ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΗΣ ΑΤΑΞΙΑΣ ΤΥΠΟΥ 36 (SCA36) ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

ΚΑΤΣΙΜΠΟΥΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΝΟΣΗΛΕΥΤΗΣ ΠΕ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ «ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΡΑΔΗΜΑ ΓΕΩΡΓΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ,ΕΚΠΑ

ΜΟΝΑΔΑ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Α’ Νευρολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

14/1/2020

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της Νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικής Αταξίας Τύπου 36 (SCA36) σε Έλληνες ασθενείς»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Καραδήμα Γεωργία, Επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α

Κούτσης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α

Κουτσιλιέρης Μιχαήλ, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α

ΜΟΝΑΔΑ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Α’ Νευρολογική Κλινική, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, ως συνέχεια της πρακτικής μου άσκησης, πραγματοποιήθηκε στην Μονάδα Νευρογενετικής του Αιγινητείου Νοσοκομείου στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία». Στο χρονικό διάστημα, που διήρκησε πραγματοποιήθηκε ο σκοπός της, που ήταν η προτυποποίηση της μεθόδου ανίχνευσης της εξανουκλεοτιδικής επανάληψης της SCA36, η διερεύνηση της συχνότητας της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό και η κλινικοεργαστηριακή συσχέτιση γονοτύπου φαινοτύπου της νόσου.

Ολοκληρώνοντας την εργασία αυτή, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά, όλους όσους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της. Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Γεωργία Καραδήμα για την παροχή του εργαστηρίου και την πολύτιμη καθοδήγησή της, σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και κατά την συγγραφή της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Κούτση για την καθοδήγησή του τόσο κατά τη διάρκεια της πρακτικής άσκησης, της κλινικής κατάταξης της ομάδας των ασθενών που μελετήθηκαν όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Στη συνέχεια ευχαριστώ τον κ. Μάριο Πάνα για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του. Έπειτα ευχαριστώ τη Χρυσούλα Καρτάνου για την υπομονή και την επιμονή σε κάθε απορία που είχα, σε ό,τι βοήθεια χρειαζόμουν όλο αυτό το χρόνο. Ευχαριστώ τη Ζωή Κοντογεωργίου για τις συμβουλές της στις ερωτησεις μου και τη Μαριάνθη Μπρέζα για τη βοήθεια της στην πρακτική άσκηση. Τέλος δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την Εύη Τσάνου, καθώς και όλους τους προαναφερθέντες για το πολύ όμορφο κλίμα που συνάντησα σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Δε θα μπορούσα παρά να πω ένα μικρό ευχαριστώ, σε σχέση με όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει, στην οικογένειά μου για τη στήριξη σε όλες τις επιλογές μου, τη βοήθεια που προσέφεραν όχι μόνο με υλικά μέσα, αλλά πολύ περισσότερο με ψυχολογική υποστήριξη και τόνωση, με προτροπή να ακολουθώ τα όνειρά μου. Σημαντική ήταν και η βοήθεια που έλαβα από τους φίλους και το στενό μου περιβάλλον όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΜΕΡΟΣ Α' ΕΙΣΑΓΩΓΗ……..6

Α.1 ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΕΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΣ ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΕΣ ΑΤΑΞΙΕΣ…….7

Α.2 ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΗ ΑΤΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ 36 (SCA36)……8

Α.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ..... ….8

Α.2.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ 8

Α.2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 9

Α.2.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ 11

Α.2.5 Η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ GGCCTG ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ SCA36 11

Α.2. 6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΣΠΕΥΣΗ (ANTICIPATION)……12

Α.2.7 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ 13

Α.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ 14

Α.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NOP56 15

Α.4.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ 15

Α.4.2 ΔΟΜΗ.....16

Α.4.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ……...16

Α.4.4 ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ……..……...17

Α.4.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ……..…..18

Α.5 ΣΚΟΠΟΣ…….....19

ΜΕΡΟΣ Β' ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……..20

Β.1 ΥΛΙΚΑ…….....21

Β.2 ΜΕΘΟΔΟΙ…….....22

Β.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA……...22
Β.2.2 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA……...27
Β.2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (SIZING PCR)……...27
Β.2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ…….....33
Β.2.5 ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ……37
Β.2.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΓΑΡΟΖΗΣ……39
Β.2.7 FRAGMENT ANALYSIS……41
Β.2.8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ FRAGMENT ANALYSIS……..42
Β.2.9 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING) ΚΑΤΑ SANGER……...43
Β.2.10 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ RP-PCR……..47
Β.2.11 ΧΡΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ……53
Β.2.12 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΗ……55
ΜΕΡΟΣ Γ' ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……..56
Γ.1 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR……57
Γ.2 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SANGER (SEQUENCING)……58
Γ.3 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ RP-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ……..60
Γ.4ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΗ ΑΤΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ 36…….....61
ΜΕΡΟΣ Δ' ΣΥΖΗΤΗΣΗ……62
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ…….....63
ΜΕΡΟΣ Ε' ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……66
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ…….....67
ΜΕΡΟΣ ΣΤ' ΠΕΡΙΛΗΨΗ……72
ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ……73
ABSTRACT…….....75
ΜΕΡΟΣ Ζ' ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ……77

ΜΕΡΟΣ Α’

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α.1. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΕΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΣ ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΕΣ ΑΤΑΞΙΕΣ

Οι αυτοσωμικές επικρατείς νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες (autosomal dominant cerebellar ataxias, ADCAs) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα κληρονομικών διαταραχών, που χαρακτηρίζονται από προοδευτική παρεγκεφαλιδική αταξία, συχνά συνοδευόμενη από επιπρόσθετα νευρολογικά σημεία και συμπτώματα, όπως πυραμιδικά και εξωπυραμιδικά σημεία, οφθαλμοπληγία, γνωστική έκπτωση, περιφερική νευροπάθεια και οπτική ατροφία[1]. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ως νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες (spinocerebellar ataxias, SCAs) και κατατάσσονται αριθμητικά κατά αύξοντα αριθμό με γνώμονα τη χρονική τους καταγραφή[2]. Μέχρι στιγμής έχουν καταγραφεί πάνω από 40 γενετικά διακριτές SCAs.[3]

Η επίπτωση των SCAs στην Ευρώπη υπολογίζεται 1 έως 3 ανά 100.000 άτομα[2], ενώ η παγκόσμια επίπτωση υπολογίζεται σε 1 έως 5 ανά 100.000 άτομα[4]. Η συχνότητα εμφάνισης των υποτύπων SCA ποικίλει ανάλογα με την εθνικότητα (φαινόμενο ιδρυτικής μεταλλαγής,founder effect).[5]

Οι πιο συχνοί τύποι SCA ανά τον κόσμο είναι οι SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 και SCA7, που οφείλονται σε επεκτάσεις τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων.[2] Οι ασθενείς που πάσχουν από SCAs, συνήθως προέρχονται από οικογένειες που εμφανίζουν αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης, ενώ έχουν καταγραφεί και σποραδικές περιπτώσεις στις οποίες η μεταλλαγή εμφανίστηκε de novo.[6]

Α.2 ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΗ ΑΤΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ 36 (SCA36)

Α.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 36 (SCA36) που αναγνωρίστηκε το 2011 ως νέος υπότυπος SCA, προκαλείται από την επέκταση μιας μεγάλης επανάληψης του εξανουκλεοτιδίου GGCCTG (650-2500) στο γονίδιο της πυρηνικής πρωτεΐνης 56 (*NOP56*). [8][23]

Η SCA36 είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή με μηχανισμό παθογένειας που φαίνεται ότι οφείλεται στην τοξική λειτουργία του μεταλλαγμένου RNA (RNA gain of function mechanism).[8][24] Υπάρχουν λίγες αναφορές για τη SCA36 και οι περισσότερες αφορούν υπο-ομάδες πληθυσμών, όπως στην Ιαπωνία, την Ισπανία, την Κίνα.[8][23][25][26]

Αποτελεί μια βραδέως εξελισσόμενη νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία, παρόμοια με άλλες αταξίες με όψιμη έναρξη, όπως οι SCA6, SCA23 και SCA35, που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης.[27][28][29][30][31]

Α.2.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η SCA36 συνήθως αρχίζει να εκδηλώνεται με βραδέως εξελισσόμενη νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία όψιμου ενάρξεως, συνήθως μεταξύ πέμπτης και έκτης δεκαετίας της ζωής.[8][23][32]

Περαιτέρω βασικά κλινικά χαρακτηριστικά με τα οποία εκδηλώνεται η νόσος είναι η νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής, η δυσαρθρία, οι ατροφίες των μυών, ιδιαίτερα της γλώσσας, που μπορεί να οδηγήσουν ακόμα και σε μέτρια δυσφαγία και η εμπλοκή του κατώτερου κινητικού νευρώνα.[33][34][35][36][37][38] Άλλα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν νυσταγμό, πτώση και ήπια έως μέτρια γνωστική εξασθένηση με πρότυπο μετωπιαίας βλάβης. Συχνά επίσης οι ασθενείς αυτοί εκδηλώνουν κατάθλιψη και απάθεια.[33]

Α.2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η διάγνωση της παρεγκεφαλιδικής αταξίας αποτελεί πρόκληση λόγω της ύπαρξης περισσότερων από 500 γονιδίων που σχετίζονται με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή αταξία. Έτσι πολλές οικογένειες που έχουν προσβληθεί από τη νόσο παραμένουν αδιάγνωστες εδώ και δεκαετίες. Η εισαγωγή μεθόδων μοριακής βιολογίας και γενετικής στη διαγνωστική αξιολόγηση βελτίωσε σημαντικά το χρόνο διάγνωσης.[39][40]

Οι νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες (SCAs) είναι μια ετερογενής ομάδα νευροεκφυλιστικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας και παρεγκεφαλιδικά συμπτώματα. Μέχρι σήμερα έχουν ανευρεθεί πάνω από 40 διακριτές κλινικές οντότητες.[3]

Επί του παρόντος, η SCA36 έχει μελετηθεί ελάχιστα στον παγκόσμιο πληθυσμό. Οι μελέτες κυρίως αφορούν υπο-ομάδες πληθυσμών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Η συχνότητα της SCA36 έχει αναφερθεί σε περιοχές της Ιαπωνίας, της Ισπανίας και πιο πρόσφατα της Κίνας. [8][23][25][26]

Όσον αφορά τον ευρωπαϊκό πληθυσμό φαίνεται να ακολουθεί μία άνιση κατανομή με την Ισπανία να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα (6.3%), ακολουθούμενη από την Ιταλία (3%), τη Γαλλία (1.9%) και την Πολωνία.[23][44][43]

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η συχνότητα της SCA36 στους πληθυσμούς που έχει μελετηθεί.

ΧΩΡΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ*	ΜΕΛΕΤΗ
Ισπανία	6.3%	Garcia-Murias et al., 2012[23]
Δυτική Ιαπωνία	3.6%	Kobayashi et al., 2011[8]
Ανατολική Ιαπωνία	1.5%	Obayashi et al., 2015[25]
Κίνα (πληθυσμός Han)	0.6%	Lee et al., 2016[26]
Γαλλία	1.9%	Obayashi et al., 2015[25]
Γερμανία	0.0%	Obayashi et al., 2015[25]
Ιταλία	3%	Sarto et al., 2013[44]
Ηνωμένο Βασίλειο	0.0%	Hersheson et al., 2012[42]
Πολωνία	Πέντε οικογένειες	Sulek et al., 2013[43]
ΗΠΑ	0.0%	Valera et al., 2017[41]
Πορτογαλία	0.0%	Loureiro et al., 2013[45]

**Όλες οι συχνότητες έχουν υπολογιστεί σε ομάδες ασθενών με SCA, εκτός από τη μελέτη της Ιταλίας που έχει υπολογιστεί σε ομάδα ασθενών με ADSCA.*

Πίνακας 1 : Συχνότητα της SCA36 σε μελετημένους πληθυσμούς

Α.2.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η παρουσία ή η απουσία της παθολογικής επέκτασης GGCCTG είτε θα επιβεβαιώσει είτε θα αποκλείσει την SCA36 στους ασθενείς σε κίνδυνο νόσησης καθώς και σε εκείνους που πιστεύεται ότι έχουν σποραδική αταξία. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, SizingPCR, RP-PCR) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ετερόζυγης επέκτασης. Ο ακριβής αριθμός των επαναλήψεων που φέρουν οι φορείς της παθολογικής επέκτασης μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση στυπώματος κατά Southern.[8][23]

Ο αριθμός των επαναλήψεων CGCCTG στα φυσιολογικά αλλήλια κυμαίνεται από 3 έως 14 σε καυκάσιους πληθυσμούς και από 3 έως 8 στους Ιάπωνες. Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα συνήθως φέρουν από 650 έως και 2500 επαναλήψεις.[8][23]

Τα αλληλόμορφα που περιέχουν από 15 έως 649 επαναλήψεις ονομάζονται αλληλόμορφα αβέβαιης κλινικής σημασίας,[8][23] λόγω του ότι δεν έχει διευκρινιστεί ξεκάθαρα η συμμετοχή τους στον παθολογικό φαινότυπο. Ενδεικτικά υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ότι ακόμα και μικρού μεγέθους επαναλήψεις, περίπου στις 30 επαναλήψεις, ενδέχεται να οδηγήσουν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου.[25]

Α.2.5 Η ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ GGCCTG ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ SCA36

Η SCA36 προκαλείται από την επέκταση του εξανουκλεοτιδίου GGCCTG στο πρώτο εσόνιο του γονιδίου NOP56 που εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 20. Οι φυσιολογικές επαναλήψεις κυμαίνονται από 3 έως 14. Αντίθετα, σε ασθενείς με SCA36 αυτή η εξανουκλεοτιδική επέκταση GGCCTG που περιγράφηκε προηγουμένως, εκτείνεται σε μέγεθος μεταξύ 6,8 kb και ~ 18 kp,. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί από 650 έως 2500 εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις, αντίστοιχα. [8][17]

Τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ανιχνεύονται με συμβατική PCR με εκκινητές που πλαισιώνουν την περιοχή επανάληψης GGCCTG.[8][23]

Η παρουσία δύο φυσιολογικών αλληλομόρφων του γονιδίου NOP56 αποκλείει τη διάγνωση της SCA36. Εάν ανιχνευτεί μόνο ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο, απαιτείται περαιτέρω έλεγχος με τη χρήση ειδικής PCR (Repeat Prime-PCR, RP-PCR), για να προσδιοριστεί εάν ο ασθενής είναι ομόζυγος φυσιολογικός ή ετερόζυγος παθολογικός και έτσι το δεύτερο αλληλόμορφό του φέρει παθολογικό αριθμό επαναλήψεων.[8][23]

Η ύπαρξη μεταλλαγμένου αλληλόμορφου ανιχνεύεται με ανάλυση RP-PCR για την επέκταση GGCCTG. Ακολουθώντας την ίδια εργαστηριακή διαδικασία ανιχνεύονται και οι επαναλήψεις στο εύρος της γκρίζας ζώνης, με αβέβαιη κλινική σημασία (15-650 επαναλήψεις).[8][23]

Α.2.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΣΠΕΥΣΗ (ANTICIPATION)

Η γενετική επίσπευση (anticipation) αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών νευροεκφυλιστικών διαταραχών, που προκαλούνται από νουκλεοτιδικές επαναλήψεις (copy number viariants, CNVs) και αναφέρεται στην εμφάνιση της νόσου σε πρωιμότερη ηλικία και με βαρύτερη συμπτωματολογία κατά τη μεταβίβασή της από γενεά σε γενεά.

Στις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε οικογένειες με SCA36 δεν έχει αναφερθεί στατιστικά σημαντική γενετική επίσπευση. [8][23][25]

Α.2.7 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Επί του παρόντος δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεραπεία για την αντιμετώπιση της νόσου. Η διεπιστημονική θεραπευτική προσέγγιση αφορά στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου και περιλαμβάνει:

- Φυσικοθεραπεία και εργοθεραπεία για τη βελτίωση της βάδισης, της ισορροπίας και του συντονισμού των κινήσεων. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στις δραστηριότητες της καθημερινής ζωής.
- Φυσική άσκηση και έλεγχος του βάρους.
- Βοηθήματα για τη διευκόλυνση της κίνησης (π.χ. χρήση βακτηρίας), καθώς και διαμόρφωση του προσωπικού χώρου για την εξυπηρέτηση του σκοπού αυτού.
- Λογοθεραπεία και συμβουλές επικοινωνίας για τη βελτίωση της δυσαρθρίας.
- Κατάλληλο διατροφικό πρόγραμμα για τη βελτίωση της δυσφαγίας και την αποφυγή εισρόφησης.
- Αποφυγή χρήσης αλκοόλ και φαρμάκων, που δύναται να επηρεάσουν τη λειτουργία της παρεγκεφαλίδας και του έσω ους. Επίσης αποφυγή χώρων που μπορεί να επηρεάσουν την ακουστική λειτουργία (π.χ. δυνατή μουσική από ακουστικά, θορυβώδη περιβάλλοντα).
- Η ακουστική αποκατάσταση και η λογοθεραπεία μπορούν να συμβάλουν στη βελτίωση της δυνατότητας διάκρισης των λέξεων και της ομιλίας. Τα ακουστικά βοηθήματα πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση. Η χρησιμότητα των κοχλιακών εμφυτευμάτων παραμένει άγνωστη, αν και έχουν προταθεί για άλλες νευροεκφυλιστικές αταξίες.[48]

- Διαχείριση της συναισθηματικής και νοητικής εξασθένισης μέσω της θεραπείας, αντιμετώπιση της κατάθλιψης και ψυχολογική υποστήριξη.[46]

Α.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ

Η γενετική συμβουλευτική είναι μια διαδικασία παροχής πληροφοριών σε άτομα και οικογένειες με σκοπό να εξηγηθούν οι πιθανές συνέπειες των ευρημάτων μιας γενετικής εξέτασης ή ενός γενετικού ελέγχου, τα πλεονεκτήματα και οι κίνδυνοι αυτών καθώς και, όπου είναι δυνατόν , να υποστηριχθεί το άτομο ώστε να μπορέσει μακροπρόθεσμα να διαχειριστεί τις επιπτώσεις. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα πριν και μετά την γενετική εξέταση ή τον γενετικό έλεγχο.

