



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΟΥΣ ΣΠΑΣΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΠΛΗΓΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

ΒΟΥΔΟΜΜΑΤΗΣ-ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

A.M. 41903

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ, 2022



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΟΥΣ ΣΠΑΣΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΠΛΗΓΙΑΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

ΒΟΥΔΟΜΜΑΤΗΣ-ΣΤΕΡΓΙΟΥ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

A.M. 41903

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ :

Καραδήμα Γεωργία, Επίκ. Καθηγήτρια Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καραδήμα Γεωργία, Επίκ. Καθηγήτρια Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Κόλλια Παναγούλα, Καθηγήτρια Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κούτσης Γεώργιος, Επίκ. Καθηγητής Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Οικογενής Σπαστική Παραπληγία (Hereditary Spastic Paraplegia, HSP) είναι ένα κλινικά και γενετικά ετερογενές κληρονομικό νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από προοδευτική εγκατάσταση δυσχέρειας βάδισης και αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή που προσβάλλει τα κάτω άκρα. Κληρονομείται μέσω όλων των κλασικών τρόπων μεντελιανής κληρονομικότητας, Μέχρι σήμερα εντοπίζονται περισσότεροι από 100 γενετικοί τόποι που εμπλέκονται στην παθογένεση της HSP. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες να έχουν αξιολογήσει το γενετικό φάσμα της HSP στην Ελλάδα. Έως τώρα η Μονάδα Νευρογενετικής της Α΄ Νευρολογικής Κλινικής, του Αιγινήτειου Νοσοκομείου του ΕΚΠΑ, έχει πραγματοποιήσει μελέτη στην οποία διερευνήθηκε για πρώτη φορά το κλινικό και γενετικό φάσμα της HSP σε ενήλικους Έλληνες ασθενείς με στοχευμένη αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Targeted Next-Generation Sequencing, Targeted NGS) θέτοντας γενετική διάγνωση στο 51% των περιπτώσεων (11 παραλλαγές). Εκτός όμως από τις σημειακές παραλλαγές, ένα ποσοστό των παραλλαγών αφορά σε ελλείψεις και διπλασιασμούς σε συγκεκριμένα γονίδια σχετιζόμενα με τη νόσο. Επομένως, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περαιτέρω διερεύνηση των Ελλήνων ασθενών με HSP της Μονάδας που έχουν βρεθεί αρνητικοί για σημειακές μεταλλαγές με NGS, για copy number variants (CNVs) με την εφαρμογή της τεχνικής multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), αποσκοπώντας στην πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής τους ταυτότητας. Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται 26 ασθενείς δείκτες με μέσο όρο ηλικίας έναρξης των συμπτωμάτων τα 31 έτη και κύριο σύμπτωμα έναρξης τη δυσχέρεια βάδισης. Οι ασθενείς ελέγχθηκαν για την ανίχνευση ελλείψεων ή διπλασιασμού στα γονίδια *ATL1*, *SPAST*, *REEP1*, *SPG7*, *NIPA1*, *NIPA2*. Από τους 26, 3 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για έλλειψη στο γονίδιο *SPAST* διαμορφώνοντας την συχνότητα CNV στην κοόρτη στο 11,53%. Από τους θετικούς ασθενείς οι δύο διαγνώστηκαν με έλλειψη του εξονίου 1 και ένας με έλλειψη του εξονίου 5 στο γονίδιο *SPAST*. Θετική βρέθηκε και η μητέρα του ενός θετικού ασθενούς για έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST*. Το ποσοστό των θετικών για CNVs ασθενών της μελέτης μας δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά με την διεθνή βιβλιογραφία. Η ανίχνευση CNVs φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση της γενετικής διερεύνησης της HSP δίδοντας τη δυνατότητα για γενετική συμβουλή και προσυμπτωματικό έλεγχο της νόσου σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών.

ABSTRACT

Hereditary Spastic Paraplegia (HSP) is a clinically and genetically heterogeneous group of inherited disorders characterized by progressive onset of walking difficulty and bilateral pyramidal involvement affecting the lower limbs. It is inherited through all types of Mendelian inheritance. To date, more than 100 genetic loci have been identified contributing to the pathogenesis of HSP. However, there are few studies that have evaluated the genetic spectrum of HSP in Greece so far. Recently, the Neurogenetics Unit of the 1st Neurological department, Eginition Hospital, NKUA carried out a study in which the clinical and genetic spectrum of HSP was investigated for the first time in adult Greek patients through Targeted Next-Generation Sequencing (Targeted Next-Generation Sequencing, Targeted NGS) making a genetic diagnosis in 51% of cases (11 variants). In addition to point mutations, deletions and duplications in specific genes related to the disease may be detected. Therefore, the aim of this study was to complete the picture of the genetic identity of Greek HSP patients by testing for copy number variants (CNVs), through the use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), in patients who have been found negative for point mutations by NGS. The study included 26 index patients with an average age of onset at 31 years and difficulty walking as onset symptom. Patients were screened for deletions or duplications in *ATL1*, *SPAST*, *REEP1*, *SPG7*, *NIPA1*, *NIPA2* genes. Three patients out of sixteen tested positive for *SPAST* gene deletions resulting in CNV frequency of 11.53%. Two patients were diagnosed with exon 1 deletion and one with exon 5 deletion in the *SPAST* gene. The mother of a positive patient was also found to be positive for exon 1 deletion in the *SPAST* gene. The percentage of patients positive for CNVs in our study does not show a statistically significant difference from other published populations. The detection of CNVs seems to be an important step in the completion of the genetic investigation of HSP, allowing for genetic counseling and targeted screening of the disease in a substantially larger percentage of patients.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην γενετική διερεύνηση της Οικογενούς Σπαστικής Παραπληγίας στον ελληνικό πληθυσμό, εξετάζοντας δείγματα ασθενών της Μονάδας Νευρογενετικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου.

Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Μονάδας Νευρογενετικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2020-Σεπτέμβριος 2021, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της επιστημονικού υπεύθυνου κ. Καραδήμα Γεωργίας, Επίκ. Καθηγήτριας Βιολογίας-Νευρογενετικής, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ξεκινήσω ευχαριστώντας την άμεσα επιβλέπουσα αυτής της μελέτης που πραγματοποιήθηκε, την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Καραδήμα Γεωργία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, με τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, τις υποδείξεις της και το αμείωτο ενδιαφέρον. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κούτση Γεώργιο, για τη βοήθεια του στην κλινική κατάταξη των ασθενών που μελετήθηκαν, στη στατιστική τους επεξεργασία και στην προθυμία του για επίλυση οποιαδήποτε απορίας. Χρειάζεται επίσης να κάνω ειδική αναφορά στην υποψήφια Διδάκτωρ κα. Κοντογεωργίου Ζωή για την άριστη συνεργασία που είχαμε σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για να μου δώσει εποικοδομητικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα, την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και τις συμβουλές και επιμονή της κατά τη συγγραφή της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης την υποψήφια Διδάκτωρ κα. Καρτάνου Χρυσούλα για τις συμβουλές, τις γνώσεις και την συμπαράσταση σε όλη την πορεία. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους που συνεργαστήκαμε στη Μονάδα Νευρογενετικής για το υγιές κλίμα και την άριστη συνεργασία μας στο διάστημα αυτό.

Περιεχόμενα

<u>ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	9
<u>1.1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΣΠΑΣΤΙΚΗ ΠΑΡΑΠΛΗΓΙΑ</u>	9
<u>1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</u>	9
<u>1.3. ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ</u>	10
<u>1.3.1. ΕΝΑΡΞΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ</u>	10
<u>1.3.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ HSP</u>	11
<u>1.4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ</u>	12
<u>1.5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ</u>	13
<u>1.5.1. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΗΣ HSP</u>	13
<u>1.5.1.1. Μη επιλεγμένες μορφές</u>	13
<u>1.5.1.2. Επιλεγμένες μορφές</u>	15
<u>1.5.2. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΗ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ HSP</u>	17
<u>1.5.2.1. Μη επιλεγμένες μορφές</u>	17
<u>1.5.2.2. Επιλεγμένες μορφές</u>	17
<u>1.5.3. ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΗ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ</u>	21
<u>1.6. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΑΣ ΤΗΣ HSP</u>	22
<u>1.6.1. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ</u>	22
<u>1.6.2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ</u>	22
<u>1.6.3. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ</u>	23
<u>1.6.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ</u>	24
<u>1.7. ΤΡΟΠΟΙ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗΣ</u>	24
<u>1.7.1. ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ</u>	24
<u>1.7.1.1. Αυτοσωμική Επικρατής HSP</u>	24
<u>1.7.1.2. Αυτοσωμική Υπολειπόμενη HSP</u>	25

1.7.1.3. Φυλοσύνδετη Κληρονομικότητα HSP	26
1.7.1.4. Μιτοχονδριακή Κληρονομικότητα HSP	28
1.8. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ	29
1.8.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ	29
1.9. ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΕ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ	30
1.10. ΣΚΟΠΟΣ	33
ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 ΥΛΙΚΟ	34
2.1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	34
2.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	34
2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	36
2.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	36
2.2.1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA	37
2.2.1.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA	38
2.2.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLPA ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	40
2.2.2.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLPA	40
2.2.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MLPA	46
2.2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	50
ΚΕΦ. 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
ΚΕΦ. 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1	Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της αυτοσωμικής επικρατούς κληρονομικότητας στις HSP.
Πίνακας 2	Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της αυτοσωμικής υπολειπόμενης κληρονομικότητας στις HSP.
Πίνακας 3	Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της επικρατούς φυλοσύνδετης HSP.
Πίνακας 4	Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της μιτοχονδριακής HSP.
Πίνακας 5	Χαρακτηριστικά ασθενών που ελέγχθηκαν
Πίνακας 6	Αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση γενωμικού DNA.
Πίνακας 7	Το μέγεθος των 47 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P165-C3 HSP mix-1, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση
Πίνακας 8	Το μέγεθος των 39 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P211-B5 HSP, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση
Πίνακας 9	Το μέγεθος των 42 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P213-B3 HSP mix-2, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση.
Πίνακας 10	Πρόγραμμα για την αντίδραση MLPA
Πίνακας 11	Συνοπτική περιγραφή των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί
Πίνακας 12	Συγκριτικές μελέτες της συχνότητας της HSP για CNVs στα γονίδια <i>SPAST</i> , <i>ATL1</i> και <i>REEP1</i>

ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΣΠΑΣΤΙΚΗ ΠΑΡΑΠΛΗΓΙΑ

Η Οικογενής Σπαστική Παραπληγία (Hereditary Spastic Paraplegia, HSP) ή νόσος Strumpell-Lorrain είναι ένα κλινικά και γενετικά ετερογενές κληρονομικό νόσημα στο οποίο προσβάλλεται ο ανώτερος κινητικός νευρώνας με μηκοεξαρτώμενο τρόπο. Χαρακτηρίζεται κλινικά από προοδευτική εγκατάσταση δυσχέρειας βάδισης και αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή που προσβάλλει κυρίως τα κάτω άκρα. Έχει συχνότητα περί τους 3-10 ασθενείς/100.000 πληθυσμού [1]. Είναι το συχνότερο νόσημα που προκαλεί σπαστική παραπληγία. Η ηλικία εμφάνισης της νόσου εκτείνεται από την παιδική έως την ενήλικη ζωή, με μέσο όρο τα 24 έτη. Κληρονομείται μέσω όλων των κλασικών τρόπων μεντελιανής κληρονομικότητας, δηλαδή την Αυτοσωμική Επικρατητική (Autosomal Dominant, AD), την Αυτοσωμική Υπολειπόμενη (Autosomal Recessive, AR) και την Φυλοσύνδετη (X-linked, XL). Επίσης κληρονομείται και με Μιτοχονδριακή (Mitochondrial, MT) κληρονομικότητα [2].

1.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η HSP περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1880 από τον Βαλτικογερμανό νευρολόγο Adolph Strümpell. Ο Strümpell παρουσίασε δύο αδέρφια με πιθανή AD-HSP, των οποίων τα συμπτώματα εκδηλώθηκαν σε ηλικία 37 και 56 ετών. Κλινικά, οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν αμιγή μορφή σπαστικής παραπληγίας, χωρίς σημαντική συνοδό σημειολογία. Μετά τον θάνατο ενός από τα αδέρφια, ιστοπαθολογικές εξετάσεις έδειξαν εκφύλιση της πλευρικής φλοιονωτιαίας οδού, του *fasciculus gracilis* [3, 4].

Στις δημοσιεύσεις του για τη νόσο, ο Strümpell συνεισέφερε σημαντικά νευροπαθολογικά ευρήματα για τη σπαστική παραπληγία, ειδικότερα καθιερώνοντας τον «αναμφίβολα πρωτογενή εκφυλισμό της πλάγιας φλοιονωτιαίας οδού» [5] και αποδεικνύοντας ότι άλλες οδοί, όπως η στήλη του Goll (*Fasciculus gracilis medullae spinalis*), μπορεί επίσης να επηρεαστούν [6]. Με τα ευρήματά

του, ο Strümpell βοήθησε στην καθιέρωση της κληρονομικής σπαστικής παραπληγίας ως ξεχωριστή διάγνωση διαφορετική από τη σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple Sclerosis, MS) ή την Πλαγία Μυατροφική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) [7]. Επιπλέον, περιγράφοντας διαφορετικές εκφάνσεις της νόσου, ο Strumpell προέβλεψε μετέπειτα γνώσεις, δηλαδή την γενετική και κλινική ετερογένεια που τη χαρακτηρίζουν [8].

Η HSP περιγράφηκε εκτενέστερα το 1888 από τον Maurice Lorrain, έναν Γάλλο γιατρό. Λόγω της συμβολής και των δύο στην περιγραφή της νόσου, η HSP εξακολουθεί να ονομάζεται νόσος Strümpell-Lorrain στις γαλλόφωνες χώρες. Ο όρος κληρονομική σπαστική παραπληγία επινοήθηκε αργότερα το 1983 από την Anita Harding [8].

1.3. ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Υπάρχει σημαντική ετερογένεια των φαινοτύπων που σχετίζονται με την HSP [9]. Η βασική κλινική εικόνα των ασθενών με αμιγή HSP είναι η αμφοτερόπλευρη σπαστικότητα κάτω άκρων με άλλοτε άλλη συνοδό μυϊκή αδυναμία. Μερικά άτομα έχουν σπαστικότητα και καμία εμφανή αδυναμία, ενώ άλλα έχουν σπαστικότητα και αδυναμία με περίπου τις ίδιες αναλογίες. Στο πλαίσιο αυτό, τα άτομα με HSP επιδεικνύουν αυξημένα τενόντια αντανακλαστικά στα κάτω περισσότερο από τα άνω άκρα άκρα, καθώς και εκτατική πελματιαία αντίδραση. Συχνά, συνυπάρχει ήπια υποπαλλαισθησία στα κάτω άκρα [10].

1.3.1. ΕΝΑΡΞΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ

Η έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να είναι πρόιμη (Early Onset, EO<35 ετών) ή όψιμη (Late Onset, LO> 35 ετών). Οι EO περιπτώσεις μπορεί να είναι σχετικά στάσιμες και να μοιάζουν με σπαστική διπληγική εγκεφαλική παράλυση (Cerebral Palsy, CP). Οι LO περιπτώσεις συνήθως εξελίσσονται αργά και σταθερά [9].

Γενικά, η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων στην AD μορφή εμφανίζεται στην ενήλικη ζωή μεταξύ της δεύτερης και τρίτης δεκαετίας της ζωής μπορεί δηλαδή να είναι EO ή LO, ενώ στην AR

και την XL μορφή, συνήθως τα πρώτα συμπτώματα ξεκινούν στην παιδική ηλικία ή στην πρώιμη εφηβεία [11-14].

1.3.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ HSP

Η HSP ταξινομείται κλινικά ως "μη επιπλεγμένη" ή "αμιγής τύπος" και "επιπλεγμένη". Η μη επιπλεγμένη είναι ο συχνότερος τύπος και αντιπροσωπεύει το 70-80% των AD μορφών. Ποσοστό 40-45% των μη επιπλεγμένων τύπων HSP έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPAST* [9].

Η μη επιπλεγμένη HSP χαρακτηρίζεται από νευρολογική βλάβη που περιορίζεται σε προοδευτική σπαστική αδυναμία των κάτω άκρων, υπέρτονη διαταραχή της ουροδόχου κύστης και ήπια μείωση της αίσθησης δόνησης των κάτω άκρων [15]. Τα άτομα με μη επιπλεγμένη HSP αντιμετωπίζουν δυσκολία στο περπάτημα. Μπορεί είτε να είναι σχετικά στάσιμη είτε να επιδεινώνεται σταδιακά, οπότε καθίσταται αναγκαία η χρήση περιπατητικών βοηθημάτων ή η καθήλωση σε αναπηρικό αμαξίδιο. Παρατηρούνται επίσης συμπτώματα επιτακτικής ούρησης (Urinary Urgency UU) και παραισθησίας των κάτω άκρων (Lower-Extremity Paresthesias LEP), φυσιολογική δύναμη και επιδεξιότητα των άνω άκρων και καμία συμμετοχή της ομιλίας, της μάσησης ή της κατάποσης. Αν και τα συμπτώματα μπορεί να προκαλούν αναπηρία, η διάρκεια ζωής δεν μειώνεται [10].

Η επιπλεγμένη HSP είναι πιο σπάνια και συνήθως ακολουθεί AR τρόπο κληρονομής. Χαρακτηρίζεται από τα κλινικά χαρακτηριστικά που υπάρχουν στη μη επιπλεγμένη HSP αλλά επιπροσθέτως και από άλλα τα οποία συμπεριλαμβάνουν αταξία, επιληπτικές κρίσεις, νοητική έκπτωση, άνοια, μυϊκή ατροφία, εξωπυραμιδική διαταραχή και περιφερική νευροπάθεια [10].

1.4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η HSP είναι νόσος που χαρακτηρίζεται από αξονική εκφύλιση των τελικών απολήξεων των μακρών κατιουσών (πρόσθια και πλάγια φλοιονωτιαία δεμάτια) και σε μικρότερο βαθμό ανιουσών (οπίσθιες δέσμες) οδών του νωτιαίου μυελού.

Η εκφύλιση είναι μεγαλύτερη στα περιφερικά τμήματα των νευραξόνων αυτών των δεματίων. Οι μακρύτερου μήκους ίνες που αφορούν τα κάτω άκρα προσβάλλονται βαρύτερα από ότι αυτές που αφορούν το άνω μέρος του σώματος. Πολλοί μάλιστα ασθενείς με HSP δεν εμφανίζουν συμπτώματα στα άνω άκρα. [11,16]

Η προσβολή των ινών μεγάλου μήκους, πιθανώς οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εξυπηρετούν την αξονική μεταφορά (*KIF5A*-SPG10, *SPAST*-SPG4, *ATL1*-SPG3A, *paraplegin*-SPG7, *proteolipoprotein*-SPG1) [11, 16, 17].

Στο επίπεδο του κινητικού φλοιού, τα κυτταρικά σώματα του Betz των εκφυλιζόμενων ινών δεν προσβάλλονται ή εκφυλίζονται σε πολύ περιορισμένο βαθμό, οι νωτιαίο-παρεγκεφαλιδικές ίνες προσβάλλονται σε μικρότερο βαθμό και πολύ σπάνια παρατηρείται εκφύλιση των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού [18].

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την ερμηνεία της αξονικής βλάβης, όπως:

- Διαταραχή στην κυτταρική διαμεμβρανική μεταφορά: Διαταράσσεται η αξονική μεταφορά μακρομορίων και οργανιδίων λόγω μεταλλαγών των γονιδίων που κωδικοποιούν τις spastin και atlastin 1 πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την αξονική μεταφορά [18].
- Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία: Η paraplegin, ένα ATP-εξαρτώμενο πρωτεολυτικό σύμπλεγμα, είναι τοποθετημένο στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και ελέγχει την αρτιότητα των πρωτεϊνών και τη συγκέντρωση των ριβοσωμάτων. Μεταλλαγές της προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία [19]
- Μεταλλαγή του γονιδίου της SPG1 (πρωτεολιποπρωτεΐνης): Οι ασθενείς εμφανίζουν ενδείξεις διαταραχής της μυελίνης που περιβάλλει τον νευράξονα και κατ' επέκταση επηρεάζεται η λειτουργία του [17].

