



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
———ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837———

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΝΟΗΤΙΚΗ
ΥΣΤΕΡΗΣΗ ΝΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ DNA**

Ουρανία- Αλεξάνδρα Π. Κεντέρογλου

Επιβλέπουσα : Έλενα Φρυσίρα, Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής

ΑΘΗΝΑ

Νοέμβριος 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διαγνωστική προσπέλαση ασθενών με Νοητική Υστέρηση με τη χρήση
μικροσυστοιχιών DNA

Ουρανία- Αλεξάνδρα Π. Κεντέρογλου

A.M.: 20160641

Επιβλέπουσα : Έλενα Φρυσίρα, Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
Ιωάννα Traeger- Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής

Νοέμβριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Νοητική Υστέρηση είναι μια αναπτυξιακή διαταραχή με κύριο χαρακτηριστικό τη μειωμένη νοητική λειτουργία και προβλήματα στην προσαρμοστική ικανότητα του ατόμου. Εμφανίζεται πριν την ενηλικίωσή του ατόμου. Λογω της μεγάλης ετερογένειας της διαταραχής αυτής ένα μεγάλο ποσοστό μένει χωρίς κάποια γενετική διάγνωση.

Με τη χρήση της εργαστηριακής τεχνικής μικροσυστοιχιών DNA εξετάστηκαν 100 ασθενείς με νοητική υστέρηση και/ή πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες.

Από τους 100 ασθενείς , στους 48 βρέθηκαν παθολογικές δομικές παραλλαγές που εξηγούν τον φαινότυπο

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ιατρική Γενετική

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: μοριακός καρυότυπος , νοητική υστέρηση

Στους γονείς μου

Πρόδρομο και Ευαγγελία

Στο σύζυγό μου

Νίκο

Στο γιο μου

Οδυσσέα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα πρωταρχικά να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής και πρώην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής , Κα Έλενα Φρυσίρα για την καθοδήγησή της και τις γνώσεις που μου παρείχε.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Κα Μαρία Τζέτη για τα αποτελέσματα που μου παρείχε καθώς και την Καθηγήτρια Γενετικής και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Ιωάννα Traegar- Συνοδινού για τον σεβασμό που αποπνέει.

Τέλος , θα ήθελα να ευχαριστήσω την Παιδιάτρο Ειρήνη Τσούτσου για την πολύτιμη βοήθειά της και την εμπειρία της που μοιράστηκε μαζί μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Ορισμός Νοητικής Υστέρησης
- 1.2Α Ταξινόμηση Νοητικής Υστέρησης
- 1.3Α Αιτίες Νοητικής Υστέρησης
- 1.3Β Γενετικά αίτια
- 1.4 Κληρονομικότητα ΝΥ
- 1.5 Διαγνωστική κλινική προσέγγιση ασθενών με ΝΥ
- 1.6 Θεραπευτική προσέγγιση ΝΥ

Κεφάλαιο 2

- 2.1 Ποικιλομορφίες αριθμού αντιγράφων (CNVs)
- 2.2 Μοριακοί μηχανισμοί δημιουργίας CNVs
- 2.3 Τεχνολογία Μικροσυστοιχιών Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού (array-CGH)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός μελέτης
Υλικά και Μέθοδοι

Αποτελέσματα

Συζήτηση

Αναφορές

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 αιτίες ΝΥ και διαγνωστική προσέγγιση

Εικόνα 2.1 Μηχανισμός μη ομόλογων άκρων

Εικόνα 3.1 αυτοματοποιημένο σύστημα QIAGEN BioROBOT M48

Εικόνα 3.2 Εικόνα τύπου .tiff

Εικόν 3.3 CGH analytics

Εικόνα 4.1 σ. Wolf- Hirschhorn

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Προγεννητικά αίτια

Πίνακας 1.2 Περιγεννητικά αίτια

Πίνακας 1.3 Μεταγεννητικά αίτια

Πίνακας 1.4 Γνωστά σύνδρομα μικροελλείμματος

Πίνακας 1.5 Συνοδά Νοσήματα με ΝΥ

Πίνακας 4.1 Κατηγοριοποίηση αποτελεσμάτων

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1

1.1 Ορισμός Νοητικής Υστέρησης

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι ένα πολύπλοκο όργανο, το οποίο επιτελεί πολλές και σύνθετες λειτουργίες. Η ανάπτυξη του είναι μια πολύ καλά ρυθμισμένη διαδικασία και κατά συνέπεια οποιαδήποτε αλλαγή μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών. (1) Σε αυτή την κατηγορία διαταραχών ανήκουν η νοητική υστέρηση, οι διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού, το σύνδρομο υπερκινητικότητας και ελλειμματικής προσοχής, τα οποία αφορούν το 3-4 % του παγκόσμιου πληθυσμού. (2) Η Νοητική Υστέρηση θεωρείται μια γενικευμένη αναπτυξιακή διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από περιορισμούς στην *νοητική λειτουργία* καθώς και στην *προσαρμοστική συμπεριφορά* του ατόμου. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, έχει βρεθεί ότι αφορά το 1-3% των νεογέννητων του γενικού πληθυσμού παγκοσμίως. (3, 4, 5, 6). Στις ανεπτυγμένες χώρες η ΝΥ αντιπροσωπεύει την πιο συχνή αιτία σοβαρού προβλήματος στα παιδιά προσχολικής ηλικίας και έναν από τους κύριους λόγους παραπομπής στην ειδικότητα της γενετικής. Η Νοητική Υστέρηση εμφανίζεται μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με άλλες συγγενείς ανωμαλίες (όπως η μικροκεφαλία), νευρολογικές διαταραχές (όπως η επιληψία), ή διαταραχές συμπεριφοράς (όπως η διαταραχή στο φάσμα του αυτισμού. (7) Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπεία και ο τρόπος που αντιμετωπίζονται οι ασθενείς είναι υποστηρικτικός κυρίως από ειδικούς παιδαγωγούς (8).

Ο επίσημος ορισμός από την Αμερικάνικη Ένωση Ψυχικής Ανεπάρκειας (AAMD) αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1983 με τον όρο «mental retardation», δηλαδή «Πνευματική Καθυστέρηση». Ο όρος αυτός έχει πλέον αντικατασταθεί από τον όρο «intellectual disability», σε μετάφραση Νοητική Υστέρηση (ΝΥ), λόγω ότι ο προηγούμενος απεφάνθη ότι ήταν υποτιμητικό για τα άτομα αυτά (9). Νοητική Υστέρηση λοιπόν, θεωρούμε μια χρόνια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από νοητική λειτουργία σημαντικά κάτω του μέσου όρου, συνυπάρχει με προβλήματα στην προσαρμοστική συμπεριφορά του ατόμου και εκδηλώνεται κατά την αναπτυξιακή περίοδο. Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό του AAMD ένα άτομο για να θεωρηθεί ότι πάσχει από Νοητική Υστέρηση πρέπει να πληροί 3 κριτήρια:

1. Νοητική ανάπτυξη κάτω του μέσου όρου, την ικανότητα να μαθαίνει, τη λογική του καθώς και την ικανότητα του να λύνει προβλήματα. Με άλλα λόγια, ως νοητική λειτουργία ορίζεται γενικευμένη ικανότητα ενός ατόμου να αντιλαμβάνεται την πραγματικότητα και να αλληλεπιδρά με αυτή. (Lee et al., 2019) Για να μετρήσουμε τη νοητική ανάπτυξη ενός ατόμου χρησιμοποιούμε το νοητικό πηλίκο (IQ score), το οποίο κυμαίνεται περίπου στο 100 στο μέσο πληθυσμό, ενώ για να θεωρηθεί ότι υπάρχει Νοητική Υστέρηση πρέπει να είναι κάτω από 70. (6)
2. Υπάρχουν δυσκολίες στην προσαρμοστική συμπεριφορά του ατόμου. Ως προσαρμοστική συμπεριφορά ορίζεται η αποτελεσματικότητα με την οποία ανταποκρίνεται το άτομο στα ορόσημα που αφορούν την προσωπική ανεξαρτησία και την υπευθυνότητα του μέσα στο κοινωνικό σύνολο.
3. Αναπτυξιακή περίοδος θεωρείται από την σύλληψη ενός ατόμου έως και την συμπλήρωση του 18^{ου} έτους ζωής.

Πριν την ηλικία των 5 χρόνων οποιαδήποτε καθυστέρηση σε τουλάχιστον 2 από τα ορόσημα ανάπτυξης ορίζεται σαν γενική αναπτυξιακή καθυστέρηση. Παρόλο που η καθυστέρηση αυτή μπορεί να είναι περιστασιακή, έχει βρεθεί ότι τα 2/3 των παιδιών αυτών μετά την ηλικία των 5 ετών θα φέρουν τη διάγνωση «νοητική υστέρηση». (10). Η κατάλληλη ηλικία για να γίνει το IQ test και να έχουμε μια σαφή εικόνα για τη νοητική κατάσταση του παιδιού είναι τα 7 έτη (11).