Η γενετική συμβουλευτική όσον αφορά τη SCA36 παρέχει πληροφορίες σε σχέση με τα εξής:

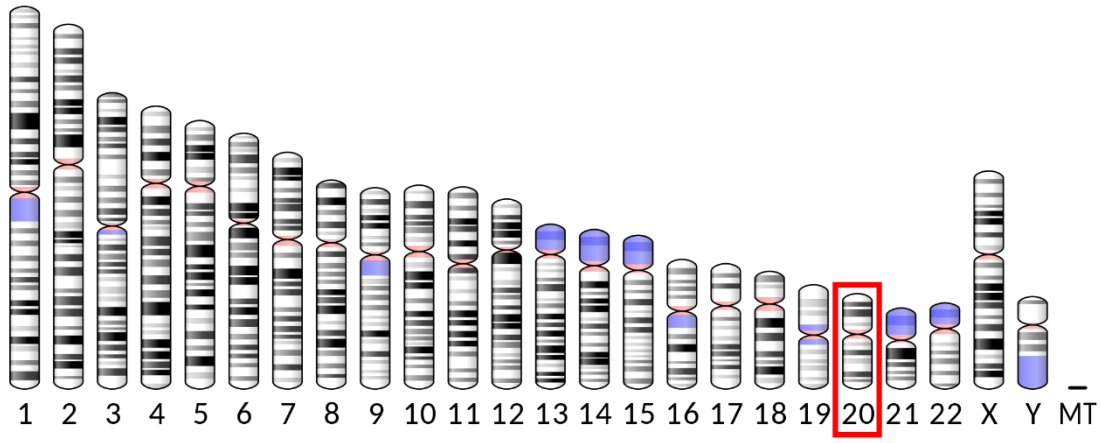
1. Τον τύπο κληρονόμησης. Η SCA36 κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.
2. Τη φύση της νόσου, τα συμπτώματα, την ηλικία έναρξης καθώς και την αντιμετώπισή της.
3. Τον κίνδυνο νόσησης των μελών της οικογένειας, τόσο για τους γονείς και τα αδέρφια όσο και για τους απογόνους ενός ατόμου που φέρει την παθογόνο επέκταση. Στην περίπτωση της SCA36 οι απόγονοι των προσβεβλημένων ατόμων έχουν 50% πιθανότητα να κληρονομήσουν την παθογόνο επέκταση.
4. Ζητήματα που αφορούν τον έλεγχο ασυμπτωματικών ενηλίκων, ασυμπτωματικών ανηλίκων, που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο και τον οικογενειακό προγραμματισμό.

5. Τι δυνατότητα προγεννητικού ελέγχου. Ο προγεννητικός έλεγχος διενεργείται για εγκυμοσύνες με αυξημένο κίνδυνο, εάν η παθογόνος παραλλαγή έχει εντοπιστεί σε ένα μέλος της οικογένειας που έχει προσβληθεί.[46]

Α.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ NOP56

Α.4.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

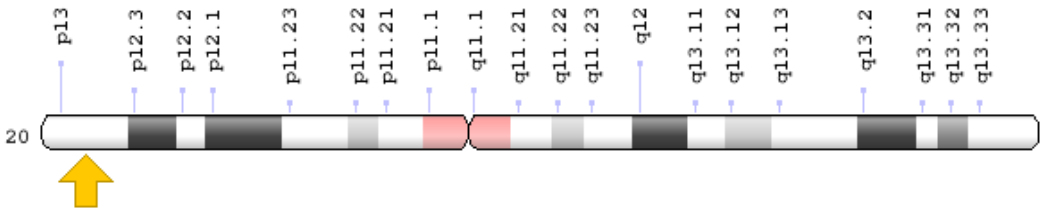
Το γονίδιο NOP56, εδράζεται στο χρωμόσωμα 20 (20p13) και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 56-kD, η οποία αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνεςNOP1 και NOP58 για να σχηματίσει τη ριβοσωμική υπομονάδα 60S.[7]



Εικόνα 1 : Χαρτογράφηση του γονιδίου *NOP56* στον άνθρωπο

Πηγή: Deloukas και συνεργάτες, 2002[7]

Μέσω ανάλυσης γονιδιωματικής αλληλουχίας οι Kobayashi και συνεργάτες (2011) χαρτογράφησαν το γονίδιο NOP56 στο χρωμόσωμα 20p13.[8]

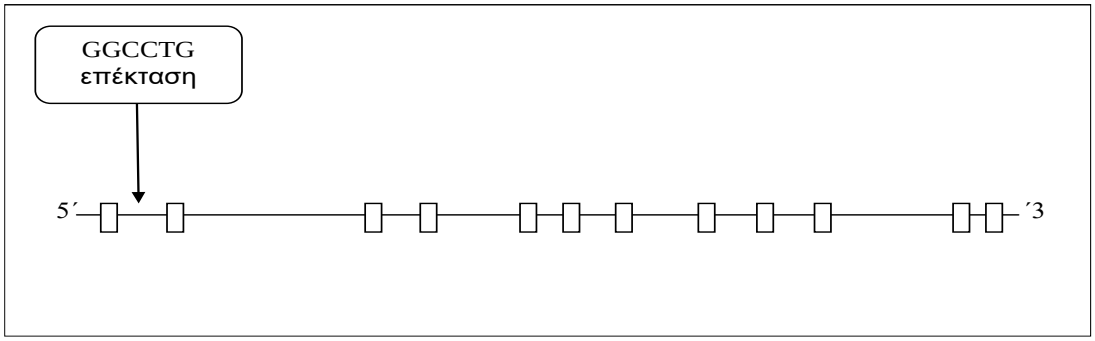


Εικόνα 2 *: Θέση του NOP56 στο χρωμόσωμα 20 στον άνθρωπο*

Πηγή: Deloukas και συνεργάτες, 2002[7]

Α.4.2 ΔΟΜΗ

Το γονίδιο NOP56 περιλαμβάνει 12 εξόνια συνολικού μήκους 5786 bp. Η κωδικοποιούσα περιοχή είναι μήκους 1782 bp. Η ακολουθία (GGCCTG), η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι παθογόνος όταν φέρει περισσότερες από 650 επαναλήψεις, βρίσκεται στο πρώτο εσόνιο του γονιδίου *NOP56*. [8]



Εικόνα 3 : Δομή του γονιδίου *NOP56*

Α.4.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το γονίδιο *NOP56* κωδικοποιεί την πυρηνική πρωτεΐνη 56 η οποία αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες NOP1 και NOP58 για να σχηματίσει τη ριβοσωμική υπομονάδα 60S.

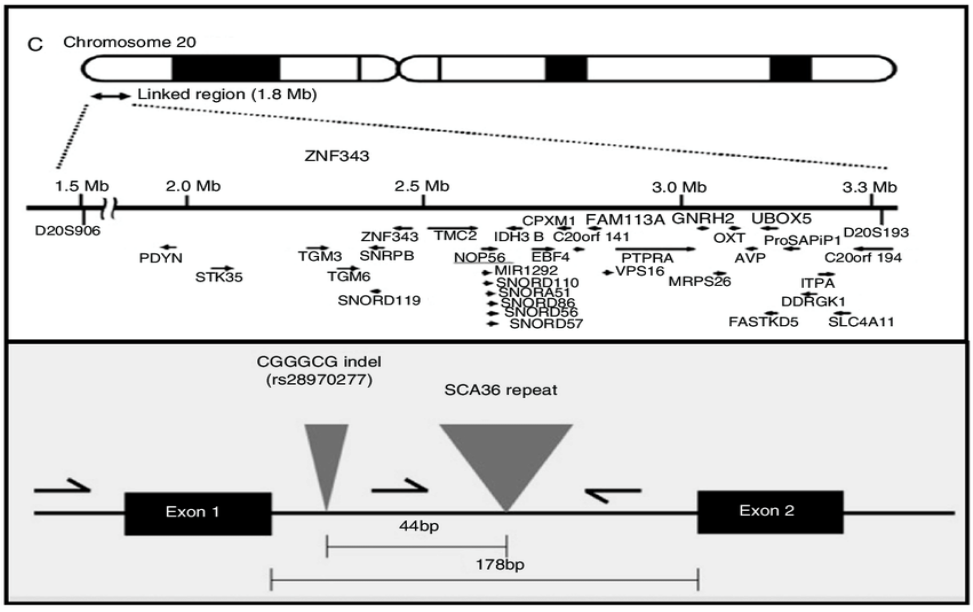
Οι Gautier και συνεργάτες (1997) αναφέρουν ότι μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου *NOP56* του ζυμομύκητα Saccharomyces cerevisiae παρεμποδίζει πολλά

από τα στάδια της ωρίμανσης του προ-rRNA, οδηγώντας σε βλάβες κατά τη δημιουργία της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S.[9]

Οι Hayano και συνεργάτες (2003) βασιζόμενοι σε γενετικές μελέτες στη ζύμη, απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη NOP56 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ωρίμανση του προ-rRNA, καθώς φαίνεται να εμπλέκεται στα πρώιμα έως ενδιάμεσα στάδια της σύνθεσης της ριβοσωμικής υπομονάδας 60S σε σειρές ανθρώπινων νεφρικών κυττάρων 293EBNA.[10]

Α.4.4 ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ

Η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία SCA36 προκαλείται από ετερόζυγη επέκταση μιας εξανουκλεοτιδικής επανάληψης GGCCTG στο εσόνιο 1του γονιδίου *NOP56.*[13]



Εικόνα 4: Πάνω μέρος: θέση του γονιδίου NOP56 στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 20 Κάτω μέρος: θέση της παθολογικής επέκτασης που είναι υπεύθυνη για την SCA36.

Πηγή: Arias και συνεργάτες, 2017[13]

Α.4.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η SCA36 προκαλείται από την παθογόνο επέκταση μιας μη κωδικοποιούσας επανάληψης GGCCTG στο πρώτο εσόνιο του γονιδίου *NOP56*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την πυρηνική πρωτεΐνη 56 (NOP56) η οποία αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες NOP1 και NOP58 για να σχηματίσει τη ριβοσωμική υπομονάδα 60S. Η πρωτεΐνη NOP56 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών NOP5 / NOP56 που εμπλέκονται στη μεθυλίωση του ριβοσωμικού RNA και στην ωρίμανση του προ-rRNA.[14] Η πρωτεΐνη NOP56 είναι απαραίτητη για το μετασχηματισμό κυττάρων κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης, μια διεργασία που επάγεται από τα γονίδια της οικογένειας Myc.[15] Ωστόσο οι μηχανισμοί παθογένειας της νόσου δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί.

Από πειράματα σε λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές, φαίνεται ότι η εξανουκλεοτιδική επέκταση οδηγεί στον σχηματισμό ενδοπυρηνικών εστιών RNA (RNA foci), τα οποία μπορεί να διαταράξουν την φυσιολογική μεταγραφή μέσω της απενεργοποίησης του ματίσματος καθώς και άλλων παραγόντων μεταγραφής. [8] Η παρουσία εστιών RNA έχει αναφερθεί και σε άλλους τύπους SCAs [16][17], στις μυοτονικές δυστροφίες τύπου 1 και τύπου 2 (myotonic dystrophy 1 and 2, DM1 και DM2) και στη νόσο Huntington- like 2 (HDL-2) [18].

Μια άλλη υπόθεση σχετικά με τους πιθανούς μηχανισμούς παθογένειας της SCA36 προέρχεται από την θεωρία ότι οι δυναμικές μεταλλαγές επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων του microRNA. Οι Kobayashi και συνεργάτες (2011) διαπίστωσαν ότι το γονίδιο MIR1292, το οποίο ευρίσκεται καθοδικά της επανάληψης, υποεκφράζεται στα κύτταρα ασθενών με SCA36.[8]

Μεταβολές στη δομή της χρωματίνης καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις φαίνεται ότι θα μπορούσαν επίσης, να εμπλέκονται στον μηχανισμό αιτιοπαθογένειας της νόσου.[19][20][21][22]

Α.5 ΣΚΟΠΟΣ

Η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 36 είναι μία πολύ σπάνια, ελάχιστα μελετημένη μορφή αταξίας τόσο παγκοσμίως όσο και στην Ελλάδα.

Σκοπός της μελέτης αποτελεί κατά πρώτον η προτυποποίηση της μεθόδου διάγνωσης της SCA36, κατά δεύτερον η διερεύνηση της συχνότητας της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό και κατά τρίτον η κλινικοεργαστηριακή συσχέτιση γονοτύπου και φαινοτύπου της νόσου.

Η παρούσα μελέτη αναμένεται να συμβάλει στο γενετικό έλεγχο της SCA36 με την προτυποποίηση της μοριακής μεθόδου διάγνωσης της νόσου και συνεπώς θα προσφέρει σημαντικά στη γενετική συμβουλή των ασθενών και των οικογενειών τους. Επιπλέον θα δώσει πληροφορίες σχετικά με την συχνότητα της νόσου στην Ελλάδα σε σχέση με την παγκόσμια κατανομή και θα συμπληρώσει το γενετικό προφίλ των αταξιών με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα αναμένεται να συμβάλουν σημαντικά στην πληρέστερη περιγραφή του γονιδιακού προφίλ των ελλήνων ασθενών με επικρατή τύπο αταξίας, ώστε να δίδεται η δυνατότητα για ακριβέστερη διάγνωση σε προσυμπτωματικό, συμπτωματικό και προγεννητικό επίπεδο.

ΜΕΡΟΣ Β’
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.1 ΥΛΙΚΑ

Η ομάδα που μελετήθηκε για την ταυτοποίηση της SCA36 εξανουκλεοτιδικής επανάληψης αποτελούνταν από 98 ασθενείς δείκτες. Οι 92 από αυτούς προήλθαν από μία κοόρτη 600 αταξικών ασθενών που ήταν αρνητικοί για τις πιο συχνές νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες (SCA1, 2, 3, 6, 7), ενώ οι υπόλοιποι προήλθαν από μία κοόρτη 20 ασθενών με νόσο Kennedy που ήταν αρνητικοί για την επανάληψη CAG στο γονίδιο του υποδοχέα των Ανδρογόνων. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .

Παράμετρος	**Ομάδα Ασθενών**
Ν	98
Φύλο	
Άρρεν	51 (52,0)
Θύλη	47 (48,0)
Ηλικία (έτη)	58 ± 13,20
Ηλικία έναρξης (έτη)	44 ± 13,48
Νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία με έναρξη 40-60 ετών	56 (57,1)
Νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής	6 (6,1)
Συμβολή του κατώτερου κινητικού νευρώνα	12 (12,2)
Τύπος κληρονομικότητας	
Οικογενείς	26 (26,5)
Σποραδικές	72 (73,5)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά της ομάδας ασθενών (Μ.Ο. ± Τυπική Απόκλιση).

Ο γενετικός έλεγχος των παραπάνω ασθενών πραγματοποιήθηκε στην Μονάδα Νευρογενετικής της 1ης Νευρολογικής Κλινικής, του Αιγινητείου Νοσοκομείου, Αθηνών. Όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση διενέργειας γενετικού ελέγχου.

Β.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει:

1) Την προτυποποίηση της μεθόδου RP-PCR για την ανίχνευση των εξανουκλεοτιδικών επεκτάσεων.
2) Την ανίχνευση της μεταλλαγής στην ομάδα ασθενών.

Για την ανίχνευση της εξανουκλεοτιδικής (GGCCTG) επέκτασης ακολουθήθηκε το εξής μεθοδολογικό σχήμα:

- Απομόνωση DNA
- Διατήρηση και μέτρηση DNA
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Sizing PCR)
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
- Φωτογράφηση πηκτώματος
- Αξιολόγηση αποτελεσμάτων αγαρόζης
- Εφαρμογή μεθόδου RP-PCR
- Χρήση γενετικού αναλυτή για διαχωρισμό των προϊόντων
- Αξιολόγηση αποτελεσμάτων αναλυτή
- Αλληλούχιση κατά Sanger του DNA

Στην συνέχεια γίνεται αναλυτική περιγραφή των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στο παραπάνω μεθοδολογικό σχήμα.

Β.2.1 *ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA*

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα εμπύρηνα κύτταρα του αίματος, δηλαδή από τα λευκοκύτταρα. Μετά τη λήψη περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό Na_2EDTA (10% w/v) από τον ασθενή ακολουθεί απομόνωση του DNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η μέθοδος του Χλωριούχου Νατρίου

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος στηρίζεται στην ιοντική ισχύ του αιμολύματος που παρασκευάζεται, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl το DNA παραμένει διαλυτό ενώ οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται επιτρέποντας έτσι την εύκολη απομάκρυνση τους. Η τελική απομόνωση πραγματοποιείται με την προσθήκη αιθανόλης, σε διάλυμα της οποίας το DNA είναι αδιάλυτο. Το DNA αυτό είναι γενωμικό, πρόκειται δηλαδή για καθαρό DNA χωρίς πρωτεϊνικές προσμίξεις.

Η μέθοδος υπερτερεί της μεθόδου της φαινόλης για το λόγο ότι δεν γίνεται χρήση τοξικών αντιδραστηρίων, πραγματοποιείται σε λιγότερο χρόνο (περίπου 2 ώρες) και περιλαμβάνει λιγότερες φυγοκεντρήσεις.[11]

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. Αντιπηκτικό διάλυμα Na_2EDTA (*10% w/v*)
2. Διάλυμα Tris-EDTA (*TE*), pH=8.0, 0.5M
3. Διάλυμα LYSIS I (*2.42g Tris HCl, 46.4g NaCl, 1.48g EDTA-Na_2και dH_2O σε τελικό όγκο 2lt και pH=7.4*)
4. Διάλυμα LYSIS II (*16.6g NH_4Cl, 2.0g $KHCO_3$, 0.74g EDTA-Na_2και dH_2O σε τελικό όγκο 2lt και pH=8.2*)
5. Διάλυμα NaCl 6M
6. Διάλυμα SDS 10%
7. Πρωτεϊνάση K (*10mg/dl*)
8. Απόλυτη αιθανόλη
9. Αιθανόλη 70%

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΣΤΑΔΙΟ Α'

1. Λήψη 10ml από περιφερικό αίμα, σε σωληνάριο των 50ml με πώμα, που περιέχει Na_2EDTA (αντιπηκτικό 2mg/ml αίματος).

(Το αίμα μπορεί να φυλαχτεί στους -80^oC επ'αόριστον).

2. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 40ml. Ήπια ανακίνηση.

Παραμονή στους 4^oC (πάγος ή στο ψυκτικό θάλαμο) για 30 λεπτά.

(το διάλυμα LYSIS I, καλό θα είναι να παραμείνει στους 4^oC, για να έχει την ίδια θερμοκρασία με τα κύτταρα).

3. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4^oC, για 15 λεπτά.

4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, αφήνοντας μικρή ποσότητα του υπερκείμενου να καλύπτει το ίζημα.

5. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 30ml. Ανακίνηση έως ότου διαλυθεί το ίζημα.

6. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4^oC, για 15 λεπτά.

7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.

8. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 20ml. Ανακίνηση έως ότου διαλυθεί το ίζημα.

9. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4^oC, για 15 λεπτά.

10. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.

11. Προσθήκη διαλύματος LYSIS II έως τα 7,5ml. Ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

12. Προσθήκη 400μl SDS 10% και 200μl πρωτεϊνάσης Κ.

13. Επώαση στους 55^{o}C για όλη τη νύχτα (O/N) σε υδατόλουτρο.

ΣΤΑΔΙΟ Β'

14. Προσθήκη 2ml NaCl και ισχυρή ανακίνηση.

15. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4^{o}C, για 15 λεπτά.

16. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε νέους, πλαστικούς, αποστειρωμένους σωλήνες των 10ml.

17. Φυγοκέντρηση στις 8500rpm, στους 4^{o}C, για 10 λεπτά.

18. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε νέους σωλήνες των 50ml.

19. Προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης.

20. Κατακρήμνιση και συλλογή DNA σε γυάλινη πιπέττα Pasteur με κυκλοτερή κίνηση.

21. Έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη (προαιρετικό).

22. Μεταφορά και επαναδιάλυση του DNA, σε σωληνάριο Eppendorf (1,5 ml) που περιέχει 1ml TE (Tris-EDTA)

23. Ανακίνηση του DNA σε περιστροφικό ανακινητή για 24-48 ώρες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Ο ρόλος του EDTA είναι διττός:

α) Καταρχήν δεσμεύει τα ιόντα Mg^{2+}, δημιουργώντας χηλικά σύμπλοκα, τα οποία χρειάζονται οι νουκλεάσες για να δράσουν. Με άλλα λόγια, το EDTA απενεργοποιεί έμμεσα τις νουκλεάσες.

β) Το EDTA δεσμεύει ιόντα Ca^{2+}, τα οποία με τα διάφορα άλλα ιόντα του αίματος θα ενεργοποιούσαν το μηχανισμό πήξης και θα δημιουργούσαν θρόμβους (ρόλος ως αντιπηκτικό).

2. Αν η απομόνωση του DNA γίνει την ίδια ημέρα με την αιμοληψία, το δείγμα μπορεί να φυλαχτεί στους 4^{o}C. Για τη διατήρησή του για πολλές μέρες απαιτείται η φύλαξή του στους -80^{o}C και όχι στους -20^{o}C, γιατί στη δεύτερη περίπτωση θα ληφθεί λιγότερη ποσότητα DNA κατά την απομόνωσή του. Βέβαια ο καλύτερος τρόπος διατήρησης του δείγματος θα ήταν σε ξηρό πάγο αιθανόλης, δηλαδή στους -30^{o}C, οπότε το αίμα παγώνει αμέσως, χωρίς τον κίνδυνο να λυθούν τα κύτταρα.

3. Η απομόνωση του DNA, είναι κατανοητό ότι γίνεται από τα εμπύρηνα κύτταρα του αίματος, δηλαδή από τα λευκοκύτταρα. Η απομόνωση των λευκοκυττάρων από το ολικό αίμα γίνεται με το αντιδραστήριο LYSIS I, με τη βοήθεια του οποίου λύονται τα ερυθροκύτταρα και απομακρύνονται. Το ίζημα που λαμβάνεται με τις φυγοκεντρήσεις αποτελείται από τα λευκοκύτταρα.

4. Το ίζημα των λευκοκυττάρων, διαλυτοποιείται με το αντιδραστήριο LYSIS II. Στην πραγματικότητα αυτό που γίνεται είναι αύξηση της οσμωτικής πίεσης λόγω της παρουσίας NaCl, κατά συνέπεια λύση των πυρήνων των λευκοκυττάρων και απελευθέρωση του DNA. Η διαλυτοποιήση με το LYSIS II πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο επιτυχής, ώστε να λυθούν οι περισσότεροι πυρήνες και να ληφθεί μεγαλύτερη ποσότητα DNA.

5. Ο ρόλος του SDS είναι η αποδιάταξη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέεται το DNA. Λειτουργεί ως απορρυπαντικό.

6. Το ένζυμο πρωτεϊνάση Κ, διασπά τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας των αμινοξέων. Έτσι δημιουργούνται πεπτίδια και όχι απλά αμινοξέα. Η δράση της πρωτεϊνικής κινάσης πραγματοποιείται στους 50^{o}C για όλο το βράδυ.

7. Η προσθήκη NaCl 6M (υπέρκορο) προκαλεί την ιοντική κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.

8. Η απόλυτη αιθανόλη έχει την ικανότητα να συσσωματώνει το γενωμικό DNA σε συγκεκριμένη ιοντική ισχύ. Έτσι το DNA κατακρημνίζεται στο διάλυμα.

9. Το διάλυμα 70% αιθανόλης βοηθάει το DNA να διαλυτοποιηθεί πλήρως στο ΤΕ.

10. Ο ρόλος του ΤΕ είναι τριπλός:

α) Το ΤΕ είναι ρυθμιστικό διάλυμα και διατηρεί το pH του διαλύματος κοντά στο 8.

β) Το EDTA λειτουργεί ως χηλική ένωση για τη δέσμευση ιόντων Mg^{2+}.

γ) Η συγκέντρωσή του είναι χαμηλή για να μη δεσμεύσει και το Mg^{2+} του ρυθμιστικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί μετά στην αντίδραση της PCR. Αν συμβεί αυτό, τότε δε θα γίνει μετά η ενζυμική αντίδραση.

11. Το τελευταίο στάδιο ανακίνησης του DNA σε περιστροφικό ανακινητήρα, βοηθά την πλήρη διαλυτοποίηση του DNA. Το βέλτιστο θα ήταν η ανακίνηση να διαρκούσε 2 ημέρες.

Β.2.2 *ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ DNA*

Το γενωμικό DNA φυλάσσεται στους 4ºC για ανάλυση αυθημερόν και στους −20ºC για μεταγενέστερη ανάλυση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA σε κάθε δείγμα γίνεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 260nm. Η καθαρότητα του DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ελέγχεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260nm και 280nm.

Για καθαρό DNA ισχύει η σχέση: OD 260nm /OD 280nm = 1.7-1.9.

Τιμές μικρότερες του 1.7 αποτελούν ένδειξη πρόσμιξης με πρωτεΐνες ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1.9 σημαίνει ότι υπάρχει πρόσμιξη με RNA.

Β.2.3 *ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (SIZING PCR)*

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αλυσιδωτή αντίδραση της DNA-πολυμεράσης (PCR), είναι μια ενζυμική αντίδραση που επιτρέπει την ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA αξιοποιώντας τις ιδιότητες του ενζύμου Taq DNA-πολυμεράση. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο έχει την ικανότητα να συνθέτει τους συμπληρωματικούς κλώνους των 2 αλυσίδων της μήτρας DNA με κατεύθυνση 5΄→3΄. Προϋπόθεση της δράσης του ενζύμου είναι οι αλυσίδες του DNA να βρίσκονται σε μονόκλωνη κατάσταση και να υπάρχει ολιγονουκλεοτίδιο που θα αποτελέσει το εναρκτήριο μόριο της αντιγραφής. Για κάθε αλυσίδα DNA χρησιμοποιείται διαφορετικό ολιγονουκλεοτίδιο που έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική με το ένα άκρο του τμήματος της αλυσίδας DNA που θα αντιγραφεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια ονομάζονται εκκινητές (primers) και είναι συνθετικά κατασκευασμένα.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, παρασκευάζεται μίγμα αποτελούμενο από ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα $MgCl_2$, μικρή ποσότητα DNA που θα αποτελέσει τη μήτρα αντιγραφής, δυο εκκινητές, δεοξυνουκλεοτίδια ως δομικά στοιχεία των νέων αλυσίδων DNA και DNA πολυμεράση.

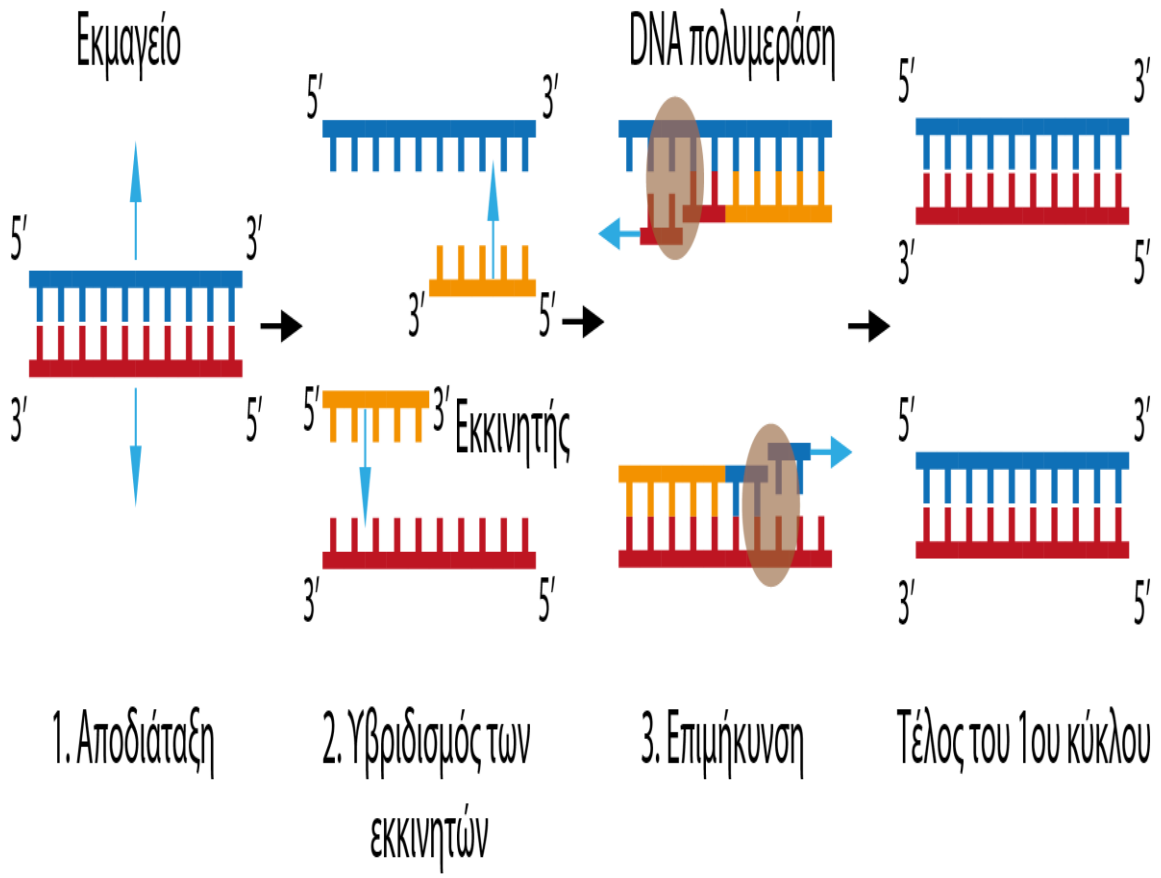
Για τη διενέργεια της αντίδρασης το μίγμα τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα που μεταβάλλει προγραμματισμένα τη θερμοκρασία και λέγεται "θερμικός κυκλοποιητής". Αρχική θέρμανση στους 94°C (συνήθως) οδηγεί σε αποδιάταξη των αλυσίδων του δίκλωνου DNA και σε δημιουργία μονόκλωνου μορίου. Στη συνέχεια μείωση της θερμοκρασίας (ανάλογα με το Tm = σημείο τήξης των εκκινητών) οδηγεί σε υβριδισμό των εκκινητών πάνω στο DNA μήτρα στις θέσεις με τις οποίες έχουν συμπληρωματική ακολουθία. Θέρμανση στους 72°C ευνοεί τη δράση της πολυμεράσης η οποία συνδέεται στις θέσεις όπου έχουν υβριδισθεί οι εκκινητές και αντιγράφει το DNA. Περαιτέρω θέρμανση στους 94°C σημαίνει την έναρξη ενός νέου κύκλου (αποδιάταξη, υβριδισμός εκκινητών, αντιγραφή DNA). Κάθε κύκλος λοιπόν αποτελείται από τρία στάδια:

α) Αρχική θέρμανση στους 94°C (συνήθως) για την αποδιάταξη των αλυσίδων του δίκλωνου DNA και τη δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων.

β) Ελάττωση της θερμοκρασίας (ανάλογα με το σημείο τήξης των εκκινητών)για τον υβριδισμό των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στη μήτρα DNA.

γ) Θέρμανση στους 72°C για την πρόσδεση της πολυμεράσης στα σημεία υβριδισμού των εκκινητών με τις μητρικές αλυσίδες DNA και για την επακόλουθη επιμήκυνση των εναρκτήριων τμημάτων από τη DNA-πολυμεράση με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας. Η επιμήκυνση αφορά στην προσθήκη δεοξυνουκλεοτιδίων στο 3΄ άκρο των εκκινητών, από το θερμοανθεκτικό ένζυμο, μέχρι την πλήρη σύνθεση των νέων κλώνων DNA. Στο στάδιο αυτό υπάρχουν διπλάσια αντίτυπα της επιλεγμένης περιοχής DNA σε σχέση με την αρχή του κύκλου.

δ) Περαιτέρω θέρμανση στους 94°C για την έναρξη ενός νέου κύκλου αποδιάταξης, υβριδισμού εκκινητών και αντιγραφής DNA.



Εικόνα 5: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης[47]

Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους. Το διάλυμα της αντίδρασης στο τέλος *n* κύκλων είναι δυνατόν να περιέχει θεωρητικά 2^n μόρια DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που ορίζουν τα εναρκτήρια μόρια. Συνήθως γίνονται περί τους 25 με 40 κύκλους αντιγραφής με αποτέλεσμα τον επαναλαμβανόμενο αναδιπλασιασμό της περιοχής που εξετάζεται (Εικόνα 5).[12]

ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. ddH2O
2. 10X PCR Buffer [200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl, Invitrogen]
3. $MgCl_2$ (50mM, Invitrogen)
4. Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια- ζεύγος εκκινητών (10μM)
5. Μίγμα dNTP's (10mM, New England Biolabs)
6. Taq DNA πολυμεράση (5u/μl Invitrogen)
7. Γενωμικό DNA (50-200ng/μl)
8. Διμεθυλικόσουλφοξίδιο (DMSO)
9. Σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml και 1ml
10. Παραφινέλαιο
11. Συσκευή θερμικού κυκλοποιητήSimplyApprtης εταιρείαςThermo
12. Πιάτο (PCR plate) πολυκαρβονικό των 96 θέσεων

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ SIZING PCR

Σε κάθε θέση του πιάτου προστίθενται κατά σειρά:

- 1μl γενωμικό DNA
- 2.5 μl 10x Buffer πολυμεράσης
- 1μl μίγμα dNTPs (10mM)
- 1 μl $MgCl_2$ (50mM)
- 1μl πρόσθιος εκκινητής (10μM)
- 1μl οπίσθιος εκκινητής (10μM)
- 14,75 μl ddH_2O
- 2,5 μl DMSO
- 0,25 μlTaq πολυμεράση (5u/μl)

Συνολικόςόγκος της αντίδρασης τα 25μl.

- Σημείωση (1):

Για περισσοτέρα του ενός δειγμάτα DNA, παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει όλα τα παραπάνω συστατικά, εκτός από το 1μl DNA (για παράδειγμα, αν έχουμε 5 δείγματα για PCR, παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει τον πενταπλάσιο όγκο από κάθε συστατικό και μετά σε κάθε θέση του πιάτου βάζουμε 1μl DNA και 1/5 από το συνολικό όγκο του μίγματος).

- Σημείωση (2):

Το DMSOείναι ένα άχρωμο, ελαιώδες και ελαφρά ιξώδες υγρό. Ο ρόλος του συνίσταται στην πρόσδεσή του στο DNA, σε περιοχές πλούσιες σε GC βάσεις, αλλάζοντας τη διαμόρφωσή του, πράγμα που το καθιστά περισσότερο ασταθές, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη θερμοκρασία αποδιάταξης(Tm).

Ακολουθεί προσθήκη 1 σταγόνας παραφινέλαιου σε κάθε δείγμα για την αποφυγή εξάχνωσης, τοποθέτηση του πιάτου PCR στη συσκευή του θερμικού κυκλοποιητή και έναρξη του προγράμματος που περιγράφεται παρακάτω:

PCR program		
94ο C	6 min	
94ο C	30 sec	30 cycles
55ο C	30 sec	
72ο C	30 sec	
72ο C	6 min	
4ºC	∞	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : Πρόγραμμα για Sizing-PCR

Ο τελευταίος κύκλος σταματά στο στάδιο της επιμήκυνσης, ώστε το τελικό προϊόν να μείνει σε δίκλωνη μορφή.

- Σημείωση (3):

Για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας αποδιάταξης(Tm), η οποία εξαρτάται από την περιεκτικότητα των εκκινητών σε βάσεις A-T, G-C, πολλαπλασιάζουμε τις A ή T των εκκινητών επί 2 και τις G ή C επί 4 και αθροίζουμε. Ο κανόνας θέλει το Tm κάθε εκκινητή είναι μικρότερο κατά 5 μονάδες από το παραπάνω άθροισμα δηλαδή Tm = [(A ή T)x 2 + (G ή C)x4] - 5. Στη δική μας περίπτωση το Tm του Pr.SCA36REP23-F από τον τύπο υπολογίζεται σε 50 και του Pr.SCA36REP23-R 56. Συνεπώς δοκιμάσαμε ως Tm τους 50^{o}C.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η αλληλουχία αναφοράς φαίνονται παρακάτω[8]

PRIMERS: Pr.SCA36REP23-F 5’ CGACGGTGGGGGTTTC3’

Pr.SCA36REP23-R 5’ AAC GCA ACC TCA GCG TCT 3’

Αλληλουχία Αναφοράς για SCA36

Με κίτρινο σημειώνεται η επανάληψη, με κόκκινο ο Pr.SCA36FORWARDκαι με πράσινο ο Pr.SCA36REVERSE

gtgaggagtggttgcggggcgcgggcgacgcgacggtgggggtttcggcctgcgttcggg
ccgcagacaggggcctgggcctgggcctgggcctgcgcctgcgcctgcgcctgccctggga
acgggttccggcagacgctgaggttgcgttgacgctcgcgccccggctcccgttccag

Β.2.4 *ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ*

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται σαν μια πρώτη μέθοδος διαχωρισμού των δειγμάτων. Όσα από τα δείγματα εμφανίσουν 2 ζώνες φυσιολογικών επαναλήψεων στην αγαρόζη, σημαίνει ότι δεν διαθέτουν παθολογικό αριθμό επαναλήψεων. Αντιθέτως όσα εμφανίσουν μία ζώνη φυσιολογικών επαναλήψεων , υπάρχει περίπτωση να είναι όντως φυσιολογικοί ομοζυγώτες για την συγκεκριμένη επανάληψη ή να διαθέτουν ένα δεύτερο αλληλόμορφο με παθολογικό αριθμό επαναλήψεων GGCCTG η οποία όμως δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με απλή PCR.

