD	GH, ACTH	YAY, ENY, YMY	Χαμηλό Ανάστημα	(Takagi et al., 2012)
10	A	Ιαπωνία	p. V75I (c.223G>A)	Βρέφος, 3 μηνών ¹		GH, TSH, PRL, FSH/LH	YAY, ENY, YMY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα , Μικροπείσμος , Αμφοτερόπλευρη Κρυπορχία	(Takagi et al., 2012)
11	Θ	Ισπανία	del1q25.2q25.3 ² μικρή απάλειψη	Βρέφος, 20 ημερών		GH, TSH, ACTH, FSH/LH	Απούσα AY & Χωάνη, ENY, YTE	RDS, Υπογλυκαιμία , Καρδιακή Ανεπάρκεια , Υποπλασία ονύχων, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Κοντό, Βραχύ, Φαρδύ Μέτωπο	(Filges et al., 2012)
12	Θ	Ιταλία	De novo διάμεση απαλειφή χρωμοσώματος 1q24.3q31.1	Παιδί, 4,5 ετών		GH, TSH, ACTH	YAY,	Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, Χειλο- υπερωϊοσχιστία, μικρά και ασύμμετρα προεξέχοντα αυτιά, κοντή μύτη με βολβοειδή ρινική άκρη και διογκωμένα ρουθούνια, μικρογναθία με οριζόντια πτυχή στο πιγούνι, αραιά μαλλιά, βραχύς λαιμός, Μικρά Πόδια & Αρ. Χέρι	(Capra et al., 2014)

Πίνακας 1: (Μέρος 2^ο) **Α:** Άρρεν, **Θ:** Θήλυ, **GH:** Αυξητική Ορμόνη, **TSH:** Θυρεοτρόπος Ορμόνη, **ACTH:** Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη, **FSH:** Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη, **LH:** Ωχρινοτρόπος Ορμόνη, **PRL:** Προλακτίνη **ΔΕ:** Δεν εκτιμήθηκε/διερευνήθηκε, **Y:** Υποπλασία, **AY:** Αδενουπόφυση **YAY:** Υποπλασία Αδενουπόφυσης, **AAY:** Απλασία Αδενουπόφυσης, **ΥπερAY:** Υπερπλασία Αδενουπόφυσης, **NY:** Νευροϋπόφυση, **ENE:** Έκτοπη Νευροϋπόφυση, **MY:** Μίσχος της Υπόφυσης, **YMY:** Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης, **PSIS (Pituitary stalk interruption syndrome):** Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης, **TE:** Τουρκικό Εφίππιο, **YTE:** Υποπλασία Τούρκικου Εφίππιου, **YM:** Υποπλασία Μεσολόβιου, **SD (standard deviation):** Σταθερή απόκλιση, **RDS (respiratory distress syndrome):** Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, **Δε:** Δεξιά **Αρ:** Αριστερά

3 ^ο ΜΕΡΟΣ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΑΛΛΑΓΗ (Πρωτεΐνη/ Νουκλεοτίδιο)	ΗΛΙΚΙΑ (& σχέση με άλλον ασθενή)	ΥΨΟΣ σε SD ή cm κατά τη ΔΙΑΓΝΩ ΣΗ	ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Βιβλιογραφία
13. A	A	Πακιστάν	p. T126M (c.377C>T)	Νεογνό	0.02 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	AAY, ENY	Ατελεκτασία, RDS, Υπογλυκαιμία, Υπονατρίαμια, Μικροπείσμος , Κρυπορχία, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Υποπλασία Μέσης Γραμμής Προσώπου, Χαμηλή Πρόσφυση Ώτων	(Gregory et al., 2015)
13. B	A	Πακιστάν	p.T126M	Νεογνό		GH, TSH, ACTH, FSH/LH	AAY, ENY	Ατελεκτασία, RDS, Υπογλυκαιμία, Υπονατρίαμια, Μικροπείσμος, Κρυπορχία Δε, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Υποπλασία μέσης γραμμής, Χαμηλή πρόσφυση Ώτων,	(Gregory et al., 2015)
14	A	Γαλλία	p.W204X	Παιδί, 2 ετών		GH, TSH, ACTH ³ , ΔΕ: FSH/LH	YAY, ENY, δεν απεικονίστηκε: MY	Χαμηλό Ανάστημα, Μυϊκή Αδυναμία και Απώλεια Ενέργειας (Asthenia)	(Rochette et al., 2015)
15	A	Αργεντινή	delK242	Βρέφος, 1 μήνα		GH, TSH, ACTH, ΔΕ:FSH/LH	YAY	Παρατεταμένος Ίκτερος	(Rochette et al., 2015)
16	Θ	Αργεντινή	p. N271S	Παιδί, 2 ετών		GH, TSH	ENY, YMY	Χαμηλό Ανάστημα, Χειλο-υπερωϊοσχιστία	(Rochette et al., 2015)
17. A	A	Γαλλία	p.Q346R	Παιδί, 6 ετών		GH, TSH ⁴	YAY, ENY, δεν απεικονίστηκε: MY	Χαμηλό Ανάστημα, Υποσπαδίας, Αγενεσία δαχτύλου, Βραχύ άκρο	(Rochette et al., 2015)
17. B		Σλοβενία	p.Q346R	Παιδί, 10 ετών		GH, TSH, ACTH ⁵ , FSH/LH ⁵	YAY, ENY, δεν απεικονίστηκε: MY		(Rochette et al., 2015)
18	A		p.R48Tfs*104 (c.143_144delG>A) ⁶	Παιδί, 2.5 ετών	-5 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	YAY, YTE	Χαμηλό Ανάστημα	(Cohen et al., 2016)

Πίνακας 2: (Μέρος 3^ο) **Α:** Άρρεν, **Θ:** Θήλυ, **GH:** Αυξητική Ορμόνη, **TSH:** Θυρεοτρόπος Ορμόνη, **ACTH:** Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη, **FSH:** Ωοθυλακιωτρόπος Ορμόνη, **LH:** Ωχρινοτρόπος Ορμόνη, **PRL:** Προλακτίνη **ΔΕ:** Δεν εκτιμήθηκε/διερευνήθηκε, **Y:** Υποπλασία, **AY:** Αδενοϋπόφυση **YAY:** Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης, **AAY:** Απλασία Αδενοϋπόφυσης, **ΥπερAY:** Υπερπλασία Αδενουπόφυσης, **NY:** Νευροϋπόφυση, **ENE:** Έκτοπη Νευροϋπόφυση, **MY:** Μίσχος της Υπόφυσης, **YMY:** Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης, **PSIS (Pituitary stalk interruption syndrome):** Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης, **TE:** Τουρκικό Εφίππιο, **YTE:** Υποπλασία Τούρκικου Εφίππιου, **YM:** Υποπλασία Μεσολόβιου, **SD (standard deviation):** Σταθερή απόκλιση, **RDS (respiratory distress syndrome):** Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, **Δε:** Δεξιά **Αρ:** Αριστερά

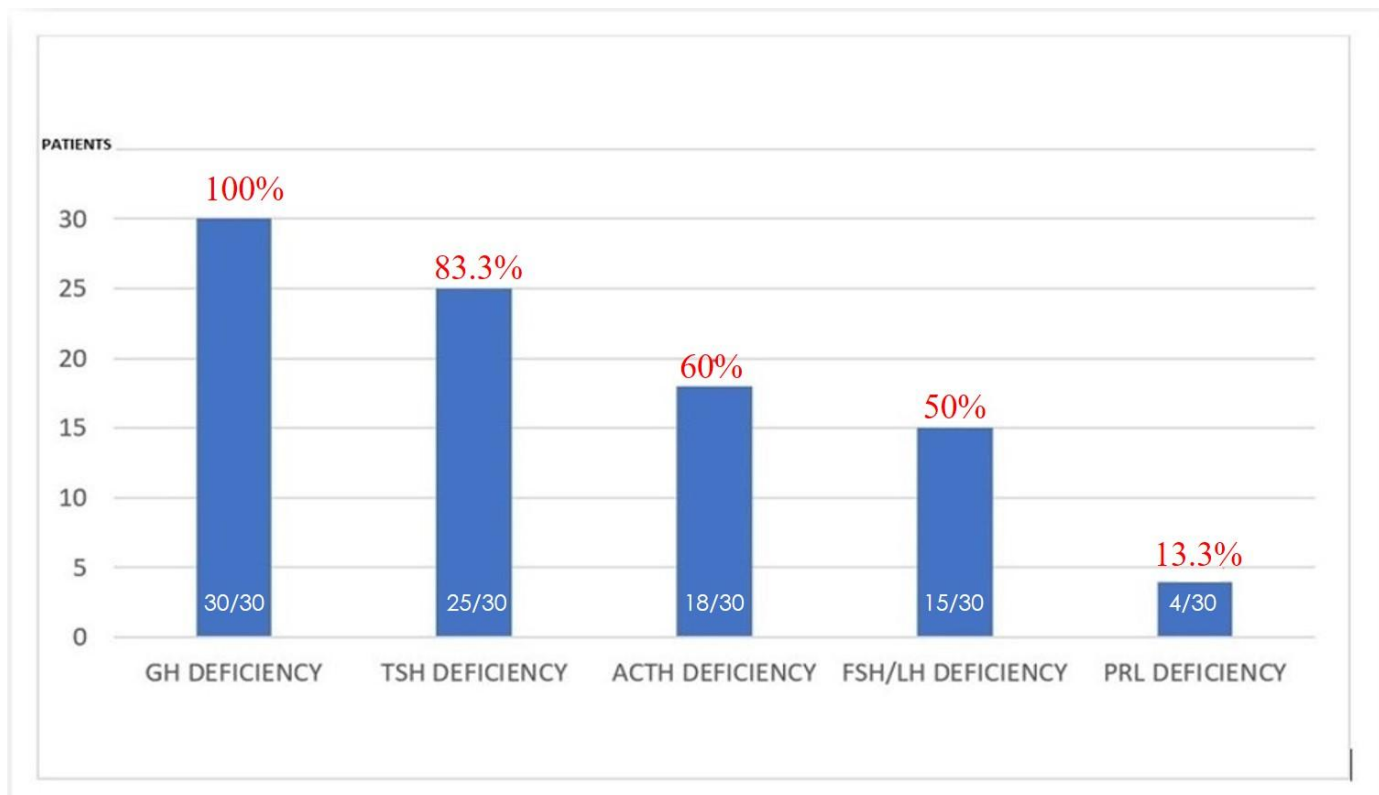
4 ^ο ΜΕΡΟΣ	ΦΥΛΛΟ	ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΑΛΛΑΓΗ (Πρωτεΐνη/ Νουκλεοτίδιο)	ΗΛΙΚΙΑ (& σχέση με άλλον ασθενή)	ΥΨΟΣ σε SD ή cm κατά τη ΔΙΑΓΝΩ ΣΗ	ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΟΦΥΣΗΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	Βιβλιογραφία
19	A		p.A65V (c. 194C>T)	Παιδί 9,5 yr	-3 SD	GH	ENE	Χαμηλό Ανάστημα, Μικροπείσμος	(Cohen et al., 2016)
20	Θ		p.Y131* (c. 324C>G) ⁷	Παιδί, 8 μηνών	-2 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH, PRL	AAY	Χαμηλό Ανάστημα, Επιληπτική Κρίση	(Cohen et al., 2016)
21	A		p.T163P (c. 487A>C)	Νεογνό 9 ημερών	-0.1 SD	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	YAY, ENY	Στένωση Αορτής, Διπλό Πνευλοκαλκικό Σύστημα, Μικροπείσμος	(Cohen et al., 2016)
22	A		c.606+1G>T		-1 SD	GH, TSH, ACTH	YAY, Διπλή ENY, YTE, Δυσπλασία Chiari τύπου 1	Μακροκρανία, Υδροκέφαλος, Στρογγυλεμένο Μέτωπο, Μικροπείσμος	(Cohen et al., 2016)
23	A		p.R221Q (c. 662G>A)	Παιδί, 15,1 ετών	-4.5 SD	GH, FSH/LH	ENY, PSIS, YTE	Χαμηλό Ανάστημα, Θολωτή Υπερώα	(Cohen et al., 2016)
24	A		p. R235Q (c. 704G>A)	Παιδί, 2,5 ετών	-1.85 SD	GH, TSH	ENY, YTE, bilateral papillary coloboma, ΔΕ: AY	Αμφοτερόπλευρο Κολόβωμα της Τριδος	(Cohen et al., 2016)
25	Θ	Κίνα	c.70G>A ⁸ και p.A324T (c.970G>A) ⁹	Βρέφος, 4,5 μηνών ¹⁰				Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ¹¹	(Lu, Huang, Yan, Zhang, & Li, 2017)

Πίνακας 3: (Μέρος 4^ο) A: Άρρεν, **Θ:** Θήλυ, **GH:** Αυξητική Ορμόνη, **TSH:** Θυρεοτρόπος Ορμόνη, **ACTH:** Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη, **FSH:** Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη, **LH:** Ωχρινοτρόπος Ορμόνη, **PRL:** Προλακτίνη **ΔΕ:** Δεν εκτιμήθηκε/διερευνήθηκε, **Y:** Υποπλασία, **AY:** Αδενοϋπόφυση **YAY:** Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης, **AAY:** Απλασία Αδενοϋπόφυσης, **ΥπερAY:** Υπερπλασία Αδενοϋπόφυσης, **NY:** Νευροϋπόφυση, **ENE:** Έκτοπη Νευροϋπόφυση, **MY:** Μίσχος της Υπόφυσης, **YMY:** Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης, **PSIS (Pituitary stalk interruption syndrome):** Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης, **TE:** Τουρκικό Εφίππιο, **YTE:** Υποπλασία Τούρκικου Εφίππιου, **YM:** Υποπλασία Μεσολόβιου, **SD (standard deviation):** Σταθερή απόκλιση, **RDS (respiratory distress syndrome):** Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας, **Δε:** Δεξιά **Αρ:** Αριστερά

¹Στους 3μήνες παραπέμφθηκε για ΜΠ, αμφοτερόπλευρη ΚΟ και στους 10mo για ΧΑ. ² Απάλειψη 13 γονιδίων, μεταξύ αυτών και το LHX4. ³Διαγνώσθηκε στην ηλικία των 9 ετών. ⁴Διαγνώσθηκε στην ηλικία των 10 ετών. ⁵ Παρουσιάστηκε στην ηλικία των 18 ετών. ⁶Απολοιφή 2 βάσεων με αποτέλεσμα να εμφανίζεται κωδικόνιο λήξης στη θέση 152. ⁷Εμφανίζεται κωδικόνιο λήξης στην περιοχή LIM2 domain. ⁸ Εντοπίζεται σε μη κωδικοποιημένη περιοχή (Untranslated Region,UTR) και προκαλεί μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης LHX4. ⁹ Το έμβρυο κληρονόμησε και τις δύο μεταλλάξεις σε ετερόζυγοτεία από τους γονείς του. ¹⁰ Βιοψία Τροφοβλάστης. ¹¹ Fetal growth restriction (FGR) <από την 5^η εκατοστιαία θέση.