1.5. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Μέχρι σήμερα εντοπίζονται περισσότεροι από 100 γενετικοί τόποι/88 γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση της HSP. Οι γενετικοί τόποι ονομάζονται SPG (Spastic Paraplegia Genes) και αριθμούνται με τη σειρά της ανακάλυψής τους. Με τον εντοπισμό των αιτιολογικών γονιδίων σε αυτούς τους τόπους, η αναφορά σε έναν συγκεκριμένο γενετικό τύπο HSP πραγματοποιείται και με τη χρήση του ονόματος του εκάστοτε γονιδίου και όχι μόνο του γενετικού τόπου [10].

Από το σύνολο των γονιδίων υπάρχουν 83 κλινικογενετικές περιπτώσεις που διακρίνονται με τον χαρακτηρισμό SPGn. Για τους υπόλοιπους γενετικούς τόπους που έχει αναφερθεί ότι προκαλούν HSP δεν έχει εκχωρηθεί η ονομασία SPG, συμπεριλαμβανομένων των τεσσάρων μιτοχονδριακών γονιδίων (*MTND4*, *MTTI*, *MTCO3*, *MTATP6*). [20, 21].

Όπως έχει προαναφερθεί τα παραπάνω γονίδια αφορούν σε AD, AR, XL και MT μορφές HSP [2]. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει περιγραφή των πιο συχνών γενετικών μορφών της νόσου.

1.5.1. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΗΣ HSP

1.5.1.1. Μη επιπλεγμένες μορφές

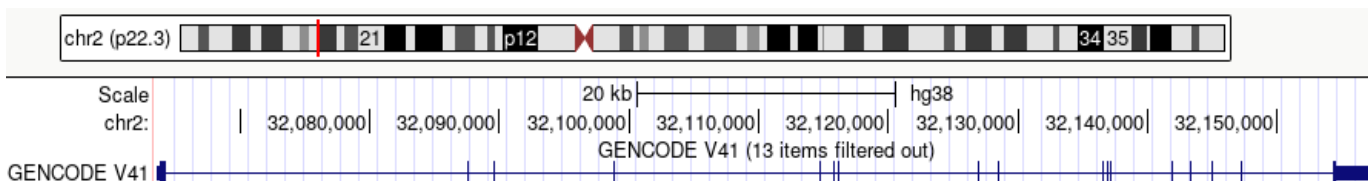
Η AD HSP είναι ο πιο κοινός τύπος HSP, που αφορά το 75%-80% των προσβεβλημένων ατόμων [10].

Ο υποτύπος SPG4 είναι η πιο κοινή HSP [22-24]. Αυτός ο υποτύπος σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPAST* και αντιπροσωπεύει έως και το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων HSP, συμπεριλαμβανομένου του 60% των αυτοσωματικών επικρατών περιπτώσεων [25]. Η μέση ηλικία έναρξης είναι τα 31,7 έτη, αλλά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με έναρξη έως και 70 ετών και συνήθως εμφανίζεται με μεμονωμένη σπαστικότητα κάτω άκρων, με ή χωρίς δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης ή αισθητηριακή δυσλειτουργία [26].

Καθώς το γονίδιο της *SPAST* είναι το συχνότερα σχετιζόμενο με τη νόσο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση p22.3, αποτελείται από 17 εξόνια και έχει

έκταση 94,082 bp. Το μεγαλύτερο σε μέγεθος εξόνιο του γονιδίου είναι το εξόνιο 1. Επίσης αποτελεί το βασικό hot spot μεταλλαγών του γονιδίου.

Εικόνα 1. Γενετικός τόπος SPAST (<https://genome.ucsc.edu>)



Ο υποτύπος SPG3A είναι ο δεύτερος πιο κοινός τύπος HSP. Αυτός ο υποτύπος σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *ATL1* και αποτελεί περίπου το 5-10% των περιπτώσεων AD HSP που είναι αρνητικές για μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPAST* [26]. Ομοίως, συνήθως εμφανίζεται με μεμονωμένη σπαστικότητα των κάτω άκρων, με ή χωρίς δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης ή αισθητική δυσλειτουργία, ωστόσο παρατηρείται αξονική κινητική νευροπάθεια έως και στο 25% των περιπτώσεων. Η μέση ηλικία έναρξης του SPG3A είναι σημαντικά χαμηλότερη από την SPG4 (5,6 έτη έναντι 31,7 έτη), που σημαίνει ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *ATL1* και *SPAST* συμβαίνουν με περίπου ίση συχνότητα στην AD HSP που εμφανίζεται την πρώτη δεκαετία της ζωής, ενώ η AD HSP που εμφανίζεται μετά την τέταρτη δεκαετία είναι απίθανο να προκαλείται από το γονίδιο *ATL1* [25].

Ο υποτύπος SPG31 είναι ο τρίτος πιο κοινός AD HSP και σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *REEP1* [27, 28]. Όπως και ο υποτύπος SPG3A, εμφανίζεται συνήθως ως καθαρός φαινότυπος, με ή χωρίς δυσλειτουργία της ουροδόχου κύστης ή αισθητική δυσλειτουργία, αλλά σχετίζεται και με νευραξονική νευροπάθεια έως και στο 50% των περιπτώσεων [29]. Φαίνεται να εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών είτε στην πρώτη ή στην τέταρτη δεκαετία της ζωής [30].

Οι υπόλοιποι τύποι αυτοσωματικής επικρατούς HSP, έχουν έναρξη κυρίως σε ενήλικα άτομα, είναι σχετικά σπάνιοι και οι περισσότεροι από αυτούς αντιπροσωπεύουν το 1% ή λιγότερο του συνόλου της αυτοσωματικής επικρατούσας HSP.

1.5.1.2. Επιπλεγμένες μορφές

Ο υποτύπος SPG17 σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BSCL2*. Το φάσμα των νευρολογικών διαταραχών που σχετίζονται με το γονίδιο *BSCL2* περιλαμβάνει το σύνδρομο Silver και παραλλαγές της νευροπάθειας Charcot-Marie-Tooth τύπου 2 (CMT2), της περιφερικής κληρονομικής κινητικής νευροπάθειας (dHMN) τύπου V και της σπαστικής παραπληγίας 17 (SPG17). Τα χαρακτηριστικά αυτών των διαταραχών περιλαμβάνουν την εμφάνιση συμπτωμάτων που κυμαίνονται από την πρώτη έως την έβδομη δεκαετία, με αργή εξέλιξη της νόσου, συμμετοχή του άνω κινητικού νευρώνα (διαταραχή βάδισης με πυραμιδικά σημάδια που κυμαίνονται από ήπια έως σοβαρή σπαστικότητα με υπεραντανακλαστικότητα στα κάτω άκρα και εκτατικές πελματιαίες αποκρίσεις), συμμετοχή κατώτερου κινητικού νευρώνα (ατροφία των περνιαίων μυών και μικρού μεγέθους μυών του χεριού), και το pes cavus και άλλες παραμορφώσεις του ποδιού. Η βαρύτητα της νόσου ποικίλλει και εντός των οικογενειών [31].

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρατίθενται τα γονίδια της AD HSP που περιγράφηκαν παραπάνω καθώς και αδρά στοιχεία για σπανιότερα γονίδια της ίδιας κατηγορίας.

Πίνακας 1: Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της AD HSP[9, 10, 32, 33].

Γονίδιο	Ονομασία HSP	Πρωτεΐνη	Τύπος HSP	Εμφάνιση	Κλινικά χαρακτηριστικά
ADAR	Δεν έχει εκχωρηθεί	DSRAD	Μη Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μη φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης ιντερφερόνης [34]
ALDH18A1	SPG9A	P5CS	Επιπλεγμένη	Από την εφηβεία έως την ενηλικίωση (1 άτομο με έναρξη της βρεφικής ηλικίας)	Κινητική νευροπάθεια. Δυσarthρία (Dysarthria), Αταξία (Ataxia), Γνωστική δυσλειτουργία [35]
ATAD3A	Δεν έχει εκχωρηθεί	ATD3A	Επιπλεγμένη	Πρώιμη έναρξη	Μυοτροφία (Amyotrophy), Υπερκινητικές κινήσεις [36]
ATL1	SPG3A	ATLA1	Μη Επιπλεγμένη	Από βρεφική έως παιδική ηλικία (σπάνια έναρξη ενήλικα)	Στατική πορεία. Επιπλεγμένος φαινότυπος με περιφερική νευροπάθεια ή αυτόνομη ανεπάρκεια [37-40]
BICD2	Δεν έχει εκχωρηθεί	BICD2	Επιπλεγμένη	Βρεφικής ή ενήλικη έναρξης	Βρεφική έναρξη: με μεταβλητά σημάδια και συσπάσεις. Ενήλικης έναρξης: μυϊκή ατροφία [41]
BSCL2²	SPG17	BSCL2	Επιπλεγμένη	Ενηλικίωση	Περιφερική μυϊκή ατροφία, Κινητική νευροπάθεια [42, 43]
CPT1C	SPG73	CPT1C	Μη Επιπλεγμένη	Πρώιμη ενηλικίωση	Παραμόρφωση άκρου ποδός [44]

DNM2 ³	Δεν έχει εκχωρηθεί	DYN2	Επιπλεγμένη	Πριν την ηλικία των 20 ετών	Αξονική πολυνευροπάθεια και Ήπια περιφερική μυοτροφία κάτω άκρων [45]
ERLIN2	SPG18 ⁴	ERLN2	Μη Επιπλεγμένη	Ανηλίκων μέχρι την ενηλικίωση	[46]
HSPD1	SPG13	CH60	Μη Επιπλεγμένη	Ενηλικίωση	Ήπια περιφερική μυοτροφία [47]
KIF1A	SPG30	KIF1A	Χωρίς επιπλοκές (για AD HSP)	Ανηλίκων μέχρι την ενηλικίωση	Ήπια νοητική αναπηρία (ID). Ατροφία του οπτικού νεύρου και σπάνια επιληψία [48, 49]
KIF5A ⁴	SPG10	KIF5A	Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία ή Ενηλικίωση	Η ατροφία του οπτικού νεύρου και η επιληψία μπορεί να παρατηρηθούν σπάνια στην AD SPG30 [50-52]
NIPA1	SPG6	<i>NIPA1</i>	Μη Επιπλεγμένη	Ενήλικη ζωή (σπάνια βρεφική έναρξη)	Σοβαρή αδυναμία & σπαστικότητα, Γρήγορα προοδευτική [53-56]
ATP2B4 (PMCA4)	Δεν έχει εκχωρηθεί	AT2B4	Μη Επιπλεγμένη	Ενηλικίωση	[57]
REEP1	SPG31	<i>REEP1</i>	Μη Επιπλεγμένη	Μεταβλητή από 2η έως 7η δεκαετία	Ήπια μυοτροφία [58, 59]
REEP2	SPG72	<i>REEP2</i>	Μη Επιπλεγμένη	Πρώιμη έναρξη	Μυοσκελετικά προβλήματα, Ήπιος τρόμος [60]
RTN2	SPG12	<i>RTN2</i>	Μη Επιπλεγμένη	Πριν την ηλικία των 12 ετών	[61]
SLC33A1	SPG42	ACATN	Μη Επιπλεγμένη	Πρώιμη ενηλικίωση	Αργά προοδευτική, Ήπιο <i>Pes canus</i> [62]
SPAST	SPG4	<i>SPAST</i>	Μη Επιπλεγμένη	Μεταβάλετε από τη βρεφική ηλικία έως την 7η δεκαετία	Γνωστική έκπτωση και άνοια, Περιφερική μυοτροφία [63-66]
SPG7	SPG7	<i>SPG7</i>	Μη Επιπλεγμένη ή Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία ή Ενηλικίωση	Δυσαρθρία, αταξία, Οπτική ατροφία, Υπερπυρηνική παράλυση [67]
WASHC5	SPG8	<i>WASHC5</i>	Μη Επιπλεγμένη	Ενήλικη ζωή (σπάνια βρεφική έναρξη)	Σοβαρό κινητικό πρόβλημα σε ορισμένα άτομα [68, 69]
TUBB4A ⁵	Δεν έχει εκχωρηθεί	<i>TUBB4A</i>	Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία	Παρεγκεφαλιδική αταξία, [70]
ZFYVE27	SPG33	ZFY27	Μη Επιπλεγμένη	Ενηλικίωση	Ήπιο <i>Pes canus</i> [71]

1.5.2. ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΗ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ HSP

Η αυτοσωμική υπολειπόμενη HSP (AR HSP) είναι ετερογενής, με έναν συνεχώς αυξανόμενο κατάλογο γονιδίων τα περισσότερα από τα οποία έχουν εντοπιστεί πρόσφατα. Πολλά γονίδια είναι πολύ σπάνια και μπορεί να περιορίζονται σε μία οικογένεια ή ακόμη και σε ένα άτομο. Η συχνότητα είναι αυξημένη σε πληθυσμούς με παρουσία αιμομιξιών. Η AR HSP εντοπίζεται σε περίπου 25%-30% όλων των ατόμων με HSP [10].

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι αυτοσωμικής υπολειπόμενης HSP που απαντώνται στο γενικό πληθυσμό είναι:

1.5.2.1. Μη επιπλεγμένες μορφές

Ο υποτύπος SPG5 σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP7B1*. Είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη HSP που είναι σχετικά σπάνια [72 80, 81]. Μια διεθνής ομάδα 34, κυρίως Ευρωπαίων, ασθενών περιγράφηκε από τους Schols et al. [16]. Η διάμεση ηλικία έναρξης ήταν τα 13 έτη (εύρος 1–33). Παρατηρήθηκε δυσλειτουργία των οπισθίων δεσμών σε 32 ασθενείς (94%), στους οποίους ήταν ασυνήθιστα σοβαρή, και σε 16 ασθενείς (47%) παρατηρήθηκε αισθητική αταξία (Sensory Ataxia) στα κάτω άκρα. Τα συμπτώματα του ουροποιητικού ήταν επίσης εμφανή και πέντε ασθενείς (15%), οι οποίοι ανέφεραν και ακράτεια κοπράνων. Η γνωσιακή έκπτωση δεν φαίνεται να είναι προεξάρχον χαρακτηριστικό [44].

1.5.2.2. Επιπλεγμένες μορφές

Ο υποτύπος SPG7 σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPG7*. Εμφανίζεται αργότερα από άλλους υποτύπους HSP, με μέση ηλικία έναρξης τα 41,7 έτη [73], και φαίνεται να είναι πιο συχνός στους άνδρες παρά στις γυναίκες [74]. Συνήθως εκδηλώνεται με συνδυασμό σπαστικότητας των κάτω άκρων, η οποία μπορεί να είναι σχετικά ήπια, και παρεγκεφαλιδικής αταξίας [75]. Το βάδισμα με τρόπο, που σχετίζεται με εγγύς μυοπαθητική αδυναμία, είναι επίσης συχνό, ενώ παρατηρείται επίσης προοδευτική εξωτερική οφθαλμοπληγία που μπορεί να είναι μια χρήσιμη διαγνωστική ένδειξη [49]. Αυτά τα χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζουν την υποκείμενη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που μπορεί να επιβεβαιωθεί με βιοψία μυών [76].

Ο υποτύπος SPG11 είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους αυτοσωμικούς υπολειπόμενους τύπους της HSP. Συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPG11* και αντιπροσωπεύει έως και 8% όλων των περιπτώσεων HSP, με υψηλότερο επιπολασμό σε πληθυσμούς με αιμομιξίες [2, 77]. Παρουσιάζεται μεταξύ 4 και 36 ετών. Ο φαινότυπος μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των μελών της οικογένειας, αλλά είναι σχεδόν πάντα επιπλεγμένος. Οι περισσότερες περιπτώσεις παρουσιάζουν γνωσιακή έκπτωση ή μαθησιακές δυσκολίες με σπαστικότητα των κάτω άκρων που εμφανίζεται αργότερα, συνήθως στη δεύτερη δεκαετία [78]. Περισσότερο από το 50% των ασθενών αναπτύσσουν δυσαρθρία, αταξία, αξονική κινητική νευροπάθεια ή εμφανή συμπτώματα του ουροποιητικού [25, 72, 78]. Η εξέλιξη στη συμμετοχή των άνω άκρων είναι συχνή και έχουν επίσης αναφερθεί παρκινσονισμός, στοματογοναθική δυστονία, επιληπτικές κρίσεις και δευτερογενώς οπτική ατροφία [72].

Ο υποτύπος SPG15 σχετίζεται με μεταλλάξεις στο *ZFYVE26* γονίδιο. Αυτός ο υποτύπος εμφανίζεται με παρόμοιο τρόπο με τον SPG11, αν και η αξονική νευροπάθεια μπορεί να είναι πιο εμφανής και ο παρκινσονισμός είναι πιο συχνός [78]. Μπορεί επίσης να προκαλέσει adducted thumbs (MASA syndrome), ένα ασυνήθιστο σημάδι που παρατηρείται σε περιπτώσεις SPG1, μια επικρατή φυλοσύνδετη (XL) HSP, η οποία είναι επίσης γνωστή για την νοητική υστέρηση, αφασία, ασταθές βάδισμα και το σύνδρομο MASA [72, 79].

Στον Πίνακα 2 παρατίθενται τα γονίδια που προαναφέρθηκαν καθώς και κάποια πιο σπάνια, που ανήκουν και αυτά στην κατηγορία της AR-HSP

Πίνακας 2: Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της AR-HSP [9, 10].

