



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



Νοσοκομείο Παιδών
"Η Αγία Σοφία"

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ «Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»

ΚΑΙ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΙΤΛΟΣ:

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΕΠΟΜΕΝΗΣ
ΓΕΝΙΑΣ (NGS) ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

ΤΑΤΣΗ ΕΛΙΣΑΒΕΤ-ΒΑΡΒΑΡΑ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ, 2020



ΕΛΙΔΕΚ.
Ελληνικό Ίδρυμα
Έρευνας & Καινοτομίας



Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων» (74156/2017).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. **Χριστίνα Κανακά-Gantenbein**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας, Διευθύντρια της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
2. **Ανδρέας Σκορίλας**, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Γεώργιος Χρούσος**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής και Διευθυντής Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου Υγείας Μητέρας, Παιδιού και Ιατρικής Ακρίβειας του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 16.06.2016

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 30.06.2016

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. **Χριστίνα Κανακά-Gantenbein**, Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας, Διευθύντρια της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
2. **Ανδρέας Σκορίλας**, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. **Γεώργιος Χρούσος**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής και Διευθυντής Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου Υγείας Μητέρας, Παιδιού και Ιατρικής Ακρίβειας του Πανεπιστημίου Αθηνών
4. **Νικόλαος Τεντολούρης**, Καθηγητής παθολογίας και Υπεύθυνος της Διαβητολογικής Μονάδας και του Ερευνητικού Διαβητολογικού Εργαστηρίου, Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό»
5. **Ιωάννα-Ραχήλ Traeger-Συνοδινού**, Καθηγήτρια Γενετικής στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών
6. **Εμμανουήλ Ζουμάκης**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
7. **Χρήστος Κοντός**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 22.11.2019

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 27.01.2020

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν αποτελεί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202 του Νόμου 5343).

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο: Τάτση Ελισάβετ-Βαρβάρα
Ημερομηνία Γέννησης: 21 Σεπτεμβρίου 1989
Τόπος Γέννησης: Αθήνα, Ελλάδα
Email: etatsi@med.uoa.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 6/2016-Σήμερα **Υποψήφια διδάκτορας, Ιατρικής Σχολής, Ε.Κ.Π.Α.**
Θέμα: «Εφαρμογή Μεθοδολογιών Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς (NGS) στη Διάγνωση Γενετικών Ενδοκρινολογικών Νοσημάτων», Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» και Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών Ε.Κ.Π.Α.
- 3/2019 **A UCSC Genome Browser workshop**, Σύνδεσμο Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας (ΣΙΓΕ), Αθήνα
- 10/2015 **OMICS SCHOOL**, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens and Neurinox, Αθήνα
- 2/2014-2/2016 **ΜΠΣ: Μοριακή Ιατρική, Τμήμα Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α.** (Άριστα 8,57)
Διπλωματική: «Ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *KCNJ11* και *PCBD1* σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY», Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»
2^ο ROTATION: «Μελέτη του ρόλου της προφιλίνης-1 σε καρκινικό πρότυπο ουροδόχου κύστεως», Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α. και Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α.
1^ο ROTATION: «Χαρακτηρισμός της έκφρασης και του ενδοκυττάριου εντοπισμού μεγάλων μη κωδικών RNA στο εντερικό επιθήλιο», Ε.Κ.Β.Ε. Alexander Fleming
- 10/2007-1/2013 **Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Ε.Κ.Π.Α.** (Λίαν Καλώς 6,55)
Πτυχιακή: «Ενζυμικός χαρακτηρισμός των μεταλλαγμένων μορφών της ανθρώπινης RNase κ», Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών Ε.Κ.Π.Α.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1-3/2018 **Introduction to Genetics and Evolution** by Duke University and Coursera
- 12/2017-2/2018 **From Disease to Genes and Back** by Novosibirsk State University and Coursera
- 11/2015-1/2016 **Bioinformatics: Genomes and Algorithms** by Inria (Informatics mathematics) and the platform FUN (France Universite Numerique)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

8/2017-6/2019 «1η Προκήρυξη ΕΛΙΔΕΚ για Υποψήφιους Διδάκτορες» από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Elizabeth Barbara Tatsi**, Christina Kanaka-Gantenbein, Andreas Scorilas, George P. Chrousos, Amalia Sertedaki. Next Generation Sequencing Targeted Gene Panel in Greek MODY patients increases diagnostic accuracy. *Pediatric Diabetes*. *Pediatr Diabetes* 2020;21(1):28-39.
2. Theocharis Koufakis, Amalia Sertedaki, **Elizabeth-Barbara Tatsi**, Christina-Maria Trakatelli, Spyridon N. Karras, Eleni Manthou, Christina Kanaka-Gantenbein, Kalliopi Kotsa. First Report of Diabetes Phenotype due to a Loss-of-Function *ABCC8* Mutation Previously Known to Cause Congenital Hyperinsulinism. *Case Reports in Genetics* 2019;2019:3654618.
3. Aikaterini Patsoura, **Elizabeth Tatsi**, Alexandra Margeli, Ino Kanavaki, Polyxeni Delaporta, Dimitra Kyriakopoulou, Alexandra Kouraklis-Symeonidis, Antonios Kattamis, Ioannis Papassotiriou. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels are markedly increased in patients with non-transfusion-dependent thalassemia: Lack of association with markers of erythropoiesis, iron metabolism and renal function. *Clinical Biochemistry* 2014;47(12):1060-4.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-POSTERS

- 9/2019 **“Whole Exome Sequencing (WES) reveals oligogenic gene mutations in a case of Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD)”**, A. Sertedaki, E.B. Tatsi, E. Nikaina, I.A. Vassilakis, I. Fylaktou, N. Iacovidou, S. Siahianidou, C. Kanaka-Gantenbein. Poster Presentation, 58th Annual Meeting of European Society of Pediatric Endocrinology, Vienna, Austria.
- 9/2019 **“Next Generation Sequencing in Greek MODY patients increases diagnostic accuracy and reveals a high percentage of MODY12 cases”** E.B. Tatsi, A. Sertedaki, A. Scorilas, G. Chrousos, C. Kanaka-Gantenbein. Oral Presentation, 58th Annual Meeting of European Society of Pediatric Endocrinology, Vienna, Austria.
- 05/2019 **“Large phenotypic variability of diabetes due to ABCC8 gene mutation illustrated by the paradigm of a family”**, T. Koufakis, A. Sertedaki, E.B. Tatsi, C.-M. Trakatelli, S. Karras, C. Kanaka-Gantenbein & K. Kotsa. Poster Presentation, 21st European Congress of Endocrinology, Lyon, France.
- 05/2019 **Next generation sequencing reveals ABCC8 (MODY 12) variants in two families with diabetes mellitus (DM)**, A. Markou, A. Sertedaki, E. Tatsi, G. Piaditis, T. Kounadi & C. Kanaka-Gantenbein. Poster Presentation, 21st European Congress of Endocrinology, Lyon, France.
- 4/2019 **«ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ (NGS) ΣΕ 50 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΔΙΑΒΗΤΗ (ΜΔ) MODY»**, Προφορική Ανακοίνωση στο 46^ο

Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη Διαβήτη, Αθήνα, Ελλάδα.

- 4/2019 **«ΜΕΓΑΛΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΣΕ ΜΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ R1352H ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ABCC8».** Θ. Κουφάκης, Σ. Καρράς, Α. Σερτεδάκη, Ε. Β. Τάτση, Μ. Γραμματική, Ξ. Τσεκμεκίδου, Χ. Κανακά- Gantenbein, Κ. Κώτσα. ePoster Presentation, στο 46^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη Διαβήτη, Αθήνα, Ελλάδα.
- 4/2019 **«ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΥΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ (ΣΔ) ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ABCC8 (MODY12)».** Α. Μάρκου, Α. Σερτεδάκη, Ε. Τάτση, Γ. Πιαδίτης, Θ. Κουνάδη, Χ. Κανακά-Gantenbein. ePoster Presentation, στο 46^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη Διαβήτη, Αθήνα, Ελλάδα.
- 9/2018 **“The application of Next Generation Sequencing MODY gene panel in Greek patients”**, E. Tatsi, P. Smirnaki, P. Triantafilou, K. Tsiroukidou, K. Kotsa, V. Lambadiari, G. Chrousos, C. Kanaka-Gantenbein, A. Sertedaki. ePoster Presentation, 57th Annual Meeting of European Society of Pediatric Endocrinology, Athens, Greece.
- 1/2016 **«Ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων KCNJ11 και PCBD1 σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY»**, Μετεκπαιδευτικά Σεμινάρια της Μονάδας Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Διαβήτη της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» και της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 11/2019-Σήμερα **Εργαστήριο Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας, Α' Παιδιατρική Κλινική Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία»**
- FilmArray ME panel (Multiplex PCR)
 - Απομόνωση ιικού RNA
 - Αντίστροφη μεταγραφή
 - Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
 - Αλληλούχηση κατά Sanger
 - Ανοσοχρωματογραφικές διαγνωστικές δοκιμασίες
 - Ανοσοχημική μέθοδος οροτύπησης
 - Χρήση οπτικού μικροσκοπίου
- 7/2015-8/2017 **Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία»**
- Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα
 - Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
 - Αλληλούχηση κατά Sanger
 - MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)
- 7-10/2013 **Ανοσολογικό Τμήμα Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας- Πειραιά «Ο Άγιος Παντελεήμων»**
- Χρήση μικροσκοπίου φθορισμού
 - ELISA
 - Ανοσοαποτύπωση

- Ανοσοκαθήλωση
- Ισοηλεκτρική Εστίαση
- Νεφελομετρία

3-6/2013

Βιοχημικό Τμήμα Νοσοκομείου Παιδων «Η Αγία Σοφία»

- Χρήση Βιοχημικών Αναλυτών
- Νεφελομετρία
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης (HPLC)
- Ατομική Απορρόφηση

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Ελληνικά (Μητρική γλώσσα)

Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English, University of Michigan / C2)

Ιταλικά (Certificate Statale di Conoscenza delle Lingue / B1)

ECDL Core Certificate (Concepts of IT, Using the Computer and Managing Files, Word Processing, Spreadsheets, Databases, Presentations, Information and Communication)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο διαγνωστικό και ερευνητικό εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία» και στο Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την χρονική περίοδο Ιούνιος 2016 – Ιανουάριος 2020.

Αισθάνομαι βαθιά την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας, Διευθύντρια της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών Νοσοκομείου Παιδών «Η Αγία Σοφία» και επιβλέπουσα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, κα Χριστίνα Κανακά-Gantenbein, καθώς και τη Γενετίστρια-Ε.Δ.Ι.Π. κα Αμαλία Σερτεδάκη, οι οποίες μου έδωσαν την ευκαιρία να γίνω μέλος της ομάδας τους στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας αναθέτοντας μου την διεκπεραίωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο: «Εφαρμογή μεθοδολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) στη διάγνωση γενετικών ενδοκρινολογικών νοσημάτων». Θα ήθελα, επίσης, να τις ευχαριστήσω για τις ευκαιρίες που μου έδωσαν όσο ήμουν κοντά τους, για όσα με δίδαξαν καθώς και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές τους.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας, κο Ανδρέα Σκορίλα για τη συνεργασία και την προσφορά της πλατφόρμας Ion Torrent PGM για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αλληλούχησης επόμενης γενιάς στο εργαστήριό του στο Τμήμα Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., και τον Ομότιμο Καθηγητή Παιδιατρικής και Διευθυντή του Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου Υγείας Μητέρας, Παιδιού και Ιατρικής Ακρίβειας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κο Γεώργιο Χρούσο, για την πολύτιμη βοήθεια του, τις συμβουλές του και τις παρατηρήσεις του.

Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, κο Χρήστο Κοντό, τον Βιολόγο και Διδάκτορα, κο Παναγιώτη Αδαμόπουλο και τον Βιολόγο και Υποψήφιο Διδάκτορα, κο Παναγιώτη Τσιακανίκα, οι οποίοι με υποδέχτηκαν με χαρά στο εργαστήριο του κο Ανδρέα Σκορίλα, με εκπαίδευσαν και με καθοδήγησαν στην διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της αλληλούχησης επόμενης γενιάς.

Ευχαριστώ τον Μοριακό Βιολόγο και Υποψήφιο Διδάκτορα κο Νίκο Μαρινάκη και την Μοριακή Βιολόγο και Διδάκτορα κα Ειρήνη Φυλακτού για την πολύτιμη βοήθεια τους στην χρήση των *in silico* προγραμμάτων και στην αξιολόγηση των γενετικών παραλλαγών.

Ευχαριστώ το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) για την υποτροφία που μου παρείχαν προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου σε αυτούς τους δύσκολους οικονομικά καιρούς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τη μητέρα μου Καίτη, τον πατέρα μου Χρήστο, τα αδέρφια μου Αποστόλη και Σπυριδούλα, τη Δέσποινα, τον Μιχάλη και τα ανίψια μου Χρήστο και Αγάπη, που ήταν δίπλα μου στα όνειρα μου, με εμπύχωναν και μου έδιναν δύναμη να συνεχίσω όποτε με λύγιζαν οι δυσκολίες. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τις βιολόγους φίλες μου, Μαρία Τάιχερτ, Ιωάννα Κοκκινοπούλου και Αθανασία Δρακουλιά, οι οποίες ήταν δίπλα μου σε κάθε στιγμή της ζωής μου, με στήριξαν και μου πρόσφεραν την πολύτιμη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους όποτε τις χρειάστηκα.

Αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή στην οικογένεια μου για την ανιδιοτελή αγάπη τους και συμπαράστασή τους και εύχομαι ολόψυχα η διατριβή αυτή να συμβάλλει σημαντικά στη γνώση της μοριακής αιτιολογίας σημαντικών γενετικών ενδοκρινολογικών νοσημάτων.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	ix
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
ABBREVIATIONS - ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xx
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ Β-ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ.....	3
1.1.1 Ανατομία και φυσιολογία του παγκρέατος	3
1.1.2 Ομοιόσταση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα	3
1.1.3 Μηχανισμός έκκρισης και δράση της ινσουλίνης.....	4
1.1.4 ATP-εξαρτώμενος διάυλος καλίου (K _{ATP}).....	5
1.1.5 Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης.....	6
1.1.6 Συγγενής Υπερινσουλινισμός	13
1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ	20
1.2.1 Υποθάλαμος - Υπόφυση.....	20
1.2.2 Οντογένεση Υπόφυσης	21
1.2.3 Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια	22
1.3 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ.....	30
1.3.1 Οντογένεση γονάδων.....	31
1.3.2 Ορολογία και κατηγοριοποίηση των ΔΔΦ	33
1.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ.....	38
1.4.1 Πρωτόκολλα NGS.....	39
1.4.2 Επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων του NGS.....	40
1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ NGS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	42
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	45
2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	46
2.1.1 Ασθενείς με Μονογονιδιακό Σακχαρώδη Διαβήτη MODY	46
2.1.2 Ασθενείς με Συγγενή Υπερινσουλινισμό	47
2.1.3 Ασθενείς με Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια	47
2.1.4 Ασθενείς με Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου	48
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών	49
2.2.2 Στοχευμένη Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς.....	51

2.2.3	Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος	57
2.2.4	Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	58
2.2.5	Σχεδιασμός Εκκινητών	63
2.2.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	66
2.2.7	Καθαρισμός του προϊόντος της PCR	69
2.2.8	Αλληλούχηση κατά Sanger	70
2.2.9	Καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης αλληλούχησης	71
2.2.10	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης	71
2.2.11	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	72
2.2.12	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	75
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	77
3.1	ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΣΔ MODY	77
3.1.1	Παραλλαγή p.A259T του γονιδίου <i>GCK</i>	78
3.1.2	Παραλλαγή c.1019+5G>A του γονιδίου <i>GCK</i>	79
3.1.3	Παραλλαγή p.C371X του γονιδίου <i>GCK</i>	80
3.1.4	Παραλλαγή p.Y61X του γονιδίου <i>GCK</i> και p.L135V του γονιδίου <i>ABCC8</i>	81
3.1.5	Παραλλαγή p.N402Y του γονιδίου <i>HNF1A</i>	83
3.1.6	Παραλλαγή p.R200Q του γονιδίου <i>HNF1A</i>	84
3.1.7	Παραλλαγή p.E285K του γονιδίου <i>HNF4A</i>	86
3.1.8	Παραλλαγή p.R181Q του γονιδίου <i>HNF1B</i>	87
3.1.9	Παραλλαγή p.G76C του γονιδίου <i>HNF1B</i>	89
3.1.10	Παραλλαγή p.A355T του γονιδίου <i>ABCC8</i>	90
3.1.11	Παραλλαγή p.M1514T του γονιδίου <i>ABCC8</i>	92
3.1.12	Παραλλαγή p.R1353H του γονιδίου <i>ABCC8</i>	93
3.1.13	Παραλλαγή p.E1206K του γονιδίου <i>ABCC8</i>	95
3.1.14	Παραλλαγή p.S1386P του γονιδίου <i>ABCC8</i>	96
3.1.15	Απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου <i>HNF1B</i>	97
3.2	ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΗ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟ.....	100
3.2.1	Παραλλαγή p.G716D του γονιδίου <i>ABCC8</i>	100
3.2.2	Παραλλαγές p.R526C και p. I445Sfs*5 του γονιδίου <i>ABCC8</i>	101
3.2.3	Παραλλαγή p.S385C του γονιδίου <i>KCNJ11</i>	102
3.2.4	Παραλλαγή p.V71A του γονιδίου <i>GCK</i>	103
3.2.5	Παραλλαγή p.R333P του γονιδίου <i>HNF4A</i>	104
3.2.6	Παραλλαγές p.P445S του γονιδίου <i>HNF4A</i> και c.2542+3A>G του γονιδίου <i>INSR</i> 106	

3.2.7	Διερεύνηση συχνότητας της παραλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου <i>KCNJ11</i> στον Ελληνικό πληθυσμό.....	108
3.3	ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	109
3.3.1	Ανάλυση δείγματος ΠΥΑ1	109
3.3.2	Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΠΥΑ1	112
3.3.3	Ανάλυση δείγματος ΠΥΑ2	116
3.3.4	Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΠΥΑ2	120
3.4	ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ..	123
3.4.1	Ανάλυση δείγματος ΔΔΦ1.....	123
3.4.2	Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΔΔΦ1	126
3.4.3	Ανάλυση δείγματος ΔΔΦ2.....	129
3.4.4	Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΔΔΦ2	132
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	137
4.1	ΜΣΔ MODY	137
4.2	ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟΣ	141
4.3	ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	144
4.3.1	Ασθενής ΠΥΑ1	144
4.3.2	Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΠΥΑ1	147
4.3.3	Ασθενής ΠΥΑ2	147
4.3.4	Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΠΥΑ2	150
4.4	ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ.....	151
4.4.1	Ασθενής ΔΔΦ1.....	151
4.4.2	Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΔΔΦ1	153
4.4.3	Ασθενής ΔΔΦ2.....	153
4.4.4	Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΔΔΦ2	155
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	156
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	160
7	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	175

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Μεγάλος αριθμός ενδοκρινολογικών νοσημάτων έχει γενετική αιτιολογία. Η εφαρμογή των μέχρι σήμερα ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατικών τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας (π.χ. αλληλούχηση κατά Sanger) αδυνατεί να αποσαφηνίσει σε πολλές περιπτώσεις την γενετική διαταραχή. Την αδυναμία αυτή καλύπτει η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία επιτρέπει την παράλληλη και μαζική αλληλούχηση πολλών γονιδίων σε πολλούς ασθενείς ταυτόχρονα σε μια μόνο δοκιμασία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενδοκρινολογικών νοσημάτων, των οποίων η αναγνώριση της μοριακής διαταραχής δεν είναι πάντα εφικτή με τις συμβατικές μεθόδους, αποτελούν ο Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης (ΜΣΔ) MODY, ο Συγγενής Υπερinsουλινισμός (ΣΥ), η Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια (ΠΥΑ) και οι Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου (ΔΔΦ). Ασθενείς με ΜΣΔ MODY και ΣΥ παρουσιάζουν διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ΜΣΔ MODY παρουσιάζουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και κατά συνέπεια υπεργλυκαιμία, ενώ ασθενείς με ΣΥ παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, δυσανάλογη προς τα κυκλοφορούντα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, και κατά συνέπεια υπογλυκαιμία. Ασθενείς με ΠΥΑ μπορεί να παρουσιάζουν ανατομικές ανωμαλίες της υπόφυσης και δυσμορφίες του προσώπου, καθώς και ανεπάρκεια τουλάχιστον δύο ορμονών της υπόφυσης, ενώ ασθενείς με ΔΔΦ παρουσιάζουν διαταραχές στον εμβρυολογικό καθορισμό και στην διαφοροποίηση του χρωμοσωμικού, γοναδικού και ανατομικού φύλου, με αποτέλεσμα την γέννηση νεογνών με αμφίβολα ή ασαφή έξω γεννητικά όργανα. Η μοριακή ταυτοποίηση της διαταραχής είναι θεμελιώδους σημασίας, όχι μόνο για την αναγνώριση των παθολογικών παραλλαγών των γονιδίων, τα οποία ευθύνονται για τα παραπάνω νοσήματα, αλλά και για τον συσχετισμό φαινότυπου-γονότυπου, για τη θεραπεία, την πρόγνωση και την αναγνώριση συνοδών χαρακτηριστικών της νόσου καθώς και για την παροχή γενετικής συμβουλευτικής στον ασθενή και στην οικογένεια του. Επιπλέον, προϋπόθεση για την ορθολογική αντιμετώπιση του νεογνού με ΔΔΦ αποτελεί η ταυτοποίηση της μοριακής βλάβης, η οποία μπορεί να καθορίσει την απόφαση για το φύλο του παιδιού, απόφαση με σημαντικές συνέπειες στην ψυχοκοινωνική προσαρμογή και τη μελλοντική ποιότητα της ζωής του.

Σκοπός: Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση της μοριακής διαταραχής, ασθενών με γενετικά ενδοκρινολογικά νοσήματα, στους οποίους οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές μοριακής ανάλυσης απέτυχαν να εντοπίσουν την μοριακή βλάβη, με την εφαρμογή μεθοδολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing Targeted Gene Panel, NGS TGP και Whole Exome Sequencing, WES). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε

η γενετική αιτία 50 ασθενών με MODY, 17 ασθενών με ΣΥ, 2 ασθενών με ΠΥΑ και 2 ασθενών με ΔΔΦ.

Ασθενείς και Μέθοδοι: Πενήντα ασθενείς με MODY ελέγχθηκαν για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών σε μια ομάδα 7 γονιδίων (*GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* και *KCNJ11*), τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με τον ΜΣΔ MODY. Δεκαεπτά ασθενείς με ΣΥ ελέγχθηκαν για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών στην παραπάνω ομάδα γονιδίων, πολλά από τα οποία έχουν συνδεθεί με το ΣΥ αλλά και σε ακόμα 5 γονίδια (*GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SLC16A1*, *TRMT10A*), τα οποία επίσης σχετίζονται με τον ΣΥ. Οι ασθενείς με MODY ή ΣΥ, στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε παθολογική παραλλαγή με την μεθοδολογία του NGS, ελέγχθηκαν για απαλείψεις και διπλασιασμούς των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8* με την μέθοδο του MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΥ στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε παθολογική παραλλαγή με την μεθοδολογία του NGS, ελέγχθηκαν και για την παρουσία των παθολογικών ιντρονικών παραλλαγών c.1333-1013A>G του γονιδίου *ABCC8* και c.636+471G>T του γονιδίου *HADH* με την αλληλούχηση κατά Sanger. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, ακόμη, διερευνήθηκε η συχνότητα της παραλλαγής p.S385C του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό. Με τη μέθοδο WES ελέγχθηκαν 2 ασθενείς με ΠΥΑ και 2 ασθενείς με ΔΔΦ, με σκοπό την ανίχνευση παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για το φαινότυπό τους. Όλες οι παθολογικές παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν με την μεθοδολογία του NGS, επιβεβαιώθηκαν με την αλληλούχηση κατά Sanger.

Αποτελέσματα: Στο 28% (14/50) των ασθενών με MODY ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* (8%, 4/50), *GCK* (8%, 4/50), *HNF1A* (6%, 3/50), *HNF1B* (4%, 2/50) και *HNF4A* (2%, 1/50). Στο 6% (3/50) βρέθηκαν αβέβαιης σημασίας παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8*. Καμία παθολογική παραλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στα γονίδια *KCNJ11* και *INS*. Πέντε νέες παθολογικές παραλλαγές ανιχνεύθηκαν: η p.C371X του γονιδίου *GCK*, η p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*, η p.E285K του γονιδίου *HNF4A*, η p.M1514T και η p.S1386F του γονιδίου *ABCC8*. Ακόμη, 2 ασθενείς με MODY έφεραν εκ νέου απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*. Στο 23.5% (4/17) των ασθενών με ΣΥ ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* (11.8%, 2/17), *GCK* (5.9%, 1/17) και *HNF4A* (5.9%, 1/17), ενώ στο 11.8% (2/17) των ασθενών με ΣΥ βρέθηκαν αβέβαιης σημασίας παραλλαγές των γονιδίων *KCNJ11*, *INSR* και *HNF4A*. Τρεις νέες παθολογικές παραλλαγές ανιχνεύθηκαν: η p.V71A του γονιδίου *GCK*, η p.R333P του γονιδίου *HNF4A* και η p.I445Sfs*5 του γονιδίου *ABCC8*. Η συχνότητα της παραλλαγής p.S385C του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό βρέθηκε να είναι 1.35% (>1%), δηλαδή πολυμορφισμός. Με την εφαρμογή του WES στους 2 ασθενείς με ΠΥΑ ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *HS6ST1*, *IL17RD*, *SOX9* (νέα παραλλαγή) και *BMP4*, *GNRH1*, *SRA1* αντίστοιχα, οι οποίες πιθανώς

ευθύνονται για κάποια από τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν, ενώ στους 2 ασθενείς με ΔΔΦ ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *TACR3*, *WNT7A* και *SAMD9* (εκ νέου παραλλαγή), *PMM2*, *ACTN4* αντίστοιχα, οι οποίες πιθανώς ευθύνονται για τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν.

Συμπεράσματα: Η εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS προσέφερε γενετική διάγνωση στο 28% των ασθενών με MODY και στο 23.5% των ασθενών με ΣΥ, επέτρεψε την ταυτοποίηση 5 νέων παθολογικών παραλλαγών σε ασθενείς με MODY και 3 σε ασθενείς με ΣΥ και αποκάλυψε ότι οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8* στους ασθενείς με MODY ήταν ισάριθμες με τις παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GCK* των ασθενών με MODY. Επιπλέον, με την εφαρμογή του WES στους προηγουμένως αδιάγνωστους ασθενείς με ΠΥΑ και στους ασθενείς με ΔΔΦ ανιχνεύθηκαν αρκετές παραλλαγές, οι οποίες ευθύνονται για τα κλινικά χαρακτηριστικά τους. Συμπεραίνεται ότι η εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS προσφέρει γρήγορα αποτελέσματα, αυξάνει την διαγνωστική ακρίβεια και είναι πιο οικονομική σε σύγκριση με την αλληλούχηση κατά Sanger. Συνεπώς, η μεθοδολογία του NGS αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση γενετικών ενδοκρινολογικών νοσημάτων.

ABSTRACT

Introduction: A large number of endocrinological disorders have genetic etiology. The application of hitherto widely used conventional techniques of Molecular Biology (e.g. Sanger sequencing) fails to clarify in many cases the genetic defect. This weakness is covered by Next Generation Sequencing (NGS), which allows the parallel and massive sequencing of many genes in many patients simultaneously in a single assay. Typical examples of endocrinological diseases whose identification of molecular disorder is not always feasible by conventional methods are the Monogenic Diabetes Mellitus MODY, the Congenital Hyperinsulinism (CHI), the Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD), and the Disorders of Sex Development (DSD). Patients with MODY and CHI have impaired insulin secretion from the beta cells of the islets of Langerhans of the pancreas. In particular, patients with MODY have reduced insulin secretion and hence hyperglycemia, whereas patients with CHI have increased insulin secretion, disproportionate to circulating blood glucose levels, and consequently hypoglycemia. Patients with CPHD may have anatomical pituitary abnormalities and facial malformations, as well as at least two pituitary hormone deficiencies, while patients with DSD may have abnormalities in sex determination and differentiation, resulting in newborns with ambiguous genitalia. The identification of molecular defect is of outmost importance, not only for the identification of the pathogenic variants of the responsible for the above disorders genes, but also for the phenotype-genotype correlation, for the treatment, the prognosis and the recognition of the accompanying features as well as providing genetic counseling to the patient and his/her family. In addition, the identification of molecular defect is important for the treatment of the newborn with DSD, as it can determine the decision on the sex of the child, a decision with significant impact on psychosocial adjustment and future quality of his/her life.

Objective: The aim of the present thesis was to identify the molecular defects by employing the methodology of next generation sequencing (Targeted Gene Panel, TGP or Whole Exome Sequencing, WES) in patients with genetic endocrinological disorders, in which the used techniques of molecular analysis have failed to detect the molecular defect. Specifically, the genetic defect of 50 patients with MODY, 17 patients with CHI, 2 patients with CPHD and 2 patients with DSD was investigated.

Patients and Methods: Fifty patients with MODY were screened for the detection of pathogenic variants in a group of 7 MODY genes (*GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* and *KCNJ11*). Seventeen patients with CHI were screened for the detection of pathogenic variants in the above gene group, many of which have been linked also to CHI, and additionally in 5 CHI genes (*GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SLC16A1*, *TRMT10A*). Patients with MODY or CHI, in whom did not detect pathogenic

variants employing NGS methodology, were screened for deletions and duplications of *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* and *ABCC8* genes employing MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe). In addition, the genetically undiagnosed patients with CHI were also tested for the pathogenic intronic variants c.1333-1013A>G of the *ABCC8* gene and c.636+471G>T of the *HADH* gene employing Sanger sequencing. In the present thesis, the frequency of the p.S385C variant of the *KCNJ11* gene in the Greek population was also investigated. In order to detect pathogenic variants responsible for the phenotype characteristics of 2 patients with CPHD and 2 patients with DSD were used WES. All pathogenic variants detected employing the NGS methodology were confirmed by Sanger sequencing.

Results: The 28% (14/50) of MODY patients carried pathogenic variants of the *ABCC8* (8%, 4/50), *GCK* (8%, 4/50), *HNF1A* (6%, 3/50), *HNF1B* (4%, 2/50) and *HNF4A* (2%, 1/50) genes, while the 6% (3/50) of the patients carried variants of uncertain significance of the *ABCC8* gene. No pathogenic variants were detected in the *KCNJ11* and *INS* genes. Five novel pathogenic variants were identified: p.C371X of the *GCK* gene, p.N402Y of the *HNF1A* gene, p.E285K of the *HNF4A* gene, p.M1514T and p.S1386F of the *ABCC8* gene. In addition, 2 unrelated patients with MODY carried *de novo* heterozygous deletion of the whole *HNF1B* gene. The 23.5% (4/17) of patients with CHI carried pathogenic variants of the *ABCC8* (11.8%, 2/17), *GCK* (5.9%, 1/17) and *HNF4A* (5.9%, 1/17) genes, whereas the 11.8% (2/17) of the patients with CHI carried variants of uncertain significance of the *KCNJ11*, *INSR* and *HNF4A* genes. Three novel pathogenic variants were detected: p.V71A of the *GCK* gene, p.R333P of the *HNF4A* gene and p.I445Sfs * 5 of the *ABCC8* gene. The frequency of p.S385C variant of the *KCNJ11* gene in the Greek population was found to be polymorphism (1.35% > 1%). The application of WES in 2 patients with CPHD revealed pathogenic variants of the *HS6ST1*, *IL17RD* and *SOX9* (novel variant) genes in the first patient and pathogenic variants of the *BMP4*, *GNRH1* and *SRA1* genes in the second patient, which are probably responsible for some of their clinical characteristics. Moreover, the application of WES in 2 patients with DSD unveiled pathogenic variants of the *TACR3*, *WNT7A* genes and *SAMD9* (*de novo* variant), *PMM2*, *ACTN4* genes respectively, which are probably responsible for their clinical characteristics.

Conclusions: The application of the NGS methodology provided genetic diagnosis in 28% of patients with MODY and 23.5% of patients with CHI, allowed the identification of 5 novel pathogenic variants in patients with MODY and 3 in patients with CHI. It has also revealed that pathogenic variants of the *ABCC8* gene detected in patients with MODY were equal to the pathogenic variants of the *GCK* gene detected in the same MODY cohort. In addition, the application of WES in previously undiagnosed patients with CPHD and patients with DSD, unveiled several variants which are probably responsible for their clinical features. It is concluded that the

application of the NGS methodology provides rapid results, increases diagnostic accuracy and is more cost-effective than Sanger sequencing. Therefore, the NGS methodology constitutes a useful and powerful tool for the diagnosis of genetic endocrinological disorders.

ABBREVIATIONS - ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A: Adenine, Αδενίνη

ABCC8: ATP-binding Cassette, Subfamily C (CFTR/MRP), Member 8

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

ACTH: Adrenocorticotrophic Hormone, Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη

ACTN4: Actinin Alpha 4

ADH: Antidiuretic Hormone, Αντιδιουρητική Ορμόνη

ADP: Adenosine Diphosphate, Διφωσφορική Αδενοσίνη

Ala: Alanine (A), Αλανίνη

Anti-GAD: Glutamic Acid Decarboxylase Auto-antibodies

AMH: Anti-Müllerian Hormone, Αντιμυλλεριανή Ορμόνη

AMHR2: Anti-Müllerian Hormone Receptor Type 2

APPL1: Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with PH Domain and Leucine Zipper 1

AR: Androgen Receptor

Arg: Arginine (R), Αργινίνη

Asn: Asparagine (N), Ασπαράγινη

Asp: Aspartic Acid (D), Ασπαρτικό οξύ

ATP: Adenosine Triphosphate, Τριφωσφορική Αδενοσίνη

ATP10A: ATPase Phospholipid Transporting 10A

BAM: Binary Alignment Map

BLK: BLK Proto-oncogene, Src Family Tyrosine Kinase

BMI: Body Mass Index, Δείκτης Μάζας Σώματος

BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4

BWA: Burrows-Wheeler Aligner

C: Cytosine, Κυτοσίνη

CADD: Combined Annotation-Dependent Depletion

CBX2: chromobox 2

cDNA: complementary DNA, Συμπληρωματικό DNA

CDG Syndromes: Congenital Disorders of Glycosylation Syndromes

CDON: Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated

CEL: Carboxyl Ester Lipase

CHI: Congenital Hyperinsulinism, Συγγενής Υπερινσουλινισμός

CPHD: Combined Pituitary Hormone Deficiency, Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια

CPP: Central Precocious Puberty, Κεντρική Πρώιμη Ήβη

CRH: Corticotropin-Releasing hormone, Εκλυτική Ορμόνη της Αδρενοκορτικοτρόπου Ορμόνης

CYP11A1: Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1

CYP17A1: Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1

CYP21A2: Cytochrome P450 Family 21 Subfamily A Member 2

Cys: Cysteine (C), Κυστεΐνη

DANN: Deep Neural Network

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database

ddNTP: Dideoxynucleotide Triphosphate, Τριφωσφορικό Διδεοξυριβονουκλεοτίδιο

DEND Syndrome: Developmental delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes Syndrome

DHT: Dihydrotestosterone, Δυδροτεστοστερόνη

DLK1: Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1

DMRT1: Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1

DNA: Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphate, Τριφωσφορικό Δεοξυριβονουκλεοτίδιο

DSD: Disorders of Sex Development, Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό Οξύ

ELs: Extracellular Loops, Εξωκυττάριας Θηλειές

EMX2: Empty Spiracles Homeobox 2

EtBr: Ethidium Bromide, Βρωμιούχο Αιθίδιο

ExAC: Exome Aggregation Consortium

FATHMM: Functional Analysis through Hidden Markov Models

FGF9: Fibroblast Growth Factor 9

FOXL2: Forkhead Box L2

FSH: Follicle Stimulating Hormone, Θυλακιοτρόπος Ορμόνη

FSGS: Focal Segmental Glomerulosclerosis, Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση

G: Guanine, Γουανίνη

GATA4: GATA binding protein 4

GCK: Glucokinase, Γλυκοκινάση

GDH: Glutamate Dehydrogenase, Γλουταμινική Δεϋδρογενάση

GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling

GH: Growth Hormone, Αυξητική ορμόνη

GHRH: Growth Hormone-Releasing Hormone, Εκλυτική Ορμόνη της Αυξητικής Ορμόνης

GHRHR: Growth Hormone Releasing Hormone Receptor

Gln: Glutamine (Q), Γλουταμίνη

Glu: Glutamic Acid (E), Γλουταμινικό οξύ

GLUD1: Glutamate Dehydrogenase 1

GLUT2: Glucose Transporter Type 2

GLUT4: Glucose Transporter Type 4

Gly: Glycine (G), Γλυκίνη

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone, Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών

HADH: Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase

HESX1: Homeobox Expressed in Stem Cells 1

HGMD: Human Gene Mutation Database

HH: Hyperinsulinemic Hypoglycemia, Υπερινσουλιναϊκή Υπογλυκαιμία

HH: Hypogonadotrophic Hypogonadism, Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός

His: Histidine (H), Ιστιδίνη

HK1: Hexokinase 1

HNF1A: Hepatocyte Nuclear Factor 1 Homeobox A

HNF1B: Hepatocyte Nuclear Factor 1 Homeobox B

HNF4A: Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha

HPE: Holoprosencephaly, Ολοπροσεγκεφαλία
HPO: Human Phenotype Ontology
HS6ST1: Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase 1
HSD3B2: Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- and Steroid Delta-Isomerase 2
HSF: Human Splicing Finder

IAA: Insulin Auto-Antibodies
IA-2: Insulinoma 2 Associated Auto-Antibodies
ICA: Islet Cell Auto-Antibodies
IGHD: Isolated Growth Hormone Deficiency, Μεμονωμένη Ανεπάρκεια της Αυξητικής Ορμόνης
IGF-1: Insulin-Like Growth Factor-1, Σωματομεδίνη C
IGSF1: Immunoglobulin Superfamily Member 1
IL17RD: Interleukin 17 Receptor D
ILs: Intracellular Loops, Ενδοκυττάριας Θηλειές
INDEL: Insertion or Deletion, Προσθήκη ή Απάλειψη
INS: Insulin, Ινσουλίνη
INSL3: Insulin Like 3
INSR: Insulin Receptor, Υποδοχέας Ινσουλίνης
ISPs: Ion Sphere Particles

K_{ATP}: ATP-dependent Potassium Channel, ATP-Εξαρτώμενος Δίαυλος Καλίου
KCNJ11: Potassium Inwardly Rectifying Channel, Subfamily J, Member 11
KLF11: Kruppel-Like Factor 11
KS: Kallmann Syndrome, Σύνδρομο Kallmann

Leu: Leucine (L), Λευκίνη
LH: Luteinizing Hormone, Ωχρινοτρόπος Ορμόνη
LHB: Luteinizing Hormone Subunit Beta
LHCGR: Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor
LHX3: LIM Homeobox 3
LHX4: LIM Homeobox 4
LRT: Likelihood Ratio Test
Lys: Lysine (K), Λυσίνη

MAF: Minor Allele Frequency
MAP3K1: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1
MCT1: Monocarboxylate Transporter, Μονοκαρβοξυλικός Μεταφορέας
Met: Methionine (M), Μεθειονίνη
MetaLR: Meta-analytic Logistic Regression
MetaSVM: Meta-analytic Support Vector Machine
MIRAGE: Myelodysplasia, Infection, Restriction of growth, Adrenal hypoplasia, Genital phenotypes and Enteropathy
MKRN3: Makorin Ring Finger Protein 3
MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young
MRI: Magnetic Resonance Imaging, Μαγνητική Τομογραφία

MRKH: Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome

NBD: Nucleotide Binding Domain, Περιοχή Δέσμευσης Νουκλεοτιδίων

NDM: Neonatal Diabetes Mellitus, Νεογνικός Σακχαρώδης Διαβήτης

NEUROD1: Neuronal Differentiation 1

NGS: Next Generation Sequencing, Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς

NGS TGP: Next Generation Sequencing Targeted Gene Panel, Στοχευμένη Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς ομάδας γονιδίων

nlHH: normosmic Isolated Hypogonadotrophic Hypogonadism, Μεμονωμένος Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός χωρίς ανοσμία

NK3: Neurokinin B

NK3R: Neurokinin B Receptor

NR0B1: Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1

NR5A1: Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1

nt: Nucleotide

OGTT: Oral Glucose Tolerance Test, Δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OTX2: Orthodenticle homeobox 2

Panther: Protein Analysis Through Evolutionary Relationships

PAX4: Paired Box 4

PCR: Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

PDX1: Pancreatic and Duodenal Homeobox 1

PGM: Personal Genome Machine

PGM1: Phosphoglucomutase 1

Phe: Phenylalanine (F), Φαινυλαλανίνη

PMM2: Phosphomannomutase 2

PolyPhen2: Polymorphism Phenotyping v2

POR: Cytochrome p450 Oxidoreductase

POU1F1: POU Class 1 Homeobox 1

PRL: Prolactin, Προλακτίνη

Pro: Proline (P), Προλίνη

PROP1: Prophet of Pit1

PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer

RCAD Syndrome: Renal Cysts and Diabetes Syndrome

REF SEQ: Reference Sequence, Αλληλουχία Αναφοράς

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribonucleic Acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

RSPO1: R-spondin 1

SAMD9: Sterile Alpha Motif Domain Containing 9

Ser: Serine (S), Σερίνη

SHH: Sonic Hedgehog Signaling Molecule

SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant

SIX3: SIX Homeobox 3

SLC16A1: Solute Carrier Family 16 Member 1
SLC2A2: Solute Carrier Family 2 Member 2
SLC2A4: Solute Carrier Family 2 Member 4
SNV: Single Nucleotide Variant, Μονονουκλεοτιδική Παραλλαγή
SOD: Septo-optic dysplasia, διαφραγματο-οπτική δυσπλασία
SOX10: SRY-box transcription factor 10
SOX13: SRY-box transcription factor 13
SOX2: SRY-box transcription factor 2
SOX3: SRY-box transcription factor 3
SOX9: SRY-box transcription factor 9
SRA1: Steroid Receptor RNA Activator 1
SRD5A2: steroid 5 alpha-reductase 2
SRY: Sex Determining Region Y
SSAHA: Sequence Search and Alignment by Hashing Algorithm
SSTR2: Somatostatin receptor type 2
SSTR5: Somatostatin receptor type 5
STAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein
STRA8: Stimulated by Retinoic Acid 8

T: Thymine, Θυμίνη
T3: Triiodothyronine, Τριωδοθυρονίνη
T4: Thyroxine, Θυροξίνη
TAC3: Tachykinin 3
TACR3: Tachykinin receptor 3
TBE: Tris/Borate/EDTA
Ter: Termination (X), κωδικόνιο λήξης
TGF-β: Transforming Growth Factor-Beta
Thr: Threonine (T), Θρεονίνη
Tm: melting Temperature, Θερμοκρασία Τήξης
TMAP: Torrent Mapping Alignment Program
TMD: TransMembrane Domain, Διαμεμβρανική Περιοχή
TRH: Thyrotropin-Releasing Hormone, Εκλυτική Ορμόνη της Θυρεοειδοτρόπου Ορμόνης
TRMT10A: tRNA Methyltransferase 10A
TSH: Thyroid Stimulating Hormone, Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
Tyr: Tyrosine (Y), Τυροσίνη

UCP2: Uncoupling Protein 2
UTR: Untranslated Region, Αμετάφραστη Περιοχή

Val: Valine (V), Βαλίνη
VarAFT: Variant Annotation and Filter Tool
VCF: Variant Call Format

WDR11: WD repeat domain 11
WES: Whole Exome Sequencing, Αλληλούχηση όλων των Κωδικοποιουσών Περιοχών του Γονιδιώματος

WGS: Whole Genome Sequencing, Αλληλούχηση Ολόκληρου του Γονιδιώματος

WNT4: Wnt Family Member 4

WNT7A: Wnt Family Member 7A

WT1: WT1 Transcription Factor

ZnT8: Zinc transporter 8

ΔΔΦ: Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου

ΕΔ: Ενδοπλασματικό Δίκτυο

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΜΣΔ: Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης

ΝΣΔ: Νεογνικός Σακχαρώδης Διαβήτης

ΠΥΑ: Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια

ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης

ΣΔ1: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

ΣΔ2: Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

ΣΥ: Συγγενής Υπερινσουλινισμός

ΣΥΕ: Συγγενής Υπερπλασία των Επινεφριδίων

ΥΧ: Υδροφοβικός

Χαρακτήρας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ενδοκρινολογικό σύστημα είναι ένα από τα σημαντικότερα συστήματα που συμβάλλουν στην ομοιόσταση και τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού μέσω μετάδοσης μηνυμάτων και επίδρασης στην έκφραση γονιδίων. Η μετάδοση πραγματοποιείται με την έκλυση πεπτιδικών ή στεροειδών ορμονών από συγκεκριμένους ιστούς-αδένες, προκειμένου να μεταφέρουν μηνύματα στο υπόλοιπο σώμα για την φυσιολογική λειτουργία του. Οι κυριότεροι ενδοκρινείς αδένες είναι ο υποθάλαμος και η υπόφυση που βρίσκονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και ελέγχουν την λειτουργία των περιφερικών ενδοκρινών αδένων: θυρεοειδή, Θύμο, επινεφρίδια, πάγκρεας και γονάδες [1].

Οι ενδοκρινολογικές διαταραχές χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική σύνθεση, έκκριση ή δράση ορμονών ή/και μη φυσιολογική χωροχρονική έκκριση ορμονών, οι οποίες συχνά οφείλονται σε γενετικά αίτια. Η ανίχνευση της γενετικής αιτιολογίας των παθήσεων αυτών είναι σημαντική καθώς συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας και των παθογενετικών μηχανισμών των διαταραχών, στην ορθολογική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών και μελλοντικά στην εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση τους, βοηθά στην πρόγνωση και στην αναγνώριση συνοδών χαρακτηριστικών της νόσου και προσφέρει γενετική συμβουλευτική στους ασθενείς και στις οικογένειες τους.

Οι επιπτώσεις των ενδοκρινολογικών διαταραχών μπορεί να είναι σοβαρές για την ζωή έως και ήπιες. Παραδείγματα ενδοκρινολογικών γενετικών διαταραχών αποτελούν ο Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης (ΜΣΔ) MODY, ο Συγγενής Υπερινσουλινισμός (ΣΥ), η Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια (ΠΥΑ) και οι Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου (ΔΔΦ).

Ασθενείς με ΜΣΔ MODY και ΣΥ παρουσιάζουν διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ΜΣΔ MODY παρουσιάζουν μειωμένη έκκριση ινσουλίνης και κατά συνέπεια υπεργλυκαιμία, ενώ ασθενείς με ΣΥ παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, δυσανάλογη προς τα κυκλοφορούντα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, και κατά συνέπεια υπογλυκαιμία. Ασθενείς με ΠΥΑ μπορεί να παρουσιάζουν ανατομικές ανωμαλίες της υπόφυσης και δυσμορφίες του προσώπου καθώς και ανεπάρκεια τουλάχιστον δύο ορμονών της υπόφυσης, ενώ ασθενείς με ΔΔΦ παρουσιάζουν διαταραχές στον εμβρυολογικό καθορισμό και στην διαφοροποίηση του ανατομικού φύλου με αποτέλεσμα την γέννηση νεογνών με αμφίβολα ή ασαφή γεννητικά όργανα.

Τα γενετικά αίτια σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με ενδοκρινολογικές γενετικές διαταραχές παραμένουν αδιευκρίνιστα παρά την αλματώδη ανάπτυξη της μοριακής

βιολογίας και των διαγνωστικών μεθοδολογιών. Μέχρι πρόσφατα, η ανίχνευση γενετικών διαταραχών που συνδέονται με ένα νόσημα γινόταν με τη χρήση συμβατικών τεχνικών της μοριακής βιολογίας. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση παθολογικών παραλλαγών (αντικαταστάσεις, διπλασιασμοί και απαλείψεις μικρής έκτασης) αποτελεί η αλληλούχηση κατά Sanger, ενώ για την διερεύνηση διπλασιασμών ή απαλείψεων ολόκληρων εξονίων ή γονιδίων χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος του MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Η αλληλούχηση κατά Sanger βασίζεται στην διαδοχική αλληλούχηση γονιδίων, τα οποία συνδέονται με τον φαινότυπο του ασθενούς. Η μεθοδολογία αυτή όμως είναι χρονοβόρα, έχει αυξημένο κόστος και επιπλέον δεν είναι πάντα επιτυχής δεδομένου ότι συχνά δεν οδηγεί στην αναγνώριση της μοριακής αιτίας και την συσχέτιση της με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών. Επομένως, είναι σαφής η ανάγκη ανεύρεσης και χρήσης νέων τεχνικών/μεθοδολογιών μοριακής ανάλυσης, οι οποίες θα μειώνουν τον χρόνο της εργαστηριακής ανάλυσης και θα αυξάνουν το ποσοστό διάγνωσης με χαμηλότερο κόστος.

Την αδυναμία αυτή της αλληλούχησης κατά Sanger, καλύπτει η μεθοδολογία της Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), η οποία επιτρέπει την μαζική και παράλληλη αλληλούχηση πολλών περιοχών του γονιδιώματος σε πολλά δείγματα ασθενών ταυτόχρονα σε μία μόνο πειραματική δοκιμασία. Με αυτό τον τρόπο, το κόστος και ο χρόνος της αλληλούχησης ανά δείγμα ασθενούς μειώνεται σημαντικά, προσφέροντας διάγνωση σε μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών. Η πιο συχνή εφαρμογή του είναι η αλληλούχηση μιάς ομάδας γονιδίων, γνωστών για την συσχέτισή τους με ένα νόσημα αλλά και η αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing, WES), η οποία έχει συμβάλει στην αναγνώριση νέων γονιδίων εμπλεκόμενων σε διάφορα ενδοκρινολογικά νοσήματα [2].

1.1 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ Β-ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ

1.1.1 Ανατομία και φυσιολογία του παγκρέατος

Το πάγκρεας βρίσκεται μεταξύ του σπλήνα και του λεπτού εντέρου. Ανατομικά διακρίνεται σε κεφαλή, σώμα και ουρά. Ο αδένας αυτός έχει ενδοκρινή και εξωκρινή δράση. Συγκεκριμένα, η εξωκρινής δράση του περιλαμβάνει την έκκριση του παγκρεατικού υγρού, το οποίο περιέχει ένζυμα που βοηθούν στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το λεπτό έντερο και τα οποία διασπώνται σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη. Η ενδοκρινής δράση του χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης, της σωματοστατίνης, του παγκρεατικού πολυπεπτιδίου και της γλυκαγόνης από τους διάφορους τύπους κυττάρων των νησιδίων του Langerhans. Συγκεκριμένα, τα νησίδια του Langerhans αποτελούνται από 4 τύπους κυττάρων:

- 1) Τα κεντρικά β-κύτταρα, τα οποία αποτελούν περίπου το 70% των νησιδίων και εκκρίνουν ινσουλίνη.
- 2) Τα περιφερειακά α-κύτταρα, τα οποία αποτελούν περίπου το 20% των νησιδίων και εκκρίνουν γλυκαγόνη.
- 3) Τα περιφερειακά δ-κύτταρα, τα οποία αποτελούν περίπου το 5% των νησιδίων και εκκρίνουν σωματοστατίνη.
- 4) Τα F-κύτταρα, τα οποία βρίσκονται κυρίως στα νησίδια του οπίσθιου λοβού της κεφαλής και εκκρίνουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο.

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη ρυθμίζουν την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα, ενώ η σωματοστατίνη ασκεί ανασταλτική παρακρινική δράση στα υπόλοιπα νησίδια σταματώντας την έκκριση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Η δράση του παγκρεατικού πολυπεπτιδίου παραμένει ακόμα άγνωστη [3].

1.1.2 Ομοιόσταση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα

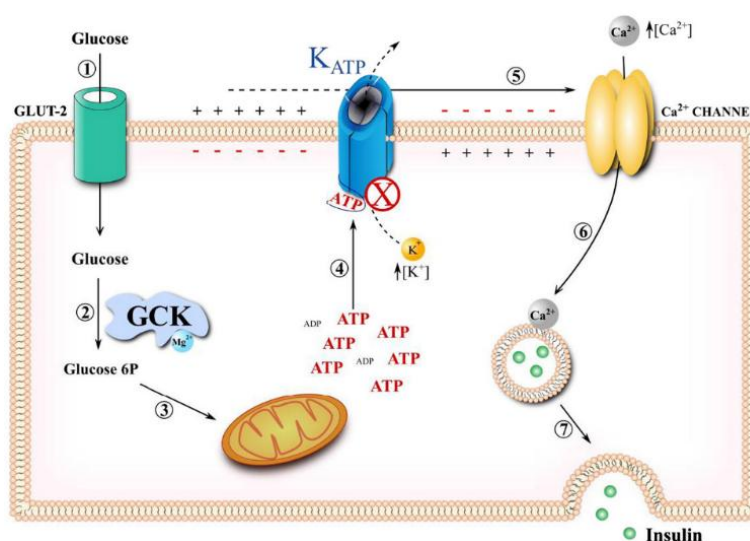
Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αυξάνεται μετά από κάθε γεύμα. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης της στα φυσιολογικά επίπεδα (70 - 100 mg/dL) πραγματοποιείται με την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος στην κυκλοφορία του αίματος [1]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνεται και ο ρυθμός έκκρισης της ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη της γλυκόζης, την κύρια πηγή ενέργειας, από τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιποκύτταρα. Επιπλέον, η ινσουλίνη οδηγεί στην αποθήκευση της γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου [4].

Εάν το ήπαρ κορεσθεί σε γλυκογόνο, η γλυκόζη κατευθύνεται στα λιποκύτταρα, όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων. Επίσης, η ινσουλίνη εμπλέκεται και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια διευκολύνοντας την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και σε διάσπαση του λίπους.

1.1.3 Μηχανισμός έκκρισης και δράση της ινσουλίνης

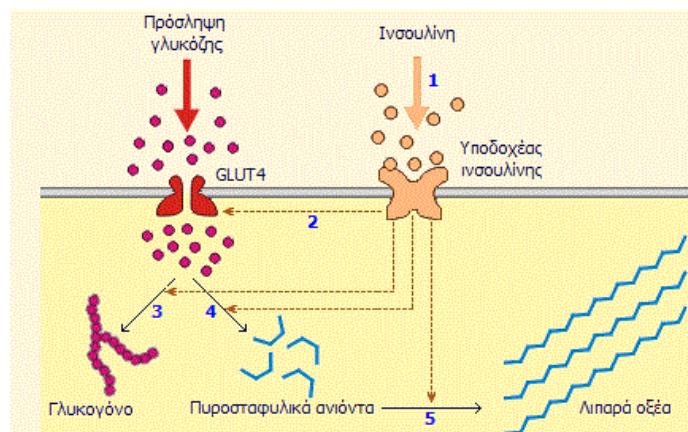
Η γλυκόζη από το αίμα μεταφέρεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω του μεταφορέα GLUT2 (ενός μεταφορέα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC2A2*). Εκεί, υπόκειται σε γλυκολυτική φωσφορυλίωση και εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, με ταυτόχρονη παραγωγή ATP. Καθώς ο λόγος ATP/ADP στο κυτταρόπλασμα αυξάνεται, διεγείρεται το κλείσιμο των διαύλων καλίου (K_{ATP}) αποπολώνοντας την κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου ενδοκυττάρια προκαλεί την εξωκύττωση της ινσουλίνης από τα αποθηκευτικά κυστίδια (Εικόνα 1) [5].



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού απελευθέρωσης της ινσουλίνης. Η γλυκόζη που βρίσκεται στο αίμα, μετά από κάθε γεύμα, προσλαμβάνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα GLUT2. Όταν η γλυκόζη εισέλθει στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνεται από την γλυκοκινάση (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GCK*) και μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η υψηλή αναλογία ATP/ADP που παράγεται στην γλυκόλυση κλείνει τον ATP-εξαρτώμενο διάυλο καλίου, αποπολώνοντας έτσι την κυτταρική μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή ανοίγει τους διαύλους ασβεστίου (Ca^{2+}), επιτρέποντας την είσοδο ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο. Τα ιόντα Ca^{2+} ενεργοποιούν την κίνηση κυστιδίων που περιέχουν ινσουλίνη προς την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης απελευθερώνοντας την στην κυκλοφορία του αίματος [6].

Μόλις το μόριο της ινσουλίνης προσδεθεί στους υποδοχείς της στα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα, ενεργοποιείται ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT4 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC2A4*), που επιτρέπει την είσοδο της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα. Ανάλογα με τη φύση του κυττάρου ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί σύνθεσης γλυκογόνου. Η

εισερχόμενη γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση, δηλαδή διασπάται προς πυροσταφυλικά ανιόντα και η εκλυόμενη ενέργεια αποθηκεύεται ως ATP. Στη συνέχεια, τα πυροσταφυλικά ανιόντα χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση νέων λιπαρών οξέων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Η ινσουλίνη προσδένεται στον υποδοχέα της (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *INSR*), ενεργοποιώντας τον μεταφορέα GLUT4 της γλυκόζης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη της γλυκόζης από τα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα.

1.1.4 ATP-εξαρτώμενος διάυλος καλίου (K_{ATP})

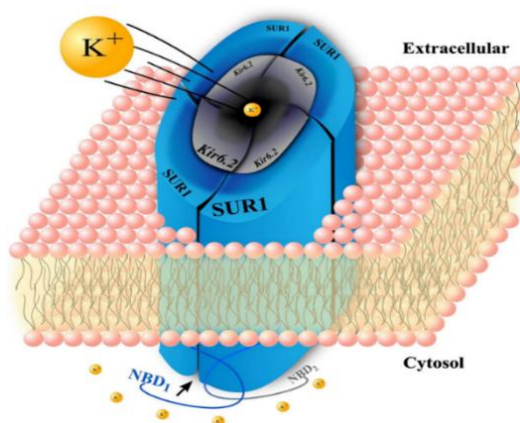
Οι ATP-εξαρτώμενοι διάυλοι καλίου (K_{ATP}) εντοπίζονται στα μυϊκά κύτταρα, στα κύτταρα του εγκεφάλου και στα β-κύτταρα του παγκρέατος [6]. Η δραστηριότητα του διαύλου στους μύες διεγείρει την σύσπαση, ενώ στον εγκέφαλο την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Στο πάγκρεας, λειτουργούν ως ρυθμιστές της ομοιόστασης της γλυκόζης του αίματος, συμβάλλοντας στο μηχανισμό απελευθέρωσης της ινσουλίνης [7, 8].

Ο διάυλος K_{ATP} αποτελείται από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Kir6.2 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *KCNJ11*) και SUR1 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABCC8*), οι οποίες σχηματίζουν την οκταμερή δομή του (Εικόνα 3). Η υπομονάδα Kir6.2 έχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TransMembrane domains, TMs), την TM1 και την TM2 και μεταξύ αυτών υπάρχει η συντηρημένη περιοχή H5, η οποία περιέχει μοτίβα γλυκίνης - τυροσίνης (ή φαινυλαλανίνης) - γλυκίνης (Gly - Tyr (or Phe) - Gly), σημαντικά για την επιλεκτικότητα του διαύλου σε ιόντα καλίου [9]. Η υπομονάδα SUR1 αποτελείται από 3 διαμεμβρανικές περιοχές (TransMembrane Domains, TMDs), τις TMD0, TMD1 και TMD2, και 2 περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding Domains, NBDs), τις NBD1 και NBD2. Η υπομονάδα SUR1 είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη του διαύλου καλίου, η ενδοκυτταρική περιοχή της οποίας περιλαμβάνει μια θέση σύνδεσης ADP. Με μηχανισμό που δεν είναι ακόμη γνωστός, η Kir6.2 υπομονάδα δεν μπορεί να εμφανιστεί στην επιφάνεια της μεμβράνης χωρίς την SUR1 υπομονάδα [6, 10].

Φυσιολογικά, όταν ο λόγος ATP/ADP στο κυτταρόπλασμα του β-κυττάρου του παγκρέατος αυξάνεται, διεγείρεται το κλείσιμο των διαύλων K_{ATP} , οδηγώντας τελικά στην έκκριση της ινσουλίνης ως απάντηση στην αύξηση της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, τα μόρια

ATP δεσμεύονται στην υπομονάδα Kir6.2 προκαλώντας αναστολή της δράσης του διαύλου, ενώ τα μόρια MgADP δεσμεύονται στην υπομονάδα SUR1 και ενεργοποιούν τον διάυλο K_{ATP} [11].

Ασθενείς με Μονογονιδιακό Σακχαρώδη Διαβήτη (ΜΣΔ), οι οποίοι φέρουν παθολογικές ενεργοποιητικές παραλλαγές σε ένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του διαύλου K_{ATP} , έχουν μόνιμα ανοιχτούς τους δίαυλους K_{ATP} με αποτέλεσμα να μην εκκρίνεται ινσουλίνη ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης οδηγώντας σε υπεργλυκαιμία. Αντίθετα, ασθενείς με Συγγενή Υπερινσουλινισμό (ΣΥ), οι οποίοι φέρουν απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του διαύλου K_{ATP} , έχουν μόνιμα κλειστούς στους δίαυλους K_{ATP} με αποτέλεσμα να εκκρίνεται συνεχώς ινσουλίνη ανεξάρτητα από τα επίπεδα της γλυκόζης και να εμφανίζουν υπογλυκαιμία.



Εικόνα 3. Ο διάυλος K_{ATP} , ο οποίος αποτελείται από 4 υπομονάδες Kir6.2 και 4 υπομονάδες SUR1 [6].

1.1.5 Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Μονογονιδιακός Σακχαρώδης Διαβήτης (ΜΣΔ) είναι μια κληρονομική ενδοκρινολογική διαταραχή του παγκρέατος, η οποία οφείλεται στην παρουσία παθολογικής παραλλαγής σε ένα και μόνο γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στην έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Η παθολογική αυτή παραλλαγή είναι ικανή να προκαλέσει υπεργλυκαιμία, ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών επιρροών. Ο ΜΣΔ διακρίνεται σε Νεογνικό ΣΔ (Neonatal Diabetes Mellitus, NDM) και ΣΔ τύπου MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young: διαβήτης ωριμότητας σε νεαρά άτομα). Υπολογίζεται ότι το 1-2% όλων των ασθενών με ΣΔ και το 6% του παιδιατρικού πληθυσμού έχουν μονογονιδιακή αιτιολογία [12, 13].

1.1.5.1 Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)

Ο ΜΣΔ MODY εμφανίζεται σε παιδιά, εφήβους και νεαρά ενήλικα άτομα, συνήθως πριν το 25^ο έτος της ηλικίας τους. Τα χαρακτηριστικά του ΜΣΔ MODY είναι: αυτοσωμικός

επικρατής τύπος κληρονομικότητας, ανεπαρκής παραγωγή ενδογενούς ινσουλίνης σε χαμηλά επίπεδα, μέτρια έως ανεπαρκή επίπεδα κυκλοφορόντος C-πεπτιδίου, απουσία αυτο-αντισωμάτων (ICA, anti-GAD, IAA, IA2 και ZnT8) ειδικών για το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1), απουσία κετοξέωσης και απουσία αντίστασης στην ινσουλίνη [13, 14]. Επίσης, οι ασθενείς με MODY συνήθως έχουν φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI).

Η διάγνωση του ΣΔ μπορεί να είναι τυχαία μετά από έναν αιματολογικό έλεγχο ρουτίνας ή ο ασθενής να παρουσιάζει συμπτώματα ΣΔ, δηλαδή πολυουρία, πολυδιψία, κόπωση, απώλεια βάρους, πολυφαγία. Συχνά, ασθενείς με ΜΣΔ MODY κατηγοριοποιούνται λανθασμένα ως ΣΔ1 ή ΣΔ2 [12].

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 14 γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση διαφορετικών υπότυπων ΜΣΔ MODY (OMIM #606391): *HNFA4-MODY*, *GCK-MODY*, *HNFA1A-MODY*, *PDX1-MODY*, *HNFA1B-MODY*, *NEUROD1-MODY*, *KLF11-MODY*, *CEL-MODY*, *PAX4-MODY*, *INS-MODY*, *BLK-MODY*, *ABCC8-MODY*, *KCNJ11-MODY* και *APPL1-MODY* [16]. Οι συχνότεροι υπότυποι είναι οι *HNFA4-MODY*, *GCK-MODY*, *HNFA1A-MODY* και *HNFA1B-MODY*, ενώ σε σημαντικό αριθμό ασθενών με ΜΣΔ MODY δεν έχει ταυτοποιηθεί το υπεύθυνο γονίδιο. Η αναγνώριση των γενετικών αιτιών σε ασθενείς με μονογονιδιακό ΣΔ είναι σημαντική καθώς υποδεικνύει την φαρμακευτική θεραπεία, εξηγεί τα κλινικά χαρακτηριστικά, συμβάλλει στην πρόγνωση της νόσου, στην έγκαιρη αναγνώριση συνοδών χαρακτηριστικών και στην γενετική συμβουλευτική της οικογένειας.

Ανάλογα με το γονίδιο στο οποίο οι ασθενείς φέρουν παθολογική παραλλαγή, η θεραπευτική αντιμετώπιση μπορεί να είναι δισκία σουλφονουλourίας, συγκεκριμένη δίαιτα ή ινσουλίνη (Πίνακας 1) [16]. Οι σουλφονουλourίες δεσμεύονται στην υπομονάδα SUR1 των διαύλων K_{ATP} των β-κυττάρων, μπλοκάροντας τη μετακίνηση των ιόντων K^+ από τους διαύλους, προκαλώντας την αποπόλωση της μεμβράνης και τελικά τη διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης [17].

Πίνακας 1. Συχνότητα και θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με MODY ανάλογα με το μεταλλαγμένο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς γονίδιο [16].

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ (%)	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
<i>HNFA4</i>	5	Σουλφονουλourίες
<i>GCK</i>	15-25	Δίαιτα
<i>HNFA1A</i>	30-50	Σουλφονουλourίες
<i>PDX1</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>HNFA1B</i>	5	Ινσουλίνη
<i>NEUROD1</i>	<1	Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>KLF11</i>	<1	Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>CEL</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>PAX4</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>INS</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>BLK</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη

<i>ABCC8</i>	<1	Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>KCNJ11</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη
<i>APPL1</i>	<1	Δίαιτα ή Αντιδιαβητικοί παράγοντες ή Ινσουλίνη

GCK-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο της γλυκοκινάσης, *GCK* (Glucokinase; NM_000162.4) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 7p13. Το γονίδιο αποτελείται από 2729 bp και 10 εξόνια, ενώ κωδικοποιεί ένα ένζυμο 465 αμινοξέων. Η γλυκοκινάση εκφράζεται στο ήπαρ (δύο μετάγραφα) και στα β-κύτταρα του παγκρέατος (1 μετάγραφο). Η γλυκοκινάση εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης, φωσφορυλιώνοντας την γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη.

Ο *GCK-MODY* εμφανίζεται στο 15-25% των περιπτώσεων ΜΣΔ αναλόγως της μελέτης [16]. Το ένζυμο γλυκοκινάση παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό της γλυκόζης καθώς φωσφορυλιώνει τον έκτο άνθρακα της γλυκόζης μετατρέποντας την σε 6 φωσφορική γλυκόζη κατά το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης [18]. Ασθενείς με ετερόζυγες απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές αυτού του γονιδίου παρουσιάζουν ήπια ανεπάρκεια στην απελευθέρωση της ινσουλίνης και συνεπώς ήπια υπεργλυκαιμία [16].

Ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GCK* παρουσιάζουν ασυμπτωματική ήπια υπεργλυκαιμία από την γέννηση, ενώ πολλές γυναίκες με *GCK-MODY* έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ κύησης, δηλαδή να διαγνωστούν κατά την εγκυμοσύνη [19]. Φυσιολογικά έμβρυα μητέρων με *GCK-MODY*, δηλαδή έμβρυα τα οποία δεν φέρουν την παθολογική παραλλαγή της μητέρας τους, αποκρίνονται στην υπεργλυκαιμία της μητέρας με παραγωγή ινσουλίνης, η οποία προκαλεί αύξηση του βάρους των νεογνών κατά περίπου 550-700 g. Αντίθετα, τα έμβρυα που φέρουν και εκείνα την παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *GCK* που φέρει και η μητέρα τους δεν παράγουν υψηλά επίπεδα ινσουλίνης και έχουν φυσιολογικό βάρος γέννησης [20].

Οι ασθενείς με *GCK-MODY* ρυθμίζουν το σάκχαρο τους με δίαιτα, ενώ η λανθασμένη χορήγηση ινσουλίνης μπορεί να προκαλέσει αύξηση βάρους και αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, οι ασθενείς με *GCK-MODY* συνήθως δεν παρουσιάζουν μικρο- ούτε μακρο-αγγειακές επιπλοκές [21].

HNF1A-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *HNF1A* (HNF1 Homeobox A; NM_000545.5) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 12q24.31. Το γονίδιο αποτελείται από 3442 bp και έχει 10 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν ένα μεταγραφικό παράγοντα 631 αμινοξέων.

Ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντας HNF1A είναι μία πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται σε διάφορα όργανα, όπως το πάγκρεας, το ήπαρ, τους νεφρούς και το έντερο. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1A ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων στα παραπάνω όργανα, και

συγκεκριμένα στο πάγκρεας ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως είναι τα γονίδια της ινσουλίνης και του μεταφορέα GLUT2 της γλυκόζης [22].

Ο *HNF1A-MODY* συνήθως εμφανίζεται κατά την εφηβεία ή λίγο αργότερα (συνήθως πριν την ηλικία των 25 ετών, αλλά και σε μεγαλύτερες ηλικίες). Η ηλικία εμφάνισης του ΣΔ στους ασθενείς αυτούς φαίνεται να επηρεάζεται από την θέση της παθολογικής παραλλαγής που φέρουν στην αμινοξική αλληλουχία. Συγκεκριμένα, ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές στα εξόνια 8-10 του γονιδίου *HNF1A* φαίνεται να παρουσιάζουν ΣΔ περίπου 7 έτη αργότερα σε σύγκριση με τους ασθενείς που φέρουν παθολογικές παραλλαγές στα πρώτα 6 εξόνια του γονιδίου [19]. Η υπεργλυκαιμία στους ασθενείς με *HNF1A-MODY* είναι βαρύτερη από αυτή του *GCK-MODY* και επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω προοδευτικής απόπτωσης των β-κυττάρων του παγκρέατος [23].

Οι ασθενείς *HNF1A-MODY* χρειάζονται φαρμακευτική αγωγή με σουλφονουλουρίες ή προοδευτικά με ινσουλίνη αναλόγως της βαρύτητας των συμπτωμάτων, ενώ συχνά παρουσιάζουν διαβητικές επιπλοκές. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι οι *HNF1A-MODY* ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων, ουρικού οξέος, γ-GT, φερριτίνης και υψηλότερη συγκέντρωση HDL χοληστερόλης σε σχέση με άλλους διαβητικούς ασθενείς [24].

HNF4A-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *HNF4A* (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha; NM_000457.3) βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 20q13.12. Το γονίδιο αποτελείται από 6445 bp και 10 εξόνια, ενώ κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα 474 αμινοξέων. Ο μεταγραφικός παράγοντας *HNF4A* προσδένεται στο DNA ως ομοδιμερές και ελέγχει την έκφραση άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκονεογένεση και στο μεταβολισμό των λιπιδίων [16]. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του παγκρέατος, του ήπατος, των νεφρών και του εντέρου.

Ασθενείς με ΜΣΔ *HNF4A-MODY* παρουσιάζουν παρόμοιο φαινότυπο με τους ασθενείς με *HNF1A-MODY*, δηλαδή εμφάνιση του ΣΔ κατά την εφηβεία ή την ενηλικίωση, αλλά ο υπότυπος *HNF4A-MODY* είναι πιο σπάνιος. Οι ασθενείς με *HNF4A-MODY* παρουσιάζουν αυξημένο βάρος γέννησης, περίπου 800 g παραπάνω από το φυσιολογικό (βάρος γέννησης >4 Kg), και μακροσωμία, πιθανόν λόγω αυξημένης έκκρισης ινσουλίνης κατά την εμβρυϊκή περίοδο, αλλά και παροδική νεογνική υπερινσουλιναιμική υπογλυκαιμία [24–26].

Επιπλέον, λόγω της μειωμένης μεταγραφικής δραστηριότητας του ελαττωματικού παράγοντα *HNF4A*, οι ασθενείς με *HNF4A-MODY* μπορεί να παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων, HDL-χοληστερόλης, A1 και A2 απολιποπρωτεϊνών και

αυξημένη συγκέντρωση LDL-χοληστερόλης, ενώ έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αγγειακών επιπλοκών [18, 27].

HNF1B-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *HNF1B* (HNF1 Homeobox B; NM_000458.3) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 17q12. Το γονίδιο αποτελείται από 2790 bp και έχει 10 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν ένα μεταγραφικό παράγοντα 577 αμινοξέων. Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF1B, δρά ως ομοδιμερές ή ετεροδιμερές με τον HNF1A συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση του σπλαχνικού ενδοδέρματος κατά την εμβρυϊκή περίοδο και συγκεκριμένα των νεφρών και του παγκρέατος.