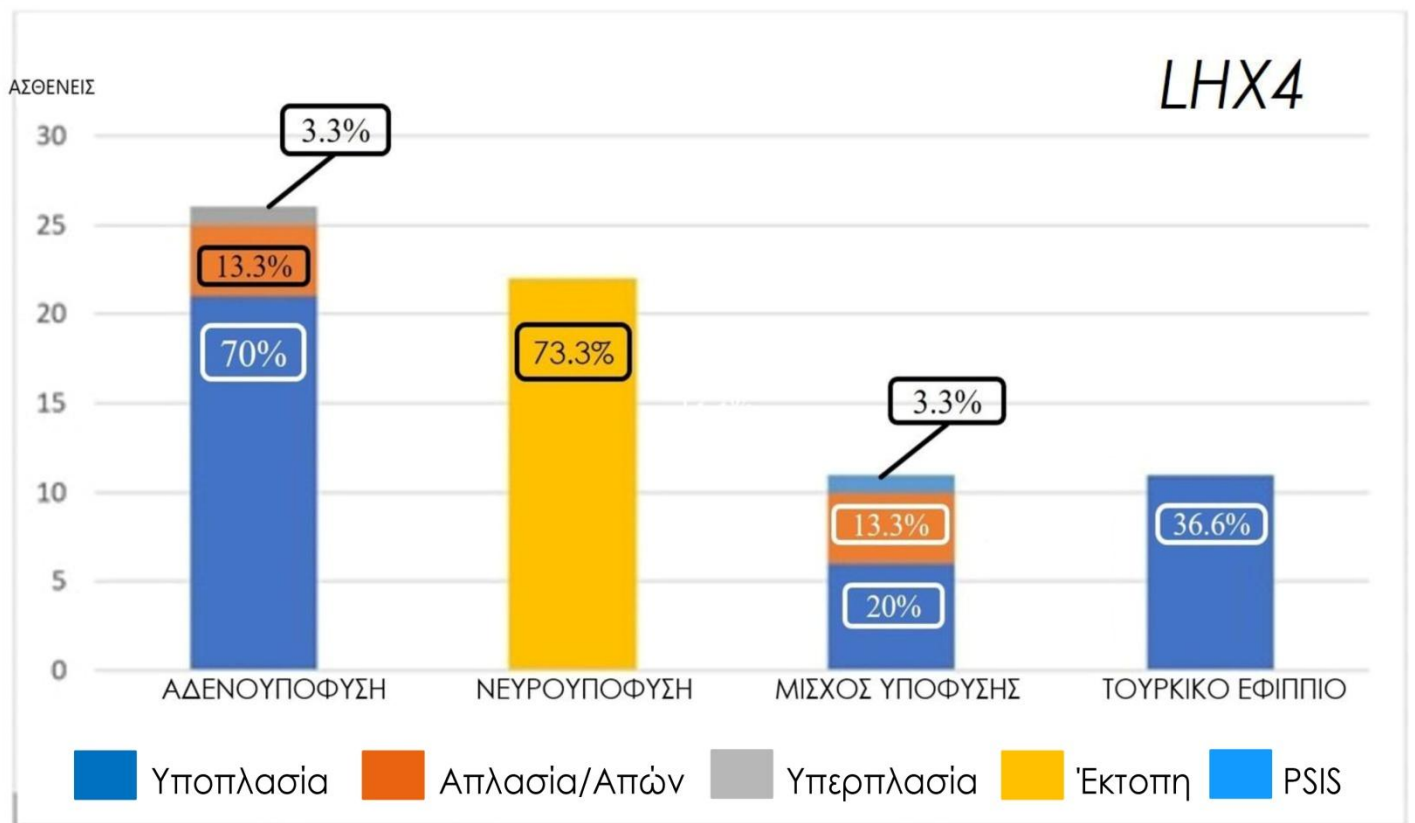
Στον πίνακα αναφέρονται 30 ασθενείς με μετάλλαξη του γονιδίου LHX4, πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια και απεικονιστικά ευρήματα από την μαγνητική τομογραφία (δεν συμπεριλαμβάνονται οι ασθενείς 1.Γ/Δ και 5.Γ λόγω έλλειψης στοιχείων) οι οποίοι παρουσιάζουν: ανεπάρκεια της GH σε ποσοστό 100% (30/30), ανεπάρκεια της TSH σε ποσοστό 83.3% (25/30), ανεπάρκεια της ACTH σε ποσοστό

60% (18/30), ανεπάρκεια των FSH/LH σε ποσοστό 50% (15/30), και ανεπάρκεια της PRL σε ποσοστό 13.3% (4/30). Μερική ανεπάρκεια TSH παρουσιάζει 1/30 ασθενείς (3.3%) ενώ 5/30 ασθενείς (16.6%) δεν έχουν διερευνηθεί για ανεπάρκεια PRL. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά των ορμονικών ανεπαρκειών ενδεχομένως να μεταβληθούν λόγω μελλοντικής εμφάνισής τους (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Συχνότητα Ορμονικών ανεπαρκειών ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο LHX4

Από τα απεικονιστικά ευρήματα των ασθενών του πίνακα 1 παρατηρείται υποπλασία ή απλασία της αδενοϋπόφυσης σε 21/30 (70%) και 4/30 (13.3%) ασθενείς αντίστοιχα, σύνολο 83.3%, μία περίπτωση υπερπλασίας της αδενοϋπόφυσης (3.3%) και 3 περιπτώσεις με κύστει στην αδενοϋπόφυση (10%). Έκτοπη νευροϋπόφυση παρατηρείται σε 22/30 ασθενείς (73.3%), εκ των οποίων, ένας ασθενής παρουσιάζει διπλή έκτοπη νευροϋπόφυση. Υποπλασία του μίσχου της υπόφυσης παρατηρείται σε 6/30 ασθενείς (20%), απουσία του μίσχου της υπόφυσης σε 4/30 ασθενείς (13.3%) και ένας ασθενής παρουσιάζει σύνδρομο διατομής του μίσχου της υπόφυσης (3.3%). Υποπλασία του τούρκικου εφιππίου παρατηρείται σε 11/30 ασθενείς (36.6%), Εικόνα 11.



Εικόνα 10: Απεικονιστικά ευρήματα MRI ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *LHX4*

Μία μόνο ομόζυγη παρερμηνεύσιμη αλλαγή στη θέση p.T126M του γονιδίου *LHX4* έχει ανιχνευτεί σε δύο αδέρφια από το Πακιστάν (Gregory et al., 2015). Τα δύο αδέρφια παρουσίασαν μετά τον τοκετό υποτονία, εικόνα συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας (RDS) με συνοδό ατελεκτασία των πνευμόνων, υπογλυκαιμία, υπονατριαιμία, χαμηλό ανάστημα, μικροπεϊσμό, κρυσορχία, υποπλασία μέσης γραμμής προσώπου, θηλών και ονύχων, καθίζηση ρίζας ρινός, χαμηλή πρόσφυση των ώτων και από τον ορμονικό έλεγχο πανυποφυσισμό (Gregory et al., 2015). Τα αδέλφια κατέληξαν την πρώτη εβδομάδα της ζωής τους μετά από φλεγμονώδη σήψη (Gregory et al., 2015). Παρόμοια κλινική εικόνα και κατάληξη είχε και η πρώτη αδελφή της οικογένειας αυτής, δίχως όμως να έχει πραγματοποιηθεί γενετικός έλεγχος που να επιβεβαιώνει την παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *LHX4* (Gregory et al., 2015).

Οι ασθενείς με ετερόζυγο μετάλλαξη στο γονίδιο *LHX4* παρουσιάζουν συνήθως χαμηλό ανάστημα και συνδυασμούς ενδοκρινολογικών διαταραχών (ανεπάρκεια GH, TSH, ACTH, FSH/LH) (Bancalari et al., 2012; McCabe & Dattani, 2014). Επιπλέον έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με επιληπτική κρίση (Cohen et al., 2016; Pfaeffle et al., 2008), επεισόδια υπογλυκαιμίας (Dateki et al., 2010; Filges et al., 2012; Gregory et al., 2015; Pfaeffle et al., 2008; T. Tajima, Yorifuji, Ishizu, & Fujieda, 2010), παρατεταμένο ίκτερο σε νεογνά (Dateki et al., 2010; Pfaeffle et al., 2008; Rochette et al., 2015), παχυσαρκία (Castinetti et al., 2008; Pfaeffle et al., 2008), μικροπεϊσμό (Castinetti et al., 2008; Cohen et al., 2016; Gregory et al., 2015; T. Tajima et al., 2010; Takagi et al., 2012), κρανιοφαρυγγικό πόρο (Machinis et al., 2001), υποσπαδία (Rochette et al., 2015; T. Tajima et al., 2010), κρυσορχία (Gregory et al., 2015; Takagi et al., 2012),

χειλοϋπερωιοσχιστία (Rochette et al., 2015) καρδιακή ανεπάρκεια (Filges et al., 2012), καθίζηση ρίζας ρινός (Filges et al., 2012; Gregory et al., 2015), αναπνευστική δυσχέρεια (Dateki et al., 2010; Gregory et al., 2015), αγενεσία δακτύλου και βραχύ άκρο (Rochette et al., 2015), στένωση αορτής (Cohen et al., 2016), διπλό πυελοκαλυκτικό σύστημα (Cohen et al., 2016), θολωτή υπερώα (Cohen et al., 2016) και αμφοτερόπλευρο κολόβωμα της ίριδος (Cohen et al., 2016). Απεικονιστικά παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς υποπλασία ή απλασία της αδενοϋπόφυσης, (συνήθως) έκτοπη νευροϋπόφυση, υποπλασία του μίσχου και του τουρκικού εφιππίου (Daniel Kelberman et al., 2009; Rochette et al., 2015).

Σε μία ασθενή εννέα ετών ανιχνεύτηκε, με SNIP array, διπλασιασμός (7.5 Mb) στην περιοχή 1q25.1q25.3. Η περιοχή αυτή του χρωμοσώματος 1 περιλαμβάνει 87 γονίδια συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *LHX4*. Η ασθενής παρουσιάζει ήπια νοητική στέρηση, υψηλό ανάστημα, μακροκεφαλία και άλλες κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες (Kehrer et al., 2015)

2.2.8 *PROP1*

Ο μεταγραφικός παράγοντας *Prop1* (*Prophet of Pit1*) είναι μέλος της ομάδας γονιδίων ομοιοπεριοχής, οι οποίοι λειτουργούν κατά ζεύγη (*Paired-like Homedomain Transcription Factors*). Το γονίδιο εδράζεται, στον άνθρωπο, στο χρωμόσωμα 5q35, αποτελείται από 3 εξόνια και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 226 αμινοξέων. Στο μυο παράγοντας *Prop1* εκφράζεται αποκλειστικά στην εμβρυική υπόφυση (Daniel Kelberman et al., 2009). Αρχικά εκφράζεται την e 10.5 - e 11.0 στο ραχιαίο τμήμα του θυλάκου του Rathke (Dattani, 2005), σε μία περιοχή δηλαδή που εκφράζεται παράλληλα και ο παράγοντας *Hesx1* (Daniel Kelberman et al., 2009) με αποτέλεσμα η έκφραση του παράγοντα *Prop1* να περιορίζεται από τον σχηματισμό ετεροδιμερών *Hesx1/Prop1* (McCabe & Dattani, 2014). Ο παράγοντας *Prop1* κορυφώνει την έκφρασή του την e 12.0 στην ουραία και μέση (caudomedial) περιοχή της αναπτυσσόμενης υπόφυσης, δεσμεύεται ως ομοδιμερές στο ίδιο τμήμα DNA (Dattani, 2005; McCabe & Dattani, 2014), στη συνέχεια φθίνει η έκφρασή του και την e 15.5 δεν ανιχνεύεται (Dattani, 2005; Daniel Kelberman et al., 2009) Ο *Prop1* είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα *Pou1F1* ή *Pit1* την e 13.5 (McCabe & Dattani, 2014) και συνεισφέρει στην διατήρηση της έκφρασης του παράγοντα *Lhx3*.

Ο μυς Ames dwarf (νάνος) που φέρει ομόζυγη παρερμηνεύσιμη (missense) σημειακή αλλαγή p. S83P στο γονίδιο *Prop1* (Sornson et al., 1996) παρουσιάζει πολλαπλή υποφυσιική ανεπάρκεια (GH, TSH, PRL, FSH/LH) (Tang, Bartke, Gardiner, Wagner, & Yun, 1993).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *Prop1* στον άνθρωπο ευθύνονται για το 50% των περιπτώσεων πολλαπλής υποφυσιακής ανεπάρκειας (ΠΥΑ) οικογενούς αιτιολογίας και για ένα πολύ μικρό ποσοστό των περιπτώσεων ΠΥΑ με σποραδική εμφάνιση (McCabe & Dattani, 2014). Στην μαγνητική τομογραφία ασθενών με μεταλλάξεις του γονιδίου *Prop1* η νευροϋπόφυση απεικονίζεται φυσιολογική ενώ η αδενοϋπόφυση μπορεί να απεικονιστεί μικρότερη ή μεγαλύτερη του φυσιολογικού (Dattani, 2005; McCabe & Dattani, 2014; Voutekis et. al. 2004).

Οι ορμονικές ανεπάρκειες των ασθενών αναπτύσσονται σταδιακά μετά τη γέννηση και με συγκεκριμένη αλληλουχία. Αρχικά τίθεται η διάγνωση της ανεπάρκειας της GH, λόγω του χαμηλού αναστήματος του ασθενούς και ανεπάρκεια TSH με υποκλινικό υποθυρεοειδισμό όμως στο 80% των περιπτώσεων. Η ανεπάρκεια των γοναδοτροπινών διαπιστώνεται κατά την περίοδο που φυσιολογικά αναμένεται η έναρξη της ήβης, ενώ με την πάροδο της ηλικίας μπορεί να εμφανιστεί και ανεπάρκεια ACTH (McCabe & Dattani, 2014).

2.2.9 *POU1F1*

Ο *POU1F1* (*Pit1*) είναι ειδικός για την υπόφυση (pituitary-specific) μεταγραφικός παράγοντας και μέλος της οικογένειας γονιδίων ομοιοπεριοχής *POU* (*POU Homeodomain family*) (Dattani, 2005). Η ονομασία *POU* προέρχεται από τα ακρωνύμια των αρχικών μελών της οικογένειας: *Pit1*, *Oct* και *Unc-86* (Mangalam et al., 1989;). Το γονίδιο *POU1F1* εδράζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 3q11, αποτελείται από έξι εξόνια και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 291 αμινοξέων (Rosenfeld, 1991; Ingraham et al., 1990).

Στο μυοκύτταρο ο παράγοντας *Pou1f1* εκφράζεται την e 13.5 αποκλειστικά στην πρόσθια μοίρα της υπόφυσης (Dattani, 2005; Prince et al., 2011) και η έκφρασή του διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια του βίου του. Ο παράγοντας *POU1F1* σχηματίζει διμερή, προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί γονίδια στόχους. Είναι ζωτικής σημασίας παράγοντας αρχικά για την ανάπτυξη των σωματοτρόπων, λακτοτρόπων και θυρεοειδοτρόπων κυττάρων (Andersen & Rosenfeld, 2001; Dattani, 2005; Davis et al., 2009; S. Li et al., 1990;) και για την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της GH-1, της PRL, της β υποομάδας της TSH (Dattani, 2005) και του υποδοχέα της GHRH (GHRHR). Επιπλέον έχει την ικανότητα να διατηρεί την έκφρασή του μέσω αυτορρύθμισης (autoregulation) (Daniel Kelberman et al., 2009; Prince et al., 2011).

Στον νάνο μυ *Snell* (*Snell dwarf mouse*) που φέρει σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *Pou1f1* στη θέση p. W261C παρατηρείται υποπλασία της αδενοϋπόφυσης, έλλειψη σωματοτρόπων, λακτοτρόπων και θυρεοειδοτρόπων κυττάρων και ανεπάρκεια GH, Prl και TSH (Daniel Kelberman et al., 2009; S. Li et al., 1990; Prince et al., 2011). Παρόμοιο φαινότυπο παρουσιάζει η διαταραχή του γονιδίου *Pou1f1* στον νάνο μυ

Jackson (Jackson dwarf mouse) (Dattani, 2005; Daniel Kelberman et al., 2009; S. Li et al., 1990).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *POU1F1* στον άνθρωπο μεταβιβάζονται με τον υπολειπόμενο και σε ορισμένες περιπτώσεις με τον επικρατούντα χαρακτήρα (Castinetti et al., 2012). Παρατηρείται ανεπάρκεια GH, Prl, TSH και φυσιολογική ή υποπλαστική αδενούποφυση (Dattani, 2005; Daniel Kelberman et al., 2009; Tatsumi et al., 1992).

3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή διερεύνηση περιστατικών οργανικής πολλαπλής υποφυσιακής ανεπάρκειας που παρουσιάζουν παθολογικά απεικονιστικά ευρήματα από την υποθάλαμο-υποφυσιακή περιοχή σε 6 ασθενείς που διαγνώστηκαν κατά την βρεφική και νηπιακή ηλικία. Η μοριακή διερεύνηση αφορά γονίδια, μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην οργανογένεση της υπόφυσης.

4. Ασθενείς και Μέθοδοι

4.1 Ασθενείς – Ιστορικό

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν έξι ασθενείς με πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια και παθολογικά απεικονιστικά ευρήματα από την υποθαλαμοϋποφυσιακή περιοχή. Ο μοριακός έλεγχος των ασθενών πραγματοποιήθηκε στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Ά Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων “Η Αγία Σοφία”. Από τους έξι ασθενείς, δύο είναι γένους θηλυκού και τέσσερις γένους αρσενικού. Η διάγνωση της ΠΥΑ τέθηκε για τα μεν θηλυκά τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής τους, στα δε αρσενικά σε νεογνική ηλικία και ο γονιδιακός έλεγχος του γονιδίου *PROP 1* ήταν σε όλους αρνητικός. Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει το φύλο, την ηλικία διάγνωσης της ΠΥΑ, τα ευρήματα από τον ορμονικό και απεικονιστικό έλεγχο, και τη συμπτωματολογία - κλινική εικόνα των ασθενών.