1.2Α Ταξινόμηση Νοητικής Υστέρησης

Η ταξινόμηση της Νοητικής Υστέρησης επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση ενός τόσο πολύπλοκου πεδίου λόγω της υψηλής κλινικής και γενετικής ετερογένειας που εμφανίζει. Η πιο κοινά αποδεκτή ταξινόμηση της ΝΥ βασίζεται στην βαρύτητα, την οποία μπορούμε να διαπιστώσουμε πέρα από κλινικά και βάσει του δείκτη νοημοσύνης του ατόμου. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, υπάρχει ένα τεστ μέτρησης της νοημοσύνης, το IQ test και σύμφωνα με το αποτέλεσμα σε αυτό το τεστ μπορούμε να κατατάξουμε τη ΝΥ. Ο πρώτος που σκέφτηκε τη δημιουργία μιας δοκιμασίας, η οποία μπορεί να μετρήσει τη νοημοσύνη ενός ατόμου ήταν ο Α. Binet το 1905 (12). Ο στόχος τους ήταν να επινοήσουν ένα μέτρο σύγκρισης της νοημοσύνης ενός παιδιού με τα αντίστοιχα παιδιά της ηλικίας του και να ορίσουν έτσι τη βιολογική ηλικία του. Το 1912, ο W. Stern εισήγαγε τον όρο Νοητικό Πηλίκο ως **το πηλίκο της νοητικής ηλικίας (NH) δια της χρονολογικής ηλικίας (XH) επί 100.**

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας , Νοητική Υστέρηση υπάρχει όταν το νοητικό πηλίκο είναι μικρότερο από 70 καθώς το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού έχει IQ κοντά στο 100. Οι κατηγορίες της ΝΥ σύμφωνα με το IQ score,όπως περιγράφονται από την 4^η έκδοση του διαγνωστικού εγχειριδίου DSM είναι οι εξής:

- Ήπια ΝΥ (mild) : IQ score 50-70
- Μέτρια ΝΥ (moderate) : IQ score 35-49
- Σοβαρή ΝΥ (severe) : IQ score 20 – 34
- Βαριά ΝΥ (profound) : IQ score <20

Στην οριακή νοημοσύνη, όταν δηλαδή το IQ score είναι από 70 έως 80, μπορεί να μη συνεπάγεται και κοινωνική ανεπάρκεια απλά μια ήπια καθυστέρηση σε σχέση με τις σχολικές επιδόσεις. Οι ήπιες μορφές πολλές φορές μένουν αδιάγνωστες μέχρι την σχολική ηλικία. (10)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως , η ΝΥ αφορά το 1- 3 % του πληθυσμού παγκοσμίως. Σχεδόν τα 2/3 των προσβεβλημένων αυτών ατόμων έχουν βλάβη σε επίπεδο ήπιο έως μέτριο ενώ αντίστοιχα μόνο το 1/3 έχει βλάβη σοβαρή έως βαριά. Όσο πιο σοβαρή είναι η Νοητική Υστέρηση τόσο πιο νωρίς γίνεται η διάγνωση ενώ αντίστοιχα οι ήπιες μορφές της μπορεί να μην διαγνωστούν πριν την έναρξη του σχολείου. Οι άντρες προσβάλλονται σε ποσοστό 1,4: 1 (9) και υπάρχει αντίστροφη σχέση με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση της οικογένειας από την οποία προέρχεται το παιδί. Βέβαια οι παραπάνω παράμετροι φαίνεται ότι παίζουν ρόλο μόνο στην ήπια μορφή ΝΥ, όπου συνήθως δεν υπάρχουν άλλα βιολογικά αίτια. Η ΝΥ μπορεί να συνοδεύει μια ποικιλία νοσηροτήτων, όπως επιληψία, σπασμοί, διαταραχές συμπεριφοράς, ψυχιατρικές ασθένειες και αισθητηριακές διαταραχές (π.χ. απώλεια ακοής/όρασης). (13)

Εκτός από την ταξινόμηση βάσει της βαρύτητας υπάρχει ένας διαχωρισμός της νοητικής υστέρησης σε συνδρομική και μη συνδρομική. Συνδρομική νοητική υστέρηση συμβαίνει όταν εκτός από την ΝΥ συνυπάρχει και ένας ξεκάθαρος κλινικός φαινότυπος (π.χ. τρισωμία 21). Η συνύπαρξη πολλαπλών συγγενών ανωμαλιών ακόμα και χωρίς κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο πάλι μας παραπέμπει σε συνδρομική νοητική υστέρηση. Αντιθέτως, μη συνδρομική ΝΥ ορίζεται όταν αυτό είναι το μόνο ορατό κλινικό χαρακτηριστικό. (13)

1.3A Αιτίες Νοητικής Υστέρησης

Οι αιτιολογικοί παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την Νοητική υστέρηση εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και περιλαμβάνουν πολλούς περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Παρόλο που περισσότερα από 500 γονίδια έχουν βρεθεί ότι είναι υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της ΝΥ, στις περισσότερες περιπτώσεις η αιτία παραμένει άγνωστη. (6, 8). Η ανεύρεση της αιτίας της ΝΥ έχει πολύ μεγάλη σημασία για του εξής λόγους : **α)** αναγνώριση των συσχετιζόμενων κινδύνων για προβλήματα υγείας καθώς και μια μακροπρόθεσμη πρόγνωση (π.χ. ανοσολογική ανεπάρκεια που σχετίζεται με το σύνδρομο μικροελλείμματος 22q11) ή τις γενετικές επιπλοκές για το άτομο που πάσχει και την οικογένειά του (π.χ. Σύνδρομο Ευθραύστου Χ) , **β)** κατανόηση του λόγου που συνέβη αυτό από την οικογένεια και κατάλληλη γενετική συμβουλευτική ώστε να μπορέσουν να προγραμματίσουν μια επόμενη κύηση, (9) . αλλά και **γ)** να αποδεχτούν την πρωτόγνωρη για αυτούς κατάσταση καθώς και τη μη επίρριψη ευθυνών στον εαυτό τους. Τέλος, **δ)** γνωρίζοντας την αιτία που προκάλεσε το πρόβλημα είναι δυνατή η επιλογή της κατάλληλης παρέμβασης, η οποία μπορεί να έχει όσο το δυνατόν καλύτερα αποτελέσματα. Μια ακριβής διάγνωση δίνει τη δυνατότητα στην οικογένεια να έχει πρόσβαση σε κλινικές δοκιμές πιθανής θεραπείας καθώς και να έρθουν σε επαφή με άλλες οικογένειες που αντιμετωπίζουν το ίδιο πρόβλημα. (16, 15,14, 11,)

Με βάση τη χρονολογική σειρά που επήλθε η εγκεφαλική βλάβη, τα αίτια της ΝΥ διακρίνονται σε **A)** προγεννητικά, (**Πίνακας 1.1**) **B)** Περιγεννητικά (**Πίνακας 1.2**) και **Γ)** Μεταγεννητικά (**Πίνακας 1.3**) . Περίπου στο 60 % των περιπτώσεων ΝΥ παραμένει χωρίς κάποια σαφή διάγνωση. Σε αυτά τα άτομα η ανεύρεση της αιτίας είναι μια συνεχιζόμενη διαδικασία, η οποία επωφελείται από την πρόοδο της τεχνολογίας των τεχνικών γενετικού ελέγχου, όπως είναι η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. (9, 17).

Πίνακας 1.1 Προγεννητικά αίτια

- Λοιμώξεις εγκύου (ιλαρά, σύφιλη, τοξοπλάσματος, κυτταρομεγαλοϊός , λιστερίωση, ιός του έρπητα)
- Γενετικά αίτια
 - Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
 - Γνωστά Γενετικά σύνδρομα
 - Σημειακές μεταλλάξεις
- Έκθεση σε τοξίνες και τερατογόνους παράγοντες κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης

- Ακτινοβολία
- Αλκοόλ
- Ναρκωτικές ουσίες
- Συγγενής υποθυρεοειδισμός
- Ενδομήτριες διαταρχές του μεταβολισμού

Πίνακας 1.2 Περιγεννητικά αίτια

- Εγκεφαλική υποξία
- Επιπλοκές από προωρότητα
- Ενδοκρανική αιμορραγία
- Περιγεννητικές λοιμώξεις – μολύνσεις

Πίνακας 1.3 Μεταγεννητικά αίτια

- Επίκτητες κακώσεις εγκεφάλου – τραυματισμοί
- Εγκεφαλικές αιμορραγίες
- Λοιμώξεις ΚΝΣ (μηνιγγιοεγκεφαλίτιδες)
- Σοβαρή υποθρεψία κατά τη βρεφική ηλικία
- Σοβαρά αποστερημένο περιβάλλον (ιδρυματοποίηση, συναισθηματική αποστέρηση)
- Έκθεση σε τοξικούς παράγοντες (μόλυβδος, υδράργυρος)

Πολλές φορές η αιτία που προκαλεί την ΝΥ αποδίδεται σε εγκεφαλική δυσγενεσία , η οποία ανευρίσκεται σε απεικόνιση των νεύρων. Αλλά είναι γενικά αποδεκτό ότι η παραπάνω κατάσταση αποτελεί ευρήματα και όχι την πραγματική αιτία.

1.3B Γενετικά αίτια

Τα προγεννητικά αίτια και ειδικά οι γενετικές μεταλλάξεις αποτελούν περίπου το 25% του συνόλου των αιτιών που έχουν προσδιοριστεί. Οι περισσότερες περιπτώσεις σοβαρής ΝΥ (IQ<50) οφείλονται σε μονογονιδιακές βλάβες.(8) Σε γενικές γραμμές οι γενετικές αιτίες μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες : **A)** χρωμοσωμικές ανωμαλίες ,**B)** μονογονιδιακές ελλείψεις (συμπεριλαμβανομένης και των αυτοσωμικών υπολειπόμενων μεταβολικών διαταραχών) και **Γ)** επιγενετικές διαταραχές /λάθη γονιδιακής αποτύπωσης. Στις μεταβολικές διαταραχές ανήκουν και μια ειδική κατηγορία νοσημάτων που αφορούν ελλείμματα στο μιτοχονδριακό DNA. Στις επιγενετικές διαταραχές μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο επηρεάζουν την δράση και άλλων γονιδίων χωρίς όμως να επιφέρουν αλλαγές στη γονιδιωματική αρχιτεκτονική των γονιδίων αυτών. Η γονιδιακή αποτύπωση είναι ένας διαφορετικός μηχανισμός , ο οποίος αναφέρεται στην επιρροή στην έκφραση των γονιδίων λόγω γονεϊκής προέλευσης.(14).

1.4 Κληρονομικότητα ΝΥ

Η κληρονομικότητα της νοητικής υστέρησης μπορεί να ακολουθεί τον μενδέλειο τρόπο κληρονομικότητας, ο οποίος περιλαμβάνει Χ φυλοσύνδετη, αυτοσωμική επικρατής (κυρίως de novo), αυτοσωμική υπολειπόμενη καθώς και το μη μενδέλειο τρόπο , όπως είναι η γονιδιακή αποτύπωση.