Ασθενείς με *HNF1B-MODY* συχνά παρουσιάζουν και άλλα χαρακτηριστικά όπως νεφρικές ή ηπατικές κύστες (Σύνδρομο RCAD, Renal Cysts And Diabetes syndrome), υποπλασία του παγκρέατος, υψηλά επίπεδα ηπατικών ενζύμων, ουρογεννητικές δυσπλασίες, νοητική υστέρηση και προβλήματα οφθαλμών [29]. Η νεφρική βλάβη στους ασθενείς αυτούς μπορεί να εκδηλωθεί πολύ πριν από την εμφάνιση του ΣΔ [30]. Το 50% των *HNF1B-MODY* ασθενών φέρουν απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*, οι οποίες συνήθως είναι εκ νέου (*de novo*). Ασθενείς με *HNF1B-MODY* συνήθως έχουν αντίσταση στις σουλφονουρίες και χρειάζονται ινσουλίνη [31].

INS-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *INS* (Insulin; NM_000207.2) βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 11p15.5. Το γονίδιο αποτελείται από 503 bp και 3 εξόνια, ενώ τα εξόνια 2 και 3 κωδικοποιούν την προ-προϊνσουλίνη 110 αμινοξέων.

Η προ-προϊνσουλίνη μετά από επεξεργασία της από πρωτεολυτικά ένζυμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και στο σύμπλεγμα Golgi σχηματίζει την ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από 51 αμινοξέα. Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο αλυσίδες την Α (21 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου) και τη Β (30 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου). Οι αλυσίδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ενδιάμεσα 31 αμινοξέα αποτελούν το C πεπτίδιο (Connecting peptide: συνδετικό πεπτίδιο). Η σύνθεση και η αποθήκευση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στα β-κύτταρα του παγκρέατος [31, 32].

Ετερόζυγες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *INS* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΜΣΔ MODY [34]. Οι παραλλαγές αυτές τροποποιούν την αναδίπλωση της προ-προϊνσουλίνης προκαλώντας την συσσώρευση της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), το οποίο προκαλεί στρες στο κύτταρο και τελικά απόπτωση του β-κυττάρου με αποτέλεσμα την εμφάνιση ΣΔ [31]. Ο υπότυπος *INS-MODY* είναι σπάνιος [16].

ABCC8-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *ABCC8* (ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8; NM_001287174.1) βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 11p15.1. Το γονίδιο αποτελείται από 4924 bp και 39 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν την υπομονάδα SUR1 1582 αμινοξέων του διαύλου K_{ATP} των β-κυττάρων του παγκρέατος.

Η υπομονάδα SUR1 ως ρυθμιστής του διαύλου K_{ATP} επηρεάζει την έκκριση της ινσουλίνης. Ετερόζυγες ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8* προκαλούν την παραμονή του διαύλου K_{ATP} στην ανοικτή κατάσταση, με αποτέλεσμα τα ιόντα K^+ να εξέρχονται από το β-κύτταρο του παγκρέατος, η μεμβράνη να μην αποπολώνεται, να μην εισέρχονται ιόντα Ca^{2+} στο κύτταρο και κατά συνέπεια να μην εκκρίνεται η ινσουλίνη ως απάντηση στα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης, οδηγώντας τελικά σε υπεργλυκαιμία.

Ασθενείς με *ABCC8-MODY* εμφανίζουν φαινοτυπική ετερογένεια, η οποία μπορεί να είναι ήπια όμοια με το *GCK-MODY* ή βαρύτερη όμοια με τα *HNF1A-MODY* και *HNF4A-MODY*. Ο ΜΣΔ στους ασθενείς αυτούς εμφανίζεται στην παιδική αλλά και στην ενήλικη ζωή. Η θεραπεία των ασθενών με *ABCC8-MODY* ποικίλλει ανάλογα με την βαρύτητα των συμπτωμάτων, με την πλειοψηφία αυτών να ρυθμίζουν τα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης με σουλφονουλουρίες [34–37].

KCNJ11-MODY

Το ανθρώπινο γονίδιο *KCNJ11* (Potassium Channel, Inwardly Rectifying Subfamily J, Member 11; NM_000525.2), εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 11p15.1, καθοδικά του γονιδίου *ABCC8*. Το γονίδιο *KCNJ11* μεγέθους 2801 bp αποτελείται από ένα εξόνιο, το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα Kir6.2 390 αμινοξέων του διαύλου K_{ATP} των β-κυττάρων του παγκρέατος.

Το 2012 με την μέθοδο WES, η Bonnefond και οι συνεργάτες της ανίχνευσαν την πρώτη παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *KCNJ11* σε ασθενή με MODY, ο οποίος ρύθμιζε τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης με σουλφονουλουρίες [39]. Ετερόζυγες ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *KCNJ11* προκαλούν το μόνιμο άνοιγμα του διαύλου K_{ATP} , εμποδίζοντας την αποπόλωση της μεμβράνης, την είσοδο των ιόντων Ca^{+2} και κατά συνέπεια την έκκριση της ινσουλίνης ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ο *KCNJ11-MODY* είναι σπάνιος και η ηλικία εμφάνισης του ΣΔ στους ασθενείς αυτούς ποικίλει [40].

Ασθενείς με ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια του διαύλου K_{ATP} εκτός από ΣΔ μπορεί να εμφανίζουν αναπτυξιακή καθυστέρηση και επιληψία

(Developmental delay, Epilepsy and Neonatal Diabetes syndrome, DEND syndrome) αφού ο δίαυλος K_{ATP} εκφράζεται και στο νευρικό σύστημα [41].

Άλλοι τύποι MODY

Το γονίδιο *PDX1* (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την γλυκαγόνη, την ινσουλίνη, τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT2 και της γλυκοκινάσης [15, 41]. Ετερόζυγες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου οδηγούν σε *PDX1*-MODY λόγω μειωμένης λειτουργίας των β-κυττάρων, ενώ συχνά παρουσιάζουν αγενεσία του παγκρέατος ή ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος [42, 43].

Το γονίδιο *NEUROD1* (Neurogenic Differentiation Factor 1) κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα σημαντικό για την ανάπτυξη του παγκρέατος και των νευρώνων. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *NEUROD1* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΜΣΔ MODY [16].

Το γονίδιο *KLF11* (Kruppel-Like Factor 11) κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά την ανάπτυξη των εξωκρινών κυττάρων του παγκρέατος και με αυτό τον τρόπο καταστέλλει την ανάπτυξη παγκρεατικών όγκων. Επίσης, δεσμεύεται στον υποκινητή της ινσουλίνης ρυθμίζοντας την έκφραση της στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *KLF11* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με φαινότυπο MODY [45].

Το γονίδιο *CEL* (Carboxyl Ester Lipase) κωδικοποιεί το πακρεατικό ένζυμο CEL, το οποίο συμμετέχει στην υδρόλυση των εστέρων (π.χ. της χοληστερόλης) που λαμβάνονται με την τροφή στο δωδεκαδάκτυλο. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *CEL* προκαλούν την εμφάνιση μιας σπάνιας μορφής ΜΣΔ MODY, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της εξωκρινούς και ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και συσσώρευση της μη σωστά αναδιπλωμένης πρωτεΐνης CEL [45, 46].

Το γονίδιο *PAX4* (Paired Box 4) κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα απαραίτητο για την διαφοροποίηση των β-κυττάρων του παγκρέατος κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη [40]. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *PAX4* έχουν βρεθεί σε μη συγγενικές οικογένειες Ταϊλανδών και Ασιατών με φαινότυπο ΜΣΔ MODY [47, 48].

Το γονίδιο *BLK* (BLK Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase) κωδικοποιεί μια κινάση, η οποία διεγείρει την σύνθεση της ινσουλίνης και την έκκρισή της, αυξάνοντας την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων *PDX1* και *NKX6.1*. Ασθενείς με *BLK*-MODY χαρακτηρίζονται από υψηλότερη συχνότητα παχυσαρκίας σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υπότυπους MODY [39, 49].

Το γονίδιο *APPL1* (Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with PH Domain and Leucine Zipper 1) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο AKT2, ένα μόριο σημαντικό για το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Το 2015, παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο αυτό συνδέθηκαν για πρώτη φορά με τον φαινότυπο του ΜΣΔ MODY [51].

1.1.6 Συγγενής Υπερινσουλινισμός

Ο Συγγενής Υπερινσουλινισμός (ΣΥ) ή Υπερινσουλιναιμική Υπογλυκαιμία (Congenital Hyperinsulinism, CHI or Hyperinsulinemic Hypoglycemia, HH) είναι η πιο συχνή αιτία εμμένουσας υπογλυκαιμίας σε νεογνά και παιδιά με συχνότητα εμφάνισης 1:50000 γεννήσεις, ενώ σε ενδογαμικές περιοχές (π.χ. Σαουδική Αραβία) η συχνότητα της εκτιμάται σε 1:2500 γεννήσεις [52].

Καθυστερημένη διάγνωση και αντιμετώπιση της υπογλυκαιμίας έχει ως αποτέλεσμα μόνιμες νευρολογικές βλάβες στον εγκέφαλο, καθώς η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για την λειτουργία του εγκεφάλου. Η ινσουλίνη, η οποία παράγεται ανεξέλεγκτα από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, προκαλεί την αποθήκευση της γλυκόζης στους μύες, στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, ενώ παράλληλα εμποδίζει την ενδογενή παραγωγή γλυκόζης μέσω της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης με αποτέλεσμα την εμφάνιση υπογλυκαιμίας στους ασθενείς αυτούς [52, 53]. Τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης επίσης εμποδίζουν τις διαδικασίες της λιπόλυσης και της κετογένεσης, με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμη ούτε η δεύτερη πηγή ενέργειας του εγκεφάλου, τα κετονικά σωμάτια [53].

Οι ασθενείς με ΣΥ κλινικά μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ή να παρουσιάζουν ταχυκαρδία, εφίδρωση, κυάνωση, δυσκολία στην σίτιση, ταχύπνοια, επεισόδια απώλειας συνειδήσεως, σπασμούς κ.α. Βιοχημικά, παρουσιάζουν τιμές γλυκόζης <45-50mg/dl, β-υδροξυβουτυρικού <2.0 mmol/l, ελεύθερων λιπαρών οξέων <42mg/dl, ενώ η ινσουλίνη θεωρείται από ορισμένους επιστήμονες παθολογική όταν είναι ανιχνεύσιμη, ενώ άλλοι την θεωρούν παθολογική όταν η τιμή της είναι >1.26μU/ml [11, 54]. Ασθενείς με ΣΥ μπορεί να παρουσιάζουν υπογλυκαιμικά επεισόδια ακόμη και 2 ώρες μετά το γεύμα [11].

Στους ασθενείς με ΣΥ συνήθως χορηγείται διαζοξίδη ή γλυκόζη σε υψηλές δόσεις, ενώ ασθενείς που δεν αποκρίνονται στη διαζοξίδη, λαμβάνουν συνήθως οκτρεοτίδη. Η διαζοξίδη είναι μία βενζοθιαδιαζίνη (benzothiadiazine), η οποία αποτελεί αγωνιστή του διαύλου K_{ATP} στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Συγκεκριμένα, η διαζοξίδη προκαλεί το άνοιγμα του διαύλου K_{ATP} και τελικά την καταστολή της έκκρισης της ινσουλίνης. Η οκτρεοτίδη είναι ένα ανάλογο σωματοστατίνης, η οποία καταστέλλει την βιοσύνθεση και έκκριση της ινσουλίνης καθώς και την μετακίνηση των ιόντων ασβεστίου μέσα στο β-κύτταρο μετά από πρόσδεση της στους υποδοχείς 2 και 5 της σωματοστατίνης (SSTR2 και SSTR5) [55, 56].

Παλαιότερα, εκτός από την φαρμακευτική αγωγή, ορισμένοι ασθενείς κατέληγαν σε χειρουργική αντιμετώπιση με μερική ή σχεδόν ολική παγκρεατεκτομή. Δεδομένου ότι η συνεχή ενδοκυττάρια εισροή ασβεστίου στο β-κύτταρο μακροχρόνια οδηγεί σε απόπτωση του β-κυττάρου, στις μέρες μας παγκοσμίως γίνεται προσπάθεια συντηρητικής αντιμετώπισης των περιστατικών αυτών, δεδομένου ότι με τη πάροδο του χρόνου η βαρύτητα των υπογλυκαιμικών επεισοδίων μειώνεται και μετά την εφηβεία μπορεί να μεταπέσει ο ασθενής σε υπεργλυκαιμία.

Ιστολογικά, ο ΣΥ διακρίνεται στην διάχυτη (diffuse form) και εστιακή μορφή (focal form). Στην εστιακή μορφή, ένα συγκεκριμένο σημείο στο πάγκρεας αποτελείται από μεγάλο μεγέθους και ακανόνιστου σχήματος υπερπλαστικά κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση του υπερινσουλινισμού. Συνήθως, το τμήμα αυτό του παγκρέατος αφαιρείται με χειρουργική επέμβαση. Στην διάχυτη μορφή, κάθε β-κύτταρο του παγκρέατος έχει την παραπάνω μορφολογία. Σε ασθενείς με διάχυτη μορφή ΣΥ όπως προαναφέρθηκε, παλαιότερα γινόταν ολική παγκρεατεκτομή και οι ασθενείς αυτοί είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ μεταχειρουργικά [57, 58]. Στις μέρες μας με τις νεότερες θεραπείες, όπως η χορήγηση οκτρεοτίδης ή λανρεοτίδης, σπάνια μόνο περιστατικά καταλήγουν σε παγκρεατεκτομή. Η εστιακή μορφή ΣΥ αντιπροσωπεύει περίπου το 30-40% των ασθενών με ΣΥ, ενώ η διάχυτη το 60-70% [60].

1.1.6.1 Γενετική βάση Συγγενή Υπερινσουλινισμού

Μέχρι σήμερα, παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8*, *KCNJ11*, *GCK*, *GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SLC16A1*, *HNF4A*, *HNF1A*, *UCP2*, *HK1*, *PGM1* και *PMM2* έχουν συνδεθεί με το ΣΥ (Εικόνα 4). Το 50% των ασθενών φέρουν παθολογικές παραλλαγές στα παραπάνω γονίδια, ενώ το υπόλοιπο 50% παραμένει αδιευκρίνιστης γενετικής αιτιολογίας, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα αυτοί οι ασθενείς να φέρουν παθολογικές παραλλαγές σε άλλα γονίδια, τα οποία μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό ότι συνδέονται με τον ΣΥ [61].

ABCC8* και *KCNJ11

Η πιο συχνή γενετική αιτία του ΣΥ (40-45%) είναι οι επικρατούσες ή υπολειπόμενες απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* και *KCNJ11*, τα οποία κωδικοποιούν τον δίαυλο K_{ATP} . Υπολειπόμενη και επικρατής κληρονομικότητα έχει συνδεθεί με τη διάχυτη μορφή [54]. Σε εστιακές μορφές έχει βρεθεί γαμετική πατρική κληρονόμηση της παθολογικής παραλλαγής με σωματική πατρική μονογονεϊκή ισοδισωμία (uniparental isodisomy) της χρωμοσωμικής θέσης 11p.15.5 και απώλεια της αντίστοιχης μητρικής χρωμοσωμικής θέσης. Στην χρωμοσωμική θέση 11p.15.5 εντοπίζονται τα εντυπωμένα

γονίδια *H19*, *CDKN1C*, *IGF2*, γεγονός το οποίο οδηγεί στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των β-κυττάρων [62].

Ασθενείς με διάχυτη μορφή ΣΥ, οι οποίοι φέρουν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* και *KCNJ11*, τα οποία κωδικοποιούν τις υπομονάδες του διαύλου καλίου, μπορεί να αποκρίνονται (συνήθως αυτοσωμικές) ή να μην αποκρίνονται (συνήθως υπολειπόμενες) στην αγωγή με διαζοξίδη, ενώ ασθενείς με εστιακή μορφή ΣΥ, οι οποίοι φέρουν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* και *KCNJ11* δεν αποκρίνονται στην διαζοξίδη [63].

GCK

Ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GCK* είναι σπάνιες σε ασθενείς με ΣΥ (αποτελούν περίπου το 7% όλων των ασθενών με ΣΥ). Μεταβιβάζονται με τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας, ενώ η εκ νέου κληρονομικότητα είναι σπάνια. Οι ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές, οι οποίες ευθύνονται για το ΣΥ, συνήθως εντοπίζονται κοντά στην θέση αλλοστερικής ενεργοποίησης της γλυκοκινάσης[64].

Οι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ή να παρουσιάζουν υπογλυκαιμία από τη νεογνική έως και την ενήλικη περίοδο [63, 64]. Ασθενείς με *GCK*-ΣΥ σπάνια μπορεί να μην αποκρίνονται στην αγωγή με διαζοξίδη και να χρειάζονται οκτρεοτίδη. Σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις, ορισμένοι ασθενείς εμφανίζουν βαριά υπογλυκαιμία όμοια με τους ασθενείς που φέρουν παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια του διαύλου K_{ATP} και μπορεί να συζητηθεί παγκρεατεκτομή, παρ' όλο που τα τελευταία χρόνια γίνεται κάθε θεραπευτική προσπάθεια ώστε να αποφεύγονται οι παγκρεατεκτομές [60, 65].

GLUD1

Το ανθρώπινο γονίδιο *GLUD1* (Glutamate Dehydrogenase 1; NM_005271.5), το οποίο εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 10q23.2, αποτελείται από 13 εξόνια συνολικού μεγέθους 3300 bp. Το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μιτοχονδριακό ένζυμο 558 αμινοξέων, την γλουταμινική δεϋδρογενάση (Glutamate Dehydrogenase, GDH), απαραίτητο για την οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμινικού σε α-κετογλουταρικό και αμμωνία (Εικόνα 5) [61]. Το α-κετογλουταρικό μεταβολίζεται μέσω του κύκλου του Krebs παράγοντας ATP, το οποίο οδηγεί στην έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος [11]. Το ένζυμο γλουταμινική δεϋδρογενάση συμμετέχει, επίσης, στο σχηματισμό αμινοξέων ως εναλλακτική πηγή ενέργειας σε απουσία γλυκόζης.

Ασθενείς με παθολογικές ενεργοποιητικές παραλλαγές του γονιδίου *GLUD1*, παρουσιάζουν μια συνδρομική μορφή υπερινσουλινισμού και υπεραμμωναιμίας, καθώς εμφανίζουν υψηλά επίπεδα αμμωνίας μετά από πρωτεϊνικά γεύματα και αυξημένα επίπεδα α-κετογλουταρικού στα ούρα. Οι ασθενείς παρουσιάζουν πιο ήπια υπογλυκαιμικά

επεισόδια από τους ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια του διαύλου καλίου. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο και συνήθως είναι εκ νέου (*de novo*) παραλλαγές [67].

Οι ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GLUD1* αποκρίνονται στην διαζοξίδη, ενώ πρέπει να λαμβάνουν γεύματα χαμηλά σε πρωτεΐνες και ειδικά σε λευκίνη, η οποία αποτελεί αλλοστερικό ενεργοποιητή του ενζύμου GDH [54]. Οι περισσότερες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GLUD1* επηρεάζουν την περιοχή πρόσδεσης GTP, αναστολέα του ενζύμου, του GDH με αποτέλεσμα να μην σταματά η δράση του ενζύμου και κατά συνέπεια να παράγεται συνεχώς ATP ενεργοποιώντας το μονοπάτι έκκρισης της ινσουλίνης [61].

HADH

Το ανθρώπινο γονίδιο *HADH* (Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase; NM_005327.5), μεγέθους 1912 bp βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 4q25. Αποτελείται από 8 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν το μιτοχondριακό ένζυμο L-3-υδροξυακυλο-CoA αφυδρογονάση 314 αμινοξέων. Το ένζυμο αυτό οξειδώνει τα λιπαρά οξέα προκειμένου να παραχθεί ATP, το οποίο προκαλεί το κλείσιμο του διαύλου K_{ATP} και τελικά την έκκριση ινσουλίνης.

Απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο, αλλά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο προκαλούν ΣΥ δεν είναι ακόμα γνωστός [61]. Οι ασθενείς με *HADH*-ΣΥ παρουσιάζουν όμοια πρωτεϊνική ευαισθησία με τους ασθενείς *GLUD1*-ΣΥ, χωρίς να παρουσιάζουν υπεραμμοναιμία [54]. Στους ασθενείς με *HADH*-ΣΥ συνήθως ανιχνεύονται υψηλές συγκεντρώσεις 3-υδροξυ-βουτυρυλο-καρνιτίνης στο αίμα και 3-υδροξυ-γλουταρικού στα ούρα [68]. Οι ασθενείς με *HADH*-ΣΥ παρουσιάζουν φαινοτυπική ετερογένεια, καθώς έχει αναφερθεί σε νεογνά με σοβαρό ΣΥ και σε εφήβους με ήπιο φαινότυπο. Συνήθως αποκρίνονται στη θεραπεία με διαζοξίδη [69].

SLC16A1

Το ανθρώπινο γονίδιο *SLC16A1* (Solute Carrier Family 16 Member 1; NM_003051.3) εντοπίζεται στην χρωμοσωμική θέση 1p13.2. Το γονίδιο έχει μέγεθος 3910 bp και 5 εξόνια, εκ των οποίων τα 4 πρώτα κωδικοποιούν τον μονοκαρβοξυλικό μεταφορέα (MonoCarboxylate Transporter, MCT1) 500 αμινοξέων. Ο MCT1 μεταφέρει πυροσταφυλικό ή γαλακτικό οξύ στον κύκλο του Krebs προκειμένου να παραχθεί ATP, το οποίο θα ενεργοποιήσει το μονοπάτι έκκρισης της ινσουλίνης.

Ο μεταφορέας αυτός εκφράζεται σε χαμηλό βαθμό στα φυσιολογικά β-κύτταρα του παγκρέατος. Η έκφραση του αυξάνεται από ενεργοποιητικές αυτοσωμικές επικρατείς παθολογικές παραλλαγές, με αποτέλεσμα την είσοδο του πυροσταφυλικού οξέος στον

κύκλο του Krebs και την ανεξέλεγκτη παραγωγή ινσουλίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης κατά την διάρκεια αναερόβιων ασκήσεων [70]. Οι ασθενείς με *SLC16A1-SY* εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στη δοκιμασία με πυροσταφυλικό οξύ [71]. Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να λαμβάνουν διαζοξίδη ή να ακολουθούν συγκεκριμένη δίαιτα [54].

INSR

Το ανθρώπινο γονίδιο *INSR* (Insulin Receptor; NM_000208.4) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 19p13.2. Το γονίδιο αυτό έχει μέγεθος 4721 bp και 22 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα της ινσουλίνης 1382 αμινοξέων [72]. Ο υποδοχέας αποτελείται από 2 υπομονάδες (α και β), οι οποίες σχηματίζουν την ετεροτετραμερή δομή του.

Οι παθολογικές απενεργοποιητικές παραλλαγές του γονιδίου αυτού κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο και προκαλούν σοβαρό υπερινσουλινισμό μεταγευματικά και αντίσταση στην ινσουλίνη, με μελανίζουσα ακάνθωση και υπερτρίχωση [73]. Η ηλικία εμφάνισης του συνδρόμου αυτού ποικίλλει από την παιδική ηλικία έως και την ενηλικίωση. Η υπερινσουλιναιμία σε αυτούς τους ασθενείς εμφανίζεται πιθανόν λόγω μειωμένης αποικοδόμησης της ινσουλίνης και όχι λόγω αυξημένης έκκρισης της [74].

TRMT10A

Το ανθρώπινο γονίδιο *TRMT10A* (tRNA Methyltransferase 10A; NM_152292.5) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 4q23. Αποτελείται από 8 εξόνια μεγέθους 3694 bp, εκ των οποίων τα εξόνια 1-7 κωδικοποιούν το κυτοπλασματικό ένζυμο 339 αμινοξέων, tRNA m^1G_9 μεθυλοτρανσφεράση.

Τα tRNA όπως και άλλα μόρια RNA υφίστανται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις από ένζυμα τα οποία συνήθως είναι συντηρημένα ακόμη και στους μονοκύτταρους μικροοργανισμούς. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *TRMT10A* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με μικροκεφαλία, χαμηλό ανάστημα, νοητική υστέρηση, καθυστερημένη ήβη και διαταραχές στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η διαταραχή στον μεταβολισμό της γλυκόζης συνήθως εμφανίζεται με κετωτική ή μη κετωτική υπογλυκαιμία ενώ αργότερα κατά την εφηβεία εμφανίζεται ΣΔ, πιθανόν λόγω απόπτωσης των β-κυττάρων του παγκρέατος [75].

Άλλοι τύποι ΣΥ

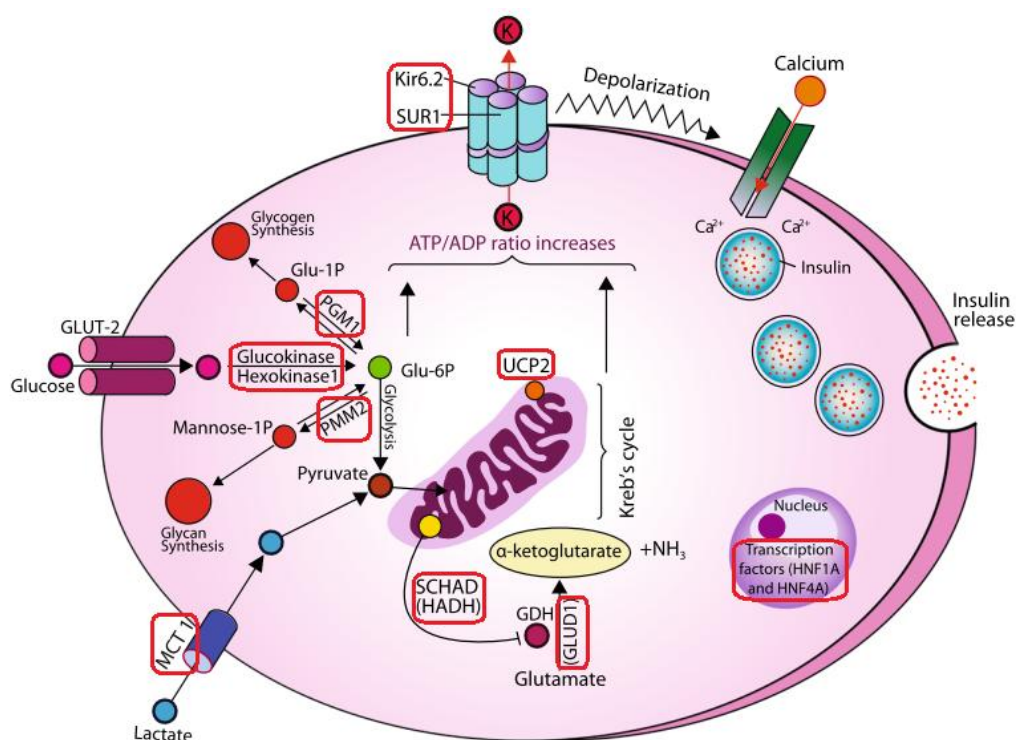
Το γονίδιο *UCP2* (Uncoupling Protein 2) κωδικοποιεί ένα μιτοχονδριακό μεταφορέα, ο οποίος εκφράζεται και στα α- και στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Ο *UCP2* καταστέλλει την οξείδωση της γλυκόζης και ενεργοποιεί την οξείδωση της γλουταμίνης, μεταφέροντας C4 μεταβολίτες έξω από το μιτοχόνδριο [76]. Απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *UCP2* προωθούν την οξείδωση της γλυκόζης προκαλώντας ΣΥ [54]. Οι ασθενείς

εμφανίζουν ετερογένεια στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων, από νεογνά έως και παιδιά [53, 60]. Οι ασθενείς αποκρίνονται στην θεραπεία με διαζοξίδη [61].

Το γονίδιο *HK1* (Hexokinase 1) κωδικοποιεί την εξοκινάση 1, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι αποσιωπημένη στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η δράση της είναι ίδια με της γλυκοκινάσης, με την διαφορά ότι η γλυκοκινάση είναι πιο ειδική για την γλυκόζη. Ετερόζυγες ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο *HK1*, οδηγούν σε ανεξέλεγκτη έκκριση ινσουλίνης και σε ΣΥ αποκρινόμενο στη διαζοξίδη [77].

Το γονίδιο *PGM1* (Phosphoglucomutase 1) κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση, το οποίο καταλύει την μετατροπή της 6-φωσφορικής-γλυκόζης σε 1-φωσφορική-γλυκόζη. Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό γλυκογόνου, της γλυκογονόλυσης και της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών [63]. Απενεργοποιητικές υπολειπόμενες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν βρεθεί σε ασθενείς με μεταγευματικό υπερινσουλινισμό και υπερκετωτική υπογλυκαιμία σε κατάσταση νηστείας [57].

Το γονίδιο *PMM2* (Phosphomannomutase 2) κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφομανομουτάση, το οποίο εμπλέκεται στην γλυκοζυλίωση και απογλυκοζυλίωση στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Οι ασθενείς με υπολειπόμενες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου παρουσιάζουν εκτός από ΣΥ και μεγάλους πολυκυστικούς νεφρούς. Οι ασθενείς με *PMM2*-ΣΥ αποκρίνονται στην διαζοξίδη [62, 77].



Εικόνα 4. Η ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης από το β-κύτταρο του παγκρέατος και τα γονίδια που συνδέονται με τον ΣΥ [54].

1.1.6.2 Παροδική Νεογνική Υπογλυκαιμία

Η παροδική νεογνική υπογλυκαιμία εμφανίζεται μετά τη γέννηση και διαρκεί περίπου 3-4 εβδομάδες. Η εμφάνιση της παροδικής υπογλυκαιμίας μπορεί να οφείλεται σε νεογνικές διαταραχές, όπως προωρότητα, περιγεννητική ασφυξία, υποθερμία, ενδομήτρια καθυστέρηση στην ανάπτυξη, λοίμωξη, συγγενή καρδιοπάθεια, αλλά και σε διαταραχές του μεταβολισμού της μητέρας, όπως ΣΔ κύησης (στις περιπτώσεις αυτές η υπογλυκαιμία υποχωρεί πολύ νωρίτερα από τις 3-4 εβδομάδες) ή στην χρήση φαρμάκων κατά την κύηση (π.χ. τερβουταλίνη, ριτορδίνη, υπογλυκαιμικούς παράγοντες, γλυκόζης) [59]. Τα αίτια της φαίνεται να μην έχουν γενετική αιτιολογία, με εξαίρεση την παροδική νεογνική υπογλυκαιμία που παρουσιάζουν οι ασθενείς με απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια *HNF4A* ή *HNF1A* και οι οποίοι αποκρίνονται στην διαζοξίδη. Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από μακροσωμία, αυξημένο βάρος γέννησης και ήπιο έως βαρύ υπερινσουλινισμό, ενώ κατά την εφηβεία εμφανίζουν ΜΣΔ MODY [24, 53].

1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ

1.2.1 Υποθάλαμος - Υπόφυση

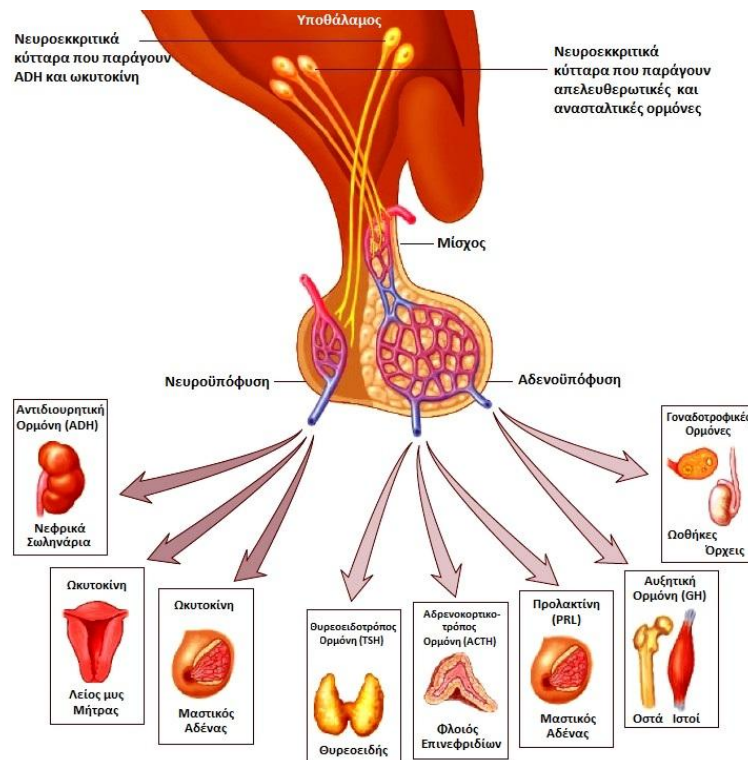
Η υπόφυση βρίσκεται μέσα στο τουρκικό εφίππιο του σφηνοειδούς οστού στη βάση του εγκεφάλου. Πάνω από την υπόφυση βρίσκεται ο υποθάλαμος, με τον οποίο ενώνεται μέσω ενός χοανοειδούς μίσχου. Η υπόφυση διακρίνεται στην αδενοϋπόφυση (ή πρόσθια υπόφυση) και στην νευροϋπόφυση (ή οπίσθια υπόφυση) [3].

Η νευροϋπόφυση αποτελεί προέκταση του υποθαλάμου και έχει νευροεξωδερμική προέλευση. Από την νευροϋπόφυση εκλύονται οι ορμόνες, ωκυτοκίνη και αντιδιουρητική ορμόνη (Antidiuretic Hormone, ADH), οι οποίες παράγονται στον υποθάλαμο. Η ωκυτοκίνη δρά στη μήτρα και στο μαστό, κατά τον τοκετό και την παραγωγή του γάλακτος, ενώ η αντιδιουρητική ορμόνη ελέγχει το ισοζύγιο του ύδατος και των αλάτων στα άπω σωληνάρια των νεφρών ρυθμίζοντας έτσι την αρτηριακή πίεση [1].

Η αδενοϋπόφυση αρχίζει να δημιουργείται κατά την 5η εβδομάδα κύησης από το θύλακα του Rathke, ο οποίος είναι στοματικής εξωδερμικής προέλευσης. Η αδενοϋπόφυση αποτελείται από 5 ομάδες κυττάρων, καθεμία από τις οποίες παράγει και εκκρίνει συγκεκριμένες ορμόνες. Η έκκριση των ορμονών της αδενοϋπόφυσης γίνεται κατά ώσεις και ρυθμίζεται από τις ορμόνες του υποθαλάμου. Οι ορμόνες του υποθαλάμου και της αδενοϋπόφυσης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα καθώς και οι τελικοί αδένες-στόχοι των ορμονών αυτών ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσιολογική τους λειτουργία (Πίνακας 2, Εικόνα 5) [1, 3].

Πίνακας 2. Ορμόνες υποθαλάμου-υπόφυσης-αδένων στόχων.

Ορμόνες Υποθαλάμου	Ομάδα κυττάρων αδενοϋπόφυσης	Ορμόνες Αδενοϋπόφυσης	Αδένας-Στόχος	Ορμόνες Αδένα-Στόχου
Εκλυτική Ορμόνη της Αδρενοκορτικοτρόπου Ορμόνης (CRH)	Κορτικοτρόπα	Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη (ACTH)	Φλοιός Επινεφριδίων	Κορτιζόλη και Στεροειδείς Ορμόνες
Εκλυτική Ορμόνη της Αυξητικής Ορμόνης (GHRH)	Σωματοτρόπα	Αυξητική Ορμόνη (GH)	Οστά Ήπαρ	
Εκλυτική Ορμόνη της Θυρεοειδοτρόπου Ορμόνης (TRH)	Θυρεοειδοτρόπα	Θυρεοειδοτρόπος Ορμόνη (TSH)	Θυρεοειδής Αδένας	Τριιωδοθυρονίνη (T3) Θυροξίνη (T4)
Εκλυτική Ορμόνη των Γοναδοτροφινών (GnRH)	Γοναδοτρόπα	Θυλακιοτρόπος (FSH) Ωχρινοτρόπος Ορμόνη (LH)	Ωοθήκες Όρχεις	Οιστρογόνα και Προγεστερόνη Τεστοστερόνη
Εκλυτική Ορμόνη της Θυρεοειδοτρόπου Ορμόνης (TRH)	Λακτοτρόπα	Προλακτίνη (PRL)	Μαστικός Αδένας	



Εικόνα 5. Ιστοί-στόχοι των ορμονών της υπόφυσης [79].

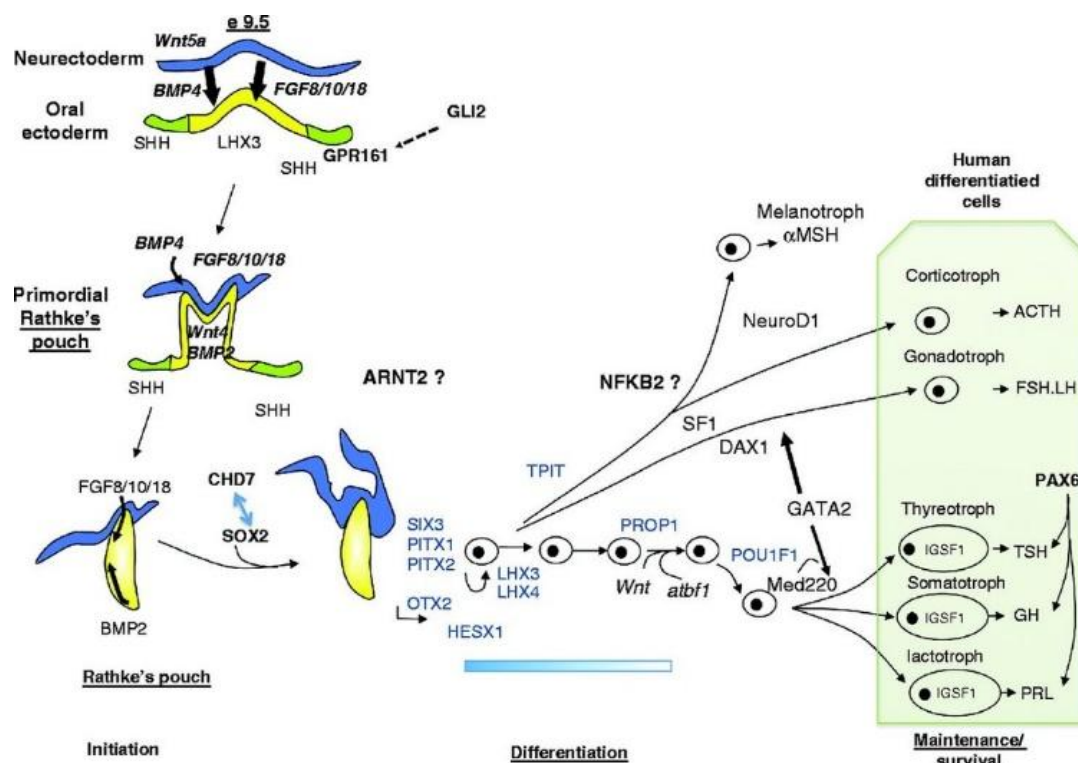
1.2.2 Οντογένεση Υπόφυσης

Η οντογένεση της υπόφυσης έχει μελετηθεί εκτενώς στον αρουραίο, αλλά παρουσιάζει κοινούς μηχανισμούς και στον άνθρωπο [80]. Η οντογένεση της υπόφυσης στον αρουραίο αρχίζει την 8.5^η εμβρυϊκή ημέρα και ολοκληρώνεται την 14^η (e8.5-e14). Κατά την 8.5^η εμβρυϊκή ημέρα (e8.5) του αρουραίου, η οροφή του στοματικού εξωδέρματος μεγαλώνει, σχηματίζοντας μια εγκόλπωση, τον θύλακα του Rathke την e9.0. Ο θύλακας περιβάλλεται από την εξωδερμικής προέλευσης πρόσθια και πλάγια επιφάνεια του διενγκεφάλου, τη χοάνη.

Στη συνέχεια, ο θύλακας πολλαπλασιάζεται και η εγκόλπωση κλείνει και αποκόπτεται από το στοματικό εξώδερμα. Από το κοιλιακό τμήμα του θύλακα Rathke σχηματίζονται τα ορμονοεκκριτικά κύτταρα της αδενοϋπόφυσης, ενώ από το ραχιαίο τμήμα του θύλακα σχηματίζεται ο ενδιάμεσος λοβός της υπόφυσης. Η κοιλότητα του θύλακα σταδιακά εξαφανίζεται ή παραμένει ως μια σχισμή. Από το νευροεξώδερμα προέρχονται ο μίσχος και η νευροϋπόφυση.

Η διαδικασία της οντογένεσης, χαρακτηρίζεται από μια προγραμματισμένη χωροχρονική αλληλουχία έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, τα οποία καταστέλλουν και ενεργοποιούν γονίδια-στόχους προωθώντας την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων της υπόφυσης (Εικόνα 6). Παθολογικές παραλλαγές σε έναν ή περισσότερους από

τους παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στην οντογένεση της υπόφυσης, οδηγούν σε διαφόρου βαθμού υποφυσιακές διαταραχές και δυσλειτουργίες [80, 81].



Εικόνα 6. Οντογένεση της υπόφυσης [83].

1.2.3 Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια

Η Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια (ΠΥΑ - Combined Pituitary Hormone Deficiency, CPHD) χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης και τουλάχιστον μιας ακόμα ορμόνης της υπόφυσης. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια μόνο της αυξητικής ορμόνης χαρακτηρίζονται από μεμονωμένη ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης (Isolated Growth Hormone Deficiency, IGHD). Περίπου το 45% των ασθενών με IGHD μετά από περίπου 5-6 έτη παρουσιάζουν πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια. Η συχνότητα εμφάνισης της ΠΥΑ εκτιμάται σε 1:8000 γεννήσεις [84].

Η διάγνωση της ΠΥΑ γίνεται μετά από παρακολούθηση του ρυθμού αύξησης, η οποία προκύπτει από την μέτρηση του ύψους του ασθενούς σε καθιστή και όρθια στάση, σε μεσοδιάστημα τουλάχιστον 6 μηνών, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ορμονών της υπόφυσης στο αίμα (ACTH, PRL, FSH, LH, TSH και IGF-1 για εκτίμηση της GH ανεπάρκειας), την μέτρηση της έκκρισης των ορμονών μετά από τεστ διέγερσης, μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI) της υπόφυσης καθώς και μέτρηση της οστικής ηλικίας [84, 85].

Το οικογενειακό ιστορικό είναι πολύ σημαντικό, καθώς εάν δεν υπάρχουν άλλα προσβεβλημένα μέλη στην οικογένεια με ανεπάρκεια ορμονών, το αίτιο μπορεί να είναι γενετικό οφειλόμενο σε εκ νέου παθολογική παραλλαγή (*de novo*) ή περιβαλλοντολογικό (π.χ. κατανάλωση αλκοολούχων ποτών ή μη σωστή διατροφή κατά την κύηση), ενώ εάν υπάρχουν αρκετά μέλη στην οικογένεια με ανεπάρκεια ορμονών, είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι το αίτιο είναι γενετικό. Ωστόσο, η βαρύτητα της νόσου και η εκφραστικότητα της, δηλαδή ο βαθμός της έκφρασης ενός φαινοτύπου (νόσημα) μεταξύ ατόμων που έχουν τον ίδιο γονότυπο, μπορεί να επηρεάζεται από περιβαλλοντολογικούς παράγοντες [84].

Ασθενείς με ΠΥΑ μπορεί να παρουσιάζουν υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (Hypogonadotrophic Hypogonadism, HH), Σύνδρομο Kallmann (Kallmann Syndrome, KS), ολοπροσεγκεφαλία (Holoprosencephaly, HPE), διαφραγματο-οπτική δυσπλασία (Septo-Optic Dysplasia, SOD) και IGHD. Η διαφραγματο-οπτική δυσπλασία χαρακτηρίζεται από υποπλασία οπτικού νεύρου, υποπλασία υπόφυσης και αγενεσία δομών της μέσης γραμμής [87]. Η ολοπροσεγκεφαλία δημιουργείται όταν ο προσεγκέφαλος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη αποτυγχάνει να διαχωριστεί σε δύο ημισφαίρια [88]. Ο HH χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια των γοναδοτροφινών, καθυστερημένη ήβη ή υπογονιμότητα. Ασθενείς με HH και μερική ή πλήρη ανοσμία παρουσιάζουν Σύνδρομο Kallmann [89].

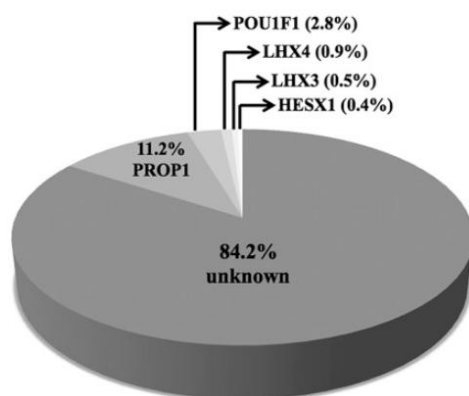
1.2.3.1 Γενετική βάση Πολλαπλής Υποφυσιακής Ανεπάρκειας

Παρόλο που περισσότερα από 30 γονίδια έχουν σχετιστεί με την ΠΥΑ, περίπου το 84% των ασθενών παραμένει άγνωστης γενετικής αιτιολογίας. Τα γονίδια που συνδέονται με την ΠΥΑ είναι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην οντογένεση της υπόφυσης. Τα πιο συχνά και πιο μελετημένα γονίδια είναι τα *PROP1*, *POU1F1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *OTX2*, *SOX2*, *SOX3* και *GLI2* [84].

Απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *PROP1* (Prophet of Pit1), αποτελούν την πιο συχνή γενετική αιτία της ΠΥΑ (Εικόνα 7) [84]. Πιθανολογείται ότι ο ρόλος του *PROP1* είναι η διέγερση μιας ομάδας υποφυσιακών βλαστοκυττάρων προς μετανάστευση και διαφοροποίηση ενεργοποιώντας την έκφραση του παράγοντα *POU1F1* [89, 90]. Ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *PROP1* αρχικά παρουσιάζουν ανεπάρκεια στις ορμόνες GH, TSH και PRL. Κατά την εφηβεία, παρουσιάζουν ανεπάρκεια στις LH, FSH και απουσία δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, ενώ σταδιακά μπορεί να παρουσιάσουν και ανεπάρκεια της ACTH. Η αδενούπόφυση στην μαγνητική τομογραφία της υποθαλαμο-υποφυσιακής περιοχής μπορεί να είναι φυσιολογική ή υποπλαστική [92].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *POU1F1* (POU Class 1 Homeobox 1) ή *PIT1* είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των κυττάρων της υπόφυσης που εκκρίνουν GH, TSH,

PRL. Ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων *GH1*, *GHRHR*, *PRL* καθώς και την έκφραση του ίδιου του *POU1F1* [93]. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *POU1F1* συνδέονται με ΠΥΑ και υποπλαστική υπόφυση και μεταβιβάζονται με τον υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Ωστόσο, 3 απενεργοποιητικές επικρατείς παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *POU1F1* έχουν αναφερθεί, οι p.R271W, c.214+1G>T και p.P76L [93–95]. Η παραλλαγή p.P76L του γονιδίου *POU1F1* ανιχνεύθηκε σε οικογένεια με IGHD.



Εικόνα 7. Κατανομή συχνότητων των ασθενών με ΠΥΑ και παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4*, *HESX1* καθώς και των γενετικά αδιάγνωστων ασθενών με ΠΥΑ [84].

Παθολογικές παραλλαγές του μεταγραφικού καταστολέα *HESX1* (Homeobox Expressed in Stem Cells 1) έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΠΥΑ με ή χωρίς διαφραγματο-οπτική δυσπλασία [96, 97]. Οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου αυτού μεταβιβάζονται με τον υπολειπόμενο αλλά και τον επικρατή τύπο κληρονομικότητας. Ο παράγοντας *HESX1* είναι απαραίτητος στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της υπόφυσης και του προσεγέφαλου [99]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες *HESX1* και *PROP1* εκφράζονται σε διαφορετικούς χρόνους και περιοχές, ενώ το διάστημα εμβρυϊκών ημερών e11-e13 παρατηρείται παράλληλη έκφραση των παραγόντων, καταστέλλοντας και ενεργοποιώντας αντίστοιχα την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την φυσιολογική ανάπτυξη της υπόφυσης. Η καταστολή του παράγοντα *HESX1* και η έκφραση του παράγοντα *PROP1* είναι απαραίτητη για την έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων της υπόφυσης [100].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *LHX3* (LIM Homeobox 3) εκφράζεται στο θύλακα του Rathke και στο νευρικό σωλήνα. Είναι σημαντικός για την ανάπτυξη της υπόφυσης και την οργάνωση των νευρώνων του νωτιαίου μυελού [84]. Ο *LHX3* εκφράζεται και στην ενήλικη υπόφυση. Ο παράγοντας *LHX3* δρά συνεργιστικά με τον παράγοντα *POU1F1* για να ενεργοποιήσουν την έκφραση των γονιδίων *TSHB* και *PRL* [101]. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *LHX3* μεταβιβάζονται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *LHX3* παρουσιάζουν όμοιο φαινότυπο με τους ασθενείς που φέρουν παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου

PROP1 αλλά επιπλέον παρουσιάζουν απώλεια ακοής και μικρό άκαμπτο αυχένα με περιορισμένη ικανότητα περιστροφής της κεφαλής [100, 101].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *LHX4* (LIM Homeobox 4) εκφράζεται στο θύλακα του Rathke, στο νευρικό σωλήνα και στον οπίσθιο εγκέφαλο. Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *POU1F1*, *GH1*, *PRL*, *GCA*, *FSHB* και *TSHB* [103]. Ασθενείς με επικρατείς παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο *LHX4* παρουσιάζουν ΠΥΑ, υποπλαστική υπόφυση, έκτοπη νευροϋπόφυση και μικρό τουρκικό εφίππιο [90, 100, 103].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *OTX2* (Orthodenticle Homeobox 2) είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και των δομών της κεφαλής. Κυρίως συμμετέχει στην ανάπτυξη των οφθαλμών και της υπόφυσης. Οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου συνδέονται με ΠΥΑ, μικροφθαλμία και πιθανόν άλλα αναπτυξιακά προβλήματα όπως αναπτυξιακή καθυστέρηση, μαθησιακές δυσκολίες, ανωμαλίες στόματος και αυτιών [104–106]. Κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν εκ νέου παραλλαγές [83, 107].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *SOX2* (SRV-box Transcription Factor 2) εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου, της υπόφυσης και στο πλακώδες των αυτιών και της μύτης, όχι όμως στην νευροϋπόφυση [109]. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου αυτού μεταβιβάζονται με τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας και παρουσιάζουν διαφορετική διεισδυτικότητα. Οι ασθενείς συνήθως χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια GH, TSH, FSH, LH και ACTH, οφθαλμικές διαταραχές, υποπλασία αδενοϋπόφυσης, απώλεια ακοής, HH κ.α. [83, 109, 110].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *SOX3* (SRV-box Transcription Factor 3) εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στον διεγκέφαλο και στη χοάνη, ενώ δεν εκφράζεται στο θύλακα του Rathke [112]. Οι ασθενείς παρουσιάζουν ΠΥΑ, IGHD, nIHH, μαθησιακές δυσκολίες και υποπλασία αδενοϋπόφυσης. Οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SOX3* παρουσιάζουν διαφορετική διεισδυτικότητα μεταξύ των ασθενών, δηλαδή συχνότητα εκδήλωσης του φαινοτύπου [84]. Οι περισσότερες παραλλαγές του γονιδίου *SOX3* αφορούν προσθήκες και απαλείψεις μιας περιοχής με 15 αλανίνες στο μέσο του γονιδίου (234-249 αμινοξέα). Οι παραλλαγές της περιοχής με τις 15 αλανίνες πιθανόν επηρεάζουν την μετακίνηση του παράγοντα *SOX3* στο κυτταρόπλασμα [113].

Ο μεταγραφικός παράγοντας *GLI2* (GLI Family Zinc Finger 2) συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι Sonic Hedgehog (SHH). Ασθενείς με απενεργοποιητικές ετερόζυγες παραλλαγές του γονιδίου παρουσιάζουν ήπιο ποικίλο φαινότυπο ΠΥΑ και διεισδυτικότητα στην οικογένεια [114]. Περίπου το 20% των παθολογικών παραλλαγών του γονιδίου *GLI2* έχουν κληρονομηθεί από ένα υγιή γονέα. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν

ολοπροσεγκεφαλία, χειλεοσχιστία, ΠΥΑ, IGHD και/ή πολυδακτυλία [115]. Ακόμη, ασθενείς με παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *GLI2*, μπορεί να φέρουν παθολογική παραλλαγή και στα γονίδια *ZIC2* και *SHH*, εξηγώντας πιθανόν την διαφορετική διεισδυτικότητα και τον ποικίλο φαινότυπο [84].

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών με ΠΥΑ, οι οποίοι φέρουν παθολογικές παραλλαγές στα παραπάνω γονίδια αλλά και σε 23 γονίδια ακόμη, γνωστά ότι συνδέονται με την ΠΥΑ φαίνονται στον πίνακα 3 [80, 83, 115–122].

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών με ΠΥΑ, οι οποίοι φέρουν παθολογικές παραλλαγές σε 32 γονίδια που συνδέονται με την ΠΥΑ.

Γονίδιο	Κληρονομικότητα	Ανεπάρκεια					Φαινότυπος Υπόφυσης	Έκτοπη Οπίσθια Υπόφυση	Άλλες Ανωμαλίες Υποφυσιακής Περιοχής	Επιπλέον Χαρακτηριστικά				
		GH	PRL	TSH	LH/FSH	ACTH				Κεφάλι/ Λαιμός	Μάτια	Ψυχοκινητικά προβλήματα	ΚΝΣ	Άλλα ευρήματα
POU1F1	AY/AE	NAI	NAI/OXI	NAI/OXI	OXI	OXI	ΦΑ/ΥΑ	OXI	Δ.Α.	Μακροκεφαλία, προπέτεια μετώπου, σχιστία ρινός, μεγάλα πρόσθια βρέγματα, μακρογλωσσία	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Πολυδακτυλία ποδών
PROP1	AY	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI/OXI	ΦΑ/ΥΑ/ΜΑ	OXI	Μεγάλο TE	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Καθυστερημένη ήβη, κίνδυνος εξελικτικής ενδοκρινοπάθειας
LHX3	AY	NAI	NAI	NAI	NAI	OXI	ΥΑ/ΜΑ	OXI	Επίπεδο TE	Βραχείς και παχείς σπόνδυλοι αυχένα και περιορισμένη περιστροφή αυχένα	Δ.Α.	NY	Νευροαισθητήρια κώφωση	Σκελετικές ανωμαλίες
LHX4	AE/AY	NAI	OXI	NAI	NAI	NAI	ΦΑ/ΥΑ	NAI/OXI	Ανώμαλο TE	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δυσμορφία παρεγκεφαλίδας τύπου Chiari I	Ανώμαλες παρεγκεφαλιδικές αμυγδαλές, νεογνική υπογλυκαμία, καρδιακή ανεπάρκεια, αναπνευστική δυσχέρεια
HESX1	AE/AY	NAI	NAI/OXI	NAI/OXI	NAI/OXI	NAI/OXI	ΦΑ/ΥΑ/ΑΑ	NAI/OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	NAI/OXI	Δ.Α.	Ψυχοκινητική Ανάπτυξη	SOD, ανωμαλίες μέσης γραμμής, μικροφαλλία, πολυδακτυλία
TGIF1	AE	NAI	Δ.Α.	NAI	NAI	Δ.Α.	ΥΑ/ΑΜ	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Κεντρικός μονήρης κοπήρας
OTX2	AE	NAI	NAI/OXI	NAI	NAI	NAI/OXI	ΦΑ/ΥΑ/ΑΜ	NAI/OXI	Δ.Α.	Κρανιακές δερμοειδείς κύστες, μικροκεφαλία, χειλεοσχιστία, δυσκολία σίτισης	Μικροφθαλμία, ανοφθαλμία, καταρράκτης κολόβωμα	Μαθησιακές δυσκολίες, αυτισμός	Δυσμορφία παρεγκεφαλίδας τύπου Chiari I, Επιληψία	Ανωμαλίες παρεγκεφαλίδας, Σύνδρομο Wolff-Parkinson-White, κλινοδακτυλία 5 ^{ου} δακτύλου
GLI2	AE	NAI	Δ.Α.	NAI/OXI	NAI/OXI	NAI/OXI	ΥΑ/ΑΑ	NAI/OXI	Δ.Α.	Μικροκεφαλία, υποπλασία μέσου προσώπου, μονήρης κοπήρας, χαρακτηριστικά όμοια με HPE	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Ανωμαλία μεσολόβιου, μέσης γραμμής, ποικίλοι φαινότυποι
GLI3	AE/AY	NAI	NAI/OXI	NAI	NAI	NAI	ΥΑ	OXI	Δ.Α.	Μικροφθαλμία, ρινο- και υπερωιοσχιστία, υδροκεφαλία, εγκεφαλοκήλη	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Γλοίωμα εγκεφαλικού κορμού, Σύνδρομο Pallister-Hall, καλοήθης όγκος υποθαλάμου
SOX2	AE	NAI/OXI	OXI	NAI/OXI	NAI	NAI/OXI	ΥΑ/ΦΑ/ΜΑ	NAI/OXI	Όγκος υπόφυσης	Μικροκεφαλία, προπέτεια μετώπου, ανωμαλίες οδόντων	Μικροφθαλμία, ανοφθαλμία, κολόβωμα	Μαθησιακές δυσκολίες, NY	Νευροαισθητήρια κώφωση, σπαστική διπληγία ή τετραπληγία	Καρδιακές και σκελετικές ανωμαλίες, ανωμαλίες σπονδύλων και γεννητικών οργάνων, ατρησία οισοφάγου
SOX3	Φυλοσύνδετο-X	NAI	OXI	NAI/OXI	NAI/OXI	NAI/OXI	ΥΑ	NAI/OXI	Παραμονή κρανιοφαρυγγικού καναλιού	Ανωμαλίες προσώπου	Δ.Α.	NY, Διαταραχές συμπεριφοράς	Δ.Α.	Δ.Α.

συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Συνέχεια πίνακα 3

Γονίδιο	Κληρονομικότητα	Ανεπάρκεια					Φαινότυπος Υπόφυσης	Έκτοπη Οπίσθια Υπόφυση	Άλλες Ανωμαλίες Υποφυσιακής Περιοχής	Επιπλέον Χαρακτηριστικά				
		GH	PRL	TSH	LH/FSH	ACTH				Κεφάλι/ Λαιμός	Μάτια	Ψυχοκινητικά προβλήματα	ΚΝΣ	Άλλα ευρήματα
ARNT2	AY	NAI/ OXI	OXI	NAI	NAI/ OXI	NAI	Δ.Α.	OXI	Δ.Α.	Μικροκεφαλία, προεξέχον μέτωπο, οπισθογναθία	Τύφλωση	Αναπτυξιακή καθυστερήση	Εγκεφαλική παράλυση, επιληπτικές κρίσεις	ΑΔ, εξάρθρωση ισχίων, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, υδρονέφρωση, θάνατος από σηψαιμία
TCF7L1	AE	NAI/ OXI	NAI/ OXI	NAI/ OXI	OXI	OXI	YA	OXI	OXI	Δ.Α.	Υποπλασία οπτικού νεύρου, νυσταγμός, μικρό οπτικό χiasmα	Δ.Α.	Δ.Α.	Μερική αγγειοπλασία μεσολόβιου, λεπτή πρόσθια σύμφυση, απουσία διαφανούς διαφράγματος
CHD7	AE	NAI	OXI	OXI	NAI	OXI	YA	NAI/OXI	Δ.Α.	Ατρησία ρινικής χοάνης	Εξόφθαλμος	NY	Κώφωση	Καθυστέρημένη ήβη και ανάπτυξη, Σύνδρομο GHARGE, υποπλασία γεννητικών οργάνων, καρδιακές ανωμαλίες, κρυφορχία
FGF8	AY	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI/ OXI	YA/AM/MA	NAI/OXI	Κενό TE	Κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες	Δ.Α.	Δ.Α.	Κώφωση	Ημιλοβιακή HPE, SOD, απουσία μεσολόβιου, ΑΔ, μικροφαλλία, υποπλασία νεφρών, KS, Σύνδρομο Moebius
FGFR1	AE	NAI	OXI	Δ.Α.	NAI	Δ.Α.	YA/AM	NAI/OXI	Δ.Α.	Χειλο-υπερωίο σχιστία, τριγωνοκεφαλία, αγγειοπλασία οδόντων	Κολόβωμα	Δ.Α.	Δ.Α.	Μικροφαλλία, KS, κρυφορχία, συνδακτυλία
SHH	AE	NAI	NAI/ OXI	NAI	NAI/ OXI	NAI/ OXI	YA/AM/AM	NAI/ Απουσία	Μικρό/Κενό TE	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Υπογλυκαιμία, κρανιοπροσωπική εγκεφαλοκήλη, άποιος διαβήτης, SOD, υπερτελορισμός
CDON	AE	NAI	OXI	NAI	OXI	NAI	YA	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	Στραβισμός	Δ.Α.	Επιληπτικές κρίσεις	Νεογνική υπογλυκαιμία, ίκτηρος, HPE
GPR161	AY	NAI	Δ.Α.	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	YA	NAI	Κενό TE	Δ.Α.	Πτώση των ματιών	NY	Δ.Α.	Βραχύ 5° δάκτυλο, συνδακτυλία, υποπλασία ονύχων, ΑΔ
POLR3A	AY	NAI/ OXI	NAI	OXI	NAI	OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Ανωμαλίες οδόντων	OXI	Δ.Α.	Υπομυελίνωση	HH, Σύνδρομο 4H, νυσταγμός, λεπτό μεσολόβιο
PROKR2	AE	NAI	OXI	NAI/ OXI	NAI	NAI/ OXI	YA/AM	NAI/OXI	Δ.Α.	Ρινοφαρυγγική στένωση	Δ.Α.	NY	Συνκίνησία, επιληπτικές κρίσεις	Διαταραχές ύπνου, KS, Σύνδρομο morning glory, κρυφορχία, σκαφοειδής θώρακας, ΑΔ, SOD, νεογνική αναπνευστική δυσχέρεια

συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Συνέχεια πίνακα 3

Γονίδιο	Κληρονομικότητα	Ανεπάρκεια					Φαινότυπος Υπόφυσης	Έκτοπη Οπίσθια Υπόφυση	Άλλες Ανωμαλίες Υποφυσιακής Περιοχής	Επιπλέον Χαρακτηριστικά				
		GH	PRL	TSH	LH/FSH	ACTH				Κεφάλι/ Λαιμός	Μάτια	Ψυχοκινητικά προβλήματα	ΚΝΣ	Άλλα ευρήματα
BMP4	AE	NAI	Δ.Α.	NAI	NAI	NAI	ΥΑ/ΑΜ	NAI	Δ.Α.	Μακροκεφαλία, προπέτεια μετώπου, Ανωμαλίες οδόντων	Ανοφθαλμία	ΝΥ	Δ.Α.	Ανωμαλίες μέσης γραμμής, πολυδακτυλία, KS, ουρογεννητικές ανωμαλίες,
IGSF1	Φυλοσύνδετο-Χ	NAI	NAI/ OXI	NAI	NAI	NAI/ OXI	ΦΑ	OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	Καλοήθης εξωτερικός υδροκέφαλος	Ήπια	Δ.Α.	Μακροορχία, υπερβαρότητα, καθυστερημένη αύξηση τεστοστερόνης στην εφηβεία
HHIP		NAI	OXI	NAI	Δ.Α.	NAI	ΥΑ/ΛΜ	Απουσία	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Νεογνικός ίκτερος
PAX6	AE	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	NAI/ OXI	NAI/ OXI	ΥΑ/ΛΜ	NAI	Υποανάπτυκτο ΤΕ	Δ.Α.	Πρόβλημα οφθαλμού	Ήπια Ψυχοκινητικά προβλήματα	OXI	Κρυφορχία, απουσία εφηβικών τριχών
POLR3A	AY	NAI/ OXI	NAI	OXI	NAI	OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Ανωμαλίες οδόντων	OXI	Δ.Α.	Υπομυελίνωση	ΗΗ, Σύνδρομο 4Η, νυσταγμός, λεπτό μεσολόβιο
RBM28	AY	NAI	NAI/ OXI	NAI/ OXI	NAI	NAI/ OXI	ΥΑ	NAI	Δ.Α.	Ανωμαλίες οδόντων	Δ.Α.	Μαθησιακές δυσκολίες	Δ.Α.	Αλωπεκία, κεντρική επινεφριδιακή ανεπάρκεια, Σύνδρομο ANE
WDR11	AE	NAI		NAI	NAI	NAI	ΜΚΑ/ΦΥ/ ΛΜ/ΑΜ/ ΑΜ/ΔΜ	NAI/ Απουσία	Δ.Α.	Ανωμαλίες οδόντων, χειλοεσχιστία	Δ.Α.	Δ.Α.	Νευροαισθητήρια κώφωση	ΗΗ, KS, ήπια υπογλυκαιμία
IFT172	AY	NAI	Δ.Α.	OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	ΥΑ	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	Πρόβλημα όρασης	Κινητική καθυστερήση	Δ.Α.	Υποπλασία μέσης γραμμής, παχυσαρκία, καμπυλότητα αριστερών δακτύλων, σκελετικές ανωμαλίες
ZSWIM6	AE	NAI/ OXI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	ΑΑ/Δ.Α.	Δ.Α.	Μεγάλο ΤΕ	Πρόσθιορινική δυσπλασία, απουσία οσφρητικών βολβών	Δ.Α.	Νευροκινητική καθυστερήση	Δ.Α.	Υποπλασία μεσολόβιου και επιγονατίδας, Πολυδακτυλία, Κρυφορχία
HNRNPU	AE	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Μαθησιακές δυσκολίες, ΝΥ	Επιληψία	Υπέρταση, Σύνδρομο Lennox-Gastaut, ανωμαλία μεγάλου δακτύλου, καθυστερημένη ΟΗ, σκελετικές ανωμαλίες
SIX3	AE	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	ΑΑ	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Μικροφθαλμία	ΝΥ	Δ.Α.	ΗΡΕ, ΑΔ
PNPLA6	AY	NAI	Δ.Α.	NAI	NAI	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Τύφλωση	Δ.Α.	Δ.Α.	Σπαστική παραπληγία, Σύνδρομο Gordon Holmes, Laurence-Moon, Oliver MacFarlane, ΗΗ κ.α.

ΦΥ: Φυσιολογική Αδενοϋπόφυση, ΥΑ: Υποπλασία Αδενοϋπόφυσης, ΜΚΑ: Μικρή Αδενοϋπόφυση, ΜΑ: Μεγάλη Αδενοϋπόφυση, ΑΑ: Απλασία Αδενοϋπόφυσης, ΑΜ: Αγενεσία Μίσχου, ΛΜ: Λεπτός Μίσχος, ΔΜ: Διατομή Μίσχου, ΤΕ: Τουρκικό Εφίππιο, ΑΔ: Άποιος Διαβήτης, ΝΥ: Νοητική υστέρηση/καθυστερήση, ΟΗ: Οστική Ηλικία, SOD: Septo-Optic Dysplasia - Διαφραγματο-οπτική Δυσπλασία, ΗΡΕ: Holoprosencephaly - ολοπροσεγκεφαλία, KS: Kallmann Syndrome - Σύνδρομο Kallmann, ΗΗ: Hypogonadotrophic Hypogonadism - Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός, Δ.Α.: Δεν αναφέρεται

1.3 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ

Οι Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου (ΔΔΦ - Disorders of Sex Development, DSD) είναι μία ομάδα κληρονομικών ενδοκρινολογικών παθήσεων, η οποία χαρακτηρίζεται από άτυπη ανάπτυξη του χρωμοσωμικού, γοναδικού ή ανατομικού φύλου. Οι ΔΔΦ παρουσιάζουν μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια η οποία χαρακτηρίζεται είτε από ατελή διαφοροποίηση του άρρενος είτε από αρρενοποίηση του θήλεος ατόμου και κλινικά εκδηλώνεται με ένα ευρύ φαινοτυπικό φάσμα που κυμαίνεται από υποσπαδία (1:250 αγόρια), αμφίβολα γεννητικά όργανα (1:4500 νεογνά) έως και πλήρη ΧΧ ή ΧΥ αναστροφή του φύλου (1:20000 νεογνά). Η συχνότητα των ΔΔΦ ποικίλει από σπάνια έως λιγότερο σπάνια αναλόγως του φαινοτύπου του ασθενούς [123, 124]. Η κλινική και φαινοτυπική ετερογένεια των ΔΔΦ οφείλεται στους πολλούς παράγοντες που εμπλέκονται στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης του φύλου.

Για την αντιμετώπιση των ασθενών με ΔΔΦ απαιτείται μία διεπιστημονική ομάδα διαφορετικών ειδικοτήτων, όπως ενδοκρινολόγοι, νεογνολόγοι, ουρολόγοι, (πλαστικοί) χειρουργοί, ακτινολόγοι, γυναικολόγοι, γενετιστές, ψυχολόγοι, οι οποίοι θα διαγνώσουν την υποκείμενη διαταραχή, αλλά και θα συμβάλλουν στην καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση του περιστατικού λαμβάνοντας υπ' όψη την πιθανή μελλοντική γονιμότητα, σεξουαλική λειτουργία, αναγκαιότητα χειρουργικών παρεμβάσεων αποκατάστασης αλλά και θα υποστηρίξουν ψυχολογικά τον ασθενή και κυρίως την οικογένεια του, δεδομένου ότι η διάγνωση τίθεται συνήθως κατά τη νεογνική ηλικία, όπου ο ίδιος ο ασθενής δεν μπορεί να λάβει μέρος στη λήψη των αποφάσεων και η τελική επιλογή γίνεται με ουσιαστική συμμετοχή των γονέων του νεογνού, όταν έχουν επαρκώς ενημερωθεί για τις παραμέτρους που θα πρέπει να λάβουν υπ' όψη τους για τη μελλοντική ποιότητα ζωής του παιδιού τους [126].

Η διάγνωση των ΔΔΦ γίνεται με κλινική εξέταση του νεογνού, εργαστηριακή διερεύνηση για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων διαφόρων ορμονών (στεροειδών του φύλου, ανδρογόνων, γοναδοτροφινών, επινεφριδιακών ορμονών, ACTH), καρυότυπο, αλλά και απεικονιστικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν υπερηχογράφημα επινεφριδίων, νεφρών και έσω γεννητικών οργάνων καθώς και με γονιδιακό έλεγχο [127]. Η απόφαση της επιλογής του φύλου του ασθενούς είναι δύσκολη και κρίσιμη τόσο για τους γονείς όσο και για τους ιατρούς. Η γενετική αιτιολογία των ΔΔΦ, όταν αυτή είναι εφικτή, είναι σημαντική καθώς συμβάλλει σημαντικά στην απόφαση για το φύλο ανατροφής επηρεάζοντας την μελλοντική

ψυχοσεξουαλική ανάπτυξη του ασθενούς, την αναπαραγωγική του ικανότητα, την θεραπεία του, και την γενετική συμβουλευτική του ασθενούς και της οικογένειάς του [128].

Παρόλο που ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΔΔΦ φέρουν παραλλαγές (SNVs ή μετατοπίσεις) του γονιδίου *SRY*, και ένα μικρότερο ποσοστό φέρει παραλλαγές σε άλλα γονίδια, υπολογίζεται ότι περίπου μόνο στο 13-20% των ασθενών με ΔΔΦ ανιχνεύεται η γενετική αιτιολογία [128–130].

1.3.1 Οντογένεση γονάδων

Κατά την εμβρυογένεση, η αρχέγονη γονάδα και το ουροποιητικό σύστημα αναπτύσσονται από τον μεσοδερμικής προέλευσης μεσόνεφρο της ουρογεννητικής ακρολοφίας. Από την ουρογεννητική ακρολοφία αναπτύσσονται οι νεφροί, ο φλοιός των επινεφριδίων και οι γονάδες [127]. Η αρχέγονη γονάδα σχηματίζεται την 4^η εβδομάδα της κύησης και παραμένει αδιαφοροποίητη και αμφιδύναμη έως την 7^η εβδομάδα. Η αρχέγονη γονάδα είναι αμφιδύναμη καθώς μπορεί να ακολουθήσει δύο αναπτυξιακές οδούς είτε προς όρχεις είτε προς ωοθήκες. Στο αδιαφοροποίητο στάδιο του αναπαραγωγικού συστήματος συνυπάρχουν σε όλα τα άτομα οι πόροι του Müller και του Wolff. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στα 46,XX άτομα από τους πόρους του Müller αναπτύσσονται οι ωαγωγοί/ σάλπιγγες, η μήτρα και το άνω τριτημόριο του κόλπου, ενώ από τους πόρους του Wolff στα φυσιολογικά 46,XY άτομα αναπτύσσονται οι σπερματοδόχοι πόροι, οι σπερματοδόχοι τόνοι και οι επιδιδυμίδες.

