



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

*ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ*

*ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ*

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΟΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ  
ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ  
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ  
ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΑΠΟΣΤΟΛΟΠΟΥΛΟΥ**

**Βιολόγος**

**Συμβουλευτική επιτροπή:**

Β. Αλεπόρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Π. Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια

Ζ. Νταϊλιάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Αθήνα

Ιούνιος 2015

*Στην Αγγέλα,*

γιατί χωρίς αυτή δεν θα πραγματοποιούνταν η παρούσα εργασία

*Στη μαμά μου,*

γιατί χωρίς αυτή δε θα ολοκληρωνόταν η συγγραφή της

*Στην κόρη μου,*

γιατί με αυτή όλα αποκτούν νόημα

*«Πάντα στον νου σου νάχεις την Ιθάκη.  
Το φθάσιμον εκεί είν' ο προορισμός σου.  
Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου.  
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει·  
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,  
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,  
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.»*

*Ιθάκη, Κ.Π. Καβάφης*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), κας Βασιλικής Αλεπόρου, την οποία ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε καθώς επίσης και για τη συμβολή της κατά τη διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Παναγούλα Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ και την κα Ζωή Νταϊλιάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγηση και υποστήριξή τους ως μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της Διδακτορικής Διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κο Μιλτιάδη Τύπα, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, κα Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, κα Κλεονίκη Λάμνησου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ και κα Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ για τη συμμετοχή και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Το πειραματικό τμήμα της Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Ανθρώπου του Τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ και στο Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Νοσοκομείου ΜΗΤΕΡΑ, το οποίο πλέον έχει συγχωνευθεί με το Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής ΆλφαLAB στο Νοσοκομείο ΛΗΤΩ. Στην παρούσα εργασία ανεκτίμητη ήταν η βοήθεια της κας Αγγελικής Χατζάκη, Προϊσταμένης Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας ΆλφαLAB, την οποία ευχαριστώ θερμότατα για τη συνεχή συμπαράσταση και καθοδήγηση. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Βούλα Βελισσαρίου, Διευθύντρια Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής του ΆλφαLAB, καθώς επίσης και την κα Λίνα Φλωρεντίν, Διευθύντρια του Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής ΆλφαLAB. Ευχαριστώ, επίσης, την κα Χρυσάνθη Μπίλη, Προϊσταμένη Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας ΆλφαLAB, καθώς και όλους του συναδέλφους μου, παλιούς και νέους, που μου συμπαραστάθηκαν και ενθάρρυναν την προσπάθεια αυτή.

Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από το Ελληνικό Κρανιοπροσωπικό Κέντρο του Νοσοκομείου ΜΗΤΕΡΑ, με διευθυντή τον αείμνηστο Αλέξανδρο Στρατουδάκη, Πλαστικό Χειρουργό, του οποίου η συμβολή ήταν καταλυτική για τη εκπόνηση της Διδακτορικής μου Διατριβής. Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τον κο Κανάρη Παναγόπουλο,

Νευροχειρουργό, την κα Όλγα Καξίρα, Πλαστική Χειρουργό και όλους τους συνεργάτες του Κρανιοπροσωπικού Κέντρου για το ενδιαφέρον και τη στήριξή τους και φυσικά τους ασθενείς και τις οικογένειές τους, που όχι μόνο προσέφεραν τα δείγματα, αλλά συχνά στήριζαν αυτή την προσπάθεια.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου, στην αδερφή μου και στο σύζυγό μου Μάνο που είναι πάντα δίπλα μου, στηρίζοντας κάθε μου απόφαση και προσπάθεια, καθώς επίσης στη φίλη μου Μαρία Κοκκινάκη και σε όλους μου τους φίλους, που πάντα μου συμπαραστέκονται.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1Α. ΤΟ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ .....	10
1Α.1 ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ.....	10
1Α.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ .....	12
1Α.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΘΟΛΟΥ .....	15
1Α.4 ΟΙ ΡΑΦΕΣ ΩΣ ΘΕΣΕΙΣ ΕΝΔΟΜΕΜΒΡΑΝΩΔΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ .....	17
1Β. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ.....	19
1Β.1 ΚΡΑΝΙΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	19
1Β.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ .....	23
1Β.2.1 Σύνδρομο Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση (acanthosis nigricans).....	24
1Β.2.2 Σύνδρομο Apert .....	25
1Β.2.3 Σύνδρομο Saethre-Chotzen .....	26
1Β.2.4 Σύνδρομο Muenke.....	27
1Β.2.5 Σύνδρομο Pfeiffer .....	28
1Β.2.6 Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS: Craniofrontonasal syndrome).....	29
1Β.2.7 Σπάνια σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης Beare-Stevenson και Jackson-Weiss .	30
1Β.3 ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ: ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ, ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	33
1Β.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ (FGFRs) .....	33
1Β.3.2 TWIST1 .....	42
1Β.3.3 EFNΒ1.....	45
1Γ. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ .....	50
1Γ.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΡΑΦΕΣ .....	50
1Γ.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ FGF/FGFR ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΘΟΛΟΥ, ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ.....	52
1Γ.3 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ RUNΧ2 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ .....	57
1Γ.3.1 RUNΧ2 (RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2) .....	57

1Γ.3.2 Ο RUNX2, το σηματοδοτικό μονοπάτι των FGFs και ο ρόλος του στην κρаниюσυνουστέωση.....	59
1Γ.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TWIST1 ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	61
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	67
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	71
3Α. ΥΛΙΚΟ.....	72
3Β. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ .....	98
3Β.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ.....	98
3Β.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ .....	99
3Β.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	99
3Β.2.2 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων μετά από επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) .....	102
3Β.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	105
3Β.2.4 Αντίδραση ανάλυσης αλληλουχίας DNA (Sequencing).....	105
3Β.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ/ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ.....	107
3Β.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (FRAGMENT ANALYSIS) ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (SEQUENCING) ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ.....	110
3Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ .....	112
3Γ.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ.....	112
3Γ.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ.....	113
3Γ.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ .....	114
3Γ.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ DNASE.....	114
3Γ.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA .....	115
3Γ.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR).....	116
3Γ.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR)..	116
3Γ.6.2 Σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) της έκφρασης γονιδίων....	119
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	121
4Α. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ .....	122
4Α.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ.....	124
4Α.2 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ .....	138

4B. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΚΑΙ <i>GAPDH</i> (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ .....	143
4B.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA .....	145
4B.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΚΑΙ <i>GAPDH</i> (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ .....	146
4B.3 ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ (RELATIVE QUANTIFICATION) ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ Ή ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	147
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>151</b>
5A. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ .....	152
5A.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	152
5A.2. ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ .....	153
5A.3 ΝΕΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ <i>EFNB1</i> ΚΑΙ <i>TWIST1</i> .....	156
5A.3.1 ΝΕΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>EFNB1</i> .....	156
.....	158
5A.3.2 ΝΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>TWIST1</i> .....	159
5A.4 ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΩΣ .....	160
5A.5 ΣΗΜΑΣΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ .....	163
5B. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΚΑΙ <i>GAPDH</i> (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ .....	164
5B.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟ ΧΡΗΣΙΜΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΚΑΙ <i>GAPDH</i> (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) .....	164
5B.2 ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>RUNX2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>COL1A1</i> ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ Ή ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	166
5B2.1 Προηγούμενες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία .....	166
5B2.2 Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων <i>TWIST1</i> , <i>RUNX2</i> και <i>COL1A1</i> στους ινοβλάστες ασθενών με κρανιοσυνοστέωση .....	168

5B2.2.1 Διαφορετικές μεταλλαγές στον FGFR2 οδηγούν σε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων <i>TWIST1</i> , <i>RUNX2</i> και <i>COL1A1</i> .....	168
5B2.2.2 Διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων <i>TWIST1</i> , <i>RUNX2</i> και <i>COL1A1</i> λόγω μεταλλαγής στον <i>TWIST1</i> .....	172
5B2.2.3 Διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων <i>TWIST1</i> , <i>RUNX2</i> και <i>COL1A1</i> μεταξύ ασθενών με συνδρομική και μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση.....	173
5B.3 ΔΥΣΚΟΛΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΙΔΑΝΙΚΟΥ ΜΟΝΕΛΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ ΛΟΓΩ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ .....	174
5Γ. ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ .....	175
<b>6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>179</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>183</b>
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>187</b>



## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1Α. ΤΟ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ

### 1Α.1 ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

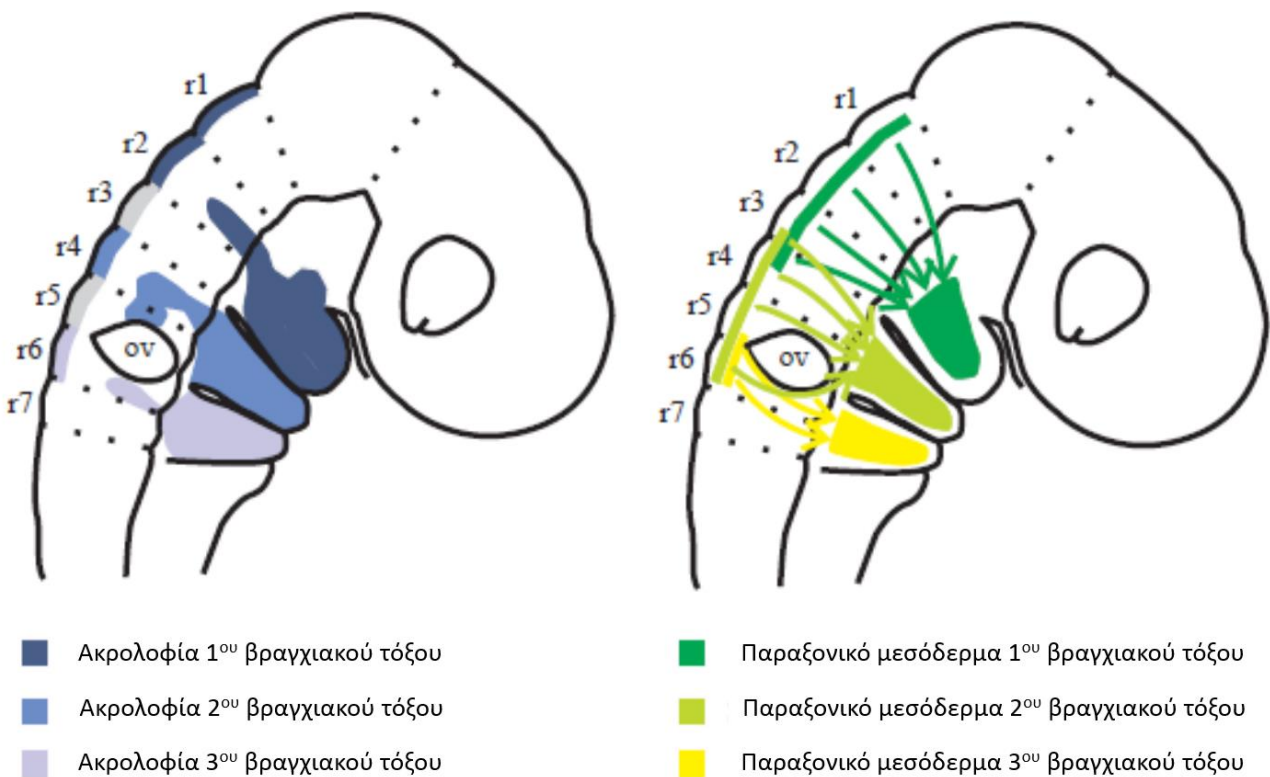
Στο τέλος της γαστριδίωσης στο έμβρυο εντοπίζονται 3 βλαστικά δέρματα (germ layers): το εξώδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Η νευρική ακρολοφία (neural crest), αν και προέρχεται από το εξώδερμα, συχνά αποκαλείται το τέταρτο βλαστικό στρώμα, λόγω της μεγάλης της σημασίας. Η νευρική ακρολοφία αποτελείται από κύτταρα που βρίσκονται στην ραχιαία πλευρά του νευρικού σωλήνα (Cochard, 2002). Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν εκτενώς προκειμένου να προκύψει από αυτά ένας μεγάλος αριθμός διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων. Η νευρική ακρολοφία μπορεί να χωριστεί σε 4 βασικά αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα: την κρανιακή (ή κεφαλική), την ακρολοφία του κορμού, την πνευμονογαστρική και ιερή (vagal and sacral) (παρασυμπαθητική ακρολοφία) και την καρδιακή νευρική ακρολοφία. Τα κύτταρα της κρανιακής νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν ραχαιοπλευρικά και δημιουργούν το κρανιοπροσωπικό μεσέγγυμα, το οποίο διαφοροποιείται σε χόνδρο, οστό, κρανιακούς νευρώνες, γλοία και συνδετικό ιστό του προσώπου (Gilbert, 2000). Στον άνθρωπο, η μετανάστευση της κρανιακής νευρικής ακρολοφίας ξεκινάει περίπου την 19<sup>η</sup> και ολοκληρώνεται την 38<sup>η</sup> εμβρυική ημέρα (E19 και E38) (Opperman, 2000).