Το 15% των περιπτώσεων ΝΥ οφείλεται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανιχνεύσιμες με συμβατικές κυτταρογενετικές τεχνικές και τα 2/3 από αυτές να αφορά το σύνδρομο Down. Το σύνδρομο Down, με συχνότητα 1 στα 800 παιδιά, οφείλεται στην ύπαρξη τρισωμίας του χρωμοσώματος 21 στο 95 % των περιπτώσεων. Στις υπόλοιπες των περιπτώσεων μπορεί να οφείλεται σε μη ισοζυγισμένη μετάθεση μεταξύ του χρωμοσώματος 21 και κάποιου άλλου χρωμοσώματος (συνήθως του χρωμοσώματος 14) και πιο σπάνια σε μωσαϊσμό . Σύνδρομο μικροελλείμματος/μικροδιπλασιασμού ,όπως για παράδειγμα σύνδρομο Prader Willi, σύνδρομο Angelman και σύνδρομο Williams syndrome, τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα με τον συμβατικό καρυότυπο, ταυτοποιήθηκαν γονιδιακά με την εισαγωγή των τεχνικών FISH και MLPA. (20)

Περισσότερα από 100 γονίδια που σχετίζονται με τη ΝΥ έχουν βρεθεί στο χρωμόσωμα Χ, δίνοντας μια εξήγηση στο γιατί υπερτερούν οριακά οι άρρενες με νοητική υστέρηση. (19, 3, 18, 14) Το Σύνδρομο Ευθραύστου Χ αποτελεί την πιο συχνή κληρονομούμενη μορφή νοητικής υστέρησης με συχνότητα 1/3600 αγόρια. Το 1991 ανακαλύφθηκε ότι το

γονίδιο FMR1 είναι υπεύθυνο για το σύνδρομο του ευθραύστου X .(21, 22) Η νοητική κατάσταση των αγοριών με σύνδρομο Ευθραύστου X ποικίλλει από δυσκολίες στη μάθηση μέχρι βαριά νοητική υστέρηση, με ή χωρίς την συνύπαρξη στοιχείων αυτισμού. Εκτός από τη νοητική κατάσταση που επηρεάζεται, τα αγόρια αυτά έχουν χαρακτηριστικό προσωπείο (μεγάλα αυτιά, μακρύ πρόσωπο με εξέχων πιγούνι και μεγάλους όρχεις) καθώς επίσης μπορεί να έχουν προβλήματα που σχετίζονται με το συνδετικό ιστό , όπως πρόπτωση μιτροειδούς βαλβίδας και υπερελαστικότητα αρθρώσεων.

Στη βάση δεδομένων OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) υπάρχουν πάνω από 1000 διαταραχές που συνδέονται τόσο με συνδρομικές όσο και με μη συνδρομικές μορφές ΝΥ .Τα σύνδρομα μικροελλείματος αποτελούν τη πιο συχνή αιτία στα σύνδρομα με ΝΥ. **Πίνακας 1.4**

Πίνακας 1.4 Γνωστά σύνδρομα μικροελλειμμάτων με ΝΥ

Σύνδρομο (#OMIM)	Συχνότητα	Χρωμοσωμική ανωμαλία
Di George/VCFS (#188400)	1/4000	del 22q11.2
Prader-Wili (#176270)	1/15000	del 15q11.2pat/UPD
Angelman (#105830)	1/20000	del 15q11.2mat/UPD
Williams (#194050)	1/20000	del 7q11.23
WAGR (#194072)	1/70000	del 11p13

1.5 Διαγνωστική κλινική προσέγγιση ασθενών με ΝΥ

Η νοητική υστέρηση ή η αναπτυξιακή καθυστέρηση σε ποιο μικρές ηλικίες αποτελούν την πιο συχνή αιτία παραπομπής στο ιατρείο Κλινικής Γενετικής. Λόγω όμως της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζει, την πληθώρα υποψηφίων γονιδίων καθώς και του υψηλού ποσοστού περιπτώσεων που μένουν αδιάγνωστες η επιλογή του κατάλληλου γονιδιακού τεστ από τον κλινικό γενετιστή παραμένει δύσκολη. (13, 23) Το σύστημα που προτείνεται να βοηθήσει στην ανεύρεση της αιτίας της ΝΥ αφορά την άκρως λεπτομερειακή κλινική εξέταση και την καταγραφή ενός πλήρους οικογενειακού ιστορικού. Το πρωταρχικό και πιο σημαντικό βήμα είναι η ανάκτηση του οικογενειακού δέντρου τουλάχιστον 3 γενεών και επέκτασή του όταν υπάρχουν και άλλοι ασθενείς. Το επόμενο βήμα είναι η λήψη πληροφοριών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και για τη νεογνική περίοδο του ατόμου. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο αποκλεισμός κάποιων πιθανών περιβαλλοντικών αιτιών ΝΥ όπως:

- αν η μητέρα έπαιρνε φάρμακα τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για παράδειγμα φάρμακα για την αντιμετώπιση της επιληψίας
- η κατανάλωση αλκοόλ στην εγκυμοσύνη
- αν είχε φανεί κάτι στους προγεννητικούς υπερήχους
- ιστορικό γέννησης (πρωωρότητα, τραυματισμός κατά τη γέννα, ανάγκη για οξυγόνο)
- νεογνική ηλικία (σπασμοί, υποτονία) και αναπτυξιακά ορόσημα

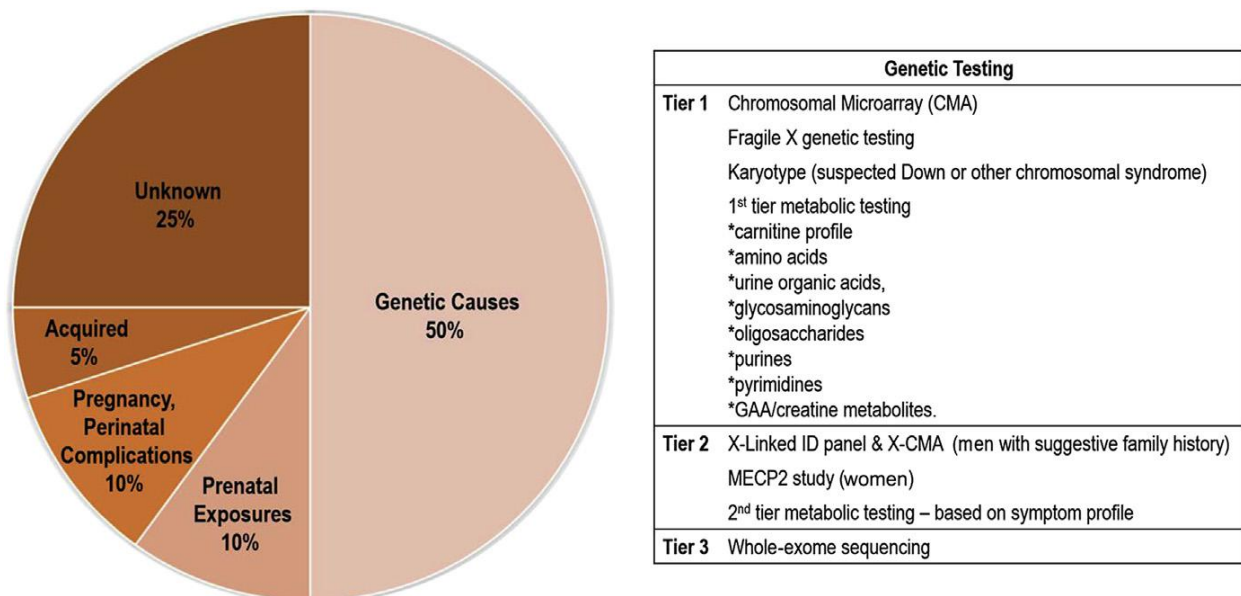
Ακολουθεί κλινική εξέταση για μορφολογικά στίγματα και μέτρηση σωματομετρικών παραμέτρων (βάρους, ύψος, περίμετρο κεφαλής) (11)

Όταν υπάρχει υποψία συγκεκριμένου συνδρόμου από τα κλινικά χαρακτηριστικά συνιστάται επιβεβαίωση με στοχευμένη αλληλούχιση κατά Sanger. Στην ιδιοπαθή ΝΥ όμως, όπου ο κλινικός φαινότυπος δεν είναι ξεκάθαρος, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ο Μοριακός Καρυότυπος σαν πρώτη επιλογή στην ιδιοπαθή ΝΥ, όπου δεν υπάρχει υποψία γνωστού συνδρόμου. (24,25). Η διαγνωστική στρατηγική που προτείνεται περιλαμβάνει :

1ο στάδιο: χρωμοσωμική ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA για την ανεύρεση πιθανών παθολογικών δομικών παραλλαγών.(25). Η μέθοδος αυτή έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ανεύρεσης παθολογικών CNVs σε ποσοστό 15-20% (26, 11).Το πιο απαιτητικό πρόβλημα με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών είναι η κατάταξη των CNVs σε παθολογικά ή καλοήγη. Για το λόγο αυτό προτείνεται η μελέτη και των γονιών μαζί με τον πάσχοντα (trio analysis). CNVs κληρονομήθηκε από φαινοτυπικά υγιή άτομα θεωρείται καλοήγη. (13)

2ο στάδιο : συμβατικός καρυότυπος υψηλής ευκρίνειας G ζώνωσης και μοριακή μελέτη επαναλήψεων της τριπλέτας CGC στο γονίδιο FMR1(άρρενες πάσχοντες για ανεύρεση συνδρόμου Ευθραύστου X) ή μοριακή διάγνωση του συνδρόμου Rett (MECP2) για κορίτσια με μέτρια ή σοβαρή ιδιοπαθή ΝΥ.

3ο στάδιο : σε "συνδρομικές" περιπτώσεις ΝΥ, X- φυλοσύνδετης ή αυτοσωμικής, συστήνεται η αλληλούχιση επόμενης γενιάς πάνελ γονιδίων που αφορούν τις νευροαναπτυξιακές διαταραχές. Η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών αλληλούχισης , που περιλαμβάνει το WES και σιγά σιγά και το WGS, θα φέρουν επανάσταση στη διαγνωστική διαδικασία της ΝΥ. (27)



Εικόνα 1.1 Αιτίες νοητικής υστέρησης και διαγνωστική προσέγγιση που προτείνεται. (Pediatrics 2014;134(3):e903–18; and Pivalizza P, Lalani SR. Intellectual disability in children: evaluation for a cause. UpToDate: Waltham (MA); 2016.) (28)

1.6 Θεραπευτική προσέγγιση ΝΥ

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπεία για τη ΝΥ και η μόνη προσέγγιση που ακολουθείται είναι εκπαιδευτική και αντιμετώπιση των συνοδών προβλημάτων.