Η οδός που θα ακολουθήσει κάθε έμβryo καθορίζεται αρχικά από το χρωμοσωμικό φύλο του εμβρύου (XX ή XY). Η παρουσία του Y χρωμοσώματος, και συγκεκριμένα του γονιδίου *SRY*, το οποίο εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα, ενεργοποιεί την ανάπτυξη των όρχεων, ενώ η απουσία του χρωμοσώματος Y και συνεπώς του γονιδίου *SRY*, ευνοεί την διαφοροποίηση των γονάδων προς ωοθήκες. Ως εκ τούτου, φυσιολογικά έμβρυα με καρυότυπο 46,XY αναπτύσσονται σε αρρένα και φυσιολογικά έμβρυα με καρυότυπο 46,XX σε θήλεα [3, 124].

Η διαφοροποίηση του φύλου περιλαμβάνει δυο στάδια, τον καθορισμό του φύλου (sex determination) και τη διαφοροποίηση του φύλου (sex differentiation). Ο καθορισμός του φύλου αφορά την διαδικασία ανάπτυξης της αδιαφοροποίητης γονάδας είτε σε εμβρυϊκούς όρχεις είτε σε εμβρυϊκές ωοθήκες, υπό την χωροχρονική ορθή έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (γοναδικό φύλο), ενώ η διαφοροποίηση αναφέρεται στην διαφοροποίηση των υπόλοιπων αδιαφοροποίητων δομών του αναπαραγωγικού συστήματος υπό την επίδραση ορμονών που εκκρίνονται από τη διαφοροποιημένη πλέον γονάδα σχηματίζοντας τα έσω και έξω γεννητικά όργανα (φαινοτυπικό φύλο). Όπως

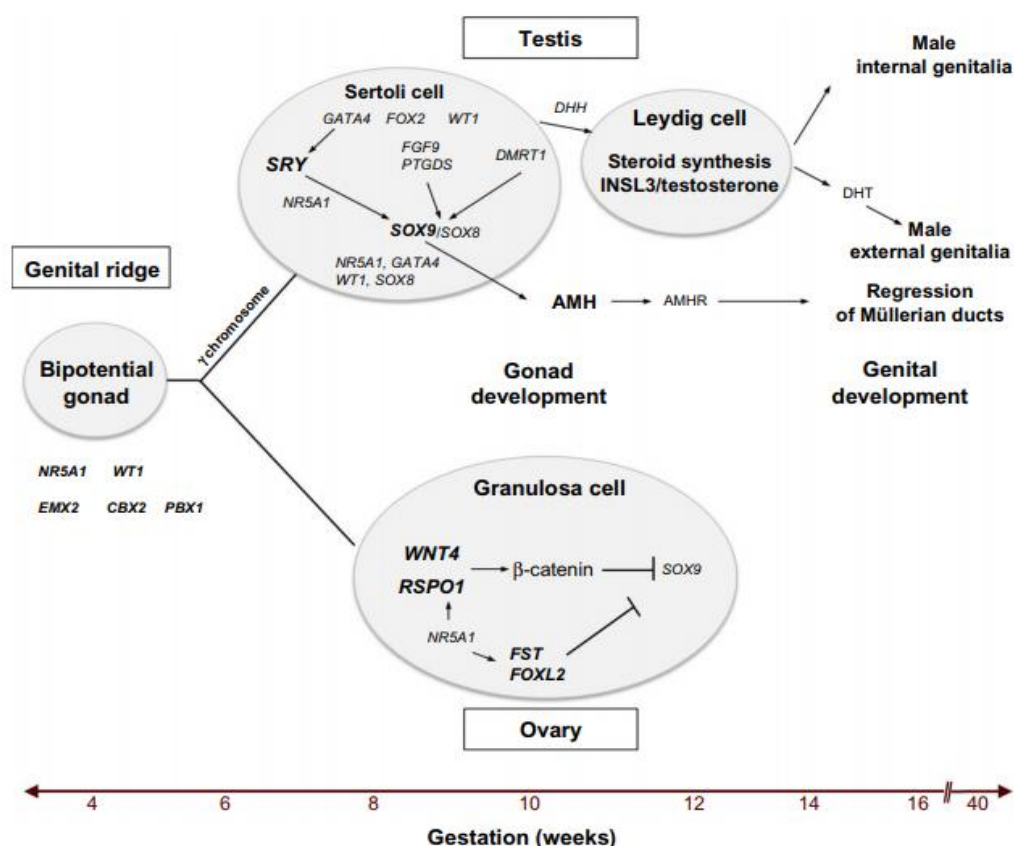
αναφέρθηκε, οι διαδικασίες αυτές καθορίζονται από την έκφραση διαφόρων γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν συγκεκριμένη χωροχρονική έκφραση, για παράδειγμα τα γονίδια *EMX2*, *CBX2*, *WT1*, *NR5A1*, *GATA4* κ.α. (Εικόνα 8) [132].

Στα 46,XY έμβρυα, η έκφραση του *SRY*, από τα πρώιμα κύτταρα Sertoli των γονάδων, επάγει την έκφραση του γονιδίου *SOX9* και αυτό με την σειρά του την έκφραση του γονιδίου *FGF9*. Αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα για την διαφοροποίηση των κυττάρων Sertoli και την οργανογένεση των όρχεων [125]. Επιπλέον, κατά την διαφοροποίηση του φύλου, τα εμβρυϊκά κύτταρα Sertoli εκκρίνουν την αντιμυλλεριανή ορμόνη (Anti-Müllerian Hormone, AMH) κατά την 6^η-7^η εβδομάδα της κύησης, η οποία προκαλεί την υποστροφή των πόρων του Müller. Η έκφραση της AMH επάγεται από τους παράγοντες *SOX9*, *SF1* και *WT1*, ενώ ο παράγοντας *DAX1* καταστέλλει την έκφραση της. Οι παράγοντες που προέρχονται από τα εμβρυϊκά κύτταρα Sertoli, όπως η AMH, ο DHH και ο *FGF9* σηματοδοτούν την έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων Leydig κατά την 7^η εβδομάδα της κύησης [133].

Κατά την 8^η εβδομάδα της κύησης, τα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig παράγουν τεστοστερόνη και ανδρογόνα υπό την επαγωγή της ορμόνης hCG (human Chorionic Gonadotropin, ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη) που παράγεται από τον πλακούντα, ενώ στο 2^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης η παραγωγή της τεστοστερόνης επάγεται από την εμβρυϊκή LH. Η έκφραση της τεστοστερόνης σταθεροποιεί τους πόρους του Wolff. Οι πόροι του Wolff διαφοροποιούνται προς επιδιδυμίδα, τον σπερματικό αγωγό και πόρο καθώς και τη σπερματοδόχο κύστη. Η μετατροπή της τεστοστερόνης σε διυδροτεστοστερόνη, η οποία πραγματοποιείται από την 5α-αναγωγή (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SRD5A2*), είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη των έξω γεννητικών οργάνων αρρένων εμβρύων. Ο παράγοντας *INSL3* και η τεστοστερόνη, συμβάλλουν στην κάθοδο των όρχεων από την περινεφρική θέση, στη βουβωνική χώρα και τελικά στο όσχεο έως την 32^η εβδομάδα της κύησης [126, 133].

Η διαφοροποίηση των ωθηκών σε 46,XX έμβρυα λαμβάνει χώρα χρονικά μια εβδομάδα μετά από αυτή των όρχεων. Στα 46,XX έμβρυα, οι παράγοντες *FOXL2*, *WNT4*, *RSPO1* και το σηματοδοτικό μονοπάτι WNT/β-κατενίνης ενεργοποιούν την διαφοροποίηση των ωθηκών. Οι παράγοντες αυτοί αποσιωπούν την έκφραση των γονιδίων *SOX9* και *FGF9* με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των όρχεων [132]. Η έκφραση των παραγόντων *FOXL2*, *WNT4*, *RSPO1* σε απουσία τεστοστερόνης και του παραγώγου της, της διυδροτεστοστερόνης (dihydrotestosterone, DHT), συμμετέχουν στην ανάπτυξη θήλεων έξω γεννητικών οργάνων. Ενώ, η απουσία της AMH, ευωδώνει την ανάπτυξη των έσω

γεννητικών οργάνων θηλέων (μήτρα, σάλπιγγες κ.α.) από τους πόρους του Müller. Επίσης, ο παράγοντας STRA8 είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των ωοκυττάρων [127].



Εικόνα 8. Η διαφοροποίηση των γονάδων κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη και τα γονίδια τα οποία συμμετέχουν σε αυτή [125].

1.3.2 Ορολογία και κατηγοριοποίηση των ΔΔΦ

Έως το 2006, οι ασθενείς με αμφίβολα γεννητικά όργανα χαρακτηριζόντουσαν ως ενδιάμεσου φύλου (intersex), ερμαφρόδιτοι (hermaphrodites) και ψευδοερμαφρόδιτοι (pseudohermaphrodites). Η ορολογία αυτή θεωρήθηκε υποτιμητική και προσβλητική για τους ασθενείς και τις οικογένειες τους και το 2006 αντικαταστάθηκε από τον γενικό όρο Διαταραχή Διαφοροποίησης του Φύλου [135]. Τον νέο όρο έθεσαν επιστήμονες ενδοκρινολόγοι, γενετιστές, χειρουργοί και ψυχολόγοι της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παιδιατρικής Ενδοκρινολογίας και της Παιδιατρικής Ενδοκρινολογικής Εταιρείας Lawson Wilkins στην Συναίνεση του Σικάγου, στην οποία κατηγοριοποίησαν τις ΔΔΦ (Πίνακας 4) και πρότειναν διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις των ασθενών με ΔΔΦ [136].

Πίνακας 4. Κατηγοριοποίηση των ΔΔΦ [135].

Χρωμοσωμική ΔΔΦ	46,XY ΔΔΦ	46,XX ΔΔΦ
45,X (Σύνδρομο Turner)	(Α) Διαταραχές ανάπτυξης των όρχεων ➤ Πλήρης γοναδική δυσγενεσία (Σύνδρομο Sweyer) ➤ Μερική γοναδική δυσγενεσία ➤ Υποστροφή γονάδων ➤ Ωοθηκορχική ΔΔΦ	(Α) Διαταραχές ανάπτυξης των ωοθηκών ➤ Ωοθηκορχική ΔΔΦ ➤ Ορχική ΔΔΦ (παρουσία SRY, διπλασιασμός SOX9) ➤ Γοναδική δυσγενεσία
47,XXY (Σύνδρομο Klinefelter)	(Β) Διαταραχές στην σύνθεση και δράση των ανδρογόνων ➤ Διαταραχή στην βιοσύνθεση των ανδρογόνων (π.χ. SRD5A, STAR) ➤ Διαταραχή στην δράση των ανδρογόνων (π.χ. Μερική ή πλήρη αντίσταση στα ανδρογόνα) ➤ Διαταραχή του υποδοχέα LH (απλασία ή υποπλασία των κυττάρων Leydig) ➤ Διαταραχές της AMH και του υποδοχέα της (Σύνδρομο εμμένοντος πόρου Müller)	(Β) Περίσσεια ανδρογόνων ➤ Εμβρυϊκής προέλευσης (ανεπάρκεια 21-υδροξυλάσης, 11-υδροξυλάσης) ➤ Εμβρυοπλακουντιακής προέλευσης (ανεπάρκεια αρωματάσης, POR) ➤ Μητρικής προέλευσης (εξωγενής λήψη ανδρογόνων, ωχρίνωμα)
45,X/46,XY (Μεικτή γοναδική δυσγενεσία, ωοθηκορχική ΔΔΦ)	(Γ) Άλλες διαταραχές ➤ Βαρειάς μορφής υποσπαδία, εκστροφή κλοάκης, κρυφορχία, Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός, κ.α.	(Γ) Άλλες διαταραχές ➤ Εκστροφή κλοάκης, κοιλιακή ατρησία, αγενεσία πόρων Müller, κ.α.
46,XX/46,XY (Χειμερινή, ωοθηκορχική ΔΔΦ)		

1.3.2.1 Χρωμοσωμική ΔΔΦ

Στην κατηγορία της χρωμοσωμικής ΔΔΦ ανήκουν ασθενείς με σύνδρομο Turner, Klinefelter, αλλά και ασθενείς με μωσαϊκισμό. Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου Turner είναι 1:2500 των θηλέων νεογνών. Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονται από ανευπλοειδία (45,X) ή έλλειψη τμήματος του ενός X χρωμοσώματος ή ανακατατάξεις του χρωμοσώματος X (διπλασιασμών και απαλείψεων τμημάτων του X χρωμοσώματος) και παρουσιάζουν χαμηλό ανάστημα, κοντό λαιμό, μικρό βάρος γέννησης, καθυστερημένη ήβη ή υπεργοναδοτροφικό υπογοναδισμό με πλήρη απουσία έναρξης ήβης ή πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια, μικρογναθία, καρδιακές ανωμαλίες, με συνηθέστερη τη στένωση του ισθμού, της αορτής κ.α. Πολλοί ασθενείς με σύνδρομο Turner έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ, υπέρτασης, υποθυρεοειδισμού αυτοάνοσης αιτιολογίας και οστεοπόρωσης [126, 136].

Οι ασθενείς με σύνδρομο Klinefelter έχουν καρυότυπο 47,XXY. Το επιπλέον X χρωμόσωμα στις περισσότερες περιπτώσεις προέρχεται από λάθος κατά την πατρική μείωση I και σε λιγότερες κατά την μητρική μείωση I ή κατά την μείωση II [138]. Η συχνότητα του συνδρόμου Klinefelter είναι 1:500 των αρρένων νεογνών. Οι ασθενείς παρουσιάζουν φυσιολογικά έξω γεννητικά όργανα, ψηλό ανάστημα, μικρούς όρχεις,

καθυστερημένη ήβη, υπογονιμότητα, γυναικομαστία, μαθησιακά προβλήματα και διαταραχές συμπεριφοράς [126, 138].

1.3.2.2 46,XY ΔΔΦ

Ασθενείς με 46,XY ΔΔΦ χαρακτηρίζονται είτε από διαταραχές στη διαφοροποίηση των γονάδων, είτε στην σύνθεση και δράση της τεστοστερόνης (ατελής αρρενοποίηση) (Εικόνα 9) [127]. Παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *SRY*, *NR5A1*, *NROB1*, *WT1*, *SOX9*, *DMRT1*, *MAP3K1* και *CBX2* έχουν συνδεθεί με 46,XY αναστροφή του φύλου, ενώ με την σύνθεση και δράση της τεστοστερόνης έχουν συνδεθεί παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *STAR*, *CYP11A1*, *HSD3B2*, *CYP17A1*, *POR*, *SRD5A2* και *AR* [124, 133].

Συχνά, οι 46,XY ΔΔΦ μπορεί να συνυπάρχουν με άλλες ανωμαλίες σε άλλα συστήματα (Συνδρομικές μορφές). Για παράδειγμα, ασθενείς με απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SOX9* εκτός από δυσγενεσία γονάδων μπορεί να παρουσιάζουν και σκελετικές ανωμαλίες (Campromelic Syndrome) [140], ενώ ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GATA4* μπορεί να εμφανίζουν και καρδιακές παθήσεις [141].

Η χρωμοσωμική περιοχή Xp21.2, η οποία περιλαμβάνει το γονίδιο *NROB1* (*DAX1*), χαρακτηρίζεται από γενετική πολυπλοκότητα, καθώς διπλασιασμός της περιοχής συνδέεται με 46,XY ΔΔΦ και αναστροφή του φύλου, απάλειψη της περιοχής συνδέεται με Συγγενή Υποπλασία των Επινεφριδίων, ενώ μικραπάλειψη της περιοχής Xp21.2 συνδέεται με 46,XX αναστροφή του φύλου [142].

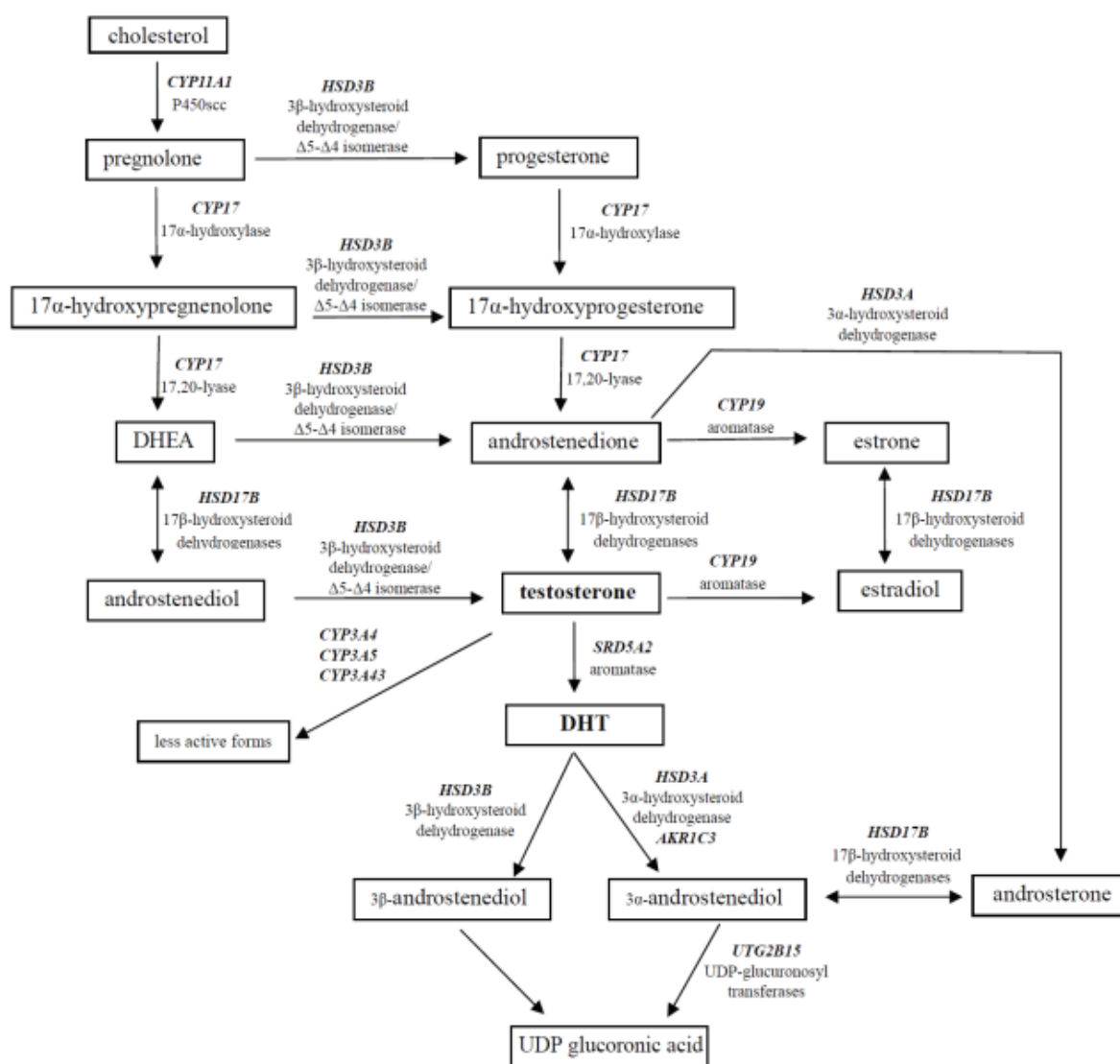
Το σύνδρομο εμμένοντων πόρων του Müller είναι μια σπάνια διαταραχή, η οποία συνήθως ανιχνεύεται κατά τη χειρουργική επέμβαση βουβωνοκήλης ή κρυφορχίας σε ασθενείς με 46,XY ΔΔΦ. Οι ασθενείς αυτοί δεν εμφανίζουν αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα, δεδομένου ότι η παραγωγή της τεστοστερόνης και μετατροπή της σε διυδροτεστοστερόνη παραμένει φυσιολογική. Η κύρια γενετική αιτία του συνδρόμου είναι υπολειπόμενες παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *AMH* και του υποδοχέα της AMH, *AMHR2*. Οι απενεργοποιητικές παραλλαγές των γονιδίων αυτών οδηγούν στην μη υποστροφή των πόρων Müller και συνεπώς διατήρηση τους, οι οποίοι διαφοροποιούνται σε ωαγωγούς, μήτρα κ.α. Συνεπώς, όπως περιγράφηκε, τα έξω γεννητικά όργανα των ασθενών είναι άρρενος ατόμου λόγω φυσιολογικής παραγωγής τεστοστερόνης, ενώ εσωτερικά αναπτύσσονται γεννητικά όργανα θήλεος [143].

1.3.2.3 46,XX ΔΔΦ

Ασθενείς με 46,XX ΔΔΦ παρουσιάζουν είτε δυσγενεσία γονάδων είτε αρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων λόγω της παρουσίας αυξημένων ανδρογόνων (Εικόνα 9). Η

συχνότερη γενετική αιτία εμφάνισης 46,XX ΔΔΦ με αρρενοποίηση είναι η Συγγενής Υπερπλασία των Επινεφριδίων (ΣΥΕ) λόγω παθολογικών παραλλαγών του γονιδίου της 21-υδροξυλάσης (*CYP21A2*). Νεογνά με καρυότυπο 46,XX με κλασική μορφή ΣΥΕ απώλειας άλατος, τα οποία φέρουν παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *CYP21A2* συχνά παρουσιάζουν αμφίβολα έξω γεννητικά όργανα [144].

Επιπλέον, έμβρυα με 46,XX ΔΔΦ μπορεί να εμφανίζουν όρχεις αντί για ωοθήκες, με κύρια γενετική αιτία (περίπου το 80%) την παρουσία, λόγω μετατόπισης, του γονιδίου *SRY* στο φυλετικό Χ χρωμόσωμα ή σε ένα από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Άλλοι λόγοι για την εμφάνιση όρχεων σε έμβρυα με 46,XX ΔΔΦ είναι η υπερέκφραση γονιδίων που συμβάλλουν στην διαφοροποίηση των όρχεων, όπως είναι τα μέλη της οικογένειας *SOX* (*SOX9*, *SOX3*, *SOX10*, *SOX13*) ή η αποσιώπηση γονιδίων που συμβάλλουν στην διαφοροποίηση των ωοθηκών, όπως είναι τα *WNT4* και *RSPO1* [126, 127, 144–146].



Εικόνα 9. Μονοπάτι σύνθεσης ανδρογόνων και τα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτό. DHEA:

Dehydroepiandrosterone (Δεϋδροεπιανδροστερόνη), DHT: Dihydrotestosterone (Διδροτεστοστερόνη) [148].

1.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Η μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) επιτρέπει τη μαζική αλληλούχηση πολλών διαφορετικών τμημάτων του γονιδιώματος σε πολλά δείγματα ασθενών ταυτόχρονα σε μια μόνο πειραματική δοκιμασία. Τρεις μεθοδολογίες στηρίζονται στην μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς, η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS), η αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing, WES) και η στοχευμένη αλληλούχηση ομάδας γονιδίων (Next Generation Sequencing Targeted Gene Panel, NGS TGP). Η μέθοδος NGS, η οποία θα εφαρμοστεί σε κάθε ξεχωριστή περίπτωση εξαρτάται από το είδος της μελέτης και τα βιολογικά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν. Η μεθοδολογία του NGS έχει πολλές εφαρμογές τόσο στην διάγνωση όσο και στην έρευνα.

Η εφαρμογή του WGS επιτρέπει την αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών (εξονίων) και μη κωδικοποιουσών περιοχών (ιντρονίων, ρυθμιστικών και διαγονιδιακών περιοχών) του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Συνήθως, το WGS επιλέγεται σε πληθυσμιακές μελέτες, δηλαδή σε μελέτες στις οποίες μελετώνται οι παραλλαγές που φέρει ένας πληθυσμός και συσχετίζονται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους, για παράδειγμα μεταβολικά, ανθρωπομετρικά κ.α. [149].

Ακόμη, το WGS επιλέγεται σε φαρμακογονιδιωματικές μελέτες, στις οποίες μελετώνται η απόκριση ασθενών σε φάρμακα. Με το WGS ανιχνεύονται οι παραλλαγές που φέρει ένας ασθενής (φαρμακογονιδιωματικό προφίλ) σε γονίδια (φαρμακογονίδια), τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τον μεταβολισμό και την μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών σε ιστούς-στόχους συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην ευαισθησία ή στην αντίσταση των ασθενών αυτών σε συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες. Η χρήση αυτή του WGS συμβάλλει στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής, η οποία έχει ως σκοπό την χορήγηση κατάλληλων θεραπευτικών φαρμάκων σε κάθε ασθενή ξεχωριστά ανάλογα με το φαρμακογονιδιωματικό προφίλ του [149, 150].

Το WES επιλέγεται συνήθως για διαγνωστικούς σκοπούς για την ανίχνευση παθολογικών παραλλαγών στις κωδικοποιούσες περιοχές (περίπου 20000 γονίδια), οι οποίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% του γονιδιώματος ασθενών, των οποίων ο φαινότυπος είναι σύνθετος [152]. Η εφαρμογή του συχνά οδηγεί στην ανίχνευση των παθολογικών παραλλαγών αλλά και στην ανεύρεση νέων γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην καλύτερη κατανόηση της νόσου και στην ορθότερη αντιμετώπιση της.

Η στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS TGP) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθολογικών παραλλαγών σε μία ομάδα γονιδίων, τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με ένα νόσημα. Επιλέγεται για διαγνωστικούς σκοπούς, σε ασθενείς με κλινικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για ένα μονογονιδιακό νόσημα, όπως για παράδειγμα ο ΜΣΔ MODY. Με την μεθοδολογία αυτή δεν είναι εφικτή η ανεύρεση εμπλοκής νέων γονιδίων σε ένα νόσημα, εκτός εάν έχει επιλεγθεί κατά τον σχεδιασμό της ομάδας γονιδίων, κάποιο γονίδιο υποψήφιο για την εμπλοκή του στην παθογένεια της νόσου.

Οι παραπάνω μέθοδοι διαφέρουν ως προς την κάλυψη (Coverage) και το βάθος των διαβασμάτων (Depth of reads) των αλληλουχιών-στόχων. Η κάλυψη αναφέρεται στο ποσοστό των βάσεων που αλληλουχούνται από τις αλληλουχίες-στόχους σύμφωνα με ένα γονιδίωμα αναφοράς. Για παράδειγμα, εάν με το NGS TGP αλληλουχούνται όλα τα εξόνια ενός γονιδίου-στόχου, τότε η κάλυψη του γονιδίου είναι 100%. Το βάθος των διαβασμάτων αναφέρεται στο πλήθος των αλληλουχήσεων μιας αλληλουχίας-στόχου. Για παράδειγμα, όταν μια αλληλουχία-στόχος έχει αλληλουχηθεί 30 φορές, τότε το βάθος των διαβασμάτων της είναι 30x.

Η στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς συνήθως παρέχει καλύτερη κάλυψη και περισσότερο βάθος των αλληλουχιών-στόχων, ενώ οι μεθοδολογίες WES και WGS δεν παρέχουν κάλυψη όλων των αλληλουχιών-στόχων και αρκετές αλληλουχίες-στόχοι έχουν βάθος λιγότερο <30x. Αυτό συμβαίνει διότι κάποιες αλληλουχίες είναι δύσκολο να αλληλουχηθούν λόγω ομόλογων περιοχών, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και αλληλουχιών υψηλής περιεκτικότητας σε GC βάσεις (G: Guanine, C: Cytosine) [153].

Το κόστος της αλληλούχησης επόμενης γενιάς είναι διαφορετικό ανάλογα με την μέθοδο που επιλέγεται, τον σχεδιασμό και το πρωτόκολλο. Η στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς παρέχει γρήγορα αποτελέσματα, αυξάνει την διαγνωστική ακρίβεια, αποτελεί την πιο οικονομική επιλογή NGS, ενώ έχει καλή σχέση κόστους-απόδοσης συγκρινόμενη με την αλληλούχηση κατά Sanger, και τις μεθόδους WES και WGS [154].

1.4.1 Πρωτόκολλα NGS

Υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα και πολλές πλατφόρμες αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Τα δείγματα που αλληλουχούνται μπορεί να είναι DNA ή RNA προερχόμενα από αίμα ή από ιστό. Σε όλα τα πρωτόκολλα αρχικά δημιουργείται μία βιβλιοθήκη (γονιδιωματική, γονιδιακή ή cDNA) με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και στην συνέχεια ακολουθεί η αλληλούχηση της.

Βασικό χαρακτηριστικό της μεθοδολογίας του NGS, είναι ότι στο στάδιο δημιουργίας της βιβλιοθήκης χρησιμοποιούνται γνωστές αλληλουχίες-προσαρμογείς (barcodes adapters), με σκοπό να διαχωρίζονται οι αλληλουχίες του κάθε δείγματος στο στάδιο της αλληλούχησης και με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η αλληλούχηση πολλών δειγμάτων στην ίδια πειραματική δοκιμασία.

Ο τρόπος αλληλούχησης διαφέρει ανάλογα με το πρωτόκολλο και την πλατφόρμα στην οποία θα αλληλουχηθεί η βιβλιοθήκη. Δύο τρόποι αλληλούχησης είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι.

Ο πρώτος τρόπος αλληλούχησης στηρίζεται στην μέτρηση της διαφοράς του pH. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες-στόχοι, οι οποίες βρίσκονται δεσμευμένες σε σφαιρίδια βομβαρδίζονται διαδοχικά από τα νουκλεοτίδια A, T, C, G, και αμέσως μετά την εισαγωγή κάθε νουκλεοτιδίου ακολουθεί μέτρηση του pH του διαλύματος. Μόλις ένα νουκλεοτίδιο προστεθεί στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ένα μόριο υδρογόνου απελευθερώνεται και αλλάζει το pH του διαλύματος, ενώ εάν δεν προστεθεί λόγω απουσίας συμπληρωματικότητας, το pH δεν αλλάζει. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η αναγνώριση των βάσεων μιας αλληλουχίας κατά το στάδιο της αλληλούχησης.

Ο δεύτερος τρόπος αλληλούχησης στηρίζεται στην μέτρηση του φθορισμού που εκπέμπει κάθε νουκλεοτίδιο το οποίο προστίθεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Σε αυτό το πρωτόκολλο, οι αλληλουχίες-στόχοι είναι προσδεσμευμένες σε μια επίπεδη επιφάνεια, η οποία βομβαρδίζεται ταυτόχρονα με όλα τα νουκλεοτίδια (A, T, C, G). Το νουκλεοτίδιο που φέρει την αδερίνη (A) εκπέμπει στο μήκος κύματος του μπλέ φάσματος, το νουκλεοτίδιο που φέρει την θυμίνη (T) εκπέμπει στο μήκος κύματος του κόκκινου φάσματος, της κυτοσίνης (C) στο μήκος κύματος του κίτρινου φάσματος και της γουανίνης (G) στο μήκος κύματος του πράσινου φάσματος. Ως εκ τούτου, κάθε νουκλεοτίδιο που προστίθεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εκπέμπει φθορισμό διαφορετικού μήκους κύματος, το οποίο ανιχνεύεται με ένα λέιζερ και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αναγνώριση των βάσεων.

1.4.2 Επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων του NGS

Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS ανιχνεύονται μονονουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (Single Nucleotide Variants, SNVs), διπλασιασμοί και απαλείψεις μικρής έκτασης νουκλεοτιδίων (INsertion and DEletion, INDEL). Με χρήση του WES ανιχνεύονται περίπου 30000 παραλλαγές ανά δείγμα, ενώ με χρήση του WGS περίπου 3000000 παραλλαγές ανά δείγμα. Η βιοπληροφορική ανάλυση των παραλλαγών που ανιχνεύονται με τη μεθοδολογία του NGS είναι απαραίτητη αλλά συνήθως η ανάλυση των παραλλαγών

που ανιχνεύθηκαν με τις μεθόδους WGS και WES αποτελεί πρόκληση καθώς είναι δύσκολη και χρονοβόρα [151, 153].

Κύριο αρνητικό χαρακτηριστικό της μεθόδου WGS, και σε χαμηλότερο βαθμό της μεθόδου WES, είναι ο χαμηλός αριθμός διαβασμάτων ορισμένων αλληλουχιών με αποτέλεσμα την ύπαρξη σημαντικού αριθμού ψευδώς θετικών παραλλαγών. Οι ψευδώς θετικές παραλλαγές προέρχονται κυρίως από το στάδιο δημιουργίας της βιβλιοθήκης, κατά το οποίο η πολυμεράση μπορεί να εισάγει ένα λάθος νουκλεοτίδιο στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα. Για να περιοριστούν οι παραλλαγές αυτές κατά την διαδικασία της ανάλυσης προτείνεται η σύγκριση των παραλλαγών αρκετών δειγμάτων, τα οποία έχουν αλληλουχηθεί με την ίδια μέθοδο [155]. Παρόλο που πάνω από 200000 ανθρώπινα γονιδιώματα έχουν αλληλουχηθεί με τη μεθοδολογία του NGS μέχρι σήμερα, ο έλεγχος των ευρημάτων με την αλληλούχηση κατά Sanger είναι απαραίτητος [154].

Κατά την βιοπληροφορική ανάλυση, οι παραλλαγές αξιολογούνται με βάση την συχνότητα τους στον πληθυσμό, και όταν η συχνότητα είναι $>1\%$ η παραλλαγή θεωρείται πολυμορφισμός, ενώ όταν είναι $<1\%$ θεωρείται μετάλλαξη. Επιπλέον, κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του WES αξιολογούνται οι παραλλαγές των γονιδίων, τα οποία είτε συνδέονται με ένα νόσημα είτε συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου. Η αξιολόγηση των παραλλαγών, για τις οποίες δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες, δεν είναι καταγεγραμμένες στις βάσεις δεδομένων ή δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία, είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Η Larin και οι συνεργάτες της προτείνουν ότι οι παραλλαγές αυτές θα πρέπει να θεωρούνται αβέβαιης σημασίας. Ακόμη, προτείνουν την εκ νέου ανάλυση των αποτελεσμάτων του WES κάθε 1-2 έτη, καθώς οι βάσεις δεδομένων και η βιβλιογραφία ανανεώνονται συνεχώς με νέα δεδομένα [152].

Το 2013, ομάδα επιστημόνων του Αμερικάνικου Κολλεγίου Γενετικής και Γονιδιωματικής Ιατρικής (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), της εταιρίας Μοριακής Παθολογίας και του Κολλεγίου Αμερικανών Παθολόγων όρισε τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αξιολόγηση των παραλλαγών και αντικατέστησε τους όρους πολυμορφισμός και μετάλλαξη σε παθολογικές, πιθανόν παθολογικές, αβέβαιης σημασίας, πιθανόν καλοήθεις και καλοήθεις παραλλαγές ανάλογα με τα κριτήρια που αυτές καλύπτουν, όπως η συχνότητα της παραλλαγής, η θέση της στο γονίδιο, η αμινοξική αντικατάσταση, η κληρονομικότητα κ.α. [155, 156].

Παραλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας, σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, αντικαταστάσεις στις πρώτες 2 θέσεις ματίσματος και απαλείψεις εξονίων ταξινομούνται ως παθολογικές παραλλαγές. Παραλλαγές για τις

οποίες δεν υπάρχουν αποδείξεις για τον ρόλο τους στο νόσημα ταξινομούνται ως αβέβαιης σημασίας, ενώ οι συνώνυμες και οι ιντρονικές παραλλαγές ταξινομούνται ως πιθανόν καλοήθεις έως ότου να υπάρξουν πειραματικές αποδείξεις για την παθολογικότητα τους ή να διερευνηθεί η συνκληρονομικότητα τους με το νόσημα στην οικογένεια [155, 156].

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του NGS προτείνεται η χρήση βάσεων δεδομένων, όπως είναι η βάση δεδομένων πληθυσμιακών συχνοτήτων Exome Aggregation Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org/>), η βάση δεδομένων ανθρώπινων μενδελιανών ασθενειών Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <https://www.omim.org/>), η βάση δεδομένων διαφόρων γονιδιακών πληροφοριών NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), καθώς και η αναζήτηση στην βιβλιογραφία των γνωστών παραλλαγών.

Συνήθως, κατά την διερεύνηση των παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για ένα νόσημα, για παράδειγμα ενδοκρινολογικό, σε ασθενή που ελέγχθηκε με την μέθοδο WES, είναι πιθανόν να ανιχνευθούν και παραλλαγές που συνδέονται με άλλα νοσήματα, για παράδειγμα καρδιολογικά, αυτοάνοσα κ.α. Προκύπτει ένα σημαντικό ζήτημα ηθικής για την διαχείριση των πληροφοριών αυτών, και για το λόγο αυτό προτείνεται ότι η γνωστοποίηση αυτών των πληροφοριών θα πρέπει να γίνεται μετά από την έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς [154].

1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ NGS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Περισσότερες από 600 εργασίες έχουν δημοσιευτεί από το 2009, στις οποίες αναφέρεται η εφαρμογή του NGS σε ασθενείς με ενδοκρινολογικά νοσήματα (Εικόνα 10). Ορισμένες από αυτές χρησιμοποίησαν στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς σε ομάδα γονιδίων που συνδέονται με ένα νόσημα για διαγνωστικούς σκοπούς, ενώ άλλες χρησιμοποίησαν WES προκειμένου να διαγνώσουν ασθενείς με φαινοτυπική ετερογένεια, αποκαλύπτοντας με αυτό τον τρόπο και την εμπλοκή νέων γονιδίων στη νόσο.

Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του WES σε 40 μέλη 15 οικογενειών με οικογενή κεντρική πρόωγη ήβη (Familial Central Precocious Puberty, CPP), αποκάλυψε την εμπλοκή στη νόσο ενός νέου γονιδίου, του *MKRN3* [158]. Μετά από αυτή την μελέτη, ακολούθησαν διάφορες μελέτες, οι οποίες επιβεβαίωσαν ότι παθολογικές παραλλαγές πατρικής προέλευσης στο μητρικά εντυπωμένο γονίδιο *MKRN3* αποτελούν την κύρια αιτία των κληρονομικών ή εκ νέων (*de novo*) περιστατικών με CPP [158, 159]. Ακόμη, το πατρικά εντυπωμένο γονίδιο *DLK1* έχει πρόσφατα συνδεθεί με την μεμονωμένη οικογενή CPP [161]. Το γονίδιο *MKRN3*

εδράζεται στην περιοχή του χρωμοσώματος 15, η οποία έχει σχετιστεί με το Σύνδρομο Prader-Willi, ενώ το γονίδιο *DLK1* είχε προηγουμένως συνδεθεί με το Σύνδρομο Temple. Ασθενείς με Σύνδρομο Temple παρουσίαζαν εκτός από μη φυσιολογική σίτιση, δυσμορφίες προσώπου, μακροκεφαλία, μικρού μεγέθους άκρα, νευρολογικές ανωμαλίες και πρώιμη ήβη [161].

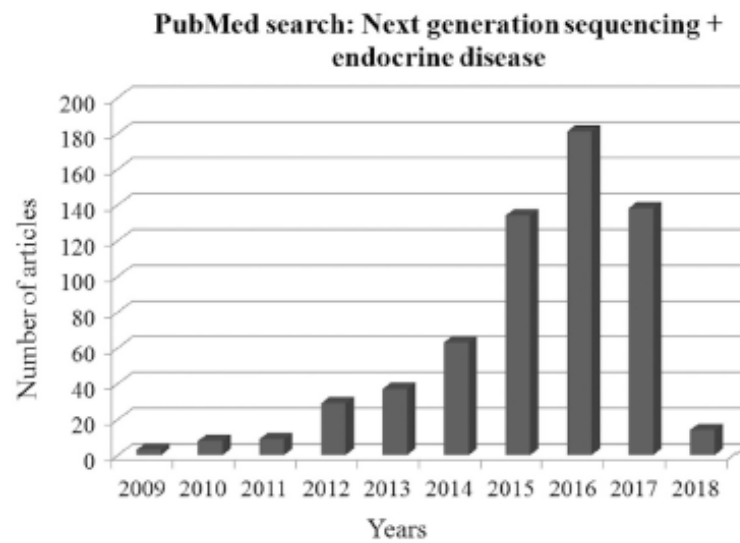
Η Izumi και οι συνεργάτες της, ανακάλυψαν με χρήση της μεθοδολογίας του NGS TGP ότι η απάλειψη της περιοχής με τις 15 αλανίνες στο μέσο του γονιδίου *SOX3* (234-249 αμινοξέα), εκτός από την Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια (ΠΥΑ) με την οποία ήταν γνωστό ότι συνδέεται, συνδέεται και με τον μεμονωμένο Υπογοναδοτροφικό Υπογοναδισμό χωρίς ανοσμία (normosmic Isolated Hypogonadotrophic Hypogonadism, nIHH) [162]. Επιπλέον, ανίχνευσαν μια παθολογική παραλλαγή σε σημείο ματίσματος του γονιδίου *WDR11* σε ασθενή με ΠΥΑ [162]. Μέχρι τότε, παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *WDR11* είχαν συνδεθεί με τον IHH χωρίς ανοσμία [163].

Το 2012, η Bonnefond και οι συνεργάτες της, έλεγξαν με WES 4 μέλη μιας οικογένειας με MODY και βρήκαν μια παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *KCNJ11*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την υπομονάδα Kir6.2 του διαύλου καλίου του β-κυττάρου του παγκρέατος, το οποίο συμμετέχει στο μονοπάτι έκκρισης της ινσουλίνης. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *KCNJ11* μέχρι τότε είχαν συνδεθεί με τον Νεογνικό Σακχαρώδη Διαβήτη (ΝΣΔ), όμως κανένα μέλος της οικογένειας δεν είχε παρουσιάσει ΝΣΔ [39].

Το 2015, η Prudente και οι συνεργάτες της, πραγματοποίησαν WES σε 60 οικογένειες, οι οποίες είχαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: 1) οικογενειακό ιστορικό ΣΔ σε τουλάχιστον 3 γενιές, η μεταβίβαση του οποίου υποδείκνυε επικρατή κληρονομικότητα, 2) ηλικία διάγνωσης ΣΔ πριν την ηλικία των 35 ετών και 3) αρνητικοί για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών των γονιδίων *GCK*, *HNF4A*, *HNF1A*, *HNF1B*, *PDX1* και *NEUROD1*. Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων του WES, ανιχνεύθηκαν 2 οικογένειες, οι οποίες έφεραν παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *APPL1*, το οποίο είναι σημαντικό για το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, συνδέοντας το για πρώτη φορά με τον μονογονιδιακό Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY [51].

Η Flanagan και οι συνεργάτες της, το 2013, μελέτησαν με NGS TGP τα εξόνια και τα ιντρόνια των γονιδίων *ABCC8* και *HADH*, τα οποία είναι γνωστό ότι συνδέονται με τον Συγγενή Υπερινσουλινισμό (ΣΥ), σε Ιρλανδούς και Τούρκους ασθενείς με ΣΥ. Από την παραπάνω μελέτη, ανιχνεύθηκαν 2 ιδρυτικές παθολογικές ιντρονικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* (c.1333-1013A>G) και *HADH* (c.636+471G>T). Οι παραλλαγές αυτές δημιουργούν κρυφές θέσεις ματίσματος δότη, οι οποίες προσθέτουν ένα ψευδοεξόνιο. Το

ψευδοεξόνιο προκαλεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης οδηγώντας στον πρόωρο τερματισμό και των 2 πρωτεϊνών [164].



Εικόνα 10. Γράφημα με τον αριθμό των δημοσιευμένων εργασιών που εφάρμοσαν μεθοδολογία NGS σε ασθενείς με ενδοκρινολογικά νοσήματα από το 2009 έως και το 2018 [154].

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η αποσαφήνιση της μοριακής διαταραχής, με την εφαρμογή μεθοδολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS TGP και WES), ασθενών με γενετικά ενδοκρινολογικά νοσήματα, στους οποίους οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές μοριακής ανάλυσης απέτυχαν να εντοπίσουν την υποκείμενη μοριακή βλάβη. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η γενετική αιτία 50 ασθενών με Μονογονιδιακό Σακχαρώδη Διαβήτη (ΜΣΔ) MODY, 17 ασθενών με Συγγενή Υπερινσουλινισμό (ΣΥ), 2 ασθενών με Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια (ΠΥΑ) και 2 ασθενών με Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου (ΔΔΦ).

Η μοριακή ταυτοποίηση της διαταραχής είναι θεμελιώδους σημασίας, όχι μόνο για την αναγνώριση των παθολογικών παραλλαγών των γονιδίων, τα οποία ευθύνονται για τον ΜΣΔ MODY, τον ΣΥ, την ΠΥΑ και τις ΔΔΦ, αλλά και για τον συσχετισμό φαινότυπου-γονότυπου, για την θεραπεία, την πρόγνωση και την αναγνώριση συνοδών χαρακτηριστικών της νόσου καθώς και για την παροχή γενετικής συμβουλευτικής στον ασθενή και στην οικογένειά του. Επιπλέον, προϋπόθεση για την ορθολογική αντιμετώπιση του νεογνού με ΔΔΦ αποτελεί η ταυτοποίηση της μοριακής βλάβης, η οποία μπορεί να καθορίσει την απόφαση για το φύλο του παιδιού, απόφαση με σημαντικές συνέπειες στην ψυχοκοινωνική προσαρμογή και τη μελλοντική ποιότητα της ζωής του. Επιπροσθέτως, η επιτυχής εφαρμογή της μεθοδολογίας της Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς θα χρησιμοποιηθεί πιλοτικά και θα επιτρέψει στο άμεσο μέλλον τη διαγνωστική εφαρμογή της.

2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη, παραπέμφθηκαν για γενετικό έλεγχο στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας της Α' Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α. στο Νοσοκομείο Παιδων «Η Αγία Σοφία».

Όλοι οι ασθενείς ή οι κηδεμόνες τους έδωσαν γραπτή πληροφορημένη συγκατάθεση για γενετικό έλεγχο.

2.1.1 Ασθενείς με Μονογονιδιακό Σακχαρώδη Διαβήτη MODY

Πενήντα ασθενείς (28 άντρες, 22 γυναίκες) με ΜΣΔ MODY ελέγχθηκαν για παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* και *KCNJ11* με την μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS TGP), οι οποίοι πληρούσαν τα παρακάτω κριτήρια για MODY:

- 1) Σακχαρώδης Διαβήτης [σάκχαρο νηστείας >126 mg/dl (6.99 mmol/l) ή τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά τη χορήγηση γλυκόζης κατά τη δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (oral glucose tolerance test-OGTT) >200 mg/dl (11.1 mmol/l)]
- 2) Νεαρή ηλικία εμφάνισης
- 3) Οικογενειακό ιστορικό ΣΔ [ένας γονέας με ΣΔ ή διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (impaired oral glucose tolerance test, OGTT)]
- 4) Αρνητικά αυτο-αντισώματα για ΣΔ τύπου 1 (anti-GAD, ICA, IAA, IA2 ή ZnT8)
- 5) Απουσία διαβητικής κετοξέωσης
- 6) Απουσία αντίστασης στην ινсуλίνη

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς είχαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Μέσος όρος $\pm$ SD): γλυκόζη νηστείας 183 ± 82 mg/dl (10.2 ± 4.6 mmol/l) (n=46), ηλικία διάγνωσης 16.6 ± 9.5 έτη (n=50), BMI 21.7 ± 5.2 kg/m² (n=33) και βάρος γέννησης 3257 ± 669 g (n=40). Όλοι είχαν αρνητικά αυτο-αντισώματα για ΣΔ τύπου 1 και απουσία κετοξέωσης, ενώ οι 42 είχαν οικογενειακό ιστορικό ΣΔ.

Επιπλέον, στους ασθενείς αυτούς υπολογίστηκε η πιθανότητα να έχουν ΜΣΔ MODY από την πλατφόρμα MODY Probability Calculator της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Exeter (www.diabetesgenes.org). Για την πλειοψηφία των ασθενών (n=29) η πιθανότητα να έχουν ΜΣΔ MODY εκτιμήθηκε στα 75.5%, ενώ για 4 ασθενείς η πιθανότητα ήταν κάτω από το 75.5%, πιθανόν λόγω των υψηλών τιμών της HbA1c, του BMI και της ηλικίας διάγνωσης.

Οι ασθενείς, στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε παθολογική παραλλαγή με την μεθοδολογία του NGS, μελετήθηκαν με τη μέθοδο MLPA για την διερεύνηση απαλείψεων ή διπλασιασμών των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8*.

2.1.2 Ασθενείς με Συγγενή Υπερινσουλιτισμό

Δεκαεπτά ασθενείς (12 αγόρια, 5 κορίτσια) με Συγγενή Υπερινσουλιτισμό (ΣΥ) εξετάστηκαν για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών στα γονίδια *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *SLC16A1*, *INSR*, *TRMT10A*, *HADH* και *GLUD1* με την μεθοδολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS TGP). Οι ασθενείς με ΣΥ, στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε παθολογική παραλλαγή με την παραπάνω μεθοδολογία, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο MLPA για την παρουσία απαλείψεων ή διπλασιασμών των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8*. Ακόμη, οι αδιάγνωστοι ασθενείς ελέγχθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger για την παρουσία των παθολογικών ιντρονικών παραλλαγών c.1333-1013A>G του γονιδίου *ABCC8* και c.636+471G>T του γονιδίου *HADH*.

Οι ασθενείς είχαν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Μέσος όρος $\pm$ SD): 6 ασθενείς ηλικίας 25 ± 2.4 ωρών παρουσίασαν τιμές γλυκόζης 35.2 ± 13.5 mg/dl (n=5) και ινσουλίνης 7 ± 4.4 μ U/ml (n=4), 7 ασθενείς ηλικίας 35.6 ± 25.2 ημερών παρουσίασαν τιμές γλυκόζης 50 ± 11.4 mg/dl (n=4) και ινσουλίνης 13.3μ U/ml και 18.9μ U/ml (n=2), ενώ 4 ασθενείς ηλικίας 4.4 ± 2.5 ετών παρουσίασαν τιμές γλυκόζης 41.6 ± 3.8 mg/dl (n=3) και ινσουλίνης 2.42μ U/ml και 24.6μ U/ml (n=2). Οι εβδομάδες κυοφορίας των ασθενών με ΣΥ ήταν $37^{+7} \pm 2^{+9}$ (n=11) με βάρος γέννησης 3262 ± 732 g (n=12). Οι μητέρες 4 ασθενών είχαν ΣΔ κύησης, ενώ η μητέρα ενός ασθενή είχε οικογενειακό ιστορικό υπογλυκαιμικού υπερινσουλιτισμού. Σε 9 ασθενείς χορηγήθηκε διαζοξίδη και σε έναν ασθενή γλυκόζη. Σε μία ασθενή που δεν αποκρίθηκε στην διαζοξίδη, χορηγήθηκε οκτρεοτίδη.

2.1.3 Ασθενείς με Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια

Δύο ασθενείς (ΠΥΑ1, ΠΥΑ2) με πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια επιλέχθηκαν να εξεταστούν σε όλες τις κωδικοποιούμενες περιοχές του γονιδιώματος τους με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (WES). Οι ασθενείς είχαν προηγουμένως ελεγχθεί με αλληλούχηση κατά Sanger και ο έλεγχος ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια: *PROP1*, *LHX3*, *LHX4* και *HESX1*. Ο ΠΥΑ1 είχε επίσης ελεγχθεί με την μέθοδο MLPA για απαλείψεις και διπλασιασμούς των γονιδίων *GH1*, *POU1F1*, *GHRHR*, *LHX3*, *LHX4*, *HESX1* και *PROP1* χωρίς να ανιχνευθεί αλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων τους. Ο ασθενής ΠΥΑ2 δεν είχε ελεγχθεί για απαλείψεις ή διπλασιασμούς γονιδίων.

Ασθενής ΠΥΑ1: Το 46,XY νεογνό ΠΥΑ1 παρουσίασε ίκτερο, υπερχολερυθριναιμία άμεσου τύπου, υπογλυκαιμία και υπερτρανσαμιναιμία. Στην κλινική εξέταση, το πέος του ήταν έντονα υποπλαστικό και λεπτό με μήκος 1.5 cm. Στο υπερηχογράφημα, οι όρχεις του εμφανίζονταν υποπλαστικοί με μικρότερες του φυσιολογικού διαστάσεις, ενώ στο δεξιό ημιόσχεο υπήρχε μία υδροκήλη και μία κύστη Morgagni. Ο πλήρης ορμονολογικός έλεγχος ανέδειξε πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια με κεντρικού τύπου υποθυρεοειδισμό, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης. Ο ασθενής αντιμετωπίστηκε με θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης της πολλαπλής του υποφυσιακής ανεπάρκειας με υδροκορτιζόνη, θυροξίνη, τεστοστερόνη και σωματοτροπίνη. Η μαγνητική τομογραφία σε ηλικία δύο μηνών έδειξε έκτοπη θέση του οπίσθιου λοβού της υπόφυσης και λέπτυνση του μίσχου, ενώ η αδενοϋπόφυση ήταν φυσιολογική με μικρό όμως μέγεθος.

Ασθενής ΠΥΑ2: Το 46,XY νεογνό ΠΥΑ2 γεννήθηκε με καισαρική τομή την 37⁺³ εβδομάδα κύησης λόγω ενδομήτριας υπολειπόμενης αύξησης και παθολογικού καρδιοτοκογραφήματος. Το βάρος γέννησης ήταν 2200 g. Κατά τα πρώτα 24ωρα ζωής παρουσίασε επεισόδια υπογλυκαιμίας που αντιμετωπίστηκαν με ενδοφλέβια γλυκόζη. Παρουσίαζε επίσης ήπια κορμική υποτονία, μικροφαλλία με μήκος πέους 1cm και ψηλαφητούς, μικρούς όρχεις. Ο ορμονολογικός έλεγχος ανέδειξε δευτεροπαθή υποθυρεοειδισμό με TSH: 5.66 mIU/ml (ΦΤ: 0.5 - 5 mIU/ml), FT4: 0.784 ng/dl (ΦΤ: 0.8 - 1.8 ng/dl), δευτεροπαθή επινεφριδιακή ανεπάρκεια με ACTH: <1 pg/ml (ΦΤ: 7 - 63 pg/ml), κορτιζόλη: 0.523 μg/dl (ΦΤ: 6.24 - 18 μg/dl), Δ4-ανδροστενδιόνη: <0.30 ng/ml (ΦΤ: 0.05 - 0.45 ng/ml), DHEA-S: <15 μg/dl (ΦΤ: 6 - 21 μg/dl) και υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με LH: <0.1 mIU/ml (ΦΤ: 0 - 1.3 mIU/ml), FSH: 0.123 mIU/ml (ΦΤ: 0.1 - 2.4 mIU/ml), ολική τεστοστερόνη: <20 ng/dl (ΦΤ: 75 - 400 ng/dl), GH: 4.54 ng/ml (ΦΤ: 5-40ng/ml), IGF-1: <15 ng/ml (ΦΤ: 15-129 ng/ml), PRL: 291.5 ng/ml (ΦΤ: 5 - 20 ng/ml), αλδοστερόνη: 1185 pg/ml (ΦΤ: 50 - 900 pg/ml) και ρενίνη: 27.6 ng/ml/h (ΦΤ: <37 ng/ml/h). Η μαγνητική τομογραφία έδειξε υποπλαστική αδενοϋπόφυση και έκτοπη οπίσθια υπόφυση με απουσία μίσχου. Στον ασθενή χορηγήθηκε θεραπεία υποκατάστασης με υδροκορτιζόνη, τεστοστερόνη, λεβοθυροξίνη και σωματροπίνη.

2.1.4 Ασθενείς με Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου

Δύο ασθενείς (ΔΔΦ1, ΔΔΦ2) με διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου επιλέχθηκαν να εξεταστούν σε όλες τις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος τους με αλληλούχηση επόμενης γενιάς (WES) προκειμένου να διερευνηθεί η γενετική αιτιολογία της διαταραχής.

Ασθενής ΔΔΦ1: Το νεογνό ΔΔΦ1 με καρυότυπο 46,XY είχε ατελή αρρενοποίηση με έξω γεννητικά όργανα θήλεος, υποπλασία των κυττάρων Leydig και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης. Ο γενετικός του έλεγχος με αλληλούχηση κατά Sanger ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια: *STAR*, *SRD5A2*, *NR0B1*, *NR5A1*, *LHB*, *CYP17A1* και *LHCGR*.

Ασθενής ΔΔΦ2: Το νεογνό ΔΔΦ2 με καρυότυπο 46,XY παρουσίαζε διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, Triple A Σύνδρομο (Achalasia-Addison-Alacrimia Syndrome) και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (Focal Segmental Glomerulosclerosis, FSGS). Ο γενετικός έλεγχος με αλληλούχηση κατά Sanger ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές στα *DAX1*, *NR5A1*.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών

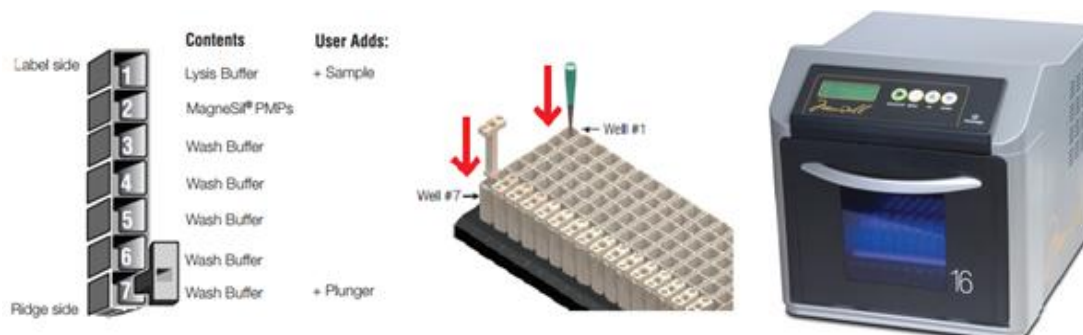
Από τους ασθενείς συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος 2-4ml σε ειδικά φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), το οποίο διατηρεί την κυτταρική σύσταση του αίματος. Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε από τα εμπύρνηνα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών με μια από τις δύο παρακάτω μεθόδους.

A. Μέθοδος απομόνωσης γενωμικού υλικού με το Maxwell 16 DNA Purification Kit

Το Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega, USA) χρησιμοποιείται ευρέως καθώς αποτελεί μία εύκολη, γρήγορη (30-40 min) και αξιόπιστη μέθοδο αυτοματοποιημένου καθαρισμού του γενωμικού DNA από ποικίλα δείγματα (αίμα, κύτταρα και ιστούς).

Το Kit περιλαμβάνει ειδικές κασέτες με 7 θέσεις (Εικόνα 11). Στην πρώτη θέση υπάρχει το διάλυμα λύσης και σε αυτή τη θέση προστίθενται 400 μl δείγματος ολικού αίματος ασθενών. Στην συνέχεια, το δείγμα μεταφέρεται στη δεύτερη θέση, στην οποία υπάρχουν παραμαγνητικά σωματίδια MagneSil (Paramagnetic Particles, PMPs) που προσδένονται ισχυρά με τα μόρια DNA. Το δείγμα περνάει διαδοχικά από τις επόμενες θέσεις, στις οποίες το προσδεδεμένο DNA ξεπλένεται από τις περίσσειες των κυτταρικών υπολειμμάτων αλλά και από τα προηγούμενα διαλύματα. Για την έκλυση του DNA, το δείγμα μεταφέρεται στο διάλυμα έκλυσης (elution buffer), ίδιας ποσότητας με την αρχική ποσότητα του δείγματος (400 μl). Το διάλυμα αυτό είναι τοποθετημένο σε μία βάση που

περιέχει μαγνήτη, ώστε να συγκρατούνται εκεί τα παραμαγνητικά σωματίδια και τελικά το DNA να συλλέγεται σε καθαρή μορφή.



Εικόνα 11. Η θέση των διαλυμάτων στις κασέτες του Maxwell 16 DNA Purification Kit και η συσκευή απομόνωσης.

B. Μέθοδος απομόνωσης γενωμικού υλικού με το QIAamp DNA Blood Mini Kit

Η μέθοδος απομόνωσης γενωμικού υλικού με το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) εξασφαλίζει, επίσης, τον εύκολο και γρήγορο καθαρισμό του ολικού DNA από ποικίλα δείγματα, όπως ολικό αίμα, πλάσμα, ορός, μυελός των οστών, άλλα σωματικά υγρά, καλλιέργειες κυττάρων και ιστών. Με τη μέθοδο αυτή η καθαρή ποσότητα DNA που λαμβάνεται από 200 μl περιφερικού αίματος στο τέλος της διαδικασίας μπορεί να είναι περίπου 6 μg.

Αρχικά, σε ένα μικροφυγοκεντρικό σωλήνα τοποθετούνται η πρωτεΐνάση K (20μl), το δείγμα ολικού αίματος (200μl) και έπειτα το διάλυμα λύσης AL (200μl). Επωάζονται όλα μαζί στους 56°C για 10 min. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται η υδρόλυση των κυτταρικών μεμβρανών του δείγματος. Η προσθήκη 100% αιθανόλης στο παραπάνω διάλυμα επιτρέπει τη πρόσδεση του DNA στη στήλη στο επόμενο βήμα, ενώ συστατικά του κυτταροπλάσματος που μπορεί να αναστείλουν την PCR και άλλες ενζυμικές αντιδράσεις, δεν συγκρατούνται.

Μετά τη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη QIAamp, ακολουθούν δύο φυγοκεντρήσεις με ενδιαμέσα στάδια ξεπλύματος με τα αντίστοιχα διαλύματα AW1 και AW2. Η χρήση αυτών των δύο διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων πλύσης βελτιώνει σημαντικά την καθαρότητα του DNA, απομακρύνοντας οποιαδήποτε ρυπαντική ουσία χωρίς να επηρεάζουν την δεσμευτική ικανότητα του DNA στην μεμβράνη.

Το DNA εκλύεται, τελικά, από τη στήλη σε συμπυκνωμένη μορφή είτε με το διάλυμα έκλυσης AE είτε με dH₂O. Η απόδοση της απομόνωσης αυξάνεται εάν το δείγμα επωαστεί με το διάλυμα έκλυσης για 5 min πριν την τελευταία φυγοκέντρηση. Το DNA που απομονώνεται σε καθαρή μορφή είναι >50 kb, χωρίς την παρουσία προσμίξεων, όπως πρωτεΐνες, νουκλεάσες, αναστολείς κ.α.

Για τον ποιοτικό έλεγχο της διαδικασίας της απομόνωσης, ηλεκτροφορούνται 5 µl αραιωμένης ποσότητας του δείγματος (1 µl DNA και 4 µl dH₂O) με 0.5 µl 10x χρωστικής ουσίας (για 100ml χρωστικής 10x: 250mg bromophenol blue, 250mg xylene cyanol, 33ml 150mM Tris-HCl pH 7.6, 60ml glycerol, 7ml H₂O) σε 1% w/v πήκτωμα αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε 1 x TBE ρυθμιστικό διάλυμα (108gr Tris, 55gr Boric acid, 40ml EDTA 0.5M pH 8.0, dH₂O μέχρι το 1L).

2.2.2 Στοχευμένη Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς

2.2.2.1 Σχεδιασμός ομάδων γονιδίων

Στην πλατφόρμα Ion Ampliseq Designer της ThermoFisher Scientific (www.ampliseq.com; v.5.6) σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των κωδικοποιουσών περιοχών και των παρακείμενων θέσεων ματίσματος επτά γονιδίων (*GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*) που συνδέονται με το Μονογονιδιακό ΣΔ MODY και αρκετά από αυτά με το Συγγενή Υπερινσουλινισμό σύμφωνα με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς hg19. Το μέγεθος των γονιδίων στόχων είναι 29.45 kb με 98.87% *in silico* κάλυψη των υπό μελέτη γονιδίων. Δεν σχεδιάστηκαν εκκινητές για 21 bp στην αρχή του εξονίου 1 του γονιδίου *HNF1B* και 136 bp στο μέσο του γονιδίου *KCNJ11* (Εικόνα 12).

Name	Target (bp)	Missed (bp)	Covered (%)
GCK	1.608	0	100
HNF1A	1.996	0	100
HNF4A	1.860	0	100
HNF1B	1.764	21	98,81
INS	353	0	100
ABCC8	5.139	0	100
KCNJ11	1.183	136	88,5

Εικόνα 12. Η *in silico* κάλυψη των επτά γονιδίων - στόχων.

Όπως και για την παραπάνω ομάδα γονιδίων, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των κωδικοποιουσών περιοχών και των παρακείμενων θέσεων ματίσματος πέντε γονιδίων (*GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SCL16A1*, *TRMT10A*) που συνδέονται με το Συγγενή Υπερινσουλινισμό σύμφωνα με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς hg19 στην πλατφόρμα Ion Ampliseq Designer της ThermoFisher Scientific (www.ampliseq.com; v.6.1). Το μέγεθος των γονιδίων στόχων υπολογίστηκε στα 20.05 kb με 100% *in silico* κάλυψη (Εικόνα 13).

Name	Target (bp)	Missed (bp)	Covered (%)
GLUD1	1.807	0	100
HADH	1.086	0	100
INSR	4.369	0	100
SLC16A1	1.543	0	100
TRMT10A	1.090	0	100

Εικόνα 13. Η *in silico* κάλυψη των πέντε γονιδίων - στόχων.

2.2.2.2 Μεθοδολογία Στοχευμένης Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς

Η Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) στο Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Ε.Κ.Π.Α. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει 3 στάδια, τη δημιουργία της βιβλιοθήκης (Library preparation), την προετοιμασία του δείγματος για αλληλούχηση (Template Preparation) και την αλληλούχηση (Sequencing).

1^ο Στάδιο: Δημιουργία Βιβλιοθήκης (Library preparation)

Αρχικά, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των DNA δειγμάτων με φθοριόμετρο Qubit 2.0 ή 3.0, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ίση ποσότητα (100 ng) DNA για όλα τα δείγματα στο στάδιο της δημιουργίας της γονιδιακής βιβλιοθήκης. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε το Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), το οποίο προσδιορίζει με υψηλή ευαισθησία το δίκλωνο DNA με αρχικές συγκεντρώσεις από 10 pg/μl έως 100 ng/μl. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, 1 μl DNA ανά ασθενή και 10 μl από τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (standards) επάζονται με 199 μl

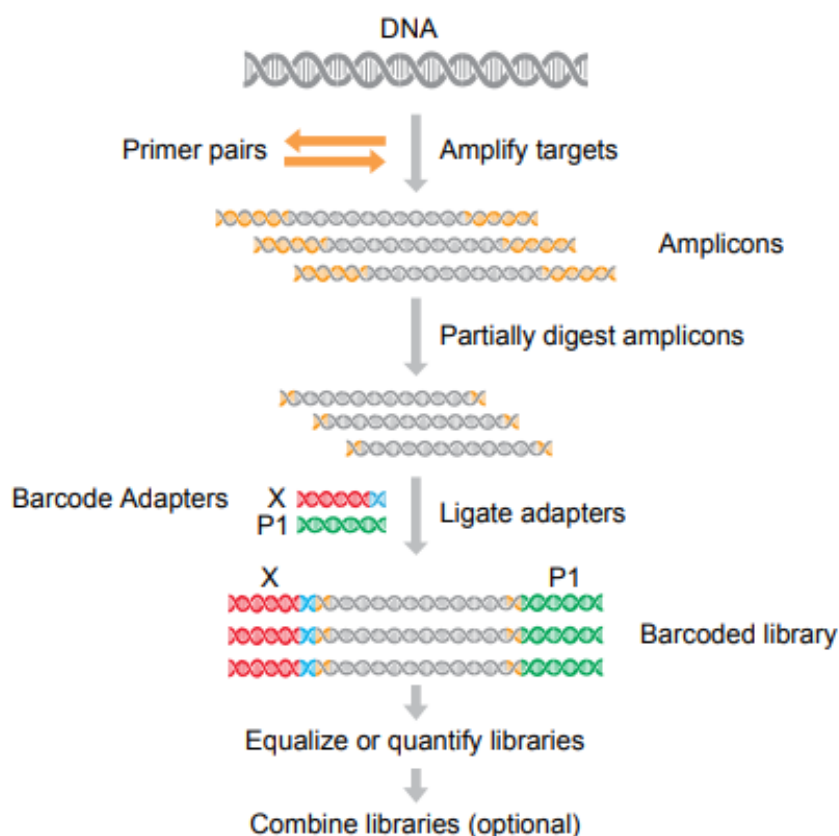
και 190 µl αντίστοιχα από το διάλυμα Qubit working solution για 2 min (Εικόνα 14). Μετά την επώαση των 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς με την μέτρηση των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης με βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση των υπό μελέτη δειγμάτων.

Qubit working solution		Standard	DNA
Qubit® dsDNA HS Reagent	1µl	Qubit® standard	10µl
Qubit® dsDNA HS Buffer	199µl	Qubit working solution	190µl
Συνολικός Όγκος	200µl	DNA	-
		Συνολικός Όγκος	200µl

Εικόνα 14. Αντίδραση προσδιορισμού συγκέντρωσης dsDNA δείγματος με το Qubit™ dsDNA HS Assay Kit.

Για τη δημιουργία της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) και για την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης της στα 100 pM το Ion Library Equalizer™ Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Στην εικόνα 15 φαίνεται σχηματικά η διαδικασία δημιουργίας μιας γονιδιακής βιβλιοθήκης.

Ion AmpliSeq™ workflow starting from genomic DNA



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων δημιουργίας της γονιδιακής βιβλιοθήκης.

Πιο αναλυτικά, το στάδιο της βιβλιοθήκης αρχικά περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των εξονίων και των παρακείμενων θέσεων ματίσματος των υπό μελέτη γονιδίων με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Εικόνα 16).

A) Πολλαπλασιασμός των υπο μελέτη γονιδίων (PCR)

5x Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	2μl	Activate the enzyme	99°C	2 minutes	
DNA (100 ng)		Denature	99°C	15 seconds	19 cycles
dH ₂ O	3μl	Anneal and extend	60°C	8 minutes	
Each 2x Primer Pool	5μl	Hold	10°C		
Συνολικός Όγκος	10μl				

Εικόνα 16. Πειραματική Διαδικασία πολλαπλασιασμού των γονιδίων κάθε ασθενούς.

Ακολουθεί η πέψη των προϊόντων της PCR προκειμένου να προσδεθούν οι προσαρμογείς (Ion Xpress Barcode Adapters) στο επόμενο στάδιο. Χρησιμοποιούνται 2 προσαρμογείς, ένας κοινός (Ion P1 Adapter) για όλα τα δείγματα και ένας ειδικός (Ion Xpress Barcode X) για κάθε δείγμα, ώστε να προσδίδει μοναδική ταυτότητα στα τμήματα DNA κάθε ασθενούς (Εικόνα 17).

B) Συνδυασμός των αντιδράσεων ανά ασθενή

(2x) Αντίδραση PCR/Primer Pool/Ασθενή	10μl
Συνολικός Όγκος Βιβλιοθήκης/Ασθενή	20μl

Γ) Πέψη των προϊόντων της PCR

FuPa Reagent	2μl
Βιβλιοθήκη/Ασθενή	20μl
Συνολικός Όγκος	22μl

50°C	10 minutes
55°C	10 minutes
60°C	20 minutes
10°C	Hold (for up to 1 hour)

Δ) Αραίωση Προσαρμογέων (Adapters)

Ion P1 Adapter	1μl
Ion Xpress™ Barcode X (X:1-16)	1μl
dH ₂ O	2μl
Συνολικός Όγκος	4μl

Ε) Πρόσδεση Προσαρμογέων (Adapters)

Switch Solution	4μl
Diluted Ion Xpress™ barcode adapter mix	2μl
DNA Ligase	2μl
Κομμένη Βιβλιοθήκη/Ασθενή	22μl
Συνολικός Όγκος	30μl

22°C	30 minutes
68°C	5 minutes
72°C	5 minutes
10°C	Hold (for up to 24 hours)

Εικόνα 17. Πειραματική διαδικασία πρόσδεσης προσαρμογέων στις γονιδιακές βιβλιοθήκες κάθε ασθενούς.

Στη συνέχεια, τα τμήματα DNA καθαρίζονται χρησιμοποιώντας το Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), το οποίο εμπεριέχει παραμαγνητικά σφαιρίδια και εξασφαλίζει υψηλής καθαρότητας τμήματα DNA μεγαλύτερα των 100 bp χωρίς προσμίξεις αλάτων, περίσσεια εκκινητών, νουκλεοτίδιων και ενζύμων (Εικόνα 18).

ΣΤ) Καθαρισμός Βιβλιοθηκών

Agencourt™ AMPure™ XP Reagen	45μl	
Βιβλιοθήκη/Ασθενή	30μl	
Συνολικός Όγκος	75μl	
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	5 minutes	
Επώαση στον μαγνήτη	2 minutes	
Απόρριψη Υπερκειμένου		
70% Αιθανόλη	150μl	
Επώαση στον μαγνήτη	2 minutes	x2
Απόρριψη Υπερκειμένου		
Επώαση στον μαγνήτη	5 minutes	

Εικόνα 18. Πειραματική Διαδικασία καθαρισμού των βιβλιοθηκών ανά ασθενή.

Στο τελευταίο στάδιο προετοιμασίας της βιβλιοθήκης, τα δείγματα ενισχύονται ξανά και εξισορροπούνται τελικά σε συγκέντρωση 100pM/βιβλιοθήκη με το Ion Library Equalizer™ Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Τα ίσης συγκέντρωσης δείγματα ενώνονται ισόποσα και διαχειρίζονται πλέον ως ένα δείγμα (Εικόνα 19).