Γονίδιο	Ονομασία HSP	Πρωτεΐνη	Τύπος HSP	Εμφάνιση	Κλινικά χαρακτηριστικά
SPG21 (ACP33)	SPG21	SPG21	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Αταξία, Άνοια ενηλίκων και Παρκινσονισμός, Πολυνευροπάθεια [80-82]
ALDH18A1	SPG9B	P5CS	Επιπλεγμένη	Από την εφηβεία έως την ενηλικίωση	Καταρράκτης, Κινητική νευροπάθεια Αταξία, Γνωστική δυσλειτουργία [83]
ALDH3A2	Δεν έχει εκχωρηθεί	ALDH3A2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Συγγενής ιχθύωση (Congenital ichthyosis), Δυστροφία ωχρής κηλίδας

					(Macular dystrophy), Επιληπτικές κρίσεις [84, 85]
AMPD2²	SPG63	AMPD2	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Κοντό ανάστημα, Λεπτό <i>Corpus callosum</i> , Αλλαγές στη λευκή ουσία (White matter) [86, 87]
AP4B1	SPG47	AP4B1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρή ID, Δυσμορφισμός προσώπου (Facial dysmorphism) Επιληπτικές κρίσεις [88, 89]
AP4E1	SPG51	AP4E1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρή ID, Δυσμορφισμός προσώπου Επιληπτικές κρίσεις [88, 90]
AP4M1	SPG50	AP4M1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρή ID, Δυσμορφισμός προσώπου Επιληπτικές κρίσεις [91]
AP4S1	SPG52	AP4S1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρή ID, Δυσμορφισμός προσώπου Επιληπτικές κρίσεις [88, 92]
AP5Z1	SPG48	AP5Z1	Μη Επιπλεγμένη	Τυπικά στην ενηλικίωση και σπάνια στη βρεφική ηλικία	Ακράτεια ούρων (Urinary incontinence), Σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση [78, 93]
ATL1	SPG3A	ATLA1	Μη Επιπλεγμένη	Από βρεφική έως παιδική ηλικία (σπάνια έναρξη ενήλικα)	Στατική πορεία, Σπαστική διπληγική εγκεφαλική παράλυση (Spastic Diplegic Cerebral Palsy) [94]
B4GALNT1	SPG26	B4GN1	Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία	Μυοτροφία, Δυσαρθρία, Αταξία, DD Δυστονία [95, 96]
BICD2	Δεν έχει εκχωρηθεί	BICD2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μυοτροφία, Συσπάσεις [97]
MTRFR (C12orf65)	SPG55	MTRFR	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	DD, Απώλεια όρασης, Πολυνευροπάθεια (Polyneuropathy) Σημάδια μιτοχονδριακής εγκεφαλομυοπάθειας mitochondrial encephalomyopathy [98]
C19orf12	SPG43	CS012	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μυοτροφία, Δυσαρθρία, Πολλαπλές συσπάσεις [99, 100]
CYP2U1	SPG56	CP2U1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρό DD, Δυστονία, Πολυνευροπάθεια [101]
CYP7B1	SPG5A	CP7B1	Επιπλεγμένη ή Μη Επιπλεγμένη	Νεανική έως πρώιμη ενηλικίωση	Αταξία, Πολυνευροπάθεια Εξωπυραμιδικά σημεία (Extrapyramidal signs) [102, 103]
DDHD1	SPG28	DDHD1	Μη Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Σκολίωση [101]
DDHD2	SPG54	DDHD2	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρό DD, Οπτική ατροφία Λεπτό <i>Corpus callosum</i> , Λευκοδυστροφία [86, 104]
ENTPD1	SPG64	ENTP1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Ήπια γνωστική αναπηρία Διαταραχές συμπεριφοράς Αλλαγές στη λευκή ουσία (White matter) [86]
ERLIN1	SPG62	ERLN1	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μυοτροφία, Αταξία

					Αναφέρθηκε φαινότυπος με νεανική εμφάνιση ALS [73, 86]
ERLIN2	SPG18	ERLN2	Επιπλεγμένη (σπάνια AR HSP)	Παιδική ηλικία	DD, Επιληπτικές κρίσεις Σπασμούς [105-107]
FA2H⁴	SPG35	FA2H	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Επιληπτικές κρίσεις, Δυστονία Παρκινσονισμός με συσσώρευση σιδήρου στα βασικά γάγγλια [78, 108, 109]
GAD1	Δεν έχει εκχωρηθεί	DCE1	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μέτρια έως σοβαρή ID [110]
GBA2	SPG46	GBA2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	DD, Αταξία, Απώλεια ακοής, Πολυνευροπάθεια [111, 112]
GJC2⁵	SPG44	CXG2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Πυρετικοί σπασμοί (Febrile seizures), Κώφωση, Επεισοδιακοί σπασμοί Μεταβλητός βαθμός λευκοδυστροφίας [32, 113]
GRID2⁶	Δεν έχει εκχωρηθεί	GRID2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μυοτροφία, Αταξία [114, 115]
IBA57⁷	SPG74	CAF17	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Οπτική ατροφία, Περιφερική νευροπάθεια [116, 117]
KIF1A⁸	SPG30	KIF1A	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Σπαστική αταξία Πολυνευροπάθεια [118-120]
KIF1C	SPG58	KIF1C	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Σπαστική αταξία, Δυστονία [121, 122]
KLC2	Δεν έχει εκχωρηθεί	KLC2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Οπτική ατροφία, Νευροπόθεια Συσπάσεις [123]
KLC4	Δεν έχει εκχωρηθεί	KLC4	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Αταξία, Πολλαπλές συσπάσεις Μεταβλητός βαθμός λευκοδυστροφίας [124]
MARS1⁹	SPG70	SYMC	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Νεφρωσικό σύνδρομο (Nephrotic syndrome), πολυνευροπάθεια Ήπια ID [86, 125]
NT5C2	SPG45	5NTC	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Οπτική ατροφία, Νυσταγμός, Στραβισμός, ID [86, 126]
PGAP1¹⁰	SPG67	PGAP1	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Σοβαρό DD, Τρέμουλο, Υπομυελίνωση (Hypomyelination) [86, 127]
PNPLA6¹¹	SPG39	PLPL6	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Μυοτροφία, Ενδοκρινικές ανωμαλίες Χοριοαμφιβληστροειδική δυστροφία (Chorioretinal dystrophy) [128-130]
REEP2	SPG72	REEP2	Μη Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία	Μυοσκελετικά προβλήματα Ήπιος τρέμουλο [60]
SPART	SPG20	SPART	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Περιφερική μυοτροφία, Κοντό ανάστημα, Πολλαπλές συσπάσεις άκρων [131, 132]
SPG7	SPG7	SPG7	Επιπλεγμένη ή Μη Επιπλεγμένη	Νεανική ηλικία ή ενηλικίωση	Δυσαρθρία, Αταξία, Οπτική ατροφία Υπερπυρηνική παράλυση (Supranuclear palsy) [67, 133-135]

SPG11	SPG11	SPTCS	Επιπλεγμένη	Παιδική ή πρώιμη ενήλικη ζωή	DD, Οπτική ατροφία, Αταξία, Ψευδοβολβικά σημάδια (Pseudobulbar signs), Πολυνευροπάθεια, Παρκινσονισμός [136-139]
TECPR2	SPG49	TCPR2	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Κεντρική άπνοια (Central apnea), Σοβαρό DD, Δυσμορφικά χαρακτηριστικά [140]
TFG	SPG57	TFG	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Οπτική ατροφία, Σοβαρή πολυνευροπάθεια [141]
USP8	SPG59	USP8	Μη Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	[86]
WDR48	SPG60	WDR48	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	Πολυνευροπάθεια, DD [86]
ZFYVE26	SPG15	ZFY26	Επιπλεγμένη	Παιδική ή πρώιμη ενήλικη ζωή	DD, Οπτική ατροφία, Αταξία, Κεντρική εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς, Πολυνευροπάθεια [78, 142]

Developmental Delay DD, Intellectual disability ID

1.5.3. ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΗ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Η XL HSP και η MT HSP, είναι οι πιο σπάνιες γενετικές μορφές της HSP, αντιπροσωπεύοντας λιγότερο από το 1%-2% όλων των ατόμων που προσβάλλονται με HSP [10]. Επηρεάζουν κυρίως συγγενείς περιπτώσεις, ιδιαίτερα στην φυλοσύνδετη HSP [143].

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται στοιχεία για τα γονίδια και τα κλινικά χαρακτηριστικά της XL HSP (Πίνακας 3) και της MT HSP (Πίνακας 4).

Πίνακας 3: Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της επικρατούς φυλοσύνδετης HSP[9, 10]

Γονίδιο	Ονομασία HSP	Πρωτεΐνη	Τύπος HSP	Εμφάνιση	Κλινικά χαρακτηριστικά
L1CAM	SPG1 ²	L1CAM	Επιπλεγμένη	Βρεφική ηλικία	ID, Αφασία, Αποφρακτικός υδροκεφαλισμός (Obstructive hydrocephalus) [79, 144-146]
PLP1³	SPG2	MYPR	Επιπλεγμένη	Πρώιμη παιδική έως νεανική ηλικία (έναρξη την 4η-7η δεκαετία σε ετεροζυγωτά θηλυκά)	Επιπλεγμένος φαινότυπος HSP σε πρώιμα στάδια [147-150]
SLC16A2	SPG22	MOT8	Επιπλεγμένη	Παιδική ηλικία	Σοβαρή ID, Βρεφική υποτονία, Προοδευτική σπαστικότητα, Αταξία Δυστονία [151, 152]

Πίνακας 4: Γονίδια και κλινικά χαρακτηριστικά της μιτοχονδριακής HSP[9, 10].

Γονίδιο	Ονομασία HSP	Πρωτεΐνη	Τύπος HSP	Εμφάνιση	Κλινικά χαρακτηριστικά
MT-ATP6	Δεν έχει εκχωρηθεί	ATP6	Επιπλεγμένη	Ενηλικίωση	Καρδιομυοπάθεια, σακχαρώδης διαβήτης, αισθητηριακή πολυνευροπάθεια [153]

1.6. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΑΣ ΤΗΣ HSP

Για την ακριβή διερεύνηση και εντοπισμό του εκάστοτε εμπλεκόμενου γονιδίου στην HSP ακολουθείται συγκεκριμένη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει:

- κλινική εξέταση/ιατρικό ιστορικό
- οικογενειακό ιστορικό
- βιοχημικό και απεικονιστικό εργαστηριακό έλεγχο
- γενετικό έλεγχο

1.6.1. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Η κλινική εξέταση και το ιατρικό ιστορικό στοχεύουν στον εντοπισμό νευρολογικών σημείων που σχετίζονται με την HSP καθώς και τυχόν πρόσθετων χαρακτηριστικών που θα μπορούσαν να υποδεικνύουν την παρουσία ενός περίπλοκου HSP [9, 10][9, 10][9, 10][9, 10][9, 10][9, 10].

1.6.2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Το οικογενειακό ιστορικό είναι επιθυμητό να καταγράφει σε βάθος τριών γενεών της οικογένειας με έμφαση σε συγγενείς με πιθανή HSP. Η τεκμηρίωση των σχετικών ευρημάτων σε μέλη της οικογένειας μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω άμεσης εξέτασης αυτών των ατόμων είτε μέσω επισκόπησης των ιατρικών τους αρχείων, συμπεριλαμβανομένης της νευροαπεικόνισης, της νευροπαθολογίας, της νευρολογικής εξέτασης και των αποτελεσμάτων μοριακών γενετικών εξετάσεων που πιθανόν υπάρχουν στον ιατρικό τους φάκελο [10][10][10][10][10][9, 10].

1.6.3. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο γενετικός έλεγχος μπορεί να περιλαμβάνει είτε στοχευμένη γονοτύπηση ενός ή περισσότερων γονιδίων ή μη στοχευμένο γονιδιακό έλεγχο με τη χρήση παράλληλης αλληλούχησης (New Generation sequencing, NGS) συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων (gene panel) ή και όλου του κωδικοποιού γονιδιώματος (exome sequencing, WES). Η γονιδιακή στόχευση απαιτεί ακριβέστερη και λεπτομερέστερη περιγραφή της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Πιο αναλυτικά, κατά το γενετικό έλεγχο της HSP μπορούν να εξεταστούν τα ακόλουθα ενδεχόμενα: ταυτόχρονης ή σειριακής εξέτασης ενός γονιδίου, εάν τα κλινικά ευρήματα ή/και το οικογενειακό ιστορικό υποδεικνύουν ότι η εμπλοκή συγκεκριμένου γονιδίου ή μικρής υπο-ομάδας γονιδίων είναι πιο πιθανή, ή/και ενός πολυγονιδιακού πάνελ που περιλαμβάνει μερικά ή όλα τα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο. Ο έλεγχος αυτός είναι πολύ πιθανό να εντοπίσει τη γενετική αιτία της πάθησης (30-50%), ενώ περιορίζει την ταυτοποίηση παραλλαγών αβέβαιης σημασίας και παθογόνων παραλλαγών σε γονίδια που δεν εξηγούν τον φαινότυπο [154-156].

Εκτενής γονιδιωματικός έλεγχος πραγματοποιείται συνήθως στις περιπτώσεις που η πιθανή διάγνωση είναι αμφιλεγόμενη ή η διαφοροδιάγνωση είναι δύσκολη. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας εξονίων (Whole Exome Sequencing, WES) χρησιμοποιείται πιο συχνά. Η αλληλούχηση γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) είναι επίσης δυνατή αν και το πλήθος της πληροφορίας που παράγει είναι τόσο μεγάλο που ενίοτε είναι δύσκολα διαχειρίσιμο. Η ανάλυση μόνο ενός συγκεκριμένου πλήθους γονιδίων από το σύνολο των δεδομένων που προκύπτουν από WES & WGS δοκιμασίες με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι συνήθως η πιο αποδοτική στρατηγική και η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη.

Αρκετές φορές για την ολοκλήρωση του γενετικού ελέγχου χρησιμοποιούνται και τεχνικές ανίχνευσης παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variants, CNVs) όπως, πολλαπλή ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης (Multiple Ligation Polymerase Amplification (MLPA) και χρωμοσωμική ανάλυση μικροσυστοιχιών (Chromosomal Microarray Analysis, CMA) [157].

1.6.4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ

Η γενετική συμβουλευτική είναι η διαδικασία παροχής πληροφοριών σε άτομα και οικογένειες σχετικά με τη φύση ενός νοσήματος, τους τρόπους κληρονόμησης και τις επιπτώσεις των μεταλλαγών με στόχο να τους βοηθήσει να λάβουν ιατρικές και προσωπικές αποφάσεις. Η ακόλουθη ενότητα ασχολείται με την εκτίμηση γενετικού κινδύνου και τη χρήση του οικογενειακού ιστορικού και του γενετικού ελέγχου για την αποσαφήνιση της γενετικής κατάστασης για τα μέλη της οικογένειας [10].

1.7. ΤΡΟΠΟΙ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, η HSP κληρονομείται με AD, AR, XL και MT τρόπο, ανάλογα με τον γενετικό υπότυπο.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, αρκετοί τύποι HSP (π.χ. αυτοί που σχετίζονται με παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια όπως τα *ATL1*, *SPG7*, *ALDH18A1* και πιθανώς το *SPG11*) μπορεί να κληρονομηθούν είτε ως AD είτε ως AR διαταραχές [10].

1.7.1. ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΤΩΝ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ

1.7.1.1. Αυτοσωμική Επικρατής HSP

Γονείς ασθενή δείκτη

Τα περισσότερα άτομα που έχουν διαγνωστεί με AD HSP έχουν γονέα που φέρει το παθογόνο αλληλόμορφο. Διαφορετικά ένας ασθενής με AD HSP μπορεί να έχει τη διαταραχή ως αποτέλεσμα μιας *de novo* παθογόνου παραλλαγής.

Οι συστάσεις για την αξιολόγηση των γονέων ενός ασθενή δείκτη με μια εμφανή επικρατή παθογόνο παραλλαγή περιλαμβάνουν μοριακό γενετικό έλεγχο και των δύο γονέων για την παθογόνο παραλλαγή που προσδιορίζεται στον ασθενή δείκτη.

Εάν η παθογόνος παραλλαγή που βρίσκεται στον ασθενή δείκτη δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε γονέα, πρόκειται για μια *de novo* παθογόνο παραλλαγή στον ασθενή δείκτη.

Αδέλφια ασθενή δείκτη

Ο κίνδυνος για τα αδέλφια του ασθενή δείκτη εξαρτάται από τον γονότυπο των γονέων του ασθενή δείκτη. Για παράδειγμα εάν ένας από τους γονείς του ασθενή δείκτη έχει παθογόνο παραλλαγή, ο κίνδυνος για τα αδέλφια να κληρονομήσουν την παθογόνο παραλλαγή είναι 50%.

Η ηλικία έναρξης και ο βαθμός αναπηρίας ποικίλλουν πολύ μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας, σε διαφορετικές οικογένειες με την ίδια παθογόνο παραλλαγή ή μεταξύ γενετικών τύπων HSP.

Απόγονοι ασθενή δείκτη

Κάθε παιδί ενός ατόμου με AD HSP διατρέχει κίνδυνο 50% να κληρονομήσει τη σχετιζόμενη με την HSP παθογόνο παραλλαγή.

1.7.1.2. Αυτοσωμική Υπολειπόμενη HSP

Γονείς ασθενή δείκτη

Οι γονείς ενός ατόμου προσβεβλημένου με AR HSP είναι συνήθως ετεροζυγώτες, δηλαδή φορείς μιας παθογόνου παραλλαγής που σχετίζεται με την HSP.

Αδέλφια ασθενή δείκτη

Κατά τη σύλληψη, κάθε απόγονος έχει 25% πιθανότητα να είναι ομόζυγος για τη μεταλλαγή και άρα εν δυνάμει ασθενής, 25% πιθανότητα να φέρει δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα του υπεύθυνου γονιδίου και 50% πιθανότητα να είναι ασυμπτωματικός φορέας.

Απόγονοι ασθενή δείκτη

Οι απόγονοι ενός ατόμου με AR HSP είναι υποχρεωτικά ετεροζυγώτες (φορείς) για την παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP. Αν υπάρχει συγγένεια μεταξύ των γονέων, υπάρχει σπάνιος κίνδυνος ψευδοεπικρατούς κληρονομής.

1.7.1.3. Φυλοσύνδετη Κληρονομικότητα HSP

Γονείς αρρένων ασθενών δεικτών

Ο πατέρας ενός άρρενος ασθενούς δε μπορεί να κληροδοτήσει στον υιό την παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP. Σε μια οικογένεια με περισσότερα από ένα άτομα με XL HSP, η μητέρα ενός προσβεβλημένου άρρενος είναι υποχρεωτικά φορέας της παθογόνου παραλλαγής που σχετίζεται με την HSP.

Εάν από τα παιδιά της οικογένειας, ένας άρρεν είναι το μόνο προσβεβλημένο μέλος της (δηλαδή, μια απλή περίπτωση), η μητέρα μπορεί να είναι ετεροζυγώτης ή να πρόκειται για μια de novo παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP.

Γονείς θήλεων ασθενών δεικτών

Μια γυναίκα μπορεί να έχει κληρονομήσει τη σχετιζόμενη με το HSP παθογόνο παραλλαγή είτε από τη μητέρα της είτε από τον πατέρα της, ή η παθογόνος παραλλαγή μπορεί να είναι de novo.

Η λεπτομερής αξιολόγηση των γονέων και η ανασκόπηση του εκτεταμένου οικογενειακού ιστορικού μπορεί να βοηθήσουν στη διάκριση των ασθενών με de novo παθογόνο παραλλαγή από εκείνων με κληρονομική παθογόνο παραλλαγή.

Αδέλφια αρρένων ασθενών δεικτών

Εάν η μητέρα ασθενή με φυλοσύνδετη κληρονομικότητα HSP έχει παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP, η πιθανότητα μεταβίβασής της σε κάθε εγκυμοσύνη είναι 50%. Οι άρρενες που κληρονομούν την παραλλαγή θα νοσήσουν ενώ τα θηλυκά άτομα που κληρονομούν την παραλλαγή θα είναι ετεροζυγώτες και μπορεί να έχουν μια σειρά από κλινικές εκδηλώσεις με διακυμάνσεις στη βαρύτητα των κλινικών χαρακτηριστικών [143].

Η ηλικία έναρξης, η διεισδυτικότητα και ο βαθμός αναπηρίας δεν είναι επαρκώς προβλέψιμα σε μέλη της ίδιας οικογένειας, σε διαφορετικές οικογένειες με την ίδια παθογόνο παραλλαγή ή μεταξύ γενετικών τύπων HSP.

Αδέλφια θηλέων ασθενών δεικτών

Ο κίνδυνος για τα αδέλφια εξαρτάται από τη γενετική κατάσταση των γονέων.

Εάν η μητέρα φέρει παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP, η πιθανότητα μεταβίβασής της σε κάθε εγκυμοσύνη είναι 50%. Οι άρρενες που κληρονομούν την παραλλαγή θα νοσήσουν ενώ τα θηλυκά άτομα που κληρονομούν την παραλλαγή θα είναι ετεροζυγώτες και μπορεί να έχουν μια σειρά από ηπιότερες κλινικές εκδηλώσεις.

Εάν ο πατέρας του παιδιού έχει μια παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με την HSP, θα την κληρονομήσει σε όλες τις κόρες του και σε κανέναν από τους γιους του.

Η ηλικία έναρξης, η διεισδυτικότητα και ο βαθμός αναπηρίας δεν είναι επαρκώς προβλέψιμα σε μέλη της ίδιας οικογένειας, σε διαφορετικές οικογένειες με την ίδια παθογόνο παραλλαγή ή μεταξύ γενετικών τύπων HSP.