Σημαντική επίσης είναι η υποστηρικτική παρέμβαση στους ίδιους τους ασθενείς αλλά και στις οικογένειες τους. Στο μέλλον με την εξέλιξη της τεχνολογίας θα υπάρξει θεραπεία σε αρκετές περιπτώσεις ΝΥ προκειμένου να μετριαστεί ή ακόμα και να αναστραφεί η νοητική δυσλειτουργία. Μέχρι τότε η πρόωγη παρέμβαση από ειδικούς εκπαιδευτές καθώς και το συνεχές follow-up από τις ανάλογες ειδικότητες γιατρών μπορούν να διευκολύνουν και να βοηθήσουν τη ζωή των ασθενών. Το ετήσιο follow –up ακόμα και των ασθενών με γενετική διάγνωση είναι πολύ σημαντικό γιατί με την εξέλιξη της τεχνολογίας μπορεί να έχει βρεθεί κάποια καινούρια θ88/εραπευτική αγωγή και ένας επιπλέον λόγος είναι ότι τα άτομα με ΝΥ σε ένα μεγάλο βαθμό έχουν συνοσηρότητες. (Πίνακας 1.5) (9)

Πίνακας 1.5 Συνοδά νοσήματα

Αυτισμός	20-30%
ΔΕΠΥ	9-15%
Αισθητηριακές Διαταραχές	Ήπια ΝΥ 2% - Σοβαρή ΝΥ 11%
Εγκεφαλική Παράλυση	Ήπια ΝΥ 6-8% – Σοβαρή ΝΥ 30%
Ψυχιατρική/συμπεριφορική διαταραχή	80%

Κεφάλαιο 2

2.1 Ποικιλομορφίες αριθμού αντιγράφων (CNVs)

Την τελευταία δεκαετία το ερευνητικό ενδιαφέρον για την μελέτη της αναπτυξιακής καθυστέρησης/ ΝΥ έχει στραφεί στις ποικιλομορφίες αριθμού αντιγράφων (CNVs). Τα CNVs αποτελούν απώλεια ή κέρδος ποσότητας γενωμικού υλικού μεγέθους μεγαλύτερο από 1 kb. (29, 26). Τα CNVs διακρίνονται σε :

- Ελλείμματα
- Διπλασιασμούς
- Ελλείμματα και διπλασιασμούς στην ίδια θέση συχνά με αλληλοεπικαλυπτόμενα όρια
- Αναστροφές και
- Ενθέσεις

Σύμφωνα με την παθογονικότητά τους τα CNVs κατατάσσονται σε :

- ✓ Παθογόνα (pathogenic) CNVs
- ✓ Αγνώστου κλινικής σημασίας (VOUS) CNVs
- ✓ Καλοήθη (benign) CNVs

Περισσότερα από 57.000 CNVs έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων Γενωμικών παραλλαγών (29), με την πλειοψηφία των παραπάνω να είναι 'καλοήθεις' παραλλαγές και να μην σχετίζονται με κάποια νόσο. Τα καλοήθη CNVs αποτελούν φυσιολογικούς πολυμορφισμούς σε ποσοστό ~1% στο γενικό πληθυσμό και ονομάζονται CNPs (Copy Number Polymorphisms). (30) Πάραυτα, κάποια σπάνια CNVs έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΝΥ και άλλων ανθρώπινων νοσημάτων. Για τον παραπάνω λόγο είναι πολύ σημαντικό για την κλινική διάγνωση να γίνει σαφής διαχωρισμός των CNVs σε καλοήθη ή παθογόνα. (31)

Τα κριτήρια για να θεωρηθεί ένα CNV παθολογικό είναι:

- Να βρίσκεται σε περιοχή σχετιζόμενη με γνωστά σύνδρομα μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών
- Η de novo εμφάνιση του ή η κληρονομηση από ασθενή γονέα
- Να περιέχει γνωστά δοσοεξαρτώμενα γονίδια
- Να αποτελεί παράγοντα χρωμοσωμικής αστάθειας

- ο Να περιέχει γνωστά OMIM γονίδια
- ο Να βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή (24)

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα CNVs ρυθμίζουν τη γονιδιακή ρύθμιση , επηρεάζουν τη γενετική ποικιλομορφία και συμβάλουν στην εξέλιξη. (32) Καλύπτουν περιοχές που περιλαμβάνουν γονίδια με ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση , τη χημική διέγερση , την απόκριση των νευροδιαβιβαστών σε εξωτερικά ερεθίσματα.

2.2 Μοριακοί μηχανισμοί δημιουργίας CNVs

Μοριακοί παθογενετικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την δημιουργία των CNVs :

I. Ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ μη αλληλικών αλληλουχιών (NAHR)

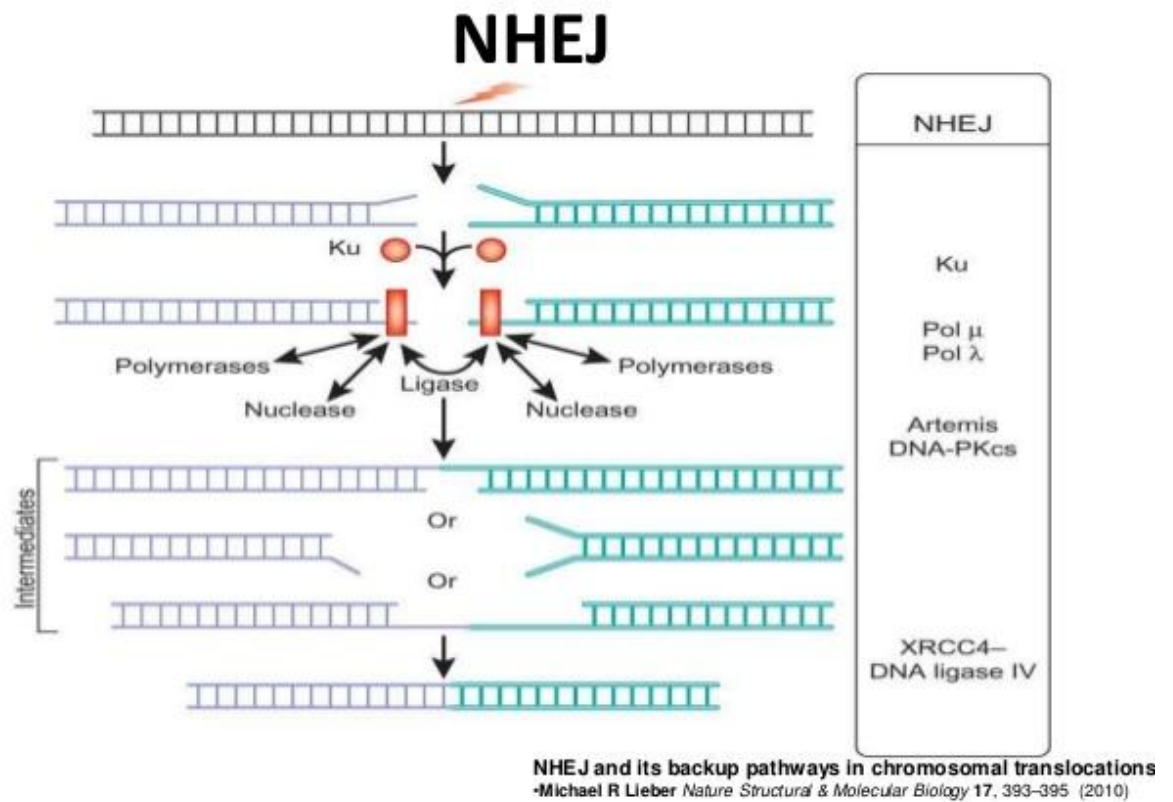
Λαμβάνει χώρα τόσο στη μίτωση όσο και κατά τη μείωση και απαιτεί δυο περιοχές LCRs (επαναλήψεις χαμηλού αριθμού αντιγράφων από 10 έως 500 kb) υψηλής ομολογίας που δρουν σαν υποστρώματα ανασυνδυασμού. Οι περιοχές LCRs εμφανίζονται σε περικεντρικές ή υποτελομεριδιακές περιοχές και αποτελούν σημεία με προδιάθεση για αναδιάταξη λόγω αστάθειας του DNA. Διαχρωμοσωμικός NAHR μεταξύ LCRs με ίδια κατεύθυνση δημιουργεί έλλειμμα ή διπλασιασμό ενώ ο ενδοχρωματικός δημιουργεί μόνο ελλείμματα. Όταν οι LCRs βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα με ίδιο προσανατολισμό ο NAHR μηχανισμός δημιουργεί ελλείμματα ή διπλασιασμούς ενώ με αντίθετη κατεύθυνση καταλήγει σε αναστροφή.(33)

II. Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS)/ Microhomology-Mediated Break Induced Replication (MMBIR) μηχανισμός

Ο μηχανισμός MMBIR επάγεται από θραύση ενώ ο μηχανισμός FoSTeS ξεκινά με διακοπή της φουρκέτας αντιγραφής χωρίς να απαιτεί θραύσμα διπλής αλυσίδας .(32)

III. NonHomologous End Joining(NHEJ) μηχανισμός

Ερμηνεύει μη επαναλαμβανόμενες αναδιατάξεις.



A major challenge faced by this pathway is that chromosome breaks can have dirty end structures, making them difficult to repair.

Εικόνα 2.1 Μηχανισμός μη ομόλογων άκρων

IV. Αναστροφές και μεταθέσεις

Οι ισοζυγισμένες δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες δεν σχετίζονται με παθολογικούς φαινοτύπους αλλά οι φορείς τέτοιων αναστροφών ή μεταθέσεων έχουν αυξημένο κίνδυνο να αποκτήσουν απόγονο με μη ισοζυγισμένη ανωμαλία (34)

2.3 Τεχνολογία Μικροσυστοιχιών Συγκριτικού Γενωμικού Υβριδισμού (array-CGH)

Για περισσότερα από 50 χρόνια ο συμβατικός καρυότυπος χρησιμοποιείται επιτυχώς για την μελέτη χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Ο καρυότυπος έχει το πλεονέκτημα ότι

χαρτογραφεί το ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα αλλά η ανάλυση του περιορίζεται στα 5-10 Mb. Περιοχές μικρότερου μεγέθους δεν μπορούν να διαβαστούν. Τα τελευταία 20 χρόνια καινούριες τεχνικές έχουν εισαχθεί στην εργαστηριακή ρουτίνα, που επέτρεψαν την ανακάλυψη καινούριων δομικών διαταραχών, μικρότερων σε μέγεθος. Ο *in situ* υβριδισμός (FISH) έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και ανιχνεύει χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, ισοζυγισμένες και μη κυρίως ελλειμμάτων, αλλά όχι σε ολόκληρο το γονιδίωμα ταυτόχρονα. Χρησιμοποιεί ειδικούς ανιχνευτές και εφαρμόζεται σε μεσοφασικούς πυρήνες για τον εντοπισμό αναδιατάξεων σε τελομεριδιακές/υποτελομεριδιακές περιοχές. (35) Η τεχνική αυτή έχει υψηλή ευκρίνεια (50-100 kb) αλλά χαμηλή απόδοση για ανίχνευση άγνωστης χρωμοσωμικής ανωμαλίας.