Ζ) Εξισορρόπηση Συγκέντρωσης Βιβλιοθηκών

Platinum™ PCR SuperMix HiFi	50μl	98°C	2 minutes	
Equalizer™ Primers	2μl	98°C	15 seconds	9 cycles
Επώαση στον μαγνήτη	2 minutes	64°C	1 minutes	
Μεταφορά σε νέα θέση	50μl	10°C	Hold (for up to 1 hour)	
Προϊόν PCR	50μl			
Equalizer™ Capture	10μl			
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	5 minutes			
Equalizer™ Beads	6μl			
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	5 minutes			
Επώαση στον μαγνήτη	2 minutes			
Απόρριψη Υπερκειμένου				
Equalizer™ Wash Buffer	150μl			
Επώαση στον μαγνήτη	2 minutes			x2
Απόρριψη Υπερκειμένου				
Equalizer™ Elution Buffer	100μl			
Elution	32°C 5 minutes			
Επώαση στον μαγνήτη	5 minutes			
Συλλογή Βιβλιοθήκης	100μl			~100pM

Εικόνα 19. Πειραματική Διαδικασία εξισορρόπηση της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών.

2° Στάδιο: Προετοιμασία του δείγματος για αλληλούχηση (Template Preparation)

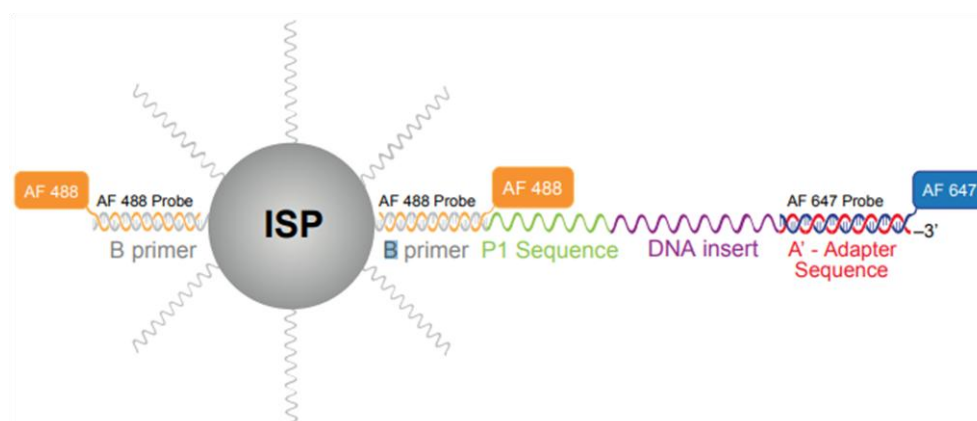
Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε το Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) και οι συσκευές IonOneTouch 2 και Ion OneTouch ES

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Εικόνα 20). Τα τμήματα DNA των βιβλιοθηκών δεσμεύονται πάνω σε ειδικά σφαιρίδια (Ion Sphere Particles, ISPs) και ενισχύονται ξανά, ώστε το κάθε σφαιρίδιο να περιέχει πολλές φορές έναν και μόνο κλώνο. Ωστόσο, σε χαμηλό ποσοστό δημιουργούνται και πολυκλωνικά σφαιρίδια.



Εικόνα 20. Οι συσκευές Ion OneTouch 2 (δεξιά) και Ion OneTouch ES (αριστερά).

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται έλεγχος του % ποσοστού των σφαιριδίων που δεσμεύτηκαν με DNA με χρήση του Ion Sphere™ Quality Control Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Αυτό γίνεται με χρήση φθοριοσημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων (Ion Probes), τα οποία δεσμεύονται στους εκκινητές των σφαιριδίων και στους προσαρμογείς και τα οποία εκπέμπουν ακτινοβολία φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος (λ). Με τα κόκκινα Cy5-φθοριοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια ($\lambda = 647 \text{ nm}$) ανιχνεύονται τα προσδεδμεμένα με DNA σφαιρίδια, ενώ με τα πράσινα FITC-φθοριοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια ($\lambda = 488 \text{ nm}$) ανιχνεύεται το σύνολο των σφαιριδίων του διαλύματος (Εικόνα 21). Ο έλεγχος αυτός δε διακρίνει τα μονόκλωνα από τα πολυκλωνικά σφαιρίδια.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση των προσδεδμεμένων με DNA σφαιριδίων και των φθοριοσημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων.

3^ο Στάδιο: Αλληλούχηση (Sequencing)

Στο στάδιο της αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκε το Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Τα σφαιρίδια τοποθετούνται σε μικροπλάκα 314v2, η οποία έχει χωρητικότητα σφαιριδίων >1 εκατομμύριο. Κατά την αντίδραση της αλληλούχησης στην πλατφόρμα Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM) (Εικόνα 22), η μικροπλάκα βομβαρδίζεται διαδοχικά με δεοξυριβονουκλεοτίδια. Όταν ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στο DNA με την βοήθεια της πολυμεράσης τότε ένα μόριο υδρογόνου απελευθερώνεται προκαλώντας αλλαγή στο pH. Την αλλαγή αυτή ανιχνεύει ένας αισθητήρας (ion sensor) και την μετατρέπει σε ψηφιακή πληροφορία – αλληλουχία του γονιδίου.



Εικόνα 22. Πλατφόρμα αλληλούχησης επόμενης γενιάς Ion Torrent™ Personal Genome Machine™.

2.2.3 Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος

Η αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing, WES) τεσσάρων δειγμάτων ασθενών, 2 με Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια και 2 με Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου, διεξήχθη σε ιδιωτικό εργαστήριο.

Για τον πολλαπλασιασμό όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκε το Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) και τουλάχιστον 50 ng DNA ασθενών. Αυτή η μέθοδος δημιουργίας βιβλιοθηκών στοχεύει >97% του κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος με >90% *in silico* κάλυψη. Οι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων-στόχων βρίσκονται ομαδοποιημένοι σε 12 βοθρία μια 96 βοθρίων πλάκα για κάθε δείγμα ασθενή. Σε κάθε πλάκα φορτώνονται δύο δείγματα ασθενών.

Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε στο Ion S5™ XL System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Εικόνα 23) σε μικροπλάκα Ion 550™ Chip (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Η μικροπλάκα βομβαρδίζεται διαδοχικά με δεοξυριβονουκλεοτίδια.

Όταν ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στο DNA με την βοήθεια της πολυμεράσης τότε ένα μόριο υδρογόνου απελευθερώνεται προκαλώντας αλλαγή στο pH. Την αλλαγή αυτή ανιχνεύει ένας αισθητήρας (ion sensor) και την μετατρέπει σε ψηφιακή πληροφορία – αλληλουχία του γονιδίου.



Εικόνα 23. Η πλατφόρμα αλληλούχησης επόμενης γενιάς Ion S5™ XL System.

2.2.4 Βιοπληροφορική Ανάλυση

Μετά το NGS, πραγματοποιήθηκε αναγνώριση των βάσεων (base calling), στοίχιση των τμημάτων που αλληλουχήθηκαν (alignment) και αναγνώριση των παραλλαγών (variant calling) από το Torrent Suite™ Server σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Τα τμήματα αλληλούχησης στοιχήθηκαν σύμφωνα με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς hg19 με το πρόγραμμα Torrent Mapping Alignment (TMAP), το οποίο χρησιμοποιεί 3 αλγόριθμους, τους Burrows-Wheeler Aligner (BWA), Sequence Search and Alignment by Hashing Algorithm (SSAHA) και Super-maximal Exact Matching. Μετά το πέρας αυτών των εργασιών, τα δεδομένα αλληλούχησης λήφθηκαν ως αρχεία VCF (Variant Call Format) και BAM (Binary Alignment Map) για περαιτέρω ανάλυση.

Οι παραλλαγές σχολιάστηκαν (annotation) με τη χρήση των λογισμικών: 1) Ion Reporter (v5.2.0.66; <https://ionreporter.thermofisher.com>) και 2) ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org>) [165] μέσω του εργαλείου VarAFT (Variant Annotation and Filter Tool, Version 2.15; <https://varaft.eu/>) [166].

Λογισμικά Εργαλεία

Ion Reporter: αποτελεί ένα λογισμικό εργαλείο που αποθηκεύει τα δεδομένα αλληλούχησης, τα αναλύει, σχολιάζει τις παραλλαγές με πληροφορίες από βάσεις δεδομένων και με τα αποτελέσματα προγραμμάτων βιοπληροφορικής και τα εξάγει σε ένα αρχείο κειμένου για κάθε δείγμα ασθενούς.

VarAFT: αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τον σχολιασμό των παραλλαγών με χρήση του ANNOVAR και για την διαχείριση/φιλτράρισμα των παραλλαγών με βάση τη θέση τους στο γονίδιο, την συχνότητα εμφάνισης τους στον πληθυσμό (1000 Genome Project, gnomAD) και την σύνδεση των γονιδίων με διάφορα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με βάσεις δεδομένων (HPO, OMIM).

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής και οι βάσεις δεδομένων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα:

Προγράμματα αξιολόγησης γενετικών αλλαγών

Mutation Taster: προβλέπει την επίπτωση των παραλλαγών που αφορούν νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, απαλείψεις και διπλασιασμούς σε κωδικές περιοχές, περιοχές ματίσματος, ιντρονίων και αμετάφραστων περιοχών (5' UTR και 3' UTR) ενός γονιδίου στο μέγεθος της αμινοξικής αλληλουχίας, την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, και στην πιθανή αλλαγή των θέσεων ματίσματος. Το αποτέλεσμα αυτού του προγράμματος είναι ο χαρακτηρισμός της παραλλαγής σε καλοήγη ή παθολογική, ενώ η σημαντικότητα της πρόβλεψης στηρίζεται από μια τιμή p-value που κυμαίνεται από 0 - 1. Όσο πιο κοντά στο ένα είναι η τιμή σημαντικότητας, τόσο πιο ασφαλής είναι η πρόβλεψη (www.mutationtaster.org/) [167].

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): προβλέπει εάν μια αμινοξική αντικατάσταση, βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αμινοξέων, επιδρά αρνητικά στην λειτουργία της πρωτεΐνης. Οι τιμές των αποτελεσμάτων κυμαίνονται από 0 - 1. Τιμές που τείνουν στο 0 χαρακτηρίζονται ως παθολογικές παραλλαγές και τιμές που τείνουν στο 1 ως καλοήθεις (<http://sift.jcvi.org/>) [168].

PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2): προβλέπει την επίπτωση των μη συνώνυμων αμινοξικών αντικαταστάσεων στην δομή και στην λειτουργία των ανθρώπινων πρωτεϊνών. Οι τιμές των αποτελεσμάτων επίσης κυμαίνονται μεταξύ 0 - 1. Τιμές που τείνουν στο 0 χαρακτηρίζονται ως καλοήθεις παραλλαγές και τιμές που τείνουν στο 1 ως παθολογικές (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [169].

UMD: προβλέπει την παθολογικότητα των αμινοξικών αντικαταστάσεων ανάλογα με την συντήρηση του φυσιολογικού αμινοξέως στο χρόνο, τις βιοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων και την πιθανή επίδραση της παραλλαγής στο επίπεδο του mRNA. Οι τιμές των αποτελεσμάτων κυμαίνονται μεταξύ 0 - 100. Παραλλαγές με τιμές κοντά στο 0 θεωρούνται

πολυμορφισμοί, ενώ παραλλαγές με τιμές κοντά στο 100 παθολογικές (<http://umd-predictor.eu>)[170].

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer): προβλέπει την παθολογικότητα των μη συνώνυμων μονονουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων, απαλείψεων και διπλασιασμών μικρής έκτασης συγκρίνοντας την αλληλουχία που φέρει την παραλλαγή με άλλες ομόλογες αλληλουχίες. Η τιμή των αποτελεσμάτων κυμαίνεται από -14 έως +14 και όταν η τιμή τείνει στο -14, η παραλλαγή θεωρείται παθολογική (<http://provean.jcvi.org>)[171].

MetaSVM (Meta-analytic Support Vector Machine) και MetaLR (Meta-analytic Logistic Regression): προβλέπουν την παθολογικότητα των παρερμηνεύσιμων παραλλαγών με βάση τα αποτελέσματα 9 προγραμμάτων, των SIFT, PolyPhen-2, GERP++, MutationTaster, Mutation Assessor, FATHMM, LRT, SiPhy and PhyloP και την συχνότητα εμφάνισης τους στο πληθυσμό με βάση το 1000 Genome Project. Στο MetaLR, η τιμή της πρόβλεψης κυμαίνεται από 0 - 1 και οι αντικαταστάσεις με τιμές που τείνουν στο 1 θεωρείται ότι είναι παθολογικές, ενώ στο MetaSVM, η τιμή κυμαίνεται από -2.0058 έως +3.0399 και οι αντικαταστάσεις με τιμές που τείνουν στο +3.0399 θεωρείται ότι είναι παθολογικές [8, 9].

Mutation Assessor: προβλέπει την παθολογικότητα των αμινοξικών αντικαταστάσεων με βάση την συντήρηση του φυσιολογικού αμινοξέως μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνών. Η τιμή των αποτελεσμάτων κυμαίνεται από -5.135 έως +6.49. Όταν η τιμή πλησιάζει στο +6.49, η αμινοξική αντικατάσταση είναι παθολογική (<http://mutationassessor.org>) [174].

CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion): προβλέπει την παθολογικότητα μονονουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων, απαλείψεων ή διπλασιασμών μικρής έκτασης με βάση τα χαρακτηριστικά των εκατέρωθεν της παραλλαγής αλληλουχιών, τα επιγενετικά χαρακτηριστικά και την λειτουργικότητα του γονιδίου. Ακόμη λαμβάνει υπόψιν και την εξελικτική συντήρηση της παραλλαγής από τον τελευταίο κοινό πρόγονο του ανθρώπου και του πιθήκου (<http://cadd.gs.washington.edu>) [175].

DANN (Deep Neural Network): προβλέπει την παθολογικότητα παραλλαγών που βρίσκονται στις κωδικοποιούσες και μη περιοχές ενός γονιδίου. Οι τιμές των αποτελεσμάτων κυμαίνονται από 0 - 1. Όταν η τιμή μιας πρόβλεψης τείνει στο 1, η παραλλαγή θεωρείται παθολογική [176].

LRT (Likelihood Ratio Test): προβλέπει την παθολογικότητα των παραλλαγών, με βάση την συντήρηση αμινοξικών αλληλουχιών συγκρίνοντας τις αλληλουχίες 32 σπονδυλωτών. Οι

τιμές των αποτελεσμάτων κυμαίνονται από 0 - 1. Παραλλαγές με τιμές κοντά στο 0 χαρακτηρίζονται ως παθολογικές [177].

FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models): προβλέπει την παθολογικότητα των αμινοξικών αντικαταστάσεων με βάση την συντήρηση της αλληλουχίας και την συχνότητα των παθολογικών και μη παραλλαγών που εντοπίζονται σε συντηρημένες περιοχές των γονιδίων. Οι τιμές των αποτελεσμάτων αυτού του προγράμματος κυμαίνονται από -16.13 έως +10.64. Οι παραλλαγές με τιμές κοντά στο -16.13 χαρακτηρίζονται ως παθολογικές (<http://fathmm.biocompute.org.uk/>) [178].

Προγράμματα συντήρησης

GERP++ (Genomic Evolutionary Rate Profiling): προβλέπει την εξελικτική συντήρηση ενός αμινοξέος μεταξύ αλληλουχιών 35 θηλαστικών. Η τιμή συντήρησης κυμαίνεται από -12.3 έως 6.17. Όσο η τιμή μιας αντικατάστασης πλησιάζει το 6.17, τόσο πιο συντηρημένο μεταξύ των 35 θηλαστικών είναι το φυσιολογικό αμινοξύ, με αποτέλεσμα η αντικατάσταση να θεωρείται παθολογική (<http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/index.html>) [179].

GRANTHAM: προβλέπει σε μια αντικατάσταση την χημική εξελικτική απόσταση των δυο αμινοξέων με βάση την σύνθεση της πλευρικής ομάδας των αμινοξέων, τον μοριακό όγκο των αμινοξέων και τον βαθμό πολικότητας. Η τιμή του αποτελέσματος κυμαίνεται από 5 - 215. Όταν η τιμή μιας αντικατάστασης πλησιάζει το 5 αντικατοπτρίζει μικρή εξελικτική απόσταση των αμινοξέων και η αντικατάσταση θεωρείται καλοήθης, ενώ όταν η τιμή πλησιάζει το 215 δείχνει μεγάλη εξελικτική απόσταση και η αντικατάσταση θεωρείται παθολογική [180].

Panther (Protein Analysis through Evolutionary Relationships): προβλέπει την πιθανότητα μια μη συνώνυμη παραλλαγή να είναι παθολογική σύμφωνα με την συντήρηση του φυσιολογικού αμινοξέος στον χρόνο, με τιμή πρόβλεψης εκφρασμένη σε εκατομμύρια χρόνια. Για όσο περισσότερο χρόνο είναι συντηρημένο ένα αμινοξύ τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα η παραλλαγή του συγκεκριμένου αμινοξέος να είναι παθολογική (<http://www.pantherdb.org>) [181].

Προγράμματα πρόβλεψης παθολογικότητας παραλλαγών σε θέσεις ματίσματος

Human Splicing Finder: προβλέπει την πιθανότητα μία νουκλεοτιδική παραλλαγή να επηρεάζει το μάτισμα είτε δημιουργώντας μια νέα θέση ματίσματος, είτε ακυρώνοντας μια

θέση ματίσματος, είτε ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας αλληλουχίες που συμμετέχουν στο μάτισμα, όπως είναι το σημείο διακλάδωσης (Branch point). Οι τιμές των αποτελεσμάτων κυμαίνονται από 0 - 100 με όριο το 65. Όταν η τιμή της φυσιολογικής αλληλουχίας είναι > 65 και η τιμή μεταξύ φυσιολογικής αλληλουχίας και παραλλαγμένης είναι < -10%, τότε η θέση ματίσματος της φυσιολογικής αλληλουχίας καταργείται. Ενώ, όταν η τιμή της φυσιολογικής αλληλουχίας είναι < 65 και η τιμή μεταξύ φυσιολογικής αλληλουχίας και παραλλαγμένης είναι > +10%, τότε μια νέα θέση ματίσματος δημιουργείται λόγω της παραλλαγής (HSF; <http://www.umd.be/HSF3>) [182].

Βάσεις δεδομένων-Μηχανές αναζήτησης

Ensembl: πρόκειται για μια γονιδιωματική μηχανή αναζήτησης, η οποία περιλαμβάνει γονιδιωματικές πληροφορίες διαφόρων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου. Συγκεκριμένα, η μηχανή αναζήτησης Ensembl περιέχει για κάθε γονίδιο τις ακριβείς συντεταγμένες του στο γονιδίωμα, την αλληλουχία αναφοράς, τις αλληλουχίες όλων των μεταγράφων του, τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες, το μέγεθος όλων των μεταγράφων και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, όλες τις γνωστές παραλλαγές στις κωδικοποιούσες και μη περιοχές του γονιδίου κ.α. (<http://www.ensembl.org>) [183].

Human Gene Mutation Database: πρόκειται για βάση δεδομένων γνωστών δημοσιευμένων ανθρώπινων γαμετικών παθολογικών παραλλαγών ή πολυμορφισμών που σχετίζονται με ασθένειες. Οι παραλλαγές αυτές είναι ομαδοποιημένες ανά γονίδιο σε παρερμηνεύσιμες, μη νοσηματικές, ρυθμιστικές, ματίσματος, προσθήκες, διπλασιασμούς και απαλείψεις μικρών και μεγάλων τμημάτων, αναδιατάξεις, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Η βάση δεδομένων HGMD διακρίνεται σε ελεύθερης και επαγγελματικής πρόσβασης (HGMD; www.hgmd.cf.ac.uk) [184].

dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database): πρόκειται για βάση δεδομένων καλοήθων και παθολογικών παραλλαγών αλλά και μικρής έκτασης απαλείψεων και διπλασιασμών του ανθρώπινου γονιδιώματος. Κάθε παραλλαγή έχει ένα μοναδικό κωδικό με πρόθεμα rs. Οι πληροφορίες που προσφέρει η βάση αυτή για κάθε παραλλαγή περιλαμβάνουν την θέση της παραλλαγής στο γονιδίωμα, την προέλευση της (σωματική, γαμετικής σειράς ή άγνωστη), την κλινική της σημασία (σύμφωνα με αυτόν που υποβάλλει την παραλλαγή) και την συχνότητα της στον πληθυσμό σύμφωνα με το 1000 Genome Project (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

STRING: πρόκειται για βάση δεδομένων άμεσων και έμμεσων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα πρόβλεψης, να προέρχονται από αποτελέσματα πειραμάτων, από πληροφορίες άλλων βάσεων δεδομένων ή από την βιβλιογραφία. Για κάθε αλληλεπίδραση υπάρχει ένα δείκτης εμπιστοσύνης από 0 - 1. Όταν ο δείκτης αυτός πλησιάζει το 1, η αλληλεπίδραση είναι αληθής. Η βάση STRING περιέχει 9643763 πρωτεΐνες από 2031 οργανισμούς (<https://string-db.org/>) [185].

Varsome: πρόκειται για μηχανή αναζήτησης πληροφοριών για παραλλαγές των κωδικών και μη κωδικών περιοχών ενός γονιδίου (εκτός των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών). Συγκεκριμένα, προσφέρει πληροφορίες για την θέση της παραλλαγής στο γονίδιο και στο γονιδίωμα, την αξιολόγηση της σε παθολογική, πιθανώς παθολογική, αβέβαιης σημασίας, πιθανώς καλοήγη και καλοήγη με βάση τα κριτήρια του ACMG, την αξιολόγηση και τις πηγές του ClinVar, τις προβλέψεις προγραμμάτων βιοπληροφορικής, την συχνότητα εμφάνισης της παραλλαγής στον πληθυσμό από το gnomAD exomes και συγκεντρώνει βιβλιογραφία σχετική με την παραλλαγή ή το γονίδιο (<https://varsome.com>) [186].

2.2.5 Σχεδιασμός Εκκινητών

Στην παρούσα εργασία, εκκινητές σχεδιάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου *KCNJ11* και την αλληλούχηση του τμήματος του που δεν καλυπτόταν από το NGS, των εξονίων 1 και 24 του γονιδίου *ABCC8*, καθώς και του εξονίου 11 του γονιδίου *GLUD1*, στα οποία αρκετοί ασθενείς είχαν διαβάσματα < 30x. Ακόμη, εκκινητές σχεδιάστηκαν για τα εξόνια και τις παρακείμενες θέσεις ματίσματος των γονιδίων, στα οποία ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές με την μεθοδολογία του NGS (Στοχευμένη Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς και WES).

Προκειμένου να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές για τα εξόνια και τις παρακείμενες θέσεις ματίσματος των γονιδίων αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες αναφοράς των γονιδίων (Reference Sequence; REF SEQ) από τη γονιδιωματική μηχανή αναζήτησης ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) και το πρόγραμμα σχεδιασμού εκκινητών Primer3 (v.0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Για την ειδική πρόσδεση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο και την ελαχιστοποίηση πολλαπλασιασμού ανεπιθύμητων τμημάτων, οι εκκινητές επιλέγονται βάσει ορισμένων κανόνων. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές πρέπει να είναι μεγέθους περίπου 18-23 nt, να έχουν περιεκτικότητα σε GC 40-60%, σημείο τήξης <65 °C, απόλυτη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία στόχο και όχι μεταξύ τους για να αποφεύγονται τα διμερή, να μην περιλαμβάνουν πολυμορφικές θέσεις ή διαδοχικά επαναλαμβανόμενες

βάσεις, ειδικά στο 3' άκρο τους και να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα στα άκρα των εκκινητών.

Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθος τους, η θερμοκρασία υβριδισμού, καθώς και το μέγεθος των παραγόμενων τμημάτων (Πίνακας 5 και 6).

Πίνακας 5. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κάλυψη των περιοχών που δεν καλύπτονταν από το NGS και για την επιβεβαίωση των παθολογικών παραλλαγών των ασθενών με ΜΣΔ MODY και Συγγενή Υπερινσουλινισμό.

Γονίδιο	Εξόνιο	Εκκινητής		Μέγεθος εκκινητή (nt)	Θερμοκρασία Υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
KCNJ11	1	F	5'-GACTCTGCAGTGAGGCCCTA-3'	20	63	1406
		R	5'-CTGTAACACCCTGGATGAGCA-3'	21		
		F2	5'-GCCACACACATTGCTCATCT-3'	20	-	-
		R2	5'-GTTGGCATCAATGACATGGT-3'	20		
		F3	5'-GACCCTCATCTTCAGCAAGC-3'	20	-	-
ABCC8	1	F	5'-GGAGCTGCAAGGGACAGA-3'	18	58	410
		R	5'-GATGAGCTGGTGTGCGAG-3'	18		
	3	F	5'-GGTTCAGTGTTCAGCCTTTGA-3'	21	59	312
		R	5'-GTTTAGAGCAATAGCTGGCACA-3'	22		
	7	F	5'-CTACGGTGGTCATTTTGCT-3'	19	54	358
		R	5'-AACATCGTTAATGGGCAACA-3'	20		
	24	F	5'-CCTGGCAAGATGAATGTGTG-3'	20	58	352
		R	5'-ACTACTGCACCACACCAG-3'	19		
	29	F	5'-AGGTGGAGCTAGGCTTCAGG-3'	20	61	329
		R	5'-TGCTGGTGGATATCCCTTGG-3'	20		
	32-33	F	5'-GAGCCATTCTGGTGGCTGAG-3'	20	60	609
		R	5'-GCAGGAGACTGCGATGTCTG-3'	20		
	34-35	F	5'-GTGTAAGCCCTCTCTGGACC-3'	20	62	620
		R	5'-ACCTCTGGGATCCTGGTCTC-3'	20		
	37	F	5'-ATCCCATCTGCTCCACTCAC-3'	20	58	277
		R	5'-TCGTGCAAAATTTCTCCCTAGC-3'	21		
	IVS8	F	5'-CCAGCCTCTGCCAGTCTCTT-3'	20	61	455
		R	5'-GCCTTGGTCCTGTAGTCCCA-3'	20		
GCK	2	F	5'-TGCAGATGCCTGGTGACAGC-3'	20	59	290
		R	5'-CACAGCTGCTTCTGGATGAG-3'	20		
	7	F	5'-CAGGAACCAGGCCCTACTC-3'	19	60	367
		R	5'-TGCTTTTCCCCAGAGTTGTT-3'	20		
	8	F	5'-GAGGGAAAGACGTGAACCAG-3'	20	58	390
		R	5'-GCCCTGAGACCAAGTCTGC-3'	19		
	9	F	5'-ACTGTCGGAGCGACACTCAG-3'	20	60	366
		R	5'-TTGGAGCTTGGGAACCGCA-3'	19		
HNF1A	3	F	5'-AAGAATCAAGGGCAAGGTCA-3'	20	60	300
		R	5'-ACCAGCACTGTTTCCCGCC-3'	19		
	5-6	F	5'-TGGCCTAAGCAAACCAATGG-3'	20	60	670
		R	5'-TGAGTCCCAGTGGCTCTTC-3'	19		
HNF4A	7	F	5'-CCACAGGCACCAGCTATCTT-3'	20	58.4	375
		R	5'-CCTGGCTGTCGTTAACATGA-3'	20		
HNF1B	1	F	5'-GGTGTCTGGAGGCTGAAGG-3'	19	60	615

	2	R	5'-GGTGTGGGAGAGAAGCAGA -3'	20	56	462
		F	5'-CATAGGTAGCACCCCCTAGA-3'	20		
		R	5'-AACATGACAGAAGCCAATCCA-3'	21		
GLUD1	11	F	5'- AGGCAGATGAATCACGAGGT -3'	20	57	615
		R	5'- TCAGTAGGATTCTTACTCCAG -3'	21		
HADH	IVS5	F	5'-CCTAAGGCCATTATGTGGATA-3'	21	59	545
		R	5'-CCTTAAGAAAACTGCAAAGTC-3'	22		

Πίνακας 6. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κάλυψη κάποιων περιοχών που δεν καλύπτονταν από το WES και για την επιβεβαίωση των παθολογικών παραλλαγών των ασθενών με Πολλαπλή Υποφυσική Ανεπάρκεια και Διαταραχές Διαφοροποίησης του Φύλου.

Γονίδιο	Εξόνιο	Εκκινητής		Μέγεθος εκκινητή (nt)	Θερμοκρασία Υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
ACTN4	17	F	5'-GACAGTTGTGAGCAGTGGG-3'	19	57	487
		R	5'-GTGCTGGTCTCTTCAATAATT-3'	21		
ATP10A	10	F	5'-CTGCACGACCAAGTGTCACT-3'	20	61	399
		R	5'-GGCATGGAAGTCCCCTGAATA-3'	21		
BMP4	3	F	5'-TTGCCCCCTCCATTTCTAGCC-3'	20	60	618
		R	5'-AAGCAGCTCTGTTCCTCAGC-3'	20		
CDON	11	F	5'-TTGGTCAGTTCCTCAGATCAG-3'	21	60	528
		R	5'-CCAGAACATTTTGAGTCAGAGT-3'	22		
GNRH1	2	F	5'-TCCTGCAACTTTCCCAATCT-3'	20	58	418
		R	5'-TCAGCCCCTAGTGCTGTCT-3'	19		
HS6ST1	2	F	5'-GCAGGAGTTGGTTGGCATT-3'	20	60	925
		R	5'-CATCCCTTGACAGTCTTGGG-3'	20		
IGSF1	18	F	5'-GTGACTCCCTGGAGATCTGG-3'	20	61	532
		R	5'-GGCTCCAAAGCTCCTCCATT-3'	20		
IL17RD	12	F	5'-AAGTCAGGCCGGTCCCTATA-3'	20	58	633
		R	5'-CCAAACGAGCTGTGTCTCA-3'	20		
PMM2	5	F	5'-GAGCTGAGAAACATTGACCAC-3'	22	59	364
		R	5'-TTGAACCTCTGGGCTCAAGT-3'	20		
SAMD9	3	F	5'-GAGGGATGCAGAAGAAACTGG-3'	21	61	650
		R	5'-TCTATGGATGGTTGCCTTTCCT-3'	22		
SHH	3	F	5'-TCAATGCCCTGCTCTCTT-3'	20	58.8	556
		R'	5'-CCCGGTTGATGAGAATGGTG-3'	20		
		F'	5'-TGTGCACAGCGTGACCCTAAG-3'	21	57.4	470
		R	5'-TGTCTTTTGTCTTGCCTTGC-3'	21		
SIX3	1	F	5'-CCTCTCTCTTCTCTCCCTGA-3'	21	62	919
		R	5'-CTCAACCCCTCTCCCTTC-3'	19		
SOX9	1	F	5'-CGCCTTCCCTAAGTGCTCGC-3'	19	61	750
		R	5'-TACACCCCTTCCACTCCC-3'	20		
SRA1	1-2	F	5'-TCGAGTCTTAGGGAGTTGCC-3'	20	60	627
		R	5'-CCTGCTCTGAGACCCTTACT-3'	20		
TACR3	1	F	5'-CAGCTGCATCCCTAACCA-3'	19	59	777
		R	5'-TCCCACCGCCAGTTCTTTT-3'	20		
WNT4	1	F	5'-GGCGGCGCTGACAGTCTGGT-3'	20	63	502
		R	5'-CACAGCCACCCCTGACGCCTC-3'	21		
WNT7A	4	F	5'-GGACCACACTGCCACAGTT-3'	19	58	543
		R	5'-GCAGGAAACCCAGGAAAAGTA-3'	21		

2.2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA *in vitro*, με χρήση διαδοχικών μεταβολών της θερμοκρασίας. Για την αντίδραση, απαιτούνται DNA του ασθενούς, DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ένα ζεύγος εκκινητών (εκατέρωθεν του τμήματος που πολλαπλασιάζεται), Mg^{+2} καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο δημιουργεί τις βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου. Οι DNA Taq πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται προέρχονται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus Aquaticus*, για το λόγο αυτό είναι σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές. Οι συνθήκες της αντίδρασης ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος και την περιεκτικότητα σε GC του DNA που πολλαπλασιάζεται, καθώς και με τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης των εκκινητών (θερμοκρασία υβριδισμού), οι οποίες προσδιορίζονται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m).

Οι αλληλουχίες των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* (εκτός από το εξόνιο 1), *ABCC8* (εκτός από το εξόνιο 1), *KCNJ11*, *HADH*, *ACTN4*, *PMM2*, *SAMD9*, *ATP10A*, *TACR3*, *IL17RD*, *WNT7A*, *HS6ST1*, *SRA1*, *BMP4*, *IGSF1*, *CDON* και *GNRH1* πολλαπλασιάστηκαν με την πολυμεράση Hot Star Taq Plus Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) (Πίνακας 7). Οι αλληλουχίες των γονιδίων *ABCC8* (εξόνιο 1), *HNF1B* (εξόνιο 1), *WNT4*, *SIX3* και *SOX9* πολλαπλασιάστηκαν με την πολυμεράση One Taq (New England Biolabs, MA, USA) (Πίνακας 8). Το εξόνιο 3 του γονιδίου *SHH* πολλαπλασιάστηκε σε 2 τμήματα κάθε ένα με διαφορετικές συνθήκες και πολυμεράσες. Το 1^ο τμήμα πολλαπλασιάστηκε με την Platinum Taq (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Πίνακας 9) και το 2^ο τμήμα με την One Taq (Πίνακας 8).

Πίνακας 7. Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης PCR με χρήση του ενζύμου Hot Star Taq Plus Master Mix.

Συστατικά PCR			
H ₂ O		6.5μl	
2 x Hot Star Taq Plus Master Mix		12.5μl	
Πρόσθιος Εκκινητής (2.5μM)		2.5μl	
Ανάστροφος Εκκινητής (2.5 μM)		2.5μl	
DNA		1μl	
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl			
Συνθήκες PCR			
Ενεργοποίηση ενζύμου		95°C	5'
35 κύκλοι	Αποδιάταξη	94°C	1'
	Υβριδοποίηση	54-63°C	1-2'
	Επιμήκυνση	72°C	1-2'
Τελική Επιμήκυνση		72°C	5-10'
Διατήρηση		4-10°C	

1 x Hot Star Taq Plus Master Mix: 1Unit polymerase, 1x PCR buffer, 200μM of each dNTP, 1.5mM MgCl₂

Πίνακας 8. Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης PCR με χρήση του ενζύμου One Taq.

Συστατικά PCR			
H ₂ O		11.375μl	6.375μl
One Taq (5 units/ml)		0.125μl	0.125μl
5x GC Reaction Buffer		5μl	5μl
High GC Enhancer		-	5μl
dNTPs (2mM)		2.5μl	2.5μl
Πρόσθιος εκκινητής (2.5μM)		2.5μl	2.5μl
Ανάστροφος εκκινητής (2.5μM)		2.5μl	2.5μl
DNA		1μl	1μl
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl			
Συνθήκες PCR			
35 κύκλοι	Ενεργοποίηση ενζύμου		94°C 2'
	Αποδιάταξη		94°C 30''- 1'
	Υβριδοποίηση		58-63°C 1'
	Επιμήκυνση		68°C 1'
	Τελική Επιμήκυνση		68°C 5'
Διατήρηση		4-10°C	

1x GC Reaction Buffer: 80mM Tris-SO₄, 2mM MgSO₄, 20mM (NH₄)₂SO₄, 5% glycerol, 5% DMSO, 0.06% IGEPAL CA-630, 0.05% Tween 20, pH 9.2, High GC Enhancer: 10mM Tris-HCl, 25% DMSO, 25% glycerol, pH 9.2.

Για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 1 του γονιδίου *WNT4* προστέθηκε GC Enhancer.

Πίνακας 9. Συστατικά και συνθήκες PCR για το εξόνιο 3 του γονιδίου *SHH* (1^ο τμήμα).

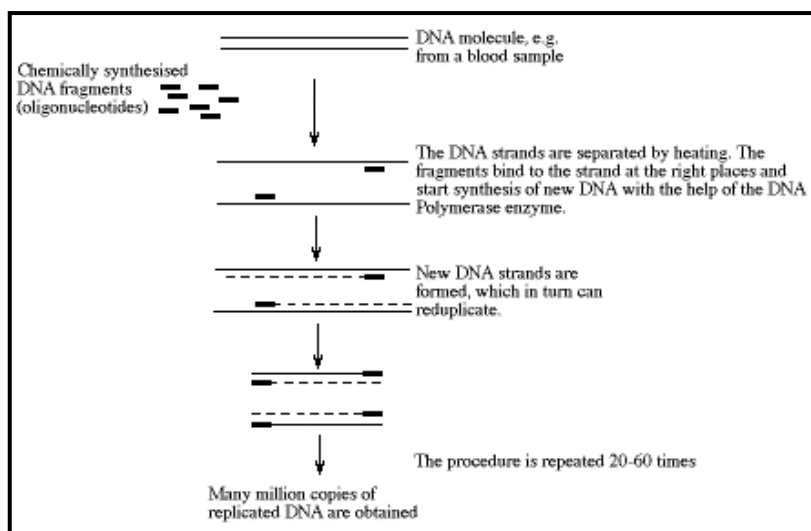
Συστατικά PCR			
H ₂ O		9.8μl	
Platinum Taq (40 Units/ml)		0.2μl	
10 x PCR Buffer (+15 mM MgCl ₂)		2μl	
dNTPs (2mM)		2μl	
Πρόσθιος εκκινητής (2.5μM)		2.5μl	
Ανάστροφος εκκινητής (2.5μM)		2.5μl	
DNA		1μl	
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl			
Συνθήκες PCR			
35 κύκλοι	Ενεργοποίηση ενζύμου		98°C 10'
	Αποδιάταξη		97°C 35''
	Υβριδοποίηση		58.8°C 35''
	Επιμήκυνση		72°C 1'
	Τελική Επιμήκυνση		72°C 10'
Διατήρηση		4-10°C	

Κάθε PCR περιλαμβάνει 5 στάδια (Εικόνα 24). Το πρώτο στάδιο είναι η ενεργοποίηση της πολυμεράσης (Initial heat activation). Οι Hot Start πολυμεράσες είναι προσδεσμένες με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου για την αποφυγή παραγωγής μη ειδικών προϊόντων. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 90°C, το αντίσωμα καταστρέφεται με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η δράση της πολυμεράσης.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η αποδιάταξη του DNA τους ασθενούς (denaturation). Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 94-95°C για περίπου 1 λεπτό, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών του. Έτσι, η διπλή έλικα θα ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Αποδιάταξη των προϊόντων συμβαίνει ξανά μετά από κάθε κύκλο με την αύξηση της θερμοκρασίας, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Το τρίτο στάδιο είναι η υβριδοποίηση (annealing), στο οποίο η θερμοκρασία μειώνεται στους 57-63°C για περίπου 1-2 min, προκειμένου να προσδεθούν οι εκκινητές στο μονόκλωνο DNA στο 3' άκρο της κάθε αλυσίδας. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, υπολογίζεται εμπειρικά από τον τύπο: $T_m = (A+T) \cdot 2 + (G+C) \cdot 4^\circ\text{C}$. Η θερμοκρασία τήξης (melting Temperature, T_m) ορίζεται ως η θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται μετάβαση από το δίκλωνο DNA στο μονόκλωνο κατά 50%.

Την υβριδοποίηση ακολουθεί η επιμήκυνση (extension), κατά την οποία η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C για 1-2 min, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης ώστε να συνθέσει την συμπληρωματική αλυσίδα του DNA χρησιμοποιώντας τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) του διαλύματος. Ένα τελευταίο στάδιο επιμήκυνσης (final extension) μετά από 30-35 κύκλους επανάληψης των προηγούμενων 3 σταδίων, πραγματοποιείται στους 72°C για 5-10 min για τα τμήματα που δεν πρόλαβαν να επιμηκυνθούν.



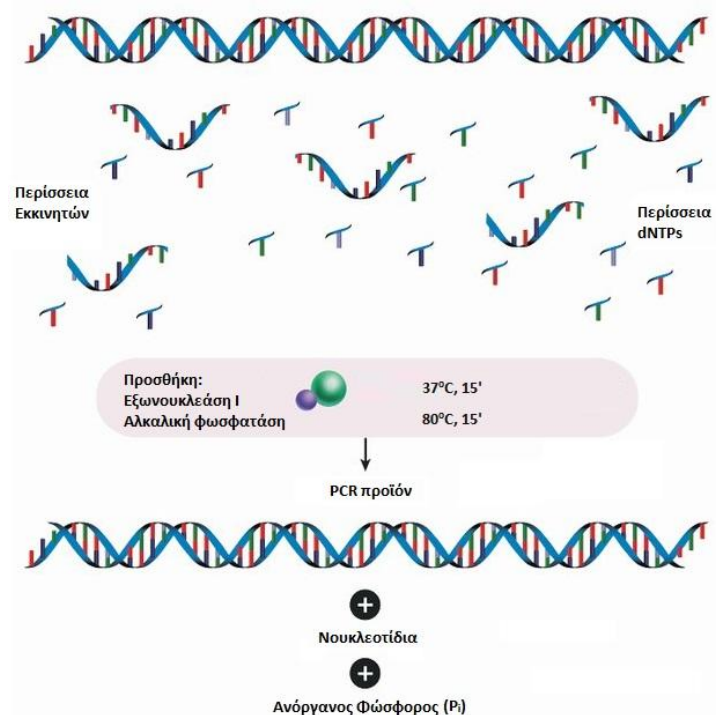
Εικόνα 24. Απεικόνιση της PCR αντίδρασης. Η διπλή συνεχόμενη γραμμή αποτελεί το αρχικό δίκλωνο DNA του ασθενούς, τα μικρά έντονα κομμάτια είναι οι εκκινητές και οι διακεκομμένες γραμμές είναι τα νέα μόρια DNA, που δημιουργούνται σε κάθε κύκλο της PCR.

Μετά το πέρας της PCR τα ενισχυμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε 1% (1.2gr αγαρόζης σε 120ml 1 x TBE) ή 2% (2.4gr αγαρόζης σε 120ml 1 x TBE) πήκτωμα αγαρόζης με EtBr, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων των γονιδίων που έχουν πολλαπλασιαστεί, για να ελέγξουμε την ποιότητα και την καθαρότητα της αντίδρασης της PCR.

2.2.7 Καθαρισμός του προϊόντος της PCR

Ο καθαρισμός του PCR προϊόντος από την περίσσεια των εκκινητών και των dNTPs είναι ένα απαραίτητο στάδιο, καθώς εξασφαλίζει την καθαρότητα των πολλαπλασιασμένων τμημάτων DNA από παράγοντες που μπορεί να μειώσουν την απόδοση της αντίδρασης της αλληλούχησης. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δυο υδρολυτικών ενζύμων, της εξωνουκλεάσης I προερχόμενη από το βακτήριο *E.coli* και της αλκαλικής φωσφατάσης προερχόμενη από την γαρίδα *P.borealis* (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent της Affymetrix, USA ή Exonuclease I και rSAP της New England Biolabs, USA). Η εξωνουκλεάση I αποικοδομεί τα μονόκλωνα κατάλοιπα εκκινητών καθώς και τα μη ειδικά μονόκλωνα τμήματα DNA που παράχθηκαν από το PCR, ενώ η αλκαλική φωσφατάση υδρολύει τα εναπομείναντα dNTPs (Εικόνα 25).

Επωάζονται 2,5μl από το PCR προϊόν με 1μl Exosap-IT ή 0.5 μl rSAP και 0.25 μl ExoI για 15 min στους 37°C, όπου τα ένζυμα είναι ενεργά και στην συνέχεια επωάζονται για 15 min στους 80°C για να απενεργοποιηθεί η δράση τους.



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της καθαρισμού της αντίδρασης της PCR.

2.2.8 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η μέθοδος αυτή εφευρέθηκε από τον Frederick Sanger το 1977 και στηρίζεται στην *in vitro* σύνθεση του DNA παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και άλυσσο-τερματικών τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs). Στο αρχικό στάδιο πραγματοποιείται αποδιάταξη των DNA τμημάτων, ώστε στο επόμενο στάδιο ο εκκινητής να υβριδοποιηθεί πάνω στο DNA στόχο (Πίνακας 10).

Η σύνθεση καταλύεται από την DNA πολυμεράση I, η οποία με τυχαίο τρόπο προσδένει dNTPs ή ddNTPs στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Στα ddNTPs λείπει ένα –OH στον 3^ο άνθρακα της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα η πολυμεράση να μην μπορεί να συνεχίσει την επιμήκυνση, αφού το επόμενο νουκλεοτίδιο δεν μπορεί να συνδεθεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών τμημάτων DNA διαφορετικού μεγέθους. Τα ddNTPs είναι επισημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες διαφορετικού χρώματος το καθένα, έτσι ώστε να μπορούν να ανιχνευτούν εύκολα με έναν ανιχνευτή λέιζερ. Συγκεκριμένα, το ddATP εκπέμπει στο μήκος κύματος του πράσινου φάσματος, το ddTTP εκπέμπει στο μήκος κύματος του κόκκινου φάσματος, το ddCTP εκπέμπει στο μπλε φάσμα και το ddGTP στο μαύρο φάσμα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το BigDye™ Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) και ο γενετικός αναλυτής ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

Πίνακας 10. Συστατικά και συνθήκες αντίδρασης αλληλούχησης.

Αντίδραση Αλληλούχησης		
BigDye Terminator v3.1		0.25μl
5 x Buffer		1.75μl
H ₂ O		7μl
Εκκινητής (3.2μM)		0.5μl
DNA		0.5μl
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 10μl		
Συνθήκες Αντίδρασης Αλληλούχησης		
25 κύκλοι	Αρχική Αποδιάταξη	96°C 1'
	Αποδιάταξη	96°C 10''
	Υβριδοποίηση	50°C 5''
	Επιμήκυνση	60°C 4'
	Διατήρηση	4°C

2.2.9 Καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης αλληλούχησης

Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται ο καθαρισμός της αντίδρασης της αλληλούχησης από την περίσσεια των dNTPs, ddNTPs και των εκκινητών με την μέθοδο της κατακρήμνισης DNA. Για το σκοπό αυτό προστίθενται σε κάθε αντίδραση 29μl από το εξής μίγμα 100 αντιδράσεων: 2750μl απόλυτη αιθανόλη (100%) και 100μl οξικό αμμώνιο 7.5M (NH₄AC). Πραγματοποιείται επώαση για 40 min στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στους 4°C για 30 min στα 2300 x g. Η αιθανόλη βοηθά τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των DNA μορίων να δεσμευτούν με ισχυρούς σταθερούς ιοντικούς δεσμούς με θετικά ιόντα, όπως Na⁺, NH₄⁺ ή Li⁺, με αποτέλεσμα το DNA να καθιζάνει.

Στην συνέχεια, απορρίπτεται το υπερκείμενο φυγοκεντρώντας τη πλάκα ανεστραμμένη στους 4°C για 2 min στα 200 x g. Ακολουθεί μία πλύση με 50μl 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση στους 4°C για 3 min στα 2300 x g. Απορρίπτεται ξανά το υπερκείμενο φυγοκεντρώντας τη πλάκα ανεστραμμένη στους 4°C για 3 min στα 200 x g. Η πλάκα παραμένει 10 min σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς καπάκι, ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια της αιθανόλης. Στον πυθμένα των βοθρίων βρίσκονται τα καθαρά τμήματα DNA. Μόλις εξατμιστεί η αιθανόλη, προστίθενται 10 μl φορμαμιδίου (Hidi), το οποίο είναι αποδιατακτικός παράγοντας και διατηρεί τα μόρια του DNA μονόκλωνα.

2.2.10 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης αλληλούχησης

Τα προϊόντα αλληλούχησης τοποθετούνται σε μια 96 βοθρίων πλάκα, κάθε σειρά της οποίας αποτελείται από 8 βοθρία. Κατά την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα της αλληλούχησης κάθε οκτάδας περνούν μέσα από το πολυμερές ακρυλαμίδης (POP-7 polymer, Applied Biosystems, Life Technologies, USA) και τα τμήματα διαχωρίζονται με

βάση το μέγεθος τους. Ένας ανιχνευτής λέιζερ ανιχνεύει την φθορίζουσα ουσία των ddNTPs σε κάθε τμήμα DNA. Με βάση το μέγεθος των τμημάτων και την φθορίζουσα ουσία που ανίχνευσε, δημιουργεί την αλληλουχία-στόχο κάθε δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός αναλυτής ABI 3500 (Applied Biosystems, LifeTechnologies, USA) (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Εξωτερική και εσωτερική απεικόνιση της συσκευής αλληλούχησης 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, HITACHI).

2.2.11 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Το MLPA είναι μία ημιοσοτική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων (απαλείψεων και διπλασιασμών) συγκεκριμένων γονιδίων που συνδέονται με ένα νόσημα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό των εξονίων των γονιδίων-στόχων σε υγιή δείγματα ελέγχου (negative controls) και στα υπό μελέτη δείγματα στην ίδια πειραματική δοκιμασία. Η μέθοδος του MLPA περιλαμβάνει συνολικά 4 στάδια (Πίνακας 11, Εικόνα 27).

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA όλων των δειγμάτων (80-100ng). Στο δεύτερο στάδιο, ζεύγος ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων - ιχνηθετών (probes), συμπληρωματικών ως προς τις παρακείμενες αλληλουχίες των εξονίων-στόχων, υβριδοποιούνται στο αποδιατεταγμένο DNA των υπό μελέτη δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου. Κατά το τρίτο στάδιο, τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν υβριδοποιηθεί συνδέονται με τη χρήση λιγάσης σε ένα ενιαίο ιχνηθέτη (probe). Κάθε ενιαίος ιχνηθέτης έχει συγκεκριμένο μήκος και διαφορετικό από τους υπόλοιπους που κυμαίνεται από 130-500 nt. Όλα τα ζεύγη ιχνηθετών περιλαμβάνουν μια κοινή αλληλουχία στο άκρο τους, στο οποίο

προσδένονται κοινοί εκκινητές. Οι ενιαίοι ανιχνευτές, στο τέταρτο στάδιο, το στάδιο της PCR, πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με την χρήση ζεύγους κοινών εκκινητών, εκ των οποίων ο ένας είναι φθοριοσημασμένος με FAM.

Η ανίχνευση του αριθμού των αντιγράφων των εξονίων-στόχων πραγματοποιείται με μέτρηση της χρωστικής FAM κατά την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση στον γενετικό αναλυτή ABI 3500. Παράλληλα με τα δείγματα τρέχει το 500 LIZ® Size Standard, το οποίο περιέχει 16 μονόκλινα τμήματα DNA γνωστών μεγεθών φθοριοσημασμένων με LIZ, τα οποία συγκρίνονται με το μέγεθος των υπό μελέτη εξονίων-στόχων ανά δείγμα.

Πίνακας 11. Συστατικά και συνθήκες MLPA αντίδρασης.

Συστατικά MLPA		
1 ^ο διάλυμα	DNA (80-100ng)	1-2μl
	Probemix	0.375μl
	SALSA MLPA Buffer	0.375μl
	H ₂ O	0.25μl
2 ^ο διάλυμα	Ligase 65 Buffer A	0.75 μl
	Ligase 65 Buffer B	0.75 μl
	Ligase 65	0.25 μl
	H ₂ O	6.25μl
3 ^ο διάλυμα	Primer Mix	0.5μl
	Polymerase	0.125μl
	H ₂ O	1.875μl
Προετοιμασία για γενετικό αναλυτή ABI 3500	PCR προϊόν	1.5μl
	LIZ GS 500	0.25μl
	Φορμαμίδιο	8.25μl
Συνθήκες MLPA		
Αποδιάταξη DNA		98°C 10'
Προσθήκη 1 ^{ου} διαλύματος		25°C παύση
Υβριδοποίηση	95°C	1'
	60°C	3h
Προσθήκη 2 ^{ου} διαλύματος		54°C παύση
Σύνδεση Ιχνηθετών		54 °C 15'

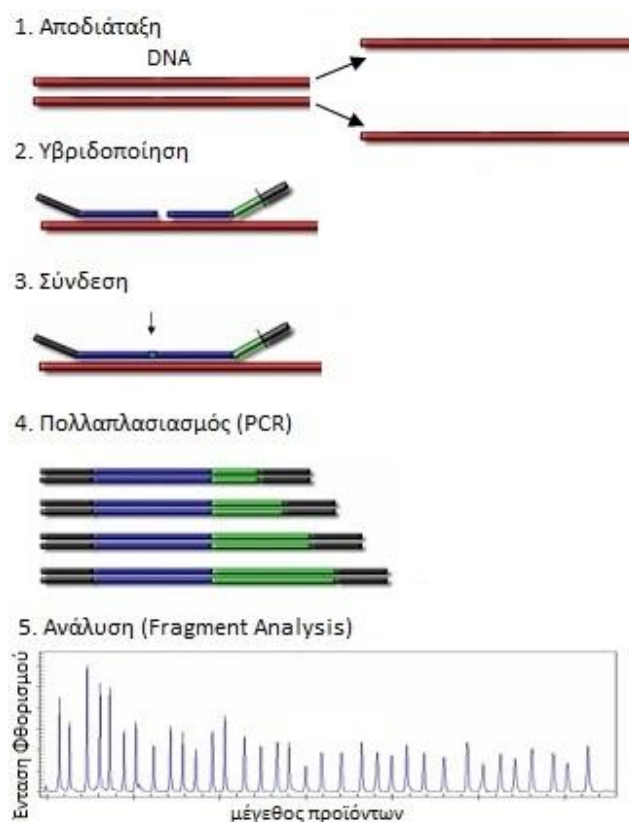
	98 °C	5'
Προσθήκη 3 ^{ου} διαλύματος	25 °C	παύση
PCR	95 °C	30''
	60 °C	30''
	72 °C	1'
	72 °C	20'

Ο γενετικός αναλυτής ABI 3500 αποδίδει ένα ηλεκτροφερόγραμμα ανά δείγμα, το οποίο αντικατοπτρίζει τον σχετικό αριθμό των αντιγράφων (ένταση φθορισμού) των υπό μελέτη εξονίων-στόχων των δειγμάτων. Μετά από σύγκριση των ηλεκτροφερογραμμάτων των υπό μελέτη δειγμάτων με εκείνα των δειγμάτων ελέγχου μέσω των λογισμικών προγραμμάτων Gene Marker V1.95 software (SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA) και Coffalyser.NET (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands), ο σχετικός αριθμός αντιγράφων ανά εξόνιο-στόχο ανά δείγμα αποδίδεται με μια τιμή. Οι τιμές των φυσιολογικών αριθμών των αντιγράφων κυμαίνεται από 0.7-1.3, εξόνια με τιμές <0.7 θεωρείται ότι το δείγμα έχει απάλειψη στο συγκεκριμένο εξόνιο, ενώ εξόνια με τιμές >1.3 θεωρείται ότι το δείγμα έχει διπλασιασμό του εξονίου.

Για την αξιολόγηση της πιστότητας των αποτελεσμάτων ως προς τα πειραματικά σφάλματα, το μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (probemix) περιείχε τέσσερις αλληλουχίες αναφοράς Q-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 ολιγονουκλεοτιδίων περιέχονται τρεις αλληλουχίες D-fragments μεγέθους 88, 92 και 96 nt, οι οποίες ελέγχουν την επιτυχία αποδιάταξης του DNA. Συγκεκριμένα, όταν οι εντάσεις φθορισμού των αλληλουχιών 88 και 96 nt είναι μικρότερες από το 40% της έντασης φθορισμού της αλληλουχίας των 92 nt αλλά και των υπόλοιπων εντάσεων φθορισμού των υπό μελέτη εξονίων-στόχων, η αποδιάταξη δεν έχει ολοκληρωθεί. Αυτό συνήθως συμβαίνει στα πρώτα εξόνια των γονιδίων καθώς αποτελούνται από μεγαλύτερο ποσοστό 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 και Y χρωμοσωμάτων αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα SALSA MLPA P241 MODY Mix 1 και SALSA MLPA P117 ABCC8 για την ανίχνευση διπλασιασμών και απαλείψεων των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8* αντίστοιχα σε ασθενείς με ΜΣΔ MODY και Συγγενή Υπερινσουλινισμό. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε το SALSA MLPA P185 Intersex, με το οποίο

ανιχνεύονται απαλείψεις και διπλασιασμοί των γονιδίων *NR0B1*, *NR5A1*, *SOX9*, *SRY* και *WNT4*, σε ασθενή με Διαταραχή Διαφοροποίησης του Φύλου.



Εικόνα 27. Στάδια της μεθόδου MLPA.

2.2.12 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Η μέθοδος RFLP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων παραλλαγών με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες μεγέθους 4-6 νουκλεοτιδίων και πέπτουν αμέσως μετά την αλληλουχία αυτή ή κοντά σε αυτή δημιουργώντας διαφόρων μεγεθών τμήματα DNA.

Αρχικά, πολλαπλασιάζεται με την μέθοδο της PCR το τμήμα DNA του ασθενούς, το οποίο περιέχει την υπό μελέτη νουκλεοτιδική θέση (Πίνακας 12). Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR πέπτονται με περιοριστικό ένζυμο, το οποίο έχει επιλεγεί για να αναγνωρίζει την αλληλουχία που φέρει ή δεν φέρει την παραλλαγή και να την πέπτει, παράγοντας έτσι κομμάτια διαφορετικού μεγέθους (Πίνακας 13). Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης και διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους. Ανάλογα με το μέγεθος και τον αριθμό των τμημάτων DNA που δημιουργήθηκαν, συμπεραίνεται εάν ο ασθενής φέρει ή όχι την παραλλαγή και εάν την φέρει εάν είναι ομοζυγώτης ή ετεροζυγώτης.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της συχνότητας της παραλλαγής p.Ser385Cys (c.1154C>G) του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό, ώστε να διερευνηθεί εάν είναι καλοήθης ή παθολογική.

Μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου *KCNJ11* (769bp) που κωδικοποιεί το φυσιολογικό αμινοξικό κατάλοιπο Ser385 (TCT) αλλά και την υπό διερεύνηση παραλλαγή Cys385 (TGT) υποβλήθηκαν στην πλατφόρμα NEBcutter v.2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Εντοπίστηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση BpmI (New England, Biolabs, USA), η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Bacillus pumilus* και

αναγνωρίζει την αλληλουχία $5' \dots \text{CTGGAG}(\text{N})_{16} \dots 3'$
 $3' \dots \text{GACCTC}(\text{N})_{14} \dots 5'$, που περιλαμβάνει την υπό μελέτη νουκλεοτιδική παραλλαγή. Το ένζυμο BpmI πέπτει την φυσιολογική αλληλουχία μία φορά 14 βάσεις πριν την αλληλουχία $5' \dots (\text{N})_{14} \text{CTCCAG} \dots 3'$ παράγοντας δύο τμήματα μεγεθών 603bp και 166bp, ενώ δεν πέπτει την αλληλουχία που φέρει την αλλαγή Cys385. Συνεπώς, ομοζυώτες (TCT/TCT) για την Ser385 παρήγαγαν δύο ζώνες μεγέθους 603bp και 166bp, ετεροζυγώτες (TCT/TGT) για την Cys385 παρήγαγαν 3 ζώνες μεγέθους 769bp, 603bp και 166bp, ενώ ομοζυγώτες για την Cys385 παρήγαγαν μια ζώνη 769bp.

Πίνακας 12. Συστατικά και συνθήκες PCR του τμήματος *KCNJ11*.

Συστατικά PCR			
H ₂ O		6.5μl	
2x Hot Star Taq Plus Master Mix		12.5μl	
F3 εκκινητής (5μM)		1.25μl	
R εκκινητής (5μM)		1.25μl	
DNA		0.5μl	
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl			
Συνθήκες PCR			
35 κύκλοι	Ενεργοποίηση ενζύμου	95°C	5'
	Αποδιάταξη	94°C	1'
	Υβριδοποίηση	63°C	1'
	Επιμήκυνση	72°C	1'
Τελική Επιμήκυνση		72°C	10'
Διατήρηση		4-10°C	

1x Hot Star Taq Plus Master Mix: 1Unit polymerase, 1x PCR buffer, 200μM of each dNTP, 1.5mM MgCl₂.

Πίνακας 13. Πέψη προϊόντος PCR με το ένζυμο BpmI.

Συστατικά Πέψης	
Προϊόν PCR	1μl
BpmI (2000 Units/ml)	0.5μl
10x NEBuffer 3.1	2.5μl

dH2O	21μl	
Συνολικός όγκος αντίδρασης: 25μl		
Συνθήκες πέψης		
Επώαση	37°C	60'
Απενεργοποίηση Ενζύμου	65°C	20'

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΣΔ MODY

Από τους 50 ασθενείς που διερευνήθηκαν για παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* και *KCNJ11* με την μεθοδολογία της Στοχευμένης Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς, 16 ασθενείς βρέθηκαν να φέρουν παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8*. Οι υπόλοιποι 34 ασθενείς εξετάστηκαν για την παρουσία απαλείψεων ή διπλασιασμών των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8* με την μεθοδολογία του MLPA. Από τους ασθενείς αυτούς 2 έφεραν απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*.

Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα ασθενών ως δείγματα ελέγχου, τα οποία έφεραν παθολογικές παραλλαγές ή απαλείψεις στα γονίδια *GCK* και *HNF1A* και τα οποία είχαν προηγουμένως ανιχνευθεί με την αλληλούχηση κατά Sanger και το MLPA. Οι παραλλαγές που έφεραν τα δείγματα ελέγχου ήταν p.S336L (c.1007C>T), p.D160N (c.478G>A) και p.S281Lfs*13 (c.840delC) του γονιδίου *GCK*, p.P379Rfs*39 (c.1136_1137delCT) του γονιδίου *HNF1A*, απάλειψη των εξονίων 8 και 9 του γονιδίου *GCK*

και απάλειψη των εξονίων 1 και 2 του γονιδίου *HNF1A*. Με επιτυχία ανιχνεύθηκαν οι παραρμηνεύσιμες και μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης παραλλαγές των 4 δειγμάτων ελέγχου, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν οι απαλείψεις που έφεραν τα 2 δείγματα ελέγχου.

3.1.1 Παραλλαγή p.A259T του γονιδίου *GCK*

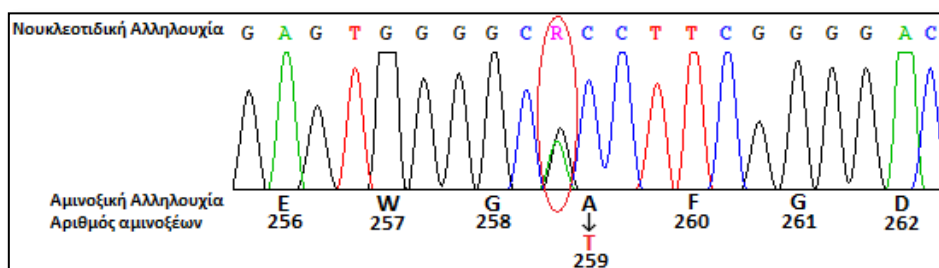
Στην ασθενή M1, η οποία παρουσίασε σε ηλικία 11.4 ετών γλυκόζη νηστείας 127 mg/dl και HbA1c 6.4%, ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.A259T (c.775G>A, rs1375656631) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4), η οποία είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 14). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδερίνη (GCC>ACC) του κωδικονίου Ala259. Η Αλανίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (Υδροφοβικός Χαρακτήρας (YX): 0.35), ενώ η Θρεονίνη ένα υδρόφιλο αμινοξύ (YX: -0.27). Τα υδρόφοβα αμινοξέα έχουν την τάση να στρέφονται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης, ενώ τα υδρόφιλα στρέφονται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης και αντιδρούν με μόρια νερού. Η διαφορά στην πολικότητα των δύο αυτών αμινοξέων πιθανόν επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Πίνακας 14. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.A259T (c.775G>A) του γονιδίου *GCK*.

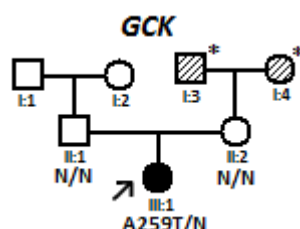
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.001	Παθολογική
	PolyPhen2	0.93	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	3.599	Παθολογική
	FATHMM	-4.13	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9812	Παθολογική
	MetaSVM	1.0674	Παθολογική
	MetaLR	0.9145	Παθολογική
	Provean	-3.57	Παθολογική
	UMD	90	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	33	Παθολογική
	DANN	0.9992	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	1368	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	58	Συντηρημένη
	GERP	5.23	Συντηρημένη
ACMG			Παθολογική

Με τη μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.A259T διαβάστηκε συνολικά 189x (G: 95x και A: 94x). Η παραλλαγή αυτή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στην

ασθενή (Εικόνα 28), ενώ, αλληλούχηση κατά Sanger στους υγιείς γονείς της ασθενούς έδειξε ότι είναι φυσιολογικοί και συνεπώς η p.A259T ήταν εκ νέου (*de novo*) παραλλαγή (Εικόνα 29). Στο ιστορικό αναφέρεται ότι οι γονείς της μητέρας της ασθενούς έχουν ΣΔ2. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι στην οικογένεια συνυπάρχουν δύο τύποι ΣΔ.



Εικόνα 28. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4) της ασθενούς M1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.A259T (c.775G>A, p.Ala259Thr).



Εικόνα 29. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς M1 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.A259T του γονιδίου *GCK*.

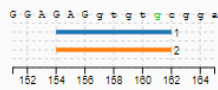
3.1.2 Παραλλαγή c.1019+5G>A του γονιδίου *GCK*

Ο ασθενής M2, ο οποίος διαγνώστηκε σε ηλικία 8.5 ετών με γλυκόζη νηστείας 115 mg/dl και HbA1c 6.8%, έφερε σε ετεροζυγωτία την παραλλαγή c.1019+5G>A, 5 νουκλεοτίδια μετά το σημείο ματίσματος δότη του εξονίου 8 του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4). Τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 15) έδειξαν ότι η παραλλαγή αυτή είναι παθολογική και πιθανόν οδηγεί σε αλλαγή της φυσιολογικής θέσης ματίσματος δότη, με πιθανό αποτέλεσμα την παραμονή του ιντρονίου 8.

Πίνακας 15. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής c.1019+5G>A του γονιδίου *GCK*.

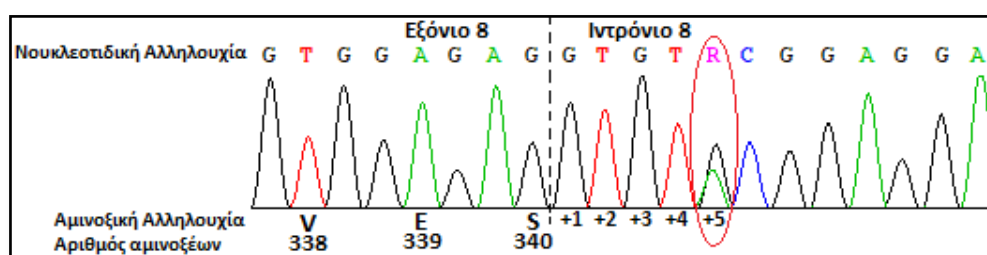
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	Mutation Taster	1	Παθολογική
Ματίσματος	Human Splicing Finder	-14.12	Αλλαγή της φυσιολογικής θέσης ματίσματος δότη, η οποία πιθανόν επηρεάζει το μάτισμα
ACMG			Αβέβαιης Σημασίας

Όπως φαίνεται και στο αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF (Εικόνα 30), η τιμή της φυσιολογικής αλληλουχίας ήταν $86.1 > 65$, με αποτέλεσμα την πιθανή αλλαγή του σημείου ματίσματος δότη μετά το εξόνιο 8 με τιμή $-14.12\% < -10\%$.

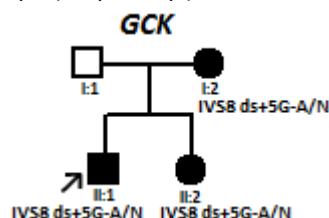
Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation					
Broken WT Donor Site	1 - HSF Matrices		Alteration of the WT donor site, most probably affecting splicing.					
	2 - MaxEnt							
▼ HSF Matrices								
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
254	154	Donor	GAGgtgtgc	GAGgtgtac	86.1	73.94	165	WT site broken <10.12

Εικόνα 30. Αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF της παραλλαγής c.1019+5G>A του γονιδίου *GCK*.

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 304x (G: 141x και A: 163x), και επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί (Εικόνα 31), στη μητέρα του ασθενούς, η οποία είχε ΣΔ κύησης, και στην αδελφή του (Εικόνα 32).



Εικόνα 31. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4) του ασθενούς M2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή c.1019+5G>A.

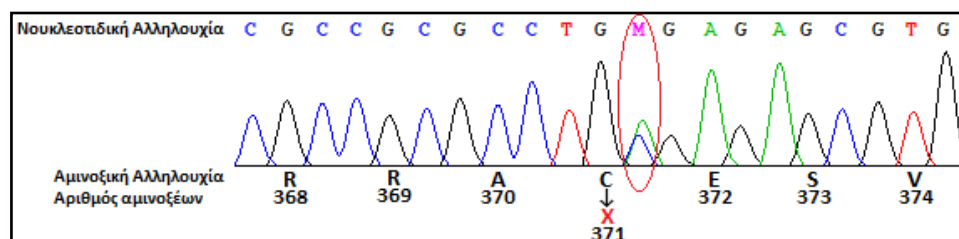


Εικόνα 32. Γενεαλογικό δέντρο του ασθενούς M2 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή c.1019+5G>A του γονιδίου *GCK*, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παθολογική παραλλαγή c.1019+5G>A του γονιδίου *GCK*.

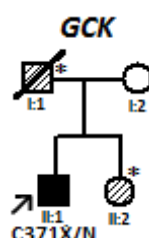
3.1.3 Παραλλαγή p.C371X του γονιδίου *GCK*

Ο ασθενής M3, ο οποίος σε ηλικία 33 ετών παρουσίασε γλυκόζη νηστείας 140 mg/dl και HbA1c 5.8%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη νέα μη νοσηματική παραλλαγή p.C371X (c.1113C>A) στο εξόνιο 9 του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4), η οποία οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας. Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 3^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε αδενίνη (TGC>TGA) του κωδικονίου Cys371.

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 76x (C: 31x και A: 45x) και επιβεβαιώθηκε στον ασθενή με αλληλούχηση κατά Sanger (Εικόνα 33). Τα δείγματα DNA των διαβητικών μελών της οικογένειάς του, του πατέρα του και της αδελφής του, δεν ήταν διαθέσιμα για γενετικό έλεγχο (Εικόνα 34).



Εικόνα 33. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4) του ασθενούς M3 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.C371X (c.1113C>A, p.Cys371Ter).

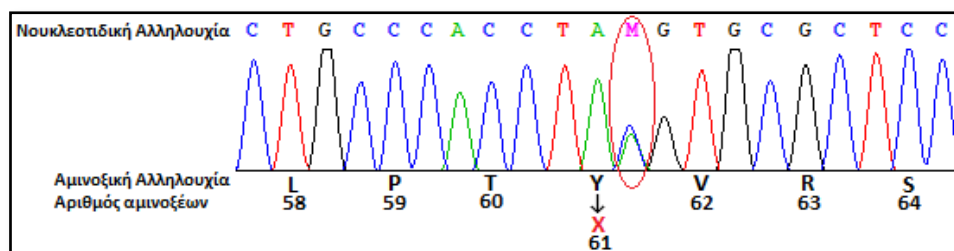


Εικόνα 34. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M3 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.C371X του γονιδίου *GCK*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα.

3.1.4 Παραλλαγή p.Y61X του γονιδίου *GCK* και p.L135V του γονιδίου *ABCC8*

Η ασθενής M4, η οποία σε ηλικία 9 ετών διαγνώστηκε με γλυκόζη νηστείας 128 mg/dl και HbA1c 6.2%, βρέθηκε να φέρει 2 παραλλαγές σε ετεροζυγωτία, μία στο γονίδιο *GCK* και μια στο γονίδιο *ABCC8*.

Η μη νοηματική παραλλαγή p.Y61X (c.183C>A) του εξονίου 2 του γονιδίου *GCK*, αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής από κυτοσίνη σε αδείνη (TAC>TAA) του 3^{ου} νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 61. Η παραλλαγή αυτή προκαλεί τον πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας. Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 331x (C: 159x και A:172x), ενώ επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στην ασθενή και στην διαβητική μητέρα της, η οποία την έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 35).



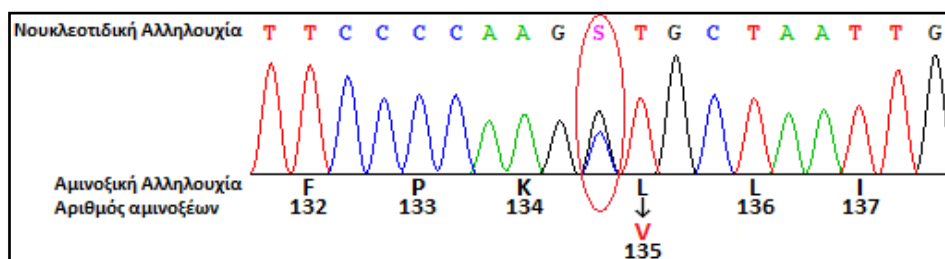
Εικόνα 35. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4) της ασθενούς M4 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.Y61X (c.183C>A, p.Tyr61Ter).