Η κρανιακή (κεφαλική) περιοχή των εμβρύων των θηλαστικών περιλαμβάνει τα 4 πρώτα ζεύγη σωματιών και όλες τις δομές που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο ή κεφαλικά (πρόσθια) αυτών. Οι κυριότερες από αυτές τις δομές είναι τα βραγχιακά ή φαρυγγικά τόξα, ο πρόσθιος, μέσος και ρομβοειδής εγκέφαλος (μεταμερίζεται σε ρομβομερίδια), οι οποίοι προέρχονται από το νευρικό σωλήνα και το κεφαλικό τμήμα της νωτοχορδής (Cochard, 2002). Τα κύτταρα της κρανιακής νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν στην περιοχή κεφαλικά των σωματιών ως 3 διακριτοί κυτταρικοί πληθυσμοί: (1) η τρίδυμη ακρολοφία (trigeminal crest) (προέρχεται από τα ρομβομερίδια 1-2, r1-r2, του ρομβοειδούς εγκεφάλου), η οποία μεταναστεύει στην προσωπορινική περιοχή και στο πρώτο βραγχιακό τόξο και

συνεισφέρει στο τρίδυμο γάγγλιο (trigeminal ganglion), (2) η υοειδής ακρολοφία (hyoid crest) (προέρχεται από το r4), η οποία μεταναστεύει στο δεύτερο βραγχιακό τόξο και (3) πνευμονογαστρική ακρολοφία (vagal crest) (προέρχεται από το r6), η οποία μεταναστεύει στο τρίτο και τέταρτο βραγχιακό τόξο καθώς και στον κορμό (Εικόνα 1Α). Μόνο τα κύτταρα της τρίδυμης ακρολοφίας συνεισφέρουν στο σχηματισμό του κρανίου (Morriss-Kay and Wilkie, 2005, Hacker and Guthrie, 1998, Gilbert, 2000).

#### A. ΚΡΑΝΙΑΚΗ ΝΕΥΡΙΚΗ ΑΚΡΟΛΟΦΙΑ

#### B. ΚΡΑΝΙΑΚΟ ΠΑΡΑΞΟΝΙΚΟ ΜΕΣΟΔΕΡΜΑ



**Εικόνα 1:** Μετανάστευση κρανιακής νευρικής ακρολοφίας (A) και κρανιακού παραξονικού μεσοδέρματος (B). Η κρανιακή νευρική ακρολοφία μεταναστεύει σε 3 ξεχωριστές λωρίδες από τα ρομβομερίδια r1-r2, r4 και r6 στην περιφέρεια του πρώτου, δεύτερου και τρίτου βραγχιακού τόξου, αντίστοιχα (A). Το κρανιακό παραξονικό μεσόδερμα μεταναστεύει σε 3 αλληλεπικαλυπτόμενες λωρίδες από τα ρομβομερίδια r1-r4, r3-r6 και r5-r6 στο κέντρο του πρώτου, δεύτερου και τρίτου βραγχιακού τόξου, αντίστοιχα (B) (Hacker and Guthrie, 1998).

Μια από τις κυρίαρχες λειτουργίες της γαστριδίωσης είναι η δημιουργία μεσοδερμικού στρώματος μεταξύ ενδοδέρματος και εξωδέρματος. Ο σχηματισμός μεσοδερμικών και ενδοδερμικών οργάνων και δομών συμβαίνει παράλληλα με τη δημιουργία του νευρικού

σωλήνα, εκατέρωθεν του οποίου δημιουργούνται μεσοδερμικοί στύλοι, οι οποίοι έχουν προέλθει από την πρωτογενή αύλακα και ονομάζονται παραξονικό μεσόδερμα. Καθώς η πρωτογενής αύλακα υποχωρεί και οι νευρικές πτυχές αναδιπλώνονται προς το κέντρο του εμβρύου ώστε να σχηματιστεί ο νευρικός σωλήνας, το παραξονικό μεσόδερμα μεταμερίζεται σε σωμίτες κατά μήκος του κεφαλοουραίου άξονα (rostromaxillary axis) (Gilbert, 2000, Cochar, 2002). Σε αντίθεση με το παραξονικό μεσόδερμα του κορμού, το κраниακό παραξονικό μεσόδερμα, το οποίο βρίσκεται κεφαλικά του πρώτου σωμίτη και θα δώσει γένεση σε τμήμα του κраниού και σε μύες της κεφαλής, σχηματίζει μια συνεχή λωρίδα, χωρίς εμφανή τμηματοποίηση. Κύτταρα του κраниακού παραξονικού μεσοδέρματος μεταναστεύουν προς τα βραγχιακά τόξα ανάλογα με την αρχική τους θέση κατά τον κεφαλοουραίο άξονα. Έτσι, κύτταρα που βρίσκονται στο επίπεδο των ρομβομεριδίων 1-4 (r1-r4) μεταναστεύουν στο πρώτο βραγχιακό τόξο, από τα r3-r6 στο δεύτερο και από τα r5-r6 στο τρίτο τόξο (Εικόνα 1B). Η κраниκή νευρική ακρολοφία μεταναστεύει στην περιφέρεια των βραγχιακών τόξων, ενώ το κраниακό παραξονικό μεσόδερμα στο κέντρο τους (Hacker and Guthrie, 1998). Μετά τη μετανάστευση και της νευρικής ακρολοφίας, η κεφαλή αποτελείται από μεσέγγυμα, το οποίο έχει προέλθει από δυο διαφορετικές πηγές: την κраниκή νευρική ακρολοφία και το παραξονικό μεσόδερμα (Opperman, 2000).

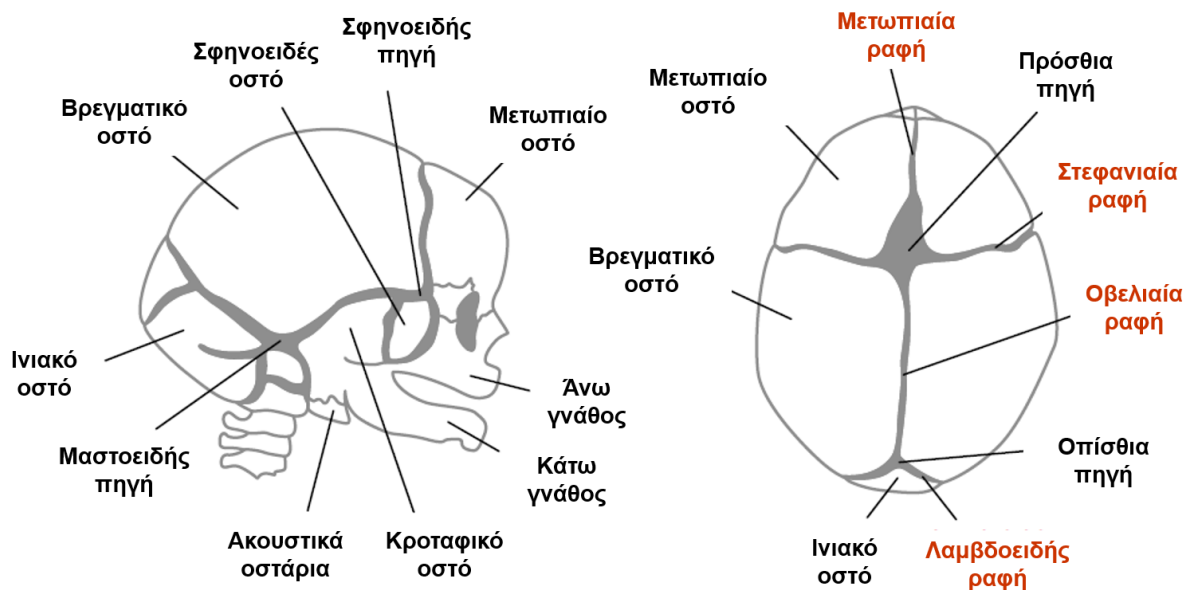
## **1A.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ**

### ***Το κраниό***

Το κраниό όλων των σπονδυλωτών με οστέινο σκελετό αποτελείται από το νευροκраниό ή εγκεφαλικό κраниό, το οποίο περιβάλλει και προστατεύει τον εγκέφαλο και το σπλαχνικό κраниό, το οποίο υποστηρίζει τις λειτουργίες της θρέψης και της αναπνοής και σχηματίζει το πρόσωπο στα θηλαστικά. Το κраниό των σπονδυλωτών σχηματίζεται από κраниακό σκελετογόνο μεσέγγυμα, το οποίο βρίσκεται μεταξύ εγκεφάλου και επιφανειακού εξωδέρματος. Η βάση του νευροκраниού, που βρίσκεται κάτω από τον εγκέφαλο, σχηματίζεται με ενδοχόνδρια οστεοποίηση, ενώ ο θόλος από μεμβρανώδη οστά με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση (Morris-Kay and Wilkie, 2005). Σε αντίθεση με την ενδοχόνδρια οστεοποίηση, η οποία περιλαμβάνει αρχικά τη δημιουργία χόνδρινου ιστού, που στη συνέχεια αντικαθίσταται από οστό, κατά την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση το οστό σχηματίζεται απευθείας από το κраниακό σκελετογόνο μεσέγγυμα. Τα οστεοπρογονικά

κύτταρα, τα οποία έχουν προέλθει από μεσεγγυματικά κύτταρα, διαφοροποιούνται αρχικά σε προ-οστεοβλάστες, οι οποίοι θα διαφοροποιηθούν στη συνέχεια σε λειτουργικούς οστεοβλάστες. Στους οστεοβλάστες γίνεται η σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών του εξωκυττάριου πλέγματος και η έκφραση των υπεύθυνων γονιδίων για την ασβεστοποίηση καθώς και για την αύξηση και μείωση των οστεοκλαστών. Αντίθετα με τους οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για την καταστροφή τόσο των ανόργανων όσο και των πρωτεϊνικών τμημάτων του οστικού πλέγματος (bone matrix) προκειμένου να δημιουργηθεί η κοιλότητα του μυελού των οστών στο εσωτερικό των οστών. Το κολλαγόνο τύπου I (type I collagen, COL1A1, COL1A2) και η αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, ALP) αποτελούν μοριακούς δείκτες των πρώιμων σταδίων διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, ενώ η οστεοκαλσίνη (osteocalcin, OC) καθώς και η μεταλλοποίηση του εξωκυττάριου πλέγματος αποτελούν όψιμους δείκτες. Άλλοι σημαντικοί δείκτες οστεοποίησης είναι η οστεονεκτίνη (osteonectin, ON), η οστεοποντίνη (osteopontin, OP) και η BSP (bone sialoprotein). Το κολλαγόνο τύπου I μαζί με άλλες πρωτεΐνες (οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη, φωσφοπρωτεΐνες), λιπίδια και γλυκοσαμινογλυκάνες αποτελούν το οργανικό πλέγμα (organic matrix) του οστού. Τα υπόλοιπα συστατικά του οστού είναι το μεταλλοποιημένο πλέγμα (mineralized matrix) και, σε κυτταρικό επίπεδο, οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες (Gilbert 2000, Cohen, 2006).