Ο μοριακός καρυότυπος μας συστήθηκε το 2003 για τη μελέτη χρωμοσωμικών αναδιατάξεων σε ολόκληρο το γονιδίωμα σε ασθενείς με ΝΥ και /με ΠΣΑ, μπορεί να εντοπίσει έως 99% των χρωμοσωμικών αλλαγών. (36). Σαν τεχνική επιτρέπει την ταυτοποίηση και μέτρηση των αλλαγών των αριθμών αντιγράφων στο DNA και ταυτόχρονα τη χαρτογράφηση των θέσεων αυτών πάνω στο γονιδίωμα. Προσφέρει διπλάσια διαγνωστική επιτυχία από το συμβατικό καρυότυπο και τον *in situ* υβριδισμό. (24, 36). Ο Μοριακός Καρυότυπος χρησιμοποιεί ανιχνευτές μονόκλωνα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ssDNA) μεγέθους 25-85 bp και ονομάζονται μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (oligo array-CGH). Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι πολλά γι' αυτό και πλέον θεωρείται πρώτη επιλογή διαγνωστικά στις περιπτώσεις ΝΥ :

- έχει 10-100 φορές μεγαλύτερη ευκρίνεια από τον συμβατικό καρυότυπο
- δεν απαιτεί διαιρούμενα κύτταρα
- μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα γενετικού υλικού.
- Η array-CGH επιτρέπει την ανίχνευση μη ισοζυγισμένων δομικών γενωμικών αναδιατάξεων (μικροελλείμματα, μικροδιπλασιασμούς, μεταθέσεις) ακόμα και σε επίπεδο εξωνίου για συγκεκριμένα γονίδια.

Οι μικροσυστοιχίες array-CGH είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την ανακάλυψη νέων συνδρόμων με σκοπό την καλύτερη συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου. (37)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κλινική και εργαστηριακή διερεύνηση παιδιών με νοητική υστέρηση γενετικής αιτιολογίας με ή χωρίς πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες με τη μέθοδο γενωμικού συγκριτικού υβριδισμού (array-CGH) για την ανεύρεση υπομικροσκοπικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (copy number variations, CNVs) που να σχετίζονται με το φαινότυπο των ασθενών. Επίσης , η συσχέτιση συγκεκριμένων CNVs με συγκεκριμένους παθολογικούς φαινοτύπους για καλύτερη συσχέτιση γονοτύπου- φαινοτύπου σε σύνδρομα μικροελλείμματος ή μικροδιπλασιασμού που εμπλέκονται σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές

Υλικά και Μέθοδοι

Σε επιλεγμένο αριθμό ασθενών που έχουν παραπεμφθεί στα εξωτερικά ιατρεία της Κλινικής Γενετικής το διάστημα 2010- 2018 εφαρμόσαμε τη μέθοδο του γενωμικού συγκριτικού υβριδισμού (array-CGH) με επίπεδο ευκρίνειας ~8kb. Το Εργαστήριο της Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με έδρα το Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο στο νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία» διαθέτει τον κατάλληλο εξοπλισμό για τη διεκπεραίωση της μεθόδου.

Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που ακολουθείται βασίζεται στην τεχνολογία a-CGH Agilent oligonucleotide και περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

- 1.Απομόνωση γενωμικού DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος
- 2.Ενζυμική πέψη με gDNA
- 3.Σήμανση gDNA με φθορίζουσες χρωστικές
- 4.Πλύσεις για απομάκρυνση μη σημασμένου gDNA
- 5.Υβριδοποίηση
- 6.Πλύσεις για απομάκρυνση μη υβριδοποιημένου υλικού
- 7.Σάρωση μικροσυστοιχιών
- 8.Ανάλυση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν υψηλής ανάλυσης 4x180K και 1X244K συστοιχίες της τεχνολογίας της εταιρείας Agilent με 60-μερή ολιγονουκλεοτιδικά probes με μέσο επίπεδο ευκρίνειας 7 Mb – 13Mb αντίστοιχα.

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος

Αρχικά έγινε απομόνωση λευκοκυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα, το οποίο συλλέχθηκε από τους ασθενείς σε φιαλίδια γενικής αίματος 3 ml με αντιπηκτικό EDTA. Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση του γενωμικού DNA με το πλήρως αυτοματοποιημένο ρομποτικό σύστημα απομόνωσης με χρήση τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων (QIAGEN BioROBOT M48, QIAGEN, HILDEN, GERMANY). Τα μαγνητικά σφαιρίδια έχουν πυρήνα από πυρίτιο στο οποίο προσδένεται το DNA παρουσία ενός χαοτροπικού άλατος. Στη συνέχεια το προσδεδμένο DNA ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα και απιονισμένο νερό , το οποίο βελτιώνει την καθαρότητα του.



Εικόνα 3.1 Αυτοματοποιημένο σύστημα QIAGEN BioROBOT M48

2. Έλεγχος καθαρότητας και μέτρηση συγκέντρωσης DNA

Ακολουθεί έλεγχος καθαρότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με τη χρήση του σπεκτροφωτομέτρου Nano Drop ND- 1000 UV-Vis. Μετρώνται οι λόγοι A260/280 και A260/230. Τιμές για το λόγο A260/280 από 1,8 έως 2 θεωρούνται αποδεκτές για καθαρό DNA από εξωγενείς πρωτεΐνες ενώ τιμές πάνω από 2 για το λόγο A260/230 δείχνει απουσία οργανικών ενώσεων. Η ποιότητα του αρχικού gDNA είναι πολύ σημαντικό βήμα γιατί από αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η ακρίβεια του αποτελέσματος της μεθόδου.

3. Ενζυμική πέψη γενωμικού DNA

Ακολουθεί πέψη γενωμικού DNA με ισομοριακές ποσότητες DNA από το εξεταζόμενο δείγμα του ασθενούς και το δείγμα αναφοράς (από την Promega p/n G1521(θήλυ) ή p/n G1471 (άρρεν)). Σε κάθε είδος μικροσυστοιχίας απαιτείται διαφορετική ποσότητα και όγκος προστιθέμενου αρχικού gDNA με ελάχιστη ποσότητα 0,5 μg. Στη συνέχεια , για κάθε αντίδραση πέψης προστίθεται σε αποστειρωμένο strip η απαιτούμενη ποσότητα γενωμικού DNA καθώς και η απαραίτητη ποσότητα νερού χωρίς νουκλεάσες ανάλογα με τον τύπο της μικροσυστοιχίας. Συνολικός όγκος δείγματος με νερό ελεύθερο νουκλεασών για μικροσυστοιχίες τύπου 1x,2x και 4x είναι τα 20.2 μl. Έπειτα το κάθε μείγμα αναμειγνύεται με τα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης πέψης: 10x buffer C, ακετυλιωμένη BSA , τα περιοριστικά ένζυμα Alu I και RSA I. Τελικός όγκος του μίγματος πέψης ανά αντίδραση :5.8 μL

Σε επόμενο βήμα τα 5.8 μL του μίγματος πέψης προστίθενται σε καθένα από τα σωληνάτια με το γενωμικό DNA ελεύθερο νουκλεασών. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για ομογενοποίηση του δείγματος. Τα σωληνάρια με τα δείγματα μεταφέρονται σε PCR block στους 37°C για 2 ώρες και στους 65°C για 20 λεπτά για απενεργοποίηση των ενζύμων και έπειτα μεταφέροντα στους -20°C μέχρι την επόμενη μέρα, όπου και πραγματοποιείται η διαδικασία φθορίζουσας σήμανσης. Τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν μέχρι 1 μήνα στους -20°C.

4. Σήμανση DNA δειγμάτων με φθορίζουσες χρωστικές

Η διαδικασία της φθορίζουσας σήμανσης των DNA δειγμάτων πραγματοποιείται με το Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS, όπου χρησιμοποιούνται οι φθορίζουσες χρωστικές **Cyanine 3-dUTP** και **Cyanine 5-dUTP**. Το δείγμα εξέτασης σημαίνεται με Cy-5 (μπλε χρωστική) και το δείγμα αναφοράς με Cy-3 (κόκκινη χρωστική). Πολύ σημαντικό κατά τη διαδικασία της σήμανσης είναι η ελαχιστοποίηση της έκθεσης στο φως καθώς οι δυο αυτές χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες. Αρχικά προστέθηκαν στο δείγμα 5 μL τυχαίων εκκινητών σε κάθε δείγμα και ακολουθεί καλή ανάδευση για ομογενοποίηση του δείγματος. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται στους 95°C στο PCR block για 3 λεπτά και μετά 5 λεπτά στον πάγο. Έπειτα προστίθεται το μείγμα σήμανσης, το οποίο περιλαμβάνει:

- ✓ Νερό χωρίς νουκλεάση
- ✓ 5x buffer
- ✓ 10x dNTPs
- ✓ Τη χρωστική και
- ✓ Το θραύσμα της εξωνουκλεάσης Klenow

Φτιάχνουμε 2 τέτοια δείγματα, ένα για την κόκκινη και ένα για την μπλε χρωστική. Ακολουθεί προσθήκη 21 μL μίγματος σήμανσης σε κάθε σωληνάριο με gDNA. Τα δείγματα μεταφέρονται, σκεπασμένα με αλουμινόχαρτο για φωτοπροστασία, στους 37°C για 2 ώρες και στους 65°C για 10 λεπτά. Ακολουθούν πλύσεις του σημασμένου γενωμικού DNA σε στήλες με φίλτρο.

5. Υβριδισμός

Στο στάδιο αυτό προετοιμάστηκε το μείγμα υβριδοποίησης από το Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit, το οποίο περιλαμβάνει τα συστατικά Cot-1 DNA, 10x blocking Agent και 2x Hybridization buffer. Κάθε συστατικό πριν τη χρήση αναδεύεται καλά, φυγοκεντρείται και προστίθεται ξεχωριστά στο σημασμένο DNA. Μετά την επώαση στους 95°C για 3 λεπτά, το σημασμένο αναμιγμένο gDNA υβριδίζεται με το περιεχόμενο των μικροσυστοιχιών.

6. Πλύσιμο μικροσυστοιχιών για απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου υλικού.