<i>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</i>	<i>ΦΥΛΟ, ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ</i>	<i>ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ</i>	<i>ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΕΣ ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ</i>	<i>ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ</i>	<i>ΑΛΛΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</i>
1.	Θήλυ 10.09.2009	11 μηνών	GH, TSH	YAY, ENY, ΔΜΥ	Υπογλυκαιμία, Γενικευμένοι τονικοκλονικοί σπασμοί, Απώλεια συνείδησης, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Υπερτελορισμός
2.	Άρρεν 30.03.2009	1 μήνα	GH, TSH	YAY, ENY	Μικροπείσμος, Υποσπαδία, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Κυανοί Σκληροί
3.	Θήλυ 18.12.2005	2 ετών	GH, TSH, ACTH	YAY, ENY, YMY	Υπογλυκαιμικοί Σπασμοί, Καθίζηση Ρίζας Ρινός, Κύρτωση μετώπου
4.	Άρρεν 06.05.2011	2 μηνών	GH, TSH, ACTH	YAY, ENY, PSIS	Υπογλυκαιμία, Ίκτερος (νεογνική ηπατίτιδα), Μικροπείσμος, Υποπλασία Όρχεων, Επικοινωνούσα Υδροκήλη Δεξιά, Κύστη Morgagni Δεξιά
5.	Άρρεν 25.07.2012	1 μήνα	GH, TSH, ACTH	YAY, YMY, ΔΜΥ	Υπογλυκαιμία, Νωθρότητα, Παρατεταμένος Ίκτερος
6.	Άρρεν 14.07.2009	1 μήνα	GH, TSH, ACTH, FSH/LH	YAY, ENY, ΔΜΥ, ΥΤΕ	Μικροπείσμος

***Πίνακας 2:** GH: Αυξητική Ορμόνη, TSH: Θυρεοτρόπος Ορμόνη, ACTH: Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη, FSH: Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη, LH: Ωχρινोटρόπος Ορμόνη, PRL: Προλακτίνη, AY: Αδενοϋπόφυση YAY: Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης, NY: Νευροϋπόφυση, ENY: Έκτοπη Νευροϋπόφυση, MY: Μίσχος της Υπόφυσης, YMY: Υποπλαστικός Μίσχος Υπόφυσης, ΔMY: Δυσδιάκριτος Μίσχος Υπόφυσης, PSIS (Pituitary stalk interruption syndrome): Σύνδρομο Διατομής του Μίσχου της Υπόφυσης, TE: Τουρκικό Εφίππιο, YTE: Υποπλασία Τουρκικού Εφίππιου, YM: Υποπλασία Μεσολόβιου, d: ημέρες, mo: μήνες, yr: έτη, SD (standard deviation): Σταθερή απόκλιση*

Ασθενής 1

Η ασθενής σε ηλικία ενός μηνός παρουσίασε απώλεια συνείδησης με απύρετους γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς, υπογλυκαιμία, ανορεξία και ανησυχία. Σε ηλικία 16 μηνών εμφανίστηκε εκνευρισμός και πάλι απώλεια συνείδησης επί 15-20 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε MRI η οποία ανέδειξε υποπλαστική πρόσθια υπόφυση, έκτοπη νευροϋπόφυση στο επίπεδο του οπτικού χιάσματος, δυσδιάκριτο μίσχο της υπόφυσης και εστιακή αλλοίωση στην περικοιλιακή λευκή ουσία. Η ασθενής παρουσιάζει υπερτελορισμό και καθίζηση ρίζας ρινός. Σε χρονολογικές ηλικίες 19 μηνών και 7 ετών, η οστική της ηλικία μετρήθηκε 6 μηνών και 5 ετών, αντίστοιχα. Εργαστηριακά διαπιστώθηκε ανεπάρκεια GH και TSH.

Ασθενής 2

Η κλινική εξέταση του βρέφους ηλικίας ενός μηνός ανέδειξε υποσπαδιακή ακροποσθία (βαλανικός υποσπαδίας), μικροπεϊσμό, κυανούς σκληρούς και καθίζηση ρίζας ρινός. Ο ορμονικός έλεγχος ανέδειξε ανεπάρκεια GH και TSH. Τα ευρήματα του απεικονιστικού ελέγχου σε ηλικία 5 ετών ανέδειξαν υποπλαστική αδενουπόφυση, έκτοπη νευροϋπόφυση (στο φαιό όγκωμα του υποθαλάμου) και δυσδιάκριτο μίσχο της υπόφυσης.

Ασθενής 3

Ο ασθενής ηλικίας 21 μηνών παρουσίασε επεισόδιο αδιαθεσίας, υποτονίας και σπασμών και διεγνώσθη με υπογλυκαιμικούς σπασμούς. Από την κλινική εξέταση παρατηρείται καθίζηση ρίζας ρινός και προπέτεια μετώπου (frontal bossing). Ανευρέθηκε ανεπάρκεια GH, TSH και ACTH και ξεκίνησε θεραπεία υποκατάστασης σε ηλικία 26 μηνών. Η μαγνητική τομογραφία ανέδειξε υποπλασία αδενουπόφυσης με συνοδό, υποπλαστικό μίσχο της υπόφυσης και ανατομική δυσπλασία του μεσολοβίου και το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (ΗΕΓ) διάχυτα βραδέα και υψηλά δυναμικά.

Ασθενής 4

Το βρέφος ηλικίας 1,5 μηνός διακομίστηκε στο νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία με βιοχημικά ευρήματα νεογνικής ηπατίτιδας, υπογλυκαιμικά επεισόδια, υπερχολεθρυναιμία άμεσου τύπου και υπερτρανσαμιναιμία. Ο ασθενής παρουσίαζε ίκτερο, έντονα υποπλαστικό πέος (μικροπεϊσμός) και υποπλαστικό όσχεο και ο υπερηχογραφικός έλεγχος ανέδειξε υποπλαστικούς όρχεις, επικοινωνούσα υδροκήλη δεξιά και μικρών διαστάσεων κύστη Morgagni δεξιά. Στον ορμονολογικό έλεγχο διαπιστώθηκε ανεπάρκεια GH, TSH και ACTH και στον απεικονιστικό έλεγχο υποπλασία αδενουπόφυσης, έκτοπη νευροϋπόφυση και σύνδρομο διατομής του μίσχου της υπόφυσης (PSIS).

Ασθενής 5

Το βρέφος ηλικίας ενός μηνός εισήχθη στην εντατική λόγω νωθρότητας και ελαττωμένης σίτισης. Διαπιστώθηκε υπογλυκαιμία, παρατεταμένος ίκτερος, καθώς και μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης με synachten test και χορηγήθηκε υδροκορτιζόνη. Ένα μήνα αργότερα διαπιστώθηκε κεντρικός υποθυρεοειδισμός και χορηγήθηκε θυροξίνη (T₄). Τα απεικονιστικά ευρήματα της μαγνητικής τομογραφίας (MRI) υποθαλαμο-υποφυσιακής περιοχής σε ηλικία 5.5 μηνών ανέδειξαν υποπλαστική αδενουπόφυση και λεπτό, δυσδιάκριτο μίσχο της υπόφυσης. Σε ηλικία είκοσι μηνών προστέθηκε στην φαρμακευτική του αγωγή η Αυξητική Ορμόνη λόγω της ανεπάρκειας της GH.

Ασθενής 6

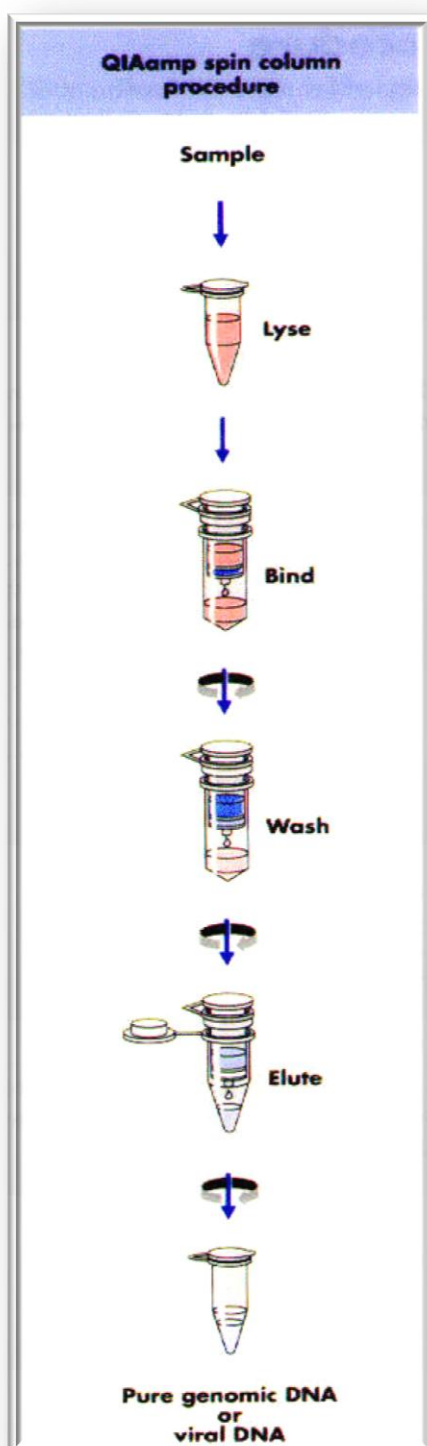
Το βρέφος σε ηλικία ενός μηνός διεγνώσθηκε με μικροπείσμό, ανεπάρκεια GH, TSH, ACTH, FSH/LH και από τον απεικονιστικό έλεγχο υποπλασία της αδενούποφουσης, έκτοπη νευροϋπόφουση, λεπτό μίσχο της υπόφουσης και υποπλασία του τουρκικού εφιππίου.

Ο πίνακας 8 παρουσιάζει το φύλο, την ηλικία διάγνωσης της ΠΥΑ, τα ευρήματα από τον ορμονικό και απεικονιστικό έλεγχο, και τη συμπτωματολογία - κλινική εικόνα των ασθενών.

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενομικού DNA στην παρούσα εργασία έγινε με την χρήση QIAamp Blood DNA Mini kit της εταιρίας QIAGEN (GmbH, Hilden, Germany). Η απομόνωση έγινε από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος. Το δείγμα του αίματος τοποθετείται σε φιαλίδια με EDTA 5% w/v και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20 °C ώσπου να χρησιμοποιηθεί. Τα στάδια της απομόνωσης DNA είναι κατά σειρά η καταστροφή και απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων, η λύση της κυτταρικής μεμβράνης των λευκοκυττάρων, η απελευθέρωση του DNA, η καταστροφή των πρωτεϊνών (ιστονών), η καθίζησή τους με μορφή ιζήματος και η κατακρήμνιση του DNA (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Στάδια απομόνωσης γενομικού DNA.

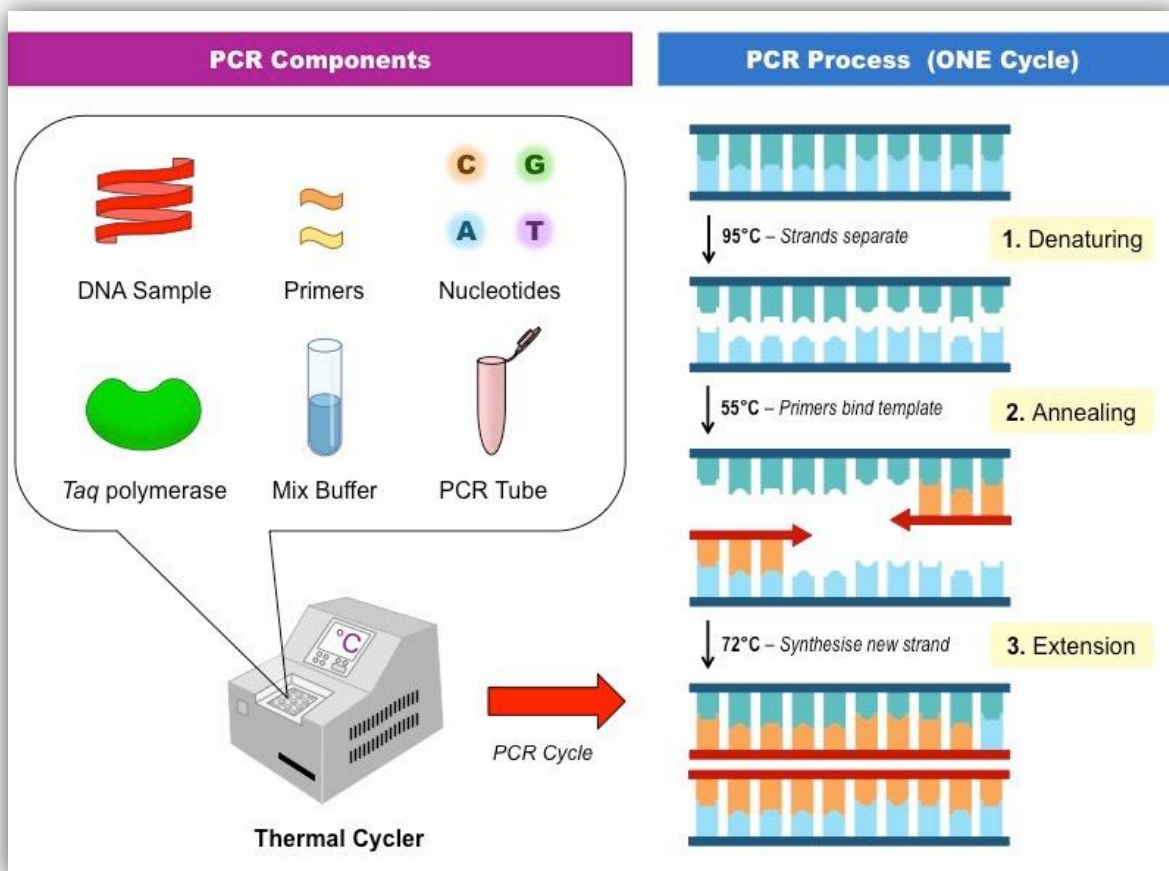
1. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο “eppendorf” (όγκου 1,5 ml) τοποθετούνται 20 µl πρωτεΐνάσης (πρωτεολυτικό ένζυμο απαραίτητο για την καταστροφή των πρωτεϊνών).
2. Προστίθενται στο σωληνάριο 200 µl περιφερικού αίματος και 200 µl ρυθμιστικού διαλύματος AL.
3. Το μίγμα ομογενοποιείται με χρήση vortex για 15 δευτερόλεπτα και ακολουθεί επώαση 10 min σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 56 °C ώστε να δράσει η πρωτεΐνάση K και να εξασφαλιστεί η καταστροφή των πρωτεϊνών και η αποτελεσματική λύση των λευκών αιμοσφαιρίων.
4. Σύντομη φυγοκέντρηση στις 3500 rpm

5. Προσθήκη 200 μ l αιθανόλη (96-100%), η οποία προκαλεί κατακρήμνιση του DNA.
6. Ακολουθεί περιδίνηση (vortex) επί 15 sec και ξανά σύντομη φυγοκέντρωση.
7. Το μίγμα μεταφέρεται προσεκτικά σε ειδική στήλη φυγοκέντρωσης (QIAamp Mini spin column), η οποία τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής των 2 ml.
8. Φυγοκεντρείται στις 8000 rpm για 1 λεπτό.
9. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα συλλογής.
10. Προσθήκη 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος AW1.
11. Φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1min.
12. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα συλλογής.
13. Προσθέτουμε 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος AW2.
14. Φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 3 min. Η στήλη φυγοκέντρωσης φέρει ειδική μεμβράνη (*silica gel membrane*) στην οποία προσδένεται το DNA. Με την προσθήκη διαλυμάτων και διαδοχική φυγοκέντρωση απομακρύνονται οι πρωτεΐνες ενώ το DNA παραμένει προσκολλημένο στην μεμβράνη.
15. Η στήλη μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf (όγκου 1,5 ml)
16. Προσθήκη 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος AE ή H₂O.
17. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min
18. Φυγοκέντρωση επί 1 min στις 8000 rpm.
19. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του διαλύματος DNA εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1%).

4.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) περιγράφηκε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis, ο οποίος δέκα χρόνια αργότερα το 1993 τιμήθηκε με βραβείο Nobel για την μέθοδο πολλαπλασιασμού (PCR) ενός τμήματος του DNA. Είναι μία μέθοδος που απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού γενωμικού υλικού για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων μιας ορισμένης περιοχής DNA. Τα απαραίτητα συστατικά για την διενέργεια μιας αντίδρασης PCR είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 12):

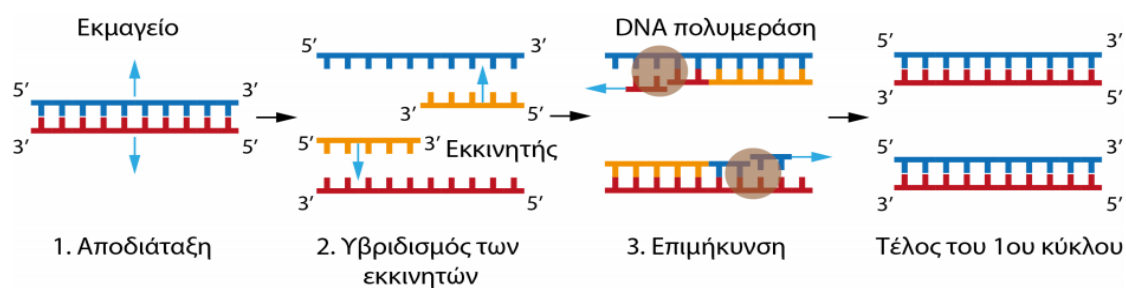
1. Το DNA μήτρα,
2. Εκκινητές - Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-25 βάσεων) τα οποία είναι ομόλογα της αλληλουχίας εκατέρωθεν του τμήματος που θα πολλαπλασιαστεί.
3. Νουκλεοτίδια dNTPs (A, C, G and T) τα δομικά υλικά για την σύνθεση των προϊόντων της PCR.
4. Ιόντα Mg⁺².
5. Ένζυμο Taq DNA Polymerase
6. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)



Εικόνα 12: Συστατικά και διαδοχικά στάδια της PCR.