Η δεύτερη παραλλαγή που έφερε η ασθενής M4 είναι η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.L135V (c.403C>G, rs368450282) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή αυτή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 16). Η παραλλαγή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής από κυτοσίνη σε γουανίνη (CTG>GTG) στο 1^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου Leu135. Η Λευκίνη και η Βαλίνη είναι δύο υδρόφοβα αμινοξέα με υδροφοβικό χαρακτήρα 1.80 και 1.32, αντίστοιχα. Η αντικατάσταση αυτή πιθανόν να μην επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης αλλά την λειτουργικότητα της.

Πίνακας 16. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.L135V του γονιδίου *ABCC8*.

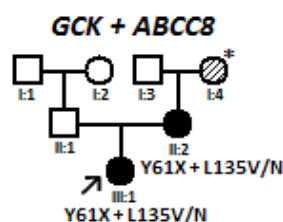
Προγράμματα Βιοπληροφορικής	Τιμή	Πρόβλεψη	
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.003	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	2.505	Πιθανόν Παθολογική
	FATHMM	-4.21	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.984	Παθολογική
	MetaSVM	0.898	Παθολογική
	MetaLR	0.919	Παθολογική
	Provean	-1.51	Καλοήθης
	UMD	100	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	26.3	Παθολογική
DANN	0.9985	Παθολογική	
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	32	Συντηρημένη
	GERP	5.78	Συντηρημένη

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 382x (C: 185x και G:197x), ενώ επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στην ασθενή και στην διαβητική μητέρα της, η οποία την έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) της ασθενούς M4 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.L135V (c.403C>G, p.Leu135Val).

Στο ιστορικό της ασθενούς αναφέρεται ότι η μητρική γιαγιά της είχε ΣΔ (Εικόνα 37), η οποία ρύθμιζε το σάκχαρο της με δίαιτα, όπως και η μητέρα της ασθενούς. Ωστόσο, το δείγμα της γιαγιάς δεν ήταν διαθέσιμο για γενετικό έλεγχο.



Εικόνα 37. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς M4 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρος τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει τις παραλλαγές p.Y61X του γονιδίου *GCK* και p.L135V του γονιδίου *ABCC8*.

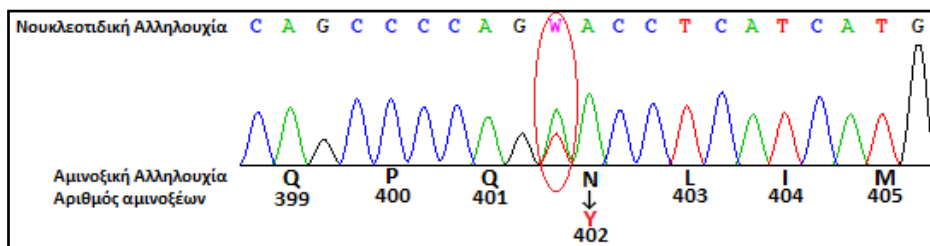
3.1.5 Παραλλαγή p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*

Η ασθενής M5, η οποία παρουσίασε σε ηλικία 13.5 ετών γλυκόζη νηστείας 240 mg/dl και HbA1c 11.5%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.N402Y (c.1204A>T) στο εξόνιο 6 του γονιδίου *HNF1A* (NM_000545.5). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 17). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από αδενίνη σε θυμίνη (ΔAC>TAC) του κωδικονίου Asn402. Η Ασπαραγίνη είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (YX: -1.50), ενώ η Τυροσίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (YX: 0.39). Το υδρόφιλο αμινοξύ στρέφεται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης και αντιδρά με μόρια νερού. Η αντικατάσταση του από ένα υδρόφοβο αμινοξύ μπορεί να επηρεάσει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, στρέφοντας το αμινοξύ της θέσης 402 προς το εσωτερικό της.

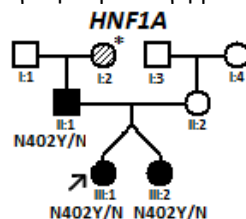
Πίνακας 17. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.001	Παθολογική
	PolyPhen2	0.999	Παθολογική
	Mutation Taster	0.9997	Παθολογική
	Mutation Assessor	2.265	Πιθανόν Παθολογική
	FATHMM	-4.58	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9909	Παθολογική
	MetaSVM	1.0789	Παθολογική
	MetaLR	0.9436	Παθολογική
	Provean	-3.45	Παθολογική
	UMD	93	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	26.1	Παθολογική
DANN	0.9863	Παθολογική	
Συντήρησης	Panther	842	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	143	Συντηρημένη
	GERP	4.8099	Συντηρημένη
ACMG		Πιθανόν Παθολογική	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 403x (Α: 194x και Τ:209x), ενώ επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στην ασθενή (Εικόνα 38), στον διαβητικό πατέρα της και στην δίδυμη αδελφή της, οι οποίοι την έφεραν επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 39).



Εικόνα 38. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF1A* (NM_000545.5) της ασθενούς M5 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.N402Y (c.1204A>T, p.Asn402Tyr).



Εικόνα 39. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς M5 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*.

3.1.6 Παραλλαγή p.R200Q του γονιδίου *HNF1A*

Η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R200Q (c.599G>A, rs893256143) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *HNF1A* (NM_000545.5) ανιχνεύθηκε σε δυο μη συγγενικούς ασθενείς (M6, M7). Η

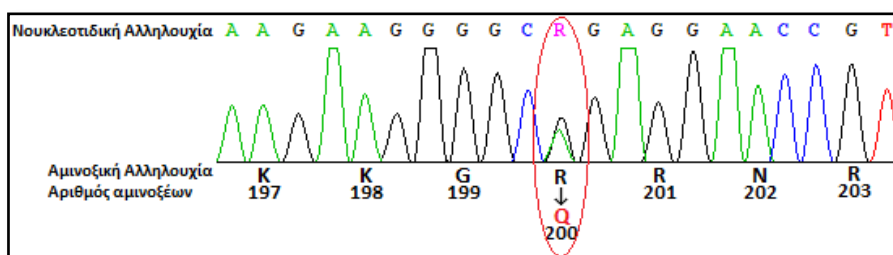
ασθενής M6 παρουσίασε σε ηλικία 12.5 ετών γλυκόζη νηστείας 163 mg/dl και HbA1c 7.4%, ενώ ο ασθενής M7 σε ηλικία 30 ετών παρουσίασε γλυκόζη νηστείας 230 mg/dl.

Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 18). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδερίνη (C_{GG}>C_{AG}) του κωδικονίου Arg200. Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -1.50), ενώ η Γλουταμίνη είναι ένα λιγότερο υδρόφιλο (ΥΧ: -0.93) αμινοξύ, το οποίο δεν φέρει φορτίο. Η υδροφιλικότητα κάνει τα αμινοξέα να στρέφονται προς το εξωτερικό μέρος της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, ενώ ανάλογα με το φορτίο που κάποια αμινοξέα φέρουν αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα της ίδιας πρωτεΐνης συμβάλλοντας επίσης στην διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι η παραλλαγή p.R200Q επηρεάζει την διαμόρφωση της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια τη λειτουργικότητά της.

Πίνακας 18. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R200Q του γονιδίου *HNF1A*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.001	Παθολογική
	PolyPhen2	0.977	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	3.1649	Πιθανόν Παθολογική
	FATHMM	-4.29	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9879	Παθολογική
	MetaSVM	1.0545	Παθολογική
	MetaLR	0.9205	Παθολογική
	Provean	-3.32	Παθολογική
	UMD	99	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	27.9	Παθολογική
Συντήρησης	DANN	0.9995	Παθολογική
	Panther	842	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	43	Συντηρημένη
	GERP	4.55	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

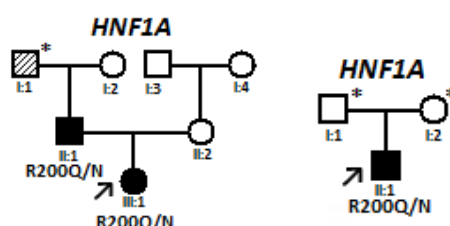
Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 742x (G: 378x και A: 364x) στην ασθενή M6 και 294x (G: 141x και A: 153x) στον ασθενή M7. Η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger και στους 2 ασθενείς (Εικόνα 40).



Εικόνα 40. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF1A* (NM_000545.5) των ασθενών M6 και M7, οι οποίοι φέρουν την παθολογική παραλλαγή p.R200Q (c.599G>A, p.Arg200Gln).

Αλληλούχηση κατά Sanger στον διαβητικό πατέρα της ασθενούς M6, έδειξε ότι φέρει επίσης σε ετεροζυγωτία την παραλλαγή p.R200Q του γονιδίου *HNF1A* (Εικόνα 41). Το δείγμα του διαβητικού πατρικού παππού της ασθενούς δεν ήταν διαθέσιμο για γενετικό έλεγχο.

Για τους γονείς του ασθενούς M7 δεν υπήρχε καμία πληροφορία σχετικά με το ιστορικό τους και τα δείγματα DNA τους δεν ήταν διαθέσιμα για γενετικό έλεγχο (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Γενεαλογικά δέντρα των οικογενειών της ασθενούς M6 (βέλος) στα αριστερά και του ασθενούς M7 (βέλος) στα δεξιά. N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.R200Q του γονιδίου *HNF1A*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.R200Q του γονιδίου *HNF1A*.

3.1.7 Παραλλαγή p.E285K του γονιδίου *HNF4A*

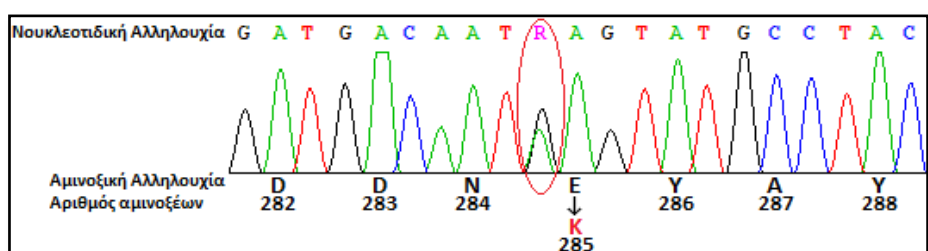
Ο ασθενής M8, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 12.5 ετών γλυκόζη νηστείας 143 mg/dl και HbA1c 8.3%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.E285K (c.853G>A) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.3). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 19). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδενίνη (GAG>AAG) του κωδικονίου Glu285. Το γλουταμινικό οξύ είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -1.95) αρνητικά φορτισμένο, ενώ η Λυσίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: -1.54), το οποίο δεν φέρει φορτίο. Η διαφορά των δύο αμινοξέων ως προς το φορτίο που φέρουν και κατά συνέπεια στις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμμετέχουν, πιθανόν να επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Πίνακας 19. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.E285K του γονιδίου *HNF4A*.

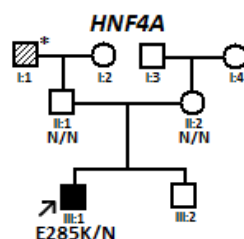
Προγράμματα Βιοπληροφορικής	Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0
	PolyPhen2	0.995
	Mutation Taster	0.999
	Mutation Assessor	3.845
	FATHMM	-5.75
	FATHMM-MKL	0.969
	MetaSVM	0.991
	MetaLR	0.988

	Provean	-3.84	Παθολογική
	UMD	75	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	33	Παθολογική
	DANN	0.999	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	1037	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	56	Συντηρημένη
	GERP	4.98	Συντηρημένη
ACMG			Πιθανόν Παθολογική

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 34x (G: 19x και A:15x). Επιβεβαίωση με αλληλούχηση κατά Sanger έδειξε ότι η παραλλαγή που φέρει ο ασθενής M8 είναι *de novo* (Εικόνα 42), αφού κανένας από τους υγιείς γονείς του δεν την φέρει (Εικόνα 43).



Εικόνα 42. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.3) του ασθενούς M8 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.E285K (c.853G>A, p.Glu285Lys).



Εικόνα 43. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M8 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρος τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.E285K του γονιδίου *HNF4A*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα.

3.1.8 Παραλλαγή p.R181Q του γονιδίου *HNF1B*

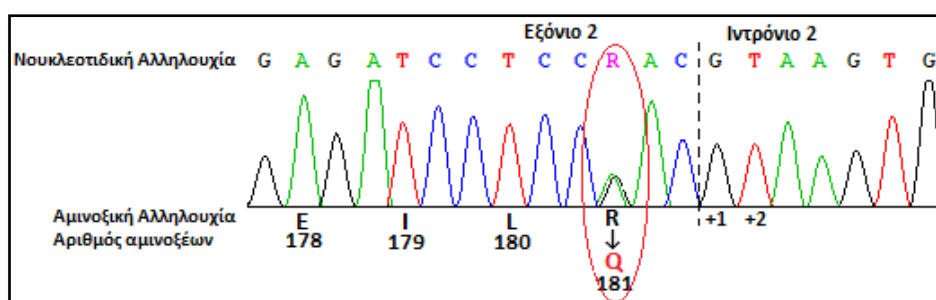
Ο ασθενής M9, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 8 ετών γλυκόζη νηστείας 170 mg/dl, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R181Q (c.542G>A, rs776195231) στο εξόνιο 2 του γονιδίου *HNF1B* (NM_000458.3). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 20). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδενίνη (CGA>CAA) του κωδικονίου Arg181. Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -1.50) και η Γλουταμίνη είναι ένα λιγότερο υδρόφιλο (ΥΧ: -0.93) αμινοξύ, το οποίο δεν φέρει φορτίο. Λόγω υδροφιλικότητας τα αμινοξέα στρέφονται προς

το εξωτερικό μέρος της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, αλλά το φορτίο που φέρουν διαφέρει με αποτέλεσμα να συμμετέχουν σε διαφορετικές αλληλεπιδράσεις συμβάλλοντας πιθανόν αρνητικά στην διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης.

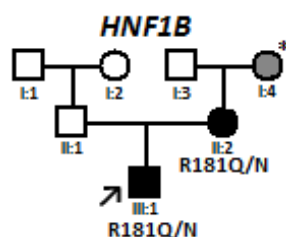
Πίνακας 20. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R181Q του γονιδίου *HNF1B*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.91	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.999	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	0.98	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.9049	Παθολογική
	MetaSVM	0.8031	Παθολογική
	MetaLR	0.9096	Παθολογική
	UMD	78	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	23.5	Παθολογική
	DANN	0.9989	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	43	Συντηρημένη
	GERP	5.96	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 317x (G: 175x και A:140x). Ενώ, η ετερόζυγη παραλλαγή p.R181Q επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή (Εικόνα 44) και στην μητέρα του, η οποία παρουσίασε υπεργλυκαιμία από τα 17 της έτη (Εικόνα 45). Ενώ το δείγμα της μητρικής γαλιγιάς του ασθενούς, η οποία είχε ΣΔ κύησης σε ηλικία 26 ετών, δεν ήταν διαθέσιμο για γενετικό έλεγχο.



Εικόνα 44. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF1B* (NM_000458.3) του ασθενούς M9 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R181Q (c.542G>A, p.Arg181Gln).



Εικόνα 45. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M9 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, μαύρο

τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.R181Q του γονιδίου *HNF1B*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, γκρι κύκλος: ΣΔ κύησης, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.R181Q του γονιδίου *HNF1B*.

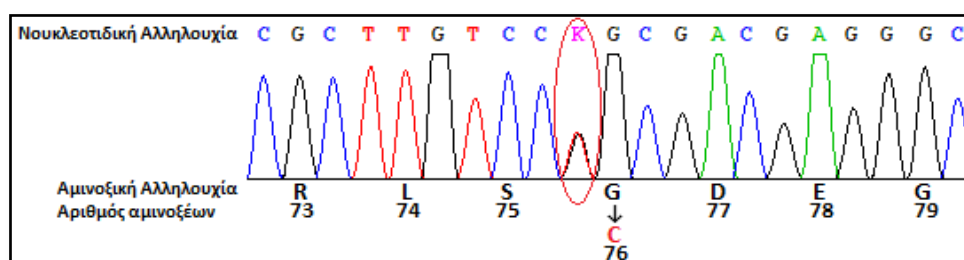
3.1.9 Παραλλαγή p.G76C του γονιδίου *HNF1B*

Ο ασθενής M10, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 30 ετών γλυκόζη νηστείας 308 mg/dl, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.G76C (c.226G>T, rs776195231) στο εξόνιο 1 του γονιδίου *HNF1B* (NM_000458.3). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 21). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε θυμίνη (GGC>TGC) του κωδικονίου Gly76. Η Γλυκίνη είναι ένα μη πολικό αμινοξύ (ΥΧ:0), το οποίο δεν φέρει φορτίο, ενώ η Κυστεΐνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (0.76), το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών με άλλες κυστεΐνες. Η διαφορά των δυο αμινοξέων ως προς την υδροφοβικότητα και το φορτίο, πιθανόν επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια την λειτουργικότητα της.

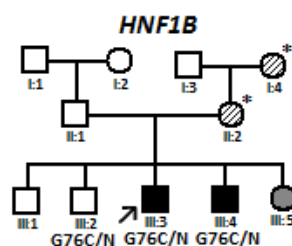
Πίνακας 21. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.G76C του γονιδίου *HNF1B*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	2.5699	Πιθανόν Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9926	Παθολογική
	MetaSVM	1.1	Παθολογική
	MetaLR	0.956	Παθολογική
	UMD	96	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	34	Παθολογική
	DANN	0.9976	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	159	Συντηρημένη
	GERP	5.13	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 713x (G: 380x και T: 333x). Ενώ, η ετερόζυγη παραλλαγή p.G76C επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή (Εικόνα 46) και σε δύο από τα αδέλφια του. Σύμφωνα με το ιστορικό τους, ο ένας αδελφός ήταν διαβητικός, ενώ ο άλλος ήταν υγιής. Τα δείγματα της μητέρας τους, η οποία είχε ΣΔ από τα 30 έτη, της μητρικής γιαγιάς καθώς και της αδελφής τους, η οποία παρουσίασε ΣΔ κύησης, δεν ήταν διαθέσιμα για γενετικό έλεγχο (Εικόνα 47).



Εικόνα 46. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF1B* (NM_000458.3) του ασθενούς M10 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.G76C (c.226G>T, p.Gly76Cys).



Εικόνα 47. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M10 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.G76C του γονιδίου *HNF1B*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, γκρι κύκλος: ΣΔ κύησης.

3.1.10 Παραλλαγή p.A355T του γονιδίου *ABCC8*

Η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.A355T (c.1063G>A, rs145136257) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) ανιχνεύθηκε σε δυο μη συγγενικούς ασθενείς (M11, M12). Ο ασθενής M11 διαγνώστηκε με ΣΔ σε ηλικία 42 ετών με γλυκόζη νηστείας 170 mg/dl, ενώ η ασθενής M12 σε ηλικία 24 ετών παρουσίασε γλυκόζη νηστείας 210 mg/dl και HbA1c 6.9%.

Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 22). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδερίνη (GCC>ACC) του κωδικονίου Ala355. Η Αλανίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: 0.35), ενώ η Θρεονίνη είναι ένα υδρόφιλο (-0.27) αμινοξύ. Η διαφορά αυτή στην υδροφιλικότητα κάνει το αμινοξύ της θέσης 355 από το εσωτερικό μέρος της δομής της πρωτεΐνης να στρέφονται προς το εξωτερικό επηρεάζοντας την διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της.

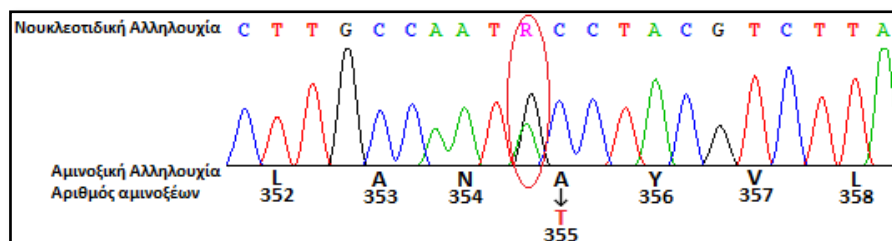
Πίνακας 22. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.A355T του γονιδίου *ABCC8*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.1	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.314	Καλοήθης
	Mutation Taster	0.999	Παθολογική
	Mutation Assessor	0.72	Καλοήθης
	FATHMM	-3.45	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9589	Παθολογική
	MetaSVM	0.3429	Παθολογική
	MetaLR	0.6963	Παθολογική
	Provean	-1.23	Καλοήθης
	UMD	87	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	22.9	Παθολογική
DANN	0.9972	Παθολογική	
Συντήρησης	Panther	455	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	58	Συντηρημένη
	GERP	5.7899	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

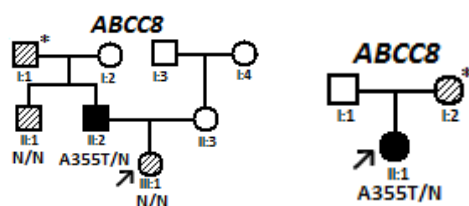
Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 442x (G: 227x και A: 215x) στον ασθενή M11 και 289x (G: 150x και A: 139x) στην ασθενή M12. Η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger και στους 2 ασθενείς (Εικόνα 48).

Η διαβητική κόρη του M11 εξετάστηκε για παραλλαγές στα 7 γονίδια που συνδέονται με το ΜΣΔ MODY με την μεθοδολογία του NGS, καθώς και με αλληλούχηση κατά Sanger στο εξόνιο 7 του γονιδίου *ABCC8*, αλλά καμία παθολογική παραλλαγή δεν ανιχνεύθηκε. Επιπλέον, το δείγμα του αδελφού του ελέγχθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο εξόνιο 7 του γονιδίου *ABCC8*, αλλά δεν ανιχνεύθηκε παθολογική παραλλαγή. Στην οικογένεια αυτή πιθανόν συνυπάρχουν τουλάχιστον 2 διαφορετικοί τύποι ΣΔ (Εικόνα 49).

Το δείγμα της διαβητικής μητέρας της ασθενούς M12 δεν ήταν διαθέσιμο για γενετικό έλεγχο (Εικόνα 49).



Εικόνα 48. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) των ασθενών M11 και M12, οι οποίοι φέρουν την παθολογική παραλλαγή p.A355T (c.1063G>A, p.Ala355Thr).



Εικόνα 49. Γενεαλογικά δέντρα των οικογενειών των ασθενών M11 (πατέρας ασθενούς με βέλος) στα αριστερά και M12 (βέλος) στα δεξιά. N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.A355T του γονιδίου *ABCC8*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.A355T του γονιδίου *ABCC8*.

3.1.11 Παραλλαγή p.M1514T του γονιδίου *ABCC8*

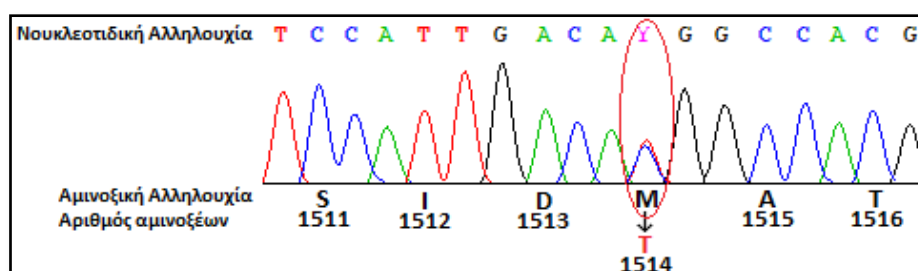
Η ασθενής M13, η οποία παρουσίασε σε ηλικία 11.5 ετών γλυκόζη νηστείας 103 mg/dl και HbA1c 6.8%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.M1514T (c.4541T>C) στο εξόνιο 37 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 23). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από θυμίνη σε κυτοσίνη (ATG>ACG) του κωδικονίου Met1514. Η Μεθειονίνη είναι ένα υδρόφοβο (ΥΧ: 1.10) αμινοξύ, το οποίο περιέχει θεική ομάδα στην πλευρική του αλυσίδα, ενώ η Θρεονίνη είναι ένα ελάχιστα υδρόφιλο (-0.27) αμινοξύ. Το υδρόφιλο αμινοξύ στρέφεται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης και αντιδρά με μόρια νερού, επηρεάζοντας την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Πίνακας 23. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.M1514T του γονιδίου *ABCC8*.

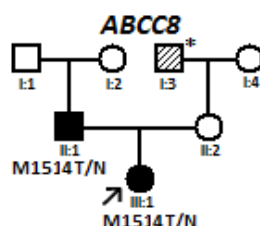
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.002	Παθολογική
	PolyPhen2	0.002	Καλοήθης
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	-1.2549	Καλοήθης
	FATHMM	-1.04	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.9826	Παθολογική
	MetaSVM	-0.7789	Καλοήθης
	MetaLR	0.1956-	Καλοήθης
	Provean	4.29	Παθολογική
	UMD	90	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	23.5	Παθολογική
	DANN	0.9822	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	81	Συντηρημένη

	GERP	4.94	Συντηρημένη
ACMG			Πιθανόν Παθολογική

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 113x (T: 50x και C: 63x). Ενώ με αλληλούχηση κατά Sanger η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε σε ετεροζυγωτία στην ασθενή (Εικόνα 50) και στον πατέρα της, ο οποίος είχε ΣΔ από 41 ετών και έκανε θεραπεία με μετφορμίνη (Εικόνα 51).



Εικόνα 50. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) της ασθενούς M13 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.M1514T (c.4541T>C, p.Met1514Thr).



Εικόνα 51. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας της ασθενούς M13 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.M1514T του γονιδίου *ABCC8*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.M1514T του γονιδίου *ABCC8*.

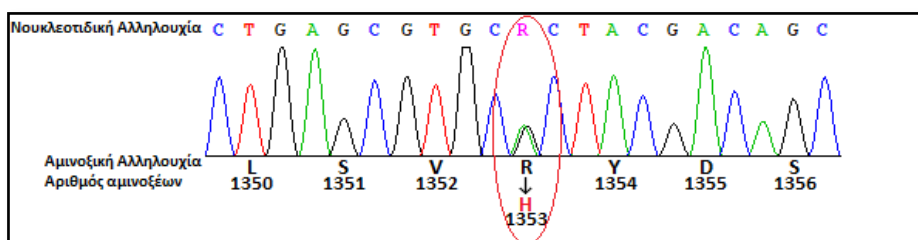
3.1.12 Παραλλαγή p.R1353H του γονιδίου *ABCC8*

Ο ασθενής M14, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 17.9 ετών γλυκόζη νηστείας 253 mg/dl και HbA1c 9.9%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R1353H (c.4058G>A) στο εξόνιο 33 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 24). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδερίνη (CGC>CAC) του κωδικονίου Arg1353. Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο (YX: -1.50) αμινοξύ, ενώ η Ιστιδίνη είναι ένα λιγότερο υδρόφιλο (-0.65), το οποίο μπορεί να είναι θετικά φορτισμένο ή να μην φέρει φορτίο. Βιοχημικά, τα δύο αμινοξέα δεν διαφέρουν αρκετά και πιθανόν η αντικατάσταση αυτή να μην επηρεάζει την δομή αλλά την λειτουργία της πρωτεΐνης.

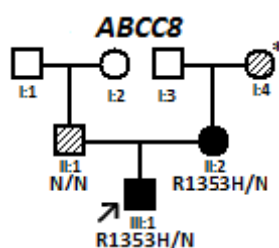
Πίνακας 24. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R1353H του γονιδίου *ABCC8*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής	Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.001
	PolyPhen2	1
	Mutation Taster	1
	Mutation Assessor	2.425
	FATHMM	-2.73
	FATHMM-MKL	0.981
	MetaSVM	0.840
	MetaLR	0.829
	Provean	-4.53
	UMD	78
	LRT	0
	CADD	35
	DANN	1
Συντήρησης	Panther	842
	Grantham	29
	GERP	4.8299
ACMG		Πιθανόν Παθολογική

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 235x (G: 116x και A: 119x). Μετά από αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί και στους δύο διαβητικούς γονείς του, η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε σε ετεροζυγωτία στον ασθενή (Εικόνα 52) και στην μητέρα του, η οποία παρουσίασε ΣΔ κύησης στην επόμενη κύηση (Εικόνα 53). Πιθανόν, δυο τύποι ΣΔ να συνυπάρχουν σε αυτή την οικογένεια.



Εικόνα 52. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) του ασθενούς M14 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R1353H (c.4058G>A, p.Arg1353His).



Εικόνα 53. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M14 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.R1353H του γονιδίου *ABCC8*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.R1353H του γονιδίου *ABCC8*.

3.1.13 Παραλλαγή p.E1206K του γονιδίου *ABCC8*

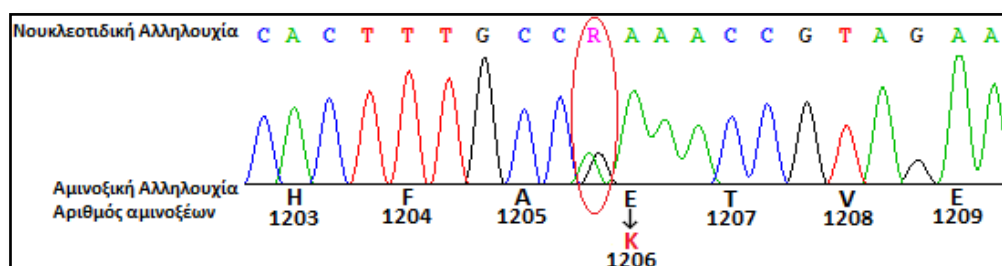
Ο ασθενής M15, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 24 ετών γλυκόζη νηστείας 365 mg/dl και HbA1c 11.9%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.E1206K (c.3616G>A) στο εξόνιο 29 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 25). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδενίνη (GAA>AAA) του κωδικονίου Glu1206. Το Γλουταμινικό οξύ είναι ένα υδρόφιλο (-1.95) αμινοξύ αρνητικά φορτισμένο, ενώ η Λυσίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: -1.54), το οποίο δεν φέρει φορτίο. Συνεπώς, η αντικατάσταση αυτή κάνει το αμινοξύ της θέσης 1206 να στρέφεται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης επηρεάζοντας την τριτοταγή δομή της.

Πίνακας 25. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.E1206K του γονιδίου *ABCC8*.

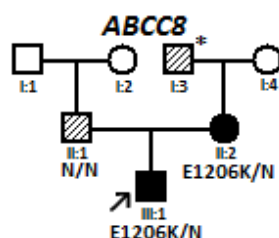
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	3.6849	Παθολογική
	FATHMM	-3.78	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9845	Παθολογική
	MetaSVM	0.409	Παθολογική
	MetaLR	0.6129	Παθολογική
	Provean	-3.6	Παθολογική
	UMD	75	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	32	Παθολογική
	DANN	0.9992	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	842	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	56	Συντηρημένη
	GERP	5.4899	Συντηρημένη
ACMG			Πιθανόν Παθολογική

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 178x (G: 93x και A: 85x). Μετά από αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί και στους δυο γονείς του, η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε σε ετεροζυγωτία στον ασθενή (Εικόνα 54) και στην μητέρα του,

η οποία παρουσίαζε διαταραγμένη καμπύλη γλυκόζης (Εικόνα 55). Ο μητρικός παππούς ήταν επίσης διαβητικός και έκανε ινσουλίνη από τα 45 του έτη. Το δείγμα του δεν ήταν διαθέσιμο για γενετικό έλεγχο. Ο πατέρας του ασθενούς ήταν διαβητικός αλλά δεν έφερε την παραλλαγή p.E1206K του γονιδίου *ABCC8*. Συνεπώς, δύο διαφορετικοί τύποι ΣΔ πιθανόν να συνυπάρχουν στην οικογένεια αυτή.



Εικόνα 54. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) του ασθενούς M15 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.E1206K (c.3616G>A, p.Glu1206Lys).



Εικόνα 55. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M15 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.E1206K του γονιδίου *ABCC8*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την παραλλαγή p.E1206K του γονιδίου *ABCC8*.

3.1.14 Παραλλαγή p.S1386P του γονιδίου *ABCC8*

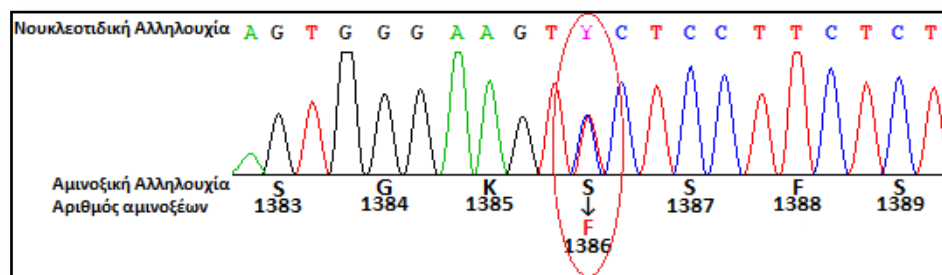
Ο ασθενής M16, ο οποίος παρουσίασε σε ηλικία 33 ετών γλυκόζη νηστείας 320 mg/dl και HbA1c 10.6%, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία τη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.S1386P (c.4154C>T) στο εξόνιο 34 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 26). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε θυμίνη (TCC>TTC) του κωδικονίου Ser1386. Η Σερίνη είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -0.63), ενώ η Προλίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: 0.84). Η αντικατάσταση αυτή πιθανόν προκαλεί την αλλαγή θέσης του κωδικονίου 1386 από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης επηρεάζοντας την τριτοταγή δομή της.

Πίνακας 26. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.S1386P του γονιδίου *ABCC8*.

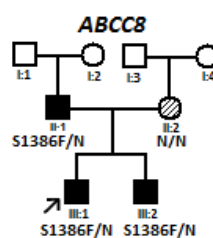
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	4.815	Παθολογική
	FATHMM	-4.59	Παθολογική

	FATHMM-MKL	0.9905	Παθολογική
	MetaSVM	1.0825	Παθολογική
	MetaLR	0.9722	Παθολογική
	Provean	-5.45	Παθολογική
	UMD	93	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	32	Παθολογική
	DANN	0.9984	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	842	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	155	Συντηρημένη
	GERP	5.0599	Συντηρημένη
ACMG		Πιθανόν Παθολογική	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή διαβάστηκε συνολικά 205x (C: 105x και T: 100x). Ενώ με αλληλούχηση κατά Sanger η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε σε ετεροζυγωτία στον ασθενή (Εικόνα 56) και στον διαβητικό πατέρα του και αδελφό του (Εικόνα 57). Ο αδελφός του διαγνώστηκε με γλυκόζη νηστείας 170 mg/dl και HbA1c 7.9%. Η διαβητική μητέρα του ασθενούς μετά από αλληλούχηση κατά Sanger βρέθηκε πως δεν φέρει την παραλλαγή p.S1386P του γονιδίου *ABCC8*. Συμπεραίνεται ότι δύο διαφορετικοί τύποι ΣΔ συνυπάρχουν στην οικογένεια αυτή.



Εικόνα 56. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1) του ασθενούς M16 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.S1386F (c.4154C>T, p.Ser1386Phe).

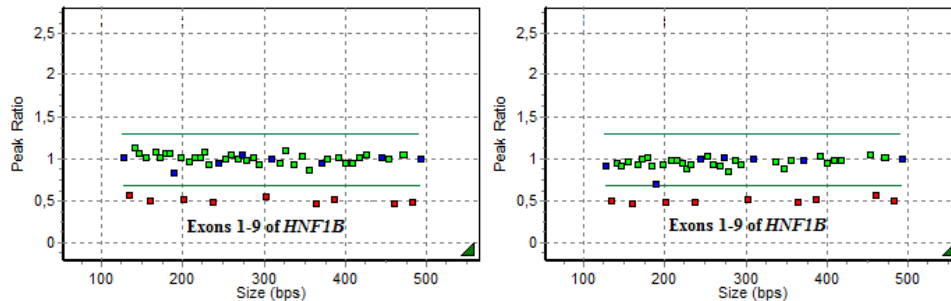


Εικόνα 57. Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας του ασθενούς M16 (βέλος). N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρος τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την παραλλαγή p.S1386F του γονιδίου *ABCC8*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα.

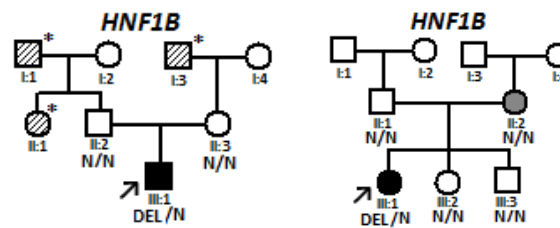
3.1.15 Απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*

Απάλειψη (p.Met1_Trp557del) ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B* (NM_000458.3) βρέθηκε να φέρουν δύο μη συγγενικοί ασθενείς (Εικόνα 58). Ο ασθενής M17, ο οποίος

παρουσίασε σε ηλικία 12 ετών γλυκόζη νηστείας 113mg/dl και HbA1c 5.8%, αλλά και η ασθενής M18, η οποία παρουσίασε σε ηλικία 12.3 ετών γλυκόζη νηστείας 180mg/dl και HbA1c 6.3%. Μετά από έλεγχο και των δύο γονιών τους με την μέθοδο του MLPA, διαπιστώθηκε ότι η απάλειψη αυτή ήταν *de novo* (Εικόνα 59).



Εικόνα 58. Απάλειψη των εξονίων-στόχων του γονιδίου *HNF1B* των ασθενών M17 και M18.



Εικόνα 59. Γενεαλογικά δέντρα των οικογενειών των ασθενών M17 (βέλος) στα αριστερά και M18 (βέλος) στα δεξιά. N: φυσιολογικό αλληλόμορφο, *: μη διαθέσιμο DNA για έλεγχο, άσπρο τετράγωνο: μη διαβητικός άντρας, ριγέ τετράγωνο: διαβητικός άντρας, μαύρο τετράγωνο: διαβητικός άντρας που φέρει την απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*, άσπρος κύκλος: μη διαβητική γυναίκα, ριγέ κύκλος: διαβητική γυναίκα, γκρι κύκλος: ΣΔ κύησης, μαύρος κύκλος: διαβητική γυναίκα που φέρει την απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*.

Πίνακας 27. Κλινικά χαρακτηριστικά των 18 ασθενών με MODY, οι οποίοι έφεραν παθολογικές ή αβέβαιης σημασίας παραλλαγές και απαλείψεις.

Γονίδιο	Νουκλεοτιδική Αλλαγή	Πρωτεϊνική Αλλαγή	Προηγούμενως δημοσιευμένες	Φύλο	Κληρονομητικότητα	Ηλικία έναρξης ΣΔ (έτη)	Στην διάγνωση		Βάρος Γέννησης g (εβδομάδα κύησης)	Νεογνική Υπογλυκαιμία	BMI kg/m ² (z-score)
							Γλυκόζη νηστείας mg/dl (mmol/l)	% HbA1c (mmol/mol)			
GCK	c.183C>A	p.Tyr61X	[187]	θήλυ	Μητρική	9	128 (7.1)	6.2 (44.3)	Μ.Δ. (Μ.Δ.)	Μ.Δ.	17.2 (-0.47)
	c.775G>A	p.Ala259Thr	[188]	θήλυ	Εκ νέου	11.4	127 (7)	6.4 (46.4)	2630 (36 ⁺²)	ΟΧΙ	15.6 (-1.26)
	c.1113C>A	p.Cys371X	NEA	Άρρεν	Άγνωστη	33	140 (7.8)	5.8 (39.9)	Μ.Δ. (40)	Μ.Δ.	Μ.Δ.
	c.1019+5 G>A	-	[189]	Άρρεν	Μητρική	8.5	115 (6.4)	6.8 (50.8)	3400 (39)	ΟΧΙ	15.1 (-0.95)
HNF1A	c.1204A>T	p.Asn402Tyr	NEA	θήλυ	Πατρική	13.5	240 (13.3)	11.5 (102.2)	1750 (33) δίδυμη κύηση	ΟΧΙ	21 (-0.02)
	c.599G>A	p.Arg200Gln	[190]	θήλυ	Πατρική	12.5	163 (9)	7.4 (57)	2800 (40)	ΟΧΙ	22.8 (0.55)
	c.599G>A	p.Arg200Gln		Άρρεν	Άγνωστη	30	230 (12.8)	Μ.Δ.	3200 (Μ.Δ.)	Μ.Δ.	Μ.Δ.
HNF4A	c.853G>A	p.Glu285Lys	NEA	Άρρεν	Εκ νέου	12.5	143 (7.9)	8.3 (67.2)	4650 (39)	ΟΧΙ	26.8 (1.65)
HNF1B	c.226G>T	p.Gly76Cys	[191]	Άρρεν	Άγνωστη	30	308 (17.1)	Μ.Δ.	3750 (Μ.Δ.)	Μ.Δ.	33.8
	c.542G>A	p.Arg181Gln	[192]	Άρρεν	Μητρική	8	170 (9.4)	Μ.Δ.	2930 (Μ.Δ.)	Μ.Δ.	Μ.Δ.
	-	p.Met1_Trp557del	[193]	Άρρεν	Εκ νέου	12	113 (6.3)	5.8 (39.9)	3240 (40)	Μ.Δ.	16.1 (-1.12)
	-	p.Met1_Trp557del		θήλυ	Εκ νέου	12.3	180 (10)	6.3 (45.4)	Μ.Δ. (Μ.Δ.)	ΟΧΙ	17.3 (-0.97)
ABCC8	c.1063G>A	p.Ala355Thr	[62]	θήλυ	Άγνωστη	24	210 (11.7)	6.9 (51.9)	2800 (40)	Μ.Δ.	26
	c.1063G>A	p.Ala355Thr		Άρρεν	Άγνωστη	42	170 (9.4)	Μ.Δ.	Μ.Δ. (Μ.Δ.)	Μ.Δ.	Μ.Δ.
	c.3616G>A	p.Glu1206Lys	-	Άρρεν	Μητρική	24	365 (20.3)	11.9 (107)	4100 (Μ.Δ.)	ΟΧΙ	24
	c.4058G>A	p.Arg1353His	[194]	Άρρεν	Μητρική	17.9	253 (14)	9.9 (84.7)	3600 (38)	ΟΧΙ	23.5 (-0.09)
	c.4154C>T	p.Ser1386Phe	NEA	Άρρεν	Πατρική	33	320 (17.8)	10.6 (92)	3050 (40)	ΟΧΙ	27.7
	c.4541T>C	p.Met1514Thr	NEA	Θήλυ	Πατρική	11.5	103 (5.7)	6.8 (50.8)	3810 (40)	Μ.Δ.	Μ.Δ.

Μ.Δ.: Μη διαθέσιμο, Z-score υπολογίστηκε με βάση τις καμπύλες ανάπτυξης των παιδιών και εφήβων του Ελληνικού πληθυσμού, οι αριθμοί της στήλης «Προηγούμενως δημοσιευμένες» αναφέρονται στην αντίστοιχη βιβλιογραφία.

3.2 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΗ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟ

Από τους 17 ασθενείς που διερευνήθηκαν για παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SCL16A1* και *TRMT10A* με την μεθοδολογία της στοχευμένης αλληλούχησης επόμενης γενιάς, 6 έφεραν παθολογικές ή αβέβαιης σημασίας παραλλαγές στα γονίδια *ABCC8*, *GCK*, *HNF4A*, *INSR* και *KCNJ11*. Οι ασθενείς που δεν βρέθηκε να φέρουν παθολογική παραλλαγή στα παραπάνω γονίδια, ελέγχθηκαν για την παρουσία απαλείψεων και διπλασιασμών των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, και *ABCC8* με το MLPA καθώς και για την παρουσία των ιντρονικών παθολογικών παραλλαγών c.1333-1013A>G του γονιδίου *ABCC8* και c.636+471G>T του γονιδίου *HADH* με αλληλούχηση κατά Sanger. Κανένας από τους ασθενείς αυτούς δεν βρέθηκε να φέρει απαλείψεις ή διπλασιασμούς των παραπάνω γονιδίων, αλλά ούτε τις ιντρονικές παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* και *HADH*.

3.2.1 Παραλλαγή p.G716D του γονιδίου *ABCC8*

Η ασθενής ΣΥ1, η οποία σε ηλικία 48 ημερών παρουσίασε υπογλυκαιμία με γλυκόζη 46 mg/dl, έφερε σε ετεροζυγωτία την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.G716D (c.2147G>A, rs72559723) στο εξόνιο 16 του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η παραλλαγή αυτή, η οποία αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδενίνη (GGC>GAC) του κωδικονίου Gly716, είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 28). Η Γλυκίνη είναι ένα μη πολικό αμινοξύ (ΥΧ:0), το οποίο δεν φέρει φορτίο, ενώ η ασπαραγίνη είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ:-0.99). Η διαφορά στην πολικότητα των δυο αυτών αμινοξέων πιθανόν επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, αφού η ασπαραγίνη έχει την τάση να στρέφεται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης και να αντιδρά με μόρια νερού.

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.G716D του γονιδίου *ABCC8* είχε διαβαστεί συνολικά 271x (G: 132x και A: 139x).

Πίνακας 28. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Gly716Asp του γονιδίου *ABCC8*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.064	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.999	Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	4.3449	Παθολογική
	FATHMM	-5.52	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9764	Παθολογική
	MetaSVM	0.9667	Παθολογική
	MetaLR	0.9887	Παθολογική
	Provean	-6.08	Παθολογική
	UMD	100	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	33	Παθολογική
	DANN	0.998	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	910	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	94	Συντηρημένη
	GERP	5.2699	Συντηρημένη
ACMG		Πιθανόν Παθολογική	

3.2.2 Παραλλαγές p.R526C και p. I445Sfs*5 του γονιδίου *ABCC8*

Ο ασθενής ΣΥ2, ο οποίος στον πρώτο μήνα ζωής παρουσίασε υπογλυκαιμία με γλυκόζη 36 mg/dl και υπερινσουλιναμία με τιμή ινσουλίνης 18.9 μU/ml, ήταν σύνθετος ετεροζυγώτης του γονιδίου *ABCC8* (NM_001287174.1). Η πρώτη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή στο εξόνιο 10 του γονιδίου είναι η p.R526C (c.1576C>T, rs751279984), η οποία αφορά την μεταπτωτική αντικατάσταση του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε θυμίνη (C>T) του κωδικονίου Arg526. Η παραλλαγή αυτή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 29). Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -1.50), ενώ η Κυστεΐνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (0.76), το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών με άλλες κυστεΐνες. Η διαφορά των αμινοξέων αυτών ως προς την υδροφοβικότητα αλλά και των δεσμών που το καθένα μπορεί να κάνει πιθανόν να επηρεάζει την τριτοταγή δομή και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Η δεύτερη παραλλαγή είναι μια νέα απάλειψη 8 βάσεων στην θέση ματίσματος του εξονίου 8 του γονιδίου *ABCC8*, η p.I445Sfs*5 (c.1332_1332+8deletionGGTACTAGA), η οποία μετατοπίζει το πλαίσιο ανάγνωσης οδηγώντας στον πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης 5 αμινοξέα μετά την απάλειψη.

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.R526C του γονιδίου *ABCC8* είχε διαβαστεί συνολικά 929x (C: 501x και T: 428x) και η παραλλαγή p. I445Sfs*5 του γονιδίου *ABCC8* είχε διαβαστεί 1070x (απάλειψη: 551x και φυσιολογική αλληλουχία: 519x).

Πίνακας 29. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Arg526Cys του γονιδίου *ABCC8*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	4.1449	Παθολογική
	FATHMM	-2.63	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9672	Παθολογική
	MetaSVM	1.0145	Παθολογική
	MetaLR	0.9004	Παθολογική
	Provean	-6.8	Παθολογική
	UMD	99	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	34	Παθολογική
	DANN	0.9994	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	910	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	180	Συντηρημένη
	GERP	6.0199	Συντηρημένη
ACMG			Πιθανόν Παθολογική

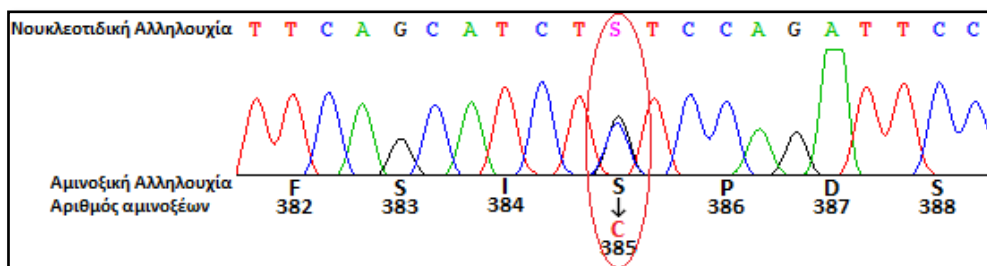
3.2.3 Παραλλαγή p.S385C του γονιδίου *KCNJ11*

Ο ασθενής ΣΥ3, ο οποίος σε ηλικία 3.5 ετών παρουσίασε υπογλυκαιμία με τιμή γλυκόζης 39 mg/dl και τιμή ινσουλίνης 2.42 μ U/ml, ήταν ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.S385C (c.1154C>G, rs41282930) του γονιδίου *KCNJ11* (NM_000525.2). Τα αποτελέσματα των προγραμμάτων βιοπληροφορικής για την παραλλαγή φαίνονται στον πίνακα 30. Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε γουανίνη (TCT>TGT) του κωδικονίου Ser385. Η Σερίνη είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -0.63), ενώ η Κυστεΐνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (0.76), το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών με άλλες κυστεΐνες. Η διαφορά των αμινοξέων αυτών ως προς την υδροφοβικότητα αλλά και των δεσμών που το καθένα μπορεί να κάνει πιθανόν να επηρεάζει την τριτοταγή δομή και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Πίνακας 30. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου *KCNJ11*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.002	Παθολογική
	PolyPhen2	0.38	Καλοήθης
	Mutation Taster	0.6147	Παθολογική
	Mutation Assessor	1.1	Καλοήθης
	FATHMM	-2.37	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.4604	Καλοήθης
	MetaSVM	0.1826	Παθολογική
	MetaLR	0.4173	Καλοήθης
	Provean	-1.7	Καλοήθης
	UMD	57	Πιθανόν Πολυμορφισμός
	LRT	0.6077	Καλοήθης
	CADD	21.6	Παθολογική
Συντήρησης	DANN	0.9781	Παθολογική
	Panther	220	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	112	Συντηρημένη
	GERP	5.17	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.S385C του γονιδίου *GCK* είχε διαβαστεί συνολικά 791x (C: 411x και G: 380x). Ενώ, επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή και στην υγιή μητέρα του, η οποία ήταν επίσης ετεροζυγώτης (Εικόνα 60).



Εικόνα 60. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *KCNJ11* (NM_000525.2) του ασθενούς ΣΥ3 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.S385C (c.1154C>G, p.Ser385Cys).

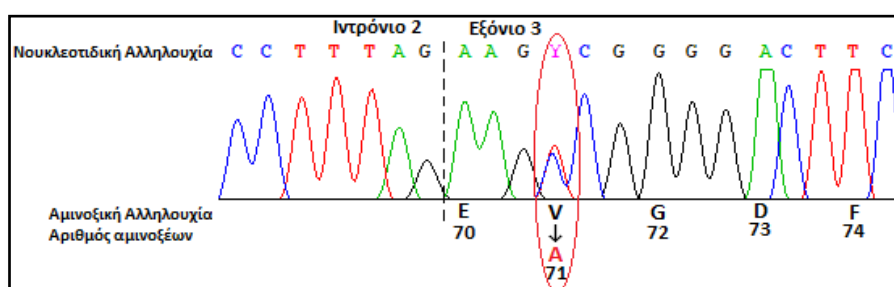
3.2.4 Παραλλαγή p.V71A του γονιδίου *GCK*

Ο ασθενής ΣΥ4, ο οποίος σε ηλικία 3.5 ετών παρουσίασε υπογλυκαιμία με τιμή γλυκόζης 40 mg/dl και υπερινσουλιναμία με τιμή ινσουλίνης 24.6 μU/ml, ήταν ετεροζυγώτης για την νέα παραλλαγή p.V71A (c.212T>C) του εξονίου 3 του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4). Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από θυμίνη σε κυτοσίνη (GTC>GCC) του κωδικονίου Val71. Η παραλλαγή p.V71A είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 31). Η Βαλίνη και η Αλανίνη είναι δύο υδρόφοβα αμινοξέα με υδροφοβικό χαρακτήρα 1.32 και 0.35, αντίστοιχα. Η αντικατάσταση αυτή πιθανόν να μην επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης αλλά την λειτουργικότητά της.

Πίνακας 31. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Val71Ala του γονιδίου *GCK*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.143	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.995	Παθολογική
	Mutation Taster	0.999	Παθολογική
	Mutation Assessor	0.935	Καλοήθης
	FATHMM	-4.72	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.912	Παθολογική
	MetaSVM	0.976	Παθολογική
	MetaLR	0.925	Παθολογική
	Provean	0.64	Καλοήθης
	UMD	63	Πιθανόν Πολυμορφισμός
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	23.5	Παθολογική
	DANN	0.997	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	64	Συντηρημένη
	GERP	4.67	Συντηρημένη
ACMG			Πιθανόν Παθολογική

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.V71A του γονιδίου *GCK* είχε διαβαστεί συνολικά 2069x (T: 1049x και C: 1020x). Ενώ, επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στην μητέρα του, η οποία ήταν ετεροζυγώτης και είχε παρουσιάσει επίσης υπερινσουλινισμό (Εικόνα 61).



Εικόνα 61. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GCK* (NM_000162.4) του ασθενούς ΣΥ4 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.V71A (c.212T>C, p.Val71Ala).

3.2.5 Παραλλαγή p.R333P του γονιδίου *HNF4A*

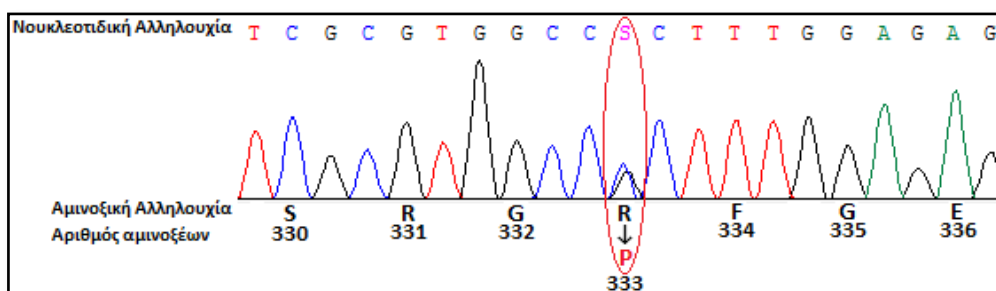
Ο ασθενής ΣΥ5, τις πρώτες ώρες ζωής παρουσίασε υπογλυκαιμία με τιμή γλυκόζης 23 mg/dl και υπερινσουλιαιμία με τιμή ινσουλίνης 10.6 μU/ml, ήταν ετεροζυγώτης για την νέα παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R333P (c.998G>C) στο εξόνιο 8 του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.4), η οποία αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε κυτοσίνη (CGC>CCC) του κωδικονίου Arg333. Η παραλλαγή αυτή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 32). Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -1.50), ενώ η Προλίνη είναι ένα υδρόφοβο (ΥΧ: 0.84) αμινοξύ. Με βάση τον υδροφοβικό χαρακτήρα των δύο αμινοξέων, η παραλλαγή

αυτή πιθανόν κάνει το αμινοξύ της θέσης 333 της αμινοξικής αλληλουχίας από το εξωτερικό της πρωτεΐνης να στρέφεται προς το εσωτερικό με πιθανή επιρροή της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης.

Πίνακας 32. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Arg333Pro του γονιδίου *HNF4A*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	-Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	4.405	Παθολογική
	FATHMM	-5.21	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.9709	Παθολογική
	MetaSVM	1.0379	Παθολογική
	MetaLR	0.9828	Παθολογική
	Provean	-5.92	Καλοήθης
	UMD	93	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	33	Παθολογική
	DANN	0.9976	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	1037	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	103	Συντηρημένη
	GERP	5.4	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.R333P του γονιδίου *HNF4A* είχε διαβαστεί συνολικά 402x (G: 203x και C: 199x). Επιπλέον, η παραλλαγή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία ήταν επίσης ετεροζυγώτης και είχε παρουσιάσει ΣΔ κύησης (Εικόνα 62).



Εικόνα 62. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.4) του ασθενούς ΣΥ5 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R333P (c.998G>C, p.Arg333Pro).

3.2.6 Παραλλαγές p.P445S του γονιδίου *HNF4A* και c.2542+3A>G του γονιδίου *INSR*

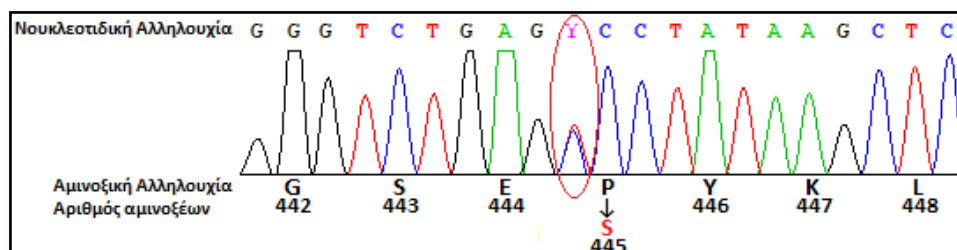
Ο ασθενής ΣΥ6, ο οποίος παρουσίασε υπογλυκαιμία από τις πρώτες ώρες ζωής, ήταν ετεροζυγώτης για τις παραλλαγές p.P445S (c.1333C>T, rs1063239) στο εξόνιο 10 του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.4), και c.2542+3A>G μετά το εξόνιο 12 του γονιδίου *INSR* (NM_000208.3).

Η πρώτη παραλλαγή αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε θυμίνη (C>T) του κωδικονίου Pro445. Η παραλλαγή αυτή πιθανόν είναι καλοήθης σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 33). Η Προλίνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: 0.84), ενώ η Σερίνη είναι ένα υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -0.63). Η αντικατάσταση αυτή πιθανόν να προκαλεί την αλλαγή θέσης του κωδικονίου 445 από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης επηρεάζοντας την τριτοταγή δομή της.

Πίνακας 33. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Pro445Ser του γονιδίου *HNF4A*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.482	Καλοήθης
	PolyPhen2	0	Καλοήθης
	Mutation Taster	0.71	Παθολογική
	Mutation Assessor	0.55	Καλοήθης
	FATHMM	-0.28	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.913	Παθολογική
	MetaSVM	-0.841	Καλοήθης
	MetalR	0.1529	Καλοήθης
	Provean	-0.22	Καλοήθης
	UMD	75	Παθολογική
	LRT	0.09	Καλοήθης
	CADD	13.34	Καλοήθης
DANN	0.8679	Καλοήθης	
Συντήρησης	Panther	220	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	56	Συντηρημένη
	GERP	5.23	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.P445S του γονιδίου *HNF4A* είχε διαβαστεί συνολικά 349x (C: 158x και T: 191x), ενώ επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση κατά Sanger στον ασθενή και στον πατέρα του, ο οποίος ήταν επίσης ετεροζυγώτης (Εικόνα 63).



Εικόνα 63. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HNF4A* (NM_000457.4) του ασθενούς ΣΥ6 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.P445S (c.1333C>T, p.Pro445Ser).

Πίνακας 34. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής c.2542+3A>G του γονιδίου *INSR*.

Όπως φαίνεται και στο αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF (Εικόνα 64), η τιμή της φυσιολογικής αλληλουχίας είναι $73.22 > 65$, με αποτέλεσμα την πιθανή αλλαγή του σημείου ματίσματος δότη μετά το εξόνιο 12 με τιμή $-39.54\% < -10\%$.

Εικόνα 64. Αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF της παραλλαγής c.2542+3A>G του γονιδίου *INSR*.

107

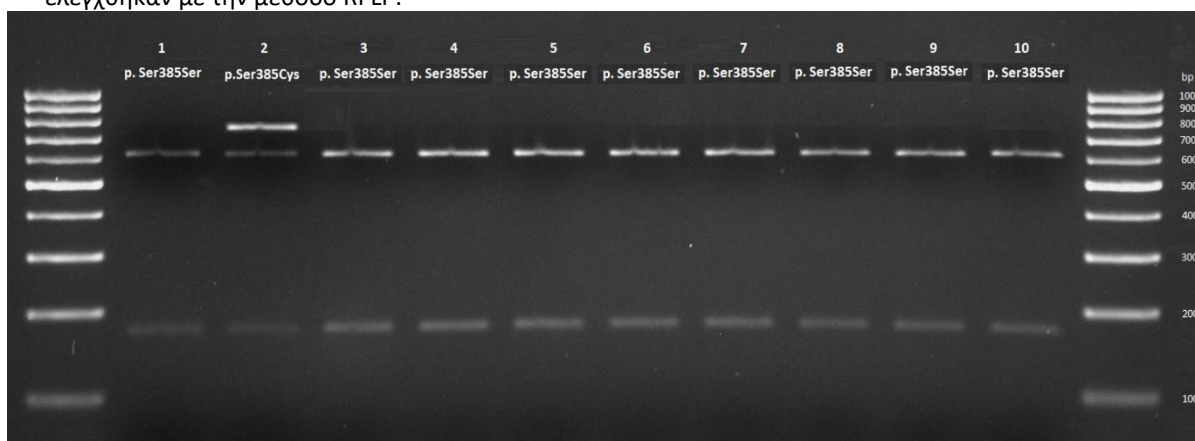
3.2.7 Διερεύνηση συχνότητας της παραλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό

Προκειμένου να διερευνηθεί η συχνότητα της παραλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό, μελετήθηκαν 148 Έλληνες (296 χρωμοσώματα), οι οποίοι δεν παρουσίαζαν ΣΥ για την νουκλεοτιδική θέση c.1154C>G.

Με τη μέθοδο RFLP εξετάστηκαν 83 υγιή άτομα, από τα οποία μόνο 2 βρέθηκε να φέρουν σε ετεροζυγωτία την παραλλαγή p.Ser385Cys (c.1154C>G) του γονιδίου *KCNJ11* (Εικόνα 65). Με αλληλούχηση κατά Sanger είχαν προηγουμένως ελεγχθεί 12 άτομα χωρίς ιστορικό ΣΥ στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής «Ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *KCNJ11* και *PCBD1* σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου MODY», ενώ στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είχαν ελεγχθεί για παραλλαγές του γονιδίου *KCNJ11* 53 άτομα χωρίς ιστορικό ΣΥ με την μεθοδολογία του NGS.

Συνολικά, 148 άτομα (296 χρωμοσώματα) ελέγχθηκαν για την φορεία της παραλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου *KCNJ11*. Συνεπώς, η συχνότητα εμφάνισης της αλλαγής p.Ser385Cys του γονιδίου *KCNJ11* στον Ελληνικό πληθυσμό προσδιορίστηκε στο 1.35% (>1%).

Εικόνα 65. Ηλεκτροφόρηση 9 ομοζυγωτών p.Ser385Ser και ενός ετεροζυγώτη p.Ser385Cys, οι οποίοι ελέγχθηκαν με την μέθοδο RFLP.



3.3 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

3.3.1 Ανάλυση δείγματος ΠΥΑ1

Ο ασθενής ΠΥΑ1, ο οποίος παρουσίαζε ΠΥΑ με κεντρικού τύπου υποθυρεοειδισμό, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, και κλινικά υποπλαστικούς όρχεις και μικροπείσμό, καθώς και απεικονιστικά έκτοπη θέση νευροϋπόφυσης, λέπτυνση του μίσχου και μικρού μεγέθους αλλά φυσιολογικής εντόπισης αδενοϋπόφυση, ελέγχθηκε με WES για την διερεύνηση παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για τον φαινότυπο του. Από το σύνολο των 20000 γονιδίων-στόχων επιτεύχθηκε αλληλούχηση σε 18900 γονίδια με ποσοστό κάλυψης 88.92% και >20x διαβάσματα. Τα VCF (Variant Call Format) αρχεία που προέκυψαν από την αλληλούχηση, περιλάμβαναν 38032 παραλλαγές σε 12337 γονίδια του ασθενούς ΠΥΑ1.

Αρχικά, αναζητήθηκαν οι παραλλαγές 79 γονιδίων που συνδέονται με την πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια, την μεμονωμένη ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης, τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και την ολοπροσεγκεφαλία (Πίνακας 35) [194, 195]. Η κάλυψη των γονιδίων αυτών ήταν 92.08% τα οποία διαβάστηκαν >20x. Από την ανάλυση αυτή ανιχνεύθηκαν σε ετεροζυγωτία 2 παθολογικές παρερμηνεύσιμες παραλλαγές, μια στο γονίδιο *HS6ST1* και μια στο γονίδιο *IL17RD*.

Πίνακας 35. Διερεύνηση 79 γονιδίων στον ασθενή ΠΥΑ1.

Χαρακτηριστικά σχετικά με ΠΥΑ	Με/Χωρίς παραλλαγές	Γονίδια					
Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια	Π	<i>ARNT2</i> (100)	<i>BMP2</i> (92.19)	<i>CDON</i> (91.74)	<i>CHD7</i> (99.26)	<i>GATA2</i> (100)	<i>GLI2</i> (95.21)
		<i>GLI3</i> (92.35)	<i>HHIP</i> (95.63)	<i>IFT172</i> (97)	<i>IGSF1</i> (76.23)	<i>LHX3</i> (92.8)	<i>LHX4</i> (90.96)
		<i>OTX2</i> (100)	<i>NEUROD1</i> (100)	<i>NFKB2</i> (94.02)	<i>PAX6</i> (93.22)	<i>PCSK1</i> (95.21)	<i>PNPLA6</i> (93.84)
		<i>POLR3A</i> (91.59)	<i>POU1F1</i> (84.36)	<i>PROK1</i> (100)	<i>PROKR2</i> (100)	<i>PROP1</i> (84)	<i>ROBO1</i> (98.48)
		<i>SHH</i> (82.15)	<i>SIX3</i> (87.1)	<i>SOX3</i> (61.3)	<i>TBX19</i> (100)	<i>TGIF1</i> (100)	<i>TRH</i> (100)
		<i>TSHB</i> (72)	<i>WDR11</i> (80.14)	<i>WNT4</i> (92.71)	<i>ZFHX3</i> (96.83)		-
	ΧΠ	<i>BMP4</i> (96.17)	<i>FGF8</i> (90.39)	<i>FGF10</i> (100)	<i>FGF18</i> (93.59)	<i>FGFR1</i> (98.5)	<i>GPR161</i> (89.58)
		<i>HESX1</i> (100)	<i>HNRNPU</i> (88.1)	<i>PITX1</i> (100)	<i>PITX2</i> (100)	<i>RBM28</i> (92.3)	<i>SOX2</i> (81.97)
		<i>TCF7L1</i> (84.1)	<i>TRHR</i> (84.88)	<i>WNT5A</i> (99.74)	<i>ZSWIM6</i> (79.36)	-	-
Μεμονωμένη Ανεπάρκεια της Αυξητικής Ορμόνης	Π	<i>GH1</i> (100)	-	-	-	-	-
	ΧΠ	<i>GHRH</i> (100)	<i>GHRHR</i> (100)	-	-	-	-
Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός	Π	<i>DUSP6</i> (100)	<i>FEZF1</i> (87.18)	<i>FGF17</i> (94.32)	<i>GNRH1</i> (100)	<i>HST6ST1</i> (76.62)	<i>IL17RD</i> (96.78)
		<i>KISS1</i> (91.85)	<i>KISS1R</i> (99.67)	<i>NROB1</i> (88.96)	<i>NSMF</i> (77.14)	<i>SEMA3A</i> (86.05)	<i>SOX10</i> (73.3)
		<i>TACR3</i> (100)	-	-	-	-	-
	ΧΠ	<i>ANOS1</i> (72.1)	<i>FLRT3</i> (85.23)	<i>GNRHR</i> (100)	<i>PROK2</i> (88.48)	<i>SPRY4</i> (100)	<i>TAC3</i> (100)
Ολοπροσεγκεφαλία	Π	<i>DISP1</i> (99.34)	<i>DLL1</i> (97.51)	<i>FOXH1</i> (92.44)	<i>NODAL</i> (98.85)	<i>PTCH1</i> (99.33)	-
	ΧΠ	<i>GAS1</i> (91.62)	<i>ZIC2</i> (68.67)	-	-	-	-

Π: γονίδια στα οποία ο ασθενής έφερε παραλλαγές, ΧΠ: γονίδια στα οποία ο ασθενής δεν έφερε παραλλαγές. Στη παρένθεση αναγράφεται το ποσοστό % κάλυψης του κάθε γονιδίου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια στα οποία ο ασθενής έφερε παθολογική παραλλαγή.

Ανάλυση με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς ΠΥΑ1 (Πίνακας 36), τα οποία υποβλήθηκαν με την χρήση του HPO (Human Phenotype Ontology) στο VarAFT, έδωσε μια ομάδα γονιδίων που συνδέονται με τα χαρακτηριστικά αυτά. Οι παραλλαγές των εξονίων και θέσεων ματίσματος των γονιδίων αυτών με συχνότητα <2% διερευνήθηκαν και εντοπίστηκαν οι δυο παραλλαγές που είχαν βρεθεί με την προηγούμενη ανάλυση των γονιδίων *HS6ST1* και *IL17RD* αλλά και μία επιπλέον παραλλαγή στο γονίδιο *SOX9*, την οποία ο ασθενής έφερε σε ετεροζυγωτία.

Πίνακας 36. Διερεύνηση γονιδίων βάσει του φαινοτύπου του ασθενούς ΠΥΑ1 με χρήση του HPO.

Human Phenotype Ontology (HPO)	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	Γονίδια με παραλλαγές			
	Micropenis HP:0000054	<i>C2CD3</i>	<i>CDH11</i>	<i>HS6ST1</i>	<i>IL17RD</i>
		<i>INPP5E</i>	<i>KDM5C</i>	<i>KIAA1109</i>	<i>KIF7</i>
		<i>KMT2D</i>	<i>LMOD3</i>	<i>SOX9</i>	<i>UBR1</i>
	Ectopic posterior pituitary HP:0011755	<i>PROP1</i>	<i>SOX3</i>		
	Pituitary hypothyroidism HP:0008245	<i>CDH23</i>	<i>PROP1</i>	<i>SOX3</i>	
	Growth hormone deficiency HP:0000824	<i>FLNB</i>	<i>FOS</i>	<i>SOX3</i>	<i>VP513B</i>

Με κόκκινο απεικονίζονται τα γονίδια με παθολογική παραλλαγή.

Στην συνέχεια, με την χρήση του προγράμματος VarAFT διερευνήθηκαν οι παραλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων που αλληλουχήθηκαν. Η ανάλυση αυτή περιείχε 11 παραλλαγές, εκ των οποίων 3 είχαν διαβάσματα <20x. Από τις υπόλοιπες παραλλαγές καμία δεν σχετιζόταν με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκαν οι παραλλαγές των εξονίων και θέσεων ματίσματος 118 γονιδίων (Πίνακας 37), τα οποία αλληλεπιδρούν με 32 γονίδια που συνδέονται με την πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια σύμφωνα με το πρόγραμμα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων STRING και τα οποία δεν ανήκουν στην παραπάνω ομάδα γονιδίων που είχε ήδη ελεγχθεί. Από τις 84 παραλλαγές των γονιδίων αυτών, αξιολογήθηκαν οι 10 με συχνότητα <1% με προγράμματα βιοπληροφορικής, αλλά καμία δεν βρέθηκε να είναι παθολογική.

Πίνακας 37. Διερεύνηση 118 γονιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν με 32 γονίδια της ΠΥΑ.