Στα θηλαστικά, ο κρανιακός θόλος αποτελείται κυρίως από 5 πλατιά οστά : δυο μετωπιαία, δυο βρεγματικά και ένα μεσοβρεγματικό (ινιακό οστό στον άνθρωπο) (εικόνα 2) (Bonaventure et al., 2003).



Εικόνα 2: Το ανθρώπινο κρανίο (Bonaventure et al., 2003).

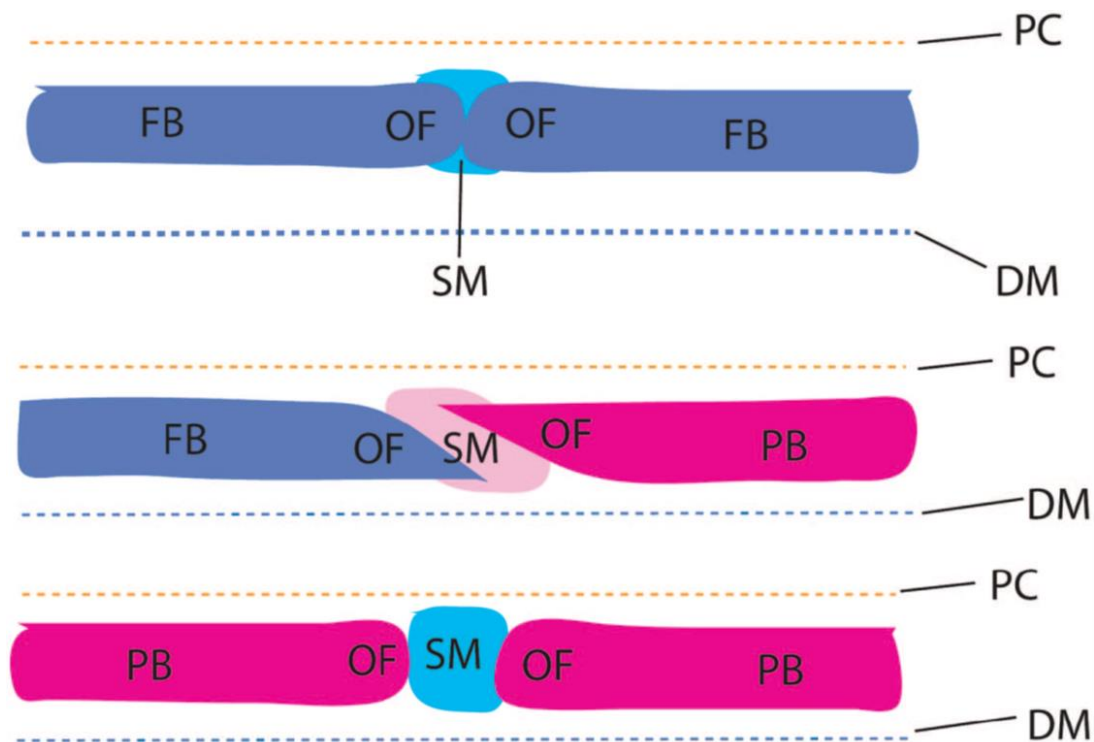
### **Οι κρανιακές ραφές**

Οι ραφές του κρανιακού θόλου είναι οι ινώδεις ιστοί που ενώνουν τα οστά του κρανίου, καθώς αυτά πλησιάζουν μεταξύ τους κατά την κρανιοπροσωπική ανάπτυξη (Opperman, 2000). Παίζουν πολύ σημαντικούς ρόλους ειδικά στα πρώτα στάδια της ζωής, εφόσον αφενός επιτρέπουν τη συμπίεση του κρανίου κατά τον τοκετό και την αύξησή του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, και αφετέρου λειτουργούν ως σηματοδοτικά κέντρα, ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των οστεογενετικών προδρομών κυττάρων (osteogenic precursors). Οι κρανιακές ραφές αποτελούν τα κυριότερα αυξητικά κέντρα στο κρανίο για τα πρώτα χρόνια της ζωής. Μεταξύ των μετωπιαίων οστών σχηματίζεται η μετωπιαία ραφή και μεταξύ των βρεγματικών οστών η οβελιαία ραφή. Η στεφαναία ραφή σχηματίζεται μεταξύ των μετωπιαίων και των βρεγματικών οστών, ενώ η λαμβδοειδής μεταξύ των βρεγματικών και του ινιακού οστού (Εικόνα 2) (Slater et al., 2008).

Οι ραφές θεωρείται ότι αποτελούν ένα σύμπλοκο από 4 βασικά στοιχεία: (1) τα οστεογενετικά μέτωπα (osteogenic fronts) των οστών που πλησιάζουν μεταξύ τους, (2) το μεσέγγυμα της ραφής που βρίσκεται μεταξύ των οστεογενετικών μετώπων, (3) το περικράνιο ή κρανιακό περιόστεο, το οποίο βρίσκεται από πάνω και (4) τη σκληρή μήνιγγα (σκληρή ινώδης μεμβράνη, το εξωτερικό στρώμα των μηνίγγων που περιβάλλουν τον εγκέφαλο), που βρίσκεται από κάτω. Τα οστεογενετικά μέτωπα της στεφαναίας και της λαμβδοειδούς ραφής αλληλεπικαλύπτονται, ενώ αυτά της οβελιαίας και της μετωπιαίας ραφής βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο (Εικόνα 3) (Slater et al., 2008, Lenton et al., 2005).

Οι 3 από τις κρανιακές ραφές, η οβελιαία, η μετωπιαία και η λαμβδοειδής, σχηματίζονται από την ελάττωση των μεμβρανωδών κενών μεταξύ των οστών, τα οποία αρχικά βρίσκονται μακριά το ένα από το άλλο (Morriss-Kay and Wilkie, 2005), και η θέση τους συμπίπτει με ανατομικές δομές του εγκεφάλου. Στα νεογνά, τα οστά αυτά μετακινούνται το ένα πάνω στο άλλο προκειμένου να διευρυνθεί η ραφή, όταν το μωρό κλαίει και η ενδοκρανιακή πίεση αυξάνεται (Morriss-Kay and Wilkie, 2005).

Αν και οι κρανιακές ραφές του ποντικού είναι ανάλογες με αυτές του ανθρώπου, στο ποντίκι μόνο το οπίσθιο τμήμα της μετωπιαίας ραφής (μεσομετωπιαία) συνοστεώνεται φυσιολογικά, ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν ανοιχτές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ζώου. Στον άνθρωπο, η μετωπιαία ραφή συνοστεώνεται κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής, ενώ οι υπόλοιπες παραμένουν ανοιχτές μέχρι και μετά την ενηλικίωση (Lenton et al., 2005).



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση των στοιχείων και της ιστολογικής προέλευσης της οπίσθιας μετωπιαίας (πάνω), της στεφαναίας (μέση) και της οβελιαίας ραφής (κάτω) του ποντικού.

DM: σκληρή μήνιγγα, OF: οστεογενετικό μέτωπο, FB: μετωπιαίο οστό, PB: βρεγματικό οστό, PC: περικράνιο, SM: μεσέγγυμα ραφής.

Μπλε: ιστός που προέρχεται από τη νευρική ακρολοφία. Ροζ: ιστός μεσοδερμικής προέλευσης (Slater et al., 2008).

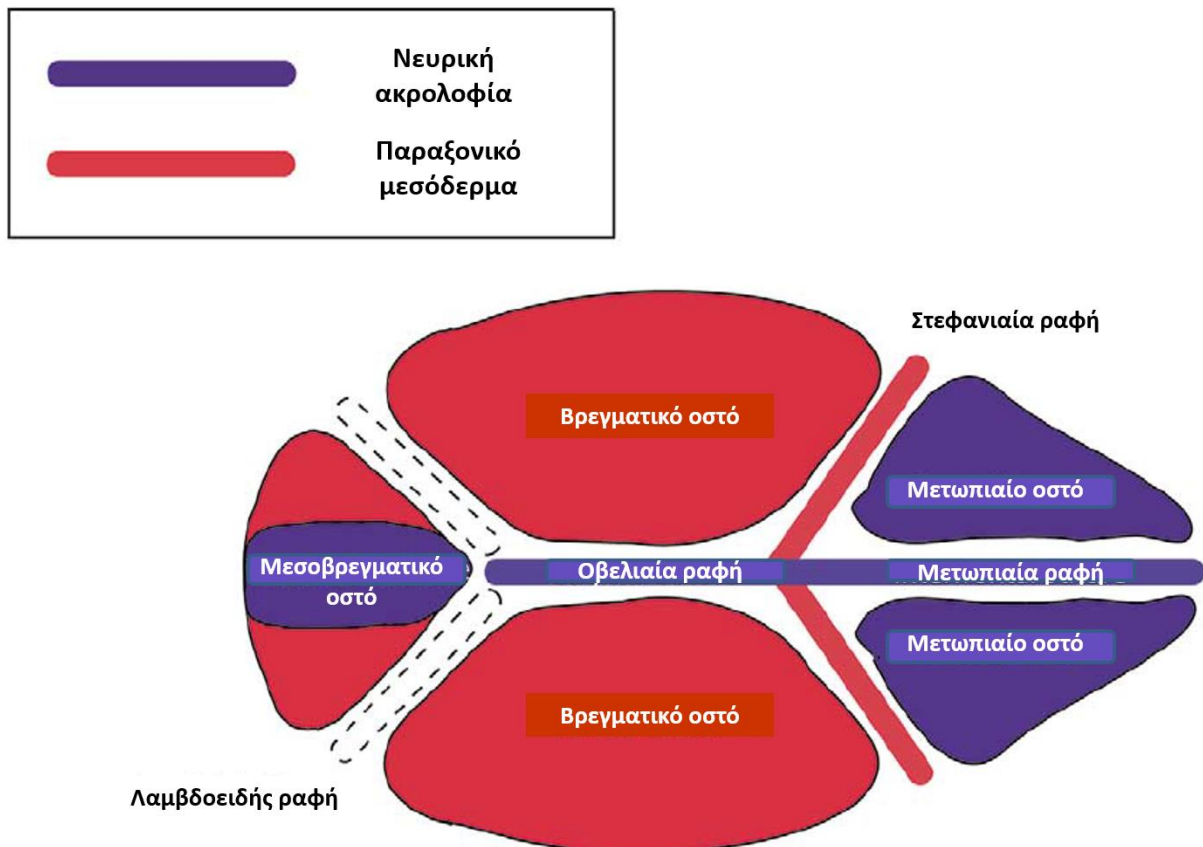
### 1A.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΘΟΛΟΥ