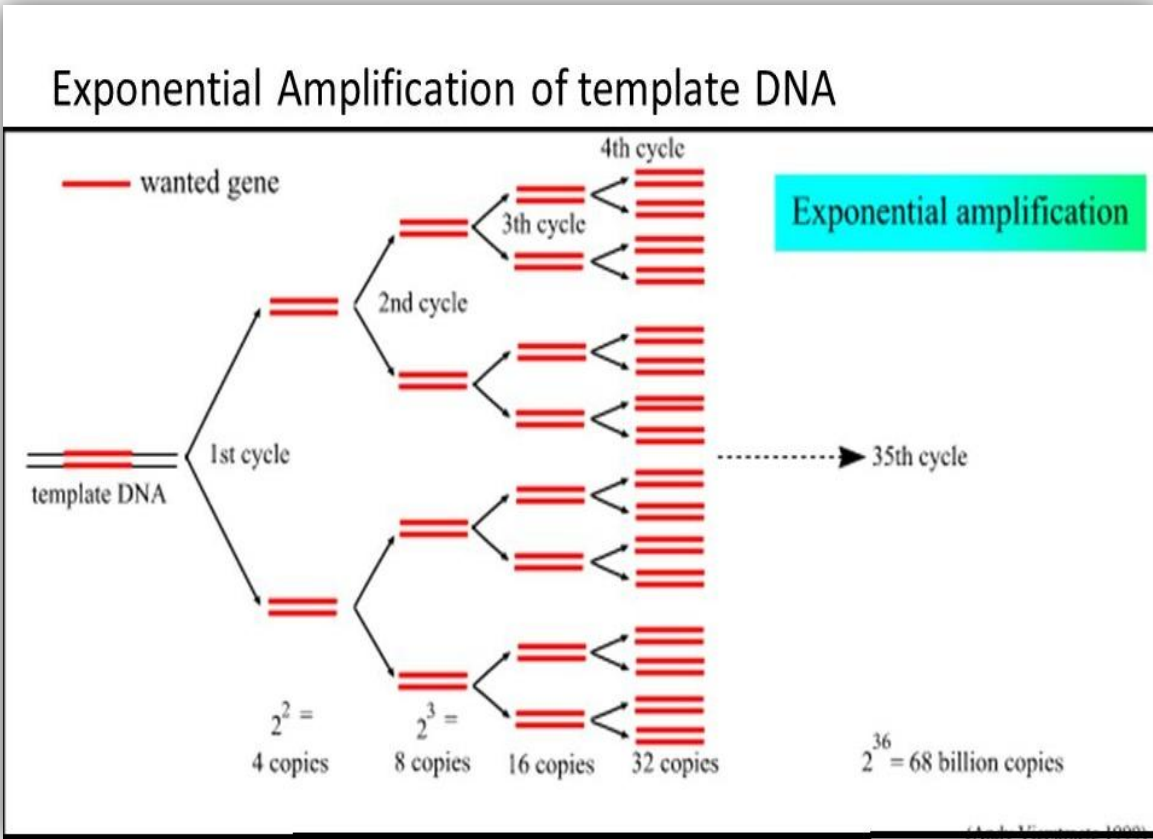
Τα στάδια της αντίδρασης είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 13):

1. Αρχική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA σε θερμοκρασία $94-95^{\circ}\text{C}$ και ενεργοποίηση του ενζύμου (Initial Denaturation).
2. Αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας DNA σε θερμοκρασία 94°C για 30 sec έως 1 min (Denaturation).
3. Υβριδισμός εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες DNA. Καθώς ψύχεται το δείγμα στους $54-60^{\circ}\text{C}$ παρεμβάλλονται μεταξύ των οι εκκινητές. (Annealing).
4. Αύξηση της θερμοκρασίας στους $68-72^{\circ}\text{C}$, σύνθεση της αλυσίδας και επιμήκυνση των υβριδοποιημένων εκκινητών από την πολυμεράση (Elongation/Extension).



Εικόνα 13: Πρώτος κύκλος PCR

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους. Σε κάθε κύκλο ο αριθμός των αντιγράφων του επιλεγμένου γονιδίου διπλασιάζεται (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR

Στο τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C επί 5-10 min για την τελική επιμήκυνση της αλυσίδας (Πίνακας 3).

ΣΤΑΔΙΑ PCR		ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
ΣΤΑΔΙΑ 2-4 x 35	1. Αρχική Αποδιάταξη	94-95 °C	30 sec-5 min
	2. Αποδιάταξη	94 °C	30 sec-1 min
	3. Υβριδισμός εκκινητών	54-60 °C	20 sec-1 min
	4. Επιμήκυνση	68-72 °C	1 min
	5. Τελική επιμήκυνση	68-72 °C	5-10 min

Πίνακας 3: Πρόγραμμα της αντίδρασης PCR στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή. Ο χρόνος και η θερμοκρασία διαφοροποιούνται ανάλογα με την Ταq πολυμεράση που χρησιμοποιείται.

Η Taq DNA πολυμεράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), από τις θερμές πηγές στο εθνικό πάρκο Yellowstone των ΗΠΑ. Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστη θερμοκρασία δράσης, τους 72 °C. Η πολυμεράση συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA στην κατεύθυνση 5' προς 3', χρειάζεται σαν συμπράγοντα ιόντα Mg^{2+} , μπορεί να επεκτείνει μόνο ένα δίκλωνο τμήμα DNA με σημείο εκκίνησης τον εκκινητή και εισάγει dNTP's χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Το γενετικό υλικό αντιγράφεται με εξαιρετική πιστότητα και με ταχύτητα των 1000 bp ανά λεπτό.

Οι εκκινητές είναι συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς τα άκρα της αλληλουχίας του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Η ποσοστιαία σύστασή τους σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης (GC content) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%
2. Το μήκος τους να κυμαίνεται μεταξύ 18-25 βάσεις.
3. Να μην έχουν συμπληρωματικότητα στα 3', 5' άκρα τους αλλά και μεταξύ τους ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διμερών εκκινητών (Primer-Dimer formation).
4. Η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m , melting temperature) που εξαρτάται από το μέγεθος και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας των εκκινητών, δεν πρέπει να έχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο ζεύγος των εκκινητών. Ένας εμπειρικός τύπος για τον υπολογισμό της T_m είναι: $T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$. Το ζεύγος εκκινητών υβριδίζεται με την συμπληρωματική αλληλουχία DNA, που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την T_m . Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού προσδιορίζεται πειραματικά με σημείο εκκίνησης 3-5 °C χαμηλότερα από την T_m .

Στο διαδύκτιο υπάρχουν προγράμματα βιοπληροφορικής για την σχεδίαση των εκκινητών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) και σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για τα γονίδια *HESX1*, *LHX3* και *LHX4* που παρουσιάζονται στους πίνακες 4-6.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Tm	ANNEALING	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
HESX1_x1F	5’-GGT GAA CTG CAG GAA GAT CC-3’	62 °C	59 °C	423 bp
HESX1_x1R	5’-CAC TCC AGT CTT GGC AAC AA-3’	60 °C		
HESX1_x2-4F	5’-TAA CGG GGT GCA ATT CTC TT -3’	58 °C	56 °C	1060 bp
HESX1_x2-4R	5’-TGC CCA AAT ATG TAC CAT GC -3’	58 °C		
HESX1_x2-4seqF	5’-CTC ACT TTG GTA TCT CAG TT-3’	56 °C		
HESX1_x2-4seqR	5’-TTG GCA ATT AAT CTG GAT GC-3’	56 °C		

Πίνακας 4: Γονίδιο HESX1: Οι αλληλουχίες των εκκινήτών, η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm), η θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing) και το μέγεθος προϊόντος PCR.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Tm	ANNEALING	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
LHX3_x1F	5’-AAC CCA GCC AGG GAG GGA -3’	60 °C	60 °C	439 bp
LHX3_x1R	5’-ACT TTC TTT GCC TGG CCG C-3’	60 °C		
LHX3_x2F	5’-GGT GGC TTC ACT GCC TCC T-3’	62 °C	58 °C	310 bp
LHX3_x2R	5’-CTT GGT GAT TGT GAG GGG AG-3’	62 °C		
LHX3_x3F	5’-CTCGGGGCGAAATGAGCCT -3’	62 °C	57 °C	353 bp
LHX3_x3R	5’-GGA GAG AAT TTC CCC GGA C -3’	60 °C		
LHX3_x4-5F	5’-GCC TTC CGA GAA GCC TGT G -3’	62 °C	54 °C	642 bp
LHX3_x4-5R	5’-CTA ACT CCA TGG GAA ATT CAG A -3’	62 °C		
LHX3_x6F	5’-TAG AAG GGG CCT GTT ATG AC -3’	60 °C	55 °C	647 bp
LHX3_x6R	5’-CCC ACT TCC TCG GAA ACC-3’	58 °C		

Πίνακας 5. Γονίδιο LHX3: Οι αλληλουχίες των εκκινήτών, η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm), η θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing) και το μέγεθος προϊόντος PCR.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	Tm	ANNEALING	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
LHX4_x1F	5'-GGC CTG CTT GGG GTT TTA ATT-3'	62 °C	58 °C	312 bp
LHX4_x1R	5'- CCC TGT GAC CGC CTC TGC-3'	62 °C		
LHX4_x2F	5'-TCT GTT TCC ACC ATC AGC AG-3'	60 °C	55 °C	450 bp
LHX4_x2R	5'-GTGATC AGA AGG GGG ACC T-3'	60 °C		
LHX4_x3F	5'-CGG TAA GCT CTG GGT GAC T-3'	60 °C	55 °C	461 bp
LHX4_x3R	5'-GCA TGA GTA GGG CTC TGA G-3'	60 °C		
LHX4_x4F	5'-CAG GCT TAG GTG CAG AAA GG-3'	62 °C	57 °C	403 bp
LHX4_x4R	5'-TGG GCC TCA GAA CTC TGT CT-3'	62 °C		
LHX4_x5F	5'-GCT CCA TTC AGG CTT CAG TC-3'	62 °C	57 °C	406 bp
LHX4_x5R	5'-AGG AAA AGC CTG TGT TCA GGA-3'	62 °C		
LHX4_x6F	5'-GCA TCT TTC CTG GTC ATG TG-3'	60 °C	55 °C	617 bp
LHX4_x6R	5'-CGG AGG ACT TCC ATT GAA AAT-3'	60 °C		

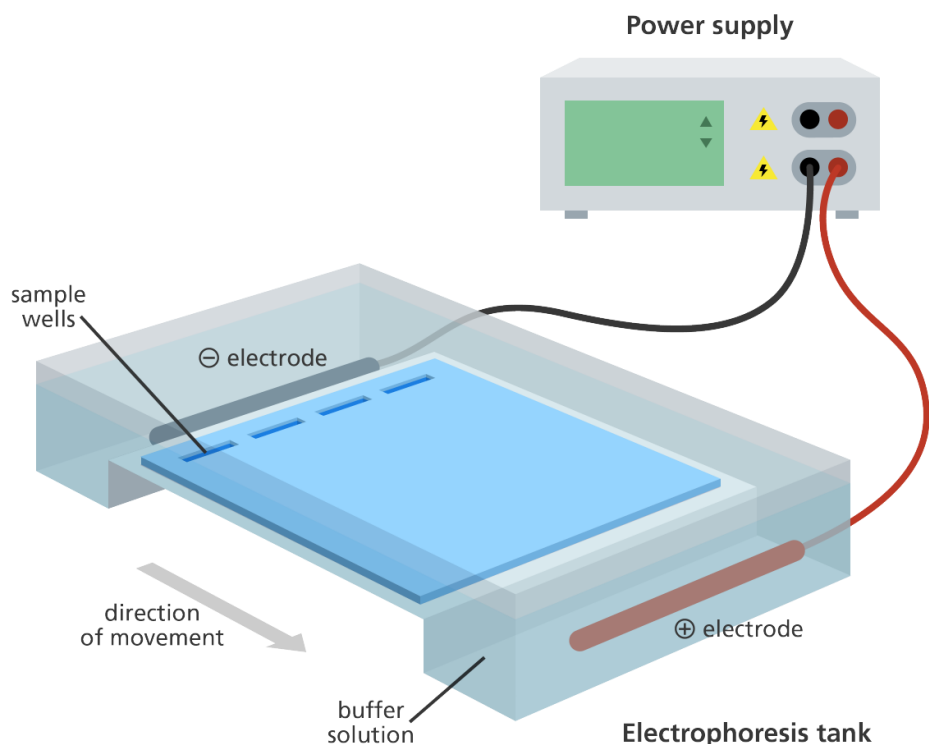
Πίνακας 6: Γονίδιο LHX4: Οι αλληλουχίες των εκκινήτων, η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm), η θερμοκρασία υβριδισμού (Annealing) και το μέγεθος προϊόντος PCR.

4.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση ως τεχνική διαχωρισμού μακρομοριακών ουσιών έγινε γνωστή από τον Arne Tiselius το 1937. Η τεχνική αυτή αποτέλεσε σημαντικό εργαλείο στη χημική ανάλυση και την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων. Ο Tiselius τιμήθηκε με βραβείο Nobel χημείας το 1948 .

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα μορίων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδατικά διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο (Εικόνα 15). Δεδομένου ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο κατευθύνεται προς τον θετικό πόλο της συσκευής με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού του βάρους. Τα δείγματα συγκρίνονται με μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους (π.χ.100 bp DNA Ladder) που ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφορητική συσκευή

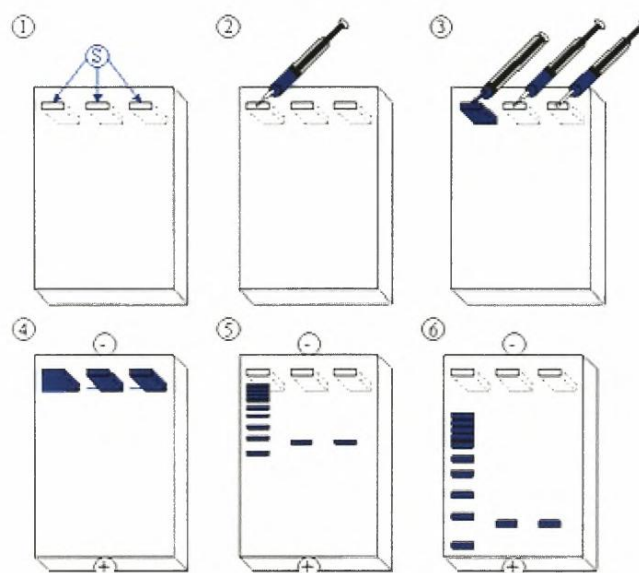
Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2% και διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2% που παρασκευάστηκε μετά από διάλυση 2.4 g αγαρόζης σε 120 ml διαλύματος 1xTBE (89 mM Tris HCL, 89 mM βορικό οξύ, 2.5 μM EDTA) πάνω σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης επηρεάζεται από την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές (D-galactose και L-galactopyranose) που απομονώνεται από φύκη (red algae).

Το TBE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και για τη διατήρηση του pH σε μια σχετικά σταθερή τιμή.

Στο διάλυμα αγαρόζης 2% προστίθενται 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου 1%, το οποίο παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και φθορίζει κατά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBrDNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου EtBr.

Στις θέσεις-οπές του πηκτώματος ηλεκτροφορούνται 5 μl προϊόντος PCR με 0.5 μl χρωστικής (Εικόνα 16).

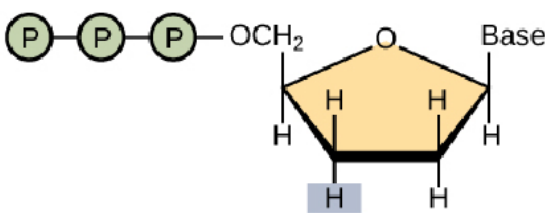


Εικόνα 16: Πήκτη αγαρόζης

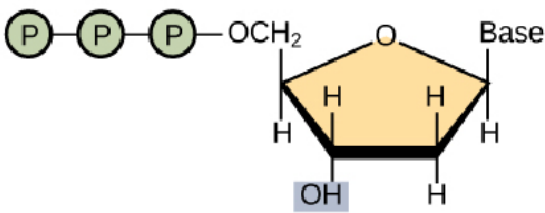
4.2.4 Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger

Η μέθοδος αλληλούχισης ανακαλύφθηκε το 1977 από τον Βρετανό βιοχημικό Frederick Sanger (1918-2013), ο οποίος τιμήθηκε δύο φορές με βραβείο Nobel χημείας. Το 1958 «για τις εργασίες επί της δομής των πρωτεϊνών και ιδίως της ινσουλίνης» και το 1980 μαζί με τους Αμερικανούς Walter Gilbert και Paul Berg «για τις συνεισφορές τους στον προσδιορισμό των αλληλουχιών των βάσεων στα νουκλεϊκά οξέα».

Η ενζυμική αυτή μέθοδος απαιτεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο (template) για τη σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA *in vitro*. Η σύνθεση καταλύεται από την DNA πολυμεράση I (*E.coli*) με σημείο εκκίνησης μία ολιγονουκλεϊτιδική αλληλουχία τον εκκινητή και παρουσία τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Μαζί με τα τέσσερα dNTP's προστίθενται και μία μικρή ποσότητα (φθοριοσημασμένων) διδεοξυνουκλεοτιδίων, ddNTP's. Τα ddNTP's είναι χημικά ανάλογα των 4 νουκλεοτιδίων (ddA, ddC, ddG, ddT), δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα της δεοξυριβόζης, η οποία απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η προσθήκη της επόμενης συμπληρωματικής βάσης και η επιμήκυνση της αλυσίδας DNA (Εικόνα 18). Τα ddNTP's είναι επισημασμένα με φθορίζουσες ομάδες και καθένα εκπέμπει διαφορετικού μήκους κύματος φθοριόχρωμα. Τα ddNTP's συναγωνίζονται με την περίσσεια των dNTP's και σποραδικά, ενσωματώνονται κατά τύχη, σε έναν αυξανόμενο κλώνο DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συνόλου από DNA θραύσματα διαφορετικού μεγέθους. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή και μετά από πολλούς κύκλους ενίσχυσης έχουμε μόρια DNA με όλα τα πιθανά μήκη.