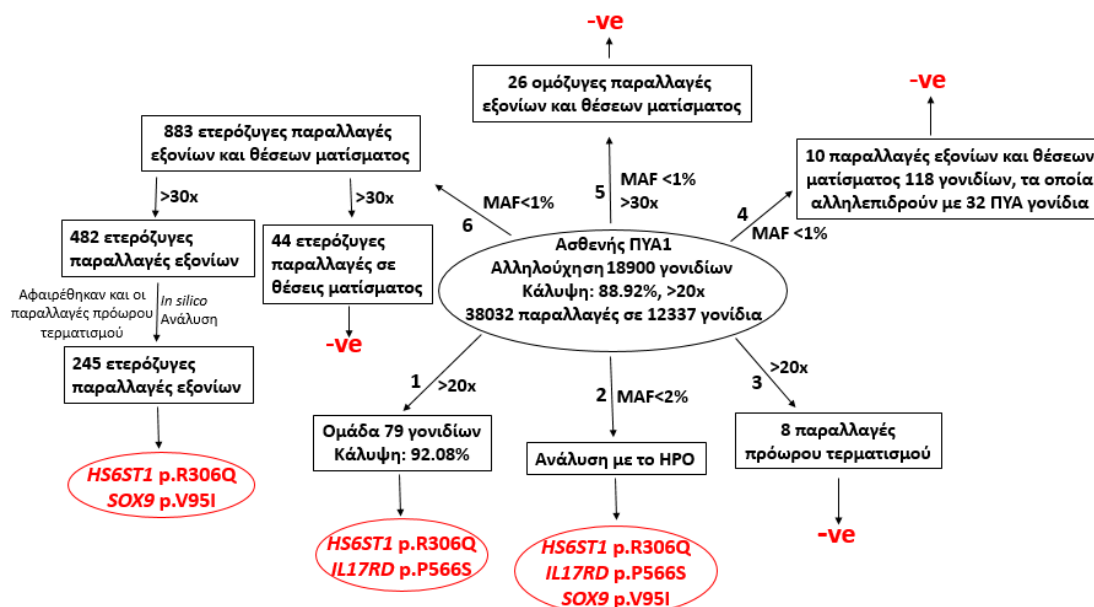
32 ΠΥΑ Γονίδια	118 Γονίδια Αλληλεπίδρασης						
ARNT2 BMP4 CDON CHD7 FGF8 FGFR1 GLI2 GLI3 GPR161 HESX1 HHIP HNRNPU IFT172 IGSF1 LHX3 LHX4 OTX2 PAX6 PNPLA6 POLR3A POU1F1 PROKR2 PROP1 RBM28 SHH SOX2 SOX3 TCF7L1 TGIF1 WDR11 ZSWIM6 SIX3	<i>ABL1</i>	<i>CUL3</i>	<i>FRS2</i>	<i>IFT81</i>	<i>NPAS4</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>ST8SIA3</i>
	<i>ACVR1</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FST</i>	<i>IFT88</i>	<i>NTS</i>	<i>PRKAR1B</i>	<i>STAT3</i>
	<i>AES</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>FURIN</i>	<i>IHH</i>	<i>OR13H1</i>	<i>PRL</i>	<i>STK36</i>
	<i>AHR</i>	<i>DAG1</i>	<i>GAS1</i>	<i>IMP4</i>	<i>OR5AK2</i>	<i>PROK2</i>	<i>SUFU</i>
	<i>ALDH1L2</i>	<i>DDX49</i>	<i>GBX2</i>	<i>INHBA</i>	<i>PAICS</i>	<i>PSMA2</i>	<i>SUPT16H</i>
	<i>ALX1</i>	<i>DHH</i>	<i>GCG</i>	<i>INS</i>	<i>PASD1</i>	<i>PSMA4</i>	<i>SUZ12</i>
	<i>ALX3</i>	<i>DMRT1</i>	<i>GLI1</i>	<i>ISL1</i>	<i>PAX2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SYNCRIP</i>
	<i>ALX4</i>	<i>DNAH12</i>	<i>GMNN</i>	<i>KATNB1</i>	<i>PDCD11</i>	<i>PTCH2</i>	<i>TLE1</i>
	<i>ARNT</i>	<i>DYNC2H1</i>	<i>GPC3</i>	<i>KDR</i>	<i>PLA2G15</i>	<i>RAB23</i>	<i>TLE2</i>
	<i>ARSE</i>	<i>EDN3</i>	<i>GPCPP1</i>	<i>KLF4</i>	<i>PLA2G16</i>	<i>RARB</i>	<i>TLE3</i>
	<i>ASB14</i>	<i>EGFR</i>	<i>GREM1</i>	<i>LCAT</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>ROBO2</i>	<i>TLE4</i>
	<i>ATXN1</i>	<i>EIF5B</i>	<i>GRP</i>	<i>LDB1</i>	<i>PLB1</i>	<i>RRP12</i>	<i>TNFRSF25</i>
	<i>AXIN2</i>	<i>EP300</i>	<i>HDAC1</i>	<i>LENG8</i>	<i>PLCG1</i>	<i>SALL4</i>	<i>TTC21B</i>
	<i>BMPR1A</i>	<i>EPAS1</i>	<i>HDAC2</i>	<i>LGALS4</i>	<i>PNPLA7</i>	<i>SAP30</i>	<i>TTC30B</i>
	<i>BMPR1B</i>	<i>ESX1</i>	<i>HDGFL1</i>	<i>LGALSL</i>	<i>POLR1C</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>TULP3</i>
	<i>BMPR2</i>	<i>EYA1</i>	<i>HHAT</i>	<i>LHX2</i>	<i>POLR1D</i>	<i>SETC1A</i>	<i>UBA2</i>
	<i>BMS1</i>	<i>EYA4</i>	<i>HIF1A</i>	<i>LIN28A</i>	<i>POLR2E</i>	<i>SETDB1</i>	<i>ILK3</i>
	<i>BNIP2</i>	<i>EZH2</i>	<i>HIST1H2B2</i>	<i>LYPLA1</i>	<i>POLR2H</i>	<i>SIM2</i>	<i>UTP6</i>
	<i>BTRC</i>	<i>FAM13A</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>LYPLA2</i>	<i>POLR3B</i>	<i>SIN3A</i>	<i>VSX2</i>
	<i>C17orf75</i>	<i>FBXW11</i>	<i>HNRNPA0</i>	<i>MBNL3</i>	<i>POLR3C</i>	<i>SIN3B</i>	<i>WDPCP</i>
	<i>CCDC15</i>	<i>FGF1</i>	<i>HNRNPA1</i>	<i>MIER3</i>	<i>POLR3D</i>	<i>SIX6</i>	<i>WDR19</i>
	<i>CD101</i>	<i>FGF2</i>	<i>HNRNPA2B1</i>	<i>MYC</i>	<i>POLR3E</i>	<i>SLIT2</i>	<i>WNT1</i>
	<i>CDC42</i>	<i>FGF20</i>	<i>HNPNPC</i>	<i>NAA40</i>	<i>POLR3F</i>	<i>SMAD2</i>	<i>XPOT</i>
	<i>CDC5L</i>	<i>FGF23</i>	<i>HNRNPH1</i>	<i>NANOG</i>	<i>POLR3H</i>	<i>SMAD3</i>	<i>ZNF354C</i>
	<i>CDH2</i>	<i>FGF4</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>NES</i>	<i>POU2F1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZNF532</i>
	<i>CGA</i>	<i>FGF9</i>	<i>HNRNPM</i>	<i>NEUROG2</i>	<i>POU3F2</i>	<i>SMAD5</i>	<i>ZBPB</i>
	<i>CHRD</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IFT122</i>	<i>NIFK</i>	<i>POU5F1</i>	<i>SMAD9</i>	
	<i>CHRNA3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IFT140</i>	<i>NLK</i>	<i>PPARG</i>	<i>SMARCC1</i>	
	<i>CIRH1A</i>	<i>FGFR4</i>	<i>IFT46</i>	<i>NOG</i>	<i>PRDM10</i>	<i>SMOL</i>	
	<i>CREBBP</i>	<i>FOXA2</i>	<i>IFT52</i>	<i>NOP2</i>	<i>PRKACA</i>	<i>SPAG9</i>	
	<i>CTBP1</i>	<i>FOXD3</i>	<i>IFT57</i>	<i>NOP58</i>	<i>PRKACB</i>	<i>SPOP</i>	
	<i>CTNNB1</i>	<i>FOXG1</i>	<i>IFT74</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PRKACG</i>	<i>SRSF1</i>	

Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ομόζυγες παραλλαγές του ασθενούς ΠΥΑ1 με συχνότητα <1%, οι οποίες βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος. Ο αριθμός των παραλλαγών αυτών ήταν 36. Από τις παραλλαγές αυτές, οι 26 με >30x διαβάσματα που εντοπίζονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος αξιολογήθηκαν με τα προγράμματα βιοπληροφορικής και την συσχέτιση τους με τον φαινότυπο του ασθενούς. Δεν εντοπίστηκε καμία παθολογική παραλλαγή σχετική με τον φαινότυπο του ασθενούς ΠΥΑ1.

Με τη χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ετερόζυγες παραλλαγές του ασθενούς ΠΥΑ1 με συχνότητα <1%, οι οποίες εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων και στις περιοχές ματίσματος. Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 883 παραλλαγές. Από τις παραλλαγές αυτές αφαιρέθηκαν εκείνες που είχαν <30x διαβάσματα, με αποτέλεσμα να παραμείνουν 44 παραλλαγές στις περιοχές ματίσματος και 482 παραλλαγές στις κωδικές περιοχές. Από τις 482 παραλλαγές των εξονίων αφαιρέθηκαν οι καλοήθειες παραλλαγές και

εκείνες που προκαλούν πρόωρο τερματισμό με αποτέλεσμα να παραμείνουν 245 παραλλαγές για περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης τους με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Τέλος, ο έλεγχος με αλληλούχηση κατά Sanger των εξονίων 3 του γονιδίου *SHH* και 1 του γονιδίου *SIX3*, που δεν καλύφθηκαν με την μεθοδολογία του NGS, για τον ασθενή ΠΥΑ1 ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές.



Εικόνα 66. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας και ανάλυσης των παραλλαγών του ασθενούς ΠΥΑ1. Με κόκκινο απεικονίζονται τα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης. MAF: Minor Allele Frequency, μικρότερη συχνότητα αλληλομόρφου, -ve: αρνητικό αποτέλεσμα.

3.3.2 Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΠΥΑ1

3.3.2.1 Παραλλαγή p.R306Q του γονιδίου *HS6ST1*

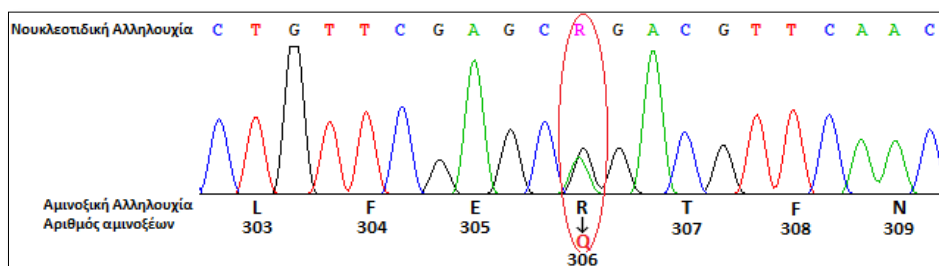
Ο ασθενής ΠΥΑ1 φέρει σε ετεροζυγωτία την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R306Q (c.917G>A, rs201307896) του εξονίου 2 του γονιδίου *HS6ST1* (NM_004807.3), η οποία σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής είναι παθολογική (Πίνακας 38). Η παραλλαγή αυτή αφορά την μεταπτωτική αντικατάσταση της γουανίνης από αδερίνη (CGG>CAG) του κωδικονίου Arg306. Η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (Υδροφοβικός Χαρακτήρας (ΥΧ): -1.50) και η Γλουταμίνη είναι ένα λιγότερο υδρόφιλο (ΥΧ: -0.93) αμινοξύ, το οποίο δεν φέρει φορτίο. Η υδροφιλικότητα κάνει τα αμινοξέα να στρέφονται προς το εξωτερικό μέρος της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, ενώ ανάλογα με το φορτίο, που κάποια αμινοξέα φέρουν, αλληλεπιδρούν με διαφορετικά αμινοξέα της ίδιας πρωτεΐνης συμβάλλοντας στην διαμόρφωση επίσης της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι η παραλλαγή p.R306Q επηρεάζει την διαμόρφωση της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια τη λειτουργικότητά της.

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *HS6ST1* έχουν συνδεθεί με τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, και συγκεκριμένα η παραλλαγή p.R306Q που φέρει ο ασθενής ΠΥΑ1 έχει συνδεθεί εκτός από τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και με μικρού μεγέθους αδενοϋπόφυση, χαρακτηριστικά που παρουσιάζει και ο ασθενής ΠΥΑ1.

Πίνακας 38. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R306Q του γονιδίου *HS6ST1*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής	Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.153 Καλοήθης
	PolyPhen2	0.998 Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	0.999 Παθολογική
	Mutation Assessor	1.725 Καλοήθης
	FATHMM	-1.73 Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.979 Παθολογική
	MetaSVM	0.205 Παθολογική
	MetaLR	0.626 Παθολογική
	Provean	-2.39 Καλοήθης
	UMD	84 Παθολογική
	LRT	0 Καλοήθης
	CADD	26 Παθολογική
	DANN	0.999 Παθολογική
Συντήρησης	Panther	750 Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	43 Συντηρημένη
	GERP	4.78 Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.R306Q του γονιδίου *HS6ST1* είχε διαβαστεί συνολικά 143x (G: 76x και A: 67x). Ενώ, επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία ήταν επίσης ετεροζυγώτης (Εικόνα 67).



Εικόνα 67. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *HS6ST1* (NM_004807.3) του ασθενούς ΠΥΑ1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R306Q (c.917G>A, p.Arg306Gln).

3.3.2.2 Παραλλαγή p.P566S του γονιδίου *IL17RD*

Ο ασθενής ΠΥΑ1 βρέθηκε επίσης να είναι ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.P566S (c.1696C>T, rs61742267) του εξονίου 12 του γονιδίου *IL17RD* (NM_017563.5). Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης φαίνονται στον πίνακα 39. Η παραλλαγή αυτή αφορά την μεταπτωτική αντικατάσταση του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε θυμίνη (CCC>TCC) του κωδικονίου Pro566. Η Προλίνη είναι ένα υδρόφοβο (ΥΧ: 0.84) αμινοξύ, ενώ η Σερίνη ένα υδρόφιλο (ΥΧ:-0.63) αμινοξύ. Με βάση τον υδροφοβικό

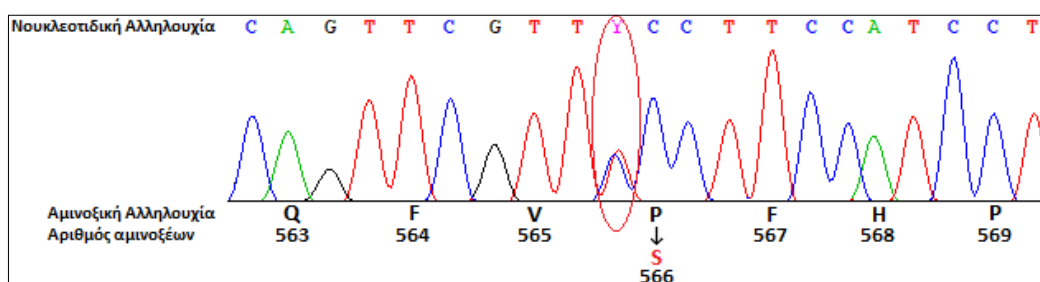
χαρακτήρα των δύο αμινοξέων, η παραλλαγή αυτή πιθανόν κάνει το αμινοξύ της θέσης 566 της αμινοξικής αλληλουχίας από το εσωτερικό της πρωτεΐνης να στρέφεται προς το εξωτερικό με πιθανή επιρροή στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Το γονίδιο *IL17RD* φαίνεται ότι ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του FGFR1/FGF8 και παθολογικές παραλλαγές του έχουν συνδεθεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με ή χωρίς ανοσμία, χαρακτηριστικό που παρουσιάζει και ο ασθενής ΠΥΑ1.

Πίνακας 39. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.P566S του γονιδίου *IL17RD*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής	Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.57 Καλοήθης
	PolyPhen2	0.972 Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	0.999 Παθολογική
	Mutation Assessor	1.845 Καλοήθης
	FATHMM	2.82 Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.986 Παθολογική
	MetaSVM	-1.214 Καλοήθης
	MetaLR	0.020 Καλοήθης
	Provean	-1.44 Καλοήθης
	UMD	33 Πολυμορφισμός
	LRT	0 Παθολογική
	CADD	23.6 Παθολογική
	DANN	0.998 Παθολογική
Συντήρησης	Panther	455 Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	74 Συντηρημένη
	GERP	5.64 Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.P566S του γονιδίου *IL17RD* είχε διαβαστεί συνολικά 37x (C: 20x και T: 17x). Η αλληλούχηση κατά Sanger επιβεβαίωσε την παραλλαγή αυτή στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία επίσης την έφερε σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 68).



Εικόνα 68. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *IL17RD* (NM_017563.5) του ασθενούς ΠΥΑ1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.P566S (c.1696C>T, p.Pro566Ser).

3.3.2.3 Παραλλαγή p.V95I του γονιδίου SOX9

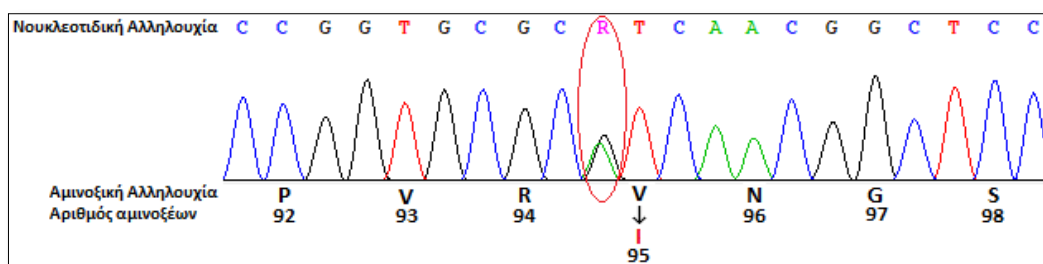
Η νέα (*novel*) παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.V95I (c.283G>A) στο εξόνιο 1 του γονιδίου SOX9 (NM_000346.4) που ανιχνεύθηκε στον ασθενή ΠΥΑ1, είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής, όπως φαίνεται στον πίνακα 40. Η παραλλαγή αυτή αφορά την μεταπτωτική αντικατάσταση του 1^{ου} νουκλεοτιδίου του κωδικονίου 95 από γουανίνη σε αδενίνη (GTC>ATC) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της Βαλίνης στη θέση 95 της αμινοξικής αλληλουχίας από Ισολευκίνη. Η Βαλίνη και η Ισολευκίνη είναι δυο υδρόφοβα αμινοξέα με υδροφοβικό χαρακτήρα 1.32 και 1.83 αντίστοιχα. Πιθανόν η παραλλαγή αυτή να μην αλλάζει την διαμόρφωση της πρωτεΐνης, αλλά να επηρεάζει την λειτουργικότητα της.

Το γονίδιο SOX9 ελέγχθηκε λόγω της σύνδεσης του με τον μικροπείσμό. Ωστόσο, το γονίδιο αυτό εκφάζεται σε διάφορους ιστούς και παθολογικές παραλλαγές του έχουν βρεθεί σε ασθενείς με μικρογναθία, χειλοεσχιστία και προσωπικές δυσμορφίες, αλλά και σε ασθενείς με διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου. Πιθανολογείται, λοιπόν, ότι η παραλλαγή αυτή ευθύνεται για τα υποπλαστικά και μικρού μεγέθους γεννητικά όργανα του ασθενούς ΠΥΑ1.

Πίνακας 40. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.V95I του γονιδίου SOX9.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.21	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.999	Πιθανόν παθολογική
	Mutation Taster	0.999	παθολογική
	Mutation Assessor	2.825	Πιθανόν παθολογική
	FATHMM	-1.36	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.953	παθολογική
	MetaSVM	0.397	παθολογική
	MetaLR	0.7	παθολογική
	Provean	-0.86	Καλοήθης
	UMD	48	Πολυμορφισμός
	CADD	23.3	παθολογική
	DANN	0.998	παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν παθολογική
	Grantham	29	Συντηρημένη
	GERP	4.24	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.V95I του γονιδίου SOX9 είχε διαβαστεί συνολικά 82x (G: 38x και A: 44x). Ενώ, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία έφερε επίσης την παραλλαγή αυτή σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 69).



Εικόνα 69. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *SOX9* (NM_000346.4) του ασθενούς ΠΥΑ1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.V95I (c.283G>A, p.Val95Ile).

3.3.3 Ανάλυση δείγματος ΠΥΑ2

Ο ασθενής ΠΥΑ2, ο οποίος παρουσίαζε ΠΥΑ με δευτεροπαθή υποθυρεοειδισμό, δευτεροπαθή επινεφριδιακή ανεπάρκεια, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, κλινικά μικρού μεγέθους όρχεις και μικροπείσμό, και απεικονιστικά έκτοπη θέση νευροϋπόφυσης, απουσία μίσχου και υποπλαστική αδενοϋπόφυση, ελέγχθηκε με WES για την διερεύνηση παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για τον φαινότυπο του. Από το σύνολο των 20000 γονιδίων-στόχων επιτεύχθηκε αλληλούχηση σε 18921 γονιδια με 90.72% ποσοστό κάλυψης και >20x διαβάσματα. Τα VCF αρχεία που προέκυψαν από την αλληλούχηση, περιελάμβαναν 38348 παραλλαγές σε 12459 γονιδια του ασθενούς ΠΥΑ2.

Αρχικά, αναζητήθηκαν οι παραλλαγές 79 γονιδίων που συνδέονται με την πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια, την μεμονωμένη ανεπάρκεια της αυξητικής ορμόνης, τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και την ολοπροσεγκεφαλία (Πίνακας 41) [194, 195]. Η κάλυψη των γονιδίων αυτών ήταν 92.73% με διαβάσματα >20x. Από την ανάλυση αυτή ανιχνεύθηκαν σε ετεροζυγωτία μια παρερμηνεύσιμη παραλλαγή του γονιδίου *BMP4* και μια μη νοηματική παραλλαγή του γονιδίου *GNRH1*.

Πίνακας 41. Διερεύνηση 79 γονιδίων στον ασθενή ΠΥΑ2.

Χαρακτηριστικά σχετικά με ΠΥΑ	Με/Χωρίς παραλλαγές	Γονίδια					
Πολλαπλή Υποφυσιακή Ανεπάρκεια	Π	ARNT2 (100)	BMP2 (98.57)	BMP4 (99.19)	CDON (94.49)	CHD7 (99.26)	GLI2 (97.88)
		GLI3 (96.67)	HNRNP1 (95.2)	IFT172 (98.55)	IGSF1 (85.47)	LHX3 (92.8)	LHX4 (83.03)
		NFKB2 (91.72)	PAX6 (93.22)	PCSK1 (95.21)	PITX1 (100)	PNPLA6 (95.55)	POLR3A (95.88)
		POU1F1 (81.62)	PROKR2 (100)	PROP1 (61.38)	RBM28 (92.3)	ROBO1 (99.21)	SHH (79.27)
		SIX3 (90.49)	TBX19 (89.98)	TCF7L1 (77.82)	TGIF1 (100)	TRH (100)	TRHR (100)
		TSHB (72)	WDR11 (90.59)	WNT5A (99.74)	ZFHX3 (95.26)	-	-
	ΧΠ	FGF8 (90.39)	FGF10 (100)	FGF18 (83.97)	FGFR1 (100)	GATA2 (100)	GPR161 (93.86)
		HESX1 (100)	HHIP (99.1)	NEUROD1 (100)	OTX2 (100)	PITX2 (100)	PROK1 (100)
		SOX2 (98.53)	SOX3 (74.72)	WNT4 (90.06)	ZSWIM6 (74.92)	-	-
Μεμονωμένη Ανεπάρκεια της Αυξητικής Ορμόνης	Π	GH1 (100)	GHRHR (100)	-	-	-	-
	ΧΠ	GHRH (100)	-	-	-	-	-
Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός	Π	DUSP6 (100)	FEZF1 (88.07)	FGF17 (100)	FLRT3 (83.79)	GNRH1 (100)	HST6ST1 (76.62)
		IL17RD (93.65)	KISS1 (91.85)	KISS1R (99.67)	SEMA3A (75.86)	SOX10 (80.09)	TACR3 (100)
	ΧΠ	ANOS1 (82.57)	GNRHR (100)	NROB1 (88.96)	NSMF (77.72)	PROK2 (88.48)	SPRY4 (98.84)
		TAC3 (100)	-	-	-	-	-
Ολοπροσεγκεφαλία	Π	DISP1 (98.82)	DLL1 (97.51)	FOXH1 (92.44)	NODAL (100)	PTCH1 (99.45)	-
	ΧΠ	GAS1 (94.8)	ZIC2 (68.67)	-	-	-	-

Π: γονίδια στα οποία ο ασθενής έφερε παραλλαγές, ΧΠ: γονίδια στα οποία ο ασθενής δεν έφερε παραλλαγές. Στην παρένθεση αναγράφεται το ποσοστό % κάλυψης του κάθε γονιδίου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια στα οποία ο ασθενής έφερε παθολογική παραλλαγή.

Διερεύνηση των παραλλαγών με συχνότητα <2% των εξονίων και θέσεων ματίσματος των γονιδίων που συνδέονται με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς ΠΥΑ2 (Πίνακας 42), τα οποία υποβλήθηκαν με την χρήση του HPO στο VarAFT, ανέδειξε εκτός από τις παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων **BMP4** και **GNRH1**, μια παθολογική παραλλαγή στο γονίδιο **SRA1**.

Πίνακας 42. Διερεύνηση γονιδίων βάσει του φαινοτύπου του ασθενούς ΠΥΑ2 με χρήση του HPO.

Human Phenotype Ontology (HPO)	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	Γονίδια με παραλλαγές			
	Abnormality of the hypothalamus-pituitary axis HP:0000864	BMP4	ERCC4	FANCB	FANCD2
		PIBF1	PTPN22	TMEM237	
	Adrenal insufficiency HP:0000846	GATA4	ZFPM2		
	Growth hormone deficiency HP:0000824	FOS			
	Anterior hypopituitarism HP:0000830	BMP4			
	Panhypopituitarism HP:0000871	PTCH1	TGIF1		
	Micropenis HP:0000054	BMP4	DYNC2H1	ERCC6	FRAS1
		GATA4	GNRH1	KIF7	LMOD3
		MEGF8	RYR1	SRA1	UBA1
		ZFPM2			

Με κόκκινο απεικονίζονται τα γονίδια με παθολογική παραλλαγή.

Στην συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος VarAFT διερευνήθηκαν οι παραλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων που

αλληλουχήθηκαν. Η ανάλυση αυτή ανέδειξε 12 παραλλαγές, εκ των οποίων 5 είχαν <20x διαβάσματα. Από τις υπόλοιπες παραλλαγές, μόνο η μη νοηματική παραλλαγή του γονιδίου *GNRH1* σχετιζόταν με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Διερευνήθηκαν, επίσης, οι παραλλαγές των εξονίων και θέσεων ματίσματος 118 γονιδίων (Πίνακας 43), τα οποία αλληλεπιδρούν με 32 γονίδια που συνδέονται με την πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια σύμφωνα με το πρόγραμμα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων STRING και τα οποία δεν ανήκουν στην παραπάνω ομάδα γονιδίων που είχε ήδη ελεγχθεί. Από τις 84 παραλλαγές, αξιολογήθηκαν οι 15, οι οποίες είχαν συχνότητα <1%, με προγράμματα βιοπληροφορικής αλλά και ως προς την συσχέτιση των γονιδίων αυτών με τον φαινότυπο του ασθενούς. Δεν βρέθηκε καμία να είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο του ασθενούς.

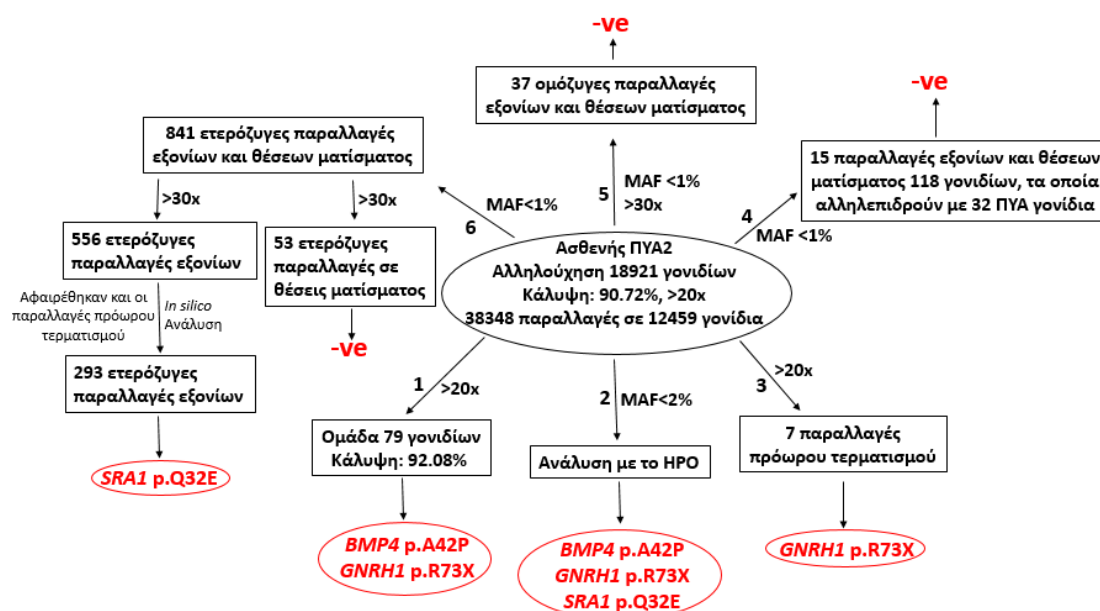
Πίνακας 43. Διερεύνηση 118 γονιδίων, τα οποία αλληλεπιδρούν με 32 γονίδια της ΠΥΑ.

32 ΠΥΑ Γονίδια	118 Γονίδια Αλληλεπίδρασης						
ARNT2	<i>ABL1</i>	<i>CUL3</i>	<i>FRS2</i>	<i>IFT81</i>	<i>NPAS4</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>ST8SIA3</i>
	<i>ACVR1</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FST</i>	<i>IFT88</i>	<i>NTS</i>	<i>PRKAR1B</i>	<i>STAT3</i>
BMP4	<i>AES</i>	<i>CYP1A2</i>	<i>FURIN</i>	<i>IHH</i>	<i>OR13H1</i>	<i>PRL</i>	<i>STK36</i>
CDON	<i>AHR</i>	<i>DAG1</i>	<i>GAS1</i>	<i>IMP4</i>	<i>OR5AK2</i>	<i>PROK2</i>	<i>SUFU</i>
CHD7	<i>ALDH1L2</i>	<i>DDX49</i>	<i>GBX2</i>	<i>INHBA</i>	<i>PAICS</i>	<i>PSMA2</i>	<i>SUPT16H</i>
FGF8	<i>ALX1</i>	<i>DHH</i>	<i>GCG</i>	<i>INS</i>	<i>PASD1</i>	<i>PSMA4</i>	<i>SUZ12</i>
FGFR1	<i>ALX3</i>	<i>DMRT1</i>	<i>GLI1</i>	<i>ISL1</i>	<i>PAX2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SYNCRIP</i>
GLI2	<i>ALX4</i>	<i>DNAH12</i>	<i>GMNN</i>	<i>KATNB1</i>	<i>PDCD11</i>	<i>PTCH2</i>	<i>TLE1</i>
GLI3	<i>ARNT</i>	<i>DYNC2H1</i>	<i>GPC3</i>	<i>KDR</i>	<i>PLA2G15</i>	<i>RAB23</i>	<i>TLE2</i>
GPR161	<i>ARSE</i>	<i>EDN3</i>	<i>GPCPP1</i>	<i>KLF4</i>	<i>PLA2G16</i>	<i>RARB</i>	<i>TLE3</i>
HESX1	<i>ASB14</i>	<i>EGFR</i>	<i>GREM1</i>	<i>LCAT</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>ROBO2</i>	<i>TLE4</i>
HHIP	<i>ATXN1</i>	<i>EIF5B</i>	<i>GRP</i>	<i>LDB1</i>	<i>PLB1</i>	<i>RRP12</i>	<i>TNFRSF25</i>
HNRNPU	<i>AXIN2</i>	<i>EP300</i>	<i>HDAC1</i>	<i>LENG8</i>	<i>PLCG1</i>	<i>SALL4</i>	<i>TTC21B</i>
IFT172	<i>BMPR1A</i>	<i>EPAS1</i>	<i>HDAC2</i>	<i>LGALS4</i>	<i>PNPLA7</i>	<i>SAP30</i>	<i>TTC30B</i>
IGSF1	<i>BMPR1B</i>	<i>ESX1</i>	<i>HDGFL1</i>	<i>LGALSL</i>	<i>POLR1C</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>TULP3</i>
LHX3	<i>BMPR2</i>	<i>EYA1</i>	<i>HHAT</i>	<i>LHX2</i>	<i>POLR1D</i>	<i>SETC1A</i>	<i>UBA2</i>
LHX4	<i>BMS1</i>	<i>EYA4</i>	<i>HIF1A</i>	<i>LIN28A</i>	<i>POLR2E</i>	<i>SETDB1</i>	<i>ILK3</i>
OTX2	<i>BNIP2</i>	<i>EZH2</i>	<i>HIST1H2B2</i>	<i>LYPLA1</i>	<i>POLR2H</i>	<i>SIM2</i>	<i>UTP6</i>
PAX6	<i>BTRC</i>	<i>FAM13A</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>LYPLA2</i>	<i>POLR3B</i>	<i>SIN3A</i>	<i>VSX2</i>
PNPLA6	<i>C17orf75</i>	<i>FBXW11</i>	<i>HNRNPA0</i>	<i>MBNL3</i>	<i>POLR3C</i>	<i>SIN3B</i>	<i>WDPCP</i>
POLR3A	<i>CCDC15</i>	<i>FGF1</i>	<i>HNRNPA1</i>	<i>MIER3</i>	<i>POLR3D</i>	<i>SIX6</i>	<i>WDR19</i>
POU1F1	<i>CD101</i>	<i>FGF2</i>	<i>HNRNPA2B1</i>	<i>MYC</i>	<i>POLR3E</i>	<i>SLIT2</i>	<i>WNT1</i>
PROKR2	<i>CDC42</i>	<i>FGF20</i>	<i>HNPNPC</i>	<i>NAA40</i>	<i>POLR3F</i>	<i>SMAD2</i>	<i>XPOT</i>
PROP1	<i>CDC5L</i>	<i>FGF23</i>	<i>HNRNPH1</i>	<i>NANOG</i>	<i>POLR3H</i>	<i>SMAD3</i>	<i>ZNF354C</i>
RBM28	<i>CDH2</i>	<i>FGF4</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>NES</i>	<i>POU2F1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>ZNF532</i>
SHH	<i>CGA</i>	<i>FGF9</i>	<i>HNRNPM</i>	<i>NEUROG2</i>	<i>POU3F2</i>	<i>SMAD5</i>	<i>ZPBP</i>
SOX2	<i>CHRD</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IFT122</i>	<i>NIFK</i>	<i>POU5F1</i>	<i>SMAD9</i>	
SOX3	<i>CHRNA3</i>	<i>FGFR3</i>	<i>IFT140</i>	<i>NLK</i>	<i>PPARG</i>	<i>SMARCC1</i>	
TCF7L1	<i>CIRH1A</i>	<i>FGFR4</i>	<i>IFT46</i>	<i>NOG</i>	<i>PRDM10</i>	<i>SMOL</i>	
TGIF1	<i>CREBBP</i>	<i>FOXA2</i>	<i>IFT52</i>	<i>NOP2</i>	<i>PRKACA</i>	<i>SPAG9</i>	
WDR11	<i>CTBP1</i>	<i>FOXD3</i>	<i>IFT57</i>	<i>NOP58</i>	<i>PRKACB</i>	<i>SPOP</i>	
ZSWIM6	<i>CTNNB1</i>	<i>FOXB1</i>	<i>IFT74</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PRKACG</i>	<i>SRSF1</i>	

Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ομόζυγες παραλλαγές του ασθενή ΠΥΑ2 με συχνότητα <1%, οι οποίες βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος. Ο αριθμός των παραλλαγών αυτών ήταν 54. Από τις παραλλαγές αυτές, οι 37 με >30x διαβάσματα που εντοπίζονται σε εξόνια και σε θέσεις ματίσματος αξιολογήθηκαν με τα προγράμματα βιοπληροφορικής αλλά και ως προς την λειτουργία των γονιδίων και της σύνδεσης τους με κάποιο νόσημα. Από την ανάλυση αυτή δεν αναδείχθηκε καμία νέα παθολογική παραλλαγή σχετική με τον φαινότυπο του ασθενούς ΠΥΑ2.

Με τη χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ετερόζυγες παραλλαγές του ασθενούς ΠΥΑ2 με συχνότητα <1%, οι οποίες εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων και στις περιοχές ματίσματος. Συνολικά 841 παραλλαγές ανιχνεύθηκαν με αυτή την ανάλυση. Από τις παραλλαγές αυτές αφαιρέθηκαν εκείνες που είχαν <30x διαβάσματα με αποτέλεσμα να παραμείνουν 53 παραλλαγές στις περιοχές ματίσματος, και 556 παραλλαγές στις κωδικές περιοχές. Ακόμη, αφαίρεση των πολυμορφικών παραλλαγών και εκείνων που προκαλούν πρόωρο τερματισμό μείωσε τον αριθμό των παραλλαγών στις κωδικές περιοχές στις 293 για περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης τους με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Τέλος, ο έλεγχος με αλληλούχηση κατά Sanger των εξονίων 3 του γονιδίου *SHH* και 1 του γονιδίου *SIX3*, που δεν καλύφθηκαν με την μεθοδολογία του NGS, για τον ασθενή ΠΥΑ2 ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές.



Εικόνα 70. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας και ανάλυσης των παραλλαγών του ασθενούς ΠΥΑ2. Με κόκκινο απεικονίζονται τα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης. MAF: Minor Allele Frequency, μικρότερη συχνότητα αλληλομόρφου, -ve: αρνητικό αποτέλεσμα.

3.3.4 Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΠΥΑ2

3.3.4.1 Παραλλαγή p.A42P του γονιδίου *BMP4*

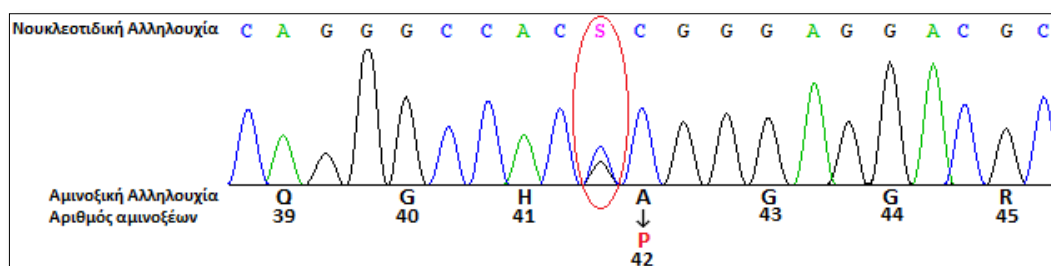
Ο ασθενής ΠΥΑ2 είναι ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.A42P (c.124G>C, rs140920120) του εξονίου 3 του γονιδίου *BMP4* (NM_001202.4). Η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων των προγραμμάτων βιοπληροφορικής δείχνουν ότι η παραλλαγή αυτή είναι καλοήθης (Πίνακας 44), ωστόσο ήταν καταγεγραμμένη στην βάση παθολογικών παραλλαγών HGMD. Η παραλλαγή αυτή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε κυτοσίνη (GCG>CCG) του κωδικονίου A42. Ως προς την υδροφοβικότητα τα δύο αμινοξέα δεν διαφέρουν σημαντικά καθώς είναι και τα δύο υδρόφοβα (Αλανίνη ΥΧ: 0.35, Προλίνη ΥΧ: 0.84) και πιθανόν δεν τροποποιούν την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Ο παράγοντας BMP4 συμβάλλει στην διαφοροποίηση των κυττάρων του θύλακα Rathke, από τον οποίο αναπτύσσεται η αδενούπόφυση και ο ενδιάμεσος λοβός της υπόφυσης. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν σχετιστεί με ΠΥΑ, υποπλαστική υπόφυση, κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες κ.α. Ο ασθενής ΠΥΑ2 εμφανίζει ΠΥΑ και υποπλαστική αδενούπόφυση, χαρακτηριστικά για τα οποία θα μπορούσε να ευθύνεται η παρουσία αυτής της αλλαγής.

Πίνακας 44. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p. A42P του γονιδίου *BMP4*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.69	Καλοήθης
	PolyPhen2	0.523	Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	0.668	Πολυμορφισμός
	Mutation Assessor	0.13	Καλοήθης
	FATHMM	-0.23	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.841	Παθολογική
	MetaSVM	-0.655	Καλοήθης
	MetaLR	0.182	Καλοήθης
	LRT	0.115	Καλοήθης
	Provean	-0.95	Καλοήθης
	UMD	69	Πιθανόν Παθολογική
	CADD	19.44	Καλοήθης
	DANN	0.994	Παθολογική
Συντήρησης	Grantham	27	Συντηρημένη
	GERP	5.19	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.A42P του γονιδίου *BMP4* είχε διαβαστεί συνολικά 193x (G: 85x και C: 108x). Η αλληλούχηση κατά Sanger επιβεβαίωσε την παραλλαγή αυτή στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία επίσης την έφερε σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 71).

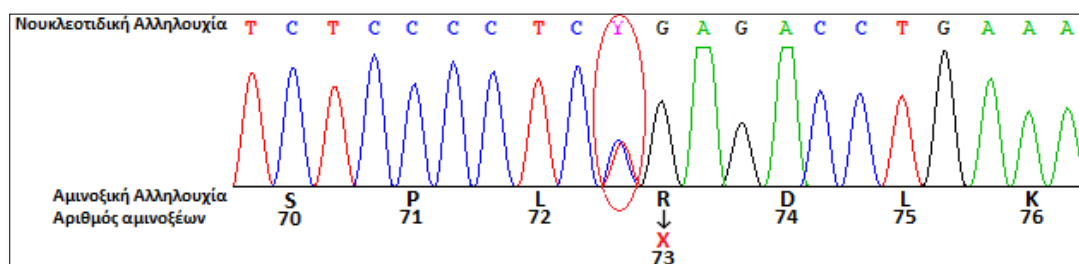


Εικόνα 71. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *BMP4* (NM_001202.4) του ασθενούς ΠΥΑ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.A42P (c.124G>C, p.Ala42Pro).

3.3.4.2 Παραλλαγή p.R73X του γονιδίου *GNRH1*

Στον ασθενή ΠΥΑ2 ανιχνεύθηκε, επίσης, σε ετεροζυγωτία η μη νοσηματική παραλλαγή p.R73X (c.217C>T, rs375970738) του εξονίου 2 του γονιδίου *GNRH1* (NM_000825.3), η οποία οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας. Η παραλλαγή αυτή προκλήθηκε από την μεταπτωτική αντικατάσταση της κυτοσίνης σε θυμίνη στο 1^ο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου 73. Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή αυτή είχε διαβαστεί συνολικά 58x (C: 32x και T: 26x). Ενώ, η αλληλούχηση κατά Sanger επιβεβαίωσε στον ασθενή ΠΥΑ2 την παθολογική παραλλαγή και στον πατέρα του, ο οποίος την έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 72).

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GNRH1*, το οποίο κωδικοποιεί την ορμόνη GnRH που διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροφινών LH και FSH από την αδenoυπόφυση, έχουν συνδεθεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και μικροφαλλία, χαρακτηριστικά τα οποία παρουσιάζει και ο ασθενής ΠΥΑ2.



Εικόνα 72. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *GNRH1* (NM_000825.3) του ασθενούς ΠΥΑ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R73X (c.217C>T, p.Arg73Ter).

3.3.4.3 Παραλλαγή p.Q32E του γονιδίου *SRA1*

Ο ασθενής ΠΥΑ2 ήταν επίσης ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.Q32E (c.94C>G, rs35610885) του εξονίου 1 του γονιδίου *SRA1*. Η παραλλαγή αυτή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 45). Η παραλλαγή αφορά την αντικατάσταση μεταστροφής του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε γουανίνη (CAG>GAG) του κωδικονίου Gln32. Η Γλουταμίνη είναι ένα υδρόφιλο (-0.93) αμινοξύ το

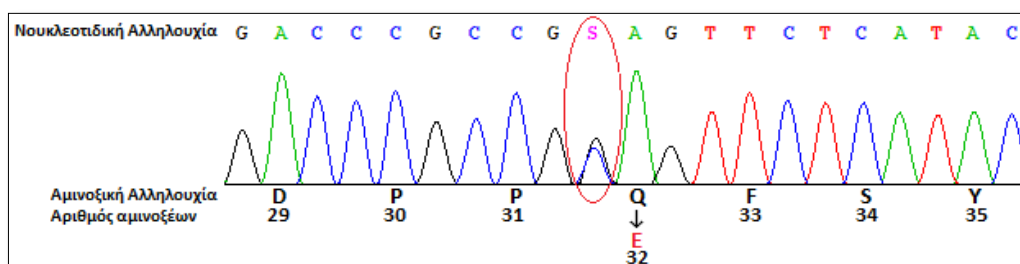
οποίο δεν φέρει φορτίο, ενώ το Γλουταμινικό οξύ είναι ένα υδρόφιλο (-1.95) αμινοξύ αρνητικά φορτισμένο. Η ιδιότητα τους αυτή κάνει το αμινοξύ της θέσης 32 της αμινοξικής αλληλουχίας να στρέφεται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης και να αλληλεπιδρά πιθανόν με άλλα αμινοξέα, με πιθανή αλλαγή της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης και συνεπώς της λειτουργικότητας της.

Το γονίδιο *SRA1* είναι λειτουργικό ως πρωτεΐνη αλλά και ως non-coding RNA. Ο ρόλος τους είναι η ενεργοποίηση των στεροειδικών υποδοχέων και ρύθμιση παραγόντων. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν συνδεθεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και μικροφαλία, χαρακτηριστικά που παρουσιάζει και ο ασθενής ΠΥΑ2.

Πίνακας 45. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.Q32E του γονιδίου *SRA1*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.2	Παθολογική
	PolyPhen2	0.994	Πιθανόν παθολογική
	Mutation Taster	0.999	Παθολογική
	FATHMM	0.71	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.984	Παθολογική
	MetaSVM	-0.874	Καλοήθης
	MetaLR	0.162	Καλοήθης
	Provean	-1.43	Καλοήθης
	UMD	25	Πολυμορφισμός
	CADD	27	Παθολογική
Συντήρησης	DANN	0.993	Παθολογική
	Panther	220	Πιθανόν παθολογική
	Grantham	29	Συντηρημένη
	GERP	5.01	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.Q32E του γονιδίου *SRA1* διαβάστηκε συνολικά 200x (C: 106x και G: 94x). Πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση με αλληλούχηση κατά Sanger στον ασθενή και στην μητέρα του, η οποία επίσης ήταν ετεροζυγώτης (Εικόνα 73).



Εικόνα 73. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *SRA1* (NM_001035235.3) του ασθενούς ΠΥΑ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.Q32E (c.94C>G, p.Gln32Glu).

3.4 ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ

3.4.1 Ανάλυση δείγματος ΔΔΦ1

Το νεογνό ΔΔΦ1 με καρυότυπο 46,XY, το οποίο είχε ατελή αρρενοποίηση με έξω γεννητικά όργανα θήλεος, υποπλασία των κυττάρων Leydig και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ελέγχθηκε με WES για την διερεύνηση παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για τον φαινότυπο του. Από το σύνολο των 20000 γονιδίων-στόχων επιτεύχθηκε αλληλούχηση σε 18925 γονίδια με ποσοστό κάλυψης 94.48% και >20x διαβάσματα. Τα VCF αρχεία που προέκυψαν από την αλληλούχηση περιελάμβαναν 38763 παραλλαγές σε 12473 γονίδια.

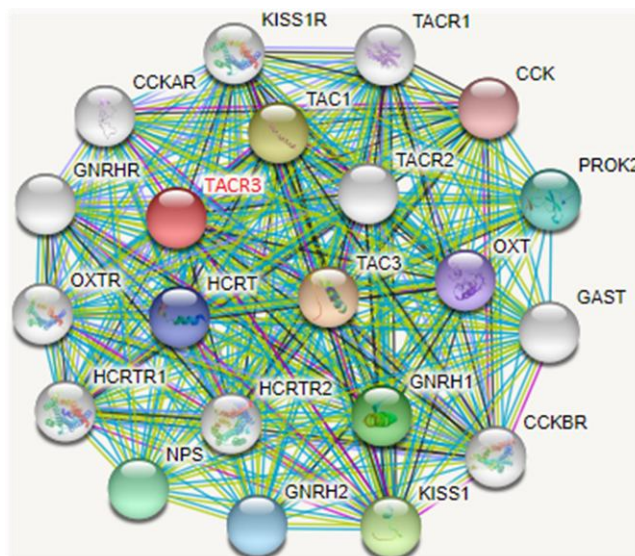
Αρχικά, αναζητήθηκαν οι παραλλαγές 120 γονιδίων που συνδέονται με την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των γονάδων, την σύνθεση και την δράση των ανδρογόνων, τον υπογοναδισμό, την υποσπαδία, την κρυφορχία και το σύνδρομο MRKH (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome) [127, 196]. Η κάλυψη των γονιδίων που φαίνονται στον πίνακα 46 είναι 93.08% και >20x διαβάσματα. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε σε ετεροζυγωτία μια παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *TACR3*.

Πίνακας 46. Διερεύνηση 120 γονιδίων στον ασθενή ΔΔΦ1.

Χαρακτηριστικά σχετικά με ΔΔΦ	Με/Χωρίς παραλλαγές	Γονίδια					
Ανάπτυξη Γονάδων	Π	<i>CBX2</i> (94.45)	<i>CXCL12</i> (81.68)	<i>DMRT1</i> (97.06)	<i>ESR1</i> (98.73)	<i>ESR2</i> (100)	<i>FGF9</i> (100)
		<i>FST</i> (93.45)	<i>GATA4</i> (91.38)	<i>HSPA14</i> (13.91)	<i>IGFBP7</i> (89.47)	<i>IGF1R</i> (97.71)	<i>KIT</i> (100)
		<i>LHX9</i> (92.42)	<i>MAP3K1</i> (81.8)	<i>MAP3K4</i> (99.48)	<i>MFGE8</i> (95.02)	<i>MSX1</i> (97.81)	<i>NOTUM</i> (86.45)
		<i>NR5A1</i> (92.21)	<i>NROB1</i> (88.96)	<i>OSR1</i> (100)	<i>PBX1</i> (100)	<i>PRDM1</i> (100)	<i>PRDM14</i> (99.36)
		<i>PTCH1</i> (99.36)	<i>PTGDS</i> (100)	<i>RBFOX2</i> (98.13)	<i>ROBO1</i> (99.2)	<i>SIX4</i> (100)	<i>SMAD3</i> (100)
		<i>SMAD4</i> (100)	<i>SOSTDC1</i> (100)	<i>SOX8</i> (96.87)	<i>SOX9</i> (100)	<i>SOX17</i> (88.11)	<i>SPP1</i> (100)
		<i>STRA8</i> (100)	<i>SULF2</i> (98.81)	<i>TSPYL1</i> (100)	<i>WT1</i> (96.63)	<i>ZFPM2</i> (93.95)	-
		<i>BMP15</i> (100)	<i>CBLN1</i> (65.64)	<i>CITED2</i> (81.74)	<i>CTNNB1</i> (100)	<i>CYP26B1</i> (85.6)	<i>CXCR4</i> (94.94)
	ΧΠ	<i>DACH2</i> (87.3)	<i>DHH</i> (96.14)	<i>DMRT2</i> (49.87)	<i>EMX2</i> (100)	<i>FOXL2</i> (70.65)	<i>GADD45</i> (98.95)
		<i>GPC3</i> (80.45)	<i>INSRR</i> (100)	<i>KITLG</i> (100)	<i>OSR2</i> (91.83)	<i>PGD</i> (95.55)	<i>PHLDA2</i> (70.15)
		<i>PITX2</i> (100)	<i>PKNOX1</i> (100)	<i>RARA</i> (100)	<i>RSPO1</i> (100)	<i>RUNX1</i> (97.43)	<i>SIX1</i> (100)
		<i>SOX3</i> (81.43)	<i>SRY</i> (100)	<i>TCF21</i> (100)	<i>WNT4</i> (92.71)	-	-
		<i>ACVR1</i> (100)	<i>ACVR2B</i> (96.62)	<i>AKR1C2</i> (81.74)	<i>AMH</i> (88.89)	<i>ATRX</i> (66.85)	<i>CYB5A</i> (100)
		<i>CYP11A1</i> (100)	<i>CYP11B1</i> (100)	<i>CYP17A1</i> (100)	<i>CYP19A1</i> (100)	<i>FGFR2</i> (90.82)	<i>HSD3B1</i> (100)
Διαφοροποίηση Γονάδων (σύνθεση και δράση ανδρογόνων)	Π	<i>HSD17B3</i> (100)	<i>HSD17B4</i> (91.72)	<i>LHCGR</i> (100)	<i>PDGFRA</i> (98.62)	<i>POR</i> (100)	<i>SRD5A2</i> (100)
		<i>STAR</i> (100)	-	-	-	-	-
		<i>ACVR1B</i> (99.92)	<i>AKR1C4</i> (100)	<i>AMHR2</i> (100)	<i>AR</i> (96.33)	<i>ARX</i> (69.57)	<i>CDKN1C</i> (64.57)
		<i>HSD3B2</i> (99.64)	<i>PECAM1</i> (63.83)	-	-	-	-
	ΧΠ	-	-	-	-	-	-
Υπογοναδοτροφικό Υπογοναδισμό	Π	<i>BBS9</i> (87.04)	<i>CHD7</i> (98.02)	<i>FSHB</i> (100)	<i>KISS1R</i> (99.67)	<i>LHX3</i> (92.42)	<i>PROKR2</i> (100)
		<i>PROP1</i> (83.99)	<i>TACR3</i> (100)	<i>WDR11</i> (91.48)	-	-	-
	ΧΠ	<i>ANOS1</i> (92.12)	<i>FGF8</i> (91.78)	<i>FGFR1</i> (100)	<i>FSHR</i> (96.48)	<i>GNRH1</i> (100)	<i>GNRHR</i> (100)
		<i>HESX1</i> (100)	<i>LEP</i> (100)	<i>PROK2</i> (88.48)	<i>TAC3</i> (100)	-	-
Υποσπαδία, Κρυφορχία, MRKH	Π	<i>INSL3</i> (66.11)	<i>RXFP2</i> (100)	-	-	-	-
	ΧΠ	<i>ATF3</i> (100)	<i>HOXA13</i> (65.47)	<i>MAMLD1</i> (98.23)	-	-	-

Π: γονίδια στα οποία ο ασθενής είχε παραλλαγές, ΧΠ: γονίδια στα οποία ο ασθενής δεν είχε παραλλαγές. Στην παρένθεση αναγράφεται το ποσοστό % κάλυψης του κάθε γονιδίου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο στο οποίο ο ασθενής είχε παθολογική παραλλαγή.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι παραλλαγές 20 γονιδίων που αλληλεπιδρούν με το γονίδιο *TACR3* σύμφωνα με τη βάση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων STRING (Εικόνα 74). Καμία παθολογική παραλλαγή δεν εντοπίστηκε στα γονίδια αυτά.



Εικόνα 74. Είκοσι (20) γονίδια που αλληλεπιδρούν με το γονίδιο *TACR3* σύμφωνα με την βάση αλληλεπιδράσεων STRING.

Ακολούθως, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς ΔΔΦ1 που φαίνονται στον πίνακα 47 υποβλήθηκαν στο VarAFT με την χρήση του HPO, επιλέγοντας έτσι τα γονίδια, στα οποία ο ασθενής έχει παραλλαγές και τα οποία συνδέονται με το φαινότυπο του. Διερευνήθηκαν οι παραλλαγές των γονιδίων αυτών που βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος και έχουν συχνότητα <2%. Από την διαλογή αυτή δεν εντοπίστηκε καμία νέα παθολογική παραλλαγή.

Πίνακας 47. Διερεύνηση γονιδίων βάσει του φαινοτύπου του ασθενούς ΔΔΦ1 με χρήση του HPO.

Human Phenotype Ontology (HPO)	Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά	Γονίδια με παραλλαγές				
	Abnormal sex determination HP:0012244	GATA4	MAP3K1			
	Abnormality of the testis HP:0000035	AHR	BEST1	CA4	FSCN2	GJB4
		PARN	PRPF31	RP1	TULP1	
	Absence of secondary sex characteristics HP:0008187	GATA4	MAP3K1	PROP1	TACR3	
	Absent testis HP:0010469	FANCD2	FANCM	TCTN3		
	Ambiguous genitalia HP:0000062	BUB1B	CKAP2L	GATA4	MAP3K1	PTCH1
		TGIF1	TSPYL1	WDR34		
	Gonadal dysgenesis HP:0000133	FGFR3	GATA4	MAP3K1		
	Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone deficiency HP:0003164	TACR3				
	Male pseudohermaphroditism HP:0000037	CEP290	MAP3K1			
	Female external genitalia in individual with 46,XY karyotype HP:0008730	GATA4	MAP3K1			
	Decreased testosterone in males HP:0008230	GATA4	MAP3K1	SLC39A4	TACR3	

Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο στο οποίο ο ασθενής είχε παθολογική παραλλαγή.

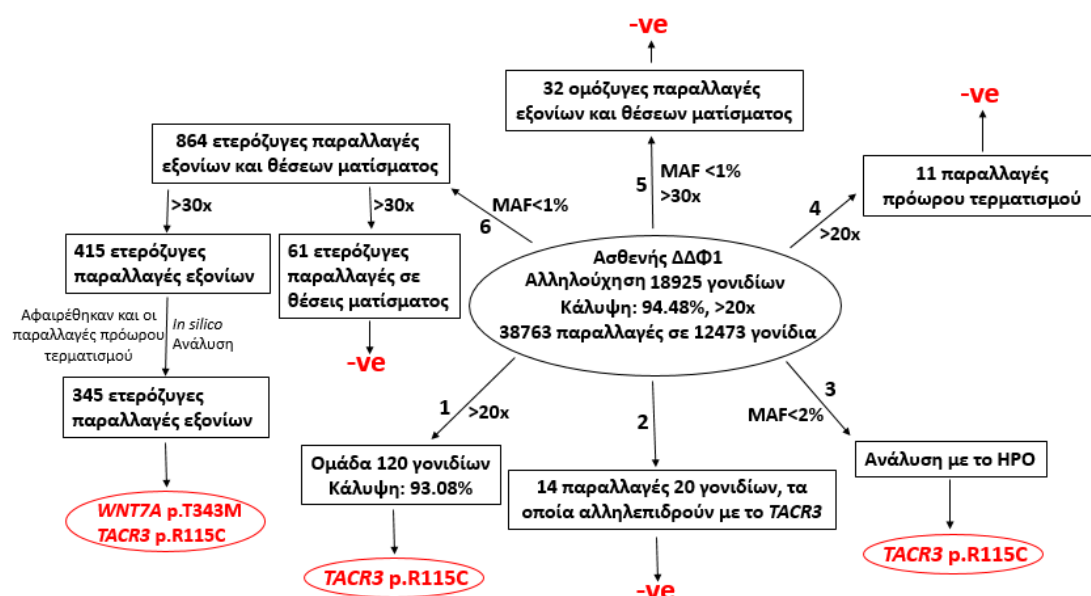
Με τη χρήση του προγράμματος VarAFT διερευνήθηκαν οι παραλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων που αλληλουχήθηκαν. Η ανάλυση αυτή περιείχε 15 παραλλαγές, εκ των οποίων 4 είχαν <20x διαβάσματα και από τις υπόλοιπες 11 παραλλαγές καμία δεν συνδεόταν με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ομόζυγες παραλλαγές του ασθενή ΔΔΦ1 με συχνότητα <1%, οι οποίες βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος. Ο αριθμός των παραλλαγών αυτών ήταν 40. Από τις παραλλαγές αυτές, οι 32 με >30x διαβάσματα που εντοπίζονται σε εξόνια και θέσεις ματίσματος διερευνήθηκαν ως προς την πρόβλεψη των προγραμμάτων βιοπληροφορικής και την συσχέτιση τους με τον φαινότυπο του ασθενούς. Καμία παθολογική παραλλαγή υπεύθυνη για τον φαινότυπο του ασθενούς ΔΔΦ1 δεν εντοπίστηκε.

Με τη χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ετερόζυγες παραλλαγές του ασθενούς ΔΔΦ1 με συχνότητα <1%, οι οποίες εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων και στις περιοχές ματίσματος αυτών. Συνολικά, οι παραλλαγές αυτής της ανάλυσης ήταν 864. Από τις παραλλαγές αυτές αφαιρέθηκαν εκείνες που είχαν <30x διαβάσματα με αποτέλεσμα να παραμείνουν 61 παραλλαγές σε περιοχές ματίσματος και 415 παραλλαγές σε εξόνια. Από τις 415 παραλλαγές των εξονίων αφαιρέθηκαν οι καλοήθειες

παραλλαγές σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής και παρέμειναν 345. Η διερεύνηση των παραλλαγών αυτών ως προς την συσχέτιση τους με τον φαινότυπο του ασθενούς ανέδειξαν μια ετερόζυγη παρερμηνεύσιμη παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *WNT7A*.

Τέλος, ο έλεγχος με αλληλούχηση κατά Sanger του εξονίου 1 του γονιδίου *WNT4*, το οποίο δεν καλύφθηκε με την μεθοδολογία του NGS, για τον ασθενή ΔΔΦ1 ήταν αρνητικός για παθολογικές παραλλαγές.



Εικόνα 75. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας και ανάλυσης των παραλλαγών του ασθενούς ΔΔΦ1. Με κόκκινο απεικονίζονται τα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης. MAF: Minor Allele Frequency, μικρότερη συχνότητα αλληλομόρφου, -ve: αρνητικό αποτέλεσμα.

3.4.2 Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΔΔΦ1

3.4.2.1 Παραλλαγή p.R115C του γονιδίου *TACR3*

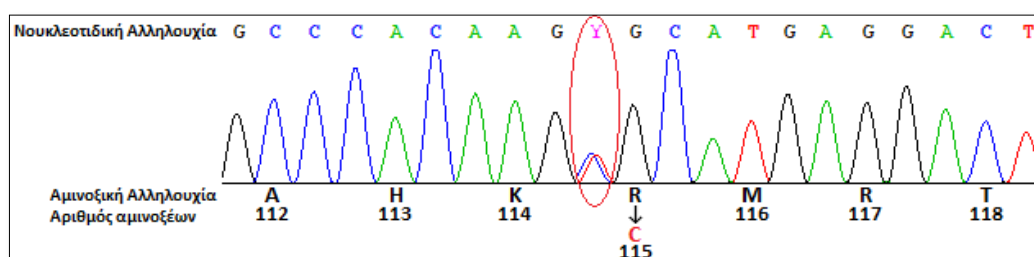
Στον ασθενή ΔΔΦ1 ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία η παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.R115C (c.343C>T, rs201886341) στο εξόνιο 1 του γονιδίου *TACR3* (NM_001059.3). Σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής η παραλλαγή είναι παθολογική (Πίνακας 48). Η παραλλαγή p.R115C αφορά την αντικατάσταση μετάπτωσης του 1^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε θυμίνη (CGC>TGC) του κωδικονίου Arg115. Η Κυστεΐνη είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ (0.76), το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών με άλλες κυστεΐνες, ενώ η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (-1.50). Η διαφορά των αμινοξέων αυτών ως προς την υδροφοβικότητα αλλά και των δεσμών που το καθένα μπορεί να κάνει πιθανόν να επηρεάζει την τριτοταγή δομή και κατ' επέκταση την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Το γονίδιο *TACR3* εκφράζεται στον υποθάλαμο και συμμετέχει στην ανάπτυξη και ρύθμιση του άξονα Υποθάλαμου-Υπόφυσης-Γονάδων, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των γονάδων, την στεροειδογένεση, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και την γονιμότητα. Εκτός του υποθαλάμου, το γονίδιο εκφράζεται και στα κύτταρα Leydig, προωθώντας την διαφοροποίηση και ανάπτυξη των όρχεων. Πιθανολογείται, ότι η παραλλαγή αυτή του γονιδίου *TACR3*, που φέρει ο ΔΔΦ1, ευθύνεται για την υποπλασία των κυττάρων Leydig και τα χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης.

Πίνακας 48. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R115C (c.343C>T) του γονιδίου *TACR3*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	0.99	Παθολογική
	Mutation Assessor	0.975	Παθολογική
	FATHMM	-0.76	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.9	Παθολογική
	MetaSVM	0.4032	Παθολογική
	MetaLR	0.626	Παθολογική
	Provean	-7.53	Παθολογική
	UMD	96	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	31	Παθολογική
	DANN	0.9994	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	456	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	180	Συντηρημένη
	GERP	5.11	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με τη μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.R115C διαβάστηκε συνολικά 249x (C: 108x και T: 141x). Η παραλλαγή αυτή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο ασθενή και στον πατέρα του, ο οποίος επίσης την έφερε σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 76).



Εικόνα 76. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *TACR3* (NM_001059.3) του ασθενούς ΔΔΦ1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R115C (c.343C>T, p.Arg115Cys).

3.4.2.2 Παραλλαγή p.T343M του γονιδίου *WNT7A*

Ο ασθενής ΔΔΦ1 ήταν, επίσης, ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παθολογική παραλλαγή p.T343M (c.1028C>T, rs140491601) στο εξόνιο 4 του γονιδίου *WNT7A* (NM_004625.3), έξι αμινοξέα πριν το τέλος του γονιδίου. Η αλλαγή αυτή αφορά την μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από κυτοσίνη σε

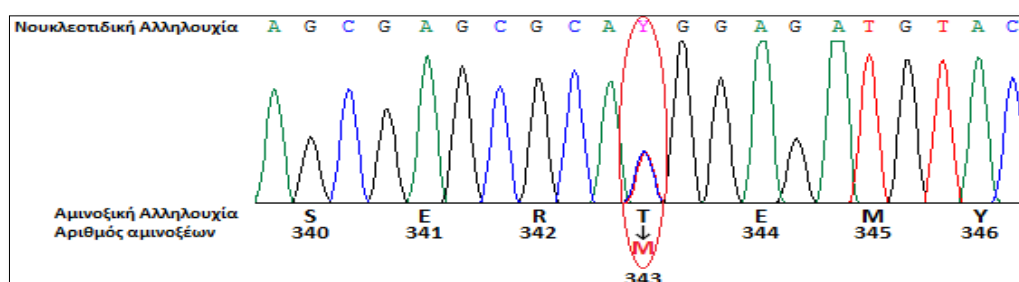
θυμίνη (ACG>ATG) του κωδικονίου Thr343. Η παθολογική πρόβλεψη των προγραμμάτων βιοπληροφορικής αυτής της παραλλαγής φαίνεται στον πίνακα 49. Βιοχημικά, η Θρεονίνη είναι ένα ελάχιστα υδρόφιλο (-0.27) αμινοξύ, ενώ η Μεθειονίνη ένα υδρόφοβο (1.10) αμινοξύ, το οποίο περιέχειθειϊκή ομάδα στην πλευρική του αλυσίδα. Λόγω της υδροφοβικότητας, η Met343 της παραλλαγμένης αμινοξικής αλληλουχίας στρέφεται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης και αλληλεπιδρά με άλλα αμινοξέα, γεγονός που πιθανόν επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

Ο παράγοντας WNT7A ενεργοποιεί τον υποδοχέα της AMH, AMHR2 στα μεσεγχυματικά κύτταρα των πόρων του Müller, με σκοπό την υποστροφή τους και τελικά την διαφοροποίηση των πόρων του Wolff. Συνεπώς, η παθολογική παραλλαγή του γονιδίου WNT7A που φέρει ο ασθενής ΔΔΦ1 πιθανόν ευθύνεται για την ατελή αρρενοποίηση με έξω γεννητικά όργανα θήλεος που παρουσίασε.

Πίνακας 49. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.T343M του γονιδίου WNT7A.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.03	Παθολογική
	PolyPhen2	1	Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	2.55	Μέτρια Παθολογική
	FATHMM	-1.02	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.962	Παθολογική
	MetaSVM	0.275	Παθολογική
	MetaLR	0.602	Παθολογική
	Provean	-4.08	Παθολογική
	UMD	90	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	32	Παθολογική
	DANN	0.999	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	910	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	81	Συντηρημένη
	GERP	4.46	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με τη μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.T343M διαβάστηκε συνολικά 145x (C: 71x και T: 74x). Η παραλλαγή αυτή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο ασθενή και στη μητέρα του, η οποία την έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 77).



Εικόνα 77. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου WNT7A (NM_004625.3) του ασθενούς ΔΔΦ1 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.T343M (c.1028C>T, p.Thr115Met).

3.4.3 Ανάλυση δείγματος ΔΔΦ2

Το νεογνό ΔΔΦ2 με καρυότυπο 46,XY, το οποίο παρουσίαζε διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, Triple A Σύνδρομο και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, ελέγχθηκε με WES για την διερεύνηση παθολογικών παραλλαγών που ευθύνονται για τον φαινότυπο του. Από το σύνολο των 20000 γονιδίων-στόχων επιτεύχθηκε αλληλούχηση σε 18897 γονίδια με ποσοστό κάλυψης 87.14% και >20x διαβάσματα. Τα VCF αρχεία που προέκυψαν από την αλληλούχηση, περιελάμβαναν 37911 παραλλαγές σε 12472 γονίδια του ασθενούς ΔΔΦ2.

Αρχικά, διερευνήθηκαν οι παραλλαγές 120 γονιδίων (Πίνακας 50) με κάλυψη 87.88% με διαβάσματα >20x που συνδέονται με την ανάπτυξη των γονάδων, την σύνθεση και την δράση των ανδρογόνων τα οποία συμβάλουν στην διαφοροποίηση των γονάδων, τον υπογοναδισμό, την υποσπαδία, την κρυφορχία και το σύνδρομο MRKH (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome) [127, 196]. Ακόμη, διερευνήθηκαν οι παραλλαγές του γονιδίου AAAS (κάλυψη γονιδίου: 100%), το οποίο συνδέεται με το σύνδρομο Triple A. Καμία παθολογική παραλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στα γονίδια αυτά. Στην συνέχεια, διερευνήθηκαν οι παραλλαγές 48 γονιδίων (Πίνακας 50) με ποσοστό κάλυψης 87.41% με διαβάσματα >20x που συνδέονται με νεφρολογικά νοσήματα [198]. Από την ανάλυση των γονιδίων που συνδέονται με νεφρωσικά σύνδρομα, βρέθηκαν 2 παθολογικές παραλλαγές, μία στο γονίδιο *PMM2* και μία στο γονίδιο *ACTN4*.

Πίνακας 50. Τα 169 γονίδια που διερευνήθηκαν στον ασθενή ΔΔΦ2.

Χαρακτηριστικά σχετικά με ΔΔΦ	Με/Χωρίς παραλλαγές	Γονίδια					
Ανάπτυξη Γονάδων	Π	CBX2 (91.48)	CYP26B1 (88)	CXCL12 (78.84)	DMRT1 (93.49)	ESR1 (83.64)	FGF9 (100)
		GATA4 (89.63)	HSPA14 (70.21)	IGFBP7 (83.21)	IGF1R (91.19)	INSRR (97.66)	LHX9 (86.71)
		KIT (86.12)	MAP3K1 (75.57)	MAP3K4 (92.55)	MFGF8 (97.64)	MSX1 (95.18)	NOTUM (87.79)
		NR5A1 (80.23)	PGD (96.1)	PKNOX1 (88.55)	PRDM1 (99.68)	PRDM14 (91.11)	PTCH1 (98.46)
		PTGDS (100)	ROBO1 (90.91)	RUNX1 (94.21)	SIX4 (93.69)	SMAD3 (68.86)	SOSTDC1 (100)
		STRA8 (100)	SULF2 (91.73)	TSPYL1 (100)	WT1 (96.18)	ZFPM2 (91)	-
	ΧΠ	BMP15 (91.69)	CBLN1 (85.28)	CITED2 (65.51)	CTNNB1 (90.29)	CXCR4 (87)	DACH2 (75.41)
		DHH (93.53)	DMRT2 (49.87)	EMX2 (87.94)	ESR2 (71.87)	FOXL2 (70.65)	FST (91.87)
		GADD45 (96.62)	GPC3 (89.52)	KITLG (86.09)	NR0B1 (88.96)	OSR1 (100)	OSR2 (92.3)
		PBX1 (98.86)	PHLDA2 (80.72)	PITX2 (100)	RARA (100)	RBFOX2 (89.45)	RSP01 (100)
		SIX1 (87.59)	SMAD4 (72.51)	SOX3 (73.9)	SOX8 (81.19)	SOX9 (100)	SOX17 (78.04)
		SPP1 (73.03)	SRY (100)	TCF21 (100)	WNT4 (88.83)	-	-
Διαφοροποίηση Γονάδων (σύνθεση και δράση ανδρογόνων)	Π	ACVR1 (100)	ACVR1B (98.25)	ACVR2B (91.34)	AKR1C4 (100)	AMH (83.13)	ATRX (34.35)
		CYB5A (100)	CYP11A1 (100)	CYP11B1 (97.44)	CYP17A1 (100)	FGFR2 (87.72)	HSD17B3 (100)
		HSD17B4 (85.13)	LHCGR (87.24)	PDGFRA (96.77)	PECAM1 (0)	POR (96.13)	SRD5A2 (75.72)
		STAR (95.69)	-	-	-	-	-
	ΧΠ	AKR1C2 (76.37)	AMHR2 (100)	AR (78.68)	ARX (66.84)	CDKN1C (64.57)	CYP19A1 (100)
		HSD3B1 (100)	HSD3B2 (87.13)	-	-	-	-
Υπογοναδοτροφικό Υπογοναδισμό	Π	ANOS1 (76.85)	BBS9 (67.26)	CHD7 (92.74)	FSHR (96.49)	GNRH1 (100)	KISS1R (99.67)
		LHX3 (92.42)	PROK2 (88.48)	PROKR2 (100)	PROP1 (73.86)	TACR3 (100)	-
	ΧΠ	FGF8 (91.78)	FGFR1 (99.7)	FSHB (100)	GNRHR (93.41)	HESX1 (100)	LEP (100)
		TAC3 (100)	WDR11 (84)	-	-	-	-
Υποσπανδία, Κρυψορχία, MRKH	Π	HOXA13 (59.73)	INSL3 (69.82)	MAMLD1 (91.51)	RXFP2 (83.4)	-	-
	ΧΠ	ATF3 (73.78)	-	-	-	-	-
Triple A Σύνδρομο	Π	AAAS (100)	-	-	-	-	-
Νεφρωσικά Νοσήματα	Π	ACTN4 (99.25)	ALG1 (59.95)	APOL1 (98.98)	ARHGAP24 (92.75)	ARHGDIA (91.16)	CD151 (100)
		CD2AP (86.29)	COL4A3 (82.44)	COL4A4 (63.67)	COQ2 (79.83)	COQ6 (98.81)	COQ8B (99.04)
		CRB2 (99.81)	CUBN (49.76)	CFH (70.79)	DGKE (79.83)	EMP2 (100)	EXT1 (99.41)
		FAT1 (99.1)	GATA3 (98.14)	INF2 (86.15)	ITGA3 (100)	ITGB4 (93.04)	LAMB2 (99.29)
		LMNA (98)	LMX1B (58.07)	MYH9 (96.42)	MYO1E (64.74)	NPHS1 (96.52)	NPHS2 (98.69)
		NUP93 (91.1)	NXF5 (76.05)	PAX2 (99.72)	PLCE1 (97.7)	PMM2 (100)	PTPRO (89.37)
		SMARCA1 (98.11)	TRPC6 (84.87)	TTC21B (80.05)	WDR73 (96.61)	-	-
		ANLN (82.57)	COL4A5 (51.12)	MAFB (99.34)	NEU1 (79.83)	NUP107 (77.58)	PDSS2 (67.33)
	ΧΠ	SCARB2 (74.25)	ZMPSTE24 (85.73)	-	-	-	-

Π: γονίδια στα οποία ο ασθενής είχε παραλλαγές, ΧΠ: γονίδια στα οποία ο ασθενής δεν είχε παραλλαγές. Στην παρένθεση αναγράφεται το ποσοστό % κάλυψης του κάθε γονιδίου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται τα γονίδια στα οποία ο ασθενής είχε παθολογική παραλλαγή.