Προκειμένου να διαλευκανθεί η προέλευση των πλατιών οστών και των ραφών του κρανιακού θόλου, οι Jiang et al., 2002 δημιούργησαν ένα διαγονιδιακό ποντίκι που έφερε μόνιμο δείκτη της κυτταρικής σειράς της νευρικής ακρολοφίας (*Wnt1-Cre/R26R*) (Jiang et al., 2002). Για να επιτευχθεί αυτό, δημιουργήθηκε σύστημα δυο παραγόντων βασισμένο στον ανασυνδυασμό *Cre/lox*. Το ένα στοιχείο είναι ένα διαγονίδιο, το οποίο εκφράζει την *Cre recombinase* υπό τον έλεγχο του υποκινητή και του ενισχυτή του γονιδίου *Wnt1* (*Wnt1-Cre*). Το δεύτερο στοιχείο είναι ένα γονίδιο αναφοράς, το *R26R*, το οποίο εκφράζει β-γαλακτοσιδάση από το γενετικό τόπο (locus) *ROSA26* μόνο μετά από ανασυνδυασμό που επάγει η *Cre*. Ο γενετικός τόπος *ROSA26* εκφράζεται ομοιόμορφα και παντού, σε όλα τα αναπτυξιακά και μεταγεννητικά στάδια, χωρίς να επηρεάζεται από γενετικούς ή

περιβαλλοντικούς παράγοντες. Χωρίς ανασυνδυασμό, το μετάγραφο που προκύπτει από τον υποκινητή ROSA26 κωδικοποιεί για μια άσχετη αλληλουχία, ενώ μετά τον επαγόμενο από την Cre ανασυνδυασμό παράγεται λειτουργική πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση. Είναι σημαντικό ότι οι απόγονοι (progeny) των κυττάρων στα οποία συνέβη ο ανασυνδυασμός θα συνεχίσουν να παράγουν β-γαλακτοσιδάση, ακόμα και όταν το διαγονίδιο *Wnt1-Cre* δε θα είναι πια ενεργό (Chai et al., 2000, Jiang et al., 2000). Οι Jiang et al., 2002, προκειμένου να διακρίνουν τα στοιχεία του κρανιακού σκελετογόνου μεσεγχύματος που προέρχονται είτε από τη νευρική ακρολοφία είτε από το μεσόδερμα και επομένως να ερευνήσουν την ιστολογική προέλευση του κρανιακού θόλου χρησιμοποίησαν διαγονιδιακό ποντίκι το οποίο ήταν διπλός ετεροζυγώτης για το αλληλόμορφο R26R και για το διαγονίδιο *Wnt1-Cre* (*Wnt1-Cre/R26R*). Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, καθώς και οι απόγονοί τους «μαρκάρονται» μόνιμα από την έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης, και γίνονται ορατά μετά από χρώση με X-gal. Ως μάρτυρας για τη σήμανση των κυττάρων του κρανιακού παραξονικού μεσοδέρματος χρησιμοποιείται ο Dil, ένας φθορίζων λιποφιλικός μάρτυρας, ο οποίος εισάγεται με ένεση στο κρανιακό μεσόδερμα, κάτω από τις νευρικές πτυχές, σε έμβρυα σταδίου 3 ή 4 σωματιών, δηλαδή πριν τη μετανάστευση της νευρικής ακρολοφίας.

Από το πείραμα αυτό διαπιστώθηκε ότι τα μετωπιαία οστά, τα λεπιδοειδή οστά, τα οστά του σπλαχνικού κρανίου, καθώς και το κεντρικό τμήμα του μεσοβρεγματικού οστού προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία, ενώ τα βρεγματικά οστά καθώς και τα πλαϊνά τμήματα του μεσοβρεγματικού οστού είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Οι ραφές του κρανιακού θόλου σχηματίζονται εκεί όπου οι πολλαπλασιαζόμενες άκρες δύο δερματικών οστών διαχωρίζονται από μια ταινία/λωρίδα μεσεγχύματος. Στη στεφαναία ραφή, η ταινία αυτή είναι μεσοδερμικής προέλευσης, διαχωρίζοντας τα προερχόμενα από τη νευρική ακρολοφία μετωπιαία οστά από τα μεσοδερμικής προέλευσης βρεγματικά οστά. Στην οβελιαία ραφή, το μεσέγχυμα προέρχεται από τη νευρική ακρολοφία, διαχωρίζοντας τα δύο μεσοδερμικής προέλευσης βρεγματικά οστά. Έτσι, τόσο η στεφαναία όσο και η οβελιαία ραφή σχηματίζονται στα σημεία επαφής μεταξύ του προερχόμενου από τη νευρική ακρολοφία και του μεσοδερμικής προέλευσης μεσεγχύματος, γεγονός που πιθανόν να ισχύει και για τη λαμβδοειδή ραφή. Αντίθετα, η μετωπιαία ραφή σχηματίζεται μεταξύ δυο προερχόμενων από τη νευρική ακρολοφία οστών, χωρίς τη συμμετοχή του μεσοδέρματος (Εικόνα 4) (Jiang et al., 2002).



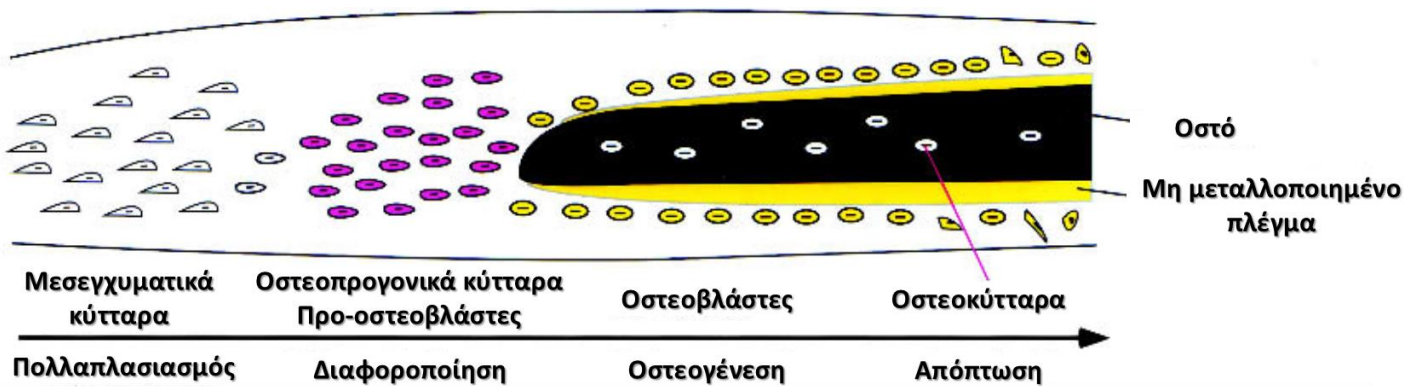


**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση των οστών, των ραφών και της ιστολογικής προέλευσης του κρανιακού θόλου του ποντικού. Τα μετωπιαία οστά καθώς και η μετωπιαία και οβελιαία ραφή προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία (μπλε), ενώ τα βρεγματικά οστά και η στεφανιαία ραφή είναι μεσοδερμικής προέλευσης (κόκκινο). Το μεσοβρεγματικό οστό είναι σύνθετο με μικτή προέλευση τόσο από τη νευρική ακρολοφία όσο και από το παραξονικό μεσόδερμα (Lenton et al., 2005).

#### 1Α.4 ΟΙ ΡΑΦΕΣ ΩΣ ΘΕΣΕΙΣ ΕΝΔΟΜΕΜΒΡΑΝΩΔΟΥΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Οι ραφές είναι λειτουργικές δομές, υπεύθυνες για την προσθήκη ενδομεμβρανώδους οστού στις άκρες των οστικών μετώπων, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούν περίπου το ίδιο πλάτος, ενώ αυξάνεται ο κρανιακός θόλος, ακολουθώντας την παράλληλη αύξηση του εγκεφάλου (Opperman, 2000). Η δημιουργία και διατήρηση των ραφών είναι μια υψηλά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από τη στρατολόγηση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των οστεοπρογονικών κυττάρων (osteoprogenitor cells). Οποιαδήποτε διαταραχή μεταξύ αυτών των λειτουργιών μπορεί να επάγει πρώιμη ή καθυστερημένη σύντηξη των ραφών, με αποτέλεσμα τον ανώμαλο σχηματισμό των οστών

του κρανίου. Επομένως οι διαδικασίες που ελέγχουν τη συμπεριφορά των κυττάρων στο επίπεδο των ραφών είναι σημαντικές για την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση. Στον έλεγχο για τη δημιουργία των ραφών εμπλέκονται αρκετά είδη κυττάρων. Τα περισσότερα κύτταρα που περιβάλλουν τη ραφή είναι μεσεγχυματικά. Κοντά στη ραφή, μια μειοψηφία κυττάρων διαφοροποιείται σε προ-οστεοβλάστες. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες, οι οποίοι εντοπίζονται κατά μήκος των οστικών δοκίδων, τις οποίες δημιουργούν. Τελικά, οι οστεοβλάστες είτε αποπίπτουν είτε ενσωματώνονται στο πλέγμα, μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα, τα οποία θα οδηγηθούν σε απόπτωση στο τέλος της ζωής τους (Εικόνα 5) (Ornitz and Marie, 2002, Marie et al., 2007).



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση ενός αναπτυσσόμενου ενδομεμβρανώδους οστού. Αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα και αυτά με τη σειρά τους σε ώριμους οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες είτε αποπίπτουν είτε ενσωματώνονται στο πλέγμα, μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα (Ornitz and Marie, 2002).

Προκειμένου να λειτουργήσουν οι ραφές ως θέσεις ενδομεμβρανώδους ανάπτυξης των οστών πρέπει να επιτρέπουν τη δημιουργία νέου οστού στις άκρες των αλληλεπικαλυπτόμενων οστικών μετώπων, παραμένοντας όμως οι ίδιες σε μη οστεοποιημένη κατάσταση. Αυτή η διαδικασία βασίζεται στην παραγωγή επαρκών οστικών κυττάρων που θα στρατολογηθούν στα οστικά μέτωπα, διασφαλίζοντας παράλληλα ότι τα κύτταρα της ραφής παραμένουν αδιαφοροποίητα (Orperman, 2000). Δηλαδή, οι ραφές πρέπει να παραμείνουν ανοιχτές (patent), επιτρέποντας παράλληλα τη γρήγορη δημιουργία οστού στις άκρες των οστικών μετώπων. Η κρανιοσυνοστέωση, η πρώιμη οστεοποίηση των ραφών μέσω σύντηξης των οστικών μετώπων κατά μήκος της θέσης της ραφής, εμποδίζει την περαιτέρω δημιουργία οστού στη θέση αυτή. Η απώλεια των κέντρων ανάπτυξης των

ραφών έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία ορθής ανάπτυξης του κρανίου και την εμφάνιση κρανιοπροσωπικών δυσμορφιών (Opperman, 2000).