Απόγονοι αρρένων ασθενών δεικτών

Η σχετιζόμενη με την HSP παθογόνος παραλλαγή κληρονομείται σε όλες τις κόρες τους, που θα είναι ετεροζυγώτες και μπορεί να έχουν μια σειρά από, συνήθως ήπιες, κλινικές εκδηλώσεις, και σε κανέναν από τους γιους τους.

Απόγονοι θηλυκών ασθενών δεικτών

Οι γυναίκες με παθογόνο παραλλαγή που σχετίζεται με HSP έχουν 50% πιθανότητα να κληρονομήσουν την παθογόνο παραλλαγή σε κάθε παιδί:

- Οι άρρενες που κληρονομούν την παθογόνο παραλλαγή θα νοσήσουν.
- Τα θηλυκά άτομα που κληρονομούν την παραλλαγή θα είναι ετεροζυγώτες και μπορεί να έχουν μια σειρά από, συνήθως ήπιες, κλινικές εκδηλώσεις.

1.7.1.4. Μιτοχονδριακή Κληρονομικότητα HSP

Η Μιτοχονδριακή Κληρονομικότητα δεν ακολουθεί το Μενδελιανό πρότυπο μεταβίβασης, μεταβιβάζεται από τη μητέρα (μητρική μεταβίβαση) και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία. Για να εμφανισθεί νόσος, θα πρέπει το ποσοστό των παθολογικών μιτοχονδρίων κάθε κυττάρου να ξεπεράσει ένα κρίσιμο όριο (φαινόμενο ουδού).

Γονείς ασθενή δείκτη

Ο πατέρας ενός ασθενή δείκτη δεν κινδυνεύει να έχει την παθογόνο παραλλαγή. Η μητέρα ενός ασθενή δείκτη (συνήθως) έχει την παθογόνο παραλλαγή και μπορεί να έχει ή να μην έχει συμπτώματα. Εναλλακτικά, ο ασθενής δείκτης μπορεί να έχει μια *de novo* μιτοχονδριακή παθογόνο παραλλαγή.

Αδέλφια ασθενή δείκτη

Ο κίνδυνος για τα αδέλφια εξαρτάται από τη γενετική κατάσταση της μητέρας. Εάν η μητέρα έχει την παθογόνο παραλλαγή, όλα τα αδέλφια ενός ασθενή δείκτη θα κληρονομήσουν την παθογόνο παραλλαγή και μπορεί να έχουν ή να μην έχουν συμπτώματα (φαινόμενο ουδού). [158]

Απόγονοι ασθενή δείκτη

Όλοι οι απόγονοι θηλυκών με παθογόνο παραλλαγή mtDNA θα κληρονομήσουν την παθογόνο παραλλαγή και θα αναπτύξουν η όχι τη νόσο ανάλογα το ποσοστό των παθολογικών μιτοχονδρίων κάθε κυττάρου (ετεροπλασμία), ενώ οι απόγονοι αρσενικών με παθογόνο παραλλαγή mtDNA δεν κινδυνεύουν να κληρονομήσουν την παθογόνο παραλλαγή.

1.8. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ

Πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την παροχή συμβουλών σε ένα άτομο που έχει όλα τα σημεία και συμπτώματα της HSP, αλλά δεν έχει παρόμοια προσβεβλημένα συγγενικά πρόσωπα. Τέτοια άτομα χωρίς γνωστό οικογενειακό ιστορικό HSP μπορεί να έχουν αυτοσωμική υπολειπόμενη HSP (και επομένως χαμηλό κίνδυνο μετάδοσης της διαταραχής στους απογόνους), είναι επίσης πιθανό να έχουν φυλοσύνδετη HSP, αυτοσωματική επικρατής HSP με μειωμένη διεισδυτικότητα, μια *de novo* παθογόνος παραλλαγή, παθογόνος παραλλαγή mtDNA, λανθασμένη πατρότητα ή επίκτητη διαταραχή λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων [10].

1.8.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ

Είναι σκόπιμο να προσφερθεί γενετική συμβουλευτική για οικογενειακό προγραμματισμό, συμπεριλαμβανομένης της γενικής συζήτησης για πιθανούς κινδύνους για τους απογόνους και τις επιλογές αναπαραγωγής, σε νεαρούς ενήλικες που ενδέχεται να είναι φορείς, σε φορείς που κινδυνεύουν να εκδηλώσουν τη νόσο, καθώς και σε άτομα που ήδη νοσούν. Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να γίνουν συγκεκριμένες προβλέψεις σχετικά με την πιθανή σοβαρότητα ή την ακριβή ηλικία έναρξης της νόσου στους απογόνους.

Αν εντοπιστεί παθογόνος παραλλαγή σε ένα προσβεβλημένο μέλος της οικογένειας, είναι δυνατός ο προγεννητικός έλεγχος και ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος για HSP.

Ο βέλτιστος χρόνος για τον προσδιορισμό του γενετικού κινδύνου και τη συζήτηση της διαθεσιμότητας προγεννητικού/προεμφυτευτικού γενετικού ελέγχου είναι πριν από την κύηση. Είναι απαραίτητο να έχει δοθεί εκτεταμένη γενετική συμβουλή πριν τη διενέργεια προγεννητικού ή προεμφυτευτικού ελέγχου.

1.9. ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΕ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Η HSP εμφανίζεται σε όλους τους πληθυσμούς αλλά με παραλλαγές στη συχνότητα κατανομής των αιτιολογικών γονιδίων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες να έχουν αξιολογήσει το γενετικό φάσμα της HSP στην Ελλάδα.

Προκειμένου να μελετηθεί το κλινικό και γενετικό φάσμα της HSP σε ενήλικους Έλληνες ασθενείς η Μονάδα Νευρογενετικής της Α΄ Νευρολογικής Κλινικής, του Αιγινήτειου Νοσοκομείου του ΕΚΠΑ, πραγματοποίησε μελέτη η οποία διήρκεσε 19 χρόνια.

Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε [159], για πρώτη φορά, ομάδα Ελλήνων ασθενών με HSP, που περιλάμβανε 54 ασθενείς από 40 οικογένειες. Χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση στοχευμένης αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Targeted Next-Generation Sequencing, Targeted NGS) πραγματοποιήθηκε γενετική διάγνωση στο 51% των περιπτώσεων και εντοπίστηκαν 11 παραλλαγές (*SPAST* c.430C>T, *SPAST* c.575T>A, *SPAST* c.1508G>C, *SPAST* c.1591dup, *KIF5A* c.745C>G, *KIF5A* c.2590C>T, *REEP1* c.166G>A, *SPG11* c.2278T>C, *SPG11* c.5381T>C, *CYP7B1* c.1304T>C, *CYP7B1* c.1322C>T). Φάνηκε ότι οι παραλλαγές στα γονίδια *SPAST* και *KIF5A* είναι οι πιο συχνές αιτίες αυτοσωμικής επικρατούσας HSP, ενώ οι παραλλαγές στα γονίδια *SPG11* και *CYP7B1* ήταν οι πιο συχνές αιτίες αυτοσωμικής υπολειπόμενης HSP. Μία νέα παραλλαγή (c.5381T>C), η οποία εντοπίστηκε στο γονίδιο *SPG11*, αποδείχτηκε ότι οδηγεί σε ασθένεια όψιμης έναρξης και ότι μπορεί να είναι μοναδική για τον ελληνικό πληθυσμό. Επίσης ανιχνεύθηκε παραλλαγή (c.2590C>T) στο γονίδιο *KIF5A* ως πρώτη nonsense μετάλλαξη που επίσης αναφέρθηκε στον ελληνικό πληθυσμό. Από την μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά των Ελλήνων ασθενών με HSP δε διαφέρουν από αυτά των άλλων ευρωπαϊκών πληθυσμών [159].

Η μελέτη των Polymeris et al. [160], με σκοπό να περιγράψει την παιδική HSP στην Ελλάδα, μελέτησε μια σειρά 15 παιδιών από την Ελλάδα που προσβλήθηκαν από αμιγή HSP και υποβλήθηκαν σε εκτεταμένες διαγνωστικές εξετάσεις. Η μοριακή ανάλυση περιελάμβανε WES ή διαδοχικό έλεγχο των γονιδίων *ATL1*, *SPAST*, *REEP1* και *CYP7B1*. Το WES που εκτελέστηκε σε τρεις περιπτώσεις έδωσε γνωστές μεταλλάξεις στα γονίδια *ATL1* και *CYP7B1*, και μια νέα παραλλαγή την c.397C>T στο γονίδιο *SPG7*. Ο έλεγχος των υποψηφίων γονιδίων που πραγματοποιήθηκε στους υπόλοιπους

ασθενείς εντόπισε γνωστές μεταλλάξεις στα γονίδια *ATL1*(2), *SPAST*(2) και *REEP1*(1) και δύο νέες μεταλλάξεις, τις c.1636G>A και c.1413+3_6delAAGT, στο γονίδιο *SPAST*. Σε έξι περιπτώσεις, τις μεταλλάξεις τις κληρονόμησαν από τους γονείς τους, ενώ σε τρεις περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις ήταν *de novo*. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν τη γενετική ετερογένεια της HSP που ξεκινά από την παιδική ηλικία, με τις *SPG4/SPAST* και *SPG3A/ATL1* να είναι οι πιο συχνές μορφές.

Πέρα από τις παραπάνω μελέτες, υπάρχουν και δημοσιεύσεις σχετικές με μεμονωμένες περιπτώσεις Ελλήνων ασθενών με HSP.

Έτσι από την ομάδα της Μονάδας Νευρογενετικής του Αιγινήτειου, πολύ μεγάλου ενδιαφέροντος είναι και η μοριακή διάγνωση αδρενολευκοδυστροφίας ωφειλόμενη στην μεταλλαγή c.1174_1178del, p.Leu392Serfs*7 στο γονίδιο *ABCD1*, σε μια οικογένεια η οποία επί 30 χρόνια έφερε τη διάγνωση της HSP. Αποδεικνύεται έτσι η μεγάλη σημασία της διαφορική διάγνωση στην HSP καθώς οι ασθενείς με αδρενολευκοδυστροφία έχουν ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης της λειτουργίας των επινεφριδίων και δυνητικά μπορεί να επωφεληθούν από φαρμακευτικές θεραπείες [156].

Η μελέτη των Daoud et al. [161] αναφέρεται στην κλινική περιγραφή και τις γενετικές αναλύσεις μιας ελληνικής οικογένειας με τέσσερα άτομα που πάσχουν από μια πολύπλοκη μορφή κληρονομικής σπαστικής παραπληγίας με υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομικότητας. Η αλληλούχηση WES όλων των προσβεβλημένων ατόμων οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας ομόζυγης έλλειψης 25bp που προβλεπόταν ότι θα οδηγήσει σε μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης και δημιουργία πρόωρου κωδικόνιου λήξης στο γονίδιο *SPG7*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη paraplegin. Αυτή η έλλειψη, η οποία εντοπίζεται στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου *SPG7*, δεν είχε αναφερθεί προηγουμένως και πιθανότατα οδηγεί σε πλήρη απουσία της πρωτεΐνης *SPG7*. Αυτή η οικογένεια παρουσιάζει σημαντική φαινοτυπική ετερογένεια τονίζοντας την κλινική μεταβλητότητα που σχετίζεται με τις μεταλλάξεις του γονιδίου *SPG7*.

Οι Fraidakis et al. [162], παρουσιάζουν την περίπτωση μιας 30χρονης γυναίκας ασθενούς με σύνθετη αυτοσωμική υπολειπόμενη HSP με λέπτυνση του *Corpus callosum* (Thinning of the *Corpus callosum* TCC) και άνοια που ήταν σύνθετη ετεροζυγώτης με δύο νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPG11*. Η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου *SPG11* αποκάλυψε δύο νέες μεταλλάξεις σε μια σύνθετη ετερόζυγη κατάσταση στην ασθενή (c.2431C>T/p.Gln811Ter και

c.6755_6756insT/p.Glu2252Aspfs*88). Η μαγνητική τομογραφία έδειξε TCC, εστίες λευκής ουσίας (White Matter WM) περικοιλιακά, και το σημάδι «αυτιά του λύγκα» (ears of the lynx).

1.10. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε η HSP χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική και γενετική ετερογένεια η οποία καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την επίτευξη της γενετικής διάγνωσης. Η προτεινόμενη σήμερα μεθοδολογία γενετικού ελέγχου αφορά στην ανάλυση μέσω NGS με τη χρήση είτε targeted NGS είτε WES. Η διαγνωστική δυνατότητα των προαναφερόμενων τεχνολογιών φτάνει το 30%-50%. [16] και καλύπτει κυρίως τη διερεύνηση σημειακών μεταλλαγών.

Εκτός όμως από τις σημειακές παραλλαγές, ένα ποσοστό των παραλλαγών αφορά σε ελλείψεις και διπλασιασμούς σε συγκεκριμένα γονίδια σχετιζόμενα με τη νόσο. Συγκεκριμένα, στην SPG4 το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει το 41%, ενώ για τα γονίδια *ATL1*, *SPAST*, *NIPA1*, *SPG7* *REEP1* τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται έως 55. Κατ' επέκταση ο αριθμός αυτός των γονιδίων που αφορά σε παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variants, CNV) διερευνάται με τη χρήση άλλων τεχνολογιών όπως Μικροσυστοιχιών (Microarrays) ή Πολλαπλής Ενίσχυσης Υβριδοποιημένων Ανιχνευτών Εξαρτώμενης από την Αντίδραση της Λιγάσης (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) κ.α.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περαιτέρω διερεύνηση των ασθενών με HSP της Μονάδας Νευρογενετικής, που έχουν ήδη ελεγχθεί με NGS, για σημειακές παραλλαγές που αφορούν τη νόσο, για CNVs με την εφαρμογή της τεχνικής MLPA, αποσκοπώντας στην πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής ταυτότητας των Ελλήνων ασθενών με HSP.

Αναλυτικότερα η εργασία περιλαμβάνει:

- Προτυποποίηση της μεθοδολογίας MLPA για τον εντοπισμό μεταλλαγών (ελλείψεων ή διπλασιασμών) στα γονίδια *SPAST*, *ATL1*, *SPG7* και *REEP1*.
- Εφαρμογή της μεθοδολογίας MLPA σε δείγματα HSP ασθενών αρνητικών για σημειακή μεταλλαγή μέσω NGS.

Τα αποτελέσματα αναμένεται να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τη γενετική ταυτότητα της HSP στον Ελλαδικό χώρο και να βοηθήσουν έτσι στην ορθότερη αντιμετώπιση της νόσου σε επίπεδο τόσο συμπτωματικό, όσο και προσυμπτωματικό, και στην παροχή εστιασμένης γενετικής συμβουλής.

ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΟ

2.1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Τα δείγματα αφορούν τόσο σε ασθενείς όσο και σε γενετικό υλικό της Μονάδας Νευρογενετικής. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα DNA προέρχονται από την τράπεζα δειγμάτων της Μονάδας και αφορούν σε ασθενείς δείκτες οι οποίοι έχουν ήδη ελεγχθεί με NGS για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλαγών και έχουν βρεθεί αρνητικοί. Αναλυτικότερα, από σύνολο 102 ασθενών-δεικτών με HSP που ελέγχθηκαν με NGS παρέμειναν 44 ασθενείς χωρίς γενετική διάγνωση. Από αυτούς, οι 26 ασθενείς δείκτες ελέγχθηκαν με την μέθοδο της MLPA για τον εντοπισμό ελλείψεων ή διπλασιασμών.

2.1.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτελείται από 26 ασθενείς δείκτες οι οποίοι εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά HSP και οι οποίοι έχουν αξιολογηθεί και καταγραφεί από ειδικό Νευρολόγο-Νευρογενετιστή στο Ειδικό Ιατρείο της Μονάδας Νευρογενετικής.

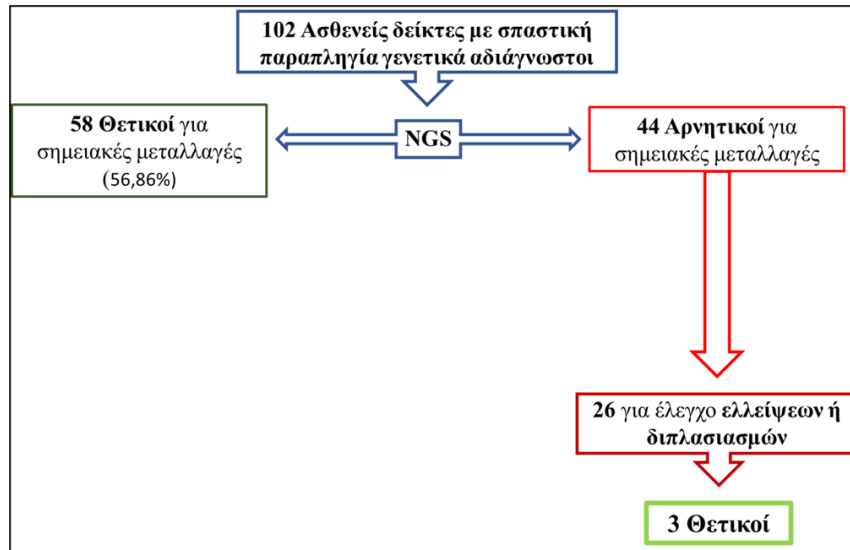
Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται 26 ασθενείς δείκτες εκ των οποίων οι 15 ήταν άντρες και οι 11 γυναίκες. Οι 12 ασθενείς (46,1%) παρουσίαζαν την αυτοσωμική επικρατή μορφή κληρονομικότητας, 5 ασθενείς (19,23%) παρουσίαζαν την αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας και οι υπόλοιποι 9 (34,61%) ήταν σποραδικά περιστατικά. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 43,68 έτη και ο μέσος όρος ηλικίας έναρξης των συμπτωμάτων τους ήταν τα 31 έτη. Το κύριο σύμπτωμα έναρξης ήταν η δυσχέρεια βάδισης.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ασθενών που ελέγχθηκαν.

<i>Ασθενείς δείκτες</i>	26
<i>Τύπος κληρονομικότητας(%)</i>	
<i>ΑΕ</i>	12 (46,1%)
<i>ΑΥ</i>	5 (19,23%)
<i>Σποραδικό περιστατικό</i>	9 (34,61%)
<i>Φύλο (Α/Θ)</i>	15/11
<i>Ηλικία (έυρος)</i>	43,68 ±15,1 (17-73)
<i>Ηλικία έναρξης (έυρος)</i>	31±20 (1-58)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ο αλγόριθμός επεξεργασίας των δειγμάτων που ακολουθείται απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1).



Εικόνα 2: Αλγόριθμός επεξεργασίας των δειγμάτων. Πειραματική διαδικασία.

Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε όπως προαναφέρθηκε με την εφαρμογή της MLPA στα δείγματα DNA που παρέμειναν αδιάγνωστα μετά από την πραγματοποίηση του NGS. Για κάποια δείγματα λόγω παλαιότητας χρειάστηκε να γίνει νέα αιμοληψία και απομόνωση DNA και για το λόγω αυτό περιγράφεται και η τεχνική απομόνωσης στη μεθοδολογία. Την αντίδραση MLPA ακολουθεί τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή καθώς και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση ειδικού λογισμικού. Ακολουθεί το σύνολο των εργαστηριακών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Ένα μεγάλο εμπόδιο κατά την εξαγωγή του DNA από μεγάλο αριθμό δειγμάτων είναι η μέθοδος αποπρωτεϊνοποίησης των πέψων των κυττάρων με τους επικίνδυνους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και ισοχλωροφόρμιο. Μια γρήγορη, ασφαλής και φθηνή μέθοδος αναπτύχθηκε για να

απλοποιήσει τη διαδικασία αποπρωτεϊνοποίησης. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την εξάλειψη των κυτταρικών πρωτεϊνών με αφυδάτωση και καθίζηση με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου [163].