Dideoxynucleotide (ddNTP)



Deoxynucleotide (dNTP)

Εικόνα 17: Δίδεοξυνουκλεοτίδιο και Δεοξυνουκλεοτίδιο

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το Big Dye Terminator cycle sequencing kit της Applied Biosystems Inc. (Foster City CA). Τα συστατικά και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η “Cycle sequencing” παρουσιάζονται στους πίνακες 7 και 8.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Volume
BD	0,25 µl
5XBuffer	1,75 µl
H ₂ O	7,0 µl
Primer (3,2 µM)	0,5 µl
DNA	0,5 µl
Total Volume	10,0 µl

Πίνακας 7: Συστατικά της αλληλούχησης με την μέθοδο Sanger

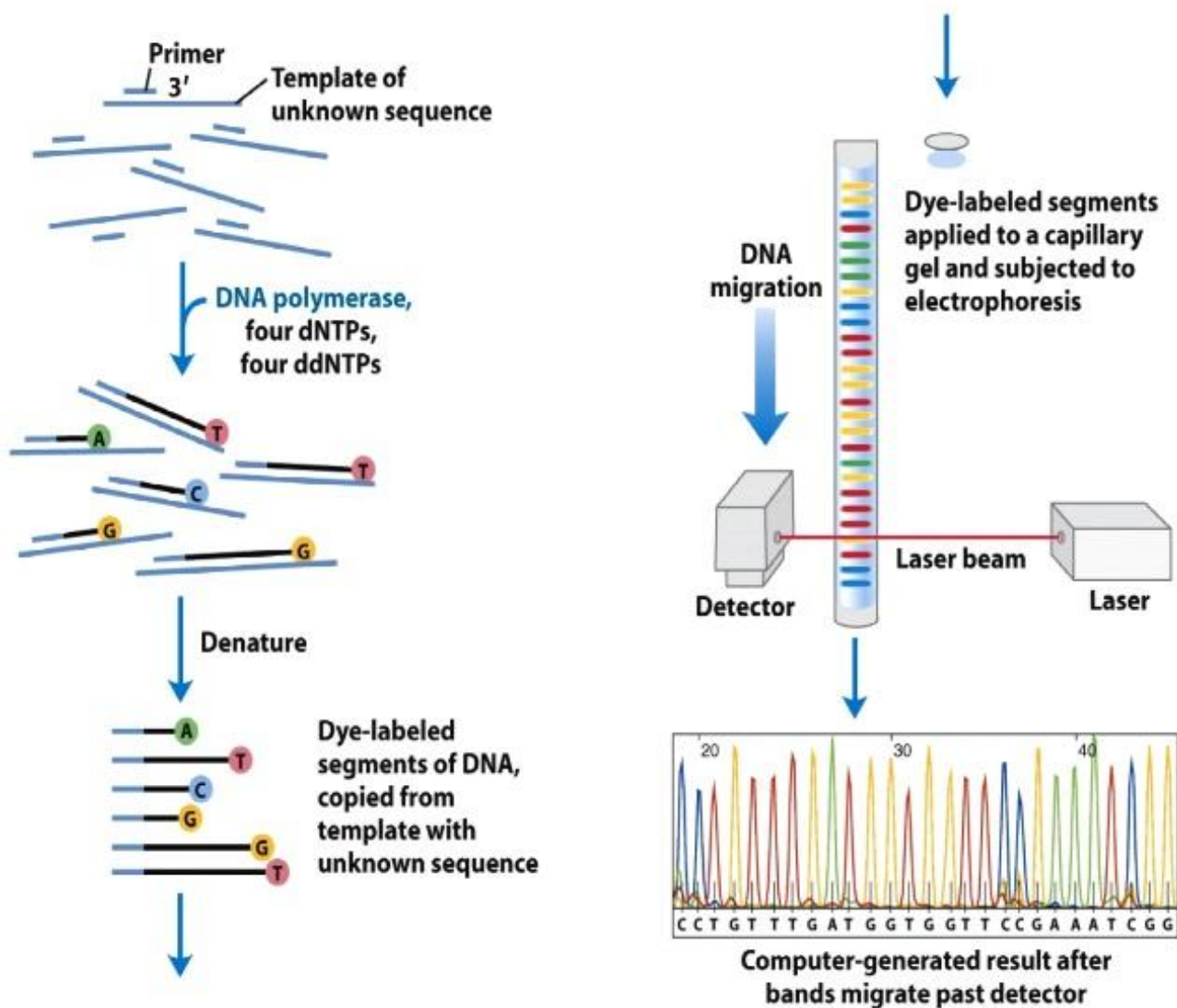
Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	96 °C	1 min	
Αποδιάταξη	96 °C	10 sec	25 Κύκλοι
Υβριδισμός	50 °C	5 sec	
Επέκταση	60 °C	4 min	

Πίνακας 8: Συνθήκες της αντίδρασης αλληλούχησης με τη μέθοδο Sanger

Μετά το τέλος των αντιδράσεων ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης.

1. 2750 µl 100% EtOH (παγωμένη αιθανόλη) αναμιγνύονται με 100 µl NH₄Ac (οξικό αμμώνιο).
2. Προσθήκη 29 µl από το μίγμα σε κάθε αντίδραση.
3. Επώση δειγμάτων 30-40 min στους 4 °C
4. Φυγοκέντρωση 30 λεπτά, 2300g, 4 °C.
5. Φυγοκέντρωση 3 min, 200 g, 4 °C με ανεστραμένο πιάτο για απόχυση του υπερκείμενου.
6. Προσθήκη 50 µl 70% EtOH σε κάθε αντίδραση.
7. Φυγοκέντρωση 3 min, 2300 g, 4 °C.
8. Φυγοκέντρωση 3 min, 200 g, 4 °C με ανεστραμένο πιάτο.
9. Επώση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
10. Προσθήκη 10 µl HIDI σε κάθε αντίδραση. Το φορμαμίδιο (HIDI) διατηρεί το DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες.

Τα προϊόντα που προκύπτουν υποβάλλονται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε αυτόματους αναλυτές αλληλουχίας. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός αναλυτής ABI 3500 sequencer (ABI 3500 Applied Biosystems). Οι ηλεκτροφορητικές συνθήκες σε ειδικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης επιτρέπουν το διαχωρισμό των τμημάτων DNA που διαφέρουν σε μέγεθος ενός νουκλεοτιδίου. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα μόρια διέρχονται από δέσμη laser ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες και να ανιχνευθούν από το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας (που φέρει κάθε μόριο στο 3' άκρο του). Κάθε διαδοχικό μόριο που διέρχεται από το σύστημα ανίχνευσης είναι κατά μία βάση μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Το σήμα μεταφέρεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή που αυτόματα αναλύει και αποθηκεύει τα δεδομένα. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι το χρωματογράφημα το οποίο αποτελείται από τις διαδοχικές βάσεις του τμήματος DNA, οι οποίες εμφανίζονται με τέσσερα διαφορετικά χρώματα. Έχει επικρατήσει το διδεοξυνουκλεοτίδιο A να φθορίζει σε χρώμα πράσινο, το G κίτρινο (μαύρο στο χρωματογράφημα), το C μπλε και το T κόκκινο (Εικόνα 18).



Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης κατά Sanger

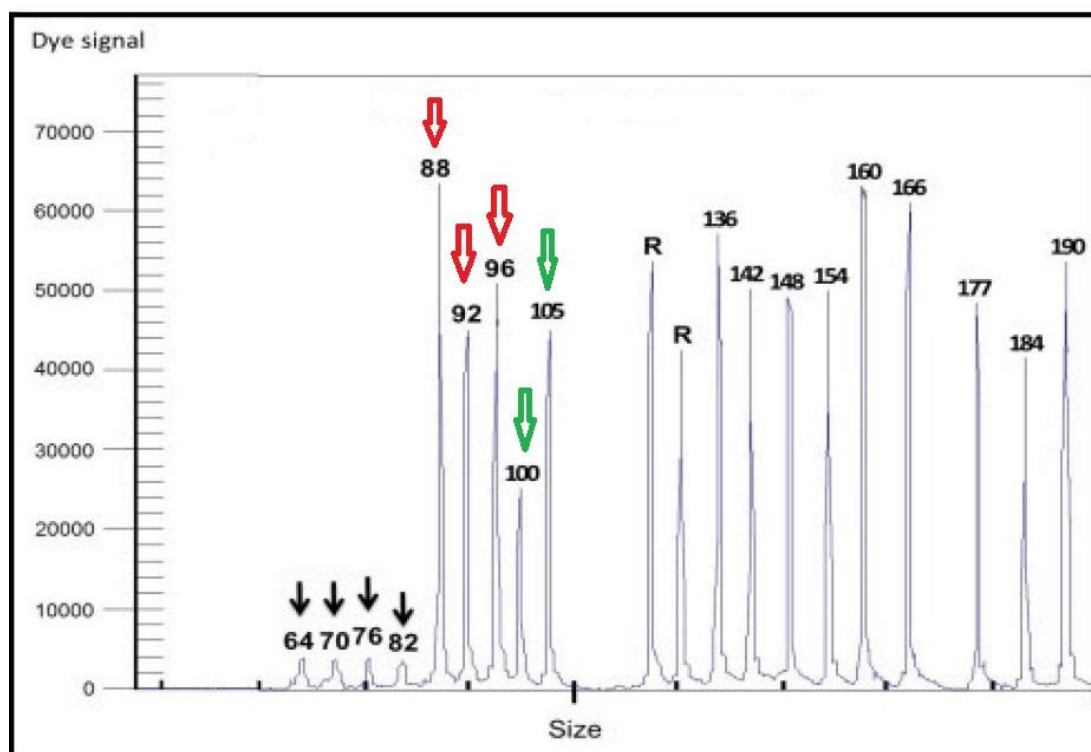
4.2.5 Τεχνική MLPA

Η μοριακή μέθοδος της εξαρτώμενης από την λιγάση πολλαπλής ενίσχυσης υβριδοποιημένων ιχνηθετών (Multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA) περιγράφηκε πρώτη φορά το 2002 από τον Jan Schouten, ιδρυτή της βιοτεχνολογικής εταιρίας MRC-Holland και τους συνεργάτες του (*Nucleic Acid Research* 30, e57). Πρόκειται για μία ημιποσοτική τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων (ελλείψεων και διπλασιασμών) συγκεκριμένων γονιδίων που συνδέονται με ένα νόσημα. Ο προσδιορισμός αυτός προκύπτει μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων των υπό μελέτη ασθενών με τα αποτελέσματα αρνητικών και θετικών δειγμάτων ελέγχου. Το MLPA δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού του αριθμού των αντιγράφων σε έως και 60 διαφορετικές αλληλουχίες ταυτόχρονα σε μία μόνο αντίδραση.

Το SALSA MLPA probemix περιέχει αλληλουχίες αναφοράς ώστε να αξιολογείται η πιστότητα των αποτελεσμάτων ως προς τα πειραματικά σφάλματα. Το μείγμα ιχνηθετών περιέχει τέσσερις αλληλουχίες Q-fragments (DNA Quantity fragments) μεγέθους 64, 70, 76 και 82 nt, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA και της αντίδρασης σύνδεσης των ιχνηθετών. Οι αλληλουχίες Q-fragments είναι ορατές όταν δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα DNA ή απουσιάζει πλήρως καθώς και όταν δεν πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης.

Επιπλέον, στο μείγμα ιχνηθετών περιέχονται τρεις αλληλουχίες D-fragments (DNA denaturation control fragments) μεγέθους 88, 92 και 96 nt, οι οποίες ελέγχουν την επιτυχία αποδιάταξης του DNA. Συγκεκριμένα, όταν οι κορυφές των αλληλουχιών 88 και 96 nt είναι μικρότερες από το 40% της κορυφής της αλληλουχίας των 92 nt αλλά και των υπόλοιπων κορυφών των εξεταζόμενων αλληλουχιών, η αποδιάταξη δεν έχει ολοκληρωθεί πιθανόν λόγω μεγάλου ποσοστού CG νουκλεοτιδίων.

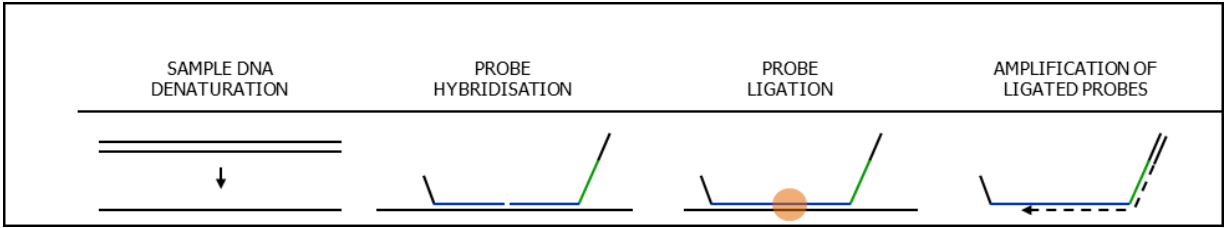
Ένα ακόμη στάδιο ελέγχου αποτελεί η ταυτοποίηση του φύλου του ασθενούς, η οποία πραγματοποιείται με τον πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών 100 και 105 nt των X & Y χρωμοσωμάτων αντίστοιχα (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Τα μαύρα βέλη αντιστοιχούν στα Q-fragments, τα κόκκινα στα D-fragments και τα πράσινα στα X & Y fragments

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το P216-B1 Growth Hormone Deficiency probemix kit, το οποίο περιέχει ιχνηθέτες για τα εξόνια των γονιδίων: *GH1* (πλην των εξονίων 1, 2), *Prop1*, *POU1F1* (πλην του εξονίου 5), *GHRHR* (πλην του

εξονίου 8), *HESX1*, *LHX3* και *LHX4*. Το πρωτόκολλο MLPA που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει 4 στάδια (εικόνα 20) και πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή.



Εικόνα 20: Στάδια MLPA

Το πρώτο στάδιο του MLPA είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, στους 98°C για 10 min. Για το συγκεκριμένο στάδιο απαιτούνται 60-80 ng DNA (1-2 µl). Ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης, το οποίο διαρκεί 3 ώρες στους 60°C προκειμένου όλοι οι ιχνηθέτες να υβριδοποιηθούν στις αλληλουχίες-στόχους τους. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της λιγάσης τα ζεύγη ιχνηθετών συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα τμήμα DNA. Η λιγάση δρα στους 54°C και απενεργοποιείται στους 98°C πριν το στάδιο του PCR. Τέλος, τα τμήματα αυτά πολλαπλασιάζονται με τη μέθοδο του PCR με τη χρήση κοινών φθοριοσημασμένων με FAM εκκινητών που υβριδοποιούνται πάνω σε συμπληρωματικό, γνωστής αλληλουχίας, τμήμα των ιχνηθετών. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες των αντιδράσεων κατά τα στάδια του MLPA παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες, 9 και 10 αντίστοιχα.

ΣΤΑΔΙΑ MLPA	Αντιδραστήρια	Ποσότητα/Αντίδραση
Υβριδοποίηση Ιχνηθετών	Μίγμα Ιχνηθετών	0,375µl
	Ρυθμιστικό Διάλυμα MLPA	0,375µl
	H ₂ O	0,25µl
Σύνδεση Ιχνηθετών	H ₂ O	6,25µl
	Ρυθμιστικό Διάλυμα Λιγάσης 65 A	0,75µl
	Ρυθμιστικό Διάλυμα Λιγάσης 65 B	0,75µl
	Λιγάση 65	0,25µl
PCR	H ₂ O	1,875µl
	Μίγμα Εκκινητών	0,5µl
	Πολυμεράση	0,125µl

Πίνακας 9: Ποσότητα αντιδραστηρίων ανά αντίδραση που χρησιμοποιούνται στα διαφορετικά στάδια του MLPA.

ΣΤΑΔΙΑ MLPA	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αποδιάταξη DNA	98 °C	10 min	
	25 °C	παύση	
Υβριδοποίηση Ιχνηθετών	95 °C	1 min	
	60 °C	3 hours	
	54 °C	παύση	
Σύνδεση Ιχνηθετών	54 °C	15 min	
	98 °C	5 min	
	4 °C	παύση	
	25 °C	παύση	
PCR	95 °C	30 sec	35 Κύκλοι
	60 °C	30 sec	
	72 °C	1 min	
	72 °C	20 min	
	4 °C	παύση	

Πίνακας 10: Συνθήκες αντιδράσεων των σταδίων του MLPA. Στις παύσεις (25 °C, 54 °C) φορτώνονται τα μίγματα αντιδραστηρίων που αντιστοιχούν σε κάθε στάδιο.