## **1B. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ**

### **1B.1 ΚΡΑΝΙΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΔΥΣΠΛΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ**

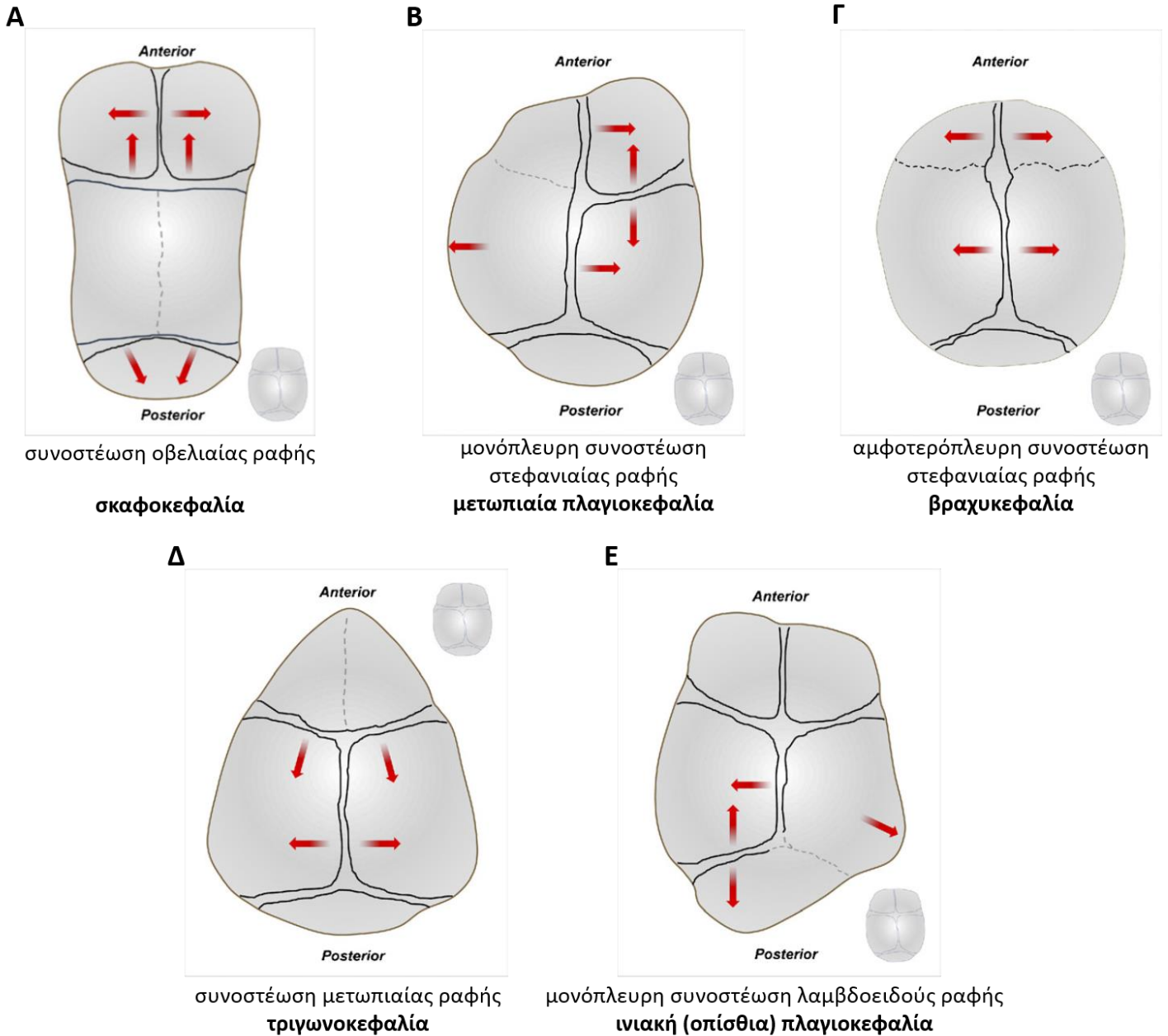
Οι κρανιοσκελετικές δυσπλασίες αποτελούν ετερογενή ομάδα δυσπλασιών που επηρεάζουν το μέγεθος, το σχήμα και την οστεοποίηση (υφή και μετάλλωση) του σκελετού και του κρανιακού θόλου. Ανάλογα με το πρωτεύον χαρακτηριστικό των δυσπλασιών αυτών, μπορούν να διακριθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις σκελετικές δυσπλασίες, που επηρεάζουν κυρίως τον σκελετό, και τις κρανιοσυνοστεώσεις, που επηρεάζουν τον κρανιακό θόλο. Τρεις βασικές σκελετικές δυσπλασίες, η αχονδροπλασία (ACH), η υποχονδροπλασία (HCH) και η θανατηφόρος δυσπλασία τύπου 1 και 2 (TDI και TDII) συνδέονται με μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR3* (Cohen et al., 2006).

Ο όρος κρανιοσυνοστέωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε εγχειρίδιο παθολογικής ανατομίας το 1830 από τον Otto για να χαρακτηρίσει την πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών. Οι ραφές, οι στενές επιφάνειες επαφής των κρανιακών οστών, αποτελούνται από μη διαφοροποιημένο μεσέγγυμα και επιτρέπουν τη σύγχρονη με την ανάπτυξη του εγκεφάλου διαμόρφωση του κρανιακού θόλου.

Οι κρανιοσυνοστεώσεις αποτελούν μια χωριστή ομάδα κρανιοσκελετικών δυσπλασιών με ποικίλη αιτιολογία, όπου μόνο το 21% των περιπτώσεων οφείλονται σε γενετικά αίτια. Από αυτά, περίπου το 85% οφείλεται σε μεταλλαγές σε γονίδια, όπου κυρίαρχο ρόλο παίζουν και πάλι οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFRs 1-3) και το 15% σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Άλλες αιτίες κρανιοσυνοστέωσης είναι ο ενδομήτριος περιορισμός της ανάπτυξης του εμβρύου και η έκθεση της εγκύου σε τερατογόνα, όπως το βαλπροϊκό και η ισοτρετινοΐνη (Johnson and Wilkie, 2011).

Η συχνότητα της κρανιοσυνοστέωσης εκτιμάται σε 1 στις 2100-2500 γεννήσεις (Johnson and Wilkie, 2011). Οι συχνότητες των διαφορετικών τύπων κρανιοσυνοστέωσης ποικίλουν ανάλογα με το κέντρο αναφοράς, αλλά κατά μέσο όρο στο σύνολο των συνοστεώσεων πιο συχνή είναι η συνοστέωση της οβελιαία ραφής (40-55%), ακολουθούμενη από τη στεφαναία, μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη (20-25%), τη μετωπιαία (5-15%), την πολλαπλή, όπου υπάρχει συνοστέωση σε περισσότερες από μια ραφές (5-15%) και τη λαμβδοειδή (0-5%) (Morriss-Kay and Wilkie, 2005). Η διαμόρφωση του κρανιακού σχήματος ποικίλει ανάλογα με το ποια ή ποιες από τις ραφές θα συνοστεωθούν. Η συνοστέωση της οβελιαίας ραφής προκαλεί αύξηση της προσθιοπίσθιας διαμέτρου του κρανίου που ονομάζεται σκαφοκεφαλία (Εικόνα 6Α, 7c,d). Η συχνότητά της εκτιμάται σε 1.9-2.3 στις 10.000 γεννήσεις, εμφανίζεται συχνότερα στα άρρενα άτομα (άρρενα:θήλεα, 3.5:1) και θεωρείται ότι μόνο το 2% των περιπτώσεων συνοστέωσης που περιλαμβάνουν την οβελιαία ραφή είναι οικογενείς. Η μονόπλευρη συνοστέωση στεφαναίας ραφής προκαλεί ασύμμετρο κρανιακό σχήμα που ονομάζεται μετωπιαία πλαγιοκεφαλία (Εικόνα 6Β, 7i,j), ενώ αμφοτερόπλευρη συνοστέωσή της βραχυκεφαλία (φαρδύ και πεπλατυσμένο κρανίο) (εικόνα 6Γ, 7g,h) και σε σοβαρές περιπτώσεις σχήμα κρανίου δίκην τριφυλλιού (cloverleaf). Περίπου το 60-75% των περιπτώσεων στεφαναίας συνοστέωσης είναι θήλεα άτομα και 8-10% έχουν οικογενειακό ιστορικό. Η μετωπιαία συνοστέωση εκτιμάται ότι συμβαίνει σε 1 στις 10.000-15.000 γεννήσεις, πιο συχνά σε άρρενα άτομα και προκαλεί τριγωνοκεφαλία (Εικόνα 6Δ, 7e,f). Σε περιπτώσεις αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της λαμβδοειδούς ραφής, ολόκληρη η ινιακή περιοχή εμφανίζεται πεπλατυσμένη (επίπεδη και φαρδιά). Στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως, που αφορούν στην λαμβδοειδή ραφή υπάρχει μονόπλευρη συνοστέωση που έχει ως αποτέλεσμα ασύμμετρη ινιακή (οπίσθια) πλαγιοκεφαλία (Εικόνα 6Ε) (Levi et al., 2012). Όλες οι περιπτώσεις πλαγιοκεφαλίας που οφείλονται σε κρανιοσυνοστέωση πρέπει να διαφοροποιούνται από την πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως, όπου οι ραφές παραμένουν φυσιολογικά ανοιχτές.

Η συνοστέωση περισσότερων από μια ραφών συχνά προκαλεί αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση και σχετίζεται με αναπτυξιακή υστέρηση και υψηλό ποσοστό επαναληπτικής χειρουργικής αποκατάστασης (Kimonis et al., 2007). Σε κάποιες περιπτώσεις, συνοστέωση όλων των κρανιακών ραφών (πανσυνοστέωση) μπορεί να προκαλέσει σχήμα κρανίου δίκην τριφυλλιού ή πυργοκεφαλία/οξυκεφαλία, οι οποίες μπορούν να προκληθούν και από συνοστέωση δυο διαφορετικών ραφών.



**Εικόνα 6:** Σχηματική απεικόνιση του κρανίου μετά από συνοστέωση της οβελιαίας (A), της στεφανιαίας μονόπλευρα (B) ή αμφοτερόπλευρα (Γ), της μετωπιαίας (Δ) και της λαμβδοειδούς ραφής μονόπλευρα (E) (Levi et al., 2012, τροποποιημένο).

### **Μη συνδρομική και συνδρομική κρανιοσυνοστέωση**

Η κρανιοσυνοστέωση συνήθως ταξινομείται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: μη συνδρομική και συνδρομική. Η μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση αντιπροσωπεύει περίπου το 70% των περιπτώσεων και περιγράφει την κατάσταση του ασθενούς όταν η συνοστέωση των κρανιακών ραφών είναι το μόνο πρωτεύον εύρημα. Δευτερεύοντα συμπτώματα, όπως νευρολογικά ή οφθαλμολογικά, μπορούν να εμφανιστούν ως αποτέλεσμα της πρόωρης

συνοστέωσης των ραφών. Οι μη συνδρομικές κρανιοσυνοστεώσεις, στις οποίες η πρόωρη σύντηξη των ραφών εμφανίζεται ως απομονωμένο χαρακτηριστικό, μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη ραφή που συνοστεώνεται: μετωπιαία, οβελιαία, στεφανιαία και λαμβδοειδή. Στις συνδρομικές περιπτώσεις η κρανιοσυνοστέωση μπορεί να αφορά μία ή περισσότερες ραφές ενώ συνυπάρχουν και άλλες πρωτεύοντες μορφογενετικές ανωμαλίες, όπως ευρήματα στα άκρα, την καρδιά, το κεντρικό νευρικό σύστημα κ.α. Στην πράξη, η διάκριση μεταξύ των δυο αυτών κατηγοριών κρανιοσυνοστεώσεως είναι πολύ δύσκολη και είναι πιθανόν κάποιες μη συνδρομικές μορφές να αντιπροσωπεύουν το τέλος του φάσματος της κλινικής ετερογένειας των συνδρομικών μορφών (Passos-Bueno et al., 2008).