2.2.1.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Πραγματοποιείται απομόνωση καθαρού DNA, χωρίς δηλαδή πρωτεϊνικές προσμίξεις, το επονομαζόμενο γενωμικό DNA. Η μέθοδος του Χλωριούχου Νατρίου βασίζεται στην ιοντική ισχύ του αιμολύματος, όπου με την καταβύθιση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται και η απομάκρυνση τους. Αντίθετα, το DNA είναι διαλυτό στο διάλυμα του αιμολύματος. Για την λήψη του DNA γίνεται προσθήκη αλκοόλης, όπου και κατακρημνίζεται [163].

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση γενωμικού DNA.

Διάλυμα	Σύσταση
LYSIS I	2,42g Tris HCl, 46,4g NaCl, 1,48g EDTA-Na ₂ , dH ₂ O σε τελικό όγκο 2L. pH=7,4
LYSIS II	16,6g NH ₄ Cl, 2,0g KHCO ₃ , 0,74g EDTA-Na ₂ και dH ₂ O, σε τελικό όγκο 2L. pH=8,2
Na₂EDTA	10%w/v
Tris-EDTA (TE)	0.5M. pH=8.0
NaCl	6M
SDS	10%
Απόλυτη αιθανόλη	100%
Αιθανόλη	70%
Πρωτεΐνάση K	10mg/dL

2.2.1.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

1^ο Στάδιο

- Πραγματοποιείται λήψη 10mL περιφερικού αίματος και τοποθετείται σε σωληνάριο των 50mL με πώμα το οποίο εμπεριέχει αντιπηκτικό αίματος Na₂EDTA (2mg/mL). Το αίμα μπορεί να φυλαχτεί στους -80°C επ' αόριστο.
- Γίνεται προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 40mL και μετά από ήπια ανακίνηση παραμένει στους 4°C (σε πάγο ή σε ψυκτικό θάλαμο) για 30 λεπτά.
- Φυγοκεντρείται στις 3600rpm, σε θερμοκρασία 4°C, για 15 λεπτά.
- Γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 30mL. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
- Φυγοκεντρείται εκ νέου στις 3600rpm, σε θερμοκρασία 4°C, για 15 λεπτά.
- Γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 20mL. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση.
- Φυγοκεντρείται εκ νέου στις 3600rpm, σε θερμοκρασία 4°C, για 15 λεπτά.
- Γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη διαλύματος 7mL διαλύματος LYSIS II. Ακολουθεί ανακίνηση έως ότου διαλυθεί το ίζημα και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Προστίθενται 400μL SDS 10% και 200μL πρωτεΐνης K και μένουν για επώαση σε θερμοκρασία ~50°C όλη τη νύχτα μέσα σε υδατόλουτρο υπό συνεχή ανακίνηση.

2^ο Στάδιο

- Προστίθενται 2mL NaCl και γίνεται ισχυρή ανακίνηση.
- Φυγοκεντρείται στις 3600rpm, σε θερμοκρασία 4°C, για 15 λεπτά.
- Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα των 10mL.
- Φυγοκεντρείται εκ νέου στις 8500rpm, σε θερμοκρασία 4°C, για 10 λεπτά.
- Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο σωλήνα των 50mL.
- Προστίθενται ο διπλάσιος όγκος, του υπερκείμενου, απόλυτης αιθανόλης.
- Ακολουθεί κατακρήμνιση και με γυάλινη πιπέτα Pasteur γίνεται η συλλογή του DNA.
- Πραγματοποιείται έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη.

- Το DNA μεταφέρετε για επαναδιάλυση σε Eppendorf (1mL) που εμπεριέχει 1mL TE (Tris EDTA)
- Γίνεται ανακίνηση του DNA σε περιστροφικό ανακινητή για 24 ώρες.

2.2.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLPA ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

2.2.2.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLPA

Η μέθοδος εξαρτώμενης από την αντίδραση της λιγάσης, πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών υβριδοποιημένων στο γονιδίωμα (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA®) είναι μια μέθοδος η οποία βασίζεται στην τεχνολογία PCR, που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση μικρών αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων έως και 50 διαφορετικών αλληλουχιών γονιδιωματικού DNA σε μία απλή αντίδραση. Χρησιμοποιώντας MLPA, μπορούν να διακριθούν αλληλουχίες που διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο [164]. Η μέθοδος αναπτύχθηκε από την MRC Holland και διατίθενται για περισσότερες από 300 διαφορετικές εφαρμογές. Για κάθε εφαρμογή, χρησιμοποιούνται τα ίδια αντιδραστήρια MLPA και οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης, μόνο οι ανιχνευτές MLPA διαφέρουν ανά εφαρμογή.

Η μέθοδος MLPA βασίζεται στο ότι δεν είναι το δείγμα DNA αυτό που ενισχύεται κατά την αντίδραση PCR, αλλά το ζεύγος των ανιχνευτών MLPA που υβριδοποιούνται με το δείγμα DNA. Κάθε ανιχνευτής MLPA αποτελείται από δύο ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτή, τα οποία πρέπει να υβριδοποιούνται δίπλα στο DNA στόχο για μια επιτυχημένη σύνδεση μεταξύ τους με αντίδραση λιγάσης. Μόνο οι συνδεδεμένοι ανιχνευτές μπορούν να ενισχυθούν εκθετικά με PCR. Στην αντίδραση MLPA PCR, χρησιμοποιείται ένα μόνο ζεύγος εκκινητών, εκ των οποίων μόνο ο εμπρόσθιος εκκινητής είναι σημασμένος με φθορισμό. Εφόσον η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται και σταματά όταν έχει καταναλωθεί η πλειονότητα των εκκινητών PCR [165].

Κάθε ανιχνευτής MLPA έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε το προϊόν ενίσχυσης του να έχει μοναδικό μήκος σε ένα μίγμα ανίχνευσης MLPA. Τα προϊόντα ενίσχυσης PCR αναμιγνύονται με δείκτες μοριακού βάρους και φορμαμίδιο, μετουσιώνονται με ένα σύντομο στάδιο θέρμανσης και στη συνέχεια διαχωρίζονται με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση [165]. Τέλος χρησιμοποιείται ειδικό λογισμικό για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Το SALSA MLPA Probemix P165 HSP mix-1 (MRC-Holland) είναι ένας ποσοτικός προσδιορισμός για την ανίχνευση ελλείψεων ή διπλασιασμού στα γονίδια *ATL1* και *SPAST*. Αυτή η ανάλυση προορίζεται για χρήση με γονιδιωματικό DNA που έχει απομονωθεί από δείγματα ανθρώπινου περιφερικού ολικού αίματος.

Το SALSA MLPA Probemix P165-C3 HSP mix-1 περιέχει 47 ανιχνευτές MLPA με προϊόντα ενίσχυσης μεταξύ 130 και 481 νουκλεοτιδίων (nt). Αυτό περιλαμβάνει 16 ανιχνευτές για το γονίδιο *ATL1* και 20 ανιχνευτές για το γονίδιο *SPAST*. Επιπλέον, περιλαμβάνονται 11 ανιχνευτές αναφοράς που ανιχνεύουν αυτοσωματικές χρωμοσωμικές θέσεις. Στο kit περιλαμβάνονται και 9 τμήματα DNA (control fragments), τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της μεθόδου.

Πίνακας 7: Το μέγεθος των 47 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P165-C3 HSP mix-1, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση.

Μέγεθος (nt)	SALSA MLPA Probe	Χρωμοσωμική θέση		
		Αναφορά	<i>ATL1</i>	<i>SPAST</i>
64-105	Control fragments			
130	Reference probe 00797-L00463	5q31		
137	<i>SPAST</i> probe 05952-L05396			Exon 13
142	<i>SPAST</i> probe 22526-L31678			Exon 1
149	Reference probe 10056-L10480	8q22		
154	<i>ATL1</i> probe 05277-L26403		Exon 2b	
161	<i>SPAST</i> probe 11061-L21076			Exon 2
167	<i>ATL1</i> probe 05279-L31680		Exon 3	
173	<i>SPAST</i> probe 07128-L06737			Exon 17
178	<i>ATL1</i> probe 05280-L04661		Exon 4	
184	<i>SPAST</i> probe 05949-L05391			Exon 3
190	Reference probe 16424-L18877	18q21		
196	<i>SPAST</i> probe 05268-L04651			Exon 4
202	<i>ATL1</i> probe 05281-L04662		Exon 5	
208	<i>SPAST</i> probe 05951-L05395			Exon 11
214	<i>SPAST</i> probe 22527-L31867			Exon 5
220	<i>ATL1</i> probe 05282-L04663		Exon 6	
228	Reference probe 08007-L07788	7q21		
235	<i>SPAST</i> probe 05265-L04648			Exon 1
241	<i>SPAST</i> probe 05658-L05111			Exon 17
247	<i>ATL1</i> probe 05283-L04664		Exon 7	

254	Reference probe 13128-L14348	9q34		
263	<i>ATL1</i> probe 17303-L20798		Exon 1	
269	<i>SPAST</i> probe 05270-L21080			Exon 7
276	<i>ATL1</i> probe 05284-L21081		Exon 8	
282	<i>ATL1</i> probe 20719-L28597		Exon 1	
290	Reference probe 02338-L21083	12q23		
296	<i>SPAST</i> probe 05271-L21084			Exon 8
302	<i>ATL1</i> probe 05285-L04666		Exon 9	
310	Reference probe 13275-L14608	1p21		
319	<i>SPAST</i> probe 05272-L04646			Exon 9
327	<i>ATL1</i> probe 05286-L04667		Exon 10	
337	Reference probe 07930-L07660	20p13		
346	<i>SPAST</i> probe 05273-L04655			Exon 10
355	<i>ATL1</i> probe 05287-L05110		Exon 11	
364	<i>SPAST</i> probe 05953-L05397			Exon 14
373	<i>ATL1</i> probe 05288-L04644		Exon 12	
382	<i>ATL1</i> probe 05278-L04645		Exon 2b	
391	Reference probe 04530-L03919	2q24		
400	<i>SPAST</i> probe 05274-L04656			Exon 12
409	<i>ATL1</i> probe 05289-L21085		Exon 13	
427	<i>SPAST</i> probe 05275-L04657			Exon 15
436	<i>ATL1</i> probe 05290-L21086		Exon 15	
445	<i>SPAST</i> probe 20720-L28598			Exon 16
454	Reference probe 03856-L03307	17q11		
463	<i>SPAST</i> probe 05950-L05394			Exon 6
472	<i>SPAST</i> probe 07279-L21088			Exon 1
481	Reference probe 03328-L02715	3q26		

(Product Description SALSA® MLPA® Probemix P165-C3 HSP mix-1 To be used with the MLPA General Protocol)

Το SALSA MLPA Probemix P211-B5 HSP περιέχει 39 ανιχνευτές MLPA με προϊόντα ενίσχυσης μεταξύ 128 και 462 νουκλεοτιδίων (nt). Αυτό περιλαμβάνει 13 ανιχνευτές για την περιοχή 2p22.3 και κάποια εξόνια του γονιδίου *SPAST* και 13 ανιχνευτές για την περιοχή 15q11.2 που συμπεριλαμβάνει τα γονίδια *NIPA1*, *NIPA2* που σχετίζονται με την HSP. Επειδή αρκετά συχνά οι CNV παραλλαγές στην περιοχή περιλαμβάνουν μεγαλύτερα τμήματα και όχι αποκλειστικά τα γονίδια που σχετίζονται με τη νόσο οι ανιχνευτές εκτείνονται στους γενετικούς τόπους που αναφέρθηκαν αναγνωρίζοντας τμήματα παράπλευρων γονιδίων. Επιπλέον, περιλαμβάνονται 11 ανιχνευτές αναφοράς που ανιχνεύουν αυτοσωματικές χρωμοσωμικές θέσεις. Στο kit περιλαμβάνονται και 9 τμήματα DNA (control fragments), τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της μεθόδου.

Πίνακας 8: Το μέγεθος των 39 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P211-B5 HSP, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση.

Μέγεθος (nt)	SALSA MLPA Probe	Χρωμοσωμική θέση		
		Αναφορά	2p22.3	15q11.2
64-105	Control fragments			
128	Reference probe 00797-L00093	5q31		
133	<i>HERC2P2 probe 09878-L22208</i>			Exon 23
139	<i>SPAST probe 05659-L22209</i>		Exon 1	
148	Reference probe 04445-L03831	4q13		
154	<i>GOLGA6L2 probe 09873-L10285</i>			Exon 7
166	<i>Reference probe 16058-L18232</i>	9p21		
173	<i>SPAST probe 07128-L06737</i>		Exon 17	
179	<i>WHAMML1 probe 09875-L12280</i>			Exon 2
184	<i>Reference probe 02312-L01803</i>	19p13		
190	<i>SPAST probe 08262-L08125</i>		Upstream	
196	<i>SPAST probe 08263-L08126</i>		Intron 1	
202	<i>NIPA2 probe 07123-L05171</i>			Exon 8
214	<i>NIPA2 probe 05767-L05718</i>			Exon 4
220	<i>Reference probe 02947-L02379</i>	7q31		
226	<i>SPAST probe 08264-L08127</i>		Intron 1	
235	<i>SPAST probe 05265-L04648</i>		Exon 1	
241	<i>SPAST probe 05658-L05111</i>		Exon 17	
256	<i>Reference probe 06007-L05432</i>	2q36		
265	<i>NIPA1 probe 07124-L05206</i>			Exon 5
274	<i>Reference probe 05360-L04739</i>	11p13		

292	Reference probe 08790-L11322	10q21		
299	SPAST probe 07127-L06736		Exon 1	
314	GOLGA6L2 probe 09874-L12277			Exon 8
320	DPY30 probe 07130-L12278		Exon 5	
328	Reference probe 16583-L18726	12q24		
337	SLC30A6 probe 07132-L06741		Exon 12	
346	TUBGCP5 probe 01321-L12279			Exon 8
355	DPY30 probe 07129-L06738		Exon 2	
364	Reference probe 10675-L11257	6p12		
382	CYFIP1 probe 01818-L01317			Exon 23
391	NIPA1 probe 07125-L05755			Exon 3
400	Reference probe 05343-L04730	1p21		
409	MAGEL2 probe 11155-L11839			Exon 1
418	NIPA2 probe 05117-L04501			Exon 10
428	HERC2P2 probe 09877-L11168			Exon 13
436	SPAST probe 08261-L22286		Upstream	
445	SPAST probe 20720-L28598		Exon 16	
454	Reference probe 01051-L00620	8q21		
462	Reference probe 18948-L01619	13q13		

(Product Description SALSA® MLPA® Probemix P211-B5 HSP. To be used with the MLPA General Protocol)

Το SALSA MLPA Probemix P213-B3 HSP mix-2 περιέχει 42 ανιχνευτές MLPA με προϊόντα ενίσχυσης μεταξύ 128 και 436 νουκλεοτιδίων (nt). Αυτό περιλαμβάνει 10 ανιχνευτές για το γονίδιο *REEP1* και 21 ανιχνευτές για το γονίδιο *SPG7*. Επιπλέον, περιλαμβάνονται 11 ανιχνευτές αναφοράς που ανιχνεύουν αυτοσωματικές χρωμοσωμικές θέσεις. Στο kit περιλαμβάνονται και 9 τμήματα DNA (control fragments), τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της μεθόδου.

Πίνακας 9: Το μέγεθος των 42 ανιχνευτών του kit SALSA MLPA Probemix P213-B3 HSP mix-2, ο τύπος των ανιχνευτών και η χρωμοσωμική τους θέση.

Μέγεθος (nt)	SALSA MLPA Probe	Χρωμοσωμική θέση		
		Αναφορά	REEP1	SPG7
64-105	Control fragments			
128	Reference probe 00797-L00093	5q31		
133	Reference probe 16316-L20697	3q21		
142	REEP1 probe 07248-L06819		Exon 3	

148	SPG7 probe 07265-L06836			Exon 8
154	Reference probe 04531-L05030	2q24		
160	SPG7 probe 17745-L21891			Exon 2
166	SPG7 probe 07268-L06839			Exon 11
172	REEP1 probe 20988-L29219		Exon 5	
177	SPG7 probe 17746-L21892			Intron 9
184	Reference probe 19450-L25864	14q31		
190	SPG7 probe 07262-L21916			Exon 5
196	SPG7 probe 07271-L21917			Exon 14
202	REEP1 probe 07246-L06817		Exon 2	
208	SPG7 probe 07263-L06834			Exon 6
214	SPG7 probe 07257-L21923			Exon 1
220	REEP1 probe 07253-L08404		Exon 7	
226	SPG7 probe 07274-L08405			Exon 17
232	SPG7 probe 07266-L06837			Exon 9
238	REEP1 probe 17747-L21893		Exon 1	
245	SPG7 probe 07261-L08406			Exon 4
253	Reference probe 06236-L01311	21q11		
260	REEP1 probe 07254-L08407		Exon 8	
268	SPG7 probe 07256-L08408			Upstream
276	SPG7 probe 17902-L22475			Exon 13
283	SPG7 probe 17749-L21895			Exon 3
292	Reference probe 08936-L09031	11p15		
298	SPG7 probe 21471-L21918			Exon 7
310	REEP1 probe 07249-L21919		Exon 3	
319	SPG7 probe 07272-L06843			Exon 15
328	REEP1 probe 07252-L06823		Exon 6	
337	SPG7 probe 07267-L06838			Exon 10
346	Reference probe 04835-L04219	5p13		
355	Reference probe 05991-L05416	20p12		
363	SPG7 probe 07273-L21920			Exon 16
373	Reference probe 10693-L11275	6p12		
382	REEP1 probe 07245-L21921		Exon 1	
391	SPG7 probe 17750-L21896			Intron 9
400	REEP1 probe 07250-L06821		Exon 4	
408	SPG7 probe 17751-L21897			Exon 12

417	Reference probe 18456-L23632	7q31		
427	SPG7 probe 07258-L06829			Exon 1
436	Reference probe 04279-L23590	12q12		

(Product Description SALSA® MLPA® Probemix P213-B3 HSP mix-2. To be used with the MLPA General Protocol)

Συνολικά επομένως χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά kit MLPA. Τα δύο εξ αυτών αφορούν γονίδια που κληρονομούνται με επικρατή τρόπο (P165-C3 & P211-B5) και με αυτά τα kit ελέγχθηκαν οι ασθενείς οι οποίοι είχαν οικογενειακό ιστορικό που παρέπεμπε σε επικρατή κληρονόμηση ή ήταν σποραδικά περιστατικά για την περίπτωση de novo μεταλλάξης. Το ένα kit (P213-B3) αφορά υπολειπόμενα γονίδια. Με το kit αυτό ελέγχθηκαν οι ασθενείς που είχαν οικογενειακό ιστορικό που παρέπεμπε σε υπολειπόμενη κληρονομικότητα καθώς και τα σποραδικά περιστατικά.

2.2.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MLPA

Αποδιάταξη γενωμικού DNA

- Έπειτα από την απομόνωση του γενωμικού DNA, χρησιμοποιείται ποσότητα 80ng DNA (0.5-1μL DNA ανάλογα με τη συγκέντρωση του) το οποίο διαλυτοποιείται σε TE (10mM Tris-HCl, pH 8.2 + 0,1mM EDTA) με τελικό όγκο τα 5μL.
- Το πιάτο της PCR τοποθετείται στη συσκευή του θερμικού κυκλοποιητή ώστε να γίνει αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία 98°C για 5 λεπτά.

Αντίδραση Υβριδισμού

Προετοιμασία διαλύματος υβριδισμού:

- Για την προετοιμασία του διαλύματος υβριδισμού απαιτείται 1,5μL MLPA Buffer και 1,5μL probemix για κάθε αντίδραση.
- Σε θερμοκρασία 25°C προστίθενται 3μL διαλύματος υβριδισμού σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας.
- Ο υβριδισμός πραγματοποιείται για 16-20 ώρες σε θερμοκρασία 60°C.