<u>ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ</u>

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό των διάφορων τμημάτων του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Μετά από έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο, τα αρνητικά φορτισμένα (λόγω των φωσφορικών ομάδων) τμήματα του DNA κινούνται μέσα στο πήκτωμα προς το θετικό πόλο. Το πήκτωμα αγαρόζης περιέχει έναν παράγοντα που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένας αρωματικός πολυκυκλικός υδρογονάνθρακας που επιτρέπει την οπτική αναγνώριση του DNA μετά από ηλεκτροφόρηση. Αυτό συμβαίνει χάρη σε δύο ιδιότητες που έχει η οργανική αυτή ένωση, δηλαδή:

α) Να ενσωματώνεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων των δίκλωνων αλυσίδων του DNA και

β) να φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ταχύτητα κίνησης ενός τμήματος DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες:

1. Το μοριακό βάρος του DNA (είναι αντιστρόφως ανάλογη).
2. Τη συγκέντρωση (%) της αγαρόζης στο πήκτωμα. Μικρή συγκέντρωση της αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA.

3. Τη διαμόρφωση του DNA (κλειστό κυκλικό, ανοικτό κυκλικό και γραμμικό).

4. Τη διαφορά τάσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη με την τάση που παρέχεται. Η διαχωριστική ικανότητα ελαττώνεται όταν η τάση του ρεύματος αυξάνεται υπέρμετρα. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται, όταν το DNA ηλεκτροφορείται με διαφορά τάσης όχι μεγαλύτερη από 5 Volt /cm μήκους πηκτώματος.

Η συμπεριφορά του DNA στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία ή τις αναλογίες βάσεων που περιέχουν τα τμήματα του DNA.[50]

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. Σκόνη αγαρόζης (*PCR agarose, Bio-RAD*)
2. Ρυθμιστικό διάλυμα 10xTAE (*400mM Tris, 2.5M οξικόοξύ, 10mM EDTA, pH=7.7*)
3. Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (*0.025g βρωμοφαινόλης, 2g Ficoll, 2ml 0.5M EDTA, pH=7.5 και ddH_2O έως τελικό όγκο 10ml*)
4. Δείκτης DNA (*pBR322 DNA-MspI Digest, New England Biolabs, Εικόνα 2.3*) 0.5mg DNA/ml
5. Βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/ml)

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Με βάση το μοριακό βάρος του DNA υπολογίζεται η πυκνότητα του πηκτώματος αγαρόζης που θα χρησιμοποιηθεί και διαλύεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε 1x TAE Buffer. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

2. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης.

3. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος κατέλθει στους 65^{o}C ακολουθεί προσθήκη 0.5μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), στην συγκεκριμένη περίπτωση προστέθηκαν 12μl EtBr. Στην συνέχεια πραγματοποιείται άμεση ανακίνηση για την ομοιόμορφη κατανομή του βρωμιούχου αιθιδίου και επίστρωση του διαλύματος σε ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή.

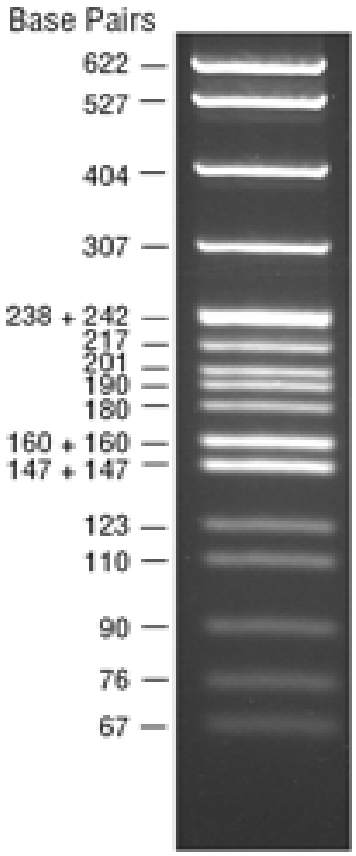
4. Για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης τοποθετείται χτένι κάθετα στο πήκτωμα και το διάλυμα αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 περίπου λεπτά. Μετά την πήξη του διαλύματος αγαρόζης, το χτένι αφαιρείται προσεκτικά.

5. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1x TAE το οποίο εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

6. Στα δείγματα του DNA που θα ηλεκτροφορηθούν προστίθενται 4μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Η βρωμοφαινόλη λόγω της ταχύτερης μετακίνησης της σε σχέση με τα περισσότερα μικρά μόρια του DNA επιτρέπει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Συγχρόνως η προσθήκη βρωμοφαινόλης επαυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετούνται, το καθένα χωριστά, στις θέσεις ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος της αγαρόζης.

7. Παράλληλα, σε ειδική θέση τοποθετείται ο δείκτης DNA (DNA marker). Στην προκειμένη περίπτωση, ο δείκτης DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pBR322 DNA-MspIDigest και φορτώθηκε εκατέρωθεν των δειγμάτων για ευκολότερη μέτρηση του μεγέθους τους. Και σε αυτόν προστέθηκαν 4μl χρωστικής και συμπληρώθηκε ο όγκος του (για να γίνει ίσος με αυτόν των δειγμάτων με ddH_2O.

8. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση ρεύματος, 120Volts, για περίπου 2 ώρες.



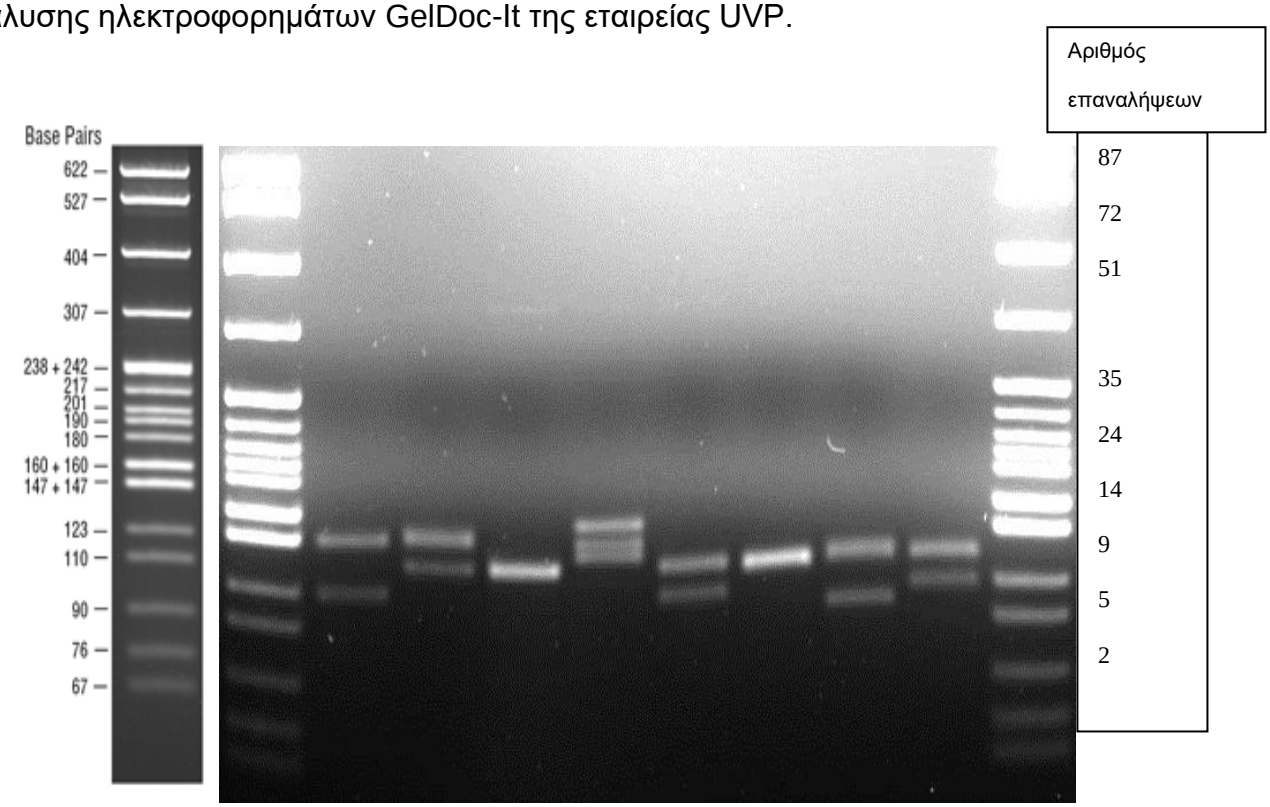
Εικόνα 6: pBR322 DNA-MspIDigestδείκτης

Β.2.5 *ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ*

Μετά την ηλεκτροφόρηση τα μόρια του DNA σχηματίζουν διακριτές ζώνες κατά την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, όποτε και φωτογραφίζονται.

Το βρωμιούχο αιθίδιο απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα.

Για την φωτογράφηση των πηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα απεικόνισης και ανάλυσης ηλεκτροφορημάτων GelDoc-It της εταιρείας UVP.



Marker A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 Marker

Φωτογραφία 1 : Φωτογραφία ηλεκτροφόρηση μετά από έκθεση σε UV.

Από τη φωτογραφία του πηκτώματος παρατηρούμε ότι οι ασθενείς Α1, Α2, Α4, Α5, Α7 και Α8 είναι ετερόζυγοι για τη μεταλλαγή, καθώς και τα δύο τους αλληλόμορφα βρίσκονται εντός του φυσιολογικού εύρους στο πήκτωμα.

Σε αντίθεση με τους ασθενείς Α1, Α2, Α4, Α5, Α7 και Α8 οι ασθενείς Α3 και Α6 φαίνεται να διαθέτουν μία ζώνη στο πήκτωμα, που σημαίνει ότι είτε είναι ομόζυγοι

είτε το δεύτερο αλληλόμορφό τους φέρει παθολογικό αριθμό επαναλήψεων και συνεπώς χρειάζεται να εξεταστεί με τη μέθοδο της RP-PCR.

Β.2.6 *ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΓΑΡΟΖΗΣ*

Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και την φωτογράφηση του πηκτώματος της αγαρόζης ακολουθεί η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Αρχικά διαχωρίζονται οι ομοζυγώτες από τους ετεροζυγώτες στο πήκτωμα. Αυτό σημαίνει ότι οι ετεροζυγώτες έχουν μικρό αριθμό GGCCTG εξανουκλεοτιδικών επαναλήψεων για αυτό και είναι ορατά και τα 2 τους αλλήλια στην αγαρόζη. Οι ομοζυγώτες, μπορεί όντως να έχουν ίδιο αριθμό επαναλήψεων και στα 2 τους αλληλόμορφα, ή να έχουν ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο και ένα παθολογικό που δεν είναι ορατό στην αγαρόζη.

Έτσι μόνο οι ομοζυγώτες καταγράφονται για να υποβληθούν και στην μέθοδο RP-PCR ώστε να είμαστε σίγουροι για το εάν διαθέτουν την παθολογική επανάληψη.

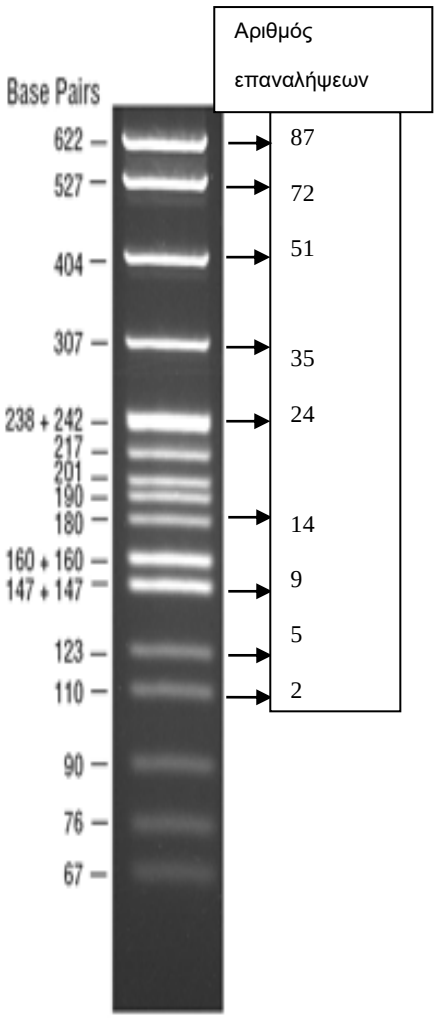
Από το πήκτωμα της αγαρόζης ταυτοποιείται και ο αριθμός των επαναλήψεων που φέρει κάθε αλληλόμορφο. Αυτός υπολογίζεται ως εξής:

- ✓ Το συνολικό μήκος της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζουμε είναι 120bp.
- ✓ Οι GGCCTG εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις στο συγκεκριμένο κομμάτι είναι 4. Άρα 6 x 4 = 24bp.
- ✓ Επομένως το σταθερό κομμάτι (χωρίς τις επαναλήψεις) που πολλαπλασιάζουμε κάθε φορά είναι 120 – 24 = 96 bp.

Άρα για να υπολογίσουμε τον αριθμό των επαναλήψεων κάθε αλληλομόρφου αφαιρούμε το σταθερό κομμάτι της αλληλουχίας και διαιρούμε με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων της επανάληψης, εφαρμόζοντας τον εξής αριθμητικό τύπο:

$$\text{No of repeats} = \frac{PCR\ product - 96}{6}$$

Εφαρμόζοντας αυτόν τον τύπο και για τον δείκτη DNA (pBR322 DNA-MspI Digest) μπορούμε να αντιστοιχήσουμε τις βάσεις του με εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα. Η διαδικασία αυτή βοηθά στον γρήγορο υπολογισμό των επαναλήψεων των δειγμάτων.



Εικόνα 7 :Αντιστοίχηση αριθμού βάσεων με εξανουκλεοτιδές επαναλήψεις στον pBR322 DNA-MspIDigest δείκτη

B.2.7 *FRAGMENT ANALYSIS*

Μετά την μέθοδο του Sizing PCR ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για φόρτωμα σε γενετικό αναλυτή και περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. GeneScan 500 ROX dye Size Standard (Applied Biosystems)
2. Hi-Di formamide (Applied Biosystems)
3. Σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml
4. ΓενετικόςαναλυτήςABI PRISM 3500 (Applied Biosystems)
5. Septa

- Σημείωση (1):

Ο ROX είναι ο marker του γενετικού αναλυτή. Ανάλογα με τις κορυφές του ROX υπολογίζεται το μέγεθος των αλληλομόρφων του δείγματος. Καλύπτει τμήματα DNA από 35-500 ζεύγη βάσεων.

- Σημείωση (2):

Η φορμαμίδη δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, δηλαδή διαχωρίζει τις δύο αλυσίδες του DNA.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα δείγματα μεταφέρονται σε plateόπου προστίθενται τα εξής:

- 1 μl PCR προϊόν (αφού πρώτα το έχουμε αραιώσει 1/5 με dH_2O)
- 1 μl ROX
- 12 μl formamide
- septa

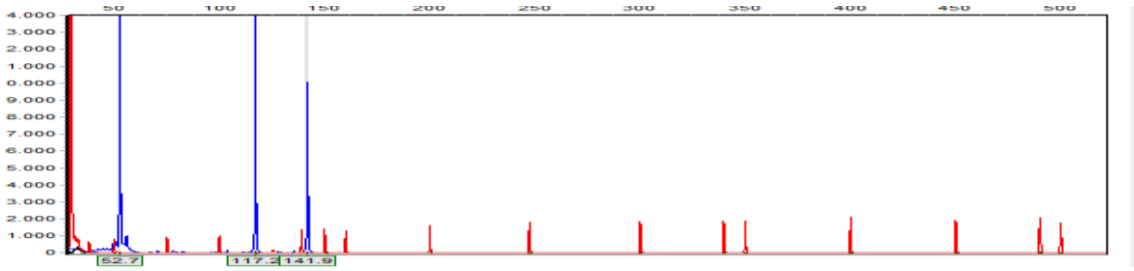
Αφού προετοιμαστούν τα δείγματα όπως ακριβώς αναφέρθηκε παραπάνω, είναι έτοιμα να φορτωθούν στον γενετικό αναλυτή. Ο συγκεκριμένος αναλυτής που

χρησιμοποιήθηκε είναι ο ABI 3500του Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου, Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία».

Β.2.8 *ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ FRAGMENT ANALYSIS*

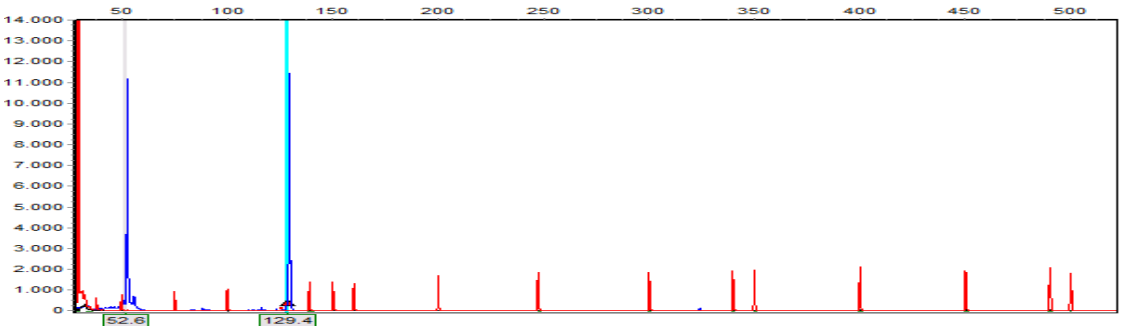
Μετά από την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του Sizing PCR, πραγματοποιείται η ανάλυση τους με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού. Στην προκειμένη, χρησιμοποιήθηκε το GeneMarkerV2.2.

Για ένα δείγμα ετερόζυγο για την εξανουκλεοτιδική επανάληψη η εικόνα από το γενετικό αναλυτή παρουσιάζει ξεκάθαρα δύο κορυφές.