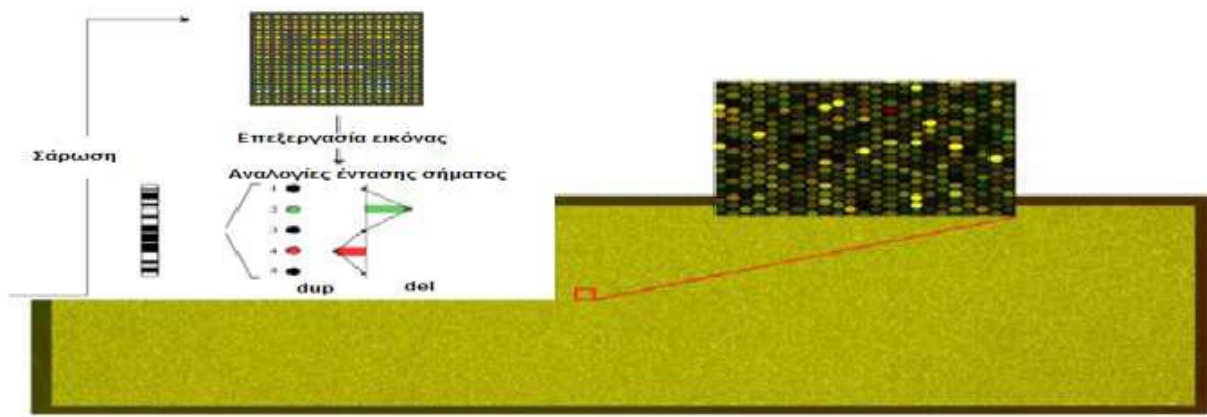
Μετά την ολοκλήρωση του υβριδισμού, ακολουθούν πλύσεις για την απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου υλικού σε χαμηλό φωτισμό με σκοπό την ελάχιστη απώλεια φθορισμού και σε απαγωγή με εξαερισμό.

7. Σάρωση μικροσυστοιχιών

Αμέσως μετά τις πλύσεις ακολουθεί η σάρωση στο μηχάνημα “microarray scanner”. Για τη σάρωση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ανάλυσης Agilent Scanner Control Software v A.8.4.1., υψηλής υπολογιστικής δύναμης.

8. Ανάλυση δεδομένων

Μετά την σάρωση ακολουθεί επεξεργασία της εικόνας και μετατροπή σε αρχεία κειμένου με τη χρήση του λογισμικού Feature Extraction Agilent Technologies. Το λογισμικό αυτό επεξεργάζεται τα σαρωμένα δεδομένα από την εικόνα με αυτοποιημένο τρόπο και καθορίζει επακριβώς την πυκνότητα των ανιχνευτών και την έντασή τους. Από την εξαγωγή δεδομένων προκύπτουν μετρήσεις, τα QC metrics, τα οποία δίνουν πληροφορίες για την αξιοπιστία του πειράματος. Όταν δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στον αριθμό αντιγράφων στο εξετασθέν δείγμα, το σήμα εκπομπής είναι κίτρινο γιατί υπάρχει ίση ποσότητα του δείγματος με το DNA αναφοράς. Σε περίπτωση διπλασιασμού υπάρχει εκπομπή πράσινου χρώματος ενώ αντίθετα σε έλλειμμα υπάρχει εκπομπή κόκκινου χρώματος.

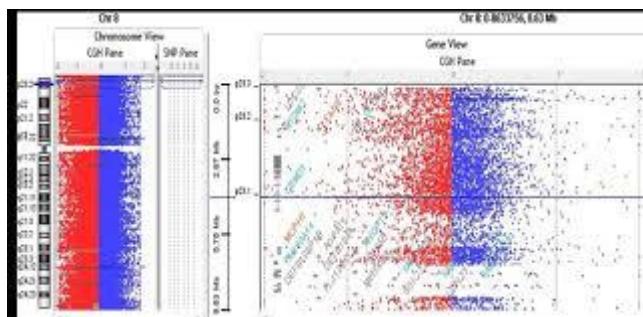


Εικόνα 3.2 εικόνα τύπου .tiff όπου οι υβριδοποιημένοι ανιχνευτές έχουν χρώμα μεταξύ πράσινου και κίτρινου σε ένα επιτυχημένο πείραμα.

Τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό Cytogenomics.

Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία επεξεργασίας και ερμηνείας των αποτελεσμάτων , απαιτείται η συλλογή πληροφοριών και η σύγκριση των γονοτυπικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σε παρόμοιες περιπτώσεις που έχουν καταγραφεί σε συγκεκριμένες βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται είναι :

- ❖ DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>)
- ❖ Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)
- ❖ ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>)
- ❖ HuGENet (<https://www.cdc.gov/genomics/hugenet/collaborg.htm>)
- ❖ ISCA database (<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>)
- ❖ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)



Εικόνα 3.3 CGH analytics

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 80 ασθενείς που εξετάστηκαν στο ιατρείο της Κλινικής Γενετικής με AK/NY και με ή χωρίς ΠΣΑ κατά τη χρονική διάρκεια 2013-2018. Από τους 100 ασθενείς στους 48 έχουν βρεθεί παθολογικά CNVs τα οποία είτε προκαλούν συγκεκριμένο σύνδρομο είτε έχουν αναφερθεί στις βάσεις δεδομένων σαν παθολογικά. Στους υπόλοιπους 52 ασθενείς η ανάλυση μικροσυστοιχιών DNA ήταν φυσιολογική και κατά συνέπεια οι περιπτώσεις αυτές έμειναν αδιάγνωστες. Σε όλους τους ασθενείς είχε προηγηθεί ανάλυση χρωμοσωμάτων με συμβατικό καρυότυπο καθώς και γονδιακό τεστ για τον αποκλεισμό του συνδρόμου Ευθραύστου X στους άρρενες.

ΑΑ, φύλο	Ηλικία	Αποτέλεσμα	Προέλευση	Κλινική εικόνα εκτός NY	Σύνδρομο	Γονίδια
1, Θ	7	19q13.43 del, 0,107 Mb	De novo	Μικροκεφαλία, IQ 33, ψυχιατρικά θέματα	-	ZNF324, ZNF446, SLC27A5, ZBTB45, TRIM28, CHNP2A, UBE2M, M2F1
2, Θ	1	-Del, 5q11.2 -Del, 9p13.1 -Del, 12q13.3	De novo	Βρεφικοί σπασμοί, κεντρική υποτονία, χαμηλά σωματομετρικά	Γονίδια σχετιζόμενα με νευροαναπτυξιακές διαδικασίες	-PDE4D - CNTNAP3 -SDR9C7, RDH16
3, Α	8	-Dup 4p16.3-15.33, 11.6Mb -del 22q13.31-q13.33, 4.4 Mb	De novo	Σοβαρή ΨΚΚ, μικροκεφαλία	- σ. Wolf-Hirschhorn) - σ. Phelan Mcdermik	
4, Θ	3	Del 4q34.3-4q35.2 7,8 Mb	De novo	Υποτονία, ΔΕΠΥ	Γνωστό σύνδρομο	-
5, Α	2	Del 16p13.13, 0,305 Mb	De novo	Μικροκεφαλία, υποπλασία	-Σύνδρομο CMT1C	-LITAF

				παρεγκεφαλίδος, λέπτυνση μεσολοβίου, κατέληξε 14 μηνών	-Γονίδια σχετιζόμενα με νευρολογικές και αναπτυξιακές διαταραχές	-SNN, TXNDC11, ZC3H7A
6, A	8	-del 6p22.1-p21.33 2,24 Mb (vous) -Del 20p13, 652 kb	De novo	Μορφολογικά (στραβισμός, επίκανθος)	Σύνδρομο φάσματος αυτισμού και ήπιας ΝΥ	-GABBR1, MOG, TUBB -ZCCHC3, NRSN2, RBCK1, SOX12, CSNK2A1
7, A	7	Dup 13q34, 1,64 Mb	De novo	Σοβαρή ΨΚΚ, όχι ομιλία	-	-
8, A	4	Dup 18p11.32-p11.21, 15,2 Mb	De novo	Σπασμοί, ήπια φλοιώδης εγκεφαλική ατροφία, μικροκεφαλία	Σύνδρομο 18p dup	-
9, Θ	30	Del 8p21.3, 0,196 Mb	De novo	Μικροκεφαλία	-	-
10, Θ	8	Del X	De novo	-	Turner Syndrome	Whole X chromosome
11, A	5	Del 3p26.3	De novo	Αυτισμός	-	CHL
12, A	57	Dup Xp11.22, 212,7 kb	μητρική	-	Φυλοσύνδετη ΝΥ	-
13, A	2	-Dup 2q32.2-q33.1, 8,2 Mb -Del 2q33.1-q33.3, 7,4 Mb	De novo	Μυϊκή υποτονία, ΨΚΚ	-	- -SATB2, KCTD18, ADAM23
14, Θ	6	Dup 13q34, 40 kb	De novo	Σπαστική τετραπληγία, μικροκεφαλία	-	CDC16, UPF3A
15, Θ	14	Del 2q37.1-q37.3, 8,53 Mb	De novo	Μικροκεφαλία, σπαστική διπληγία, βαριά ΨΚΚ	Σύνδρομο 2q37	-
16, Θ	7	Del 17p13.3, 433 kb	De novo	ΔΕΠΥ	Περιλαμβάνεται η περιοχή του	NXN, TIM22, ABR,

					συνδρόμου Miller- Dicker	BHLHA9, TUSC5
17, A	2	-del 16p13.3, 2,33 Mb -del 20q13.33, 726 kb -del 5p15.33, 1,4 Mb	De novo	Υποτονία, ΔΑΔ	-Σύνδρομο συνδεόμενα με NY, επιληψία και διανοητικές διαταραχές	-
18, A	20	Dup 2q33.1, 150 kb	De novo	Μικροφθαλμία, μικροκεφαλία, ΨΚΚ	SATB2- associated syndrome (SAS)	SATB2
19, Θ	7	Del 15q11.2, 154 kb	De novo	Βαριά ΨΚΚ, μικροκεφαλία, στερεοτυπίες	Περιοχή συνδρόμου PW- Angelman	PWRN2
20, Θ	1	-Del 1p36.33- p36.22, 10,3 Mb -dup 16p11.2, 401 kb	De novo	Υποτονία, μικροκεφαλία, σπασμοί	-	-
21, A	5	-Del 7q22.1- q22.3, 6,04 Mb -del 17p13.1, 354 kb	De novo	Βλάβη παρεγκεφαλίδας , ΨΚΚ	Γνωστά σύνδρομα	-
22, A	8 μην ών	Del 22q13.31- 13.33, 5,8 Mb	De novo	Υποτονία, πλαγιοκεφαλία, μακροκεφαλία	Phelan- Mc Dermik	-
23, Θ	6	-Dup 16p13.11, 1,4 Mb -del 19p13.3, 200 kb	De novo	ΨΚΚ	- -CFC	- -MAP2K2
24, A	5	-Del 4q35.1- q35.2, 5,2 Mb -dup 9q24.3- q21.1, 31,6 Mb	De novo	ΨΚΚ	Γνωστά σύνδρομα	-
25, Θ	1	dup Xp11.4- p11.21, 17,1 Mb	De novo	ΨΚΚ, σπασμοί, αυξημένο βάρος	Υπομελάνωσ η του ITO	-
26, Θ	28	Del 17p13.3, 138 kb	De novo	Διαταραχή οπτικού νεύρου	Περιλαμβάνει την περιοχή του Miller- Dicker	-