Αντίδραση λυγάσης

Προετοιμασία διαλύματος λυγάσης:

- Για την προετοιμασία του διαλύματος λιγάσης προστίθεται 25μL dH₂O + 3μL Ligase buffer A + 3μL Ligase buffer B + 1μL Ligase-65 enzyme για κάθε αντίδραση, και γίνεται ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας.
- Σε θερμοκρασία 54°C προστίθενται η ποσότητα 32μL διαλύματος λιγάσης σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας. Έπειτα από το πέρας της αντίδρασης, το πρόγραμμα σταματάει και παραμένει σε θερμοκρασία 20°C.

Ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών με PCR

Προετοιμασία διαλύματος πολυμεράσης:

- Για την προετοιμασία του διαλύματος πολυμεράσης προστίθενται 7,5μL dH₂O + 2μL SALSA PCR primer mix + 0,5μL SALSA Polymerase για κάθε αντίδραση και γίνεται ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας.
- Σε θερμοκρασία 20°C προστίθενται ποσότητα 10μL διαλύματος πολυμεράσης σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη με τη χρήση πιπέτας.
- Ακολουθεί η PCR που περιλαμβάνει 35 κύκλους από:
 - ☐ 30sec σε θερμοκρασία 95°C → Αποδιάταξη
 - ☐ 30sec σε θερμοκρασία 60°C → Πρόσδεση
 - ☐ 60sec σε θερμοκρασία 72°C → Επimήκυνση
- Τέλος παραμένει για 20min σε θερμοκρασία 72°C και έπειτα παραμένει σε θερμοκρασία 15°C.

Τα προϊόντα ενίσχυσης μπορούν να

- ✓ αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 4°C για πάνω από μία εβδομάδα
- ✓ αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -25°C -15°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, σε σκούρο κουτί ή σε σκιερό μέρος διότι οι φθορίζουσες χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες.

Το πρόγραμμα της PCR για την αντίδραση MLPA παρουσιάζεται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 10: Πρόγραμμα για την αντίδραση MLPA.

Αποδιάταξη γενωμικού DNA	
98°C	5min
25°C	Παύση
Αντίδραση Υβριδισμού	
95°C	1min
60°C	Παύση
Αντίδραση Λιγάσης	
54°C	Παύση
54°C	15min
98°C	5min
20°C	Παύση
Ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών με PCR	
35 κύκλοι	30sec στους 95°C → Αποδιάταξη 30sec στους 60°C → Πρόσδεση 60sec στους 72°C → Επιμήκυνση
72°C	20min
15°C	Παύση

Χρήση του γενετικού αναλυτή για το διαχωρισμό των προϊόντων PCR

Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό βιολογικών μορίων με βάση την κίνησή τους λόγω της επίδρασης ενός συνεχούς ηλεκτρικού πεδίου. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό θραυσμάτων DNA (ή άλλων μακρομορίων, όπως το RNA και τις πρωτεΐνες) με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει τη διέλευση ενός ρεύματος μέσω ενός πηκτώματος (gel) που περιέχει τα μόρια ενδιαφέροντος. Με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους, τα μόρια μετακινούνται μέσα από το πηκτωμα σε διαφορετικές κατευθύνσεις ή με διαφορετικές ταχύτητες, επιτρέποντάς τους να διαχωριστούν το ένα από το άλλο.

Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, είναι μια τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης υψηλής απόδοσης. Έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως υψηλή ανάλυση και ευαισθησία, καλή επαναληψιμότητα, μικρό όγκο δείγματος, είναι αποτελεσματική και γρήγορη διαδικασία και υπάρχει η δυνατότητα πραγματοποίησης πλήρους αυτοματισμού. Έτσι, εφαρμόστηκε ευρέως τα τελευταία χρόνια στον τομέα της ιατρικής και της βιολογίας, ιδιαίτερα στον διαχωρισμό και την ανάλυση περίπλοκων βιολογικών μειγμάτων [166-168]. Με την χρήση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται διαχωρισμός των προϊόντων της MLPA.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης μεταφέρονται σε Plate MicroAmp optical 96-well plate 0,7μL προϊόντος μαζί με 0,3 μL ROX500 marker και 9 μL formamide.

Χρήση ειδικού λογισμικού ανάλυσης αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης MLPA Coffalyser.Net™ που αναπτύχθηκε και διατίθεται από την MRC Holland για την επεξεργασία των δεδομένων. Είναι ένα προηγμένο σύστημα ποιοτικών ελέγχων σχεδιασμένο ειδικά για το MLPA, το οποίο βοηθά στην αξιολόγηση της ποιότητας του διαχωρισμού των θραυσμάτων και της αντίδρασης MLPA και την αναπαραγωγιμότητα των δειγμάτων αναφοράς.

Με τη χρήση του λογισμικού Coffalyser.Net™ γίνεται η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR που έχουν διαχωριστεί πρωτύτερα με ηλεκτροφόρηση.

Ο υπολογισμός του σήματος για κάθε ανιχνευτή προκύπτει από την διαίρεση του εμβαδού της καμπύλης που καταγράφεται για το προϊόν του κάθε ανιχνευτή προς το σύνολο των εμβαδών των καμπυλών που καταγράφονται για τα προϊόντα της PCR για όλους τους ανιχνευτές του δείγματος. Εκφράζεται ως πολλαπλάσιο του σήματος του ίδιου ανιχνευτή σε ένα φυσιολογικό δείγμα ελέγχου.

Αναμενόμενες τιμές:

- ✓ Σε φυσιολογικό δείγμα 0.7-1.3
- ✓ Σε ετερόζυγη έλλειψη 0.3-0.7

- ✓ Σε ομόζυγη έλλειψη 0.1-0.3
- ✓ Σε διπλασιασμό >1.3

Είναι απαραίτητο να σημειωθεί πως για την σωστή διεξαγωγή του πειράματος και την αποφυγή σφαλμάτων, τα δείγματα DNA θα πρέπει να υφίστανται παρόμοιες συνθήκες μεταχείρισης και αποθήκευσης, το γενωμικό DNA να έχει απομονωθεί χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και τα δείγματα να έχουν όσο το δυνατόν παρόμοιες συγκεντρώσεις. Τέλος είναι πολύ σημαντικό να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην πειραματική διαδικασία έτσι ώστε να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις.

2.2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Με την χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS (SPSS v17.0) πραγματοποιήθηκε η σύγκριση του αριθμού των γενετικά διαγνωσμένων ασθενών με HSP της κοορτής μας με το ποσοστό που παρουσιάζεται σε αντίστοιχες μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία. Η σύγκριση έγινε με τη δοκιμασία χ^2 , μέσω του υπολογισμού του p-value. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως το 0,05.

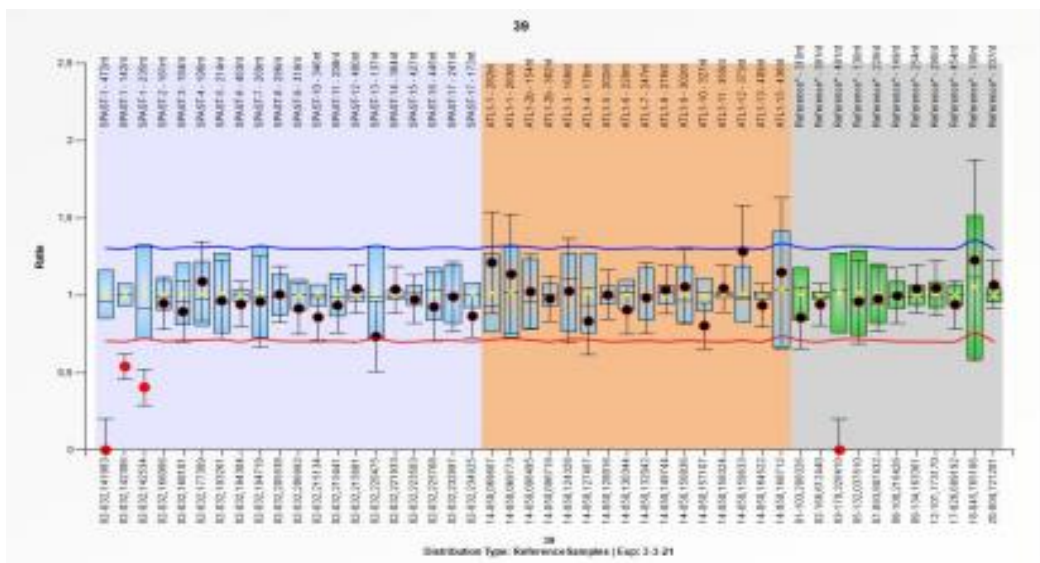
ΚΕΦ. 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται 26 ασθενείς δείκτες εκ των οποίων οι 15 ήταν άντρες και οι 11 γυναίκες. Οι 12 ασθενείς (46,1%) παρουσίαζαν την αυτοσωμική επικρατή μορφή κληρονομικότητας, 5 ασθενείς (19,23%) παρουσίαζαν την αυτοσωμική υπολειπόμενη μορφή κληρονομικότητας και οι υπόλοιποι 9 (34,61%) ήταν σποραδικά περιστατικά. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 43,68 έτη και ο μέσος όρος ηλικίας έναρξης των συμπτωμάτων τους ήταν τα 31 έτη. Το κύριο σύμπτωμα έναρξης ήταν η δυσχέρεια βάδισης.

Οι ασθενείς ελέγχθηκαν για την ανίχνευση ελλείψεων ή διπλασιασμού στα γονίδια *ATL1*, *SPAST*, *REEP1*, *SPG7*, *NIPA1* και *NIPA2*. Από το σύνολο των 26 ασθενών, 3 βρέθηκαν θετικοί (11,53%) εκ των οποίων οι δύο βρέθηκαν με έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST* και ένας με έλλειψη του εξονίου 5 στο γονίδιο *SPAST*, ενώ στη συνέχεια η μητέρα του ενός εκ των δύο θετικών για την έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST* βρέθηκε επίσης θετική στην ίδια έλλειψη.

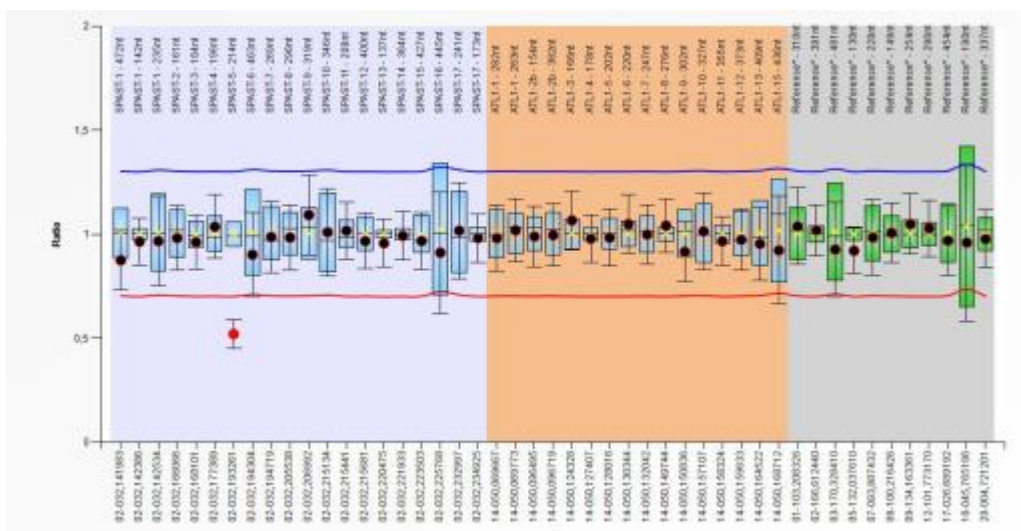
Παρακάτω ακολουθούν οι περιγραφές των ασθενών οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί στον έλεγχο, καθώς και ένας πίνακας με την συνοπτική περιγραφή τους (Πίνακας 8).

Ο πρώτος ασθενής (A1) ήταν μια γυναίκα η οποία βρέθηκε θετική σε έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST*. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της ήταν τα 63 έτη, παρουσιάζοντας αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή χωρίς αισθητικές διαταραχές, χωρίς σημειολογία από το εξωπυραμιδικό σύστημα και την παρεγκεφαλίδα, με φυσιολογικό ηλεκτρονευρογράφημα και ηλεκτρομυογράφημα και φυσιολογική μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού (Magnetic Resonance Imaging, MRI).



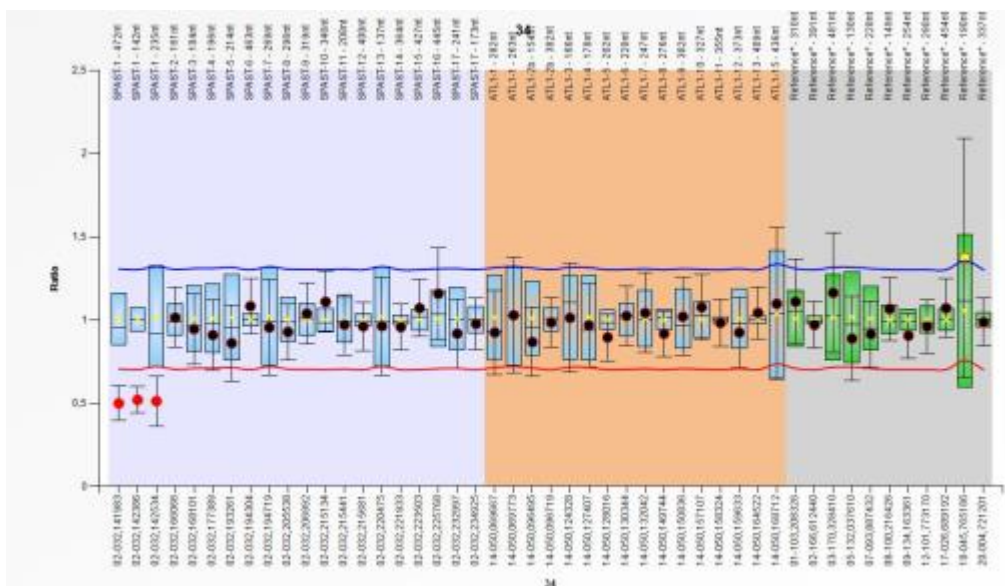
ΕΙΚΟΝΑ 3. MLPA 1^{ΟΥ} ΑΣΘΕΝΗ

Ο δεύτερος ασθενής (A2) ήταν επίσης γυναίκα η οποία βρέθηκε θετική σε έλλειψη του εξονίου 5 στο γονίδιο *SPAST*. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της ήταν τα 38 έτη, παρουσιάζοντας δυσχέρεια βάδισης και σπαστική βάδιση, αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή, σπαστικότητα κάτω άκρων, επιτακτική ούρηση, σημείο Babinski άμφω και στην MRI εγκεφάλου παρουσίαζε δύο άτυπες μικρές μη-ειδικές αλλοιώσεις ακτινωτού στεφάνου.



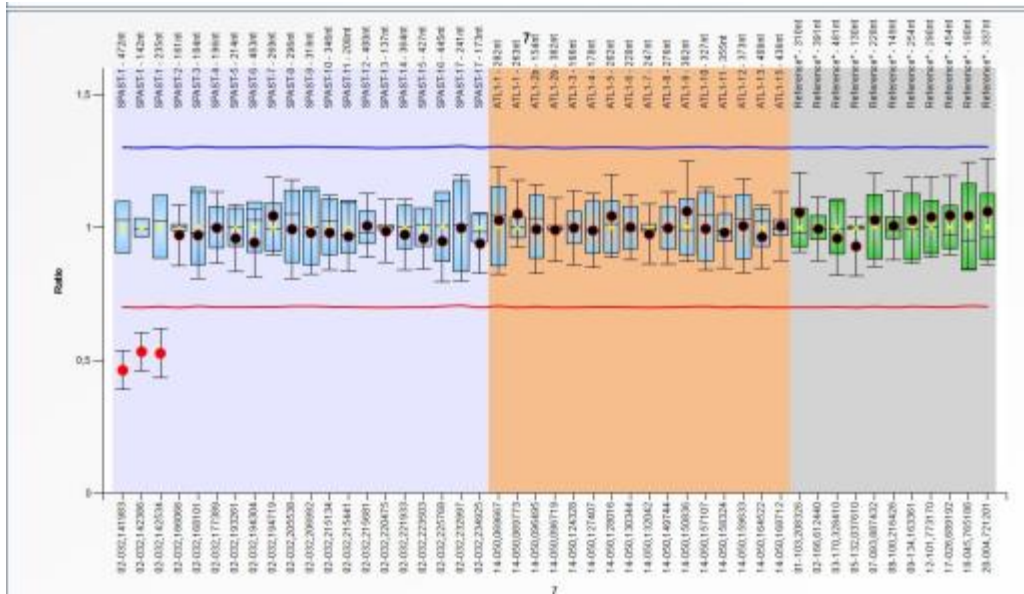
ΕΙΚΟΝΑ 4. MLPA 2^{ΟΥ} ΑΣΘΕΝΗ

Ο τρίτος ασθενής (A3) ήταν άνδρας ο οποίος βρέθηκε θετικός σε έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST*. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων του ήταν τα 36 έτη, παρουσιάζοντας δυσχέρεια βάδισης και σπαστική βάδιση, αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή, σπαστικότητα κάτω άκρων, σημείο Babinski άμφω και πάρεση κάτω άκρων.



EΙΚΟΝΑ 5. MLPA 3^οΥ ΑΣΘΕΝΗ

Ο τέταρτος ασθενής (A4) ήταν γυναίκα συγγενής του 3^{ου} ασθενή (μητέρα) η οποία βρέθηκε θετική σε έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST*. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της ήταν τα 37 έτη, παρουσιάζοντας δυσχέρεια βάδισης, αμφοτερόπλευρη πυραμιδική συνδρομή, με σπαστικότητα κάτω άκρων και σημείο Babinski, και διαταραχές αισθητικότητας κάτω άκρων .

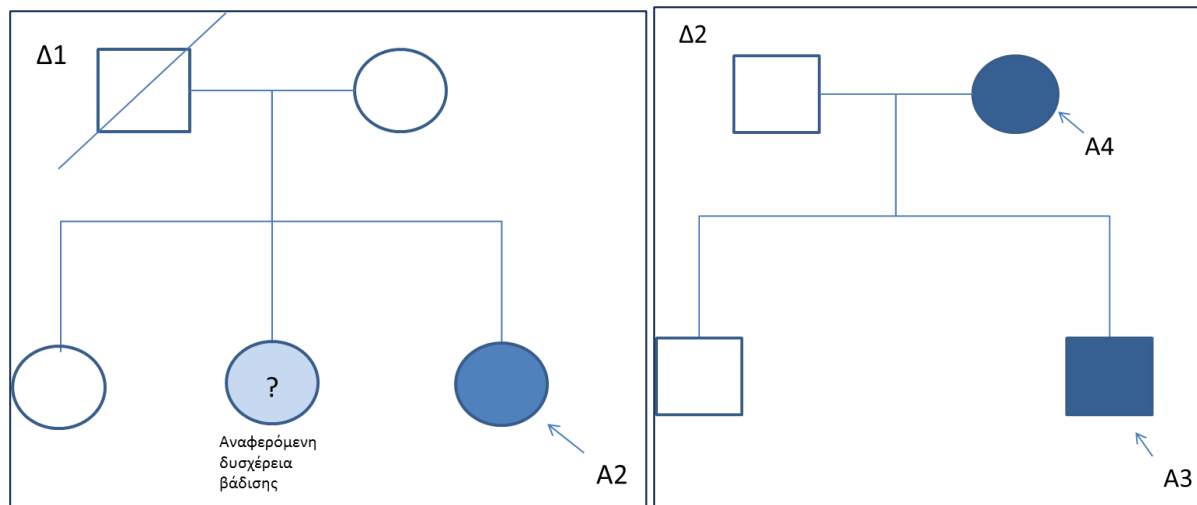


ΕΙΚΟΝΑ 6. MLPA 4^{ΟΥ} ΑΣΘΕΝΗ

Πίνακας 11: Συνοπτική περιγραφή των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί.