Εικόνα 7: Ετερόζυγο δείγμα για την εξανουκλεοτιδική επανάληψη.

Για ένα δείγμα που παρουσιάζει μία κορυφή παίρνουμε την εξής εικόνα



Εικόνα 8: Δείγμα με μία κορυφή στο διάγραμμα του αναλυτή.

Ένα τέτοιο δείγμα είτε είναι ομόζυγο για την εξανουκλεοτιδική επανάληψη είτε είναι ετερόζυγο , αλλά η επανάληψη δε μπορεί να ανιχνευτεί με αυτή τη μέθοδο. Τα συγκεκριμένα δείγματα χρειάζεται να αναλυθούν περαιτέρω με την πιο ευαίσθητη μέθοδο RP- PCR.

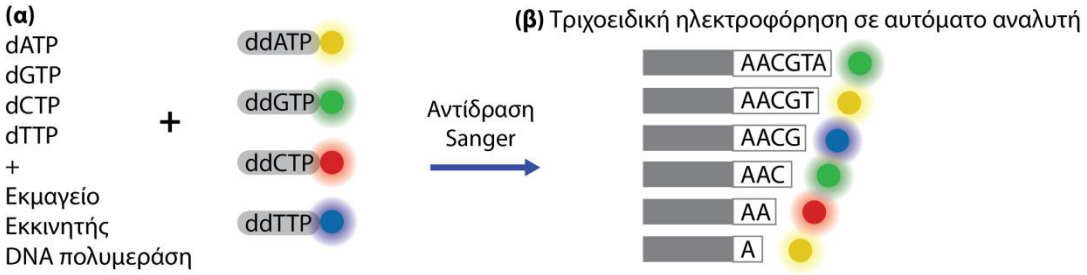
Β.2.9 *ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ(SEQUENCING) ΚΑΤΑ SANGER*

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική αλληλούχιση DNA σε δείγματα ασθενών, προκειμένου να προσδιορίσουμε τον ακριβή αριθμό των επαναλήψεων που διαθέτουν και στη συνέχεια να διορθώσουμε εάν χρειαστεί τις μετρήσεις των επαναλήψεων που προκύπτουν από τη “fragment analysis”.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη ικανότητα των τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοσιδίων να σταματούν την επιμήκυνση ενός κλώνου DNA. Σε ένα σωλήνα που περιέχει μονόκλωνα μόρια του DNA προστίθεται DNA πολυμεράση, DNA εκκινητή και των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Στο συγκεκριμένο μείγμα προστίθενται τα διδεοξυριβονουκλεοσίδια, κάποιο από τα οποία μπορεί να ενσωματωθεί στην αυξανόμενη αλυσίδα. Κατά συνέπεια η αλυσίδα δεν διαθέτει πλέον ένα ελεύθερο 3'-OH για τη δημιουργία του επόμενου φωσφοδιεστερικού δεσμού, οπότε η αλυσίδα του DNA σταματά σε αυτό το σημείο.

Για τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας ενός κλάσματος DNA χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη μέθοδος με κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά τριφωσφορικά διδεοξυριβονουκλεοσίδια (ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP) σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης αντιγράφων του ίδιου μονόκλωνου DNA εκμαγείου. Κάθε αντίδραση ανάλογα με το ενσωματωμένο τριφωσφορικό διδεοξυριβινουκλεοσίδιο παράγει μια ομάδα μορίων DNA που σταματούν σε διαφορετικά σημεία της αλληλουχίας. Τα προϊόντα αυτών των τεσσάρων αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τέσσερις στήλες μιας πηκτής πολυακρυλαμίδης. Τα νεοσυντεθειμένα κλάσματα ανιχνεύονται, όντας σημασμένα με έναν δείκτη (ραδιενεργό ή φθορίζοντα) που έχει ενσωματωθεί σε αυτά. Η αλληλουχία του νεοσυντεθειμένου κλώνου μπορεί να καθορισθεί με ανάγνωση των ζωνών, αρχίζοντας από το κάτω άκρο της πηκτής διαβάζοντας «γράμμα- γράμμα».[51]



Εικόνα 9: Απεικόνιση της μεθόδου sequencing[46]

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. ddH_2O
2. Nucleo Spin ExtractII Column
3. NT1 Buffer
4. NT3 Buffer
5. NEBuffer
6. Primer Pr.SCA36REP23-R
7. 5x buffer
8. TRP
9. Blue-Mix
10. Terminator removal bind and wash buffer

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. Το πρώτο βήμα είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπως ακριβώς περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο σελ 27.
2. Στη συνέχεια κάνουμε ένα πήκτωμα αγαρόζης (checking gel 3%).
3. Ακολουθεί ο καθαρισμός των PCR προϊόντων με ιοντοαναταλακτικές στήλες (**Machery-Nagel kit).**
4. Μετά τον καθαρισμό προχωράμε σε ένα ακόμα checking gel 3%.
5. Μετά τον καθαρισμό προχωράμε στις αντιδράσεις sequencing με τα BigDye Terminator Kit/ Monarch purification NEB kit
6. Μετά τις αντιδράσεις sequencing καθαρίζουμε ξανά τα PCR προϊόντα με το Terminator Removal kit.

Πιο συγκεκριμένα τα πρωτόκολλα κάθε βήματος είναι τα εξής:

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR

1. 25μl PCRpr + 75μl ddH_2O + 200μl NT1 Buffer
2. Προσθήκη του παραπάνω διαλύματος σε μια στήλη NucleoSpin ExtractIIColumn
3. Φυγοκέντρηρη στα 13.000rpm για 30sec
4. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωλήνα
5. Προσθήκη 700 μl NT3 Buffer στη στήλη
6. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 30sec
7. Απομάκρυνση του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωλήνα
8. Επανάληψη των βημάτων 5,6,7
9. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 60sec
10. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωλήνα
11. Προσθήκη στη στήλη 30μl NEB Buffer (70^oC)
12. Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
13. Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 60sec
14. Συλλογή διηθήματος, στο οποίο περιέχεται καθαρό το PCRpr

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ SEQUENCING

Σε κάθε πηγάδι πιάτου 98 θέσεων τοποθετείται:

- 3 μl 5x buffer
- 2 μl TRP
- 10 μl dH_2O
- 4 μl Primer Pr.SCA36REP23-R
- 1 μl PCR product

Πρόγραμμα στον κυκλοποιητή: SeqGAn

Θερμοκρασ	**Χρόνος**
96ºC	10΄΄
50ºC	5΄΄
60ºC	4΄
Στάδια 1-3	
4ºC	∞

Πρωτόκολλο καθαρισμού Sequencing με το Terminator removal kit της Applichem

1. 20μLπροιόνsequencing +5μLBlue-Mix +150μL Terminator removal bind and wash buffer
2. Φορτώνω στη στήλη
3. 13.000rpm/1min
4. Απορρίπτω διήθημα
5. 400μL Terminator removal bind and wash
6. 13.000rpm/2min
7. Απορρίπτω διήθημα
8. Τοποθετώ τη στήλη σε καθαρό σωλήνα
9. 25μL ddH_2O
10. 2min RT
11. 13.000rpm/1min

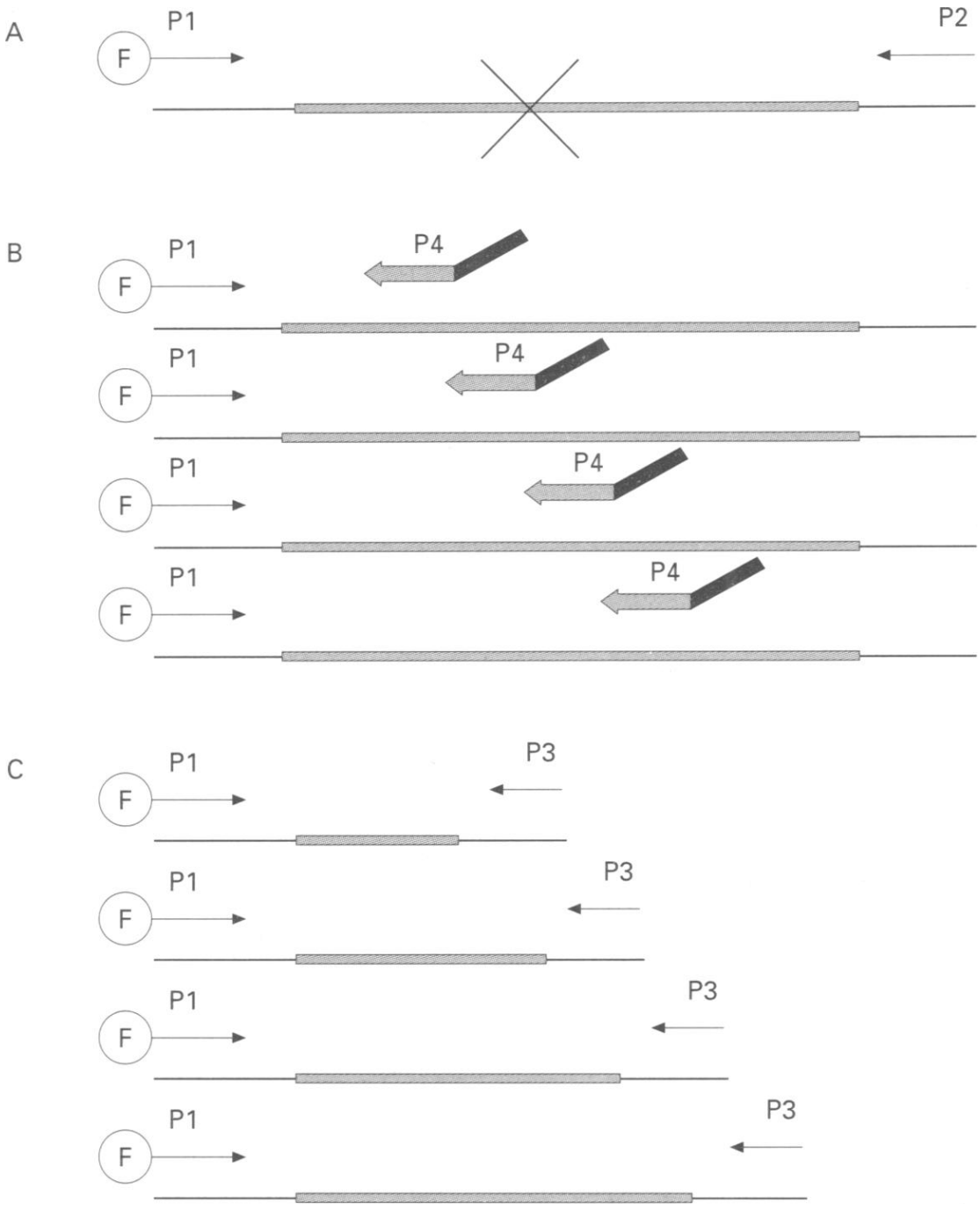
Β.2.10 *ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ RP-PCR*

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της GGCCTG εξανουκλεοτιδικής επέκτασης στα άτομα που εμφάνισαν μία ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης που αναφέρθηκε προηγουμένως.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος του RP-PCR, χρησιμοποιεί 3 εκκινητές με διαφορετική αναλογία. Ο πρώτος εκκινητής (P1-FAM) είναι σημασμένος και υβριδοποιείται πριν την επανάληψη. Ο δεύτερος (P4-anchor) έχει ένα άκρο συμπληρωματικό της επανάληψης-στόχου και στο άλλο φέρει μια μη-ειδική αλληλουχία-ουρά (5'). Ο τρίτος εκκινητής (P3-tail) είναι πανομοιότυπος με την μη-ειδική αλληλουχία-ουρά του δεύτερου. Αυτή η μη-ειδική αλληλουχία-ουρά είναι ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που πληρεί τα παρακάτω κριτήρια: 1) δεν εμφανίζει αυτό-συμπληρωματικότητα, 2) δεν είναι συμπληρωματική της επανάληψης και 3) δεν εμφανίζει ομολογία με καμία γνωστή αλληλουχία στον άνθρωπο.

Στους αρχικούς κύκλους ο P4-anchor εκκινητής υβριδοποιείται σε πολλαπλές θέσεις πάνω στην επανάληψη (η ειδικότητα καθορίζεται από τον P1-FAM εκκινητή). Το κλειδί στην συγκεκριμένη τεχνική είναι η αναλογία των εκκινητών η οποία είναι 10:1 του P3-tail και P1-FAM προς τον P4-anchor, δηλαδή οι δύο εκκινητές έχουν δεκαπλάσια συγκέντρωση από τον τρίτο. Αυτό γίνεται, για να διασφαλιστεί ότι ο P4-anchor θα εξαντληθεί στους πρώτους κύκλους πολλαπλασιασμού και ότι δεν θα δημιουργηθούν νέες θέσεις υβριδοποίησης του, στο εσωτερικό των ήδη πολλαπλασιασμένων τμημάτων και κατά συνέπεια μείωση του μεγέθους των προϊόντων. Στην συνέχεια ο P3-tail εκκινητής προσδένεται στα προϊόντα των προηγούμενων γύρων και τα επιμηκύνει. Ο χρόνος επιμήκυνσης είναι αρκετός ούτως ώστε να πολλαπλασιαστούν και οι μεγαλύτερες επαναλήψεις. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα χαρακτηριστικό μείγμα τμημάτων DNA αυξανόμενου μεγέθους τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους τόσο όσο το μέγεθος της επανάληψης (π.χ. 6 νουκλεοτίδια για την επανάληψη που μας ενδιαφέρει).[52]



Εικόνα 8: Α. απλή PCR , Β. RP-PCR (1ο βήμα), C. RP-PCR (2ο βήμα) [53]

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. ddH2O
2. 5 XBuffer (-$MgCl_2$, KapaLongRange)
3. $MgCl_2$ (50mM, Kapa Long Range)
4. Μίγμαεκκινητών 10:1* (10 μM)
5. Μίγμα dNTP's (10mM, New England Biolabs)
6. Kapa Long Range DNA polymerase (5u/μl)
7. Γενωμικό DNA (50-200ng/μl)
8. Betaine (5M)
9. Σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml
10. Παραφινέλαιο
11. Συσκευή θερμικού κυκλοποιητή της εταιρείας M.J. Research Inc. μοντέλο PTC-100TM
12. Πιάτο (PCR plate) πολυκαρβονικό των 96 θέσεων

10:1 Pr Mix*	
SCA36REP23-F(100μM)	16.5 μl
SCA36REP23-R (100μM)	16.5 μl
SCA36REPEAT-SPECIFIC(100μM)	1.65 μl
dH_2O	365.35 μl

Πίνακας 4: Δημιουργία PCRmix 10:1

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σε κάθε θέση του πιάτου προστίθενται τα αντιδραστήρια όπως φαίνονται στον πίνακα .

Mix	μl (ανά δείγμα)
Δείγμα DNA	1
10:1 Pr Mix*	2
Betaine (5M)	9.5
5xBuffer	5
dH_2O	4.75
$MgCl_2$	2.25
dNTP's	1.25
Enzyme	0.25
Συνολικός όγκος της αντίδρασης τα 25μl.	

Πίνακας 5: Πρωτόκολλο εργασίας RP- PCR

Όπως και στο Sizing- PCR για περισσότερα του ενός δείγματα, παρασκευάζεται μίγμα, πολλαπλασιάζοντας τις ποσότητες των παραπάνω αντιδραστηρίων με τον αριθμό των δειγμάτων.

Ακολουθεί η προσθήκη μιας σταγόνας παραφινέλαιου σε κάθε δείγμα και μεταφορά του PCR πιάτου στην συσκευή του θερμικού κυκλοποιητή, στο πρόγραμμα που περιγράφεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Time		*ycle*
emp		
8 C	10 min	
7 C	35 sec	
3 C	2 min	0
8 C	2 min	
7 C	35 sec	
3 C	2 min	5
8 C	2 min (+20 sec/cycle)	
8 C	7 min	
C	hold	

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : Πρόγραμμα για RP-PCR

Παρακάτω παρατίθενται η αλληλουχία των εκκινήτων καθώς η περιοχή των επαναλήψεων στο γονίδιο.[8]

Ακολουθία εκκινητών:

- SCA36FORWARD: 5'TTT CGG CCT GCG TTC GGG 3'
- SCA36REVERSE: 5'TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG 3'
- SCA36REPEAT- SPECIFIC: 5'TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG CAG GCC CAG GCC CAG GCC CAG GCC 3'

Περιοχή των επαναλήψεων στο γονίδιο *NOP56* :

gtgaggagtggttgcggggcgcgggcgacgcgacggtgggggtttcggcctgcgttcggg
ccgcagacaggcctgggcctgggcctgggcctgcgcctgcgcctgcgcctgccctggga
acgggttccggcagacgctgaggttgcgttgacgctcgcgccccggctcccgttccag

<u>όπου:</u> με πράσινο χρώμα σημειώνεται ο SCA36FORWARD, με μπλε σημειώνεται η επανάληψη όπου σε αυτήν υβριδοποιείται ο SCA36REPEAT-SPECIFIC, ο οποίος έχει μία πλευρική ουρά, στην οποία υβριδοποιείται ο SCA36REVERSE.

<u>Σημείωση (1):</u> Θετικά δείγματα για την εξανουκλεοτιδική επανάληψη χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση RP- PCR. Τα συγκεκριμένα δείγματα προσφέρθηκαν ευγενικά από το εργαστήριο του Dr H. Houlden (UCL Neurogenetics Unit).

Β.2.11 *ΧΡΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ*

Μετά την μέθοδο του RP-PCR ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων για φόρτωμα σε γενετικό αναλυτή και περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

1. GeneScan 500 ROX dye Size Standard (Applied Biosystems)
2. Hi-Di formamide (Applied Biosystems)
3. Σωληνάριατύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml
4. ΓενετικόςαναλυτήςABI PRISM 3500 (Applied Biosystems)
5. Septa

- Σημείωση (1):

Ο ROX είναι ο marker του γενετικού αναλυτή. Ανάλογα με τις κορυφές του ROX υπολογίζεται το μέγεθος των αλληλομόρφων του δείγματος. Καλύπτει τμήματα DNA από 35-500 ζεύγη βάσεων.