Μετά το πέρας του PCR, σε 1,5μl προϊόντος κάθε αντίδρασης προστίθενται 0,25μl χρωστική LIZ GS 500 και 8,25μl φορμαμίδιο Hi-Di. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στον γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, HITACHI, Life Technologies). Η χρωστική LIZ αντιδρά με τις φθοριοσημασμένες αλληλουχίες, καθιστώντας τις ορατές από τον ανιχνευτή κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Ο γενετικός αναλυτής ABI 3500 αποδίδει ένα ηλεκτροφερόγραμμα ανά δείγμα με τα σχετικά ύψη των κορυφών των φθοριοσημασμένων αλληλουχιών (ένταση φθορισμού) που αντικατοπτρίζουν τον σχετικό αριθμό των αντιγράφων των υπό μελέτη περιοχών του DNA. Τα ύψη των κορυφών των υπό μελέτη δειγμάτων συγκρίνονται με τα φυσιολογικά ύψη κορυφών των δειγμάτων αναφοράς προκειμένου να αξιολογηθούν. Η έλλειψη μιας περιοχής εμφανίζεται με μείωση του σχετικού ύψους της κορυφής, ενώ η αύξηση του ύψους της κορυφής παρατηρείται στην περίπτωση διπλασιασμού.

5. Αποτελέσματα

5.1 Αλληλούχιση DNA κατά Sanger

Στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών πραγματοποιήθηκε ανάλυση DNA με αλληλούχιση των γονιδίων *HEXS1*, *LHX3*, *LHX4* σε 6 ασθενείς με πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια (Πίνακας 11).

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΞΟΝΙΟ	ΑΛΛΑΓΗ		ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΟΜΟΖΥΓΩΤΙΑ	ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΛΛΑΓΗΣ
			DNA	Πρωτεΐνη			
3	<i>LHX3</i>	5	c. 775+24C>G			√	Πολυμορφισμός
1, 2, 4, 6	<i>LHX3</i>	5	c. 775+24delC		√		Πολυμορφισμός
2	<i>LHX4</i>	3	c. 385C>T	D128D	√		Πολυμορφισμός
6	<i>LHX4</i>	6	c. 984A>T	N328S	√		Πολυμορφισμός
1, 4	<i>LHX4</i>	6	c. 984A>T	N328S		√	Πολυμορφισμός
5	<i>LHX4</i>	6	c. 1119 G>C	D373E	√		Νέα Παρερμηνεύσιμη αλλαγή

Πίνακας 11: Ασθενείς και αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger

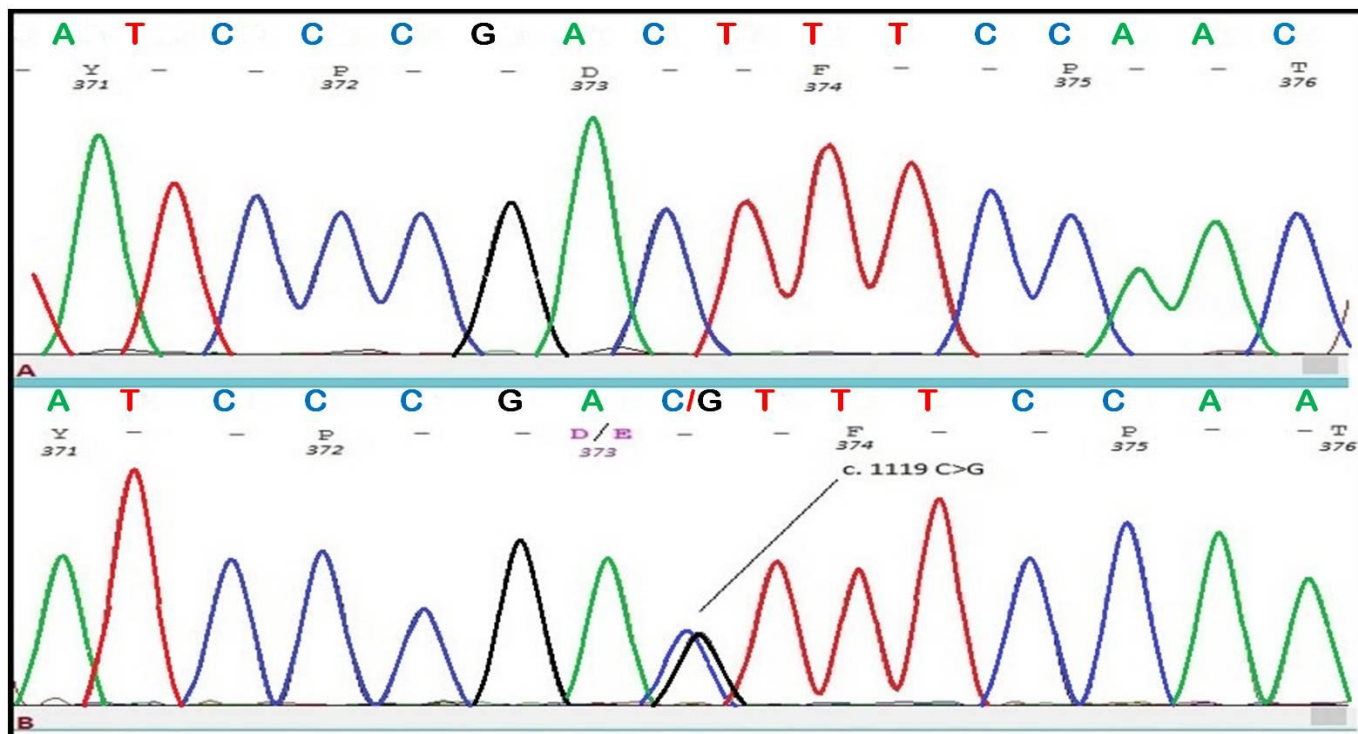
Ανιχνεύθηκε πολυμορφισμός στο εσόνιο 5 του γονιδίου *LHX3* με ομόζυγη σημειακή αλλαγή στη θέση c. 775+24C>G στον ασθενή 3 και ετερόζυγη σημειακή έλλειψη στη θέση c. 775+24delC στους ασθενείς 1,2,4 και 6.

Η DNA αλληλούχιση στο εξόνιο 3 του γονιδίου *LHX4* ανίχνευσε ετερόζυγη σημειακή αλλαγή στη θέση c. 385C>T στον ασθενή 2. Η θυμίνη αντικαθιστά την κυτοσίνη (GAC>GAT) δεν αλλάζει το ασπαρτικό οξύ (Asp) σε άλλο αμινοξύ και χαρακτηρίζεται συνώνυμη αλλαγή.

Ανιχνεύθηκε σημειακή αλλαγή στη θέση c. 984A>T στο εξόνιο 6 του γονιδίου *LHX4* σε ετεροζυγωτία στον ασθενή 6 και σε ομοζυγωτία στους ασθενείς 1 και 4. Η αλλαγή αυτή (AAT>AGT) αντικαθιστά την ασπαργινίνη (Asn) με σερίνη (Ser). Χαρακτηρίζεται πολυμορφισμός με βάση την in-silico ανάλυση με λογισμικό Mutation Taster και PolyPhen-2.

Στο εξόνιο 6 του γονιδίου *LHX4* του ασθενή 5 ανιχνεύθηκε παρερμηνεύσιμη αλλαγή στη θέση c. 1119G>C (D373E). Η αλλαγή της γουανίνης σε κυτοσίνη (GAC>GAG) οδηγεί σε αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος (Asp) με γλουταμινικό

οξύ (Glu). Με βάση την *in silico* ανάλυση με τα λογισμικά Mutation Taster, PolyPhen-2, Panther Classification System και Align GVGD χαρακτηρίζεται ως πιθανώς επιβλαβής αλλαγή (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Ηλεκτροχρωματογράφημα, μέρος της αλληλουχίας του εξονίου 6 του γονιδίου *LHX4*. A: Φυσιολογικό, B: Ετερόζυγη αλλαγή στη θέση c. 1119 C>G, p.D373E

Με το Panther Classification System υπολογίστηκε η χρονική διάρκεια που είναι συντηρημένο το ασπαρτικό οξύ στη θέση 373 της πρωτεΐνης *LHX4*, σε 842 εκατομμύρια χρόνια (εικόνα 22).

LHX4 gene

N - terminus LIM LIM Homeodomain C - terminus	
Species	Amino acids: 361-390
HOMO SAPIENS:	SDISTGSSVGYPDFPTSPGSWLDEMDHPPF
CHIMPANZEE:	SDISTGSSVGYPDFPTSPGSWLDEMDHPPF
GORILLA:	SDISTGSSVGYPDFPTSPGSWLDEMDHPPF
MOUSE:	SDLSTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
ZEBRAFISH:	SDLSTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHSGQF
ELEPHANT:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
COW:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
DOG:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
CAT:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
DOLPHIN:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
HORSE:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
PIG:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
SQUIRREL:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPAF
SHEEP	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
PANDA:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDEMDHPPF
TURKEY:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDMMDHPPF
CHICKEN:	SDISTGSSVGYPDFPTSPASWLDMMDHPPF
HUMAN LHX3:	SDLSTGSSVGYPDFPASPASWLDEVDAHQF
PATIENT 5:	SDISTGSSVGYPDFPTSPGSWLDEMDHPPF

Εικόνα 22: Πεπτιδική σύνθεση του γονιδίου LHX4 (αμινοξέα 361-390) στα διάφορα είδη και στον ασθενή 5, σε στοίχιση.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επαναλήφθηκε στον ασθενή με διαφορετική Taq DNA πολυμεράση ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η αλλαγή δεν οφείλεται σε λάθος της πολυμεράσης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Hot Star Taq Master Mix plus και το Accuprime Taq DNA Polymerase. Μετά την αλληλούχιση κατά Sanger στους γονείς του ασθενή διαπιστώθηκε ότι η αλλαγή κληρονομήθηκε από τον πατέρα.

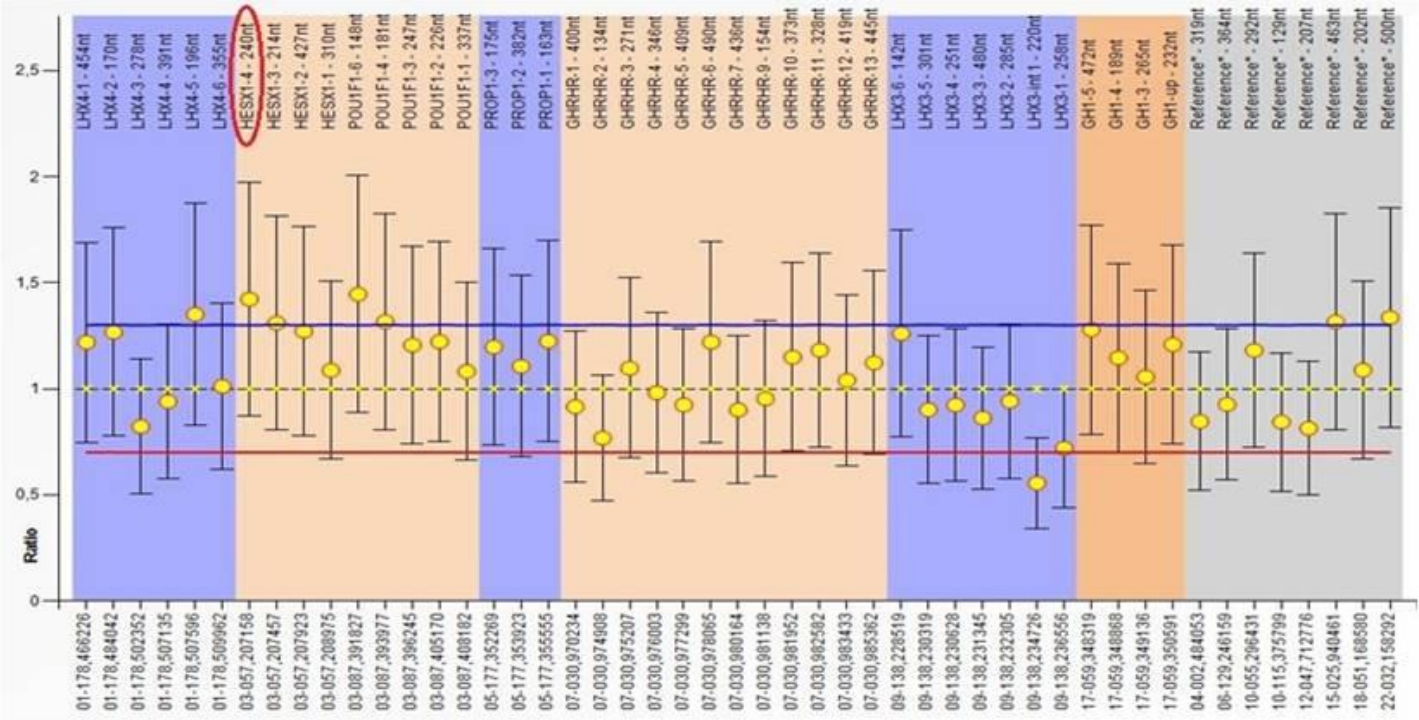
5.2 Μέθοδος MLPA

Με την μέθοδο του MLPA εξετάστηκαν 5 ασθενείς (1,2,3,4,6), στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στα γονίδια HESX1, LHX3 και LHX4 με την αλληλούχιση κατά Sanger. Ο ασθενής 5, στον οποίο βρέθηκε η σημειακή αλλαγή στο γονίδιο LHX4 δεν έχει συμπεριληφθεί.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Coffalyzer (v.140721.1958). Η ένταση φθορισμού των υπό μελέτη αλληλουχιών μέσω του προγράμματος Coffalyzer αποδίδεται σε ηλεκτροφερογράφημα

και σε τιμές. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αναφοράς έχουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων στα γονίδια που μελετώνται και οι αναμενόμενες τιμές τους είναι κοντά στο 1. Στα υπό μελέτη δείγματα οι τιμές <0.7 και 0 υποδηλώνουν ετερόζυγη και ομόζυγη έλλειψη αντίστοιχα, ενώ τιμές >1.3 υποδηλώνουν διπλασιασμό.

Στους υπό εξέταση ασθενείς 1, 3, 4 και 6 δεν ανιχνεύθηκε αλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων *GH1*, *PROP1*, *POUF1*, *GHRHR*, *HESX1*, *LHX3* και *LHX4* που μελετήθηκαν. Ωστόσο, ο ασθενής 2 παρουσίαζε διπλασιασμό με τιμές 1.41, 1.42 και 1.45 στο εξόνιο 4 του γονιδίου *HEXS1* και τις 3 φορές που επαναλήφθηκε η μέθοδος (Εικόνα 24).



Εικόνα 23: Απεικόνιση των σημασμένων αλληλουχιών του ασθενή 2. Με μπλε (0,7) και κόκκινες (1,3) γραμμές καθορίζονται τα φυσιολογικά όρια τιμών. Σε κόκκινο κύκλο είναι η διπλασιασμένη αλληλουχία, η οποία ανιχνεύθηκε και στα 3 ανεξάρτητα πειράματα MLPA που υποβλήθηκε ο ασθενής.

5.3 Αδύναμα Σημεία

Είναι γνωστό ότι το ένα τρίτο περίπου του ανθρώπινου γονιδιώματος εντοπίζεται σε περιοχές οι οποίες είναι πλούσιες σε δινουκλετίδια Κυτοσίνης Γουανίνης (CpG dinucleotides >60%) (Frey et. al. 2008). Ο πολλαπλασιασμός των περιοχών αυτών με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι συχνά δύσκολος λόγω του σχηματισμού δευτεροταγών ενδομοριακών δομών. Οι μονόκλωνες (αποδιατεταγμένες) αλυσίδες σχηματίζουν δομές στελέχους-βρόχου σε σχήμα φουρκέτας κατά τους πρώτους κύκλους ενίσχυσης της PCR με αποτέλεσμα να μην αντιγράφονται οι βρόγχοι από την *Taq* πολυμεράση. Έτσι παράγονται βραχύτερα προϊόντα PCR από τα οποία λείπει η αλληλουχία του βρόχου. (McDowell et. al, 1998; Musso et. Al., 2006). Επιπλέον είναι πιθανό να υβριδιστούν οι εκκινητές με

αλληλουχίες μικρότερης ποσοστιαίας σύστασης σε βάσεις Γουανίνης Κυτοσίνης παράγοντας μη ειδικά μακρύτερα προϊόντα PCR (Frey et. al. 2008).

Το γονίδιο LHX3 αποτελείται κατά 70% από αζωτούχες βάσεις Γουανίνης Κυτοσίνης ενώ στα εξόνια 4-5 το ποσοστό αυτό πλησιάζει το 74% (475 βάσεις GC σε σύνολο 643 βάσεων), γεγονός το οποίο έκανε δύσκολη τον επιτυχή πολλαπλασιασμό τους.

Μετά από διάφορες δοκιμασίες με διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας, ενζύμου, συγκεντρώσεων MgCl₂ και εκκινητών) ο πολλαπλασιασμός των εξονίων 4-5 του γονιδίου επιτεύχθηκε σε τέσσερεις από τους έξι ασθενείς της παρούσας εργασίας.