Στη συνέχεια, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ασθενούς (Πίνακας 51) υποβλήθηκαν στο VarAFT με χρήση του HPO, επιλέγοντας τα γονίδια, στα οποία ο ασθενής έφερε παραλλαγές και τα οποία συνδέονται με το φαινότυπο του. Διερευνήθηκαν οι παραλλαγές των γονιδίων αυτών που βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος και έχουν συχνότητα <2%. Από την ανάλυση αυτή βρέθηκε μία παθολογική παραλλαγή στο γονίδιο *SAMD9* καθώς και η παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *ACTN4*, η οποία είχε βρεθεί και με την προηγούμενη ανάλυση.

Πίνακας 51. Διερεύνηση γονιδίων βάσει του φαινοτύπου του ασθενούς ΔΔΦ2 με χρήση του HPO.

Human Phenotype Ontology (HPO)	Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά	Γονίδια με παραλλαγές			
	Focal segmental glomerulosclerosis HP:0000097	<i>ACTN4</i>	<i>CD2AP</i>	<i>COQ6</i>	<i>INF2</i>
	Adrenal insufficiency HP:0000846	<i>SAMD9</i>	-	-	-
	Achalasia HP:0002571	<i>SAMD9</i>	-	-	-
	Ambiguous genitalia HP:0000062	<i>FZD2</i>	<i>IFT80</i>	<i>TGIF1</i>	-
	Male infertility HP:0003251	<i>ADGRG2</i>	<i>AURKC</i>	<i>BRAF</i>	<i>TEX11</i>
	Male hypogonadism HP:0000026	<i>AIP</i>	<i>CDH23</i>	-	-

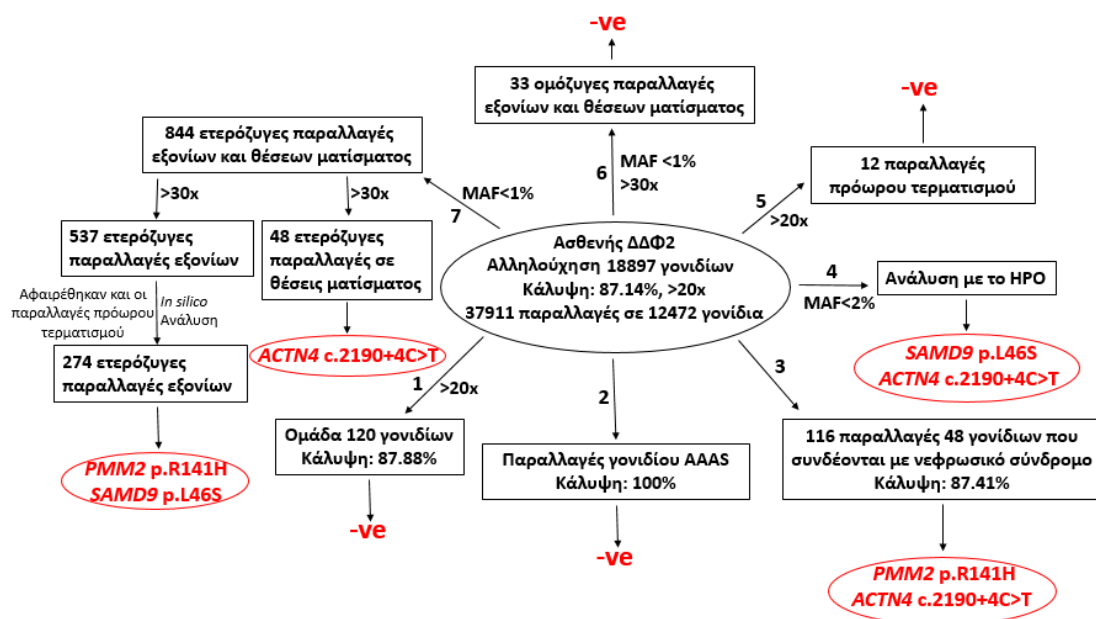
Με κόκκινο απεικονίζονται τα γονίδια με παθολογική παραλλαγή

Στην συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος VarAFT διερευνήθηκαν οι παραλλαγές που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της αμινοξικής αλληλουχίας των γονιδίων που αλληλουχήθηκαν. Η ανάλυση αυτή περιείχε 65 παραλλαγές, εκ των οποίων οι 12 είχαν αριθμό διαβασμάτων <30x. Από τις υπόλοιπες παραλλαγές καμία δεν συνδεόταν με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Επιπλέον, με τη χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ομόζυγες παραλλαγές του ασθενή ΔΔΦ2 με συχνότητα <1%, οι οποίες βρίσκονται σε εξόνια και περιοχές ματίσματος. Ο αριθμός των παραλλαγών αυτών ήταν 54. Από τις παραλλαγές αυτές, οι 33 με >30X διαβάσματα που εντοπίζονται σε εξόνια και θέσεις ματίσματος αξιολογήθηκαν ως προς την πρόβλεψη των προγραμμάτων βιοπληροφορικής και την συσχέτιση τους με τον φαινότυπο του ασθενούς. Δεν εντοπίστηκε καμία παθολογική παραλλαγή υπεύθυνη για τον φαινότυπο του ασθενούς ΔΔΦ2.

Με τη χρήση του προγράμματος VarAFT επιλέχτηκαν οι ετερόζυγες παραλλαγές του ασθενούς ΔΔΦ2 με συχνότητα <1%, οι οποίες εντοπίζονται στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων και στις περιοχές ματίσματος. Συνολικά, 844 παραλλαγές ανιχνεύθηκαν από αυτή την ανάλυση. Από τις παραλλαγές αυτές αφαιρέθηκαν εκείνες που είχαν <30x διαβάσματα με αποτέλεσμα να παραμείνουν 48 παραλλαγές στις περιοχές ματίσματος και 537 παραλλαγές σε εξόνια. Ακόμη, αφαίρεση των καλοήθων παραλλαγών σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής μείωσε τον αριθμό των παραλλαγών στις κωδικές περιοχές στις 274. Από τις παραλλαγές αυτές δεν ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές που να σχετίζονται με τον φαινότυπο του ασθενούς.

Τέλος, ο έλεγχος για απαλείψεις και διπλασιασμούς των γονιδίων *NR0B1*, *NR5A1*, *SOX9*, *SRY* και *WNT4* στον ασθενή ΔΔΦ2 ήταν αρνητικός.



Εικόνα 78. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας και ανάλυσης των παραλλαγών του ασθενούς ΔΔΦ2. Με κόκκινο απεικονίζονται τα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης. MAF: Minor Allele Frequency, μικρότερη συχνότητα αλληλομόρφου, -ve: αρνητικό αποτέλεσμα.

3.4.4 Γενετικά ευρήματα του ασθενούς ΔΔΦ2

3.4.4.1 Παραλλαγή p. R141H του γονιδίου *PMM2*

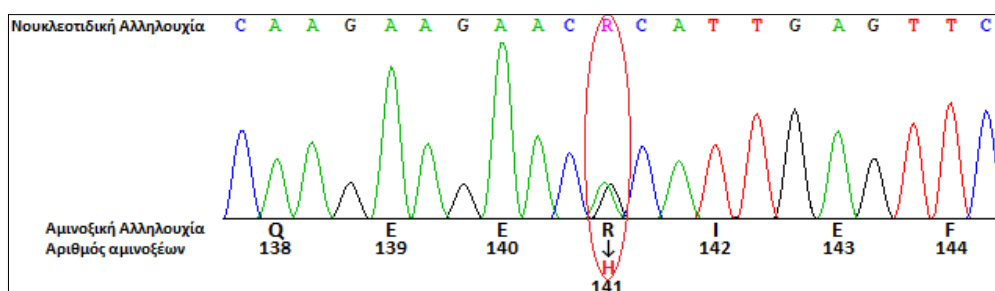
Από την ομάδα των γονιδίων που συνδέονται με νεφρωσικά σύνδρομα, δεδομένου ότι ο ασθενής εμφάνισε εστιακή σπειραματοσκλήρυνση με σημαντικού βαθμού πρωτεϊνουρία (focal segmental glomerulosclerosis), ανιχνεύθηκαν δύο παθολογικές παραλλαγές σε ετεροζυγωτία. Η πρώτη ετερόζυγη παρερμηνεύσιμη παραλλαγή είναι η p.R141H (c.422G>A, rs28936415) του γονιδίου *PMM2* (NM_000303.3), η οποία αφορά τη μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από γουανίνη σε αδενίνη (C<u>G</u>>C<u>A</u>C), αντικαθιστώντας το αμινοξύ Arg141. Βιοχημικά, η Αργινίνη είναι ένα θετικά φορτισμένο υδρόφιλο (ΥΧ: -1.50) αμινοξύ, ενώ η Ιστιδίνη είναι ένα αρνητικά φορτισμένο υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -0.65). Τα δυο αμινοξέα διαφέρουν σημαντικά ως προς το φορτίο, το οποίο μπορεί να αλλάξει την αλληλεπίδραση μεταξύ των αμινοξέων της πρωτεΐνης επηρεάζοντας την τριτοταγή δομή της. Η βιοπληροφορική ανάλυση της παραλλαγής αυτής είναι παθολογική (Πίνακας 52).

Το ένζυμο *PMM2* συμμετέχει στο μονοπάτι της γλυκοζυλίωσης, το οποίο είναι σημαντικό για την ανάπτυξη και λειτουργία των εμβρυϊκών νεφρών. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου συνδέονται με την συγγενή διαταραχή της γλυκοζυλίωσης τύπου 1α, το οποίο προκαλεί μεταξύ άλλων και νεφρωσικό σύνδρομο.

Πίνακας 52. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.R141H του γονιδίου *PMM2*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0.03	Παθολογική
	PolyPhen2	0.835	Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	1	Παθολογική
	Mutation Assessor	4.07	Παθολογική
	FATHMM	-5.59	Παθολογική
	FATHMM-MKL	0.974	Παθολογική
	MetaSVM	0.763	Παθολογική
	MetaLR	0.951	Παθολογική
	Provean	-4.8	Παθολογική
	UMD	77	Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	34	Παθολογική
	DANN	0.999	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	1628	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	29	Συντηρημένη
	GERP	5.43	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαιης Σημασίας	

Με την μεθοδολογία του NGS, η παραλλαγή p.R141H του γονιδίου *PMM2* διαβάστηκε 71x (G: 32x και A: 39x). Η παραλλαγή αυτή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί και στον πατέρα του, ο οποίος την έφερε επίσης σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 79).



Εικόνα 79. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *PMM2* (NM_000303.3) του ασθενούς ΔΔΦ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.R141H (c.422G>A, p.Arg141His).

3.4.4.2 Παραλλαγή c.2190+4C>T του γονιδίου *ACTN4*

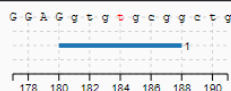
Η δεύτερη παθολογική παραλλαγή του ασθενή ΔΔΦ2 που ανιχνεύθηκε στα γονίδια που συνδέονται με νεφρωσικά νοσήματα είναι μία μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση στο 4^ο νουκλεοτίδιο μετά το σημείο ματίσματος του εξονίου 17 του γονιδίου *ACTN4*, η c.2190+4C>T (rs201878895). Τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 53) έδειξαν ότι η παραλλαγή αυτή είναι πιθανόν παθολογική, η οποία αποκαλύπτει ένα κρυφό σημείο ματίσματος 2 νουκλεοτίδια μετά το εξόνιο 17, μετατοπίζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης και οδηγώντας στον πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης 85 αμινοξέα μετά το εξόνιο 17, μειώνοντας την πρωτεΐνη κατά 96 αμινοξέα.

Η ακτίνη 4 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ACTN4*) εκφράζεται στα ποδοκύτταρα των σπειραματικών σωληναρίων των νεφρών και παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν σχετιστεί με την εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση, χαρακτηριστικό το οποίο παρουσιάζει ο ασθενής ΔΔΦ2.

Πίνακας 53. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής c.2190+4C>T του γονιδίου *ACTN4*.

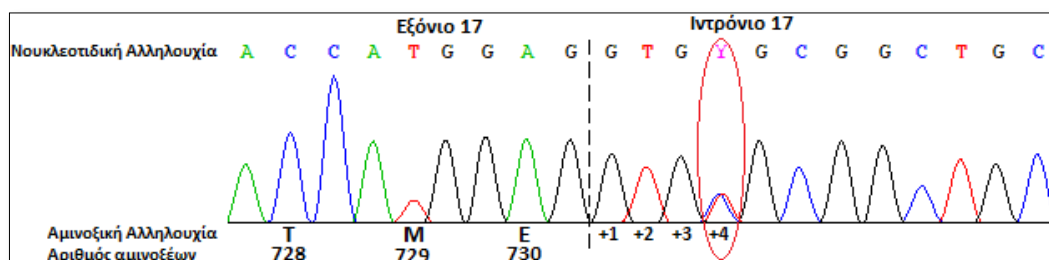
Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	Mutation Taster	1	Παθολογικό
	Human Splicing Finder	+61.31	Ενεργοποίηση μιας κρυφής θέσης ματίσματος, η οποία πιθανόν επηρεάζει το μάτισμα
ACMG			Αβέβαιης Σημασίας

Όπως φαίνεται και στο αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF (Εικόνα 80), η τιμή της φυσιολογικής αλληλουχίας είναι 43.78 <65, ενώ η αλληλουχία που φέρει την παραλλαγή έχει τιμή 70.62 >65 με αποτέλεσμα την πιθανή δημιουργία μιας νέας κρυφής θέσης ματίσματος δότη δυο νουκλεοτίδια μετά το εξόνιο 17 με τιμή +61.31% > +10%.

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation					
New Donor Site	1 - HSF Matrices		Activation of an intronic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.					
▼ HSF Matrices								
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
280	180	Donor	Ggtgcgcgg	GGTgtgcgg	43.78	70.62	NA	New site +61.31

Εικόνα 80. Αποτέλεσμα του προγράμματος ματίσματος HSF της παραλλαγή c.2190+4C>T του γονιδίου *ACTN4*.

Η παραλλαγή αυτή είχε διαβαστεί συνολικά 169x (C: 87x και T: 82x), και επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί και στη μητέρα του, η οποία την έφερε σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 81).



Εικόνα 81. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *ACTN4* (NM_004924.6) του ασθενούς ΔΔΦ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή c.2190+4C>T.

3.4.4.3 Παραλλαγή p.L46S του γονιδίου *SAMD9*

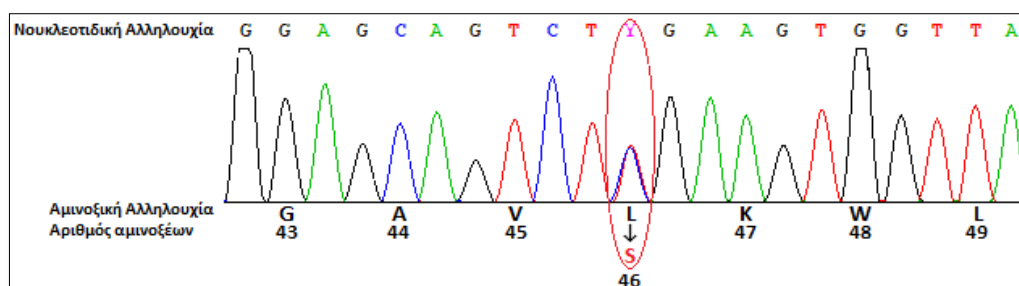
Ο ασθενής ΔΔΦ2 είναι ετεροζυγώτης για την παρερμηνεύσιμη παραλλαγή p.L46S (c.137T>C, rs754337797) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *SAMD9* (NM_017654.4). Η παραλλαγή είναι παθολογική σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής (Πίνακας 54). Η παραλλαγή αυτή είναι μία αντικατάσταση μετάπτωσης του 2^{ου} νουκλεοτιδίου από θυμίνη σε κυτοσίνη (TIG>TCG) του κωδικονίου Leu46. Η Λευκίνη ως υδρόφοβο αμινοξύ (ΥΧ: 1.80) στρεφόταν προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης και αντιδρούσε με άλλα αμινοξέα, ενώ η Σερίνη ως υδρόφιλο αμινοξύ (ΥΧ: -0.63) στρέφεται προς το εξωτερικό της πρωτεΐνης επηρεάζοντας πιθανόν την τριτοταγή δομή της και την λειτουργία της.

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SAMD9* συνδέονται με το σύνδρομο MIRAGE (Myelodysplasia, Infection, Restriction of growth, Adrenal hypoplasia, Genital phenotypes, and Enteropathy), το οποίο χαρακτηρίζεται από επινεφριδιακή ανεπάρκεια, αναιμία, σοβαρές μολύνσεις και ΔΔΦ. Κάποια από τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου αυτού παρουσιάζει ο ασθενής ΔΔΦ2 και συγκεκριμένα ατελή αρρενοποίηση έξω γεννητικών οργάνων και επινεφριδιακή ανεπάρκεια.

Πίνακας 54. *In silico* αποτελέσματα της παραλλαγής p.L46S του γονιδίου *SAMD9*.

Προγράμματα Βιοπληροφορικής		Τιμή	Πρόβλεψη
Αξιολόγηση γενετικών παραλλαγών	SIFT	0	Παθολογική
	PolyPhen2	0.998	Πιθανόν Παθολογική
	Mutation Taster	0.999	Παθολογική
	Mutation Assessor	3.08	Μέτρια Παθολογική
	FATHMM	-1.01	Καλοήθης
	FATHMM-MKL	0.965	Παθολογική
	MetaSVM	-0.179	Καλοήθης
	MetaLR	0.580	Παθολογική
	Provean	-2.61	Παθολογική
	UMD	69	Πιθανόν Παθολογική
	LRT	0	Παθολογική
	CADD	24.6	Παθολογική
	DANN	0.998	Παθολογική
Συντήρησης	Panther	455	Πιθανόν Παθολογική
	Grantham	145	Συντηρημένη
	GERP	4.79	Συντηρημένη
ACMG		Αβέβαις Σημασίας	

Η παραλλαγή p.L46S του γονιδίου *SAMD9* διαβάστηκε συνολικά 51x (T: 23x και C: 18x). Η παραλλαγή αυτή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στο παιδί αλλά όχι στους γονείς και συνάγεται ότι πρόκειται για αλλαγή εκ νέου (*de novo*) (Εικόνα 82).



Εικόνα 82. Ηλεκτροχρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *SAMD9* (NM_017654.4) του ασθενούς ΔΔΦ2 που φέρει την παθολογική παραλλαγή p.L46S (c.137T>C, p.Leu46Ser).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΜΣΔ MODY

Στην παρούσα εργασία 50 ασθενείς με ΜΣΔ MODY ελέγχθηκαν για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών σε 7 γονίδια MODY, τα *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* και *KCNJ11* με την μεθοδολογία του NGS. Τα υπόλοιπα 7 γονίδια, τα οποία συνδέονται με το ΜΣΔ MODY δεν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη καθώς είναι σπάνια, ασθενείς με παθολογικές παραλλαγές στα γονίδια αυτά παρουσίαζαν, εκτός από ΜΣΔ, επιπλέον φαινοτυπικά χαρακτηριστικά [16] και προκειμένου να μην αυξηθεί το κόστος του ελέγχου.

Στο 28% (14/50) των ασθενών ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8* (8%, 4/50), *GCK* (8%, 4/50), *HNF1A* (6%, 3/50), *HNF4A* (2%, 1/50) και *HNF1B* (4%, 2/50). Στο 6% (3/50) βρέθηκαν αβέβαιης σημασίας παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8*. Καμία παθολογική ή πιθανόν παθολογική παραλλαγή δεν βρέθηκε στα γονίδια *KCNJ11* και *INS*. Με την μέθοδο του MLPA ανιχνεύθηκαν δυο ασθενείς, οι οποίοι έφεραν *de novo* απάλειψη ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*, υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο διάγνωσης, δεδομένου ότι η διερεύνηση του αριθμού των αντιγράφων των εξονίων των υπό μελέτη γονιδίων δεν είναι δυνατή από την μεθοδολογία του NGS. Συνεπώς, το διαγνωστικό ποσοστό της παρούσας εργασίας έφτασε το 32% (16/50).

Πέντε νέες παθολογικές παραλλαγές ανιχνεύθηκαν, η p.C371X του γονιδίου *GCK*, η p.N402Y του γονιδίου *HNF1A*, η p.E285K του γονιδίου *HNF4A*, η p.M1514T και η p.S1386F του γονιδίου *ABCC8*.

Τέσσερις από τις παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν ήταν *de novo*, δύο παρερμηνεύσιμες στα γονίδια *GCK* και *HNF4A* και δύο απαλείψεις ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B*. Η αναφορά *de novo* παθολογικών παραλλαγών των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* και *HNF1B* σε μελέτες με μεγάλο αριθμό ασθενών με MODY συνεχώς αυξάνεται [198, 199], ενώ οι *de novo* απαλείψεις ολόκληρου του γονιδίου *HNF1B* είναι αρκετά συχνές [192, 200].

Καμία παθολογική παραλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στα γονίδια *KCNJ11* και *INS* στους 50 ασθενείς που μελετήθηκαν με το NGS, παρόλο που τα γονίδια είχαν καλή κάλυψη και διαβάσματα >230x. Ωστόσο, οι συχνοί πολυμορφισμοί p.K23E και p.V337I του γονιδίου *KCNJ11* και p.A1370S του γονιδίου *ABCC8*, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με το ΣΔ2 [201–203] ανιχνεύθηκαν στο 90% των ασθενών (45/50). Ο πολυμορφισμός c.-23T> A στο 3'UTR του γονιδίου *INS*, ο οποίος επίσης σχετίζεται με το ΣΔ2, ανιχνεύθηκε στο 96% (48/50) των ασθενών [205].

Στην ασθενή M4 ανιχνεύθηκαν 2 παθολογικές παραλλαγές, η μη νοηματική p.Y61X του γονιδίου *GCK* και η παρερμηνεύσιμη p.L135V του γονιδίου *ABCC8*. Ο φαινότυπος της

ασθενούς ήταν όμοιος με των GCK-MODY ασθενών, και συνεπώς θεωρήθηκε ότι μόνο η μη νοσηματική παραλλαγή του γονιδίου GCK ήταν υπεύθυνη για την ήπια υπεργλυκαιμία της ασθενούς, ενώ η παραλλαγή p.L135V του γονιδίου ABCC8 δεν υπολογίστηκε στο ποσοστό διάγνωσης των ασθενών με MODY και στο ποσοστό των ABCC8-MODY ευρημάτων. Η παραλλαγή p.L135V του γονιδίου ABCC8 είχε προηγουμένως βρεθεί σε ασθενή με ΣΥ [206]. Προκειμένου να αποδειχθεί η παθολογικότητα της παραλλαγής p.L135V του γονιδίου ABCC8, θα πρέπει να γίνουν *in vitro* ή *in vivo* πειράματα, όπως για παράδειγμα να αναπτυχθούν διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία θα φέρουν σε ετεροζυγωτία την παραλλαγή p.L135V του γονιδίου ABCC8 και στα οποία θα γίνουν βιοχημικές εξετάσεις για την εκτίμηση της επίδρασης της παραλλαγής p.L135V του γονιδίου ABCC8 στο φαινότυπο τους. Ακόμη, μελέτες αναφέρουν ασθενείς με MODY και διγονιδιακή κληρονομικότητα των GCK και HNF1A γονιδίων καθώς και των HNF1A και HNF4A γονιδίων [206–208]. Συγκεκριμένα, ασθενής με MODY έφερε την παθολογική παραλλαγή c.-160_-154dupTGGGGGT στο 5' UTR του γονιδίου HNF1A και την μη νοσηματική παραλλαγή p.Y61X του γονιδίου GCK [209], την οποία έφερε η ασθενής M4 της παρούσας μελέτης.

Στην παρούσα εργασία, το 12% των ασθενών βρέθηκε να φέρει παθολογικές ή αβέβαιης σημασίας παραλλαγές στο γονίδιο ABCC8, παρόλο που ο ABCC8-MODY θεωρείται σπάνιος (<1%) [16]. Αυτό το ποσοστό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αλληλούχηση κατά Sanger του γονιδίου ABCC8 δεν πραγματοποιούνταν στο εργαστήριο καθώς ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρα και κοστοβόρα λόγω του μεγάλου μεγέθους του γονιδίου (39 εξόνια). Ενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν συνδεθεί με τον Μονογονιδιακό ΣΔ, ενώ απενεργοποιητικές παθολογικές παραλλαγές του έχουν συνδεθεί με τον Συγγενή Υπερινσουλινισμό [209–211]. Ωστόσο, παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο ABCC8 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΣΥ, οι οποίοι κατά την ενηλικίωση παρουσίασαν ΣΔ [213].

Τρεις από τις παραλλαγές του γονιδίου ABCC8 που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με MODY στην παρούσα εργασία, οι p.L135V, p.A355T και p.R1353H, έχουν περιγραφεί προηγουμένως σε ασθενείς με ΣΥ [61, 193, 205]. Τέσσερις από τους ασθενείς της παρούσας εργασίας, οι οποίοι έφεραν παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου ABCC8, δεν παρουσίασαν νεογνική υπογλυκαιμία, ενώ για τους υπόλοιπους δεν ήταν γνωστή η πληροφορία αυτή.

Οι παραλλαγές p.R1353H, p.M1514T και p.S1386F του γονιδίου ABCC8 βρίσκονται εντός της περιοχής NBD2, ενώ οι p.A355T και p.E1206K βρίσκονται εντός των TMD1 και TMD2 περιοχών, αντιστοίχως. Οι παραλλαγές των TMD μπορούν να επηρεάσουν τη δομή

του διαύλου K_{ATP} , ενώ οι παραλλαγές του NBD2 μπορεί να επηρεάσουν τη δέσμευση του $ATP-Mg^{+2}$ οδηγώντας στο άνοιγμα του διαύλου K_{ATP} και την αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης [10].

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών της παρούσας εργασίας που φέρουν παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8* παρουσιάζουν φαινοτυπική ετερογένεια, η οποία κυμαίνεται από ήπιο φαινότυπο όμοιο με το *GCK-MODY* έως πιο βαρύ όμοιο με τους *HNF1A-MODY* και *HNF4A-MODY*. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών ήταν: τιμές γλυκόζης νηστείας από 103 - 365 mg/dl, HbA1c από 6.2% - 11.9%, ηλικία εμφάνισης ΣΔ από 9 – 42 ετών, BMI από 17.2 - 27.7 kg/m² και βάρος γέννησης από 2800 - 4100 g. Παρόμοια φαινοτυπική ετερογένεια έχει περιγραφεί στους ασθενείς με *ABCC8-MODY* που αναφέρονται στην βιβλιογραφία (Πίνακας 55) [34–37, 213–218].

Παρά το γεγονός ότι μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 14 διαφορετικοί τύποι *MODY*, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με *MODY* εξακολουθεί να παραμένει με αδιευκρίνιστη γενετική αιτιολογία. Η εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS, και ιδιαίτερα η μέθοδος WES, επιτρέπει τον προσδιορισμό νέων γονιδίων, τα οποία πιθανόν να συνδέονται με το *MODY*. Ωστόσο, παρά το σημαντικό αριθμό μελετών, τα οποία εφάρμοσαν WES, ακόμα το ποσοστό των αδιάγνωστων ασθενών με *MODY* δεν έχει μειωθεί [50, 213]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μη αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό όλων των γονιδίων, στην παρουσία ιντρονικών παθολογικών παραλλαγών, οι οποίες ενδεχομένως να δημιουργούν νέες θέσεις ματίσματος, καθώς και στην παρουσία παραλλαγών αβέβαιης σημασίας, όμως η αξιολόγηση της παθογένειας των παραπάνω παραλλαγών είναι ιδιαίτερα δύσκολη [163, 219].

Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή διαγνώστηκε το 28% των ασθενών που εξετάστηκαν σε επτά γονίδια *MODY* με την στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς, ενώ σε συνδυασμό με το MLPA το ποσοστό έφτασε στο 32%. Παρόλο που ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με *MODY* παραμένει χωρίς την ακριβή αναγνώριση του υπότυπου *MODY*, η εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS στη διάγνωση του ΜΣΔ παρείχε γρήγορα αποτελέσματα, υψηλή διαγνωστική ακρίβεια, δυνατότητα αλληλούχησης μεγάλων γονιδίων, όπως το *ABCC8* και ήταν λιγότερο κοστοβόρα σε σύγκριση με την αλληλούχηση κατά Sanger.

Πίνακας 55. Χαρακτηριστικά των *ABCC8*-MODY ασθενών που αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

Παθολογικές Παραλλαγές	Βιβλιογραφία	Φύλο	Κληρονομικότητα	Ηλικία έναρξης ΣΔ (έτη)	Στην διάγνωση		Βάρος Γέννησης (g)	BMI (kg/m ²)	Θεραπεία	Άλλα χαρακτηριστικά	Άλλος Φαινότυπος [Βιβλιογραφία]
					Γλυκόζη νηστείας mg/dl (mmol/l)	% HbA1c (mmol/mol)					
p.Glu100Lys	[35]	Άρρεν	Μητρική	42	Δ.Α.	Δ.Α.	3370	25	Τολβουταμίδη, Μετφορμίνη, Ινσουλίνη	-	-
p.Val222Met	[35]	Θήλυ	Μητρική	15	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	27.3	Ινσουλίνη	-	ΣΥ [35]
p.Gly214Arg	[35]		Άγνωστη							-	-
p.Gln485Arg	[35]	Θήλυ	Εκ νεού	13	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	26.6	Γλιβενκλαμίδη	-	-
p.Asn1245Asp	[35]	Άρρεν	Πατρική	14	Δ.Α.	Δ.Α.	3690	30	Ινσουλίνη	-	-
p.Arg1380His	[35]	Θήλυ	Πατρική	11	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	18	Ρεπαγλινίδη	-	Παροδικό ΝΣΔ [221] [222]
		Άρρεν	Άγνωστη	19	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	19.3	Γλικλαζίδη	-	
p.Val1523Leu	[35]	Άρρεν	Άγνωστη	36	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	26.5	Γλικλαζίδη	-	Μόνιμο ΝΣΔ [223]
p.Ala1366Thr ‡	[36]	Θήλυ	Άγνωστη	25	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	29.9	Σουλφονουλουρία, Μετφορμίνη	-	-
p.Arg74Gln	[214]	Θήλυ	Μητρική	9	175 (9.7)	Δ.Α.	2800	23.6	Μετφορμίνη	ήπια AK + ΝΥ	ΣΥ [224]
p.His103Tyr	[214]										-
p.Arg620Cys	[215]	Θήλυ	Άγνωστη	24	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Σουλφονουλουρία, Μετφορμίνη	ΣΔ κύησης	ΣΥ [225]
p.Ala1457Thr ‡	[37]	Άρρεν	Μητρική	27	432 (24)	Δ.Α.	Δ.Α.	25	Γλικλαζίδη, Αναστολείς SGLT2	Επιληψία ↑ LDL	ΣΥ [226]
p.Cys418Arg	[38]	Θήλυ	Άγνωστη	13	322 (17.8)	12 (108)	Δ.Α.	30.3	Μετφορμίνη Ινσουλίνη	-	ΣΥ [225]
p.Phe793Serfs*71 ‡	[216]	Άρρεν	Πατρική	32	409 (22.7)	7.9 (63)	Δ.Α.	25.26	Ινσουλίνη	-	-
c.4608+4A>G ‡	[216]		Μητρική								-
p.Ala1536Thr ‡	[216]	Άρρεν	Άγνωστη	10	148 (8.25)	9.4 (79)	Δ.Α.	25.46	OAD	↑ Τριγλυκερίδια ↑ Χοληστερόλη	-
p.Val84Ile	[217]	Άρρεν	Μητρική	12	110-115 (6.1-6.4)	5.9 (41)	2350 (δίδυμη κύηση)	18.1	Καμία	-	-
p.Ser1500Arg ‡	[218]	Θήλυ	Πατρική	10	290 (16.1)	9.8 (84)	Δ.Α.	20.5	Ινσουλίνη	RFX6 p.Ser520Thr	-
p.Asn781Ser	[219]	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	-	-
p.Gly1009Ser	[219]	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	-	-
p.Ala1473Thr	[219]	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	-	-
p.Glu971Val	[219]	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	-	-
p.Lys1023Gln	[219]	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	-	-

Δ.Α.: Δεν Αναφέρεται, SGLT2: Νάτριο/Γλυκόζη συμμεταφορέας 2 (Sodium/Glucose cotransporter 2), OAD: από του στόματος αντιδιαβητικά φάρμακα (Oral Antidiabetes Drugs), ΣΔ: Σακχαρώδης Διαβήτης, ΣΥ:Συγγενής Υπερινσουλινισμός, AK: Αναπτυξιακή Καθυστέρηση, ΝΥ: Νοητική Υστέρηση. ‡: Βάσει του NM_000352.4, μετάγραφο με μία Σερίνη λιγότερο στο εξόνιο

4.2 ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΙΣΜΟΣ

Στην παρούσα εργασία 17 ασθενείς με υπερινσουλινισμό ελέγχθηκαν για την παρουσία παθολογικών παραλλαγών των γονιδίων *GLUD1*, *HADH*, *INSR*, *SLC16A1*, *TRMT10A*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS*, *ABCC8* και *KCNJ11* με την μεθοδολογία του NGS. Στο 23.5% (4/17) των ασθενών ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *ABCC8*, *GCK*, *HNF4A*, ενώ στο 11.8% (2/17) των ασθενών βρέθηκαν αβέβαιης σημασίας παραλλαγές των γονιδίων *KCNJ11*, *INSR*, *HNF4A*.

Τρεις νέες παθολογικές παραλλαγές ανιχνεύθηκαν, η p.V71A του γονιδίου *GCK*, η p.R333P του γονιδίου *HNF4A* και η p.I445Sfs*5 του γονιδίου *ABCC8*.

Το μεγαλύτερο ποσοστό (11.8%, 2/17) των ασθενών αυτών έφεραν παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο *ABCC8*. Η ασθενής ΣΥ1, η οποία γεννήθηκε πρόωρα (34⁺⁶ εβδομάδα κύησης) και σε ηλικία 48 ημερών παρουσίασε παροδική ταχύπνοια, ίκτερο λόγω μειωμένης σίτισης, βολβοστροφή, κυάνωση και υποτονία λόγω υπογλυκαιμίας συνέπεια του υπερινσουλινισμού, βρέθηκε να φέρει σε ετεροζυγωτία την παραλλαγή p.G716D του γονιδίου *ABCC8*. Η ασθενής δεν ανταποκρινόταν στην θεραπεία με διαζοξίδη με αποτέλεσμα να της χορηγηθεί οκτρεοτίδη. Μέχρι σήμερα, η παραλλαγή αυτή έχει βρεθεί σε ετεροζυγωτία σε 3 ασθενείς με ΣΥ μη αποκρινόμενους στην θεραπεία με διαζοξίδη [205, 226, 227]. Δυο από τους ασθενείς αυτούς αναφέρεται ότι είχαν διάχυτη μορφή ΣΥ. Η παραλλαγή αυτή εντοπίζεται στην NBD1 περιοχή του γονιδίου και *in vitro* πειράματα λειτουργικότητας έδειξαν την επίδραση της παραλλαγής αυτής στην μειωμένη έκφραση του διαύλου K_{ATP} στην επιφάνεια των β-κυττάρων του παγκρέατος [228]. Η μη ανταπόκριση ως εκ τούτου των ασθενών αυτών σε θεραπεία με διαζοξίδη, είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι η διαζοξίδη δρά στο δίαυλο K_{ATP} .

Ο ασθενής ΣΥ2, ο οποίος παρουσίασε υπερινσουλινισμό κατά τον πρώτο μήνα ζωής του βρέθηκε να είναι σύνθετος ετεροζυγώτης για τις παραλλαγές p.R526C και p. I445Sfs*5 του γονιδίου *ABCC8*. Ο ασθενής αποκρινόταν στην θεραπεία με διαζοξίδη. Η παραλλαγή p.R526C, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή TMD1 του γονιδίου *ABCC8*, έχει αναφερθεί προηγουμένως σε σύνθετη ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία σε ασθενείς με ΣΥ αποκρινόμενους ή μη στη διαζοξίδη [228–231]. Πειράματα σε φυσιολογικά και κατευθυνόμενα μεταλλαγμένα HEK 293 κύτταρα (Human Embryonic Kidney) έδειξαν ότι μετά από την χορήγηση διαζοξίδης, στα HEK 293 κύτταρα που έφεραν τη παραλλαγή p.R526C σε ετεροζυγωτία ή σε σύνθετη ετεροζυγωτία με την p.H627Mfs*20 του γονιδίου *ABCC8*, ο δίαυλος K_{ATP} άνοιγε παρουσία διαζοξίδης [229].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε ο ασθενής ΣΥ3, ο οποίος εκτός από υπερινσουλινισμό είχε υποτονία και σύνδρομο Dandy Walker. Ασθενείς με συνδρομικό ΣΥ πιθανόν να παρουσιάζουν ελαττωματική γλυκοζυλίωση των υπομονάδων του διαύλου K_{ATP} (Congenital Disorders of Glycosylation Syndromes, CDG) [233]. Στον ασθενή αυτόν βρέθηκε σε ετεροζυγωτία η παραλλαγή p.S385C του γονιδίου *KCNJ11*, την οποία κληρονόμησε από την υγιή μητέρα του. Το γονίδιο *KCNJ11*, εκφράζεται και σε νευρικά κύτταρα με αποτέλεσμα παραλλαγές του γονιδίου να συμμετέχουν και στην εμφάνιση νευρολογικών παθήσεων [234]. Η συγκεκριμένη παραλλαγή ήταν αβέβαιης σημασίας με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση, ενώ η συχνότητα της στον πληθυσμό παρουσίαζε μεγάλη ετερογένεια. Στον Ευρωπαϊκό και Αμερικάνικο πληθυσμό η συχνότητα της ήταν 1%, στον Ασιατικό πληθυσμό ήταν 0%, ενώ στον Αφρικανικό 3%. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας διερευνήθηκε η συχνότητα της παραλλαγής στον Ελληνικό πληθυσμό και βρέθηκε να είναι πολυμορφισμός με συχνότητα 1.35% (> 1%).

Η παραλλαγή p.S385C του γονιδίου *KCNJ11*, σε μελέτη με μεγάλο αριθμό δειγμάτων αναφέρεται ότι αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 [203]. Ακόμη, έχει αναφερθεί ως καλοήθης σε καρδιολογική μελέτη σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου [235]. Η παραλλαγή p.S385C εντοπίζεται στο C- κυτταροπλασματικό άκρο της Kir6.2 υπομονάδας, και πειράματα λειτουργικότητας έδειξαν ότι η θέση S385 μετά από φωσφορυλίωση της λαμβάνει μέρος στην μετάδοση του σήματος μέσω του ERK2/MAPK μονοπατιού. Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση p.S385A ακυρώνει την μετάδοση του σήματος και η αντικατάσταση p.S385D μειώνει την ευαισθησία του διαύλου K_{ATP} στο ATP [236]. Συνεπώς, με βάση τα αντικρουόμενα δεδομένα που αναφέρθηκαν παραπάνω η παραλλαγή αυτή στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε ως αβέβαιης σημασίας.

Ο ασθενής ΣΥ6 βρέθηκε να φέρει μια παραλλαγή σε θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 12 του γονιδίου *INSR*, η οποία σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής είναι παθολογική. Ωστόσο, η παραλλαγή αυτή αναφέρεται σε δυο μελέτες ως πολυμορφισμός [236, 237]. Ακόμη, είναι καταγεγραμμένη ως πιθανόν καλοήθης στις βάσεις δεδομένων dbSNP και ClinVar, με συχνότητα εμφάνισης στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό 1%, στον Αμερικανικό και Νότια Ασιατικό πληθυσμό 0%, ενώ στον Αφρικανικό και Ανατολικό Ασιατικό πληθυσμό 4%. Η παραλλαγή αυτή για να εκτιμηθεί ως προς την παθολογικότητα της θα πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα ελέγχου της λειτουργικότητας του υποδοχέα ως προς την αναγνώριση της ινσουλίνης και της μετάδοσης του σήματος. Με βάση τα παραπάνω, η παραλλαγή χαρακτηρίστηκε ως αβέβαιης σημασίας στην συγκεκριμένη εργασία.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου με το MLPA των αδιάγνωστων ασθενών αλλά και των ασθενών ΣΥ3 και ΣΥ6 με τις αβέβαιης σημασίας παραλλαγές, με σκοπό την διερεύνηση απαλείψεων ή διπλασιασμών των εξονίων των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* και *ABCC8*, ήταν αρνητικά. Ακόμη, οι παραπάνω ασθενείς ελέγχθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger για την παρουσία των παθολογικών ιντρονικών παραλλαγών c.1333-1013A>G του γονιδίου *ABCC8* και c.636+471G>T του γονιδίου *HADH*, αλλά τα αποτελέσματα ήταν επίσης αρνητικά. Συνεπώς, ένα σημαντικά μεγάλο ποσοστό (65%, 11/17) ασθενών με ΣΥ παραμένει με αδιευκρίνιστη γενετική αιτιολογία. Πιθανόν, η αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος στους ασθενείς αυτούς να αποκαλύψει την συμβολή και άλλων γονιδίων στην παθογένεια του Συγγενή Υπερινσουλινισμού.

4.3 ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΥΠΟΦΥΣΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

4.3.1 Ασθενής ΠΥΑ1

Μετά από αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος του ασθενούς ΠΥΑ1, ο οποίος παρουσίαζε ΠΥΑ με κεντρικού τύπου υποθυρεοειδισμό, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, υποπλαστικούς όρχεις και πέος, έκτοπη θέση νευροϋπόφυσης και μίσχου καθώς και μικρού μεγέθους αλλά φυσιολογική αδενοϋπόφυση, ανιχνεύθηκαν 3 παθολογικές ετερόζυγες παραλλαγές, η p.R306Q του γονιδίου *HS6ST1*, η p.P566S του γονιδίου *IL17RD* και η p.Val95Ile του γονιδίου *SOX9*. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *HS6ST1* έχουν σχετιστεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και μικρή υπόφυση, παραλλαγές του γονιδίου *IL17RD* επίσης με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και παραλλαγές του γονιδίου *SOX9* με κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες και διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου.

Πιο αναλυτικά, το γονίδιο *HS6ST1* (Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase 1) μεγέθους 4223bp εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 2q14.3 και αποτελείται από 2 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν το ένζυμο 6-O-σουλφοτρανσφεράση 1 της θειικής ηπαράνης (411 αμινοξέα).

Κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, οι νευρώνες μεταναστεύουν από το σημείο που δημιουργήθηκαν έως τον εγκέφαλο. Για την διαδικασία αυτή απαιτούνται πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η θειική ηπαράνη, μια εξωκυττάρια γλυκοζαμινογλυκάνη, η οποία μετά από 6-O-θείωση της από το ένζυμο *HS6ST1* ρυθμίζει την πρόσδεση πολλών προσδετών-υποδοχέων κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου [239]. Για παράδειγμα, απαιτείται για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα *FGFR1* με τον προσδέτη *FGF8*, ο οποίος ως γνωστό εμπλέκεται στην παθογένεια του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού [240].

Οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *HS6ST1* μεταβιβάζονται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας και έχουν συνδεθεί με τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με ή χωρίς ανοσμία (OMIM #604846). Η παραλλαγή p.R306Q του γονιδίου *HS6ST1*, η οποία ανιχνεύθηκε στον ασθενή ΠΥΑ1, είναι καταγεγραμμένη στην βάση δεδομένων παθολογικών παραλλαγών HGMDB και έχει προηγουμένως αναφερθεί σε άρρενα ασθενή με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με ανοσμία. Συγκεκριμένα, ο ασθενής αυτός παρουσίαζε χαμηλά επίπεδα γοναδοτροφινών και τεστοστερόνης, ανεπάρκεια GnRH, μικροφαλλία αλλά όχι κρυψορχία. Επίσης, η MRI τους ασθενούς έδειξε φυσιολογικό υποθάλαμο και μικρή υπόφυση. Η μητέρα του ασθενούς, που του μεταβίβασε την παραλλαγή p.R306Q παρουσίασε καθυστερημένη ήβη και φυσιολογική οσμή [240]. Στο

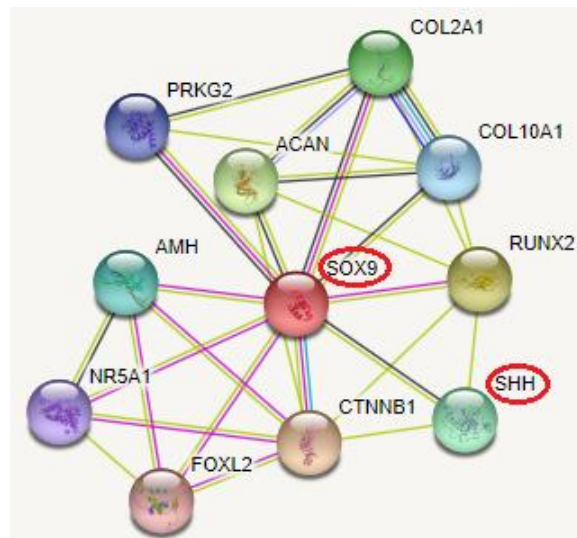
δικό μας ασθενή η μαγνητική τομογραφία της υποθαλαμο-υποφυσιακής περιοχής ανέδειξε φυσιολογική με μικρό μέγεθος αδενοϋπόφυση και έκτοπη νευροϋπόφυση. *In vitro* πειράματα διερεύνησης της ικανότητας μεταφοράς θειικών ομάδων από το καθαρό ανασυνδυασμένο ένζυμο που φέρει την παραλλαγή p.R306Q σε σύγκριση με το φυσιολογικό ένζυμο έδειξαν τη μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου που φέρει την παραλλαγή p.R306Q [240].

Το γονίδιο *IL17RD* (Interleukin 17 Receptor D) βρίσκεται στην χρωμοσωμική θέση 3p14.3, αποτελείται από 8698 bp και 13 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μια μεμβρανική πρωτεΐνη 739 αμινοξέων, μέρος του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 17. Το γονίδιο *IL17RD* φαίνεται ότι ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι του FGFR1/FGF8 και παθολογικές παραλλαγές του, οι οποίες μεταβιβάζονται είτε με αυτοσωμικό υπολειπόμενο είτε με αυτοσωμικό επικρατή τύπο (OMIM #606807), έχουν συνδεθεί με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με ή χωρίς ανοσμία και καθυστερημένη ήβη [240, 241].

Μολονότι, η παραλλαγή p.P566S είναι γνωστή και καταγεγραμμένη στην μηχανή γονιδιωματικής αναζήτησης Ensembl, δεν έχει αναφερθεί σε ασθενή. Η συχνότητα της παραλλαγής αυτής παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών σύμφωνα με το 1000 Genome Project. Συγκεκριμένα, η συχνότητα της παγκοσμίως είναι 1%, στους Ευρωπαίους 3% (Φιλανδία 4%, Αγγλία και Σκοτία 5%, Ιταλία 2%, Βόρεια και Δυτική Ευρώπη 3%, Ισπανία 1%), στους Αμερικανούς 2% (Κολομβία 4%, Καλιφόρνια 1%, Περου 0% και Πουέρτο Ρίκο 3%), στους Ασιάτες 0% και στους Αφρικανούς 0%.

Τα προγράμματα βιοπληροφορικής αξιολόγησης δείχνουν ότι η παραλλαγή p.P566S είναι πιθανόν παθολογική. Ενώ, τα προγράμματα βιοπληροφορικής GERP, PANTHER, Grantham, Mutation Taster αναδεικνύουν ότι το αμινοξύ Pro566 είναι συντηρημένο στο χρόνο για πάνω από 455 εκατομμύρια χρόνια και μεταξύ των θηλαστικών, πτηνών και αμφιβίων.

Το γονίδιο *SOX9* (SRY-box 9) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 17q24.3 και αποτελείται από 3 εξόνια (3931 bp), τα οποία κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα *SOX9* (509 αμινιξέα). Κατά την εμβρυογένεση, το *SOX9* εκφράζεται σε διάφορα όργανα, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, η υπόφυση, οι όρχεις κ.α. Οι πρωτεΐνες *SOX* παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση, εγκαθίδρυση ή διατήρηση των βλαστικών και προγονικών κυττάρων διαφόρων ιστών. Στα νευρικά βλαστοκύτταρα του εγκεφάλου, η έκφραση του *SOX9* φαίνεται να επάγεται από τον παράγοντα *SHH* [243]. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών *SOX9* και *SHH* φαίνεται και στην εικόνα 83.



Εικόνα 83. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης SOX9.

Κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη των ποντικών (e13.5-14.5), η πρωτεΐνη SOX9 εκφράζεται στα μεταναστευτικά νευρικά κύτταρα του κρανίου, η οποία κατανέμεται στο οπίσθιο και κυρίως στο μέσο του εγκεφάλου, ενώ αργότερα εκφράζεται στους χόνδρους και στα οστά [244]. Ακόμη, η πρωτεΐνη SOX9 έχει βρεθεί να λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό των κρανιοπροσωπικών χαρακτηριστικών, και ασθενείς με παραλλαγές του γονιδίου παρουσιάζουν μικρογναθία, χειλοσχιστία και προσωπικές δυσμορφίες [245].

Επιπλέον, κατά την εμβρυολογική ανάπτυξη των γονάδων και αφού τα προγονικά υποστηρικτικά κύτταρα (supporting cell precursors) έχουν αρχίσει τον σχηματισμό των κυττάρων Sertoli παράγοντας διάφορους παράγοντες, ο παράγοντας SRY μαζί με τον παράγοντα SF-1 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο *NR5A1*) επάγουν την έκφραση του γονιδίου *SOX9*. Μόλις η συγκέντρωση του παράγοντα SOX9 είναι επαρκής, ο ίδιος ο SOX9 καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *SRY*, ο οποίος μαζί με τον παράγοντα SF-1 επάγει την ίδια του την έκφραση με σκοπό την διαφοροποίηση των κυττάρων Sertoli και την ανάπτυξη των όρχεων [246]. Επιπλέον, ο μεταγραφικός παράγοντας SOX9 μαζί με τον παράγοντα SF-1 ρυθμίζουν την έκφραση της AMH (Anti-Müllerian Hormone), η οποία έχει στόχο την υποστροφή των πόρων του Müller στα άρρενα έμβρυα.

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SOX9* κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο και συνδέονται με την καμπομελική δυσπλασία (Campomelic Dysplasia) (OMIM # 608160), η οποία χαρακτηρίζεται από σκελετικές ανωμαλίες, ενώ κάποιοι 46,XY ασθενείς παρουσιάζουν και διαταραχές στην διαφοροποίηση του φύλου. Η βαρύτητα των χαρακτηριστικών αυτού του συνδρόμου ποικίλουν. Ασθενείς με ΔΔΦ και παραλλαγές στο γονίδιο αυτό χωρίς την εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών αναφέρεται ότι έχουν ακαμπομελική καμπομελική δυσπλασία (Acampomelic Campomelic Dysplasia) [247].

4.3.2 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΠΥΑ1

Η γνωστή p.R306Q παραλλαγή του γονιδίου *HS6ST1* που φέρει ο ασθενής ΠΥΑ1, ευθύνεται για το μικρό μέγεθος της υπόφυσης του και για την μικροφαλλία, χαρακτηριστικά τα οποία παρουσίαζε και ο ασθενής στον οποίο είχε βρεθεί προηγουμένως η ίδια παραλλαγή. Η παραλλαγή p.P566S του γονιδίου *IL17RD*, λόγω της σύνδεσης του γονιδίου με τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, πιθανόν ευθύνεται για την μικροφαλλία. Ενώ, η νέα παραλλαγή p.V95I που φέρει στο γονίδιο *SOX9* πιθανόν ευθύνεται για τα υποπλαστικά έξω γεννητικά του όργανα.

Ακόμη, το ένζυμο HS6ST1 παίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη των νευρώνων στον εγκέφαλο, γεγονός που το κάνει πιθανό υποψήφιο και για τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του ασθενούς ΠΥΑ1 (έκτοπη θέση οπίσθιου λοβού και μίσχου της υπόφυσης, ανεπάρκεια GH, TSH, κορτιζόλης), καθώς η ανάλυση των περισσότερων παραλλαγών δεν έχει αναδείξει ακόμα κάποια άλλη παθολογική παραλλαγή, η οποία να σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά της ΠΥΑ.

4.3.3 Ασθενής ΠΥΑ2

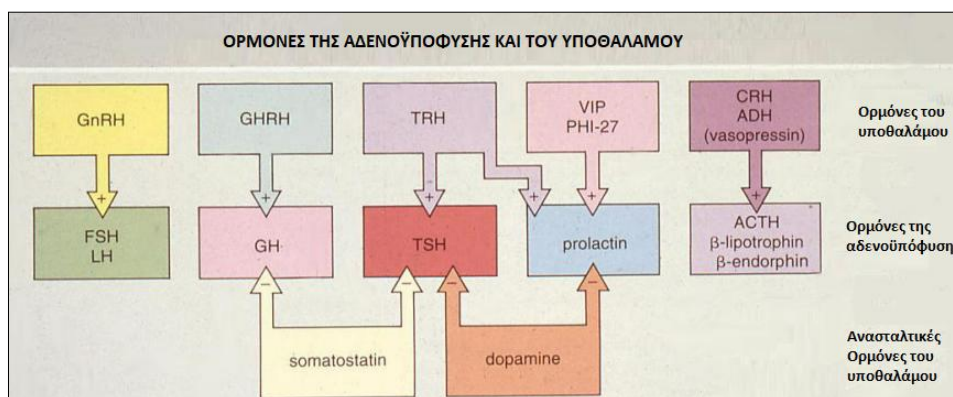
Μετά από αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος του ασθενούς ΠΥΑ2, ο οποίος παρουσίαζε ΠΥΑ με δευτεροπαθή υποθυρεοειδισμό, δευτεροπαθή επινεφριδιακή ανεπάρκεια, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης, μικρού μεγέθους όρχεις, μικροπείσμο, έκτοπη θέση νευροϋπόφυσης, απουσία μίσχου και υποπλαστική αδενοϋπόφυση, ανιχνεύθηκαν 3 παθολογικές ετερόζυγες παραλλαγές, η p.A42P του γονιδίου *BMP4*, η p.R73X του γονιδίου *GNRH1* και η p.Q32E του γονιδίου *SRA1*. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *BMP4* έχουν σχετιστεί με ΠΥΑ, υποπλαστική υπόφυση, κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες και των γονιδίων *GNRH1* και *SRA1* με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και μικροφαλλία.

Πιο αναλυτικά, το γονίδιο *BMP4* (Bone Morphogenetic Protein 4) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 14q22.2 και αποτελείται από 4 εξόνια 1931bp, εκ των οποίων το 3^ο και το 4^ο κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 408 αμινοξέων, μέλος της οικογένειας των παραγόντων TGF-β (Transforming Growth Factor-beta). Μελέτες σε *BMP4* knock-out ποντίκια, δηλαδή σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με απενεργοποιημένο το γονίδιο *BMP4*, έδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός συμβάλλει στην διαφοροποίηση των κυττάρων του θύλακα Rathke, από τον οποίο αναπτύσσεται η αδενοϋπόφυση και ο ενδιάμεσος λοβός της υπόφυσης [248]. Τα ποντίκια αυτά παρουσίασαν απλασία της υπόφυσης, ανωμαλίες του προσώπου, των νεφρών και σκελετικές ανωμαλίες [249]. Σε ασθενή με ΠΥΑ, υποπλαστική υπόφυση και

σκελετικές δυσπλασίες έχει αναφερθεί η *de novo* παθολογική παραλλαγή p.Arg300Pro του γονιδίου *BMP4* [249]. Παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο *BMP4* σχετίζονται με ένα εύρος φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όπως κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες, οφθαλμικά προβλήματα, υποσπαδία, δυσπλασία ή υποπλασία νεφρών, κ.α. [195].

Η παραλλαγή p.Ala42Pro που φέρει ο ασθενής ΠΥΑ2 σύμφωνα με τα προγράμματα βιοπληροφορικής δεν είναι παθολογική. Έχει βρεθεί, όμως, σε ασθενή και στην μητέρα της, οι οποίες παρουσίαζαν αγενεσία οδόντων και κανένα άλλο χαρακτηριστικό. Μελέτη της λειτουργικότητας του *BMP4* δεν έδειξαν να αλλάζει η λειτουργικότητα της παραλλαγμένης πρωτεΐνης, αλλά πειράματα ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν πιθανή αρνητική επιρροή της παραλλαγής αυτής στην αποθήκευση και στην μεταφορά της ώριμης πρωτεΐνης *BMP4* στο εξωκυττάριο στρώμα του αναπτυσσόμενου οδόντος [250]. Η συχνότητα της είναι χαμηλή με συχνότητα εμφάνισης παγκοσμίως 0.00028 (< 1%) και στην Ευρώπη (Non-Finnish European) 0.001 (< 1%) σύμφωνα με τη βάση δεδομένων gnomAD exomes.

Το γονίδιο *GNRH1* (Gonadotropin Releasing Hormone 1) αποτελείται από 3 εξόνια (1760bp) και εντοπίζεται στην χρωμοσωμική θέση 8p21.2. Κωδικοποιεί την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (GnRH) (92 αμινοξέων), η οποία παράγεται και εκκρίνεται από τον υποθάλαμο. Η δράση της GnRH είναι να διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροφινών LH και FSH από την αδenoϋπόφυση (Εικόνα 84).



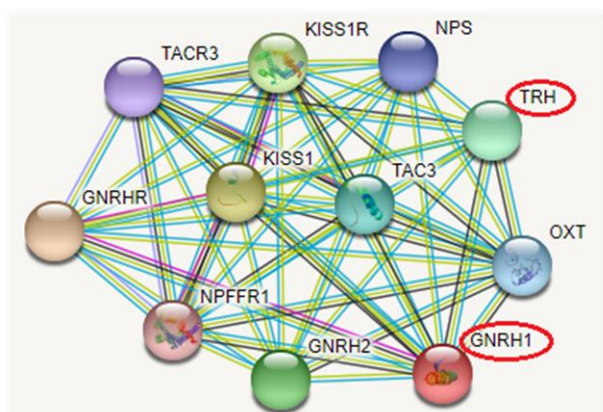
Εικόνα 84. Ορμόνες υπόφυσης και υποθαλάμου.

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *GNRH1* κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο (OMIM #152760) και συνδέονται με τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό με ή χωρίς ανοσμία.

Η παραλλαγή p.Arg73Ter, που φέρει ο ασθενής ΠΥΑ2, έχει αναφερθεί σε ετεροζυγωτία σε έναν 46,XY ασθενή με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και φυσιολογική κατά τα άλλα λειτουργία της υπόφυσης. Ο ασθενής παρουσίαζε βουβωνοκήλη, κρυφορχία και μικροφαλλία. Την παραλλαγή κληρονόμησε από τον πατέρα του, ο οποίος ήταν επίσης ετεροζυγώτης και παρουσίαζε ήπιο φαινότυπο καθυστερημένης ήβης. Στην οικογένεια

αυτή η παραλλαγή μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας και παρουσιάζει ποικίλη διεισδυτικότητα [251].

Επιπλέον, αναζήτηση των αλληλεπιδράσεων της ορμόνης GnRH με άλλες πρωτεΐνες στην βιβλιογραφία και με χρήση της βάσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων STRING, αποκάλυψε αλληλεπίδραση της GnRH με την εκλυτική ορμόνη της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TRH) του υποθαλάμου (Εικόνα 85). Πειράματα διέγερσης της TRH σε κύτταρα της αδενούποφυσης με τους υποθαλαμικούς παράγοντες GnRH, CRH και GRF έδειξαν ότι μόνο η GnRH προκαλεί σε σημαντικό ποσοστό έκκριση της TRH, υποδεικνύοντας πιθανή αποθήκευση της TRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης [252].



Εικόνα 85. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων της ορμόνης GnRH.

Το γονίδιο *SRA1* (Steroid Receptor RNA Activator 1) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 5q31.3 και αποτελείται από 5 εξόνια μεγέθους 2107bp, τα οποία κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 236 αμινοξέων. Το γονίδιο αυτό είναι λειτουργικό ως πρωτεΐνη αλλά και ως non-coding RNA. Ο ρόλος τους είναι η ενεργοποίηση των στεροειδικών υποδοχέων και ρύθμιση παραγόντων, όπως είναι το SF1 (*NR5A1*) και το DAX1 (*NROB1*) [253]. Συγκεκριμένα, το λειτουργικό non-coding RNA συμμετέχει άμεσα ή έμμεσα στην ενεργοποίηση του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR), των οιστρογόνων (ER), των γλυκοκορτικοειδών (GR), της προγεστερόνης (PR) και του θυρεοειδικού υποδοχέα (TR). Αναφέρεται επίσης ότι το γονίδιο *SRA1* είναι σημαντικό για την διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του εγκεφάλου, καθώς και για την μεταβολική του ομοιόσταση [254].

Ασθενής, ο οποίος φέρει την παθολογική παραλλαγή p.Gln32Glu, που φέρει και ο ασθενής ΠΥΑ2, και την παθολογική παραλλαγή p.Ile179Thr του γονιδίου *SRA1*, παρουσίαζε υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό χωρίς ανοσμία οφειλόμενο στα χαμηλά επίπεδα γοναδοτροφινών και τεστοστερόνης, μικροφαλλίας και κρυψορχίας που εμφάνιζε. Οι παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SRA1* μεταβιβάζονται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας [255].

4.3.4 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΠΥΑ2

Συμπερασματικά, στον ασθενή ΠΥΑ2, οι ετερόζυγες παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν στα γονίδια *GNRH1* και *SRA1* ευθύνονται για τον υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, την μικροφαλλία και πιθανόν για τον δευτεροπαθή υποθυρεοειδισμό, καθώς φαίνεται ότι η ορμόνη GnRH διεγείρει την έκλυση της TRH και ο *SRA1* αλληλεπιδρά άμεσα με τον θυρεοειδικό υποδοχέα στον εγκέφαλο και τον ενεργοποιεί.

Το γονίδιο *SRA1* εκφράζεται στους όρχεις, στην υπόφυση και στα επινεφρίδια, σύμφωνα με τα δεδομένα των NCBI και GTExPortal. Το γονίδιο *SRA1*, λόγω της έκφρασης του στα επινεφρίδια και της εμπλοκής του στην ρύθμιση των γονιδίων *SF1* και *DAX1*, πιθανόν να συμβάλει και στην επινεφριδιακή ανεπάρκεια του ασθενούς ΠΥΑ2.

Τέλος, το γονίδιο *BMP4* κατά την εμβρυογένεση συμβάλλει στην δημιουργία της υπόφυσης, ενώ παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου αυτού προκαλούν εκτός από ΠΥΑ και άλλα χαρακτηριστικά όπως σκελετικές ανωμαλίες. Συνεπώς, η παραλλαγή που φέρει ο ασθενής ΠΥΑ2 στο γονίδιο *BMP4* πιθανόν ευθύνεται για την ΠΥΑ, την υποπλαστική αδενοϋπόφυση, την έκτοπη θέση του οπίσθιου λοβού, την απουσία του μίσχου αλλά και την ήπια κορμική υποτονία.

4.4 ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ

4.4.1 Ασθενής ΔΔΦ1

Μετά από αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος του ασθενούς ΔΔΦ1 με καρυότυπο 46,XY, ο οποίος είχε ατελή αρρενοποίηση με έξω γεννητικά όργανα θήλεος, υποπλασία των κυττάρων Leydig και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ανιχνεύθηκαν 2 παθολογικές ετερόζυγες παραλλαγές, η p.R115C του γονιδίου *TACR3* και η p.T343M του γονιδίου *WNT7A*. Φυσιολογικά, το γονίδιο *TACR3*, το οποίο εκφράζεται από τα κύτταρα Leydig, εμπλέκεται στην διαφοροποίηση και ανάπτυξη των όρχεων, ενώ το γονίδιο *WNT7A* συμμετέχει στην υποστροφή των πόρων του Müller, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα AMHR2 της AMH.

Συγκεκριμένα, το γονίδιο *TACR3* (Tachykinin Receptor 3 ή Neurokinin B Receptor, NK3R) εδράζεται στην χρωμοσωμική θέση 4q24 και αποτελείται από 5 εξόνια με συνολικό μέγεθος 5359bp, τα οποία κωδικοποιούν τον υποδοχέα (465 αμινοξέα) της ταχυκινίνης 3 (Tachykinin 3, TAC3 ή Neurokinin B, NK3 ή Neuromedin-K). Ο υποδοχέας TACR3 αποτελείται από 7 υδροφοβικές διαμεμβρανικές περιοχές (Transmembrane Domains, TMDs), 3 εξωκυττάρια και 3 ενδοκυττάρια θηλειές (Extracellular and Intracellular Loops, ELs and ILs) και αλληλεπιδρά με G πρωτεΐνες ενεργοποιώντας το μονοπάτι φωσφατιδυλινοσιτόλης - ασβεστίου [256]. Το αμινοτελικό άκρο, οι ELs και οι TMDs φαίνεται να συμμετέχουν στην αναγνώριση και δέσμευση του προσδέτη, ενώ οι ILs εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού. Ακόμη, οι TMDs συμβάλλουν στην μετακίνηση του υποδοχέα στην μεμβράνη [256].

Το γονίδιο *TACR3* εκφράζεται στον υποθάλαμο και είναι ένα από τα γονίδια που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και ρύθμιση του άξονα Υποθάλαμου-Υπόφυσης-Γονάδων, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των γονάδων, την στεροειδογένεση, την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου και την γονιμότητα [257]. Μελέτες υποστηρίζουν την θετική επίδραση του TACR3 υποδοχέα και του προσδέτη του στην έκκριση της GnRH, των γοναδοτροφινών (LH, FSH) και κατ' επέκταση των ορμονών που εκκρίνονται από τις γονάδες [258]. Συγκεκριμένα, ετερόζυγες παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου έχουν μέχρι σήμερα βρεθεί σε ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό χωρίς ανοσμία (HH11) [258, 259], οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο (OMIM #162332).

Εμβρυολογικά, έχει δειχθεί ότι η έκφραση του γονιδίου *TACR3* επηρεάζεται από την έκφραση του γονιδίου *WNT4*. Φυσιολογικά, στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ωοθηκών το γονίδιο *WNT4* προωθεί την καταστολή του γονιδίου *TACR3*, το οποίο εκφράζεται και στα

κύτταρα Leydig, εμποδίζοντας την διαφοροποίηση και ανάπτυξη των όρχεων [261]. Είναι, λοιπόν, εμφανής η συμμετοχή του *TACR3*, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην διαφοροποίηση του αρρενος γεννητικού συστήματος όμως ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

Η παραλλαγή p.R115C του γονιδίου *TACR3*, την οποία φέρει ο ασθενής ΔΔΦ1, δεν εντοπίστηκε στην ελεύθερης πρόσβασης έκδοση του HGMD ούτε στην βιβλιογραφία, ενώ ήταν καταγεγραμμένη στην μηχανή γονιδιωματικής αναζήτησης ENSEMBL (Genome Browser) με συχνότητα 0.000399% (<1%) παγκοσμίως και 0% στην Ευρώπη με βάση το 1000 Genomes Project.

Το γονίδιο *WNT7A* (Wnt Family Member 7A) με μέγεθος 4041bp εντοπίζεται στην χρωμοσωμική θέση 3p25.1 και αποτελείται από 4 εξόνια, που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 349 αμινοξέων (39 kDa). Η πρωτεΐνη αυτή μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT - β κατενίνης λαμβάνει μέρος κατά την εμβρυογένεση συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των γονάδων.

Στα πρώιμα εμβρυολογικά στάδια, όπου οι γονάδες είναι ακόμα αδιαφοροποίητες, οι πόροι του Müller και του Wolff συνυπάρχουν. Κατά την διαφοροποίηση των γονάδων σε όρχεις, οι πόροι Müller υποστρέφονται, λόγω έκκρισης της αντιμυλλεριανής ορμόνης (AMH) από τους όρχεις και ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt στους πόρους του Müller. Οι παράγοντες WNT, και συγκεκριμένα το WNT7A, εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων του Müller. Ο WNT7A ενεργοποιεί τον υποδοχέα AMHR2 της AMH στα μεσεγχοματικά κύτταρα των πόρων του Müller, με σκοπό την καταστολή και υποστροφή των πόρων αυτών και τελικά την διαφοροποίηση των πόρων του Wolff [262].

Μελέτες σε *WNT7A*^(-/) ποντίκια έδειξαν ότι η υποστροφή των πόρων Müller δεν είναι εφικτή και τελικά διαφοροποιούνται σε έσω γεννητικά όργανα θήλεος. Συνεπώς, η απουσία της τεστοστερόνης και της AMH ορμόνης προωθούν την υποστροφή των πόρων Wolff και κατά συνέπεια την διαφοροποίηση και ανάπτυξη των πόρων του Müller σε γεννητικά όργανα θήλεος [262].

Σύμφωνα με το OMIM (#601570), παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *WNT7A* κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο και συνδέονται με τα σύνδρομα Fuhrmann και Al-Awadi-Raas-Rothschild, τα οποία χαρακτηρίζονται από ανατομικές διαταραχές του γεννητικού συστήματος και των άκρων [263].

Η παραλλαγή p.T343M του γονιδίου *WNT7A*, που φέρει ο ασθενής ΔΔΦ1, δεν εντοπίστηκε στην ελεύθερης πρόσβασης έκδοση του HGMD ούτε στην βιβλιογραφία, ενώ ήταν καταγεγραμμένη στην γονιδιωματική μηχανή αναζήτησης ENSEMBL (Genome

Browser) με συχνότητα 0.000218% (<1%) παγκοσμίως και 0.000120% (<1%) στην Ευρώπη (Non-Finnish European) με βάση το gnomAD exomes.

4.4.2 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΔΔΦ1

Συμπερασματικά, οι παθολογικές παραλλαγές p.R115C του γονιδίου *TACR3* και p.T343M του γονιδίου *WNT7A* που φέρει ο ασθενής ΔΔΦ1 δεν έχουν συνδεθεί ακόμη με κάποιο νόσημα. Η παραλλαγή p.R115C βρίσκεται στην περιοχή IL1 του υποδοχέα *TACR3*, στην οποία τα κατάλοιπα αργινίνης παίζουν σημαντικό ρόλο για την έναρξη της σηματοδότησης μέσω της φωσφατιδυλινοσιτόλης [256], ενώ η παραλλαγή p.T343M του γονιδίου *WNT7A* πιθανόν είναι απενεργοποιητική και συνεπώς η υποτροφή των πόρων του Müller δεν είναι εφικτή, με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται σε γεννητικά όργανα θήλεος. Ο συνδυασμός των δυο παραλλαγών που αναγνωρίστηκαν στον ασθενή ΔΔΦ1 είναι πιθανόν ότι ευθύνονται για την παρουσία των θήλεων έξω γεννητικών οργάνων θήλεος, την υποπλασία των κυττάρων Leydig και των χαμηλών επιπέδων της τεστοστερόνης.