### **Γενετικά αίτια κρανιοσυνοστεώσεως**

Το 30% των συνδρόμων κρανιοσυνοστεώσεως οφείλονται σε μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptors 1-3), *TWIST1* (Twist Drosophila Homolog 1), *EFNB1* (Ephrin B1), *MSX2* (Muscle Segment Homeobox Drosophila Homolog 2) και *RAB23* (RAS-associated protein RAB23). Επιπλέον 16% των συνδρομικών περιπτώσεων έχουν συσχετισθεί με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, κυρίως ελλείψεις και διπλασιασμούς, που μπορούν να ανιχνευθούν μέσω συμβατικών κυτταρογενετικών μεθόδων (καρυότυπος), ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης των χρωμοσωμάτων όπως της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενης από τη δράση της λιγάσης (MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) και του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού με μικροσυστοιχίες (array-CGH: array-based Comparative Genomic Hybridization), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν μικροελλείψεις και μικροδιπλασιασμούς (Jehee et al., 2008, Wilkie et al., 2010).

Τα συχνότερα σύνδρομα κρανιοσυνοστεώσεως Muenke, Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση, Apert, Pfeiffer, Saethre-Chotzen και CFNS οφείλονται σε μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1*, ενώ μεταλλαγές σε κάποια από αυτά έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με μη συνδρομική συνοστέωση. Μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR2* ευθύνονται και για δυο άλλα, πολύ σπάνια σύνδρομα κρανιοσυνοστεώσεως, το Beare-Stevenson και το Jackson-Weiss.

Πολύ πιο σπάνιες αλλά καλά συσχετισμένες με κρανιοσυνοστέωση είναι επίσης μεταλλαγές στα γονίδια *POR* (P450 oxidoreductase) (Huang et al., 2005) και, όπως προαναφέρθηκε, *RAB23* (RAS-associated protein RAB23) (Jenkins et al., 2011), στις οποίες

οφείλονται, αντίστοιχα, τα σύνδρομα Antley-Bixler και Carpenter. Τα σύνδρομα αυτά, σε αντίθεση με τα περισσότερα σύνδρομα κρανιοσυνοστώσεως, κληρονομούνται με τον υπολειπόμενο χαρακτήρα. Ιστορικά, η πρώτη μεταλλαγή που συσχετίστηκε με κρανιοσυνοστώση ήταν η p.Pro148His στο γονίδιο *MSX2* σε μια μόνο οικογένεια με κρανιοσυνοστώση Boston-type (Jabs et al., 1993). Πολύ πρόσφατα βρέθηκε και άλλη μεταλλαγή σε δεύτερη οικογένεια, η οποία όμως επηρεάζει την ίδια αμινοξική θέση με την πρώτη (p.Pro148Leu) (Janssen et al., 2013), ενώ έχουν αναφερθεί αρκετοί διπλασιασμοί που περιλαμβάνουν το γονίδιο *MSX2* και έχουν συσχετισθεί με κρανιοσυνοστώση (Wang et al., 2007, Kariminejad et al., 2009). Μεταλλαγές στα γονίδια *FBN1* (Fibrillin 1), *TGFBR1* (Transforming Growth Factor-beta Receptor, Type I) και *TGFBR2* (Transforming Growth Factor-beta Receptor, Type II) έχουν επίσης συσχετιστεί με κρανιοσυνοστώση, όχι όμως ως πρωτεύον κλινικό χαρακτηριστικό και πιθανόν με μειωμένη διεισδυτικότητα (Adès et al., 2006, Mizuguchi et al., 2007).

Πολύ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα επιπλέον γονίδιο, το *TCF12* (Transcription Factor 12) του οποίου μεταλλαγές συνδέονται με κρανιοσυνοστώση της στεφανιαίας ραφής, συνδρομική ή μη (Sharma et al., 2013). Μέχρι σήμερα το γονίδιο *EFNA4* (Ephrin A4) είναι ίσως το μόνο γονίδιο που έχει συνδεθεί μόνο με μη συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστώσεως της στεφανιαίας ραφής, αν και έχουν αναφερθεί ελάχιστες περιπτώσεις (Merrill et al., 2006). Επίσης, πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν μεταλλαγές του γονιδίου *FREM1* (Fras1-Related Extracellular Matrix Protein 1) που σχετίζονται με μη συνδρομική συνοστώση της μετωπιαίας ραφής. Το γονίδιο *FREM1* βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9p22.3, ελλείψεις της οποίας έχουν περιγραφεί συχνά σε περιπτώσεις συνοστώσεως της μετωπιαίας ραφής, που συνήθως όμως συνοδεύονται και από άλλα ευρήματα (συνδρομική μορφή) (Vissers et al., 2011).

## **1B.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΜΕ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ**

Έχουν αναφερθεί πάνω από 150 σύνδρομα στα οποία η κρανιοσυνοστώση αποτελεί πρωτεύον κλινικό χαρακτηριστικό (OMIM, 2012). Τα συχνότερα σύνδρομα κρανιοσυνοστώσεως είναι τα : Muenke, Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση,

Apert, Pfeiffer, Saethre-Chotzen και CFNS (Craniofrontonasal syndrome) (Πίνακας 1), ενώ σπάνια σύνδρομα με παρόμοια, όμως, κλινικά χαρακτηριστικά είναι το Beare-Stevenson και το Jackson-Weiss. Με εξαίρεση, ίσως, το σύνδρομο Apert, τα υπόλοιπα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης παρουσιάζουν ετερογένεια τόσο στα κλινικά τους χαρακτηριστικά, ακόμα και μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, όσο και στις μεταλλαγές στις οποίες οφείλονται. Το γεγονός αυτό καθιστά πολλές φορές δύσκολη την ακριβή διάγνωση, καθώς επίσης και την ανίχνευση του γενετικού αίτιου του συνδρόμου.

### **1B.2.1 Σύνδρομο Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση (*acanthosis nigricans*)**

Η κλινική εικόνα του συνδρόμου Crouzon (MIM #123500) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1912 από το Γάλλο νευρολόγο Louis Edouard Octave Crouzon, και χαρακτηρίζεται από πρόωμη συνοστέωση των κρανιακών ραφών, συνήθως της στεφαναίας αμφοτερόπλευρα, προκαλώντας βραχυκεφαλία, καθώς και από υποπλασία του προσώπου, αβαθείς οφθαλμικούς κόγχους, πρόπτωση των οφθαλμών και εξόφθαλμο (Εικόνα 7η). Εκτός της στεφαναίας ραφής μπορεί να υπάρξει συνοστέωση και άλλων ραφών ή ακόμα και πανσυνοστέωση, οδηγώντας σε σχήμα κρανίου δίκην τριφυλλιού. Η κρανιοσυνοστέωση συνήθως ολοκληρώνεται στα πρώτα 2-3 έτη της ζωής, αν και συχνά οι ραφές μπορεί να έχουν ήδη συνοστεωθεί μέχρι τη γέννηση. Συχνά αναφέρονται υπερτελορισμός, στραβισμός, προβλήματα οξύτητας της όρασης και προοδευτική υδροκεφαλία λόγω αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, ενώ δεν είναι σπάνια τα προβλήματα στην ακοή. Δεν έχουν αναφερθεί ανωμαλίες στα άκρα (δάκτυλα). Στις περισσότερες περιπτώσεις η νοητική ανάπτυξη είναι φυσιολογική (Grabb and Smith, 1997, Kimonis et al., 2007). Το σύνδρομο Crouzon οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR2* (10q26.13) (Reardon et al., 1994) και η συχνότητά του υπολογίζεται περίπου σε 1/50000 γεννήσεις (Bonaventure and Ghouzzi, 2003). Περίπου το 5% των ατόμων με σύνδρομο Crouzon εμφανίζει μελανίζουσα ακάνθωση (*acanthosis nigricans*) (αλλαγές στο χρωματισμό του δέρματος στις περιοχές των δερματικών πτυχών), σύνδρομο το οποίο χαρακτηρίζεται ως Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση (MIM #612247). Περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό κρουζονοειδές προσωπίο (*crouzonoid face*), συνοδευόμενο από μελανίζουσα ακάνθωση και οφείλεται σε μια συγκεκριμένη μεταλλαγή, την A391E, στο γονίδιο *FGFR3* (4p16.3) (Meyers et al., 1995). Η μελανίζουσα ακάνθωση μπορεί να εμφανιστεί είτε στη νεογνική περίοδο είτε αργότερα στη ζωή του ασθενούς (Johnson and Wilkie, 2011). Τα σύνδρομα Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση



κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, η πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλεται σε *de novo* μεταλλαγές στα υπεύθυνα γονίδια, οι οποίες δημιουργούνται στο σπέρμα και σχετίζονται με την αυξημένη αναπαραγωγική ηλικία του πατέρα (Glaser et al., 2000).

### **1B.2.2 Σύνδρομο Apert**

Το 1906, ο Γάλλος παιδίατρος Eugène Charles Apert περιέγραψε για πρώτη φορά ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από κраниοσυνοστέωση, υποπλασία του προσώπου, εξόφθαλμο και συμμετρική συνδακτυλία χεριών και ποδιών. Η δυσμορφία του κраниακού θόλου στους ασθενείς με σύνδρομο Apert (MIM #101200) ποικίλλει αλλά συνήθως παρατηρείται αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής, προκαλώντας πυργοβραχυκεφαλία (Εικόνα 7g,h). Τυπικά παρατηρούνται αποπλατυσμένο πρόσωπο, ρηχοί οφθαλμικοί κόγχοι, υπερτελορισμός, αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών, μύτη αποστρογγυλεμένη στο ακρορίνιο, υδροκεφαλία λόγω αυξημένης ενδοκраниακής πίεσης, σοβαρές διαταραχές στην οδοντοφυΐα καθώς και θολωτή υπερώα, ενώ συχνά συνυπάρχει σχιστία. Η συνδακτυλία στα χέρια συνήθως αφορά σε συνένωση του 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> δακτύλου, δημιουργώντας έτσι μια μάζα των μέσων δακτύλων του χεριού, στην οποία υπάρχει περίπτωση να είναι ενωμένα και το 1<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> δάκτυλο (Εικόνα 7I). Όταν ο αντίχειρας είναι ελεύθερος, είναι φαρδύς και αποκλίνει κερκιδικά. Στα πόδια, η συνδακτυλία επίσης περιλαμβάνει συνήθως το 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> δάκτυλο. Η συνδακτυλία στα χέρια είναι τόσο σοβαρή που απαιτείται χειρουργική παρέμβαση, ώστε να αποκτήσουν τα χέρια μερική λειτουργικότητα (Grab and Smith, 1997). Πολλές είναι και οι ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος που απαντώνται σε αυτό το σύνδρομο, όπως κοιλιομεγαλία, μεγαλεγκεφαλία (ενίοτε το βάρος του εγκεφάλου μπορεί να υπερβεί κατά 200-300 gr το βάρος ενός φυσιολογικού εγκεφάλου), δυσμορφίες ελίκων καθώς και ανωμαλίες στο μεσολόβιο, στο διαφανές διάφραγμα, στον υπόκαμπο και στο φλοιό του εγκεφάλου. Επιπλέον παρατηρείται νοητική υστέρηση ποικίλης σοβαρότητας. Άλλες ανωμαλίες που μπορεί να παρατηρηθούν είναι συνοστέωση σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης, αγκύλωση του αγκώνα, καρδιακές ανωμαλίες και σοβαρή αναπνευστική απόφραξη (υπνική αποφρακτική άπνοια) (Kimonis et al., 2007). Περισσότερο από 98% των περιπτώσεων του συνδρόμου Apert οφείλονται σε δυο συγκεκριμένες παρανοηματικές (missense) μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR2*, την S252W (σε ποσοστό 66%) και την P253R (σε ποσοστό 32%) (Wilkie et al., 1995, Johnson and Wilkie, 2011). Η δεύτερη μεταλλαγή έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερη

συχνότητα εμφάνισης σχιστίας της υπερώας, αλλά με ηπιότερη συνδακτυλία. Σε σπάνιες περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Apert έχουν αναφερθεί παρεμβολές Alu (Oldridge et al., 1999, Bochukova et al., 2009) ή ελλείψεις του εξονίου 10 (IIIc) του γονιδίου *FGFR2* (Bochukova et al., 2009), καθώς και η μεταλλαγή S252F (Oldridge et al., 1997, Lajeunie et al., 1999). Σχεδόν όλες οι μεταλλαγές του συνδρόμου Apert προκύπτουν *de novo* και έχει δειχθεί ότι τόσο οι μεταλλαγές όσο και οι παρεμβολές Alu προέρχονται από τον πατέρα (Moloney et al., 1996, Oldridge et al., 1999). Οι μεταλλαγές αυτές αποτελούν ένα παράδειγμα μεταλλαγών πατρικής προέλευσης σχετιζόμενη με την ηλικία του πατέρα (paternal age effect), οι οποίες εμπλουτίζονται στο σπέρμα επειδή παραδόξως προσδίδουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα μεταλλαγμένα σπερματογόνια κύτταρα στους όρχεις, λόγω του ότι πρόκειται για μεταλλαγές που οδηγούν σε ενίσχυση λειτουργίας (gain-of-function) (Yoon et al., 2009, Goriely et al., 2005). Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται περίπου σε 1/60000 γεννήσεις (Bonaventure and Ghouzzi, 2003).