	Φύλο ασθενούς	Γονίδιο	Έλλειψη	Ηλικία	Ηλικία έναρξης	Κύριο Σύμπτωμα
A1	Γυναίκα	SPAST	Exon 1	73	63	Δυσχέρεια βάδισης
A2	Γυναίκα	SPAST	Exon 5	45	38	Δυσχέρεια βάδισης
A3	Άνδρας	SPAST	Exon 1	43	36	Δυσχέρεια βάδισης
A4	Γυναίκα	SPAST	Exon 1	72	37	Δυσχέρεια βάδισης
					43,5	

Εικόνα 7: Γενεαλογικά δένδρα των ασθενών Α2 (Δ1) και Α3-Α4 (Δ2). Για τον ασθενή Α1 το οικογενειακό ιστορικό αναφέρεται ελεύθερο, δεν κατέστη δυνατό να εντοπίσουμε επιπλέον πληροφορίες.



ΚΕΦ. 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο όρος HSP περιγράφει μια κλινικά και γενετικά ετερογενή ομάδα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Ο παθογενετικός μηχανισμός και τα κλινικά χαρακτηριστικά ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με το προσβεβλημένο γονίδιο. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την κλινικογενετική επικάλυψη των HSP με άλλες ασθένειες του νευρικού συστήματος δυσχεραίνει τη γενετική διάγνωση. Η HSP αποτελεί ένα παγκόσμιο φαινόμενο με επιπολασμό 0,1–9,6 περιπτώσεων σε κάθε 100.000 άτομα σε όλο τον κόσμο [169].

Η παρούσα γενετική μελέτη είχε σκοπό να ολοκληρώσει την περιγραφή της γενετικής εικόνας των HSP στους Έλληνες ασθενείς. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε γενετική διερεύνηση για τη εύρεση ελλείψεων και διπλασιασμών σε υπεύθυνα για HSP γονίδια και για τον υπολογισμό της συχνότητας τους σε κοόρτη Ελλήνων ασθενών με HSP. Για τη εύρεση των ελλείψεων και των διπλασιασμών εφαρμόστηκε η μεθοδολογία MLPA στα γονίδια *SPAST*, *ATL1*, *SPG7*, *REEP1*, *NIPA1* και *NIPA2* σε δείγματα HSP ασθενών αρνητικών για σημειακή μεταλλαγή με ανάλυση NGS που προηγήθηκε.

Η μελέτη περιλάμβανε 26 ασθενείς (15 άντρες και 11 γυναίκες), με μέσο όρο ηλικίας τα 43,68 έτη και ο μέσος όρος ηλικίας έναρξης των συμπτωμάτων τους ήταν τα 31 έτη. Το κύριο σύμπτωμα έναρξης ήταν η δυσχέρεια βάδισης. Οι ασθενείς ελέγχθηκαν για την ανίχνευση ελλείψεων ή διπλασιασμού στα προαναφερθέντα γονίδια. Από τους 26 ασθενείς, 3 βρέθηκαν θετικοί για έλλειψη ή διπλασιασμό στα γονίδια αυτά διαμορφώνοντας την συχνότητα των μεταλλαγών αυτών στην κοόρτη στο 11,53%. Από τους θετικούς ασθενείς οι δύο διαγνώστηκαν με έλλειψη του εξονίου 1 και ένας με έλλειψη του εξονίου 5 στο γονίδιο *SPAST*, ενώ η μητέρα του ενός εκ των δύο θετικών για έλλειψη του εξονίου 1 στο γονίδιο *SPAST* βρέθηκε επίσης θετική στην ίδια έλλειψη.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται μελέτες από άλλους πληθυσμούς, ώστε να συγκριθεί η συχνότητα CNVs σε Έλληνες ασθενείς με HSP σε σχέση με άλλες χώρες παγκοσμίως. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11) παρουσιάζονται τα στοιχεία όλων των μελετών συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας. Οι μελέτες που επιλέχθηκαν αφορούσαν μεταλλαγές στα γονίδια *SPAST*, *ATL1* και *REEP1* έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμες .

Πίνακας 12: Συγκριτικές μελέτες της συχνότητας της HSP για CNVs στα γονίδια *SPAST*, *ATL1* και *REEP1*.

Μελέτες	Προέλευση πληθυσμού	Κοορτή	Θετικοί για ελλείψεις	Θετικοί για διπλασιασμούς	Ποσοστά διεγνωσμένων	p-value
Álvarez V. et al., 2010 [170]	Ισπανία	78 Ασθενείς	2 Ελλείψεις <i>SPAST</i>	-	2,56%	0,06395
Ishiura H. et al., 2014 [82]	Ιαπωνία	54 Ασθενείς	1 Έλλειψη <i>REEP1</i> 4 Ελλείψεις <i>SPAST</i>	1 Διπλασιασμός <i>SPAST</i>	11,11%	0,75027
Wei Q.Q. et al., 2014 [171]	Κίνα	35 Ασθενείς	4 Ελλείψεις <i>SPAST</i>	-	11,43%	0,98937
Kadnikova V.A. et al., 2019 [172]	Ρωσία	93 Ασθενείς	7 Ελλείψεις <i>SPAST</i>	1 Διπλασιασμός <i>SPAST</i>	8,6%	0,64768
Παρούσα μελέτη	Ελλάδα	26 Ασθενείς	3 Ελλείψεις <i>SPAST</i>	-	11,53%	-

Το ποσοστό εμφάνισης ελλείψεων ή διπλασιασμών στα συγκεκριμένα γονίδια της HSP ήταν 11,53% (3/26) για την ομάδα των ασθενών που μελετήθηκε με το σύνολο των CNVs να εντοπίζονται αποκλειστικά στο γονίδιο *SPAST*.

Τα αποτελέσματά μας μπορούν να συγκριθούν στατιστικά με τις μελέτες που παρουσιάζονται στον πίνακα καθώς έχει προηγηθεί έλεγχος των ασθενών με NGS ή Sanger sequencing τουλάχιστον για τα συχνότερα γονίδια της HSP. Το ποσοστό των θετικών για CNVs ασθενών της μελέτης μας δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις μελέτες που παρουσιάζονται στον πίνακα. [173].

Θα πρέπει να σχολιάσουμε επίσης το γεγονός του ότι στην μελέτη μας εντοπίσαμε τελικά CNVs μόνο στο γονίδιο *SPAST*, γεγονός που συνάδει με το σύνολο των μελετών όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 11, όπου μία μόνο παραλλαγή εντοπίζεται εκτός του γονιδίου *SPAST* και αφορά στο γονίδιο *REEP1*. Το γονίδιο *SPAST* είναι όπως προαναφέρθηκε υπεύθυνο για >60% των επικρατητικών HSP ενώ παρουσιάζει και υψηλό ποσοστό CNV.

Κάνοντας μια ιστορική ανασκόπηση, πρώτοι οι Hazan et al. (1999) [75] εντόπισαν 14 οικογένειες με HSP που εμφάνιζαν ετερόζυγες μεταλλάξεις στη *SPAST*. Ακολούθως, οι Fonknechten et al. (2000) [16] ανέλυσαν DNA από 87 ασθενείς με αυτοσωματική επικρατούσα κληρονομική σπαστική παραπληγία και ανίχνευσαν 34 νέες μεταλλάξεις διάσπαρτες κατά μήκος της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου *SPAST* εκ των οποίων οι 69,5% σημειακές και 30,5% CNV.

Το 2001 οι Svenson et al. [174] δήλωσαν ότι η SPG4 είναι η πιο κοινή μορφή αυτοσωματικής επικρατούσας κληρονομικής παραπληγίας.

Σε 24 (20%) από 121 probands με αυτοσωμική επικρατή SPG στους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPAST*, οι Depienne et al. (2007) [175] αναγνώρισαν 16 διαφορετικές ελλείψεις εξονίων χρησιμοποιώντας MLPA. Οι ελλείψεις κυμαίνονταν σε μέγεθος από 1 εξόνιο έως ολόκληρη την κωδικοποιούσα αλληλουχία. Οι ασθενείς με ελλείψεις εμφάνισαν παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με εκείνους με σημειακές μεταλλάξεις αλλά μικρότερη ηλικία έναρξης. Τα ευρήματα επιβεβαίωσαν ότι η απλοανεπάρκεια του *SPAST* είναι μια κύρια αιτία της SPG4. Στα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμφώνησαν και οι Beetz et al. (2007) [176].

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη συνεισφέρει στο να καταλήξουμε ότι το 56,8% των Ελλήνων ασθενών με HSP της κοόρτης μας οφείλει την κλινική του εικόνα σε σημειακές μεταλλάξεις ενώ το 2,9% σε CNVs. Επιπροσθέτως το 11,53% των ασθενών, που ελέγχθηκαν και είναι αρνητικοί για σημειακή μεταλλαγή σε γνωστά γονίδια σχετιζόμενα με HSP, νοσεί ως αποτέλεσμα CNVs. Συνολικά, οι σημειακές μεταλλάξεις αφορούν την πλειοψηφία των περιστατικών HSP αλλά οι CNVs αφορούν ένα επίσης σημαντικό ποσοστό ασθενών. Επομένως, τον έλεγχο για σημειακές μεταλλάξεις θα πρέπει να ακολουθεί έλεγχος για CNVs, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για κληρονομική νόσο.

Η ανίχνευση CNVs φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση της γενετικής διερεύνησης της HSP δίδοντας τη δυνατότητα για γενετική συμβουλή και προσυμπτωματικό έλεγχο της νόσου σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών.

Στους περιορισμούς της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να αναφερθεί ότι οι ασθενείς μας ελέγχθηκαν για CNV στα γονίδια που εμφανίζουν συχνότερα τέτοιου τύπου παραλλαγές και υπάρχει διαθέσιμο εμπορικό Kit MLPA. Τέτοιου τύπου παραλλαγές όμως θα μπορούσαν πιθανά να υπάρχουν σε μεγαλύτερο αριθμό εμπλεκόμενων γονιδίων στην HSP. Επίσης, η μέθοδος της MLPA παρουσιάζει εγγενώς τον περιορισμό της δυνατότητας ελέγχου στις περιοχές που καλύπτονται από ανιχνευτές και έτσι CNV μικρότερου μεγέθους από την διακριτική ικανότητα της μεθόδου ή εκτός του εύρους που έχει σχεδιαστεί δεν μπορούν να εντοπιστούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Noreau, A., Dion, P. A., and Rouleau, G. A., *Molecular Aspects of Hereditary Spastic Paraplegia*. Exp. Cel Res., 2014. **325**: p. 18–26.
2. Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C. and Coutinho, P., *The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies*. Neuroepidemiology, 2014. **42**(3): p. 174–83.
3. Strümpell, A., *Beitrag zur Pathologie des Rückenmarks*. Arch Psychiatr Nervenkr., 1880. **10**(3): p. 676–717.
4. Kolle, K., *Adolf Strümpell (1853–1925)*. Große Nervenkrankheiten, 1963. **3**: p. 184–190.
5. Strümpell, A., *Ueber hereditäre spastische Spinalparalyse*. Arch Psychiat Nervenkrankh, 1901. **24**: p. 1044.
6. Strümpell, A., *Ueber eine bestimmte Form der primären combinirten Systemerkrankung des Rückenmarks im Anschluss an einen Fall von spastischer Spinalparalyse mit vorherrschender Degeneration der Pyramidenbahnen und geringerer Betheiligung der Kleinhirn- Seitenstrangbahnen und der Goll'schen Strange*. Arch Psychiat Nervenkrankh, 1886. **17**: p. 217–238.
7. *Physikalisch- medicinische Societat Erlangen (1886) Sitzung vom 15*. Munch Med Wschrft, 1886. **7**: p. 901–902.
8. Engmann, B., Wagner, A., & Steinberg, H., *Adolf von Strümpell: a key yet neglected protagonist of neurology*. Journal of Neurology, 2012. **259**(10): p. 2211–2220.
9. Elsayed, L.E.O., Ahmed, A. E. M. and Stevanin, G., *"Neurogenetic Disorders in Africa: Hereditary Spastic Paraplegia: A Case Study," in The Genetics of African Populations in Health and Disease Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology*. Cambridge University Press, 2019a: p. 311–319.
10. Hedera, P., *Hereditary Spastic Paraplegia Overview. Synonyms: Hereditary Spastic Paraparesis, Strumpell-Lorrain Syndrome*, in *GeneReviews® [Internet]*, A.H. Adam MP, Pagon RA, et al., Editor. 2000 Aug 15 [Updated 2021 Feb 11]: Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
11. Klebe, S., Stevanin, G. and Depienne, C., *Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting*. Rev Neurol (Paris), 2015. **171**: p. 505–30.
12. Finsterer, J., Löscher, W., Quasthoff, S., Wanschitz, J., Auer-Grumbach, M. and Stevanin, G., *Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance*. J Neurol Sci, 2012. **318**: p. 1–18.
13. Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A. and Warner, T.T., *Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms*. Lancet Neurol. , 2008. **7**: p. 1127–38.
14. Fink, J.K., *Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms*. Acta Neuropathol, 2013. **126**: p. 307–28.
15. Harding, A.E., *Classification of the hereditary ataxias and paraplegias*. Lancet, 1983. **1**: p. 1151–5.
16. Breza, M., et al., *Expanding the Spectrum of AP5Z1-Related Hereditary Spastic Paraplegia (HSP-SPG48): A Multicenter Study on a Rare Disease*. Mov Disord, 2021. **36**(4): p. 1034–1038.
17. Πάνας, Μ., *Στοιχεία Νευρογενετικής η κλινική πρακτική*. 2017: Εκδόσεις Πασχαλίδης.
18. Lo Giudice, T., et al., *Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms*. Exp Neurol, 2014. **261**: p. 518–39.
19. Ferreira, F., et al., *Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 231–42.

20. de Souza, P.V.S., de Rezende, Pinto, W.B.V., de Rezende, Batistella, G.N., Bortholin, T. and Oliveira, A.S.B., *Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical and Genetic Hallmarks. The Cerebellum*. 2017. **16**(2): p. 525-551.
21. Tesson C, K.J., Stevanin G. Delving into the complexity of hereditary spastic paraplegias: how unexpected phenotypes and inheritance modes are revolutionizing their nosology. *Hum Genet.*, 2015. **134**(6): p. 511-538.
22. Solowska, J.M.a.B., P.W., *Hereditary spastic paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease*. *Brain*, 2015. **138**: p. 2471–84.
23. Balicza, P., Grosz, Z., Gonzalez, M.A., et al., *Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands*. *J Neurol Sci*, 2016. **364**: p. 116–21.
24. Proukakis, C., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., et al., *Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene*. *Hum Mutat*, 2003. **21**: p. 70.
25. Schule, R., Wiethoff, S., Martus, P., et al., *Hereditary spastic paraplegia: clinicogenetic lessons from 608 patients*. *Ann Neurol*, 2016. **79**: p. 646–58.
26. Loureiro, J.L., Brandao, E., Ruano, L., et al. , *Autosomal dominant spastic paraplegias: a review of 89 families resulting from a portuguese survey*. *JAMA Neurol*, 2013. **70**: p. 481–87.
27. Koh, K., Ishiura, H., Tsuji, S. and Takiyama, Y., *JASPAC: Japan Spastic Paraplegia Research Consortium*. *Brain Sci*, 2018. **8**: p. 153.
28. Zuchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K.N., et al., *Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31*. . *Am J Hum Genet*, 2006. **79**: p. 365–69.
29. Goizet, C., Depienne, C., Benard, G., et al. , *REEP1 mutations in SPG31: frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction*. *Hum Mutat*, 2011. **32**: p. 1118–27.
30. Beetz, C., Schule, R., Deconinck, T., et al. , *REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31*. *Brain*, 2008. **131**: p. 1078–86.
31. Ito, D., *BSCL2-Related Neurologic Disorders/Seipinopathy*, in *GeneReviews*(®), M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle

Copyright © 1993-2022, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).

32. Uhlenberg, B., et al., *Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(2): p. 251-60.
33. Orlacchio, A., et al., *Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: A locus to 4p and allelism with SPG4*. *Neurology*, 2008. **70**(21): p. 1959-66.
34. Crow, Y.J., Zaki, M.S., Abdel-Hamid, M.S., Abdel-Salam, G., Boespflug-Tanguy, O., Cordeiro, N.J., Gleeson, J.G., Gowrinathan, N.R., Laugel, V., Renaldo, F., Rodriguez, D., Livingston, J.H. and Rice, G.I., *Mutations in ADAR1, IFIH1, and RNASEH2B presenting as spastic paraplegia*. *Neuropediatrics*, 2014. **45**: p. 386–93.
35. Coutelier, M., Goizet, C., Durr, A., Habarou, F., et al., *Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia*. *Brain.*, 2015. **138**: p. 2191–205.
36. Cooper, H.M., Yang, Y., Ylikallio, E., Khairullin, R., Woldegebriel, R., Lin, K.L., Euro, L., Palin, E., Wolf, A., Trokovic, R., Isohanni, P., Kaakkola, S., Auranen, M., Lönnqvist, T., Wanrooij, S. and Tynnismaa, H. , *ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia*. *Hum Mol Genet.*, 2017. **26**: p. 1432–43.
37. Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C.H., Tukul, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L., Bui, M. and Fink, J.K., *Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia*. *Nat Genet.*, 2001. **29**: p. 326–31.

38. Namekawa, M., Ribai, P., Nelson, I., Forlani, S., Fellmann, F., Goizet, C., Depienne, C., Stevanin, G., Ruberg, M., Dürr, A. and Brice, A. , *SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years*. Neurology., 2006. **66**: p. 112–14.
39. Rainier, S., Sher, C., Reish, O., Thomas, D., Fink, J.K. , *De novo occurrence of novel SPG3A/atlastin mutation presenting as cerebral palsy*. Arch Neurol. , 2006. **63**: p. 445–7.
40. Ivanova, N., Claeys, K.G., Deconinck, T., Litvinenko, I., Jordanova, A., Auer-Grumbach, M., Haberlova, J., Löfgren, A., Smeyers, G., Nelis, E., Mercelis, R., Plecko, B., Priller, J., Zámečník, J., Ceulemans, B., Erichsen, A.K., Björck, E., Nicholson, G., Sereda, M.W., Seeman, P., Kremensky, I., Mitev, V. and De Jonghe, P. , *Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy*. Arch Neurol., 2007. **64**: p. 706–13.
41. Oates, E.C., Rossor, A.M., Hafezparast, M., Gonzalez, M., Speziani, F., MacArthur, D.G., Lek, M., Cottenie, E., Scoto, M., Foley, A.R., Hurles, M., Houlden, H., Greensmith, L., Auer-Grumbach, M., Pieber, T.R., Strom, T.M., Schule, R., Herrmann, D.N., et al., *Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet., 2013. **92**: p. 965–73.
42. Windpassinger, C., et al., *Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 271-6.
43. Musacchio, T., Zaum, A.K., Üçeyler, N., Sommer, C., Pfeifroth, N., Reiners, K., Kunstmann, E., Volkmann, J., Rost, S., Klebe, S., *ALS and MMN mimics in patients with BSCL2 mutations: the expanding clinical spectrum of SPG17 hereditary spastic paraplegia*. J Neurol, 2017. **264**(1): p. 11-20.
44. Rinaldi, C., et al., *Mutation in CPT1C Associated With Pure Autosomal Dominant Spastic Paraplegia*. JAMA Neurol, 2015. **72**(5): p. 561-70.
45. Sambuughin, N., Goldfarb, L.G., Sivtseva, T.M., Davydova, T.K., Vladimirtsev, V.A., Osakovskiy, V.L., Danilova, A.P., Nikitina, R.S., Ylakhova, A.N., Diachkovskaya, M.P., Sundborger, A.C., Renwick, N.M., Platonov, F.A., Hinshaw, J.E. and and C. Toro, *Adult-onset autosomal dominant spastic paraplegia linked to a GTPase-effector domain mutation of dynamin 2*. BMC Neurol, 2015. **15**: p. 223.
46. Rydning, S.L., et al., *A novel heterozygous variant in ERLIN2 causes autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia*. Eur J Neurol, 2018. **25**(7): p. 943-e71.
47. Hansen, J.J., et al., *Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(5): p. 1328-32.
48. Roda, R.H., A.B. Schindler, and C. Blackstone, *Multigeneration family with dominant SPG30 hereditary spastic paraplegia*. Ann Clin Transl Neurol, 2017. **4**(11): p. 821-824.
49. Pennings, M., et al., *KIF1A variants are a frequent cause of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia*. Eur J Hum Genet, 2020. **28**(1): p. 40-49.
50. Reid, E., et al., *A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10)*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(5): p. 1189-94.
51. Blair, M.A., S. Ma, and P. Hedera, *Mutation in KIF5A can also cause adult-onset hereditary spastic paraplegia*. Neurogenetics, 2006. **7**(1): p. 47-50.
52. Liu, Y.T., et al., *Extended phenotypic spectrum of KIF5A mutations: From spastic paraplegia to axonal neuropathy*. Neurology, 2014. **83**(7): p. 612-9.
53. Rainier, S., et al., *NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6)*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(4): p. 967-71.
54. Du, J., et al., *Expansion of the phenotypic spectrum of SPG6 caused by mutation in NIPA1*. Clin Neurol Neurosurg, 2011. **113**(6): p. 480-2.
55. Svenstrup, K., et al., *NIPA1 mutation in complex hereditary spastic paraplegia with epilepsy*. Eur J Neurol, 2011. **18**(9): p. 1197-9.
56. Hedera, P., *Recurrent de novo c.316G>A mutation in NIPA1 hotspot*. J Neurol Sci, 2013. **335**(1-2): p. 231-2.