4.4.3 Ασθενής ΔΔΦ2

Μετά από αλληλούχηση όλων των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος του ασθενούς ΔΔΦ2 με καρυότυπο 46,XY, ο οποίος παρουσίαζε διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου, επινεφριδιακή ανεπάρκεια, Triple A Σύνδρομο (Achalasia-Addison-Alacrimia Syndrome) και εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (Focal Segmental Glomerulosclerosis, FSGS), ανιχνεύθηκαν 3 παθολογικές ετεροζυγες παραλλαγές, η p.L46S του γονιδίου *SAMD9*, η p.R141H του γονιδίου *PMM2* και η c.2190+4C>T του γονιδίου *ACTN4*. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *SAMD9* έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο MIRAGE, το οποίο χαρακτηρίζεται και από επινεφριδιακή ανεπάρκεια και ΔΔΦ, ενώ παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *PMM2* και *ACTN4* έχουν συνδεθεί με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση.

Πιο αναλυτικά, το γονίδιο *SAMD9* (Sterile Alpha Motif Domain Containing 9), το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 7q21.2, έχει μέγεθος 6806 bp και αποτελείται από 3 εξόνια εκ των οποίων μόνο το 3^ο μεταφράζεται σε πρωτεΐνη 1589 αμινοξέων. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία καταστέλλει την ανάπτυξη. Φυσιολογικά, η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται για την καταστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, έχουν βρεθεί παθολογικές παραλλαγές που οδηγούν σε υπερέκφραση του γονιδίου *SAMD9* να προκαλούν μια πολυσυστηματική διαταραχή περιορισμού ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, οι παραλλαγές αυτές έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο MIRAGE (Myelodysplasia, Infection,

Restriction of growth, Adrenal hypoplasia, Genital phenotypes, and Enteropathy) και κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο (OMIM# 617053, MIRAGE Syndrome) [264].

Ασθενείς (46,XY) με αποκλειστικά *de novo* παθολογικές παραλλαγές στο γονίδιο αυτό παρουσιάζουν ανεπάρκεια και υποπλασία των επινεφριδίων, αναιμία, σοβαρές λοιμώξεις και διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου [265]. Παθολογική παραλλαγή στο γονίδιο αυτό έχει πρόσφατα αναφερθεί και σε μία ασθενή 46,XX με δυσγενεσία των ωοθηκών αλλά χωρίς επινεφριδιακή ανεπάρκεια, σε αντίθεση με όλους τους 46,XY ασθενείς με σύνδρομο MIRAGE, οι οποίοι μέχρι σήμερα αναφέρεται να έχουν και επινεφριδιακή ανεπάρκεια [266]. Ο 46,XY ασθενής μας παρουσιάζει ατελή αρρενοποίηση έξω γεννητικών οργάνων και επινεφριδιακή ανεπάρκεια.

Η παραλλαγή p.L46S του ασθενή ΔΔΦ2 δεν βρέθηκε στην ελεύθερης πρόσβασης έκδοση του HGMD ούτε στην βιβλιογραφία, υπάρχει όμως στο Ensembl με συχνότητα εμφάνισης 4.03216e-06% <1% παγκοσμίως και 0% στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (Non-Finnish European) με βάση το gnomAD exomes.

Το γονίδιο *PMM2* (Phosphomannomutase 2), το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 16p13.2, έχει μέγεθος 2285bp και αποτελείται από 8 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 246 αμινοξέων. Το ένζυμο *PMM2* καταλύει, στο μονοπάτι της γλυκοζυλίωσης, την μετατροπή της 6-φωσφορικής μαννόζης σε 1-φωσφορική μαννόζη, απαραίτητο προϊόν για την σύνθεση της δολιχόλης [267]. Η γλυκοζυλίωση είναι μία σημαντική διαδικασία κατά την ανάπτυξη και λειτουργία των εμβρυϊκών νεφρών [268].

Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου αυτού μεταβιβάζονται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και συνδέονται με την συγγενή διαταραχή της γλυκοζυλίωσης τύπου 1a, το οποίο προκαλεί μεταξύ άλλων και νεφρωσικό σύνδρομο (OMIM# 212065, Congenital Disorder of Glycosylation, Type Ia). Ο ασθενής μας, πέραν των αμφίβολων έξω γεννητικών οργάνων και της επινεφριδιακής ανεπάρκειας ανέπτυξε και νεφρωσικό σύνδρομο σε έδαφος εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης.

Η CDG είναι μία πολυσυστημική διαταραχή που επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ήπαρ, το νεφρό, το γαστρεντερικό, την καρδιά, ενώ προκαλεί ενδοκρινολογική δυσλειτουργία και διαταραχές στην πήξη του αίματος [268]. Η παθολογική παραλλαγή p.R141H του γονιδίου *PMM2* είναι συχνή μεταξύ των ασθενών με νεφρωσικό σύνδρομο και φαίνεται να επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, μελέτες ενζυμικής ενεργότητας του *PMM2* δείχνουν ότι η παραλλαγή p.R141H είναι σοβαρή καθώς επηρεάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να χάνει την λειτουργικότητα της [267],

[269]. Η συχνότητα της παραλλαγής p.R141H είναι 0.004% <1% παγκοσμίως και 0.009% <1% στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό σύμφωνα με το 1000 Genomes Project.

Το γονίδιο *ACTN4* (Actinin Alpha 4) βρίσκεται στη θέση 19q13.2. Αποτελείται από 21 εξόνια μεγέθους 4990 bp, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνη μεγέθους 911 αμινοξέων. Η α-ακτίνη 4 εκφράζεται στα ποδοκύτταρα των σπειραματικών σωληναρίων των νεφρών. Παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ACTN4*, οι οποίες κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο, έχουν συνδεθεί με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (OMIM# 603278, FSGS1). Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, ο ασθενής μας, πέραν των αμφίβολων έξω γεννητικών οργάνων και της επινεφριδιακής ανεπάρκειας ανέπτυξε και νεφρωσικό σύνδρομο σε έδαφος εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης.

Η FSGS είναι ένα συχνό νόσημα των νεφρών ειδικά στους Αφρικανούς, το οποίο χαρακτηρίζεται από σκλήρυνση κάποιων τμημάτων των σπειραματικών σωληναρίων των νεφρών και αυξημένη έκκριση πρωτεϊνών στα ούρα, χαρακτηριστικά τα οποία οδηγούν σε νεφρική δυσλειτουργία έως και νεφρική ανεπάρκεια, η οποία μπορεί να χρήζει μεταμόσχευσης [270].

Η παραλλαγή c.2190+4C>T που ανιχνεύθηκε στην θέση ματίσματος δεν υπάρχει στην ελεύθερης πρόσβασης έκδοση του HGMD ούτε στην βιβλιογραφία, ενώ υπάρχει στο Ensembl με συχνότητα εμφάνισης 0.00019% (<1%) παγκοσμίως και 0% στην Ευρώπη σύμφωνα με το 1000 Genomes Project.

4.4.4 Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου του ασθενούς ΔΔΦ2

Συμπερασματικά, η παραλλαγή p.L46S του γονιδίου *SAMD9* που έφερε ο ασθενής ΔΔΦ2 (46,XY) είναι επίσης *de novo*, όπως αναφέρεται και στις περιπτώσεις ασθενών 46,XY MIRAGE της βιβλιογραφίας, και πιθανόν ευθύνεται για τις διαταραχές διαφοροποίησης του φύλου και την επινεφριδιακή ανεπάρκεια του ασθενούς. Η παραλλαγή που ανιχνεύθηκε στην θέση ματίσματος του γονιδίου *ACTN4* και η παραλλαγή p.R141H του γονιδίου *PMM2* πιθανόν ευθύνονται για την εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση του ασθενή. Ωστόσο, μελέτες λειτουργικότητας χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν την παθολογικότητα της παραλλαγής c.2190+4C>T του γονιδίου *ACTN4*, ενώ δεν αναφέρεται στο ιστορικό του ασθενούς εάν η μητέρα του, η οποία επίσης φέρει την παραλλαγή αυτή, είχε εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS (TGP και WES) στην γενετική διάγνωση ασθενών με ενδοκρινολογικά νοσήματα αποτέλεσε ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο καθώς επέτρεψε την παράλληλη και μαζική αλληλούχηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε πολλά γονίδια ταυτόχρονα, αύξησε την ακρίβεια και την ταχύτητα της διάγνωσης και μείωσε το κόστος συγκριτικά με την διαδοχική αλληλούχηση κατά Sanger. Η εφαρμογή του TGP επέτρεψε την αλληλούχηση μεγάλων γονιδίων, όπως τα γονίδια *ABCC8* (39 εξόνια) και *INSR* (22 εξόνια), των οποίων ο έλεγχος είναι χρονοβόρος και κοστοβόρος με την αλληλούχηση κατά Sanger. Η εφαρμογή του WES επέτρεψε την αλληλούχηση του 88.92%, 90.72%, 94.48% και 87.14% των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδιώματος με >20x διαβάσματα 2 ασθενών με ΠΥΑ και 2 ασθενών με ΔΔΦ αντίστοιχα καθώς και την αναγνώριση παθολογικών παραλλαγών στους ασθενείς αυτούς, οι οποίοι παρουσίαζαν ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS σε ομάδα γονιδίων (TGP) τα οποία συνδέονται με τον ΜΣΔ MODY επιτεύχθηκε η αναγνώριση της γενετικής αιτιολογίας στο 28% των ασθενών με MODY. Το 12% των ασθενών έφεραν παθολογική ή αβέβαιης σημασίας παραλλαγή του γονιδίου *ABCC8*, το 8% των ασθενών έφεραν παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *GCK*, το 6% έφεραν παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *HNF1A*, το 4% του γονιδίου *HNF1B* και το 2% του γονιδίου *HNF4A*. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με MODY έφεραν παθολογική ή αβέβαιης σημασίας παραλλαγή του γονιδίου *ABCC8*. Το εύρημα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο αφού σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, η συχνότητα των ασθενών με *ABCC8*-MODY είναι <1%. Επιπλέον, με την εφαρμογή του TGP ανιχνεύθηκαν 5 νέες παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* και *ABCC8* και 2 εκ νέου (de novo) παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *GCK* και *HNF4A* σε ασθενείς με MODY. Καμία παθολογική παραλλαγή των γονιδίων *KCNJ11* και *INS* δεν ανιχνεύθηκε στους 50 ασθενείς με MODY που μελετήθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι υπότυποι *KCNJ11*-MODY και *INS*-MODY είναι σπάνιοι.

Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας του NGS σε ομάδα γονιδίων, τα οποία συνδέονται με τον Συγγενή Υπερινσουλινισμό (ΣΥ) επιτεύχθηκε η αναγνώριση της γενετικής αιτιολογίας στο 23.5% των ασθενών με ΣΥ, ενώ το 11.8% των ασθενών έφεραν παραλλαγές αβέβαιης σημασίας. Το 11.8% των ασθενών με ΣΥ έφερε παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8*, το 5.9% του γονιδίου *GCK* και το 5.9% του γονιδίου *HNF4A*. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με ΣΥ έφερε παθολογικές παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8*, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι παραλλαγές του γονιδίου *ABCC8* αποτελούν τη συχνότερη γενετική

αιτία του ΣΥ. Επιπλέον, με την εφαρμογή του TGP ανιχνεύθηκαν 3 νέες παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *GCK*, *HNF4A* και *ABCC8* σε ασθενείς με ΣΥ. Δεν ανιχνεύθηκαν παθολογικές παραλλαγές των γονιδίων *GLUD1*, *HADH*, *SLC16A1*, *TRMT10A*, *INS* και *HNF1A*, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι υπότυποι αυτοί είναι σπάνιοι, παρά τον χαμηλό αριθμό ασθενών με ΣΥ που μελετήθηκαν.

Η εφαρμογή του WES επέτρεψε την αναγνώριση της γενετικής αιτιολογίας σχεδόν όλων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΔΔΦ και ορισμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΠΥΑ βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφικής γνώσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι με την χρήση του WES ανιχνεύθηκε μια νέα παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *SOX9* σε ασθενή με ΠΥΑ και μια εκ νέου (*de novo*) παθολογική παραλλαγή του γονιδίου *SAMD9* σε ασθενή με ΔΔΦ. Το γεγονός ότι δεν επιτεύχθηκε η μοριακή αιτιολόγηση όλων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των ασθενών με ΠΥΑ και ΔΔΦ, μπορεί να οφείλεται στην πιθανή παρουσία επιπλέον παθολογικών παραλλαγών υπεύθυνων για τον φαινότυπο τους είτε στο 5-13% των κωδικοποιουσών περιοχών, οι οποίες δεν κατέστη δυνατόν να αλληλουχηθούν από την μεθοδολογία WES που χρησιμοποιήθηκε, είτε σε νουκλεοτιδικές περιοχές με μικρό αριθμό διαβασμάτων <30x. Επιπλέον, οι ασθενείς πιθανόν να φέρουν παθολογικές παραλλαγές υπεύθυνες για το φαινότυπο τους σε νουκλεοτιδικές περιοχές που δεν καλύπτονται από το WES, όπως είναι οι ιντρονικές και οι ρυθμιστικές περιοχές. Επίσης, πιθανές αιτίες, στις οποίες μπορεί να οφείλονται οι φαινότυποι των ασθενών με ΠΥΑ και ΔΔΦ, αποτελούν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων λόγω μεθυλίωσης γονιδίων και ιστονών ή λόγω υπερέκφρασης miRNAs, τα οποία προκαλούν την αποσιώπηση γονιδίων, επιγενετικά και μοριακά αίτια τα οποία δεν ανιχνεύονται με το WES.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνεισφορά των παθολογικών παραλλαγών στον φαινότυπο των ασθενών με ΠΥΑ και ΔΔΦ μετά την εφαρμογή του WES, είναι απαραίτητη η διενέργεια *in vivo* ή/και *in vitro* πειραμάτων. Λειτουργικές μελέτες για την επίδραση των παραλλαγών αυτών στην λειτουργία των γονιδίων, πιθανόν να αποκαλύπτan το εύρος των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που πιθανόν προκαλούν. Ωστόσο, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν πειράματα για την διερεύνηση της επίδρασης των παραλλαγών που ανιχνεύθηκαν στην λειτουργία των γονιδίων.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, σημαντικός αριθμός ασθενών με MODY και ΣΥ παραμένουν χωρίς γενετική διάγνωση και μετά την εφαρμογή του TGP. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και στην βιβλιογραφία. Προκειμένου να

αυξηθεί το ποσοστό διάγνωσης προτείνεται η εφαρμογή του NGS σε μεγαλύτερη ομάδα γονιδίων που συνδέονται με τα νοσήματα και εφόσον δεν μειωθεί το ποσοστό των αδιάγνωστων γενετικά ασθενών, προτείνεται η εφαρμογή του WES σε ένα μικρό αριθμό καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με MODY και ΣΥ, η οποία πιθανόν να επιτρέψει την ανίχνευση νέων γονιδίων, τα οποία συνδέονται με τα δυο αυτά νοσήματα.

Για την γενετική διάγνωση ασθενών με ΠΥΑ και ΔΔΦ, αρχικά συνιστάται (οδηγίες του ASHG) η εκ νέου ανάλυση των αποτελεσμάτων του WES από άλλον ερευνητή τουλάχιστον ένα χρόνο μετά την πρώτη ανάλυση [151] προκειμένου οι πληροφορίες των βάσεων δεδομένων και της βιβλιογραφίας που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν ανανεωθεί. Επιπλέον, προτείνεται ο σχεδιασμός δύο ομάδων γονιδίων, τα οποία συνδέονται με τα νοσήματα ΠΥΑ και ΔΔΦ αντίστοιχα, προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία παθολογικών παραλλαγών στα γονίδια αυτά με την εφαρμογή του NGS TGP. Η πρώτη ομάδα προτείνεται να περιλαμβάνει όλα τα γνωστά γονίδια που συνδέονται με την ΠΥΑ (Πίνακας 3) καθώς και τα γονίδια *HS6ST1*, *IL17RD*, *SOX9*, *GNRH1* και *SRA1*, τα οποία ανιχνεύθηκαν να φέρουν παθολογικές παραλλαγές σε 2 ασθενείς με ΠΥΑ που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Αντίστοιχα, η δεύτερη ομάδα προτείνεται να περιλαμβάνει όλα τα γνωστά γονίδια που συνδέονται με τις ΔΔΦ (Πίνακας 46) καθώς και τα γονίδια *SAMD9*, *TACR3* και *WNT7A*, τα οποία ανιχνεύθηκαν να φέρουν παθολογικές παραλλαγές σε 2 ασθενείς με ΔΔΦ της παρούσας διατριβής με την χρήση του WES. Η χρήση της μεθοδολογίας του TGP στις 2 παραπάνω ομάδες γονιδίων σε ασθενείς με ΠΥΑ και ΔΔΦ, θα αυξήσει το % ποσοστό κάλυψης των γονιδίων-στόχων καθώς και τον αριθμό των διαβασμάτων και επιπλέον είναι οικονομικότερη και ταχύτερη συγκρινόμενη με το WES.

Συμπερασματικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή επιβεβαιώνει την χρησιμότητα της εφαρμογής της μεθοδολογίας αλληλούχησης επόμενης γενιάς στην γενετική διάγνωση ασθενών με ενδοκρινολογικά νοσήματα, αφού επέτρεψε την αλληλούχηση πολλών γονιδίων σε πολλούς ασθενείς ταυτόχρονα αλλά και την αλληλούχηση μεγάλων γονιδίων (π.χ. *ABCC8* και *INSR*), τα οποία ήταν δύσκολο να ελεγχθούν με την αλληλούχηση κατά Sanger και είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η διαγνωστική ακρίβεια και να μειωθεί σημαντικά ο χρόνος διάγνωσης. Η εφαρμογή του NGS (TGP και WES) επέτρεψε την αναγνώριση γνωστών και νέων παθολογικών παραλλαγών, εξηγώντας τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν. Η έγκαιρη και ακριβής γενετική διάγνωση είναι σημαντική αφού υποδεικνύει την κατάλληλη θεραπεία, όπου αυτή χρειάζεται, βοηθά στην πρόγνωση και έγκαιρη αναγνώριση συνοδών χαρακτηριστικών του νοσήματος,

καθορίζει την απόφαση για το ανατομικό φύλο των ασθενών με ΔΔΦ και προσφέρει γενετική συμβουλευτική στους ασθενείς και στην οικογένειά τους.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. J. Vander, J. H. Sherman, and D. S. Luciano, *Human physiology : the mechanisms of body function*. McGraw-Hill, 2001.
- [2] C. de Bruin and A. Dauber, 'Insights from exome sequencing for endocrine disorders', *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 11, no. 8, pp. 455–464, Aug. 2015.
- [3] A. Tsatsoulis, E. Laspa, A. Fountas, A. Τσατσούλης, E. Λάσπα, and A. Φούντας, 'Σύγχρονο εγχειρίδιο ενδοκρινολογίας', Feb. 2016.
- [4] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, 'Glycogen Metabolism', 2002.
- [5] P. V Röder, B. Wu, Y. Liu, and W. Han, 'Pancreatic regulation of glucose homeostasis', *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, no. 3, p. e219, 2016.
- [6] D. H. Bonfanti *et al.*, 'ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus', *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 7–8, pp. 476–482, May 2015.
- [7] K. Bennett, C. James, and K. Hussain, 'Pancreatic β -cell KATP channels: Hypoglycaemia and hyperglycaemia', *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 11, no. 3, pp. 157–163, Sep. 2010.
- [8] A. L. Gloyn, J. Siddiqui, and S. Ellard, 'Mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K_{ATP} channel subunits Kir6.2 (*KCNJ11*) and SUR1 (*ABCC8*) in diabetes mellitus and hyperinsulinism', *Hum. Mutat.*, vol. 27, no. 3, pp. 220–231, Mar. 2006.
- [9] T. Miki, T. Iwanaga, K. Nagashima, Y. Ihara, and S. Seino, 'Roles of ATP-sensitive K⁺ channels in cell survival and differentiation in the endocrine pancreas.', *Diabetes*, vol. 50 Suppl 1, pp. S48–51, Feb. 2001.
- [10] K. P. K. Lee, J. Chen, and R. MacKinnon, 'Molecular structure of human KATP in complex with ATP and ADP', *Elife*, vol. 6, Dec. 2017.
- [11] T. Yorifuji, 'Congenital hyperinsulinism: current status and future perspectives.', *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 19, no. 2, pp. 57–68, Jun. 2014.
- [12] M. Sanyoura, L. H. Philipson, and R. Naylor, 'Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options', *Curr. Diab. Rep.*, vol. 18, no. 8, p. 58, Aug. 2018.
- [13] A. T. Hattersley *et al.*, 'ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents', *Pediatr. Diabetes*, vol. 19, pp. 47–63, Oct. 2018.
- [14] K. R. Owen, 'Monogenic diabetes: old and new approaches to diagnosis.', *Clin. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 278–81, Jun. 2013.
- [15] R. W. Carroll and R. Murphy, 'Monogenic diabetes: a diagnostic algorithm for clinicians.', *Genes (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 522–35, Sep. 2013.
- [16] P. Firdous *et al.*, 'Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives.', *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, p. 253, 2018.
- [17] D. L. Rossi *et al.*, 'State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice', *Arch Med Sci*, vol. 11, pp. 840–848, 2015.
- [18] F. M. Matschinsky, 'Evolution of the glucokinase glucose sensor paradigm for pancreatic beta cells.', *Diabetologia*, vol. 36, no. 11, pp. 1215–7, Nov. 1993.
- [19] S. Althari and A. L. Gloyn, 'When is it MODY? Challenges in the Interpretation of Sequence Variants in MODY Genes', *Rev. Diabet. Stud.*, vol. 12, no. 3–4, p. 330, 2015.
- [20] R. Murphy, 'Monogenic diabetes and pregnancy'.
- [21] M. Pinelli, F. Acquaviva, F. Barbetti, E. Caredda, and S. Cocozza, 'Identification of Candidate Children for Maturity-Onset Diabetes of the Young Type 2 (MODY2) Gene Testing: A Seven-Item Clinical Flowchart (7-iF)', *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. 79933, 2013.
- [22] M. Galán *et al.*, 'Differential effects of HNF-1 α mutations associated with familial young-onset diabetes on target gene regulation.', *Mol. Med.*, vol. 17, no. 3–4, pp.

- 256–65, 2011.
- [23] S. Bacon *et al.*, 'Serum levels of pancreatic stone protein (PSP)/reg1A as an indicator of beta-cell apoptosis suggest an increased apoptosis rate in hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A-MODY) carriers from the third decade of life onward.', *BMC Endocr. Disord.*, vol. 12, p. 13, Jul. 2012.
 - [24] C. Bellanné-Chantelot *et al.*, 'Clinical Characteristics and Diagnostic Criteria of Maturity-Onset Diabetes Of The Young (MODY) due to Molecular Anomalies of the HNF1A Gene', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 8, pp. E1346–E1351, Aug. 2011.
 - [25] R. R. Kapoor *et al.*, 'Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia and Maturity-Onset Diabetes of the Young Due to Heterozygous HNF4A Mutations', *Diabetes*, vol. 57, no. 6, pp. 1659–1663, Jun. 2008.
 - [26] A. J. Spiro, K. N. Vu, and A. L. Warnock, 'Case Report An Atypical HNF4A Mutation Which Does Not Conform to the Classic Presentation of HNF4A-MODY', 2018.
 - [27] E. R. Pearson *et al.*, 'Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene.', *PLoS Med.*, vol. 4, no. 4, p. e118, Apr. 2007.
 - [28] T. J. McDonald and S. Ellard, 'Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis'.
 - [29] K. Warncke *et al.*, 'Frequency and Characteristics of MODY 1 (HNF4A Mutation) and MODY 5 (HNF1B Mutation): Analysis From the DPV Database', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 3, pp. 845–855, Mar. 2019.
 - [30] V. V Nair, A. Chapla, N. Arulappan, and N. Thomas, 'Molecular diagnosis of maturity onset diabetes of the young in India.', *Indian J. Endocrinol. Metab.*, vol. 17, no. 3, pp. 430–41, May 2013.
 - [31] Y. Yang and L. Chan, 'Monogenic Diabetes: What It Teaches Us on the Common Forms of Type 1 and Type 2 Diabetes', *Endocr. Rev.*, vol. 37, no. 3, pp. 190–222, Jun. 2016.
 - [32] Y. Shibasaki, T. Kawakami, Y. Kanazawa, Y. Akanuma, and F. Takaku, 'Posttranslational cleavage of proinsulin is blocked by a point mutation in familial hyperproinsulinemia.', *J. Clin. Invest.*, vol. 76, no. 1, pp. 378–380, Jul. 1985.
 - [33] G. I. Bell, R. L. Pictet, W. J. Rutter, B. Cordell, E. Tischler, and H. M. Goodman, 'Sequence of the human insulin gene.', *Nature*, vol. 284, no. 5751, pp. 26–32, Mar. 1980.
 - [34] A. Molven *et al.*, 'Mutations in the Insulin Gene Can Cause MODY and Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes', *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 1131–1135, Apr. 2008.
 - [35] P. Bowman *et al.*, 'Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY', *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, pp. 123–127, Jan. 2012.
 - [36] S. Johansson *et al.*, 'Exome Sequencing and Genetic Testing for MODY', *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e38050, May 2012.
 - [37] A. K. Ovsyannikova *et al.*, 'ABCC8-Related Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY12): Clinical Features and Treatment Perspective', *Diabetes Ther.*, vol. 7, no. 3, pp. 591–600, Sep. 2016.
 - [38] T. R. Özdemir *et al.*, 'Targeted next generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)', *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 31, no. 12, pp. 1295–1304, Dec. 2018.
 - [39] A. Lie Bonnefond *et al.*, 'Whole-Exome Sequencing and High Throughput Genotyping Identified KCNJ11 as the Thirteenth MODY Gene'.
 - [40] S.-H. Kim, 'Maturity-Onset Diabetes of the Young: What Do Clinicians Need to Know?', *Diabetes Metab J*, vol. 39, pp. 468–477, 2015.
 - [41] F. M. Ashcroft, 'ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion', *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 8, pp. 2047–2058, Aug. 2005.

- [42] S. K. Kim *et al.*, 'Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *Ip1f1*-deficient mice promotes diabetes mellitus', *Nat. Genet.*, vol. 30, no. 4, pp. 430–435, Apr. 2002.
- [43] D. A. Stoffers, N. T. Zinkin, V. Stanojevic, W. L. Clarke, and J. F. Habener, 'Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human *IPF1* gene coding sequence', *Nat. Genet.*, vol. 15, no. 1, pp. 106–110, Jan. 1997.
- [44] U. Ahlgren, J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu, and H. Edlund, 'beta -Cell-specific inactivation of the mouse *Ip1f1/Pdx1* gene results in loss of the beta -cell phenotype and maturity onset diabetes', *Genes Dev.*, vol. 12, no. 12, pp. 1763–1768, Jun. 1998.
- [45] B. Neve *et al.*, 'From The Cover: Role of transcription factor *KLF11* and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 13, pp. 4807–4812, Mar. 2005.
- [46] J. Torsvik *et al.*, 'Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (*CEL*) are a rare cause of monogenic diabetes', *Hum. Genet.*, vol. 127, no. 1, pp. 55–64, Jan. 2010.
- [47] H. Ræder *et al.*, 'Mutations in the *CEL* VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction', *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 1, pp. 54–62, Jan. 2006.
- [48] N. Plengvidhya *et al.*, '*PAX4* Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 7, pp. 2821–2826, Jul. 2007.
- [49] S. F. Ang *et al.*, 'A preliminary study to evaluate the strategy of combining clinical criteria and next generation sequencing (NGS) for the identification of monogenic diabetes among multi-ethnic Asians', *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 119, pp. 13–22, Sep. 2016.
- [50] M. Borowiec *et al.*, 'Mutations at the *BLK* locus linked to maturity onset diabetes of the young and -cell dysfunction', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 34, pp. 14460–14465, Aug. 2009.
- [51] S. Prudente *et al.*, 'Loss-of-Function Mutations in *APPL1* in Familial Diabetes Mellitus', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 97, no. 1, pp. 177–185, Jul. 2015.
- [52] J.-B. Arnoux *et al.*, 'Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy', *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 6, p. 63, Oct. 2011.
- [53] A. Nessa, S. A. Rahman, and K. Hussain, 'Hyperinsulinemic Hypoglycemia - The Molecular Mechanisms.', *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 7, p. 29, 2016.
- [54] H. Demirbilek, S. A. Rahman, G. G. Buyukyilmaz, and K. Hussain, 'Diagnosis and treatment of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and its implications for paediatric endocrinology.', *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 2017, p. 9, 2017.
- [55] D. Long and Y. Akhtar, 'Hyperinsulinism', *Pediatr. Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 207–210, Apr. 2019.
- [56] S. E. Pinney *et al.*, 'Clinical characteristics and biochemical mechanisms of congenital hyperinsulinism associated with dominant K ATP channel mutations', *J. Clin. Invest.*, vol. 118, 2008.
- [57] H. Demirbilek and K. Hussain, 'Congenital Hyperinsulinism: Diagnosis and Treatment Update.', *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 9, no. Suppl 2, pp. 69–87, Dec. 2017.
- [58] C. James, R. R. Kapoor, D. Ismail, and K. Hussain, 'The genetic basis of congenital hyperinsulinism', *J. Med. Genet.*, vol. 46, no. 5, pp. 289–299, May 2009.
- [59] P. Shah, H. Demirbilek, and K. Hussain, 'Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia in infancy', *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, no. 2, pp. 76–82, Apr. 2014.
- [60] A. Pierro and S. A. Nah, 'Surgical management of congenital hyperinsulinism of infancy', *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 50–53, Feb. 2011.
- [61] J. Marquard, A. A. Palladino, C. A. Stanley, E. Mayatepek, and T. Meissner, 'Rare forms of congenital hyperinsulinism', *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 38–44, Feb. 2011.
- [62] D. Ismail *et al.*, 'Familial Focal Congenital Hyperinsulinism', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,

- vol. 96, no. 1, pp. 24–28, Jan. 2011.
- [63] S. Galcheva, S. Al-Khawaga, and K. Hussain, 'Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 32, no. 4, pp. 551–573, Aug. 2018.
 - [64] O. N. Ajala, D. M. Huffman, and I. I. Ghobrial, 'Glucokinase mutation—a rare cause of recurrent hypoglycemia in adults: a case report and literature review', *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.*, vol. 6, no. 5, p. 32983, Jan. 2016.
 - [65] R. Martínez *et al.*, 'Heterogeneity in phenotype of hyperinsulinism caused by activating glucokinase mutations: a novel mutation and its functional characterization', *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 86, no. 6, pp. 778–783, Jun. 2017.
 - [66] A. L. Cuesta-Munoz *et al.*, 'Severe Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia due to a De Novo Glucokinase Mutation', *Diabetes*, vol. 53, no. 8, pp. 2164–2168, Aug. 2004.
 - [67] A. A. Palladino, M. J. Bennett, and C. A. Stanley, 'Hyperinsulinism in Infancy and Childhood: When an Insulin Level Is Not Always Enough', *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 2, pp. 256–263, Feb. 2008.
 - [68] A. Molven *et al.*, 'Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation.', *Diabetes*, vol. 53, no. 1, pp. 221–7, Jan. 2004.
 - [69] A. J. Heslegrave and K. Hussain, 'Novel Insights Into Fatty Acid Oxidation, Amino Acid Metabolism, and Insulin Secretion From Studying Patients With Loss of Function Mutations in 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 2, pp. 496–501, Feb. 2013.
 - [70] T. J. Pullen, L. Sylow, G. Sun, A. P. Halestrap, E. A. Richter, and G. A. Rutter, 'Overexpression of monocarboxylate transporter-1 (SLC16A1) in mouse pancreatic β -cells leads to relative hyperinsulinism during exercise.', *Diabetes*, vol. 61, no. 7, pp. 1719–25, Jul. 2012.
 - [71] T. Otonkoski *et al.*, 'Physical exercise-induced hyperinsulinemic hypoglycemia is an autosomal-dominant trait characterized by abnormal pyruvate-induced insulin release.', *Diabetes*, vol. 52, no. 1, pp. 199–204, Jan. 2003.
 - [72] P. Malakar *et al.*, 'Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival', *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 31222, Nov. 2016.
 - [73] S. Innaurato *et al.*, 'Severe insulin resistance in disguise: A familial case of reactive hypoglycemia associated with a novel heterozygous *INSR* mutation', *Pediatr. Diabetes*, vol. 19, no. 4, pp. 670–674, Jun. 2018.
 - [74] K. Hojlund *et al.*, 'A Novel Syndrome of Autosomal-Dominant Hyperinsulinemic Hypoglycemia Linked to a Mutation in the Human Insulin Receptor Gene', *Diabetes*, vol. 53, no. 6, pp. 1592–1598, Jun. 2004.
 - [75] D. Gillis, A. Krishnamohan, B. Yaacov, A. Shaag, J. E. Jackman, and O. Elpeleg, 'TRMT10A dysfunction is associated with abnormalities in glucose homeostasis, short stature and microcephaly', *J. Med. Genet.*, vol. 51, no. 9, pp. 581–586, Sep. 2014.
 - [76] A. Voza *et al.*, 'UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 3, pp. 960–965, Jan. 2014.
 - [77] S. E. Pinney *et al.*, 'Dominant Form of Congenital Hyperinsulinism Maps to HK1 Region on 10q', *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 80, no. 1, pp. 18–27, 2013.
 - [78] O. R. Cabezas *et al.*, 'Polycystic Kidney Disease with Hyperinsulinemic Hypoglycemia Caused by a Promoter Mutation in Phosphomannomutase 2', *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 28, no. 8, pp. 2529–2539, Aug. 2017.
 - [79] 'Pituitary hormones - human anatomy organs'. [Online]. Available: http://www.medicalook.com/human_anatomy/organs/Pituitary_hormones.html. [Accessed: 01-Jul-2019].

- [80] A. Mehta and M. T. Dattani, 'Developmental disorders of the hypothalamus and pituitary gland associated with congenital hypopituitarism', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 191–206, Feb. 2008.
- [81] N. Di Iorgi *et al.*, 'Classical and non-classical causes of GH deficiency in the paediatric age', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 30, no. 6, pp. 705–736, Dec. 2016.
- [82] K. M. Scully, 'Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis', *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5563, pp. 2231–2235, Mar. 2002.
- [83] F. Castinetti *et al.*, 'MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: An update in the genetic aetiologies of combined pituitary hormone deficiency', *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 174, no. 6, pp. R239–R247, Jun. 2016.
- [84] Q. Fang *et al.*, 'Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era', *Endocr. Rev.*, vol. 37, no. 6, pp. 636–675, Dec. 2016.
- [85] C. Deal *et al.*, 'Associations between Pituitary Imaging Abnormalities and Clinical and Biochemical Phenotypes in Children with Congenital Growth Hormone Deficiency: Data from an International Observational Study', *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 79, no. 5, pp. 283–292, 2013.
- [86] A. Manzoor Mughal, N. Hassan, and A. Ahmed, 'Bone age assessment methods: a critical review.', *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 211–5, Jan. 2014.
- [87] V. Kumar, A. Karunakaran, and J. Valakada, 'Septo-optic dysplasia', *Int. Ophthalmol.*, Jan. 2017.
- [88] E. F. Kauvar and M. Muenke, 'Holoprosencephaly: recommendations for diagnosis and management', *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 22, no. 6, pp. 687–695, Dec. 2010.
- [89] M. I. Stamou, K. H. Cox, and W. F. Crowley, 'Discovering Genes Essential to the Hypothalamic Regulation of Human Reproduction Using a Human Disease Model: Adjusting to Life in the “-Omics” Era', *Endocr. Rev.*, vol. 2016, no. 1, pp. 4–22, Feb. 2016.
- [90] M. I. Pérez Millán, M. L. Brinkmeier, A. H. Mortensen, and S. A. Camper, 'PROP1 triggers epithelial-mesenchymal transition-like process in pituitary stem cells', *Elife*, vol. 5, Jun. 2016.
- [91] M. Giordano, 'Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 30, no. 6, pp. 679–691, Dec. 2016.
- [92] F. A. Correa *et al.*, 'Combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 mutations: update 20 years post-discovery', *Arch. Endocrinol. Metab.*, vol. 63, no. 2, pp. 167–174, 2019.
- [93] L. E. Cohen, F. E. Wondisford, and S. Radovick, 'Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin.', *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 25, no. 3, pp. 523–40, Sep. 1996.
- [94] D. Skowronska-Krawczyk *et al.*, 'Required enhancer–matrin-3 network interactions for a homeodomain transcription program', *Nature*, vol. 514, no. 7521, pp. 257–261, Oct. 2014.
- [95] H. Inoue *et al.*, 'Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency', *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 76, no. 1, pp. 78–87, Jan. 2012.
- [96] M.-L. Sobrier *et al.*, 'Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: a novel etiology for IGHD', *Hum. Mol. Genet.*, vol. 25, no. 3, pp. 472–483, Feb. 2016.
- [97] E. Coutinho, C. M. Brandão, and M. C. Lemos, 'Combined Pituitary Hormone Deficiency Caused by a Synonymous HESX1 Gene Mutation', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 7, pp. 2851–2854, Jul. 2019.
- [98] M. J. McCabe, K. S. Alatzoglou, and M. T. Dattani, 'Septo-optic dysplasia and other

- midline defects: The role of transcription factors: HESX1 and beyond', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 115–124, Feb. 2011.
- [99] J. P. Martinez-Barbera, T. A. Rodriguez, and R. S. Beddington, 'The Homeobox Gene *Hesx1* Is Required in the Anterior Neural Ectoderm for Normal Forebrain Formation', *Dev. Biol.*, vol. 223, no. 2, pp. 422–430, Jul. 2000.
- [100] L. R. Carvalho *et al.*, 'A homozygous mutation in *HESX1* is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction.', *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 8, pp. 1192–201, Oct. 2003.
- [101] M. T. Dattani, 'Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter?', *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 63, no. 2, pp. 121–130, Aug. 2005.
- [102] K. Ramzan, B. Bin-Abbas, L. Al-Jomaa, R. Allam, M. Al-Owain, and F. Imtiaz, 'Two novel *LHX3* mutations in patients with combined pituitary hormone deficiency including cervical rigidity and sensorineural hearing loss.', *BMC Endocr. Disord.*, vol. 17, no. 1, p. 17, Mar. 2017.
- [103] E. Cohen *et al.*, 'Contribution of *LHX4* mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 1, p. jc.2016-3158, Nov. 2016.
- [104] R. D. Mullen *et al.*, 'Roles of the *LHX3* and *LHX4* LIM-homeodomain factors in pituitary development.', *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 265–266, pp. 190–5, Feb. 2007.
- [105] A. M. Slavotinek *et al.*, 'Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects', *Clin. Genet.*, vol. 88, no. 5, pp. 468–473, Nov. 2015.
- [106] S. Dateki, M. Fukami, N. Sato, K. Muroya, M. Adachi, and T. Ogata, 'OTX2 Mutation in a Patient with Anophthalmia, Short Stature, and Partial Growth Hormone Deficiency: Functional Studies Using the IRBP, *HESX1*, and *POU1F1* Promoters', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 10, pp. 3697–3702, Oct. 2008.
- [107] N. K. Ragge *et al.*, 'Heterozygous Mutations of *OTX2* Cause Severe Ocular Malformations', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 76, no. 6, pp. 1008–1022, Jun. 2005.
- [108] R. H. Henderson *et al.*, 'A rare de novo nonsense mutation in *OTX2* causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction.', *Mol. Vis.*, vol. 15, pp. 2442–7, Nov. 2009.
- [109] K. S. Alatzoglou, D. Kelberman, and M. T. Dattani Affiliations, 'The role of *SOX* proteins in normal pituitary development', 2008.
- [110] A. Macchiaroli *et al.*, 'A novel heterozygous *SOX2* mutation causing congenital bilateral anophthalmia, hypogonadotropic hypogonadism and growth hormone deficiency', *Gene*, vol. 534, no. 2, pp. 282–285, Jan. 2014.
- [111] V. Tziaferi, D. Kelberman, and M. T. Dattani, 'The Role of *SOX2* in Hypogonadotropic Hypogonadism', *Sex. Dev.*, vol. 2, no. 4–5, pp. 194–199, 2008.
- [112] K. Rizzoti, S. Brunelli, D. Carmignac, P. Q. Thomas, I. C. Robinson, and R. Lovell-Badge, 'A *RTICLE* *SOX3* is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis', *Nat. Genet. Vol.*, vol. 36, no. 3, 2004.
- [113] K. S. Woods *et al.*, 'Over- and Underdosage of *SOX3* Is Associated with Infundibular Hypoplasia and Hypopituitarism', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 76, no. 5, pp. 833–849, May 2005.
- [114] I. J. P. Arnhold, M. M. França, L. R. Carvalho, B. B. Mendonca, and A. A. L. Jorge, 'Role of *GLI2* in hypopituitarism phenotype', *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 54, no. 3, pp. R141–R150, Jun. 2015.
- [115] M. M. França *et al.*, 'Novel Heterozygous Nonsense *GLI2* Mutations in Patients with Hypopituitarism and Ectopic Posterior Pituitary Lobe without Holoprosencephaly', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 11, pp. E384–E391, Nov. 2010.

- [116] A. K. Lucas-Herald *et al.*, 'A Case of Functional Growth Hormone Deficiency and Early Growth Retardation in a Child With IFT172 Mutations', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 4, pp. 1221–1224, Apr. 2015.
- [117] M. Takagi *et al.*, 'Heterozygous defects in PAX6 gene and congenital hypopituitarism', *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 172, no. 1, pp. 37–45, Jan. 2015.
- [118] C. Tatsi *et al.*, 'Pituitary Stalk Interruption Syndrome and Isolated Pituitary Hypoplasia May Be Caused by Mutations in Holoprosencephaly-Related Genes', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 4, pp. E779–E784, Apr. 2013.
- [119] D. G. del Blanco, L. C. G. de Graaff, T. J. Visser, and A. C. S. Hokken-Koelega, 'Single-nucleotide variants in two Hedgehog genes, *SHH* and *HHIP*, as genetic cause of combined pituitary hormone deficiency', *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 78, no. 3, pp. 415–423, Mar. 2013.
- [120] F. J. Rodríguez-Contreras *et al.*, 'Loss of function *BMP4* mutation supports the implication of the BMP/TGF- β pathway in the etiology of combined pituitary hormone deficiency', *Am. J. Med. Genet. Part A*, p. ajmg.a.61201, May 2019.
- [121] S. E. McCormack *et al.*, 'Digenic Inheritance of PROKR2 and WDR11 Mutations in Pituitary Stalk Interruption Syndrome.', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 7, pp. 2501–2507, 2017.
- [122] R. Spiegel, S. A. Shalev, A. Adawi, E. Sprecher, and Y. Tenenbaum-Rakover, 'ANE syndrome caused by mutated RBM28 gene: a novel etiology of combined pituitary hormone deficiency', *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 162, no. 6, pp. 1021–1025, Jun. 2010.
- [123] X. Zhu *et al.*, 'Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios', *Genet. Med.*, vol. 17, no. 10, pp. 774–781, Oct. 2015.
- [124] T. Ohnesorg, E. Vilain, and A. H. Sinclair, 'The Genetics of Disorders of Sex Development in Humans', *Sex. Dev.*, vol. 8, no. 5, pp. 262–272, 2014.
- [125] F. Ahmed, A. Kyriakou, E. Tobias, A. Lucas-Herald, and R. McGowan, 'Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management', *Adv. Genomics Genet.*, p. 165, Apr. 2015.
- [126] S. F. Ahmed *et al.*, 'Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015)', *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 84, no. 5, pp. 771–788, May 2016.
- [127] S. F. Witchel, 'Disorders of sex development.', *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 48, pp. 90–102, Apr. 2018.
- [128] S. Eggers *et al.*, 'Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort.', *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, p. 243, Dec. 2016.
- [129] Y. Dong *et al.*, 'Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with disorders of sex development', *BMC Med. Genet.*, vol. 17, no. 1, p. 23, Dec. 2016.
- [130] V. A. Arboleda *et al.*, 'Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development.', *Clin. Genet.*, vol. 83, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2013.
- [131] H. Barseghyan, E. Délot, and E. Vilain, 'New Genomic Technologies: An Aid for Diagnosis of Disorders of Sex Development', *Horm. Metab. Res.*, vol. 47, no. 05, pp. 312–320, May 2015.
- [132] A. Biason-Lauber, 'WNT4, RSPO1, and FOXL2 in Sex Development', *Semin. Reprod. Med.*, vol. 30, no. 05, pp. 387–395, Oct. 2012.
- [133] J. B. Stukenborg, E. Colón, and O. Söder, 'Ontogenesis of Testis Development and Function in Humans', *Sex. Dev.*, vol. 4, no. 4–5, pp. 199–212, Sep. 2010.
- [134] S. A. Yatsenko and S. F. Witchel, 'Genetic approach to ambiguous genitalia and disorders of sex development: What clinicians need to know', *Semin. Perinatol.*, vol.

- 41, no. 4, pp. 232–243, Jun. 2017.
- [135] I. A. Hughes, 'Disorders of sex development: a new definition and classification', *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 119–134, Feb. 2008.
 - [136] P. A. Lee, C. P. Houk, S. F. Ahmed, I. A. Hughes, and International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology, 'Consensus Statement on Management of Intersex Disorders', *Pediatrics*, vol. 118, no. 2, pp. e488–e500, Aug. 2006.
 - [137] A. Cameron-Pimblett, C. La Rosa, T. F. J. King, M. C. Davies, and G. S. Conway, 'The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan', *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 87, no. 5, pp. 532–538, Nov. 2017.
 - [138] Θ. Πατάργιας and Β. Αλεπόρου, *Γενετική ανθρώπου - Εκδόσεις Συμμετρία*, Β. Αθήνα: Συμμετρία, 2005.
 - [139] S. Davis *et al.*, 'Advances in the Interdisciplinary Care of Children with Klinefelter Syndrome.', *Adv. Pediatr.*, vol. 63, no. 1, pp. 15–46, 2016.
 - [140] Y. Katoh-Fukui *et al.*, 'Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of *SOX9*', *Mol. Genet. Genomic Med.*, vol. 3, no. 6, pp. 550–557, Nov. 2015.
 - [141] I. Martinez de LaPiscina *et al.*, 'GATA4 Variants in Individuals With a 46,XY Disorder of Sex Development (DSD) May or May Not Be Associated With Cardiac Defects Depending on Second Hits in Other DSD Genes', *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, p. 142, Apr. 2018.
 - [142] P. Dangle *et al.*, 'Female-to-male sex reversal associated with unique Xp21.2 deletion disrupting genomic regulatory architecture of the dosage-sensitive sex reversal region', *J. Med. Genet.*, vol. 54, no. 10, pp. 705–709, Oct. 2017.
 - [143] J.-Y. Picard, R. L. Cate, C. Racine, and N. Josso, 'The Persistent Müllerian Duct Syndrome: An Update Based Upon a Personal Experience of 157 Cases', *Sex. Dev.*, vol. 11, no. 3, pp. 109–125, 2017.
 - [144] S. F. Witchel, 'Congenital Adrenal Hyperplasia.', *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 30, no. 5, pp. 520–534, Oct. 2017.
 - [145] A. H. Sinclair *et al.*, 'A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif', *Nature*, vol. 346, no. 6281, pp. 240–244, Jul. 1990.
 - [146] J. J. Cox, L. Willatt, T. Homfray, and C. G. Woods, 'A *SOX9* Duplication and Familial 46,XX Developmental Testicular Disorder', *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 1, pp. 91–93, Jan. 2011.
 - [147] S. Tomaselli *et al.*, 'Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (*RSPO1*) homozygous mutation', *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 2, pp. 220–226, Feb. 2008.
 - [148] J. Li, E. Mercer, X. Gou, and Y.-J. Lu, 'Ethnic disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes', 2013.
 - [149] L. Southam *et al.*, 'Whole genome sequencing and imputation in isolated populations identify genetic associations with medically-relevant complex traits', *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 15606, Aug. 2017.
 - [150] C. Mizzi *et al.*, 'Personalized pharmacogenomics profiling using whole-genome sequencing', *Pharmacogenomics*, vol. 15, no. 9, pp. 1223–1234, Jul. 2014.
 - [151] U. I. Schwarz, M. Gulilat, and R. B. Kim, 'The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.', *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 9, no. 2, p. a033027, Feb. 2019.
 - [152] V. Lapin, L. C. Mighion, C. P. da Silva, Y. Cuperus, L. J. H. Bean, and M. R. Hegde, 'Regulating whole exome sequencing as a diagnostic test', *Hum. Genet.*, vol. 135, no. 6, pp. 655–673, Jun. 2016.

- [153] E. L. Chin, C. da Silva, and M. Hegde, 'Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations', *BMC Genet.*, vol. 14, no. 1, p. 6, Feb. 2013.
- [154] L. Persani, T. de Filippis, C. Colombo, and D. Gentilini, 'GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic diagnosis of endocrine diseases by NGS: novel scenarios and unpredictable results and risks.', *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 179, no. 3, pp. R111–R123, Sep. 2018.
- [155] T. 1000 G. P. Consortium, 'An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes', *Nature*, vol. 491, no. 7422, pp. 56–65, Nov. 2012.
- [156] S. Richards *et al.*, 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genet. Med.*, vol. 17, no. 5, pp. 405–423, May 2015.
- [157] S. Roy *et al.*, 'Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines', *J. Mol. Diagnostics*, vol. 20, no. 1, pp. 4–27, Jan. 2018.
- [158] A. P. Abreu *et al.*, 'Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene *MKRN3*', *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 26, pp. 2467–2475, Jun. 2013.
- [159] D. Simon *et al.*, 'Mutations in the maternally imprinted gene *MKRN3* are common in familial central precocious puberty', *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 174, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016.
- [160] D. S. Bessa *et al.*, 'High Frequency of *MKRN3* Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic.', *Neuroendocrinology*, vol. 105, no. 1, pp. 17–25, 2017.
- [161] A. Dauber *et al.*, 'Paternal Inherited *DLK1* Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 5, pp. 1557–1567, May 2017.
- [162] Y. Izumi *et al.*, 'Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism', *Fertil. Steril.*, vol. 102, no. 4, pp. 1130–1136.e3, Oct. 2014.
- [163] H.-G. Kim *et al.*, 'WDR11, a WD Protein that Interacts with Transcription Factor EMX1, Is Mutated in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 87, no. 4, pp. 465–479, Oct. 2010.
- [164] S. E. Flanagan *et al.*, 'Next-Generation Sequencing Reveals Deep Intronic Cryptic *ABCC8* and *HADH* Splicing Founder Mutations Causing Hyperinsulinism by Pseudoexon Activation', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 92, no. 1, pp. 131–136, Jan. 2013.
- [165] K. Wang, M. Li, and H. Hakonarson, 'ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data.', *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 16, p. e164, Sep. 2010.
- [166] J.-P. Desvignes *et al.*, 'VarAFT: a variant annotation and filtration system for human next generation sequencing data.', *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W545–W553, Jul. 2018.
- [167] J. M. Schwarz, D. N. Cooper, M. Schuelke, and D. Seelow, 'MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age', *Nat. Methods*, vol. 11, no. 4, pp. 361–362, Apr. 2014.
- [168] N.-L. Sim, P. Kumar, J. Hu, S. Henikoff, G. Schneider, and P. C. Ng, 'SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins', *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. W1, pp. W452–W457, Jul. 2012.
- [169] J. Pearl, ; M H Causality, M. Kalisch, P. Bühlmann, and T. R. Hughes, 'marloes h maathuis A method and server for predicting damaging missense mutations', Cambridge Univ. Press, 2010.
- [170] D. Salgado *et al.*, 'UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System

- for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution', *Hum. Mutat.*, vol. 37, no. 5, pp. 439–446, May 2016.
- [171] Y. Choi and A. P. Chan, 'PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels', *Bioinformatics*, vol. 31, no. 16, pp. 2745–2747, Aug. 2015.
 - [172] S. Kim, J.-H. Jhong, J. Lee, and J.-Y. Koo, 'Meta-analytic support vector machine for integrating multiple omics data', *BioData Min.*, vol. 10, no. 1, p. 2, Dec. 2017.
 - [173] Q. Li, S. Wang, C.-C. Huang, M. Yu, and J. Shao, 'Meta-analysis based variable selection for gene expression data', *Biometrics*, vol. 70, no. 4, pp. 872–880, Dec. 2014.
 - [174] B. Reva, Y. Antipin, and C. Sander, 'Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization', *Genome Biol.*, vol. 8, no. 11, p. R232, 2007.
 - [175] P. Rentzsch, D. Witten, G. M. Cooper, J. Shendure, and M. Kircher, 'CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome.', *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D886–D894, Jan. 2019.
 - [176] D. Quang, Y. Chen, and X. Xie, 'DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants', *Bioinformatics*, vol. 31, no. 5, pp. 761–763, Mar. 2015.
 - [177] S. Chun and J. C. Fay, 'Identification of deleterious mutations within three human genomes', *Genome Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 1553–1561, Sep. 2009.
 - [178] H. A. Shihab *et al.*, 'Predicting the Functional, Molecular, and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models', *Hum. Mutat.*, vol. 34, no. 1, pp. 57–65, Jan. 2013.
 - [179] E. V Davydov, D. L. Goode, M. Sirota, G. M. Cooper, and A. Sidow, 'Identifying a High Fraction of the Human Genome to be under Selective Constraint Using GERP++', *PLoS Comput Biol*, vol. 6, no. 12, p. 1001025, 2010.
 - [180] R. Grantham, 'Amino acid difference formula to help explain protein evolution.', *Science*, vol. 185, no. 4154, pp. 862–4, Sep. 1974.
 - [181] H. Tang and P. D. Thomas, 'PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation', *Bioinformatics*, vol. 32, no. 14, pp. 2230–2232, Jul. 2016.
 - [182] F.-O. Desmet, D. Hamroun, M. Lalonde, G. Collod-Bérout, M. Claustres, and C. Bérout, 'Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 9, pp. e67–e67, May 2009.
 - [183] D. R. Zerbino *et al.*, 'Ensembl 2018', *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D754–D761, Jan. 2018.
 - [184] P. D. Stenson *et al.*, 'Human Gene Mutation Database (HGMD[®]): 2003 update', *Hum. Mutat.*, vol. 21, no. 6, pp. 577–581, Jun. 2003.
 - [185] D. Szklarczyk *et al.*, 'STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets', *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D607–D613, Jan. 2019.
 - [186] C. Kopanos *et al.*, 'VarSome: the human genomic variant search engine', *Bioinformatics*, Oct. 2018.
 - [187] I. Estalella *et al.*, 'Mutations in GCK and HNF-1 β explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain', *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 0, no. 0, pp. 070615230707001-???, Jun. 2007.
 - [188] A. T. Hattersley, F. Beards, E. Ballantyne, M. Appleton, R. Harvey, and S. Ellard, 'Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight', *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 3, pp. 268–270, Jul. 1998.
 - [189] R. Lorini *et al.*, 'Maturity-Onset Diabetes of the Young in Children With Incidental Hyperglycemia:: A multicenter Italian study of 172 families', *Diabetes Care*, vol. 32,

- no. 10, pp. 1864–1866, Oct. 2009.
- [190] A. T. Hattersley, 'Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity', *Diabet. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 15–24, Jan. 1998.
 - [191] C. Bellanne-Chantelot *et al.*, 'Large Genomic Rearrangements in the Hepatocyte Nuclear Factor-1 (TCF2) Gene Are the Most Frequent Cause of Maturity-Onset Diabetes of the Young Type 5', *Diabetes*, vol. 54, no. 11, pp. 3126–3132, Nov. 2005.
 - [192] D.-Y. Hwang *et al.*, 'Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract.', *Kidney Int.*, vol. 85, no. 6, pp. 1429–33, Jun. 2014.
 - [193] R. P. Dotto *et al.*, 'Unexpected finding of a whole HNF1B gene deletion during the screening of rare MODY types in a series of Brazilian patients negative for GCK and HNF1A mutations', *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 116, pp. 100–104, Jun. 2016.
 - [194] S. N. Magge *et al.*, 'Familial Leucine-Sensitive Hypoglycemia of Infancy Due to a Dominant Mutation of the β -Cell Sulfonylurea Receptor', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 9, pp. 4450–4456, Sep. 2004.
 - [195] Q. Fang *et al.*, 'Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era', *Endocr. Rev.*, vol. 37, no. 6, pp. 636–675, Dec. 2016.
 - [196] A. Larson, N. J. Nokoff, and N. J. L. Meeks, 'Genetic causes of pituitary hormone deficiencies.', *Discov. Med.*, vol. 19, no. 104, pp. 175–83, Mar. 2015.
 - [197] M. Simoni and I. T. Ilpo T. . Huhtaniemi, *Endocrinology of the testis and male reproduction*. Springer, 2017.
 - [198] T.-S. Ha, 'Genetics of hereditary nephrotic syndrome: a clinical review', *Korean J. Pediatr.*, vol. 60, no. 3, p. 55, Mar. 2017.
 - [199] J. Stanik *et al.*, 'De novo mutations of GCK, HNF1A and HNF4A may be more frequent in MODY than previously assumed', *Diabetologia*, vol. 57, no. 3, pp. 480–484, Mar. 2014.
 - [200] T. Yorifuji *et al.*, 'Genetic basis of early-onset, maturity-onset diabetes of the young-like diabetes in Japan and features of patients without mutations in the major MODY genes: Dominance of maternal inheritance', *Pediatr. Diabetes*, vol. 19, no. 7, pp. 1164–1172, Nov. 2018.
 - [201] R. El-Khairi and L. Vallier, 'The role of hepatocyte nuclear factor 1 β in disease and development', *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 18, pp. 23–32, Sep. 2016.
 - [202] P. Haghverdizadeh, M. Sadat Haerian, P. Haghverdizadeh, and B. Sadat Haerian, 'ABCC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus', *Gene*, vol. 545, no. 2, pp. 198–204, Jul. 2014.
 - [203] N. M. Phani *et al.*, 'Population Specific Impact of Genetic Variants in KCNJ11 Gene to Type 2 Diabetes: A Case-Control and Meta-Analysis Study', *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e107021, Sep. 2014.
 - [204] P. Haghverdizadeh, Z. Mohamed, N. A. Abdullah, P. Haghverdizadeh, M. S. Haerian, and B. S. Haerian, 'KCNJ11: Genetic Polymorphisms and Risk of Diabetes Mellitus', *J. Diabetes Res.*, vol. 2015, pp. 1–9, 2015.
 - [205] J. Sokhi *et al.*, 'Association of genetic variants in INS (rs689), INSR (rs1799816) and PP1G.G (rs1799999) with type 2 diabetes (T2D): a case-control study in three ethnic groups from North-West India.', *Mol. Genet. Genomics*, vol. 291, no. 1, pp. 205–16, Feb. 2016.
 - [206] C. Bellanne-Chantelot *et al.*, 'ABCC8 and KCNJ11 molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism', *J. Med. Genet.*, vol. 47, no. 11, pp. 752–759, Nov. 2010.
 - [207] J. T. Bennett, V. Vasta, M. Zhang, J. Narayanan, P. Gerrits, and S. H. Hahn, 'Molecular genetic testing of patients with monogenic diabetes and hyperinsulinism', *Mol.*

- Genet. Metab.*, vol. 114, no. 3, pp. 451–458, Mar. 2015.
- [208] R. K. Shankar *et al.*, 'Digenic heterozygous *HNF1A* and *HNF4A* mutations in two siblings with childhood-onset diabetes', *Pediatr. Diabetes*, vol. 14, no. 7, pp. 535–538, Nov. 2013.
 - [209] M. P. López-Garrido, S. Herranz-Antolín, M. J. Alija-Merillas, P. Giralt, and J. Escribano, 'Co-inheritance of *HNF1a* and *GCK* mutations in a family with maturity-onset diabetes of the young (MODY): implications for genetic testing', *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 79, no. 3, pp. 342–347, Sep. 2013.
 - [210] P. Thomas *et al.*, 'Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy', *Science (80-.)*, vol. 268, no. 5209, pp. 426–429, Apr. 1995.
 - [211] A. L. Gloyn *et al.*, 'Activating Mutations in the Gene Encoding the ATP-Sensitive Potassium-Channel Subunit Kir6.2 and Permanent Neonatal Diabetes', *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 18, pp. 1838–1849, Apr. 2004.
 - [212] A. P. Babenko *et al.*, 'Activating Mutations in the *ABCC8* Gene in Neonatal Diabetes Mellitus', *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 5, pp. 456–466, Aug. 2006.
 - [213] R. R. Kapoor, S. E. Flanagan, C. James, J. Shield, S. Ellard, and K. Hussain, 'Hyperinsulinaemic hypoglycaemia.', *Arch. Dis. Child.*, vol. 94, no. 6, pp. 450–7, Jun. 2009.
 - [214] S. H. Kwak *et al.*, 'Clinical whole exome sequencing in early onset diabetes patients', *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 122, pp. 71–77, Dec. 2016.
 - [215] M. Doddabelavangala Mruthyunjaya *et al.*, 'Comprehensive Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) Gene Screening in Pregnant Women with Diabetes in India.', *PLoS One*, vol. 12, no. 1, p. e0168656, 2017.
 - [216] H. Dallali *et al.*, 'Genetic characterization of suspected MODY patients in Tunisia by targeted next-generation sequencing.', *Acta Diabetol.*, vol. 56, no. 5, pp. 515–523, May 2019.
 - [217] L. Gonsorcikova *et al.*, 'Familial mild hyperglycemia associated with a novel *ABCC8*-V84I mutation within three generations', *Pediatr. Diabetes*, vol. 12, no. 3pt2, pp. 266–269, May 2011.
 - [218] R. Artuso *et al.*, 'Therapeutic implications of novel mutations of the *RFX6* gene associated with early-onset diabetes.', *Pharmacogenomics J.*, vol. 15, no. 1, pp. 49–54, Feb. 2015.
 - [219] V. Mohan *et al.*, 'Comprehensive genomic analysis identifies pathogenic variants in maturity-onset diabetes of the young (MODY) patients in South India', *BMC Med. Genet.*, vol. 19, no. 1, p. 22, Dec. 2018.
 - [220] S. R. Johnson *et al.*, 'Whole-exome sequencing for mutation detection in pediatric disorders of insulin secretion: Maturity onset diabetes of the young and congenital hyperinsulinism', *Pediatr. Diabetes*, vol. 19, no. 4, pp. 656–662, Jun. 2018.
 - [221] S. E. Flanagan *et al.*, 'Mutations in ATP-Sensitive K⁺ Channel Genes Cause Transient Neonatal Diabetes and Permanent Diabetes in Childhood or Adulthood', *Diabetes*, vol. 56, no. 7, pp. 1930–1937, Jul. 2007.
 - [222] A. Hartemann-Heurtier *et al.*, 'Mutations in the *ABCC8* gene can cause autoantibody-negative insulin-dependent diabetes', *Diabetes Metab.*, vol. 35, no. 3, pp. 233–235, Jun. 2009.
 - [223] S. Ellard *et al.*, 'Permanent Neonatal Diabetes Caused by Dominant, Recessive, or Compound Heterozygous *SUR1* Mutations with Opposite Functional Effects', *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 81, no. 2, pp. 375–382, Aug. 2007.
 - [224] A. Nestorowicz *et al.*, 'Genetic Heterogeneity in Familial Hyperinsulinism', *Hum. Mol. Genet.*, vol. 7, no. 7, pp. 1119–1128, Jul. 1998.
 - [225] L. Aguilar-Bryan and J. Bryan, 'Molecular Biology of Adenosine Triphosphate-Sensitive

- Potassium Channels*', *Endocr. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 101–135, Apr. 1999.
- [226] H. Huopio *et al.*, 'Acute Insulin Response Tests for the Differential Diagnosis of Congenital Hyperinsulinism', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 10, pp. 4502–4507, Oct. 2002.
 - [227] C. Saint-Martin *et al.*, 'Monoallelic *ABCC8* mutations are a common cause of diazoxide-unresponsive diffuse form of congenital hyperinsulinism', *Clin. Genet.*, vol. 87, no. 5, pp. 448–454, May 2015.
 - [228] C. M. MacMullen *et al.*, 'Diazoxide-Unresponsive Congenital Hyperinsulinism in Children With Dominant Mutations of the β -Cell Sulfonylurea Receptor *SUR1*', *Diabetes*, vol. 60, no. 6, pp. 1797–1804, Jun. 2011.
 - [229] V. Bhushan Arya, Q. Aziz, A. Nessa, A. Tinker, and K. Hussain, 'Congenital hyperinsulinism: clinical and molecular characterisation of compound heterozygous *ABCC8* mutation responsive to Diazoxide therapy', 2014.
 - [230] M. Salomon-Estebanez *et al.*, 'Conservatively treated Congenital Hyperinsulinism (CHI) due to K-ATP channel gene mutations: reducing severity over time'.
 - [231] P. Sogno Valin *et al.*, 'Genetic Analysis of Italian Patients with Congenital Hyperinsulinism of Infancy', *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 79, no. 4, pp. 236–242, 2013.
 - [232] K. E. Snider *et al.*, 'Genotype and Phenotype Correlations in 417 Children With Congenital Hyperinsulinism', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 2, pp. E355–E363, Feb. 2013.
 - [233] R. R. Kapoor, C. James, and K. Hussain, 'Hyperinsulinism in Developmental Syndromes', in *Endocrine Involvement in Developmental Syndromes*, Basel: KARGER, 2009, pp. 95–113.
 - [234] W. Mlynarski *et al.*, 'Sulfonylurea improves CNS function in a case of intermediate DEND syndrome caused by a mutation in *KCNJ11*', *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, vol. 3, no. 11, pp. 640–645, Nov. 2007.
 - [235] A. Rangaraju, S. Krishnan, G. Aparna, S. Sankaran, A. U. Mannan, and B. H. Rao, 'Genetic variants in post myocardial infarction patients presenting with electrical storm of unstable ventricular tachycardia', *Indian Pacing Electrophysiol. J.*, vol. 18, no. 3, pp. 91–94, May 2018.
 - [236] Y.-F. Lin and Y. Chai, 'Functional modulation of the ATP-sensitive potassium channel by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation', *Neuroscience*, vol. 152, no. 2, pp. 371–380, Mar. 2008.
 - [237] S. Fujita *et al.*, 'Hyperinsulinemia and Insulin Receptor Gene Mutation in Nonobese Healthy Subjects in Japan.', *J. Endocr. Soc.*, vol. 1, no. 11, pp. 1351–1361, Nov. 2017.
 - [238] T. Unsal *et al.*, 'Genetic polymorphisms of *FSHR*, *CYP17*, *CYP11A1*, *CAPN10*, *INSR*, *SERPINE1* genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome.', *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 26, no. 4, pp. 205–16, Apr. 2009.
 - [239] J. Kreuger, D. Spillmann, J. Li, and U. Lindahl, 'Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity', *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 3, pp. 323–327, Jul. 2006.
 - [240] J. Tornberg *et al.*, 'Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 28, pp. 11524–9, Jul. 2011.
 - [241] J. Zhu *et al.*, 'A shared genetic basis for self-limited delayed puberty and idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism.', *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 4, pp. E646–54, Apr. 2015.
 - [242] H. Valdes-Socin, M. Rubio Almanza, M. Tom   Fernández-Ladreda, F. G. Debray, V. Bours, and A. Beckers, 'Reproduction, Smell, and Neurodevelopmental Disorders: Genetic Defects in Different Hypogonadotrophic Hypogonadal Syndromes', *Front.*

- Endocrinol. (Lausanne).*, vol. 5, p. 109, Jul. 2014.
- [243] A. Jo *et al.*, 'The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases', *Genes Dis.*, vol. 1, no. 2, pp. 149–161, Dec. 2014.
 - [244] P. Cela *et al.*, 'Ciliopathy Protein Tmem107 Plays Multiple Roles in Craniofacial Development', *J. Dent. Res.*, vol. 97, no. 1, pp. 108–117, Jan. 2018.
 - [245] Y.-H. Lee and J.-P. Saint-Jeannet, 'Sox9 function in craniofacial development and disease.', *Genesis*, vol. 49, no. 4, pp. 200–8, Apr. 2011.
 - [246] R. Sekido and R. Lovell-Badge, 'Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer', *Nature*, vol. 453, no. 7197, pp. 930–934, Jun. 2008.
 - [247] N. Gonen and R. Lovell-Badge, 'The regulation of Sox9 expression in the gonad', in *Current topics in developmental biology*, vol. 134, 2019, pp. 223–252.
 - [248] M. T. Dattani and I. C. Robinson, 'The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man.', *Clin. Genet.*, vol. 57, no. 5, pp. 337–46, May 2000.
 - [249] J. Breitfeld *et al.*, 'Genetic analyses of bone morphogenetic protein 2, 4 and 7 in congenital combined pituitary hormone deficiency.', *BMC Endocr. Disord.*, vol. 13, no. 1, p. 56, Dec. 2013.
 - [250] Y. Huang, Y. Lu, G. Mues, S. Wang, J. Bonds, and R. D'Souza, 'Functional evaluation of a novel tooth agenesis-associated bone morphogenetic protein 4 prodomain mutation.', *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 121, no. 4, pp. 313–8, Aug. 2013.
 - [251] Y.-M. Chan *et al.*, 'GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 28, pp. 11703–11708, Jul. 2009.
 - [252] A. Peters, H. Heuer, L. Schomburg, W. J. De Greef, T. J. Visser, and K. Bauer, 'Thyrotropin-releasing hormone gene expression by anterior pituitary cells in long-term cultures is influenced by the culture conditions and cell-to-cell interactions.', *Endocrinology*, vol. 138, no. 7, pp. 2807–12, Jul. 1997.
 - [253] B. Xu, W.-H. Yang, I. Gerin, C.-D. Hu, G. D. Hammer, and R. J. Koenig, 'Dax-1 and Steroid Receptor RNA Activator (SRA) Function as Transcriptional Coactivators for Steroidogenic Factor 1 in Steroidogenesis', *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1719–1734, Apr. 2009.
 - [254] C. Liu *et al.*, 'Steroid receptor RNA activator: Biologic function and role in disease', *Clin. Chim. Acta*, vol. 459, pp. 137–146, Aug. 2016.
 - [255] L. D. Kotan *et al.*, 'Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Caused by Inactivating Mutations in SRA1.', *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 8, no. 2, pp. 125–34, Jun. 2016.
 - [256] S. D. Noel *et al.*, 'TACR3 mutations disrupt NK3R function through distinct mechanisms in GnRH-deficient patients', *FASEB J.*, vol. 28, no. 4, pp. 1924–1937, Apr. 2014.
 - [257] S. Leka-Emiri, G. P. Chrousos, and C. Kanaka-Gantenbein, 'The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP).', *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 40, no. 8, pp. 789–802, Aug. 2017.
 - [258] K. Beate, N. Joseph, de R. Nicolas, and K. Wolfram, 'Genetics of Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism: Role of GnRH Receptor and Other Genes', *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2012, pp. 1–9, 2012.
 - [259] A. K. Topaloglu *et al.*, 'TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction.', *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 3, pp. 354–358, Mar. 2009.
 - [260] C. Tusset *et al.*, 'Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders.', *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, vol. 56, no. 9, pp. 646–52, Dec. 2012.
 - [261] F. Naillat *et al.*, 'Identification of the genes regulated by Wnt-4, a critical signal for

- commitment of the ovary.', *Exp. Cell Res.*, vol. 332, no. 2, pp. 163–78, Mar. 2015.
- [262] Z. Y. Roly *et al.*, 'The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development', *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, vol. 7, no. 3, p. e310, May 2018.
- [263] M. B. Mutlu *et al.*, 'A novel missense mutation, p.(R102W) in WNT7A causes Al-Awadi Raas-Rothschild syndrome in a fetus.', *Eur. J. Med. Genet.*, vol. 59, no. 11, pp. 604–606, Nov. 2016.
- [264] F. Buonocore *et al.*, 'Somatic mutations and progressive monosomy modify SAMD9-related phenotypes in humans', *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 5, pp. 1700–1713, May 2017.
- [265] S. Narumi *et al.*, 'SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7.', *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 7, pp. 792–7, Jul. 2016.
- [266] H. Shima *et al.*, 'MIRAGE syndrome is a rare cause of 46,XY DSD born SGA without adrenal insufficiency.', *PLoS One*, vol. 13, no. 11, p. e0206184, Nov. 2018.
- [267] A. I. Vega *et al.*, 'Expression analysis revealing destabilizing mutations in phosphomannomutase 2 deficiency (PMM2-CDG): expression analysis of PMM2-CDG mutations.', *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 34, no. 4, pp. 929–39, Aug. 2011.
- [268] R. Altassan *et al.*, 'Renal involvement in PMM2-CDG, a mini-review.', *Mol. Genet. Metab.*, vol. 123, no. 3, pp. 292–296, Mar. 2018.
- [269] P. Yuste-Checa *et al.*, 'The Effects of PMM2-CDG-Causing Mutations on the Folding, Activity, and Stability of the PMM2 Protein', *Hum. Mutat.*, vol. 36, no. 9, pp. 851–860, Sep. 2015.
- [270] J. M. Kaplan *et al.*, 'Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis', *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 3, pp. 251–256, Mar. 2000.

Received: 18 March 2019 | Revised: 2 September 2019 | Accepted: 4 October 2019
DOI: 10.1111/pedi.12931

ORIGINAL ARTICLE



WILEY

Next generation sequencing targeted gene panel in Greek MODY patients increases diagnostic accuracy

Elizabeth B. Tatsi¹ | Christina Kanaka-Gantenbein¹ | Andreas Scorilas² |
George P. Chrousos¹ | Amalia Sertedaki¹ 