### **1B.2.3 Σύνδρομο Saethre-Chotzen**

Το σύνδρομο Saethre-Chotzen (MIM #101400) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1931 από το Νορβηγό ψυχίατρο Haakon Saethre και το 1932 από το Γερμανό ψυχίατρο F. Chotzen of Breslau. Τα κύρια χαρακτηριστικά του συνδρόμου περιλαμβάνουν μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας και σπανιότερα της μετωπιαίας ή της λαμβδοειδούς ραφής, πτώση άνω βλεφάρων, υπερτελορισμό, χαμηλή έκφυση τριχοφυΐας στο μέτωπο, υποπλασία της άνω γνάθου και μικρά, δυσμορφικά αυτιά με χαμηλή πρόσφυση (Εικόνα 7p). Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρούνται ανωμαλίες των άκρων, όπως φαρδιοί, πλάγια αποκλίνοντες αντίχειρες και μεγάλα δάκτυλα κάτω άκρων, δερματική συνδακτυλία 2/3 και βραχυδακτυλία. Αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ηπίου έως μετρίου βαθμού αναπτυξιακής και νοητικής υστέρησης, η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών παρουσιάζει φυσιολογική νοημοσύνη (Cunningham et al., 2007, Johnson and Wilkie, 2011). Υπεύθυνες για το σύνδρομο Saethre-Chotzen είναι μεταλλαγές ή ελλείψεις του γονιδίου *TWIST1* (7p21.1) (Howard et al., 1997, el Ghouzzi et al., 1997, Johnson et al., 1998). Γενικά δεν έχει περιγραφεί συσχέτισμός γονοτύπου-φαινοτύπου, παρά μόνο ότι οι μεγάλες ελλείψεις σχετίζονται με μαθησιακές δυσκολίες (Johnson et al., 1998, Kress et al., 2006). Το σύνδρομο Saethre-Chotzen κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και οι μεταλλαγές στις οποίες οφείλεται προκύπτουν *de novo*. Σε κάποιες μελέτες η συχνότητα του συνδρόμου

εκτιμάται περίπου σε 1/100000 γεννήσεις (Bonaventure and Ghouzzi, 2003), σε άλλες 1/25000-1/50000 (Howard et al., 1997).

#### **1B.2.4 Σύνδρομο Muenke**

Το σύνδρομο Muenke (MIM #602849) καθορίζεται από την ύπαρξη της μεταλλαγής P250R στο γονίδιο *FGFR3* (4p16) και η μοριακή διάγνωση είναι απαραίτητη για το χαρακτηρισμό του (Bellus et al., 1996, Muenke et al., 1997). Όσον αφορά στην κλινική του εικόνα παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, ακόμα και μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων (Escobar et al., 2009), με κυριότερο χαρακτηριστικό την μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου, παρά την ύπαρξη της μεταλλαγής, δεν υπήρχε κρανιοσυνοστέωση, παρά μόνο μακροκεφαλία ή ακόμα και φυσιολογικό μέγεθος κεφαλής (Muenke et al., 1997). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και ασυμπτωματικοί ασθενείς με σύνδρομο Muenke, χωρίς καθόλου κλινικά ή ακτινολογικά ευρήματα (Robin et al., 1998). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί υποπλασία μέσου προσώπου, πτώση και αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών. Σε αρκετές περιπτώσεις υπάρχουν ευρήματα στα άκρα, όπως συνοστέωση οστών ταρσού και καρπού, βραχυδακτυλία, κλινοδακτυλία και φαρδιά μεγάλα δάκτυλα των κάτω άκρων. Ένα επιπλέον σημαντικό κλινικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου Muenke είναι η ήπια έως μετρίου βαθμού νευροαισθητήρια απώλεια της ακοής στις χαμηλές συχνότητες (Muenke et al., 1997, Doherty et al., 2007). Αναπτυξιακή και νοητική υστέρηση απαντάται επίσης σε κάποιες περιπτώσεις (Muenke et al., 1997). Αν και η συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής αποτελεί το βασικότερο χαρακτηριστικό του συνδρόμου, έχει αναφερθεί περίπτωση ασθενούς που έφερε τη μεταλλαγή P250R με τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής και προβλήματα στην ακοή (van der Meulen et al., 2006) και σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες κάποιες (λαμβδοειδής, στεφανιαία και λαμβδοειδής και/ή οβελιαία) ή όλες οι ραφές ήταν συνοστεωμένες (Doherty et al., 2007). Το σύνδρομο Muenke κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Έχουν αναφερθεί τόσο σποραδικές όσο και οικογενείς περιπτώσεις και σε όλες τις περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα η *de novo* μεταλλαγή είναι πατρικής προέλευσης (Rappan-Eliya et al., 2004). Λόγω της ετερογένειας και του συχνά ήπιου φαινοτύπου του συνδρόμου Muenke, η κλινική διάγνωση καθίσταται δύσκολη, χωρίς την επιβεβαίωση της ύπαρξης της μεταλλαγής P250R. Πολλές περιπτώσεις με σύνδρομο Muenke, όταν έχει πραγματοποιηθεί μόνο κλινική εξέταση, χαρακτηρίζονται λανθασμένα ως Crouzon, Pfeiffer και συχνότερα Saethre-Chotzen

ή ακόμα και ως μη συνδρομική συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής. Αν και υπάρχει μεγάλη φαινοτυπική αλληλεπικάλυψη μεταξύ των συνδρόμων Muenke και Saethre-Chotzen, η κλινική διάγνωση πρέπει να εστιάζει στην ύπαρξη αναπτυξιακής και νοητικής υστέρησης και νευροαισθητήριας απώλειας της ακοής στις χαμηλές συχνότητες (χαρακτηριστικά του συνδρόμου Muenke) και στη χαμηλή έκφυση τριχοφυΐας στο μέτωπο, πτώση άνω βλεφάρων, χαρακτηριστικό, μικρό αυτί και δερματική συνδακτυλία 2/3 (χαρακτηριστικά του συνδρόμου Saethre-Chotzen), προκειμένου να γίνει σωστή διάκριση (Kress et al., 2006). Η μοριακή επιβεβαίωση του συνδρόμου είναι πολύ σημαντική, όχι μόνο για την κατάλληλη γενετική συμβουλευτική, αλλά και για την κλινική και μετεγχειρητική πορεία του ασθενούς, μετά την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής. Περίπου το 20% των ασθενών με σύνδρομο Muenke χρειάζεται επανεγχείρηση λόγω αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, σε αντίθεση με ασθενείς με συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής που δεν φέρουν τη μεταλλαγή (Thomas et al., 2005, Dr. Αλέξανδρος Στρατουδάκης, MD, προσωπική επικοινωνία).

Αν και σε κάποιες μελέτες η συχνότητα του συνδρόμου Muenke εκτιμάται περίπου σε 1/50000 γεννήσεις (Bonaventure and Ghouzzi, 2003), σε άλλες παλιότερες αλλά και πιο πρόσφατες μελέτες η συχνότητα της μεταλλαγής P250R υπολογίζεται σε 1/30000 (Moloney et al., 1997, Rannan-Eliya et al., 2004, Wilkie et al., 2010). Εκτιμάται ότι περίπου το 30% των παιδιών με συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής και το 6-8% όλων των ασθενών με κρανιοσυνοστέωση φέρουν αυτή τη μεταλλαγή (Morriss-Kay and Wilkie, 2005, Wilkie et al., 2006).

### **1B.2.5 Σύνδρομο Pfeiffer**

Το σύνδρομο Pfeiffer (MIM #101600) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1964 από το Γερμανό γενετιστή Rudolf Arthur Pfeiffer και χαρακτηρίζεται κυρίως από πρόωρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής και ενίοτε της λαμβδοειδούς και της οβελιαίας καθώς και από φαρδιούς και κοντούς αντίχειρες και μεγάλα δάκτυλα κάτω άκρων, που αποκλίνουν κερκιδικά (Εικόνα 7k). Τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου αποτελούν η πυργοβραχυκεφαλία, η υποπλασία μέσου προσώπου, ο υπερτελορισμός, ο εξόφθαλμος, οι ρηχοί οφθαλμικοί κόγχοι, η αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών, η μικρή μύτη με χαμηλή ρινική άκανθα και η δερματική συνδακτυλία 2/3 στα δάκτυλα των άνω και κάτω άκρων. Επιπλέον ανωμαλίες που πιθανόν να παρατηρηθούν είναι νοητική υστέρηση, υδροκεφαλία λόγω στένωσης υδραγωγού, χαμηλή πρόσφυση αυτιών, ατρησία του έξω ακουστικού πόρου και δυσχέρεια στην αναπνοή. Με βάση τη σοβαρότητα του φαινοτύπου το σύνδρομο

Pfeiffer διαιρείται σε τρεις κλινικούς υποτύπους. Το τύπου 1 ή «κλασικό» σύνδρομο Pfeiffer περιλαμβάνει άτομα με ήπια χαρακτηριστικά, κυρίως βραχυκεφαλία, υποπλασία μέσου προσώπου και ανωμαλίες στα δάκτυλα των άνω και κάτω άκρων. Συνδέεται με φυσιολογική νευρολογική και νοητική ανάπτυξη και γενικά έχει καλή πρόγνωση. Το τύπου 2 σύνδρομο Pfeiffer περιλαμβάνει σχήμα κρανίου δίκην τριφυλλιού λόγω πολλαπλών συνοστεώσεων των κρανιακών ραφών, σοβαρή πρόπτωση, ανωμαλίες στα δάκτυλα των άνω και κάτω άκρων, αγκύλωση ή συνοστέωση του αγκώνα, αναπτυξιακή υστέρηση και νευρολογικές επιπλοκές. Το τύπου 3 σύνδρομο Pfeiffer είναι παρόμοιο με το τύπου 2, αλλά χωρίς το σχήμα κρανίου δίκην τριφυλλιού. Οι τύποι 2 και 3 έχουν παρατηρηθεί μόνο σε σποραδικές περιπτώσεις και έχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου λόγω σοβαρών νευρολογικών και αναπνευστικών επιπλοκών (Vogels and Fryns, 2006, Cunningham et al., 2007, Johnson and Wilkie, 2011). Στην πλειοψηφία των ασθενών με σύνδρομο Pfeiffer έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR2* (Schell et al., 1995), αν και σε ένα μικρό αριθμό ασθενών με σύνδρομο Pfeiffer τύπου 1 (ήπιος φαινότυπος) έχει βρεθεί η μεταλλαγή P252R στο γονίδιο *FGFR1* (8p11.23-p11.22) που αντιστοιχεί σε ποσοστό μικρότερο του 10% όλων των περιπτώσεων συνδρόμου Pfeiffer (Muenke et al., 1994, Johnson & Wilkie, 2011). Αν και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *FGFR2* που προκαλούν το σύνδρομο Pfeiffer αλληλεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό με αυτές που προκαλούν το σύνδρομο Crouzon, η πλειοψηφία των περιπτώσεων με σύνδρομο Pfeiffer σοβαρής μορφής, οφείλονται σε μια μικρή υποομάδα μεταλλαγών, W290C, Y340C, C342R και S351C (Johnson and Wilkie, 2011). Το σύνδρομο Pfeiffer κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και η συχνότητά του υπολογίζεται περίπου σε 1/100000 γεννήσεις (Vogels and Fryns, 2006). Έχουν αναφερθεί τόσο σποραδικές όσο και οικογενείς περιπτώσεις και σε όλες τις περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα η *de novo* μεταλλαγή είναι πατρικής προέλευσης (Glaser et al., 2000).