- Σημείωση (2):

Η φορμαμίδη δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, δηλαδή διαχωρίζει τις δύο αλυσίδες του DNA.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα δείγματα μεταφέρονται σε plateόπου προστίθενται τα εξής:

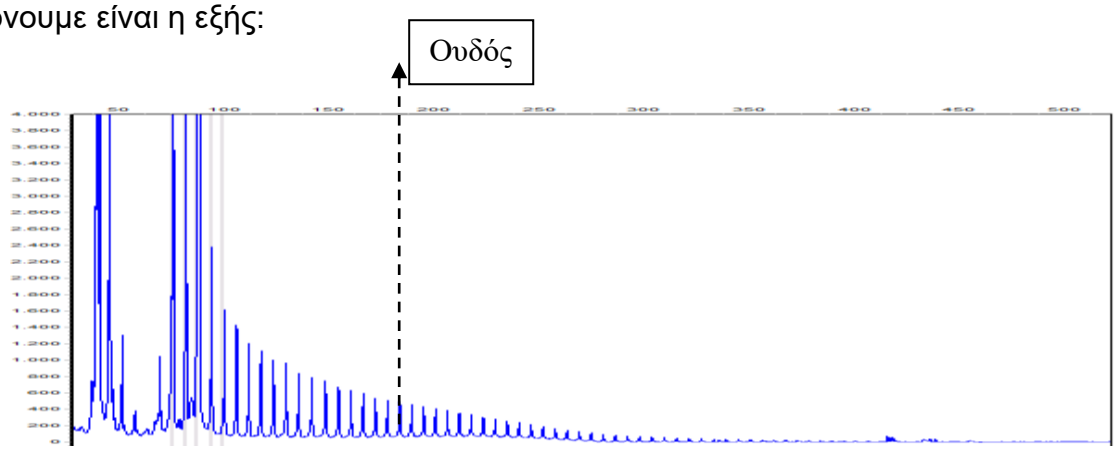
- 4 μl PCR προϊόν
- 1 μl ROX
- 12 μl formamide
- septa

Αφού προετοιμαστούν τα δείγματα όπως ακριβώς αναφέρθηκε παραπάνω, είναι έτοιμα να φορτωθούν στον γενετικό αναλυτή (ABI 3500). .

Β.2.12 *ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΗ*

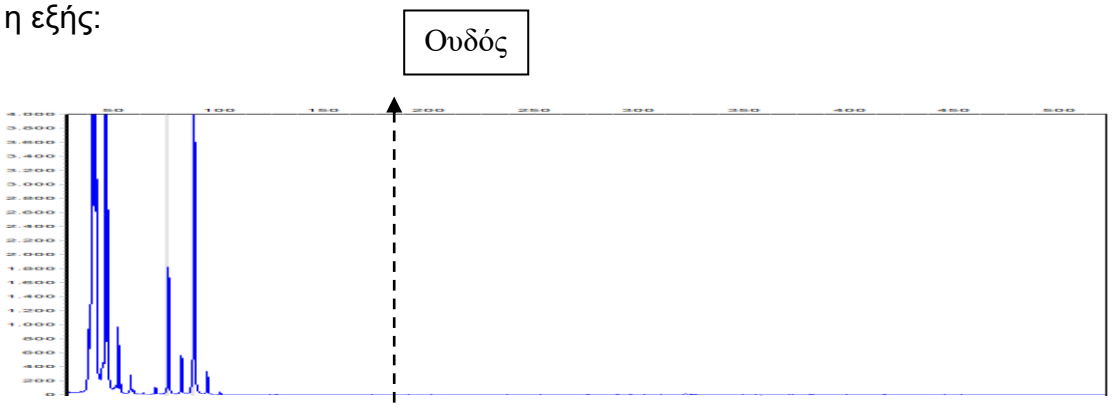
Μετά από την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του RP-PCR, πραγματοποιείται η ανάλυση τους με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού. Στην προκειμένη, χρησιμοποιήθηκε το Gene Marker V2.2.

Για ένα δείγμα που διαθέτει θετικό αριθμό επαναλήψεων (>650) η εικόνα που παίρνουμε είναι η εξής:



Εικόνα 10: Δείγμα που διαθέτει παθολογικό αριθμό εξανουκλεοτιδικής επέκτασης (θετικό).

Για ένα δείγμα με αρνητικό αριθμό επαναλήψεων (<650) η εικόνα που παίρνουμε είναι η εξής:



Εικόνα 11: Δείγμα που δε διαθέτει παθολογικό αριθμό εξανουκλεοτιδικής επέκτασης (αρνητικό).

Συμπερασματικά, με την παραπάνω μεθοδολογία καταλήγουμε να μπορούμε να ανιχνεύσουμε την εξανουκλεοτιδική GGCCTG επέκταση.

Σημείωση (1):Μας προσφέρει μία ποιοτική εικόνα για το εάν ένα δείγμα ξεπερνά τον ουδό, οπότε και έχει την επέκταση ή όχι.

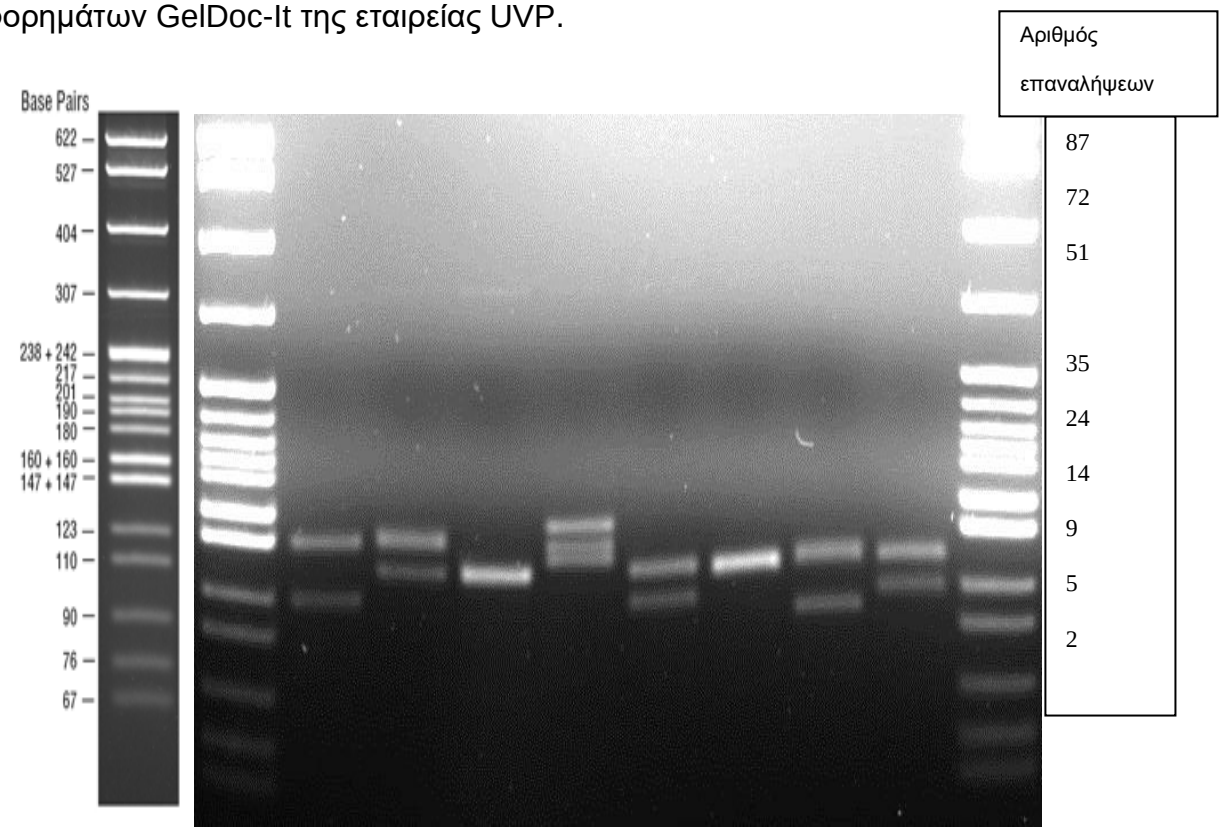
ΜΕΡΟΣ Γ’
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ PCR ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τεχνική PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA. Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η προτυποποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου για την ανίχνευση της εξανουκλεοτιδικής επανάληψης GGCCTG.

Μετά την πραγματοποίηση του PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και φωτογραφήθηκαν με σύστημα απεικόνησης και ανάλυσης ηλεκτροφορημάτων GelDoc-It της εταιρείας UVP.



Marker A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 Marker

Φωτογραφία 2 : Φωτογραφία ηλεκτροφόρηση μετά από έκθεση σε UV.

Από τη φωτογραφία του πηκτώματος παρατηρούμε ότι οι ασθενείς Α1, Α2, Α4, Α5, Α7 και Α8 είναι ετερόζυγοι για τη μεταλλαγή, καθώς και τα δύο τους αλληλόμορφα βρίσκονται εντός του φυσιολογικού εύρους στο πήκτωμα.

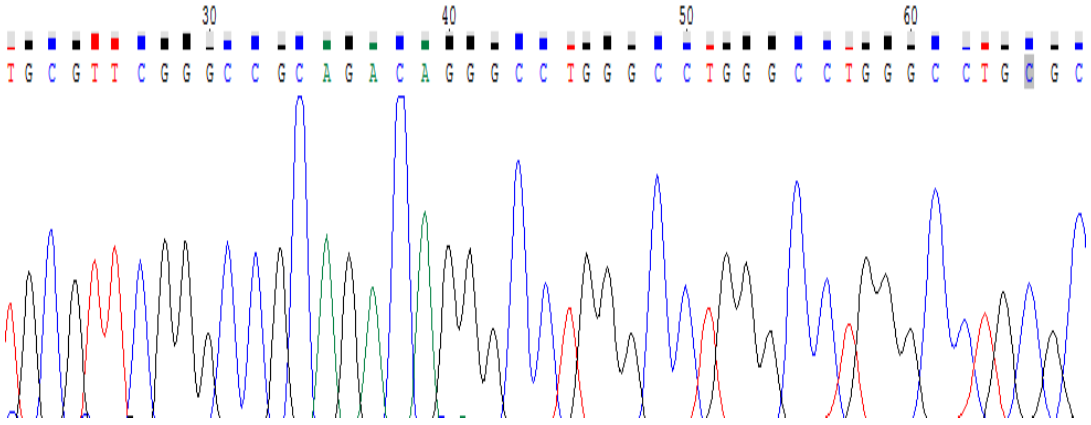
Σε αντίθεση με τους ασθενείς Α1, Α2, Α4, Α5, Α7 και Α8 οι ασθενείς Α3 και Α6 φαίνεται να διαθέτουν μία ζώνη στο πήκτωμα, που σημαίνει ότι είτε είναι ομόζυγοι είτε το δεύτερο αλληλόμορφό του φέρει παθολογικό αριθμό επαναλήψεων και συνεπώς χρειάζεται να εξεταστεί με τη μέθοδο της RP-PCR.

Γ.2 ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SANGER (SEQUENCING)

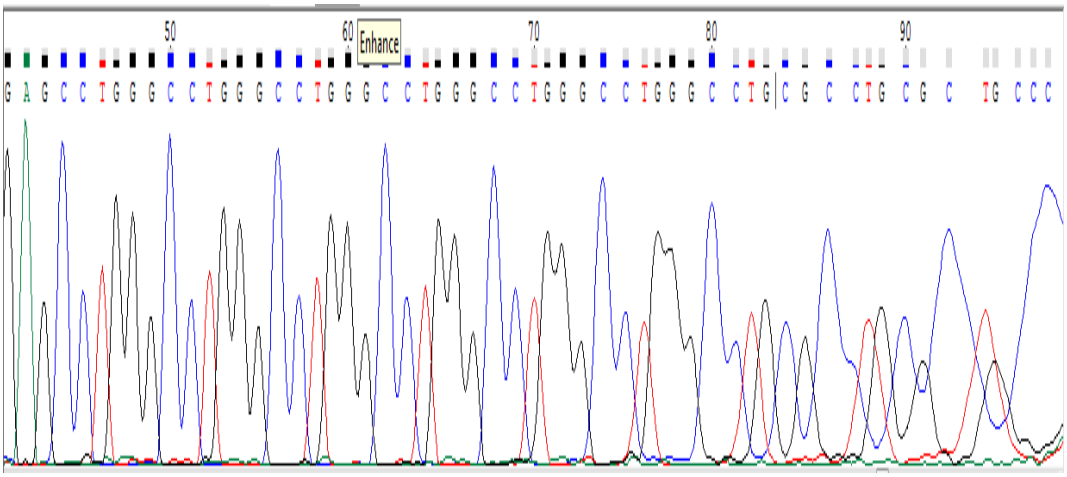
Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας ενός κλάσματος DNA.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης κατά Sanger προέκυψε ότι μετράμε σωστά και έτσι δε χρειάζεται κάποια διόρθωση στον τύπο υπολογισμού των επαναλήψεων κατά τη γονοτύπηση μέσω fragment analysis.

$$\text{No of repeats}=\frac{PCR\ product-96}{6}$$



Εικόνα 12: Αλληλούχιση δείγματος με 4 επαναλήψεις



Εικόνα 13: Αλληλούχιση δείγματος με 6 επαναλήψεις

Τα δείγματα που επιλέξαμε για να αλληλουχήσουμε είχαν σύμφωνα με τη fragment analysis 4 και 6 επαναλήψεις. Με την εφαρμογή της αλληλούχισης κατά Sanger αποδείχτηκε ότι οι μετρήσεις ήσαν ακριβείς και συνεπώς ο αριθμητικός τύπος υπολογισμού των επαναλήψεων δεν χρειαζόταν επιπρόσθετη διόρθωση.

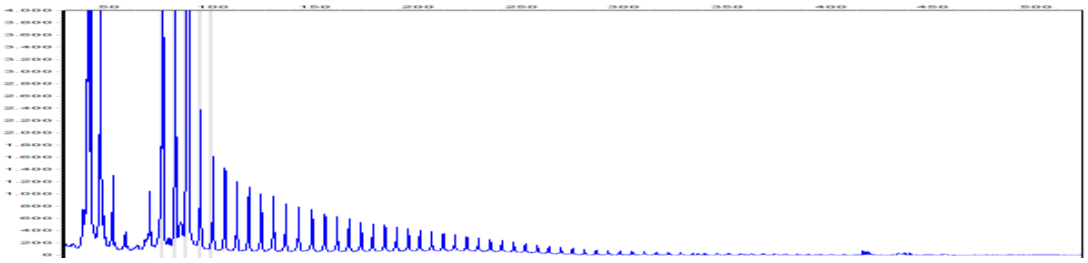
Γ.3 *ΠΡΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ RP-PCR ΜΕΘΟΔΟΥ*

Η τεχνική RP-PCR, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση νουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η προτυποποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου για την ανίχνευση 6νουκλεοτιδικών επεκτάσεων.

Μετά την πραγματοποίηση του RP-PCR και την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, πραγματοποιείται η ανάλυση τους με την χρήση κατάλληλου λογισμικού (GeneMarkerV2.2).



Εικόνα 14: Δείγμα που δε διαθέτει παθολογικό αριθμό εξανουκλεοτιδικής επέκτασης (αρνητικο).



Εικόνα 15: Δείγμα που διαθέτει παθολογικό αριθμό εξανουκλεοτιδικής επέκτασης (θετικό).

Όπως φαίνεται στις εικόνες, ένα αρνητικό δείγμα για την GGCCTG εξανουκλεοτιδική επέκταση, δίνει μια κορυφή στην αρχή του χρωματογραφήματος η οποία πέφτει απότομα στη συνέχεια, ενώ ένα θετικό δείγμα φέρει το χαρακτηριστικό οδοντωτό σχήμα (saw-tooth pattern) της περιοδικής επανάληψης που ξεπερνά τα 500 bp.

Γ.4 *ΝΩΤΙΑΙΟΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΗ ΑΤΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ36*

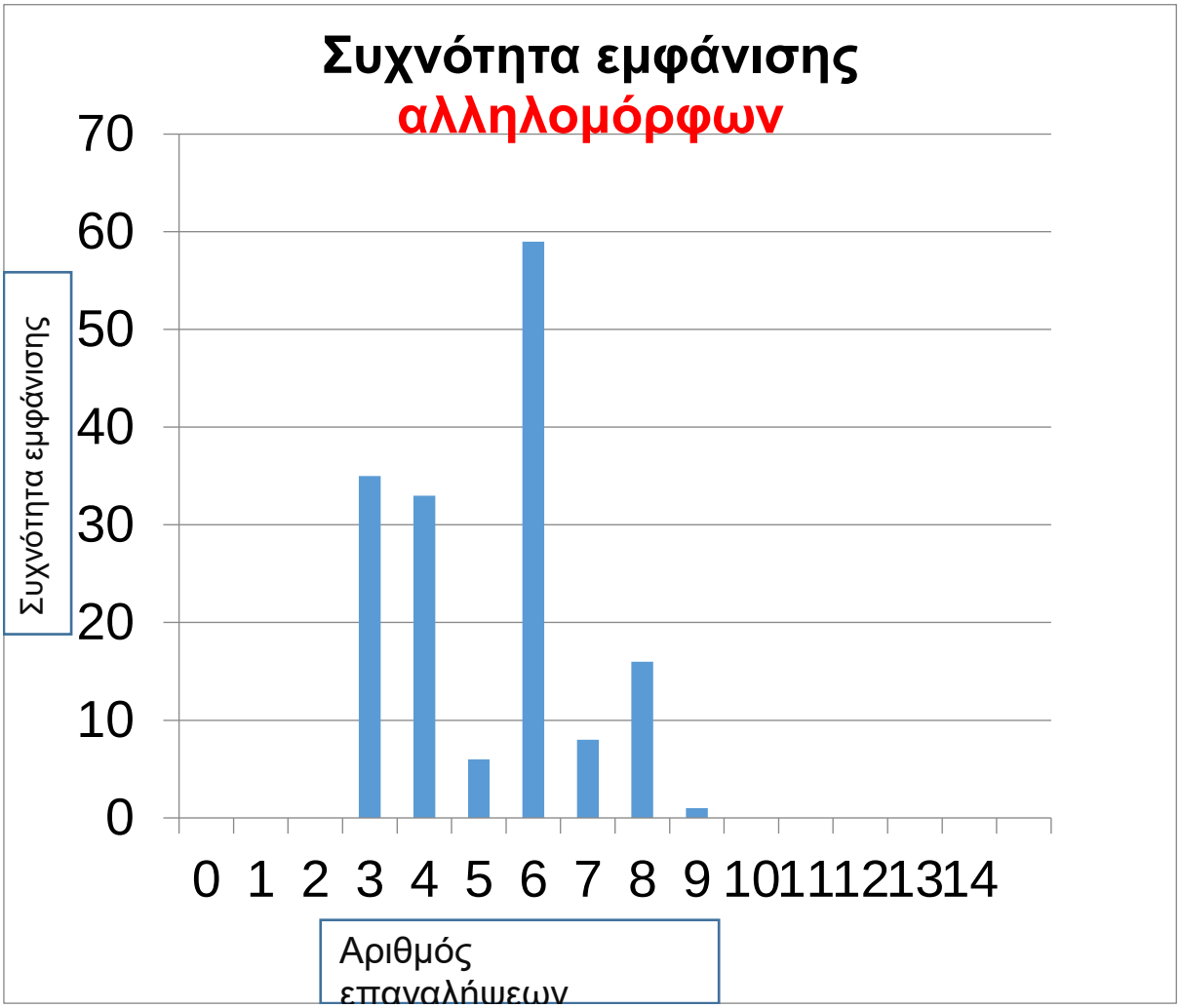
Έπειτα από την προτυποποίηση του RP-PCR, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της GGCCTG εξανουκλεοτιδικής επανάληψης σε 98 δείγματα ασθενών.