27, A	6	Del 17p11.2, 3,6 Mb	De novo	Υποτονία, ΨΚΚ	Smith-Magenis	-
28, Θ	25	Dup 19p13.11, 1,8 Mb	-	-	-	-
29, A	4	Del 8q23.1-q24.12, 12,5 Mb	Ισοζυγισμένη πατρική μετάθεση	ΨΚΚ, κρυφορχία	Σχετίζεται με ειδικούς φαινότυπους (Cornelia de Lange, Langer-Ciedion)	-
30, Θ	1	Dup 9p24.3, 125 kb	De novo	Υποτονία, ΨΚΚ, πτώση ΠΚ		DOCK8
31, A	6	Dup 2q33.1, 150 kb	De novo	Σοβαρή ΨΚΚ, αυτισμός	SAS	SATB2
32, A	1	-Del 11q14.1-q21, 16,5 Mb -del 17q21.31, 418 kb	De novo	Αγενεσία μεσολοβίου, υδρονέφρωση, ΠΚ >> 97 ^η ε.θ.	- - Koolen - de Vries	- - KANSL1
33, A	16	Dup Xq28, 613,9 kb	De novo	ΨΚΚ	Σύνδρομο μικροδιπλασιασμού dup Xq28	-
34, Θ	2	Del Xp22.31, 1,7 Mb	De novo	-	-	HDHD1, STS, VCX, PNPLA4, MIR651
35, Θ	4	Del Xp22.2, 17,8 kb	De novo	ΨΚΚ, υποτονία	-	OFDN
36, A	2	Del 6p22.1-p21.33, 215 Mb	De novo	Πολυμικρογυρία, ΨΚΚ	-	-
37, Θ	6	-Del 15q13.3, 28,7 kb -del 16p12.2, 376 kb	De novo	Μικροκεφαλία, δυσγενεσία νεφρού, μικροφθαλμία, απουσία ωοθηκών, σοβαρή ΨΚΚ	-Νεφρική δυσγενεσία -Βαρηκοΐα, NY	-FMN1 -METTL9, IGFS6, OTOA, RRN3P1
38, Θ	1	-Del 2q37.3, 4,6 Mb -Dup 9q34.3, 483Kb	De novo	Παχυσαρία, βραχυδακτυλία		
39, A	6	Dup 1q44, 1.5 Mb	De novo	Υποτονία Παθολογικό MRI		

				εγκεφάλου		
40, Θ	1	-Del 2q37.3, 4.6 Mb - Dup 9q34.3, 483 kb	De novo	Βραχυδακτυλία Παχυσαρκία		
41, A	7	-Del Xp22.31, 1.4 Mb - Del Xq24, 266kb	De novo	Ιχθύαση	-Φυλοσύνδετη ιχθύαση	-STS -UBE2A, UPF3B
42, K	1	-Dup Xp22.33, 1,03Mb	De novo	Κοντό ανάστημα		
43, A	10	Dup 2q33.1, 150 kb	De novo		SAS	SATB2
44, Θ	1	-Dup 7q36.3, 401.8kb -Dup Xp22.33 1.03Mb	De novo	Δεν παίρνει ύψος		- -SHOX
45, A	5	-Dup 1q21.1, 887kb -Del 1q21.1-q21.2, 1,033Mb	De novo		Σύνδρομο μικροελλείμματος/μικροδιπλασιασμού 1q21	
46, Θ	2	Del 18p11.32-p11.22, 9.4 Mb	De novo		Σύνδρομο 18pdel	
47, A	3	-Del 8q24.3, 1.9Mb -Del 9q24.3, 643kb -Del 20p13, 622kb	De novo			-SCRIB, PUF60 -DOCK8, KANK1 - ZCCHC3, NRSN2, SOX12, RBCK1, C SNK2A1
48, Θ	5 μ	Del 1p36.33-p36.32, 1.83Mb	De novo	Μεσοκοιλιακή επικοινωνία Ατρησία ορθού-συρίγγιο βαριά ΓΟΠ	Σύνδρομο 1p36	

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εισαγωγή της εφαρμογής του υψηλής ανάλυσης γενωμικού συγκριτικού υβριδισμού (array-CGH) σε ασθενείς με νοητική υστέρηση και/ή πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες άνοιξε έναν καινούριο δρόμο στη διερεύνηση του γονιδιώματος. Η τεχνική array-CGH είναι μια προηγμένη τεχνική που επιτρέπει την αναγνώριση μικρών χρωμοσωμικών ανωμαλιών μικρότερων από 5-10 Mb, που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τον συμβατικό καρυότυπο. Μελέτες έχουν δείξει μια μέση διαγνωστική προσέγγιση απόδοση του μοριακού καρυοτύπου της τάξεως του 15 – 20% στις νευροαναπτυξιακές διαταραχές.(24, 38) Με το πέρασμα των χρόνων η τεχνική εξελίσσεται συνεχώς πετυχαίνοντας όλο και υψηλότερη ανάλυση στη σάρωση του γονιδιώματος. Όμως η δυσκολία που προκύπτει είναι η ανάλυση των αποτελεσμάτων λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού CNVs χωρίς ξεκάθαρο φαινότυπο.

Τα Copy number variants είναι μια μορφή δομικής παραλλαγής στο γονιδίωμα και αναφέρεται στη διαφορά στον αριθμό αντιγράφων μιας συγκεκριμένης περιοχής μέσα στο γονιδίωμα. Υπάρχουν CNVs που θεωρούνται καλοήγη γιατί δεν έχουν συσχετιστεί με κάποιο παθολογικό φαινότυπο άρα αποτελούν φυσιολογικές παραλλαγές και κάποια πιο σπάνια έχουν θεωρηθεί παθογόνα και έχουν συσχετιστεί με σύνδρομα νοητικής υστέρησης. Η ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ των φυσιολογικών δομικών παραλλαγών και των παθογόνων είναι κρίσιμης σημασίας για την κλινική διάγνωση. Η δυσκολία έγκειται στο γεγονός ότι ο ορισμός ενός παθογόνου είναι πάντα ξεκάθαρος λόγω των διαφορετικών κλινικών φαινοτύπων. Έχουν προταθεί διάφορα κριτήρια και έχουν δοθεί κατευθυντήριες γραμμές για την κατάταξη των CNVs είτε σύμφωνα με το μέγεθος τους, είτε το περιεχόμενό τους σε γονίδια καθώς και αν αποδεικνύεται η παθογονικότητά τους με καταχωρίσεις στις δημόσιες βάσεις δεδομένων. (39)

Τα CNVs που βρέθηκαν στους ασθενείς του ιατρείου κατατεθήκαν σε 3 κατηγορίες :

- i. Παθογόνα
- ii. Φυσιολογικές παραλλαγές
- iii. Άγνωστης κλινικής σημασίας (VOUS), τα οποία με την παρούσα τεχνολογία και την υπάρχουσα βιβλιογραφία μπορεί να περιέχουν OMIM γονίδια αλλά να μην έχουν ακόμα συσχετιστεί ξεκάθαρα με κάποιον φαινότυπο.

Παθογόνα CNVs

Ένα CNV θεωρείται παθολογικό όταν:

1. βρίσκεται σε περιοχή που έχει συσχετιστεί με σύνδρομα μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών.
2. Περιέχει γνωστά δοσοεξαρτώμενα γονίδια
3. Εμφανίζεται de novo σε έναν ασθενή ή κληρονομείται από φαινοτυπικά παθολογικό γονέα
4. Περιέχει γνωστά παθολογικά OMIM γονίδια
5. Αποτελεί παράγοντα πολυγονιδιακής αστάθειας και μπορεί να έχει κληρονομηθεί από φυσιολογικό γονέα ως αποτέλεσμα αναστροφής. (39, 40)

Η παθογονικότητα ενός CNV πάει αναλογικά με το μέγεθος αλλά είναι πιθανό τα μεγαλύτερα σε μέγεθος CNVs να περιέχουν κρίσιμα γονίδια. Ένα μεγάλο ποσοστό των γονιδίων που έχουν βρεθεί στα παθογόνα CNVs έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, στη διαμόρφωση της χρωματίνης και σε άλλες επιγενετικές διαδικασίες που αφορούν την ανάπτυξη των νευρώνων του εγκεφάλου και την πλαστικότητα των συνάψεων. (41)

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Τα ευρήματα από την ανάλυση του μοριακού καρυοτύπου πρώτα ελέγχθηκαν σε γνωστές ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων (DECIPHER, ISCA) καθώς και στη διεθνή βιβλιογραφία για το αν υπάρχει αλληλεπικάλυψη με περιοχές που αφορούν γνωστά σύνδρομα μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών. Σε περιπτώσεις με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα έγινε ανάλυση του γονιδιακού υλικού των γονέων προκειμένου να φανεί η προέλευση της γενωμικής αναδιάταξης.

Το ποσοστό των παθολογικών CNVs που ανευρέθηκαν από την ανάλυση μικροσυστοιχιών εξηγούν ολικώς ή μερικώς το φαινότυπο σε ποσοστό ~48% (48/100 ασθενείς). Το υψηλό ποσοστό ανεύρεσης παθολογικών αποτελεσμάτων οφείλεται στη χρήση μικροσυστοιχιών υψηλής διακριτικής ευκρίνειας .