Λόγω των παραπάνω, τα εξόνια 4-5 παρουσίασαν δυσκολία πολλαπλασιασμού τους με PCR. Για τον πολλαπλασιασμό των εξονίων 4-5 του γονιδίου LHX3 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πολυμεράσες:

ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΕΣ
Hot Star Taq Master Mix plus
AccuPrime Taq DNA Polymerase
One Taq DNA Polymerase
Hot Star Taq plus Qiagen
AccuPrime Polymerase High Fidelity
Invitrogen Tag DNA Polymerase recombinant
Q5 High Fidelity Taq DNA Polymerase

6. Συζήτηση – Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν έξι ασθενείς με ΠΥΑ για την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *HESX1*, *LHX3* και *LHX4*. Οι ασθενείς αυτοί είχαν διερευνηθεί για μεταλλάξεις του γονιδίου *PROP1*, με αρνητικά αποτελέσματα στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η υποφυσιακή ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από την αδυναμία παραγωγής μίας ή περισσοτέρων υποφυσιακών ορμονών και τα αίτιά της είναι ποικίλα: τραύματα, διηθητικές (σαρκοείδωση, αιμοχρωμάτωση, ιστιοκυττάρωση X) και χωροκατακτητικές βλάβες (αδενώματα, καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι), ιατρογενή αίτια (ακτινοβολία, χειρουργική εξαίρεση), αγγειακά (αιμορραγία, ισχαιμία), ανοσολογικά (λεμφοκυτταρική, κοκκιωματώδης και ξανθωματώδης υποφυσίτιδα), ανωμαλίες της ανάπτυξης και συγγενή αίτια. Οι περιπτώσεις με μεμονωμένη ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης (IGHD, Isolated Growth Hormone Deficiency) και με κατά μέσο όρο 5.4 έτη παρακολούθησης από τη διάγνωση τους, εξελίσσονται σε ποσοστό 45% σε πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια (Fang et al., 2016; Otto et al., 2015) και η ΠΥΑ είναι πιθανότερο να εμφανιστεί στις περιπτώσεις με σοβαρή ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης (Fang et al., 2016). Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη σημασία της μακρόχρονης παρακολούθησης των ασθενών με IGHD προς αποφυγή ή έγκαιρη αντιμετώπιση των συμπτωμάτων τα οποία οφείλονται στην ανεπάρκεια των υποφυσιακών ορμονών.

Η συχνότητά της πολλαπλής υποφυσιακής ανεπάρκειας υπολογίζεται σε 1:8000 γεννήσεις παγκοσμίως (Fang et al., 2016; Haim-Pinhas, Kauli, Lilos, & Laron, 2016) εκ των οποίων το 10-20% των περιπτώσεων είναι οικογενείς (familial) και οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, απαραίτητους για την πολύπλοκη διαδικασία της εμβρυογένεσης του εγκεφάλου, της υπόφυσης και του υποθαλάμου (Haim-Pinhas et al., 2016). Σε αντίθεση με τις σποραδικές περιπτώσεις, οι οικογενείς χαρακτηρίζονται από ιστορικό προσβολής και άλλου μέλους της οικογένειας του ασθενούς και είναι πιο πιθανό σε σύγκριση με τις σποραδικές περιπτώσεις, να οφείλονται σε γενετικά αίτια, χωρίς να αποκλείεται και η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (Fang et al., 2016).

Το 1992 αναγνωρίστηκε ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει γονίδια της εμβρυογένεσης της υπόφυσης, ο *POU1F1* (Giordano, 2016) και στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν τα γονίδια *PROP1*, *LHX3*, *LHX4* και *HESX1*. Οι οικογενείς και οι σποραδικές περιπτώσεις ΠΥΑ που οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4* και *HESX1* αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό ποσοστό (των περιπτώσεων) του συνολικού αριθμού των ασθενών με ΠΥΑ. Μεταλλάξεις του γονιδίου *PROP1* ευθύνονται για το 11.2% των περιπτώσεων, ακολουθούν τα γονίδια *POU1F1* (2.8%), *LHX4* (0.9%), *LHX3* (0.5%), *HESX1* (0,4%) σε μικρότερα ποσοστά,

ενώ στο υπόλοιπο 84.2% οικογενούς και σποραδικής εμφάνισης ΠΥΑ, τα αίτια παραμένουν αδιευκρίνιστα (Fang et al., 2016). Τα υπόλοιπα γονίδια τα οποία έχουν σχετιστεί με ΠΥΑ, δεν έχουν ελεγχθεί ακόμη συστηματικά, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο υπολογισμός της συχνότητάς τους, η οποία όμως αναμένεται να είναι πολύ χαμηλή (Fang et al., 2016).

Οι μέχρι τώρα δημοσιευμένες εργασίες έχουν κυρίως εστιάσει στα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του θύλακα του Rathke και σε μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι καθιστούν ενεργή την έκφραση γονιδίων αναγκαίων για την διαφοροποίηση των υποφυσιακών κυτταρικών τύπων (Mortensen, MacDonald, Ghosh, & Camper, 2011). Υπάρχουν όμως πολλές άλλες κρίσιμες διαδικασίες κατά την οργανογένεση της υπόφυσης συμπεριλαμβανομένης και της μετανάστευσης των κυττάρων από τον πολλαπλασιασμό στη διαφοροποίηση, την εγκατάσταση επαφών μεταξύ των κυττάρων ούτως ώστε να διαμορφωθεί ένα λειτουργικό πολυκυτταρικό δίκτυο, την ανάπτυξη της αγγείωσης συμπεριλαμβανομένου του υποθαλαμοϋποφυσιακού πυλαίου συστήματος και την διασύνδεση με υποθαλαμικούς νευρώνες οι οποίοι ρυθμίζουν την ορμονική έκκριση (Mortensen et al., 2011).

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν έξι ασθενείς με ΠΥΑ για την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *HESX1*, *LHX3* και *LHX4*. Οι ασθενείς αυτοί είχαν διερευνηθεί για μεταλλάξεις του γονιδίου *PROP1*, με αρνητικά αποτελέσματα στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις των γονιδίων *HESX1*, *LHX3* στους 6 ασθενείς που διερευνήθηκαν. Στους τρεις από τους έξι ασθενείς (50%) ανιχνεύθηκε ο πολυμορφισμός Asn328Ser στο γονίδιο *LHX4*. Οι δύο ασθενείς είναι ομοζυγώτες και ο τρίτος ετεροζυγώτης. Η υψηλή συχνότητα του πολυμορφισμού N328S έχει αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς, κατά τους οποίους >50% των ασθενών τους με ΠΥΑ φέρει την αλλαγή (Castinetti et. Al. 2008; Mello et. al. 2007).

Σε έναν ασθενή ανιχνεύθηκε η παρερμηνεύσιμη αλλαγή σε ετεροζυγωτία στη θέση c. 1119G>C (p.D373E) του γονιδίου *LHX4*. Ο έλεγχος των γονέων του με αλληλούχιση κατά Sanger ανέδειξε ότι ο πατέρας του ασθενούς έφερε την αλλαγή σε ετεροζυγωτία χωρίς όμως ο ίδιος να παρουσιάζει παθολογικό φαινότυπο (ύψος πατέρα: 1.76 m). Η αλλαγή στη c. 1119G>C του γονιδίου *LHX4* είναι νέα αλλαγή και δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία (εικόνα 22, πίνακας 1). Ο ασθενής μας παρουσιάζει ανεπάρκεια της GH, ACTH και TSH όπως και το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *LHX4* (εικόνα 8). Όσον αφορά τον απεικονιστικό έλεγχο, ο ασθενής εμφανίζει υποπλασία της αδενοϋπόφυσης και του μίσχου της υπόφυσης όπως και το 70% και 20% αντίστοιχα των ασθενών με μεταλλάξεις στο

γονίδιο *LHX4* (εικόνα 9), δεν εμφανίζει όμως έκτοπη νευροϋπόφυση η οποία είναι ένα συχνότατο εύρημα σε αυτούς τους ασθενείς (73.3%).

Οι ασθενείς με ετερόζυγες αλλαγές του γονιδίου *LHX4* διαγιγνώσκονται σε βρεφική ή παιδική ηλικία. Το χαμηλό ανάστημα, ο μικροπείσμος (Castinetti et al., 2008; Cohen et al., 2016; Gregory et al., 2015; T. Tajima et al., 2010; Takagi et al., 2012) ή κρυπορχία (Gregory et al., 2015; Takagi et al., 2012) στα αγόρια είναι από τα πρώτα κλινικά ευρήματα που θέτουν την υποψία της υποφυσιακής ανεπάρκειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι μικροί ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα όπως υπογλυκαιμικά επεισόδια (Dateki et al., 2010; Filges et al., 2012; Gregory et al., 2015; Pfaeffle et al., 2008; T. Tajima et al., 2010) ή αναπνευστική δυσχέρεια (Dateki et al., 2010; Gregory et al., 2015) που θέτουν σε άμεσο κίνδυνο τη ζωή τους. Η συμβολή της μαγνητικής τομογραφίας είναι μεγάλη αφού αποκαλύπτει τις δομικές ανωμαλίες της υπόφυσης και ως επί το πλείστον την υποπλασία/απλασία της αδενοϋπόφυσης (πίνακας_1).

Ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η αυτοσωμική επικρατής κληρονομηση εμφανίζεται με ποικίλη διεισδυτικότητα και εκφραστικότητα (Castinetti et al., 2008; Cohen et al., 2016; Fang et al., 2016; Machinis et al., 2001). Η εκφραστικότητα ενός χαρακτηριστικού αναφέρεται στη φύση και την βαρύτητα του φαινοτύπου (βαθμός έκφρασης φαινοτύπου-ασθένεια) (Gelehrter & Collins, 1996). Σε ορισμένες περιπτώσεις ο γονέας του ασθενούς ή και μέλη της οικογένειάς τους, που φέρουν την ίδια αλλαγή στο *LHX4* γονίδιο, μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλό ανάστημα (GHD) δίχως όμως άλλη ορμονική ανεπάρκεια ή χαρακτηριστικά σημεία του φαινοτύπου (Fang et al., 2016). Σε άλλες περιπτώσεις εμφανίζεται προοδευτικά (σταδιακά) η ανεπάρκεια μιας υποφυσιακής ορμόνης στους ασθενείς ή τα μέλη της οικογένειας που φέρουν την ίδια αλλαγή στο *LHX4* γονίδιο (Castinetti et al., 2008; Takagi et al., 2012).

Άλλοι συγγραφείς αναφέρονται στην ελαττωμένη διεισδυτικότητα, η οποία αφορά την κλινική έκφραση (ασθένεια) ή όχι του παθολογικού γονιδίου *LHX* (Cohen, 2012; Cohen et al., 2016; Fang et al., 2016; Gregory et al., 2015). Μη διεισδυτική ορίζεται η κατάσταση όταν τα άτομα τα οποία φέρουν το παθολογικό γονίδιο δεν εκφράζουν ασθένεια (Fang et al., 2016; Gelehrter & Collins, 1996). Η ελαττωμένη διεισδυτικότητα και η ποικίλη εκφραστικότητα μεταξύ των ατόμων που έχουν τον ίδιο γονότυπο πιθανόν να οφείλεται σε περιβαλλοντικές επιρροές (Castinetti et al., 2008; Cohen, 2012; Gelehrter & Collins, 1996), στη δράση άλλων γονιδίων (Cohen, 2012; Gelehrter & Collins, 1996; Takagi et al., 2012) τροποποιητικά, επιστατικά) ή σε επιγενετικούς μηχανισμούς (Castinetti et al., 2008; Cohen, 2012; Machinis et al., 2001).

Μέχρι σήμερα μόνο μία μετάλλαξη του γονιδίου *LHX4* στη θέση p.T126M έχει ανιχνευτεί σε ομοζυγωτία σε δύο αδέρφια τα οποία κατέληξαν την πρώτη εβδομάδα της ζωής τους (Gregory et al., 2015). Το γεγονός αυτό σε συνδιασμό με το ότι οι διαγονιδιακοί knock out μύες (*lhx4^{-/-}*) πεθαίνουν κατά τη γέννηση, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ομόζυγη μετάλλαξη του γονιδίου *LHX4* είναι ασύμβατη με τη ζωή

(Castinetti et al., 2008; Machinis et al., 2001; Rochette et al., 2015). Θηλυκό έμβρυο από την Κίνα παρουσίασε ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (Fetal Growth Restriction, FGR). Μετά από λήψη και βιοψία της τροφοβλάστης και αλληλούχιση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος του (WES), ανιχνεύτηκε μητρικής προέλευσης παρερμηνεύσιμη αλλαγή στη θέση p.A324T και μια δεύτερη, πατρικής προέλευσης, σε μη κωδικοποιούσα περιοχή (c.70G>A) (Lu et al., 2017). Είναι η πρώτη περίπτωση συμβουλευτικής γενετικής σε γονείς οι οποίοι (τελικά) αποφάσισαν να διακόψουν την κύηση.

Λειτουργικές μελέτες (functional studies) του γονιδίου *LHX4* με ετερόζυγες μεταλλάξεις έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός που προκαλεί την ΠΥΑ είναι η απλοανεπάρκεια (haploinsufficiency), δηλαδή η μειωμένη παραγωγή πρωτεΐνης από το λειτουργικό αλληλόμορφο και όχι η επικρατούσα αρνητική δράση (dominant-negative effect), κατά την οποία η μη λειτουργική πρωτεΐνη που παράγεται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο εμποδίζει την λειτουργία της πρωτεΐνης που παράγεται από το φυσιολογικό (Castinetti et al., 2008; Cohen et al., 2016; Gregory et al., 2015; Machinis et al., 2001; Toshihiro Tajima et al., 2013). Λειτουργικές μελέτες του γονιδίου *LHX4* με μεταλλάξεις στις LIM περιοχές, οι οποίες θεωρούνται σημαντικές για την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών συνενεργοποιητών, έχουν δείξει ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη *LHX4* είναι μη λειτουργική (T. Tajima et al., 2010; Takagi et al., 2012). Η ομοιοπεριοχή (homeodomain) της πρωτεΐνης *LHX4* αποτελείται από τρεις α-έλικες και αλληλεπιδρά με το DNA. Η 2^η και η 3^η έλικα έχουν χαρακτηριστική δομή helix-turn-helix. Συγκεκριμένα η πρόσδεση στο DNA πραγματοποιείται κυρίως χάρη στην πεπτιδική σύνθεση (αμινοξέα 204-215) η οποία κωδικοποιεί την 3^η έλικα (Rochette et al., 2015). Οι Μεταλλάξεις σε αυτήν την περιοχή (A210P _ (Pfaeffle et al., 2008), W204X_ (Rochette et al., 2015) και Thr99fs_ (Castinetti et al., 2008)), όπως φάνηκε από λειτουργικές μελέτες (functional studies), οδηγούν σε ελαττωματική πρόσδεση στο DNA (Rochette et al., 2015).

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν λειτουργικές μελέτες του γονιδίου. Η αλλαγή (D373E) που φέρει ο ασθενής μας δεν βρίσκεται στις περιοχές LIM ή Homeodomain αλλά στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminus) της πρωτεΐνης *LHX4*, μία περιοχή η οποία είναι επίσης πολύ σημαντική και αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι είναι συντηρημένη (εικόνα 22).

Η μοριακή διάγνωση και παράλληλα η ανεύρεση της γενετικής αιτιολογίας στους ασθενείς με ΠΥΑ δίνει τη δυνατότητα για την έγκαιρη διάγνωση (πχ ορμονικές ανεπάρκειες που εγκαθίστανται σταδιακά), την ορθή αντιμετώπισή τους, τον προγεννητικό έλεγχο και τη συμβουλευτική γενετική (Lu et al., 2017).

Ο έλεγχος όλων των πιθανών γονιδίων τα οποία συνδέονται με την ΠΥΑ είναι χρονοβόρος και κοστοβόρος όταν εφαρμόζεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία (PCR και Sanger sequencing).

Την αδυναμία των μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενων τεχνικών Μοριακής Βιολογίας να ανιχνεύσουν την υποκείμενη μοριακή διαταραχή και την σχέση γονότυπου-φαινότυπου, έρχεται να καλύψει η τεχνική της αλληλούχισης επόμενης γενεάς (Next Generation Sequencing - NGS). Η τεχνική αυτή, η οποία εφαρμόζεται από το 2005 τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς, επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών γονιδίων σε περισσότερους του ενός ασθενείς, σε μία και μόνο δοκιμασία.

Στην τεχνολογία αυτή στηρίζονται, η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing - WGS) και η αλληλούχιση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing - WES). Η μεθοδολογία του NGS μπορεί να εφαρμοστεί και σε μικρότερο αριθμό γονιδίων στόχων (targeted gene panels), τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με ένα συγκεκριμένο νόσημα όπως για παράδειγμα την ΠΥΑ.