Από τα 98 δείγματα ασθενών τα 28 ελέγχθηκαν με RP- PCR, αφού όλα τα υπόλοιπα αποκλείστηκαν ως ετεροζυγώτες με δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τους 98 ασθενείς δεν ανιχνεύτηκε κανένας με παθολογικό αριθμό επαναλήψεων.

Το εύρος των επαναλήψεων που ανιχνεύτηκαν είναι από 3 έως 9 επαναλήψεις.

Το πιο συχνό αλληλόμορφο είναι αυτό που φέρει 6 επαναλήψεις, ενώ ακολουθούν τα αλληλόμορφα με 3 και 4 επαναλήψεις . Στο παρακάτω γράφημα φαίνονται οι συχνότητες εμφάνισης των φυσιολογικών αλληλομόρφων .



Γράφημα: Συχνότητα εμφάνισης φυσιολογικών αλληλομόρφων

ΜΕΡΟΣ Δ’

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αυτοσωμικές επικρατείς νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες (ADCAs) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα κληρονομικών διαταραχών, που χαρακτηρίζονται από προοδευτική παρεγκεφαλιδική αταξία, συχνά συνοδευόμενη από επιπρόσθετα νευρολογικά σημεία και συμπτώματα, όπως πυραμιδικά και εξωπυραμιδικά σημεία, οφθαλμοπληγία, έκπτωση γνωσιακών ικανοτήτων, περιφερική νευροπάθεια και οπτική ατροφία.[1]

Η συχνότητα εμφάνισης των υποτύπων SCA ποικίλει ανάλογα με την εθνικότητα (φαινόμενο ιδρυτικής μεταλλαγής) (founder effect).[5]

Οι ασθενείς που πάσχουν από SCAs, συνήθως προέρχονται από οικογένειες που εμφανίζουν αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης, ενώ έχουν καταγραφεί και σποραδικές περιπτώσεις στις οποίες η μεταλλαγή εμφανίστηκε de novo.[6]

Η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 36 (SCA36) αποτελεί ένα λιγότερο μελετημένο υπότυπο αταξίας που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης και οφείλεται στην επέκταση της εξανουκλεοτιδικής επανάληψης GGCCTG στο εσόνιο 1 του γονιδίου *NOP56.*[8]

Οι μεγαλύτερες συχνότητες παγκοσμίως έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες που αφορούν ομάδες πληθυσμών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (clusters). Πιο συγκεκριμένα εμφανίζεται στο 6,3% στη Γαλικία- Ισπανία, στο 3,6% στη Δυτική Ιαπωνία, στο 1,5% στην Ανατολική Ιαπωνία, στο 0,6% στον πληθυσμό Han στην Κίνα. Αυτή η κατανομή των συχνοτήτων της νόσου ενισχύει την εμφάνισή της λόγω του φαινομένου του ιδρυτή.[8][23][25][26]

Στην Ελλάδα οι νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες που οφείλονται σε τρινουκλεοτιδικές επεκτάσεις, ακολουθούν τις συχνότητες εμφάνισης στον ιταλικό πληθυσμό.[49] Φαίνεται δηλαδή ότι υπάρχει μία γενετική συσχέτιση στους δύο πληθυσμούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ελληνικοί πληθυσμοί αποίκισαν μεγάλες περιοχές της Ιταλίας κατά τα αρχαία και Βυζαντινά χρόνια και ότι μεγάλες περιοχές της νοτιοδυτικής Ελλάδας βρίσκονταν υπό Ενετοκρατία για αιώνες. Δεδομένου ότι στην Ιταλία η SCA36 εμφανίζεται στο 3% των αταξικών ασθενών με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης, η σπανιότητά της στον ελληνικό πληθυσμό ενισχύει τη θεωρία εμφάνισής της σε υπο-ομάδες πληθυσμών, εξαιτίας του φαινομένου του ιδρυτή.[44]

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η SCA36 στον ελληνικό πληθυσμό, όπως έχει ήδη διαπιστωθεί και για τη SCA3, αποτελεί ένα σπάνιο εύρημα σε σχέση με τις υπόλοιπες νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονόμησης.[49] Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες εμφανίζεται με συχνότητα παρόμοια με τη Γερμανία, την Πορτογαλία και το Ηνωμένο Βασίλειο, φανερώνοντας μία άνιση κατανομή στον ευρωπαϊκό πληθυσμό.[25][45][42]

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι το εύρος των φυσιολογικών αλληλομόρφων κυμαίνεται μεταξύ 3 και 8 επαναλήψεων ακολουθώντας ένα πιο στενό πλαίσιο, παρόμοιο με του πληθυσμού στη Δυτική Ιαπωνία.[8] Το πιο συχνό αλληλόμορφο στον ελληνικό πληθυσμό φέρει 6 GGCCTG επαναλήψεις, σε αντίθεση με τις περισσότερες μέχρι στιγμής

μελέτες όπου αναφέρεται σαν πιο συχνό το αλληλόμορφο που φέρει 9 επαναλήψεις. .[23][25][26]

Ένας πιθανός περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι ότι κανένας από τους ασθενείς που μελετήθηκαν ως προς τη GGCCTG μεταλλαγή, δεν εμφάνιζε όλα τα τυπικά συμπτώματα της νόσου SCA36, με την πλειοψηφία των ασθενών να εμφανίζει από ένα έως δύο κλινικά συμπτώματα της νόσου . Ως δεύτερος περιορισμός θα μπορούσε να αναφερθεί το σχετικά χαμηλό ποσοστό των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό αυτοσωμικού επικρατή τύπου κληρονόμησης που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Αν και στη συγκεκριμένη νόσο, εξαιτίας της μεγάλης ηλικίας έναρξής της διαταραχής, έχουμε αυξημένο αριθμό περιπτώσεων σποραδικής εμφάνισης της νόσου, η ύπαρξη ασθενών με θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί πάντα σημαντικό κριτήριο στη επιλογή του υλικού διότι αυξάνει τις πιθανότητες ανίχνευσης παθολογικών αλληλομόρφων.

Συνοψίζοντας η συγκεκριμένη εργασία συμβάλει στη μελέτης της γενετικής ετερογένειας των νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικών αταξιών στον ελληνικό πληθυσμό και παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την εργαστηριακή γενετική διάγνωση της νόσου SCA36, προτείνοντας ότι ο γενετικός της έλεγχος, εάν κριθεί απαραίτητος, οφείλει να έπεται του έλεγχου για τις πιο συχνές νωτιαιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες.

ΜΕΡΟΣ Ε’
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A.E. HardingThe clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the ‘the Drew family of Walworth
   Brain, 105 (Pt 1) (1982), pp. 1-28

2. A. Durr.Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. Lancet Neurol, 9 (9) (2010), pp. 885-894
3. T.D. Bird Hereditary ataxia overview R.A Pagon, T.D.Bird, C.R Dolan, K. Stephens(Eds.) GeneReviews[Internet](1993-1998) University of Washington[updated 2011 Sept.15]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/#ataxiasπρόσβαση στις 10/7/2019.
4. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. Neuroepidemiology. 2014;42:174–83
5. L. Schöls, P. Bauer, T. Schmidt, T. Schulte, O. Riess**.** Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. Lancet Neurol, 3 (5) (2004), pp. 291-304
6. M. Abele, K. Bürk, L. Schöls, S. Schwartz, I. Besenthal, J. Dichgan, *et al.***The aetiology of sporadic adult-onset ataxia**
   Brain, 125 (Pt 5) (2002), pp. 961-968

7. Deloukas, P., Matthews, L. H., Ashurst, J., Burton, J., Gilbert, J. G. R., ... &Bagguley, C. L. (2002). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature*, *414*(6866), 865.
8. Kobayashi, H., Abe, K., Matsuura, T., Ikeda, Y., Hitomi, T., Akechi, Y.... & Koizumi, A. (2011). Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *The American Journal of Human Genetics*, *89*(1), 121-130.
9. Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D., & Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Molecular and cellular biology*, *17*(12), 7088-7098.
10. Hayano, T., Yanagida, M., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Isobe, T., & Takahashi, N. (2003). Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 34309-34319.

11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
12. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 1990;262:56–65.
13. Arias, M., García-Murias, M., &Sobrido, M. J. (2017). Spinocerebellar ataxia 36 (SCA36):"Costa da Morte ataxia". *Neurología (English Edition)*, *32*(6), 386-393.
14. McKeegan, K. S., Debieux, C. M., & Watkins, N. J. (2009). Evidence that the AAA+ proteins TIP48 and TIP49 bridge interactions between 15.5 K and the related NOP56 and NOP58 proteins during box C/D snoRNP biogenesis. *Molecular and cellular biology*, *29*(18), 4971-4981.
15. Cowling, V. H., Turner, S. A., & Cole, M. D. (2014). Burkitt's lymphoma-associated c-Myc mutations converge on a dramatically altered target gene response and implicate Nol5a/Nop56 in oncogenesis. *Oncogene*, *33*(27), 3519.
16. Daughters, R. S., Tuttle, D. L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M. L., Ebner, T. J., &Ranum, L. P. (2009). RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS genetics*, *5*(8), e1000600.
17. Sato, N., Amino, T., Kobayashi, K., Asakawa, S., Ishiguro, T., Tsunemi, T., &Ishino, F. (2009). Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA) n. *The American Journal of Human Genetics*, *85*(5), 544-557.
18. Rudnicki, D. D., Holmes, S. E., Lin, M. W., Thornton, C. A., Ross, C. A., & Margolis, R. L. (2007). Huntington's disease–like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *61*(3), 272-282.
19. Dion, V., & Wilson, J. H. (2009). Instability and chromatin structure of expanded trinucleotide repeats. *Trends in Genetics*, *25*(7), 288-297
20. Kurima, K., Peters, L. M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Naz, S., ... & Ghosh, M. (2002). Keats BJ, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat. Genet*, *30*, 277-284.
21. Tlili, A., Rebeh, I. B., Aifa-Hmani, M., Dhouib, H., Moalla, J., Tlili-Chouchène, J., ... &Driss, N. (2008). TMC1 but not TMC2 is responsible for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Tunisian families. *Audiology and Neurotology*, *13*(4), 213-218.
22. Arias, M., Quintáns, B., García-Murias, M., &Sobrido, M. J. (2014). Spinocerebellar ataxia type 36. In *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle.
23. García-Murias, M., Quintans, B., Arias, M., Seixas, A. I., Cacheiro, P., Tarrío, R., ... &Dapena, D. (2012). 'Costa da Morte'ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain*, *135*(5), 1423-1435.

24. Todd, P. K., & Paulson, H. L. (2010). RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Annals of neurology*, *67*(3), 291-300.
25. Obayashi, M., Stevanin, G., Synofzik, M., Monin, M. L., Duyckaerts, C., Sato, N., ... & Wichmann, H. E. (2015). Spinocerebellar ataxia type 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCCTG repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(9), 986-995
26. Lee, Y. C., Tsai, P. C., Guo, Y. C., Hsiao, C. T., Liu, G. T., Liao, Y. C., & Soong, B. W. (2016). Spinocerebellar ataxia type 36 in the Han Chinese. *Neurology Genetics*, *2*(3), e68.
27. Bakalkin, G., Watanabe, H., Jezierska, J., Depoorter, C., Verschuuren-Bemelmans, C., Bazov, I., ... &Zubarev, R. A. (2010). Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *The American Journal of Human Genetics*, *87*(5), 593-603.
28. Guo, Y. C., Lin, J. J., Liao, Y. C., Tsai, P. C., Lee, Y. C., & Soong, B. W. (2014). Spinocerebellar ataxia 35: novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization. *Neurology*, *83*(17), 1554-1561.
29. Geschwind, D. H., Perlman, S., Figueroa, K. P., Karrim, J., Baloh, R. W., &Pulst, S. M. (1997). Spinocerebellar ataxia type 6: frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. *Neurology*, *49*(5), 1247-1251.
30. Ikeuchi, T., Takano, H., Koide, R., Igarashi, S., Tanaka, H., Tsuji, S., ... & Nakao, N. (1997). Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in α1A voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *42*(6), 879-884.
31. Wang, J. L., Yang, X., Xia, K., Hu, Z. M., Weng, L., Jin, X., ... & Li, N. (2010). TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain*, *133*(12), 3510-3518.
32. Arias, M., Arias-Rivas, S., Blanco-Arias, P., Dapena, D., Vázquez, F., Rossi, M., ... &Sobrido, M. J. (2008). SCA from the Costa da Morte: A new SCA. Description of the phenotype. *Neurologia*, *23*, 628-9.
33. Abe, K., Ikeda, Y., Kurata, T., Ohta, Y., Manabe, Y., Okamoto, M., ... & Shoji, M. (2012). Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation AsiDNA. *European journal of neurology*, *19*(8), 1070-1078.
34. Arias, M., García-Murias, M., Quintáns, B., Arias-Rivas, S., Pardo, J., Vázquez, F., ... &Sobrido, M. J. (2012). First Sca36 patients in Europe: clinical, physiological and imaging details of 10 families: Sc138. *European Journal of Neurology*, *19*, 41.
35. Ikeda, Y., Nagai, M., Kurata, T., Yamashita, T., Ohta, Y., Nagotani, S., ... & Abe, K. (2011). Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. *Neurological research*, *33*(4), 427-432.

36. Ikeda, Y., Ohta, Y., Kobayashi, H., Okamoto, M., Takamatsu, K., Ota, T., ... & Abe, K. (2012). Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (AsiDNA). *Neurology*, *79*(4), 333-341.
37. Miyashiro, A., Sugihara, K., Kawarai, T., Miyamoto, R., Izumi, Y., Morino, H., Kaji, R. (2013). *Oromandibular dystonia associated with SCA36. Movement Disorders, 28(4), 558–559.*doi:10.1002/mds.25304
38. Sugihara, K., Maruyama, H., Morino, H., Miyamoto, R., Ueno, H., Matsumoto, M., ... &Nishinaka, K. (2012). The clinical characteristics of spinocerebellar ataxia 36: a study of 2121 Japanese ataxia patients. *Movement Disorders*, *27*(9), 1158-1163.
39. Fogel, B. L., Lee, H., Deignan, J. L., Strom, S. P., Kantarci, S., Wang, X., ... &Geschwind, D. H. (2014). Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA neurology*, *71*(10), 1237-1246.
40. Pyle, A., Smertenko, T., Bargiela, D., Griffin, H., Duff, J., Appleton, M., ... & Yu-Wai-Man, P. (2014). Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain*, *138*(2), 276-283.
41. Valera, J.M., Diaz, T., Petty, L.E.,Quintáns, B., Yáñez, Z., Boerwinkle, E., Muzny, D., Akhmedov, D., Berdeaux, R., Sobrido, M.J., Gibbs, R., Lupski, J.R., Geschwind, D.H., Perlman, S., Below, J.E., and Fogel, B.L. Prevalence of spinocerebellar ataxia 36 in a US population. *Neurol Genet*. 2017; 3(4):e174. doi:10.1212/NXG.0000000000000174
42. Hersheson, J.S., Mencacci, N.E., and Giunti, P. H.H. Screening a UK cohort for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36).In: *Mov Disord*. ; 2012
43. Sulek, A., Krysa, W., Elert-Dobkowska, E., Rajkiewicz, M., Stepniak, I., Rakowicz, M., Rola, R., and Dusza-Rowinska, M. ZJ. Spinocerebellar ataxias (SCAs) and hereditary spastic paraplegias (HSP) - rare movement disorders prevalence in Poland**.**Poster presentation 67. Paris, France: *International Conference on Spinocerebellar Degenerations*; 2013
44. Sarto, E., Magri, S., Mariotti, C., Nanetti, L., Gellera, C., and Di Bella, D. T.F. SCA36 molecular analysis in patients with spinocerebellar ataxia**.** PCN 62. Paris, France: *International Conference on Spinocerebellar Degenerations*; 2013
45. Loureiro, J.R., Seixas, A.I., Loureiro, J.L., Carracedo, A., Sobrido, M.J., Coutinho, P., and Sequeiros, J. SI. Genetics of spinocerebellar ataxias in Portuguese families: screening for SCA15, SCA28 and SCA36. PCN 1396F. Boston, MA: *American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting*; 2013
46. Manuel Arias, , Beatriz Quintáns, María García-Murias, , and Maria J Sobrido. Spinocerebellar Ataxia Type 36. Synonyms: Asidan/SCA36, Costa da Morte Ataxia, SCA36. Gene Reviews. InitialPosting: August 7, 2014(πρόσβαση Ιούλιος 10 , 2019)

47. Παπανικολάου, Γεώργιος, Παλαιολόγου, Δανάη. Τα στάδια της αντίδρασης PCR.https://repository.kallipos.gr/handle/11419/594στις 17/7/2019
48. Frewin B, Chung M, Donnelly N. Bilateral cochlear implantation in Friedreich's ataxia: a case study. CochlearImplants Int. 2013;14:287–90
49. Koutsis, G., Kladi, A., Karadima, G., Houlden, H., Wood, N.W., Christodoulou, K., and Panas, M. Friedreich's ataxia and other hereditary ataxias in Greece: An 18-year perspective**.** *J Neurol Sci*. 2014; 336(1-2):87-92 doi:10.1016/j.jns.2013.10.012
50. Kirkpatrick FH. Overview of agarose gel properties. Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications. 1991. pp. 9–22.
51. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25;**94**(3):441–448.
52. Chen L., Hadd A., Sah S., Filipovic-Sadic S., Krosting J., Sekinger E., et al. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. 2010. *J. Mol. Diagn.* 12 589–600 10.2353/jmoldx.2010.090227.
53. Jon P Warner, Lilias H Barron, David Goudie, Kevin Kelly, David Dow, David R Fitzpatrick, David J H Brock. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. 1996. J Med Genet 1996;33:1022-1026.