57. Li, M., et al., *PMCA4 (ATP2B4) mutation in familial spastic paraplegia*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104790.
58. Züchner, S., et al., *Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(2): p. 365-9.
59. Hewamadduma, C., et al., *New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP)*. Neurogenetics, 2009. **10**(2): p. 105-10.
60. Esteves, T., et al., *Loss of association of REEP2 with membranes leads to hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2014. **94**(2): p. 268-77.
61. Montenegro, G., et al., *Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 538-44.
62. Lin, P., et al., *A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42)*. Am J Hum Genet, 2008. **83**(6): p. 752-9.
63. Hazan, J., et al., *Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia*. Nat Genet, 1999. **23**(3): p. 296-303.
64. Fonknechten, N., et al., *Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 637-44.
65. Nielsen, J.E., et al., *Hereditary spastic paraplegia with cerebellar ataxia: a complex phenotype associated with a new SPG4 gene mutation*. Eur J Neurol, 2004. **11**(12): p. 817-24.
66. Murphy, S., et al., *Dementia in SPG4 hereditary spastic paraplegia: clinical, genetic, and neuropathologic evidence*. Neurology, 2009. **73**(5): p. 378-84.
67. McDermott, C.J., et al., *Paraplegin gene analysis in hereditary spastic paraparesis (HSP) pedigrees in northeast England*. Neurology, 2001. **56**(4): p. 467-71.
68. Hedera, P., et al., *Phenotypic analysis of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 8q*. Neurology, 1999. **53**(1): p. 44-50.
69. Valdmanis, P.N., et al., *Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(1): p. 152-61.
70. Kancheva, D., et al., *Mosaic dominant TUBB4A mutation in an inbred family with complicated hereditary spastic paraplegia*. Mov Disord, 2015. **30**(6): p. 854-8.
71. Mannan, A.U., et al., *ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(2): p. 351-7.
72. Kara, E., et al., *Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia*. Brain, 2016. **139**(Pt 7): p. 1904-18.
73. Tunca, C., et al., *ERLIN1 mutations cause teenage-onset slowly progressive ALS in a large Turkish pedigree*. Eur J Hum Genet, 2018. **26**(5): p. 745-748.
74. Charcot JM, J.A., *Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec le'sions de la substance grise et des faisceaux ante'ro-late'raux de la moelle e'pine'e're*. Arch Physiol Neurol Path, 1869. **2**: p. 744-750.
75. Chelban, V., et al., *Spastic paraplegia preceding PSEN1-related familial Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement (Amst), 2021. **13**(1): p. e12186.
76. Hewamadduma, C.A., et al., *Novel genotype-phenotype and MRI correlations in a large cohort of patients with SPG7 mutations*. Neurol Genet, 2018. **4**(6): p. e279.
77. Chrestian, N., et al., *Clinical and genetic study of hereditary spastic paraplegia in Canada*. Neurol Genet, 2017. **3**(1): p. e122.
78. Pensato, V., et al., *Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48*. Brain, 2014. **137**(Pt 7): p. 1907-20.
79. Schrandt-Stumpel, C., et al., *Spectrum of X-linked hydrocephalus (HSAS), MASA syndrome, and complicated spastic paraplegia (SPG1): Clinical review with six additional families*. Am J Med Genet, 1995. **57**(1): p. 107-16.

80. Cross, H.E. and V.A. McKusick, *The mast syndrome. A recessively inherited form of presenile dementia with motor disturbances*. Arch Neurol, 1967. **16**(1): p. 1-13.
81. Simpson, M.A., et al., *Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(5): p. 1147-56.
82. Ishiura, H., et al., *Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses*. J Hum Genet, 2014. **59**(3): p. 163-72.
83. Coutelier, M., et al., *Alteration of ornithine metabolism leads to dominant and recessive hereditary spastic paraplegia*. Brain, 2015. **138**(Pt 8): p. 2191-205.
84. Rizzo, W.B., G. Carney, and Z. Lin, *The molecular basis of Sjögren-Larsson syndrome: mutation analysis of the fatty aldehyde dehydrogenase gene*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(6): p. 1547-60.
85. Gordon, N., *Sjögren-Larsson syndrome*. Dev Med Child Neurol, 2007. **49**(2): p. 152-4.
86. Novarino, G., et al., *Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders*. Science, 2014. **343**(6170): p. 506-511.
87. Kortüm, F., et al., *Clinical and genetic spectrum of AMPD2-related pontocerebellar hypoplasia type 9*. Eur J Hum Genet, 2018. **26**(5): p. 695-708.
88. Abou Jamra, R., et al., *Adaptor protein complex 4 deficiency causes severe autosomal-recessive intellectual disability, progressive spastic paraplegia, shy character, and short stature*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(6): p. 788-795.
89. Bauer, P., et al., *Mutation in the AP4B1 gene cause hereditary spastic paraplegia type 47 (SPG47)*. Neurogenetics, 2012. **13**(1): p. 73-6.
90. Moreno-De-Luca, A., et al., *Adaptor protein complex-4 (AP-4) deficiency causes a novel autosomal recessive cerebral palsy syndrome with microcephaly and intellectual disability*. J Med Genet, 2011. **48**(2): p. 141-4.
91. Verkerk, A.J., et al., *Mutation in the AP4M1 gene provides a model for neuroaxonal injury in cerebral palsy*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(1): p. 40-52.
92. Hardies, K., et al., *Recessive loss-of-function mutations in AP4S1 cause mild fever-sensitive seizures, developmental delay and spastic paraplegia through loss of AP-4 complex assembly*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2218-27.
93. Ślábicki, M., et al., *A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia*. PLoS Biol, 2010. **8**(6): p. e1000408.
94. Khan, T.N., et al., *Evidence for autosomal recessive inheritance in SPG3A caused by homozygosity for a novel ATL1 missense mutation*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(10): p. 1180-4.
95. Boukhris, A., et al., *Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2013. **93**(1): p. 118-23.
96. Harlalka, G.V., et al., *Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis*. Brain, 2013. **136**(Pt 12): p. 3618-24.
97. Oates, E.C., et al., *Mutations in BICD2 cause dominant congenital spinal muscular atrophy and hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 965-73.
98. Shimazaki, H., et al., *A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55)*. J Med Genet, 2012. **49**(12): p. 777-84.
99. Landouré, G., et al., *Hereditary spastic paraplegia type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19orf12*. Hum Mutat, 2013. **34**(10): p. 1357-60.
100. Schubert, S.F., S. Hoffjan, and G. Dekomien, *Mutational analysis of the CYP7B1, PNPLA6 and C19orf12 genes in autosomal recessive hereditary spastic paraplegia*. Mol Cell Probes, 2016. **30**(1): p. 53-5.
101. Tesson, C., et al., *Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(6): p. 1051-64.

102. Tsaousidou, M.K., et al., *Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 510-5.
103. Goizet, C., et al., *CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5*. Brain, 2009. **132**(Pt 6): p. 1589-600.
104. Schuurs-Hoeijmakers, J.H., et al., *Mutations in DDHD2, encoding an intracellular phospholipase A(1), cause a recessive form of complex hereditary spastic paraplegia*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(6): p. 1073-81.
105. Alazami, A.M., et al., *A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18)*. Neurogenetics, 2011. **12**(4): p. 333-6.
106. Yildirim, Y., et al., *A frameshift mutation of ERLIN2 in recessive intellectual disability, motor dysfunction and multiple joint contractures*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(10): p. 1886-92.
107. Al-Saif, A., S. Bohlega, and F. Al-Mohanna, *Loss of ERLIN2 function leads to juvenile primary lateral sclerosis*. Ann Neurol, 2012. **72**(4): p. 510-6.
108. Edvardson, S., et al., *Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia*. Am J Hum Genet, 2008. **83**(5): p. 643-8.
109. Dick, K.J., et al., *Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35)*. Hum Mutat, 2010. **31**(4): p. E1251-60.
110. Lynex, C.N., et al., *Homozygosity for a missense mutation in the 67 kDa isoform of glutamate decarboxylase in a family with autosomal recessive spastic cerebral palsy: parallels with Stiff-Person Syndrome and other movement disorders*. BMC Neurol, 2004. **4**(1): p. 20.
111. Hammer, M.B., et al., *Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(2): p. 245-51.
112. Coarelli, G., et al., *Novel homozygous GBA2 mutation in a patient with complicated spastic paraplegia*. Clin Neurol Neurosurg, 2018. **168**: p. 60-63.
113. Orthmann-Murphy, J.L., et al., *Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations*. Brain, 2009. **132**(Pt 2): p. 426-38.
114. Utine, G.E., et al., *A homozygous deletion in GRID2 causes a human phenotype with cerebellar ataxia and atrophy*. J Child Neurol, 2013. **28**(7): p. 926-32.
115. Maier, A., et al., *De novo partial deletion in GRID2 presenting with complicated spastic paraplegia*. Muscle Nerve, 2014. **49**(2): p. 289-92.
116. Lossos, A., et al., *Fe/S protein assembly gene IBA57 mutation causes hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 2015. **84**(7): p. 659-67.
117. Torraco, A., et al., *Novel mutations in IBA57 are associated with leukodystrophy and variable clinical phenotypes*. J Neurol, 2017. **264**(1): p. 102-111.
118. Hamdan, F.F., et al., *Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(3): p. 306-16.
119. Rivière, J.B., et al., *KIF1A, an axonal transporter of synaptic vesicles, is mutated in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(2): p. 219-30.
120. Klebe, S., et al., *KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(6): p. 645-9.
121. Caballero Oteyza, A., et al., *Motor protein mutations cause a new form of hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 2014. **82**(22): p. 2007-16.
122. Dor, T., et al., *KIF1C mutations in two families with hereditary spastic paraparesis and cerebellar dysfunction*. J Med Genet, 2014. **51**(2): p. 137-42.
123. Melo, U.S., et al., *Overexpression of KLC2 due to a homozygous deletion in the non-coding region causes SPOAN syndrome*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(24): p. 6877-85.

124. Bayrakli, F., et al., *Hereditary spastic paraplegia with recessive trait caused by mutation in KLC4 gene*. J Hum Genet, 2015. **60**(12): p. 763-8.
125. Gonzalez, M., et al., *Exome sequencing identifies a significant variant in methionyl-tRNA synthetase (MARS) in a family with late-onset CMT2*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013. **84**(11): p. 1247-9.
126. Elsaid, M.F., et al., *NT5C2 novel splicing variant expands the phenotypic spectrum of Spastic Paraplegia (SPG45): case report of a new member of thin corpus callosum SPG-Subgroup*. BMC Med Genet, 2017. **18**(1): p. 33.
127. Murakami, Y., et al., *Null mutation in PGAP1 impairing Gpi-anchor maturation in patients with intellectual disability and encephalopathy*. PLoS Genet, 2014. **10**(5): p. e1004320.
128. Rainier, S., et al., *Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(3): p. 780-5.
129. Synofzik, M., et al., *PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum*. Brain, 2014. **137**(Pt 1): p. 69-77.
130. Hufnagel, R.B., et al., *Neuropathy target esterase impairments cause Oliver-McFarlane and Laurence-Moon syndromes*. J Med Genet, 2015. **52**(2): p. 85-94.
131. Cross, H.E. and V.A. McKusick, *The Troyer syndrome. A recessive form of spastic paraplegia with distal muscle wasting*. Arch Neurol, 1967. **16**(5): p. 473-85.
132. Patel, H., et al., *SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 347-8.
133. Casari, G., et al., *Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease*. Cell, 1998. **93**(6): p. 973-83.
134. Arnoldi, A., et al., *A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia*. Hum Mutat, 2008. **29**(4): p. 522-31.
135. Brugman, F., et al., *Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes*. Neurology, 2008. **71**(19): p. 1500-5.
136. Stevanin, G., et al., *Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 366-72.
137. Paisan-Ruiz, C., et al., *SPG11 mutations are common in familial cases of complicated hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 2008. **70**(16 Pt 2): p. 1384-9.
138. Riverol, M., et al., *Forceps minor region signal abnormality "ears of the lynx": an early MRI finding in spastic paraparesis with thin corpus callosum and mutations in the spatacsin gene (SPG11) on chromosome 15*. J Neuroimaging, 2009. **19**(1): p. 52-60.
139. Guidubaldi, A., et al., *Novel mutations in SPG11 cause hereditary spastic paraplegia associated with early-onset levodopa-responsive Parkinsonism*. Mov Disord, 2011. **26**(3): p. 553-6.
140. Oz-Levi, D., et al., *Mutation in TECPR2 reveals a role for autophagy in hereditary spastic paraparesis*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(6): p. 1065-72.
141. Beetz, C., et al., *Inhibition of TFG function causes hereditary axon degeneration by impairing endoplasmic reticulum structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(13): p. 5091-6.
142. Hanein, S., et al., *Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 992-1002.
143. Elsayed, L.E.O., et al., *Insights into Clinical, Genetic, and Pathological Aspects of Hereditary Spastic Paraplegias: A Comprehensive Overview*. Front Mol Biosci, 2021. **8**: p. 690899.
144. Jouet, M., et al., *X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene*. Nat Genet, 1994. **7**(3): p. 402-7.
145. Yamasaki, M., et al., *A clinical and neuroradiological study of X-linked hydrocephalus in Japan*. J Neurosurg, 1995. **83**(1): p. 50-5.

146. Finckh, U., et al., *Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease*. Am J Med Genet, 2000. **92**(1): p. 40-6.
147. Saugier-Verber, P., et al., *X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus*. Nat Genet, 1994. **6**(3): p. 257-62.
148. Cambi, F., et al., *Refined genetic mapping and proteolipid protein mutation analysis in X-linked pure hereditary spastic paraplegia*. Neurology, 1996. **46**(4): p. 1112-7.
149. Hodes, M.E., et al., *Different mutations in the same codon of the proteolipid protein gene, PLP, may help in correlating genotype with phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia (PMD/SPG2)*. Am J Med Genet, 1999. **82**(2): p. 132-9.
150. Sivakumar, K., et al., *Novel exon 3B proteolipid protein gene mutation causing late-onset spastic paraplegia type 2 with variable penetrance in female family members*. Ann Neurol, 1999. **45**(5): p. 680-3.
151. Dumitrescu, A.M., et al., *A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 168-75.
152. Boccone, L., et al., *Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) caused by a novel SLC16A2 gene mutation showing severe neurologic features and unexpectedly low TRH-stimulated serum TSH*. Eur J Med Genet, 2010. **53**(6): p. 392-5.
153. Verny, C., et al., *Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation*. Mitochondrion, 2011. **11**(1): p. 70-5.
154. Morais, S., et al., *Massive sequencing of 70 genes reveals a myriad of missing genes or mechanisms to be uncovered in hereditary spastic paraplegias*. Eur J Hum Genet, 2017. **25**(11): p. 1217-1228.
155. D'Amore, A., et al., *Next Generation Molecular Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegias: An Italian Cross-Sectional Study*. Front Neurol, 2018. **9**: p. 981.
156. Koutsis, G., et al., *A novel ABCD1 mutation detected by next generation sequencing in presumed hereditary spastic paraplegia: A 30-year diagnostic delay caused by misleading biochemical findings*. J Neurol Sci, 2015. **355**(1-2): p. 199-201.
157. Saputra, L. and K.R. Kumar, *Challenges and Controversies in the Genetic Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegia*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2021. **21**(4): p. 15.
158. Dong, E.L., et al., *Clinical spectrum and genetic landscape for hereditary spastic paraplegias in China*. Mol Neurodegener, 2018. **13**(1): p. 36.
159. Lynch, D.S., et al., *Hereditary spastic paraplegia in Greece: characterisation of a previously unexplored population using next-generation sequencing*. Eur J Hum Genet, 2016. **24**(6): p. 857-63.
160. Polymeris, A.A., et al., *A series of Greek children with pure hereditary spastic paraplegia: clinical features and genetic findings*. J Neurol, 2016. **263**(8): p. 1604-11.
161. Daoud, H., et al., *Identification of a novel homozygous SPG7 mutation by whole exome sequencing in a Greek family with a complicated form of hereditary spastic paraplegia*. Eur J Med Genet, 2015. **58**(11): p. 573-7.
162. Fraidakis, M.J., et al., *Novel Compound Heterozygous Spatacsin Mutations in a Greek Kindred with Hereditary Spastic Paraplegia SPG11 and Dementia*. Neurodegener Dis, 2016. **16**(5-6): p. 373-81.
163. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
164. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
165. Eijk-Van Os, P.G. and J.P. Schouten, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences*. Methods Mol Biol, 2011. **688**: p. 97-126.

166. Hanrahan, G.a.G., F.A., *Chemometric methods in capillary electrophoresis*. 2010, Hoboken: John Wiley & Sons.
167. Holland, L., *Capillary electrophoresis of biomolecules*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(23): p. 6909-10.
168. Tao, Y., Zhang, X., Wang, J., Wang, X. and Yang, N., *Simultaneous determination of cysteine, ascorbic acid and uric acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence*. Journal of electroanalytical chemistry, 2012. **674**: p. 65-70.
169. Shribman, S., et al., *Hereditary spastic paraplegia: from diagnosis to emerging therapeutic approaches*. Lancet Neurol, 2019. **18**(12): p. 1136-1146.
170. Alvarez, V., et al., *Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 89.
171. Wei, Q.Q., et al., *Spastin mutation screening in Chinese patients with pure hereditary spastic paraplegia*. Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20**(8): p. 845-9.
172. Kadnikova, V.A., et al., *Mutational Spectrum of Spast (Spg4) and At11 (Spg3a) Genes In Russian Patients With Hereditary Spastic Paraplegia*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14412.
173. Sulek, A., et al., *Screening for the hereditary spastic paraplaegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals*. Neurol Sci, 2013. **34**(2): p. 239-42.
174. Svenson, I.K., et al., *Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations*. Neurogenetics, 2004. **5**(3): p. 157-64.
175. Depienne, C., et al., *Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases*. J Med Genet, 2006. **43**(3): p. 259-65.
176. Beetz, C., et al., *Linkage to a known gene but no mutation identified: comprehensive reanalysis of SPG4 HSP pedigrees reveals large deletions as the sole cause*. Hum Mutat, 2007. **28**(7): p. 739-40.

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.