Η μεθοδολογία NGS σε ομάδα γονιδίων στόχων (10-100 γονίδια) ταυτόχρονα σε πολλούς ασθενείς παρέχει γρήγορα αποτελέσματα, είναι απλούστερη από αυτή των WGS και WES ως προς την πειραματική διαδικασία και την ανάλυση του αποτελέσματος, ενώ έχει καλή σχέση κόστους-απόδοσης συγκρινόμενη με τις συμβατικές μεθόδους αλληλούχισης. Η ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών γονιδίων στόχων με την μεθοδολογία της αλληλούχισης επόμενης γενιάς μπορεί να προσφέρει μοριακή διάγνωση σε ασθενείς με ΠΥΑ και αδιευκρίνιστα γενετικά αίτια στο άμεσο μέλλον.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι η ανεύρεση της γενετικής αιτιολογίας στους ασθενείς μας ήταν εφικτή (πραγματοποιήθηκε) σε έναν από τους έξι ασθενείς μας (16.7%). Στην πλειοψηφία των ασθενών με ΠΥΑ δεν ανευρίσκεται η αιτία της νόσου τους και αυτό οφείλεται πιθανόν σε δράση άλλων γονιδίων, σε περιβαλλοντικές επιρροές, σε επιγενετικούς μηχανισμούς ή ενδεχομένως και σε ανοσολογικούς μηχανισμούς. Η έρευνα των τελευταίων 20 περίπου ετών στο πεδίο αυτό βοήθησε σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της εμβρυογένεσης της υπόφυσης, με αποτέλεσμα την πιο στοχευμένη (μοριακή) διερεύνηση των ασθενών. Επιπλέον η χρήση της τεχνολογίας NGS σήμερα επιτρέπει, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, την εξαγωγή γρήγορων αποτελεσμάτων σε μεγάλο αριθμό γονιδίων και ασθενών.

7. Βιβλιογραφία

- Amar, A. P., & Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics of North America*, 14(1), 11–23, v.
- Andersen, B., & Rosenfeld, M. G. (2001). POU Domain Factors in the Neuroendocrine System: Lessons from Developmental Biology Provide Insights into Human Disease¹. *Endocrine Reviews*, 22(1), 2–35.
- Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V, Heinzl, T., Gloss, B., Scully, K. M., ... Rosenfeld, M. G. (1995). P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2720–4.
- Bancalari, R. E., Gregory, L. C., McCabe, M. J., & Dattani, M. T. (2012). Pituitary Gland Development: An Update. In *Endocrine development* (Vol. 23, pp. 1–15).
- Capra, V., Severino, M., Rossi, A., Nozza, P., Doneda, C., Perri, K., ... Di Battista, E. (2014). Pituitary deficiency and congenital infiltrating lipomatosis of the face in a girl with deletion of chromosome 1q24.3q31.1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(2), 495–499.
- Castinetti, F., Reynaud, R., Quantien, M.-H., Jullien, N., Marquant, E., Rochette, C., ... Brue, T. (2015). Combined pituitary hormone deficiency: current and future status. *Journal of Endocrinological Investigation*, 38(1), 1–12.
- Castinetti, F., Saveanu, A., Reynaud, R., Quantien, M. H., Buffin, A., Brauner, R., ... Brue, T. (2008). A Novel Dysfunctional LHX4 Mutation with High Phenotypical Variability in Patients with Hypopituitarism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2790–2799.
- Cohen, L. E. (2012). Genetic disorders of the pituitary. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 19(1), 33–39.
- Cohen, L. E., Maghnie, M., Collot, N., Leger, J., Dastot, F., Polak, M., ... Legendre, M. (2016). Contribution of LHX4 mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, jc.2016–3158.
- Couly, G. F., & Le Douarin, N. M. (1987). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Developmental Biology*, 120(1), 198–214.
- Dasen, J., & Rosenfeld, M. (1999). Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 669–677.
- Dasen, J. S., & Rosenfeld, M. G. (2001). Signaling and Transcriptional Mechanisms in Pituitary Development. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 327–355.

- Dateki, S., Kosaka, K., Hasegawa, K., Tanaka, H., Azuma, N., Yokoya, S., ... Ogata, T. (2010). Heterozygous Orthodontic Homeobox 2 Mutations Are Associated with Variable Pituitary Phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 756–764.
- Dattani, M. T. (2005). Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clinical Endocrinology*, 63(2), 121–130.
- Dattani, M. T., Martinez-Barbera, J.-P., Thomas, P. Q., Brickman, J. M., Gupta, R., Mårtensson, I.-L., ... Robinson, I. C. A. F. (1998). Mutations in the homeobox gene *HESX1/Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics*, 19(2), 125–133.
- Davis, S. W., & Camper, S. A. (2007). Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. *Developmental Biology*, 305(1), 145–160.
- Davis, S. W., Ellsworth, B. S., Pérez Millan, M. I., Gergics, P., Schade, V., Foyouzi, N., ... Camper, S. A. (2013). Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Current Topics in Developmental Biology*, 106, 1–47.
- Davis, S. W., Mortensen, A. H., & Camper, S. A. (2011). Birthdating studies reshape models for pituitary gland cell specification. *Developmental Biology*, 352(2), 215–227.
- Davis, S. W., Potok, M. A., Brinkmeier, M. L., Carninci, P., Lyons, R. H., MacDonald, J. W., ... Camper, S. A. (2009). Genetics, Gene Expression and Bioinformatics of the Pituitary Gland. *Hormone Research in Paediatrics*, 71(2), 101–115.
- de Moraes, D. C., Vaisman, M., Conceicao, F. L., & Ortiga-Carvalho, T. M. (2012). Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. *Journal of Endocrinology*, 215(2), 239–245.
- Fang, Q., George, A. S., Brinkmeier, M. L., Mortensen, A. H., Gergics, P., Cheung, L. Y. M., ... Camper, S. A. (2016). Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. *Endocrine Reviews*, 37(6), 636–675.
- Fauci A.S., Kasper D.L., Braunwald E., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L., Loscalzo J., (2008). Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition
- Filges, I., Bischof-Renner, A., Rothlisberger, B., Potthoff, C., Glanzmann, R., Gunthard, J., Szinnai, G. (2012). Panhypopituitarism Presenting as Life-Threatening Heart Failure Caused by an Inherited Microdeletion in 1q25 Including LHX4. *PEDIATRICS*, 129(2), e529–e534.
- Frey U.H., Bachmann H.S., Peters J., Siffert W. (2008) PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR', *Nature Protocols*, 3(8):1312-7
- Gelehrter, T., & Collins, F. (1996). *Αρχές Ιατρικής Γενετικής*. (Χ. Γιαπιζάκης & Ε. Κιτράκη, Eds.).
- Giordano, M. (2016). Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone

- deficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(6), 679–691.
- Gleiberman, A. S., Fedtsova, N. G., & Rosenfeld, M. G. (1999). Tissue Interactions in the Induction of Anterior Pituitary: Role of the Ventral Diencephalon, Mesenchyme, and Notochord. *Developmental Biology*, 213(2), 340–353.
- Greenspan, F. S., & Gardner, D. G. (2010). *Βασική & κλινική ενδοκρινολογία*. (Ε. Διαμαντή-Κανδαράκη, Μ. Κουτσιλιέρης, Χ. Λιάπη, & Μ. Βενετίκου, Eds.). Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
- Gregory, L. C., Humayun, K. N., Turton, J. P. G., McCabe, M. J., Rhodes, S. J., & Dattani, M. T. (2015). Novel Lethal Form of Congenital Hypopituitarism Associated With the First Recessive LHX4 Mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), 2158–2164.
- Haim-Pinhas, H., Kauli, R., Lilos, P., & Laron, Z. (2016). Growth, development, puberty and adult height of patients with congenital multiple pituitary hormone deficiencies. *Growth Hormone & IGF Research*, 27, 46–52.
- Hermesz, E., Mackem, S., & Mahon, K. A. (1996). Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 122(1), 41–52.
- Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG. (1990). The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1 -Pit-1 interactions. *Cell* 611021-1033
- Kehrer, M., Liehr, T., Benkert, T., Singer, S., Grasshoff, U., Schaeferhoff, K., ... Tzschach, A. (2015). Interstitial duplication of chromosome region 1q25.1q25.3: Report of a patient with mild cognitive deficits, tall stature and facial dysmorphisms. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(3), 653–656.
- Kelberman, D., & Dattani, M. T. (2007). Hypothalamic and pituitary development: novel insights into the aetiology. *European Journal of Endocrinology*, 157(suppl_1), S3–S14.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., ... Dattani, M. T. (2006). Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 116(9), 2442–55.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R., Robinson, I. C. A. F., & Dattani, M. T. (2009). Genetic Regulation of Pituitary Gland Development in Human and Mouse. *Endocrine Reviews*, 30(7), 790–829.
- Krström, B., Zdunek, A.-M., Rydh, A., Jonsson, H., Sehlin, P., & Escher, S. A. (2009).

A Novel Mutation in the LIM Homeobox 3 Gene Is Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency, Hearing Impairment, and Vertebral Malformations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(4), 1154–1161.

- Li, H., Witte, D. P., Branford, W. W., Aronow, B. J., Weinstein, M., Kaur, S., ... Whitsett, J. A. (1994). Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *The EMBO Journal*, 13(12), 2876–85.
- Li, S., Crenshaw, E. B., Rawson, E. J., Simmons, D. M., Swanson, L. W., & Rosenfeld, M. G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*, 347(6293), 528–533.
- Lu, Y.-C., Huang, L.-Y., Yan, J.-M., Zhang, Y., & Li, D.-Z. (2017). Whole-exome sequencing identifies compound heterozygous LHX4 mutations in a fetus with early-onset growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 211, 225–227.
- Machinis, K., Pantel, J., Netchine, I., Léger, J., Camand, O. J., Sobrier, M. L., ... Amselem, S. (2001). Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 961–8.
- Mangalam, H. J., Albert, V. R., Ingraham, H. A., Kapiloff, M., Wilson, L., Nelson, C., ... Rosenfeld, M. G. (1989). A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes & Development*, 3(7), 946–58.
- McCabe, M. J., & Dattani, M. T. (2014). Genetic aspects of hypothalamic and pituitary gland development. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 124, pp. 3–15).
- McCabe, M. J., Gaston-Massuet, C., Tziaferi, V., Gregory, L. C., Alatzoglou, K. S., Signore, M., ... Dattani, M. T. (2011). Novel FGF8 Mutations Associated with Recessive Holoprosencephaly, Craniofacial Defects, and Hypothalamo-Pituitary Dysfunction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), E1709–E1718.
- McDowell D.G., Burns N.A., & Parkes H.C., (1998) Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR, *Nucleic Acids Research*, 26(14): 3340–3347.
- MelloM. E., Marui S., Carvalho L. R., Arnhold I. J. P., Leite C. C., Mendonça B. B. & Knoepfelmacher M. (2007) Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe, *Clinical Endocrinology*, 66(1), 95–102.
- Mollard, P., Hodson, D. J., Lafont, C., Rizzoti, K., & Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(6), 261–269.

- Mortensen, A. H., MacDonald, J. W., Ghosh, D., & Camper, S. A. (2011). Candidate genes for panhypopituitarism identified by gene expression profiling. *Physiological Genomics*, 43(19), 1105–1116.
- Musso M., Bocciardi R., Parodi S., Ravazzolo R., & Ceccherini I. (2006), Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(5): 544–550.
- Musumeci, G., Castorina, S., Castrogiovanni, P., Loreto, C., Leonardi, R., Aiello, F. C., ... Imbesi, R. (2015). A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochemica*, 117(4-5), 355–366.
- Netchine, I., Sobrier, M.-L., Krude, H., Schnabel, D., Maghnie, M., Marcos, E., ... Grüters, A. (2000). Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genetics*, 25(2), 182–186.
- Otto, A. P., França, M. M., Correa, F. A., Costalonga, E. F., Leite, C. C., Mendonca, B. B., ... Jorge, A. A. L. (2015). Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: a long term follow-up of patients from a single center. *Pituitary*, 18(4), 561–567.
- Pfaeffle, R. W., Hunter, C. S., Savage, J. J., Duran-Prado, M., Mullen, R. D., Neeb, Z. P., ... Rhodes, S. J. (2008). Three Novel Missense Mutations within the LHX4 Gene Are Associated with Variable Pituitary Hormone Deficiencies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(3), 1062–1071.
- Pfaeffle, R. W., Savage, J. J., Hunter, C. S., Palme, C., Ahlmann, M., Kumar, P., ... Rhodes, S. J. (2007). Four Novel Mutations of the LHX3 Gene Cause Combined Pituitary Hormone Deficiencies with or without Limited Neck Rotation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(5), 1909–1919.
- Prince, K. L., Walvoord, E. C., & Rhodes, S. J. (2011). The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12), 727–737.
- Rahilly, R. O., & Muller, F. (2000). *Εμβρυολογία και Τερατολογία του ανθρώπου*. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
- Ramzan, K., Bin-Abbas, B., Al-Jomaa, L., Allam, R., Al-Owain, M., & Imtiaz, F. (2017). Two novel LHX3 mutations in patients with combined pituitary hormone deficiency including cervical rigidity and sensorineural hearing loss. *BMC Endocrine Disorders*, 17(1), 17.
- Rochette, C., Jullien, N., Saveanu, A., Caldagues, E., Bergada, I., Braslavsky, D., ... Castinetti, F. (2015). Identifying the Deleterious Effect of Rare LHX4 Allelic Variants, a Challenging Issue. *PLOS ONE*, 10(5), e0126648.
- Romero, C. J., Pine-Twaddell, E., & Radovick, S. (2011). Novel mutations associated

- with combined pituitary hormone deficiency. *Journal of Molecular Endocrinology*, 46(3), R93–R102. <http://doi.org/10.1530/JME-10-0133>
- Rosenfeld, M. G. (1991). POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes & Development*, 5(6), 897–907.
- Schoenmakers, N., Alatzoglou, K. S., Chatterjee, V. K., & Dattani, M. T. (2015). Recent advances in central congenital hypothyroidism. *The Journal of Endocrinology*, 227(3), R51–71.
- Scully, K. M., & Rosenfeld, M. G. (2002). Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis. *Science*, 295(5563), 2231–2235.
- Sheng, H. Z., Moriyama, K., Yamashita, T., Li, H., Potter, S. S., Mahon, K. A., & Westphal, H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5344), 1809–12.
- Sloop, K. W., Meier, B. C., Bridwell, J. L., Parker, G. E., Schiller, A. M., & Rhodes, S. J. (1999). Differential Activation of Pituitary Hormone Genes by Human Lhx3 Isoforms with Distinct DNA Binding Properties. *Molecular Endocrinology*, 13(12), 2212–2225.
- Sornson, M. W., Wu, W., Dasen, J. S., Flynn, S. E., Norman, D. J., O’Connell, S. M., ... Rosenfeld, M. G. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384(6607), 327–333.
- Tajima, T., Hattori, T., Nakajima, T., Okuhara, K., Tsubaki, J., & Fujieda, K. (2007). A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica. *Endocrine Journal*, 54(4), 637–41.
- Tajima, T., Ishizu, K., & Nakamura, A. (2013). Molecular and Clinical Findings in Patients with LHX4 and OTX2 Mutations. *Clinical Pediatric Endocrinology : Case Reports and Clinical Investigations : Official Journal of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology*, 22(2), 15–23.
- Tajima, T., Yorifuji, T., Ishizu, K., & Fujieda, K. (2010). A Novel Mutation (V101A) of the LHX4 Gene in a Japanese Patient with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 118(07), 405–409.
- Takagi, M., Ishii, T., Inokuchi, M., Amano, N., Narumi, S., Asakura, Y., ... Hasegawa, T. (2012). Gradual Loss of ACTH Due to a Novel Mutation in LHX4: Comprehensive Mutation Screening in Japanese Patients with Congenital Hypopituitarism. *PLoS ONE*, 7(9), e46008.
- Takuma, N., Sheng, H. Z., Furuta, Y., Ward, J. M., Sharma, K., Hogan, B. L., ... Mahon, K. A. (1998). Formation of Rathke’s pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development (Cambridge, England)*, 125(23), 4835–40.
- Tang, K., Bartke, A., Gardiner, C. S., Wagner, T. E., & Yun, J. S. (1993). Gonadotropin

secretion, synthesis, and gene expression in human growth hormone transgenic mice and in Ames dwarf mice. *Endocrinology*, 132(6), 2518–2524.

Tatsumi, K., Miyai, K., Notomi, T., Kaibe, K., Amino, N., Mizuno, Y., & Kohno, H. (1992). Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature Genetics*, 1(1), 56–58.

Treier, M., Gleiberman, A. S., O’Connell, S. M., Szeto, D. P., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Rosenfeld, M. G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes & Development*, 12(11), 1691–704.

Vander, A. J., Sherman, J. H., & Luciano, D. S. (2001). *Human physiology: the mechanisms of body function*. McGraw-Hill.

Voutetakis, A., Argyropoulou, M., Sertedaki, A., Livadas, S., Xekouki, P., Maniati-Christidi, M., Bossis I., Thalassinos N., Patronas N., Dacou-Voutetakis, C. (2004). Pituitary Magnetic Resonance Imaging in 15 Patients with Prop1 Gene Mutations: Pituitary Enlargement May Originate from the Intermediate Lobe. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(5), 2200–2206.

Ward, R. D., Stone, B. M., Raetzman, L. T., & Camper, S. A. (2006). Cell Proliferation and Vascularization in Mouse Models of Pituitary Hormone Deficiency. *Molecular Endocrinology*, 20(6), 1378–1390.

Zhu, X., Gleiberman, A. S., & Rosenfeld, M. G. (2007). Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks. *Physiological Reviews*, 87(3), 933–963.

Μπατρίνος, Μ. (2007). *Σύγχρονη Ενδοκρινολογία Για τον Γενικό Γιατρό*. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Φούντας, Α. (2015). Υποθάλαμος - Υπόφυση. In *Συγχρονο εγχειρίδιο ενδοκρινολογίας* (pp. 28–78). Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.