ΜΕΡΟΣ ΣΤ’
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΤ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 36 (SCA36) είναι μια αυτοσωμική επικρατής (AD) διαταραχή, που κλινικά χαρακτηρίζεται από παρεγκεφαλιδική αταξία όψιμης έναρξης συνήθως μεταξύ της 5ης και 6ης δεκαετίας της ζωής, δυσαρθρία, νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής (SNHL), εμπλοκή του κατώτερου κινητικού νευρώνα και ατροφία της γλώσσας.

Η εξανουκλεοτιδική επανάληψη GGCCTG στο εσόνιο 1 του γονιδίου *NOP56*, αναφέρθηκε το 2011 ως η αιτία της νόσου. Τα φυσιολογικά αλλήλια κυμαίνονται από 3 έως 14 επαναλήψεις, αλλήλια αβέβαιης κλινικής σημασίας από 15 έως 650 επαναλήψεις και τα παθογόνα αλλήλια έχουν περισσότερες από 650 επαναλήψεις.

Οι υψηλότερες συχνότητες παγκοσμίως έχουν αναφερθεί σε ομάδες προσβεβλημένων οικογενειών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (Γαλικία- Ισπανία, Ιταλία, Χαν Κινέζοι, Ανατολική και Δυτική Ιαπωνία).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της εξανουκλεοτιδικής επέκτασης GGCCTG, που προκαλεί SCA36 σε μια ομάδα ελλήνων ασθενών με αταξία.

Η ομάδα μας αποτελούνταν από 98 ασθενείς δείκτες. Οι 92 ασθενείς προήλθαν από μια κοόρτη αταξικών ασθενών (n = 600), αρνητικοί για τους συνηθέστερους τύπους SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7), με οικογενειακό δέντρο και φαινότυπο συνεπή με SCA36 και οι 6 προήλθαν από μία κοόρτη της νόσου Kennedy (n = 200), αρνητικοί για την τρινουκλεοτιδική επανάληψη CAG στο γονίδιο *AR* και οικογενειακό δέντρο σύμφωνο με τη SCA36. Ο αριθμός των εξανουκλεοτιδικών επαναλήψεων GGCCTG προσδιορίστηκε με απλή PCR για τα μικρότερα αλλήλια και RP-PCR για τα

μεγαλύτερα. Διεξήχθη ανάλυση μήκους θραυσμάτων και χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες σε κάθε γύρω.

Συμπληρωματικά με την προηγούμενη μελέτη μας σχετικά με τις AD νωτιοπαρεγκεφαλιδικές αταξίες στον ελληνικό πληθυσμό, εξετάσαμε ένα λιγότερο κοινό γονίδιο που προκαλεί κληρονομική αταξία. Σε αντιστοιχία με τη SCA3, η SCA36 φαίνεται να είναι ένα πολύ σπάνιο εύρημα στον ελληνικό πληθυσμό. Η συχνότητα SCA36 στην Ελλάδα φαίνεται να είναι παρόμοια με τη Γερμανία, την Πορτογαλία και το Ηνωμένο Βασίλειο ενισχύοντας τα ευρήματα μιας άνισης κατανομής στην Ευρώπη. Η απουσία της SCA36 στην Ελλάδα ενδυναμώνει τη θεωρία δημιουργίας κλασμάτων ασθενών και ενισχύει την πιθανότητα του φαινομένου του ιδρυτή. Το φυσιολογικό εύρος των επαναλήψεων που εντοπίστηκαν ήταν ελαφρώς στενότερο από ότι αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία.

Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να συμβάλει στη διερεύνηση της γενετικής ετερογένειας των SCAs στον ελληνικό πληθυσμό. Ο γενετικός έλεγχος για τη SCA36 πρέπει να πραγματοποιείται μόνο μετά την εξαίρεση των πιο συνηθισμένων SCAs στον ελληνικό πληθυσμό, εφόσον αυτό κριθεί απαραίτητο.

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) is an autosomal dominant (AD) disorder, clinically characterized by late onset cerebellar ataxia usually between 5th and 6th decade of life, dysarthria, sensorineural hearing loss (SNHL), lower motor neuron involvement, and tongue atrophy.

A hexanucleotide repeat expansion, namely GGCCTG in intron 1 of the NOP56 gene, was reported in 2011 as the cause of the disease. Normal size alleles vary from 3 to 14 repeats, alleles of uncertain significance from 15 to 650 repeats and pathogenic alleles have more than 650 repeats.

The highest frequencies worldwide have been reported in clusters of affected families in specific geographical areas (Galicia-Spain, Italy, Han Chinese, East and West Japan).

The aim of current study was to investigate the presence of hexanucleotide repeat GGCCTG causing SCA36 in a cohort of Greek ataxia patients.

Our cohort consisted of 98 selected index patients. 92 patients came from an ataxia cohort (n=600), negative for the most common SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7), with pedigree and phenotype consistent with SCA36 and 6 came from a suspected Kennedy's disease cohort (n=200), negative for the CAG trinucleotide repeat in *AR* and pedigree consistent with SCA36. The number of GGCCTG hexanucleotide repeats was determined with conventional PCR for the smaller alleles and RP-PCR for the larger alleles. Fragment length analysis was performed and positive controls were used in every run.

Supplementary to our previous study of AD spinocerebellar ataxias in the Greek population, we screened a less common gene causing inherited ataxia. In line with SCA3, SCA36 seems to be a very rare finding in the Greek population. SCA36 frequency in Greece appears to be similar to Germany, Portugal and UK reinforcing the findings of an uneven distribution in Europe. The absence of SCA36 in Greece supports the theory of disease clusters and amplifies the possibility of founder effect. The normal range of repeats detected was slightly narrower than reported in literature.

The present study could contribute to the investigation of the genetic heterogeneity of SCAs in the Greek population. Testing for SCA36 should only be performed following the exclusion of other more common SCAs in Greek patient cohorts.

ΜΕΡΟΣ Ζ’
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Accepted Manuscript



Screening for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) in the Greek population

D. Katsimpouris, C. Kartanou, M. Breza, M. Panas, G. Koutsis, G. Karadima

PII: S0022-510X(19)30238-2
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.022
Reference: JNS 16335

To appear in: *Journal of the Neurological Sciences*

Received date: 20 March 2019
Revised date: 13 May 2019
Accepted date: 20 May 2019

Please cite this article as: D. Katsimpouris, C. Kartanou, M. Breza, et al., Screening for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) in the Greek population, Journal of the Neurological Sciences, https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.022

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Screening for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) in the Greek population

Katsimpouris D, Kartanou C, Breza M, Panas M, Koutsis G*, Karadima G*

Neurogenetics Unit, 1st Department of Neurology, University of Athens Medical School, Eginition Hospital, Athens, Greece

*equal contribution

Correspondence

Chrisoula Kartanou, Neurogenetics Unit, 1st Department of Neurology, Medical School National and Kapodistrian University of Athens, Eginition Hospital, 74 Vas. Sophias Ave., 11528 Athens, Greece.

Tel: 210 7289118,288

Fax: 210 7289289

Email: chrisoulakart@hotmail.com

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Keywords:

spinocerebellar ataxia type 36, SCA36, hexanucleotide repeat

Autosomal dominant cerebellar ataxia, Greek population

Abbreviations:

spinocerebellar ataxias (SCAs)

spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36)

autosomal dominant (AD)

sensorineural hearing loss (SNHL)

androgen receptor gene (AR)

ED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Dear Editor,

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogeneous group of autosomal dominant (AD) neurodegenerative disorders with cerebellar ataxia as a prominent feature. Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) is an AD disorder, clinically characterized by late onset cerebellar ataxia usually between 5th and 6th decade of life, dysarthria, sensorineural hearing loss (SNHL), lower motor neuron involvement, and tongue atrophy. A hexanucleotide repeat expansion, namely GGCCTG in intron 1 of the *NOP56* gene, was reported in 2011 as the cause of the disease. This gene encodes for the nucleolar protein 56, a ribonucleoprotein which plays a role in transcription and splicing. Normal size alleles vary from 3 to 14 repeats, alleles of uncertain significance from 15 to 650 repeats and pathogenic alleles have more than 650 repeats[1]. Interestingly there is a study indicating that even short repeat expansions can cause the disease[2]. There has been no clear evidence of anticipation in SCA36 yet, despite the fact that anticipation is common in other repeat expansion diseases[1].

The disease is caused by an RNA gain of function mechanism, in which RNA foci formed in nucleus causing cell toxicity[1]. Even though the distribution of SCA36 is still largely unknown, up to-date literature shows that the frequency of SCA36 appears to vary among different

ACCEPTED MANUSCRIPT

countries while possibly forming clusters of affected families, indicating a possible founder effect. The frequency of SCA36 in non-European populations accounts for 3.6% of SCAs in Western Japan, which is among the highest in the world, followed by 1.5% in Eastern Japan, 0.6% in China and 0.7% in US[1–4]. SCA36 is absent from north European populations (Germany 0.0%, UK 0.0% of SCA patients) except from Poland, where five families were identified[2,5,6]. In the Mediterranean basin the frequency spans from 0.0% Portugal, 1.9% France, 3% Italy to 6.3% Spain-Galicia, all frequencies determined in SCA cohorts, excepting Italy where a purely AD SCA cohort was screened[2,7–9]. Although triplet repeat expansions SCAs have been previously clinically and molecular characterized in Greece by our group, no data exist at present regarding SCA36[10].

The aim of current study was to investigate the presence of hexanucleotide repeat GGCCTG causing SCA36 in a cohort of Greek ataxia patients.

Our cohort consisted of 98 selected index patients. All cases had ataxia; 6 had additional SNHL; 12 additional lower motor neuron involvement; and 56 had onset in the 5th or 6th decade of life. Ninety two patients came from an ataxia cohort (n=600), negative for the most common SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7), while 6 came from a suspected

ACCEPTED MANUSCRIPT

Kennedy's disease cohort (n=200), negative for the CAG trinucleotide repeat in Androgen Receptor gene (AR). Twenty six out of 98 patient's pedigrees presented familial inheritance (10 of which had unequivocal AD inheritance), with the rest of them indicating sporadic cases. Mean age was 58 years and mean age of onset was 44 years ranging from 16 to 69 years. Patients were referred to Neurogenetics Unit from all over Greece, gave informed consent for the performance of molecular diagnostic testing and the study was approved by the Eginition hospital ethics committee[10].

DNA was extracted from peripheral blood leucocytes. To determine the number of GGCCTG hexanucleotide repeats we used conventional PCR for the smaller alleles and RP-PCR[9] for the larger ones, using primers that have previously been published[1]. Fragment length analysis was performed in an ABI3500 genetic analyser (Applied Biosystems), followed by *in silico* analysis, using GeneMarker V2.2.0. Positive samples for the SCA36 expansion, kindly offered by Prof. Henry Houlden (Institute of Neurology Queen Square, London), were used in every run as controls.

No pathologic repeat expansions were detected in our cohort. However we identified multiple normal repeats varying from 3 to 9 with 6 as the

ACCEPTED MANUSCRIPT

most common followed by 3 and 4 as the second and the third most common repeats respectively.

Supplementary to our previous work[10], we studied a less common gene causing AD SCA, SCA36.The highest frequencies worldwide have been reported in clusters of affected families in specific geographical areas (Galicia-Spain, Italy, Han Chinese, East and West Japan)[1–3,9]. In fact, the distribution of triplet repeat expansion SCAs in Greece has been very similar to Italian data[10]. This could be attributed to the fact that Greek people populated large areas of Italy in ancient and Byzantine times and that large parts of Southern and Western Greece were under Venetian rule for centuries. Given that the SCA36 expansion has been identified at 3% of AD SCA patients, the absence of SCA36 in Greece supports the theory of disease clusters and amplifies the possibility of founder effect[7].

In our population the normal range of repeats was slightly narrower than reported in literature. The most common normal repeat in our cohort was 6 instead of 9 reported in most studies so far[2,3,7,9]. A probable limitation of our study is that none of our patients had the full range of clinical symptoms typical for SCA36.

In conclusion in line with SCA3, SCA36 seems to be a rare finding in the Greek population compared to other AD SCAs. SCA36 frequency in

ACCEPTED MANUSCRIPT

Greece appears to be similar to Germany Portugal and UK[2,5,8], reinforcing the findings of an uneven distribution in Europe.

The present study could contribute to the investigation of the genetic heterogeneity of SCAs in the Greek population and, concerning the implications for genetic SCA testing, inform us that testing for SCA36 should only be performed following the exclusion of other more common SCAs in Greek patient cohorts.

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Author contributions:

K.D.: carried out the molecular genetic analysis, performed the *in silico* analysis and wrote the manuscript with K.C.

K.C.: established the molecular genetic methodology (fragment analysis, RP-PCR), performed the *in silico* analysis and wrote the manuscript with K.D.

B.M., P.M. and Koutsis G: examined patients clinically and carried out the selection of index patients.

Koutsis G and Karadima G: conceived of the study and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript

All authors read and approved the final manuscript

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest.

Patient consent

Obtained.

Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee of Eginition Hospital.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Acknowledgements

We thank Prof. Henry Houlden (Institute of Neurology Queen Square, London) for the kind offer of SCA36 positive control samples.

Funding

No funding was received.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Screening for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) in the Greek population

D. Katsimpouris, C. Kartanou, M. Breza, M. Panas, G. Koutsis, G. Karadima

Neurogenetics Unit, 1st Department of Neurology, Eginition Hospital, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36) is an autosomal dominant (AD) disorder, clinically characterized by late onset cerebellar ataxia usually between 5th and 6th decade of life, dysarthria, sensorineural hearing loss (SNHL), lower motor neuron involvement, and tongue atrophy.

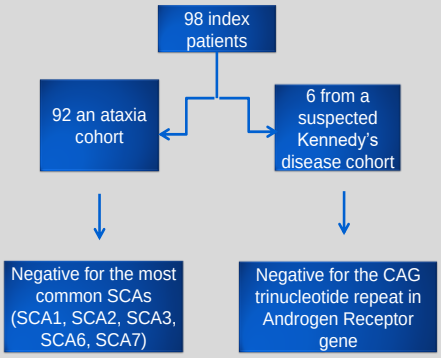
A hexanucleotide repeat expansion, namely GGCCTG in intron 1 of the NOP56 gene, was reported in 2011 as the cause of the disease. Normal size alleles vary from 3 to 14 repeats, alleles of uncertain significance from 15 to 650 repeats and pathogenic alleles have more than 650 repeats.

The highest frequencies worldwide have been reported in clusters of affected families in specific geographical areas (Galicia-Spain, Italy, Han Chinese, East and West Japan).

The aim of current study was to investigate the presence of hexanucleotide repeat GGCCTG causing SCA36 in a cohort of Greek ataxia patients.

Materials and Methods

Using molecular biological techniques including Repeat-Primed PCR (RP-PCR) 98 patients were tested for the GGCCTG repeat expansion in the Neurogenetics Unit, 1st Department of Neurology, Eginition Hospital.



Algorithm of the patients selected for the study.

All cases gave written informed consent for the performance of molecular genetic testing, and the study was approved by the ethics committee of Eginition Hospital.

The following table displays demographic and clinical characteristics of the cohorts screened.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of cohorts screened

Parameter	Patients
N	98
Sex (male/ female)	
Male	51 (52.0)
Female	47 (48.0)
Age	58 ± 13,20
Age of onset	44 ± 13,48
Ataxia	98 (100.0)
Onset in 5th and 6th decade of life	56 (57.1)
Sensorineural hearing loss	6 (6.1)
Lower motor neuron involvement	12 (12.2)
Type of inheritance	
Familial	26 (26.5)
Sporadic	72 (73.5)

Data are Mean ± SD

Results

No pathologic repeat expansions were detected in our cohort. However we identified multiple normal repeats varying from 3 to 9 with 6 as the most common followed by 3 and 4 as the second and the third most common repeats respectively, as can be seen in figure 1.

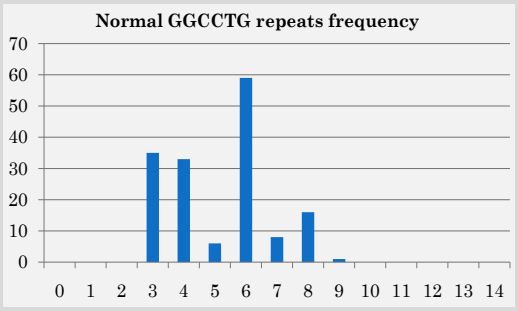


Figure 1. Normal repeat alleles distribution.

Conclusion

- The absence of SCA36 in Greece supports the theory of disease clusters and amplifies the possibility of founder effect.
- The normal range of repeats detected was slightly narrower than reported in literature.
- SCA36 seems to be a rare finding in the Greek population compared to other AD SCAs.
- SCA36 frequency in Greece appears to be similar to Germany, Portugal and UK reinforcing the findings of an uneven distribution in Europe.
- The present study could contribute to the investigation of the genetic heterogeneity of SCAs in the Greek population.
- Testing for SCA36 should only be performed following the exclusion of other more common SCAs in Greek patient cohorts.

References

1. Kobayashi, H., Abe, K., Matsuura, T., Ikeda, Y., Hitomi, T., Akechi, Y., Habu, T., Liu, W., Okuda, H., and Koizumi, A. **Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement**. Am J Hum Genet. 2011; 89(1):121-30 doi:10.1016/j.ajhg.2011.05.015
2. García-Murias, M., Quintáns, B., Arias, M., Seixas, A.I., Cacheiro, P., Tarrio, R., Pardo, J., Millán, M.J., Arias-Rivas, S., Blanco-Arias, P., Dapena, D., Moreira, R., Rodríguez-Trelles, F., Sequeiros, J., Carracedo, A., Silveira, I., and Sobrido, M.J. **"Costa da Morte" ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization**. Brain. 2012; 135:1423–1435.
3. Koutsis, G., Kladi, A., Karadima, G., Houlden, H., Wood, N.W., Christodoulou, K., and Panas, M. **Friedreich's ataxia and other hereditary ataxias in Greece: An 18-year perspective**. J Neurol Sci. 2014; 336(1-2):87-92 doi:10.1016/j.jns.2013.10.012

Disclosures

D. Katsimpouris: None; C. Kartanou: None; M. Breza: None; M. Panas: None; G. Koutsis: Teva Pharmaceuticals, Genessis Pharma, Novartis, Sanofi- Genzyme, Merck; G. Karadima: None