Η κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων ήταν μια πολύπλοκη διαδικασία λόγω της ποικιλίας των αποτελεσμάτων, των διαφορετικών γενετικών τόπων καθώς και των φαινοτύπων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεγάλη κλινική, γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια των περιπτώσεων ιδιοπαθούς ΝΥ με/ή χωρίς πολλαπλές ΣΑ καθώς εμπλέκονται εκατοντάδες γενετικοί τόποι, των οποίων η ανεύρεση αυξάνεται καθημερινά. Μια προσπάθεια κατηγοριοποίησης των ποσοστών των αποτελεσμάτων έγινε στον **πίνακα 4.1**

Με βάση το είδος του αποτελέσματος:

Deletion	Duplication	Deletion + Duplication
27	14	7

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία όταν υπάρχει αρνητικό ισοζύγιο γονιδίων, δηλαδή στα σύνδρομα μικροελλείμματος, υπάρχει πιο βαριά κλινική εικόνα σε σχέση με τα σύνδρομα μικροδιπλασιασμών. (40)

Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις CNVs

Ασθενής #3

Στον συγκεκριμένο ασθενή βρέθηκαν 2 CNVs που θεωρήθηκαν παθολογικά καθώς περιλαμβάνουν τις περιοχές 2 γνωστών συνδρόμων, του συνδρόμου Wolf- Hirschhorn και του συνδρόμου Phelan Mcdermik. Η κλινική εικόνα του παιδιού αυτού, εκτός της ΝΥ, ήταν μικροκεφαλία, ιδιόμορφο προσωπείο καθώς και σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση. Το σύνδρομο Wolf- Hirschhorn ([#194190](#)), με επιπολασμό 1/50000 γεννήσεις, χαρακτηρίζεται από σοβαρή αναπτυξιακή και νοητική υστέρηση και ιδιόμορφο προσωπείο που χαρακτηρίζεται ως «κράνος Έλληνα πολεμιστή», με ευρεία βάση ρινός, μικροκεφαλία, υπερτελορισμό, επίκανθο, πολύ τοξωτά φρύδια, μικρό φίλτρο, μικρογναθία, όχι καλά σχηματισμένα ώτα και πολλές φορές με λαγόχειλο. (εικόνα 4.1)

Επιπλέον, το σύνδρομο Phelan Mcdermik ([#606232](#)), είναι μια αναπτυξιακή διαταραχή με υπεύθυνο γονίδιο το SHANK3, που βρίσκεται στην περιοχή 22q13.33. Κοινά χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι η νεογνική υποτονία, η γενικευμένη αναπτυξιακή καθυστέρηση, απουσία ή σοβαρή καθυστέρηση του λόγου και αυτιστικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 4.1 σ. Wolf- Hirschhorn «κράνος Έλληνα πολεμιστή»

✚SATB2- Associated syndrome

Το σύνδρομο που οφείλεται σε διπλασιασμό της περιοχής 2q33.1 και περιλαμβάνει το γονίδιο SATB2 βρέθηκε σε 3 ασθενείς (#31, #18, #43). Το γονίδιο κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση και στην αναδίπλωση της χρωματίνης. Το SATB2- Associated syndrome (SAS) , είναι μια πολυσυστηματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από σημαντικά νευροαναπτυξιακά προβλήματα, όπως περιορισμένη ή απουσία λόγου, προβλήματα συμπεριφοράς και αναπτυξιακή καθυστέρηση/NY. Οι 3 ασθενείς στους οποίους βρέθηκε το παραπάνω σύνδρομο μικροδιπλασιασμού παρουσιάζουν τις παραπάνω διαταραχές και παρουσιάζουν ακριβώς το ίδιο μέγεθος διπλασιασμού 150kb.

✚ Ασθενής #25

Μωρό θήλυ 13 μηνών προσήλθε στο Ιατρείο της Κλινικής Γενετικής λόγω ήπιας αναπτυξιακής καθυστέρησης και αυξημένο βάρος. Επίσης είχε παρουσιάσει και σπασμούς και για το λόγο αυτό έκανε και MRI , το οποίο ήταν παθολγικό με σημάδια πολυμικρογυρίας. Τα αποτελέσματα του Μοριακού Καρυοτύπου έδειξαν ένα διπλασιασμό στην περιοχή Χρ11.4 μεγέθους 17.1 Mb, το οποίο μετά από ανάλυση και των γονέων βρέθηκε ότι ήταν de novo. Η περιοχή αυτή σχετίζεται με την Υπομελάνωση του ΙΤΟ , την τρίτη πιο συχνή νευροδερματική νόσο μετά την Νευροϊνωμάτωση τύπου 1 και την Οζώδη Σκλήρυνση. Κύριο χαρακτηριστικό της Υπομελάνωσης του ΙΤΟ είναι τα στίγματα αποχρωματισμού πάνω στις γραμμές

Blashko στα άκρα και τον κορμό. Αυτός είναι και ο λόγος που εμφανίζονται διαταραχές του νευρικού και του μυοσκελετικού συστήματος.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Verma V , Paul A , Amrapali Vishwanath A , Vaidya B , Clement JP. Understanding intellectual disability and autism spectrum disorders from common mouse models: synapses to behaviour. *Open Biol.* 2019 Jun 28;9(6):180265
- [2] Carninci P. et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science.* 2006 Mar 24;311(5768):1713
- [3] Chelly J , Khelfaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet.* 2006 Jun;14(6):701-13
- [4] Galasso C , Lo-Castro A, El-Malhany N, Curatolo P. "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital J Pediatr.* 2010 Feb 14;36:17. doi: 10.1186/1824-7288-36-17.
- [5] Coutton C , Dieterich K, Satre V, Vieville G, Amblard F, David M, Cans C, Jouk PS, Devillard F. Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. *Eur J Pediatr.* 2015 Jan;174(1):75-83. doi: 10.1007/s00431-014-2367-6. Epub 2014 Jul 3.
- [6] Bulayeva K , Lesch KP, Bulayev O, Walsh C, Glatt S, Gurganova F, Omarova J, Berdichevets I, Thompson PM. Genomic structural variants are linked with intellectual disability. *J Neural Transm (Vienna).* 2015 Sep;122(9):1289-301. doi: 10.1007/s00702-015-1366-8. Epub 2015 Jan 28.
- [7] Lee K , Cascella M , Marwaha R. Intellectual Disability. StatPearls Publishing; 2019 Oct. : 31613434
- [8] Altınır Ş , Yürür Kutlay N. Importance of patient selection criteria in determining diagnostic copy number variations in patients with multiple congenital anomaly/mental retardation. *Mol Cytogenet.* 2019 May 27;12:23. doi: 10.1186/s13039-019-0436-2. eCollection 2019.
- [9] Shea SE. Intellectual disability (mental retardation). *Pediatr Rev.* 2012 Mar;33(3):110-21; quiz 120-1. doi: 10.1542/pir.33-3-110.
- [10] Purugganan O1. Intellectual Disabilities. *Pediatr Rev.* 2018 Jun;39(6):299-309. doi: 10.1542/pir.2016-0116.
- [11] Vasudevan P1, Suri M2. A clinical approach to developmental delay and intellectual disability. *Clin Med (Lond).* 2017 Dec;17(6):558-561. doi: 10.7861/clinmedicine.17-6-558.
- [13] Srour M1, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Child.* 2014 Apr;99(4):386-9. doi: 10.1136/archdischild-2013-304063. Epub 2013 Dec 16.
- [14] Willemsen MH1, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet.* 2014 Feb;85(2):101-10. doi: 10.1111/cge.12244. Epub 2013 Aug 26.
- [15] Baker AH, Thrasher AJ. Editorial overview: New technologies. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Oct;24:vii-viii. doi: 10.1016/j.coph.2015.09.005. Epub 2015 Sep 28.
- [16] van Bokhoven H Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet.* 2011;45:81-104. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132512. Epub 2011 Sep 9.
- [17] van Bokhoven H. Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Ann Rev Genet* 2011; 45: 81.104

- [18] Ropers HH Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:161-87. doi: 10.1146/annurev-genom-082509-141640.
- [19] Leonard H, Foley KR, Pikora T, Bourke J, Wong K, McPherson L, Lennox N, Downs J. Transition to adulthood for young people with intellectual disability: the experiences of their families. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2016 Dec;25(12):1369-1381. Epub 2016 May 11.
- [20] Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Res.* 2016 Apr 7;5. pii: F1000 Faculty Rev-599. doi: 10.12688/f1000research.7134.1. eCollection 2016.
- [21] Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991 Aug 23;66(4):817-22.
- [22] Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):9-18. doi: 10.1038/nrg3999. Epub 2015 Oct 27.
- [23] Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability . *Arch Dis Child* 2014; 99: 386– 9
- [24] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, et al. (2010). Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 749-7
- [25] Wallace RA. Genetic testing of aetiology of intellectual disability in a dedicated physical healthcare outpatient clinic for adults with intellectual disability. *Intern Med J.* 2016 Feb;46(2):177-85. doi: 10.1111/imj.12946.
- [26] Sharma P, Gupta N, Chowdhury MR, Sapra S, Ghosh M, Gulati S, Kabra M.. Application of chromosomal microarrays in the evaluation of intellectual disability/global developmental delay patients - A study from a tertiary care genetic centre in India. *Gene.* 2016 Sep 15;590(1):109-19. doi: 10.1016/j.gene.2016.06.020. Epub 2016 Jun 9.
- [27] Sherr EH, Michelson DJ, Shevell MI, et al. Neurodevelopmental disorders and genetic testing: current approaches and future advances. *Ann Neurol* 2013;74:164–70.
- [28] Marrus N, Hall L. Intellectual Disability and Language Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2017 Jul;26(3):539-554. doi: 10.1016/j.chc.2017.03.001.
- [29]. Iafrate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W., and Lee, C . Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat.Genet.* 2004; 36, 949–951.
- [30] McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM; International HapMap Consortium. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet.* 2006 Jan;38(1):86-92.
38. Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schröder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat EA, Lingen M, Grzmil P, Schulze S, Keyser J, Weise D, Borchers M, Hobbiebrunken E, Röhl M, Gärtner J, Brockmann K, Zirn B. (2012) Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet* 2013; 83: 53–65
39. Tak Yeung Leung , Ritsuko K Pooh , Chi Chiu Wang , Tze Kin Lau and Kwong Wai Choy (2010) Classification of pathogenic or benign status of CNVs detected by microarray analysis . *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10(6), 717–721

40. Nicolien M Hanemaaijer, Birgit Sikkema-Raddatz, Gerben van der Vries, Trijnie Dijkhuizen, Roel Hordijk, Anthonie J van Essen , Hermine E Veenstra-Knol , Wilhelmina S Kerstjens-Frederikse, Johanna C Herkert , Erica H Gerkes , Lamberta K Leegte, Klaas Kok , Richard J Sinke and Conny MA van Ravenswaaij-Arts (2012) Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics European Journal of Human Genetics 20, 161–165
41. XShigeki Iwase, XNathalie G. Be´rube´, Zhaolan Zhou, XNael Nadif Kasri, Elena Battaglioli, Marilyn Scandaglia and XAngel Barco (2017) Epigenetic Etiology of Intellectual Disability The Journal of Neuroscience, 37(45):10773–10782