#### **1B.2.6 Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS: Craniofrontonasal syndrome)**

Το Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979 από τον Cohen MM Jr, ο οποίος χρησιμοποίησε τον όρο κρανιομετωπορινική δυσπλασία (Young, 1987). Στα θήλεα άτομα τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν κρανιοπροσωπική ασυμμετρία, σοβαρού βαθμού υπερτελορισμό, μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής, στραβισμό, αντιμογγολοειδή θέση των έξω κανθών, φαρδιά, δισχιδή μύτη (Εικόνα 7ο), νύχια αυλακωμένα στον επιμήκη άξονα (Εικόνα 7m), ανώμαλο θώρακα, κλείδα και ωμοπλάτη. Συχνά παρατηρείται τριγωνική προβολή του

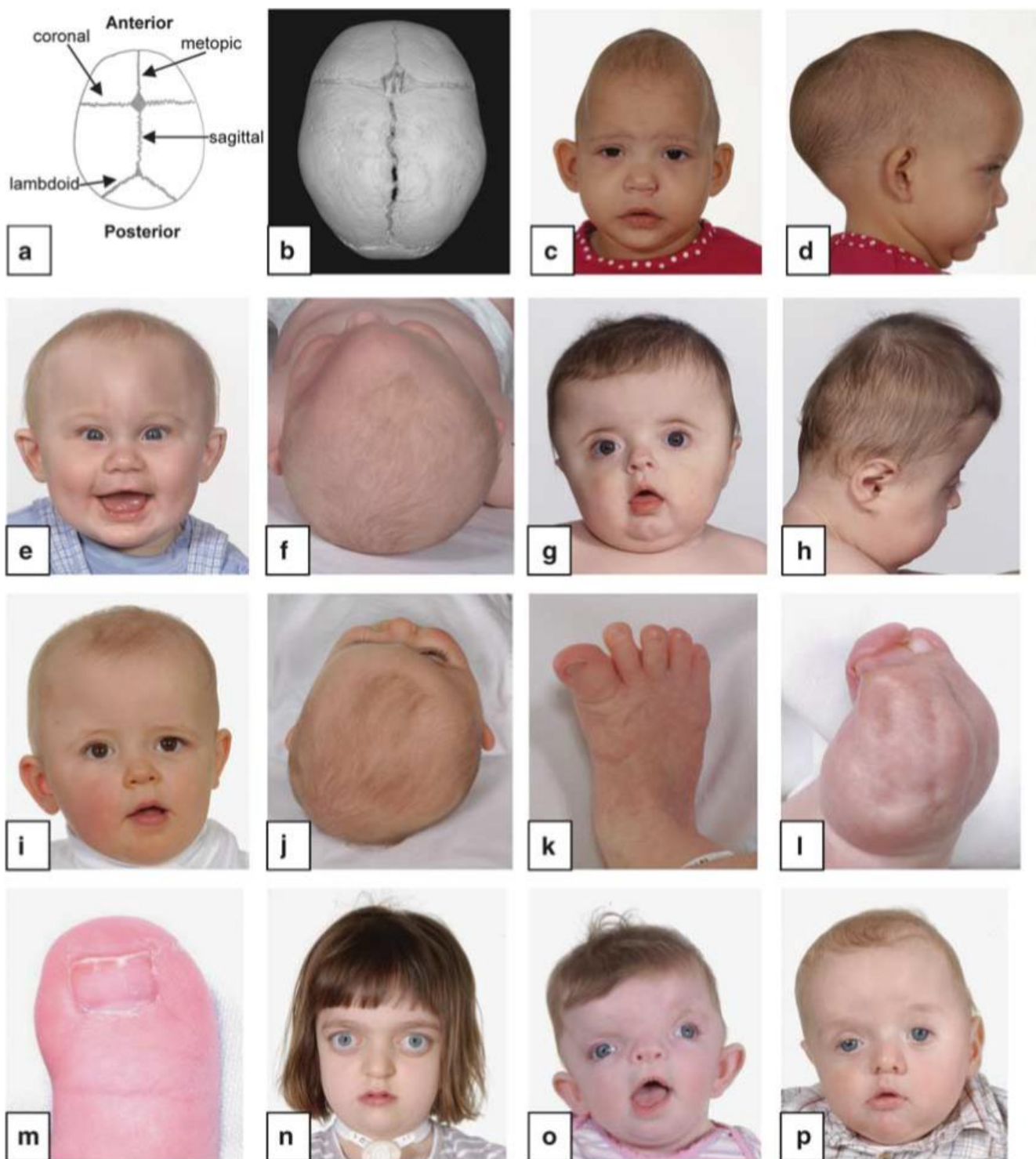
τριχωτού της κεφαλής στη μέση γραμμή, ήπια δερματική συνδακτυλία και, περιστασιακά, σχιστία χείλους και υπερώας, διπλασιασμό του αντίχειρα ή του μεγάλου δάκτυλου του ποδιού, μονόπλευρη υποπλασία του στήθους, ομφαλοκήλη και διαφραγματοκήλη. Στα άρρενα άτομα δεν παρατηρούνται καθόλου ή παρατηρούνται ήπια κλινικά χαρακτηριστικά, όπως ο υπερτελορισμός. Δεδομένου ότι το Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο ακολουθεί τον επικρατή, συνδεδεμένο με το Χ (X-linked) τύπο κληρονομιάς, το γεγονός ότι η κλινική εκδήλωσή του στα ετερόζυγα θήλεα άτομα είναι πολύ πιο σοβαρή από ότι στα ημίζυγα άρρενα αποτελεί ένα παράδοξο για αυτόν τον τύπο κληρονομικότητας (Wieland et al., 2004, Twigg et al., 2004, Vasudevan et al., 2006). Το Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *EFNB1* (Χq12-Χq13.1) (Wieland et al., 2004, Twigg et al., 2004) και σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί ελλείψεις που περιλαμβάνουν τμήμα ή και ολόκληρο το γονίδιο *EFNB1* (Twigg et al., 2006, Wieland et al., 2007). Η συχνότητα του συνδρόμου υπολογίζεται περίπου σε 1/120000 γεννήσεις. Έχουν αναφερθεί τόσο οικογενείς όσο και σποραδικές περιπτώσεις, στις οποίες η *de novo* μεταλλαγή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (92%) είναι πατρικής προέλευσης, όχι όμως αποκλειστικά (Twigg et al., 2006).

#### **1B.2.7 Σπάνια σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης Beare-Stevenson και Jackson-Weiss**

Το σύνδρομο Beare-Stevenson χαρακτηρίζεται από κρανιοσυνοστέωση, κρανιοπροσωπική δυσμορφία, δερματικές ανωμαλίες, όπως δερματικές πτυχές (*cutis gyrate*) που φέρουν τρίχωμα και μελανίζουσα ακάνθωση (*acanthosis nigricans*), ανωμαλίες στα δάκτυλα και πρόωρο θάνατο. Το σύνδρομο Jackson-Weiss έχει παρόμοια κρανιοπροσωπικά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο Crouzon, αλλά υπάρχει μεγαλύτερη ποικιλία στο είδος της συνοστέωσης και συνοδεύεται από ανωμαλίες στα κάτω άκρα, όπως φαρδιά μεγάλα δάκτυλα των ποδιών και συνοστέωση ταρσού/μεταταρσού. Τα σύνδρομα αυτά κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και οφείλονται σε *de novo* μεταλλάξεις του γονιδίου *FGFR2* (Przylera et al., 1996, Meyers et al., 1996).

**Πίνακας 1:** Τα κυριότερα σύνδρομα κρανιοσυστονώσεως

ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗΚΕ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	ΚΥΡΙΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<b>Crouzon</b> OMIM: 123500 <b>Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση</b> OMIM: 612247	1912	1/50000	<b>FGFR2</b> (10q26) <b>FGFR3</b> (4p16) Μεταλλαγή A391E	Κρουζονοειδές πρόσωπο, <b>αμφοτερόπλευρη συστονώση στεφανιαίας ραφής</b> /πολλαπλή, βραχυκεφαλία, υποπλασία του προσώπου, αβαθείς οφθαλμικοί κόγχοι, πρόπτωση, εξόφθαλμος, υπερτελορισμός / <b>μελανίζουσα ακάνθωση</b>
<b>Apert</b> OMIM: 101200	1906	1/60000	<b>FGFR2</b> (10q26) Μεταλλαγές S252W (66%) P253R (32%)	<b>Αμφοτερόπλευρη συστονώση στεφανιαίας ραφής</b> , πυργοβραχυκεφαλία, υποπλασία προσώπου, εξόφθαλμος, υπερτελορισμός, πλατυπροσωπία, αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών, <b>συμμετρική σύνθετη συνδακτυλία άνω και κάτω άκρων</b> , νοητική υστέρηση
<b>Pfeiffer</b> OMIM: 101600	1964	1/100000	<b>FGFR2</b> (10q26) <b>FGFR1</b> (8p11) Μεταλλαγή P252R	<b>Συστονώση στεφανιαίας ραφής</b> /πολλαπλή, υποπλασία μέσου προσώπου, υπερτελορισμός, εξόφθαλμος, αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών, <b>φαρδιοί, αποκλίνοντες αντίχειρες και/ή μεγάλα δάκτυλα κάτω άκρων</b> , <b>δερματική συνδακτυλία 2/3</b>
<b>Muenke</b> OMIM: 602849	1996	1/30000 - 1/50000	<b>FGFR3</b> (4p16) Μεταλλαγή P250R	<b>Μεγάλη ετερογένεια, συστονώση στεφανιαίας ραφής</b> , συχνά συστονώση καρπού και ταρσού, βραχυδακτυλία, κλινοδακτυλία, φαρδιά μεγάλα δάκτυλα των κάτω άκρων, ήπια έως μετρίου βαθμού νευροαισθητήρια απώλεια της ακοής στις χαμηλές συχνότητες
<b>Saethre-Chotzen</b> OMIM:101400	1931	1/50000	<b>TWIST1</b> (7p21)	<b>Συστονώση στεφανιαίας ραφής</b> , χαμηλή έκφυση τριχοφυΐας στο μέτωπο, υπερτελορισμός, πτώση άνω βλεφάρων, χαρακτηριστικό, μικρό αυτί, <b>δερματική συνδακτυλία 2/3</b> , φαρδιοί, αποκλίνοντες αντίχειρες και μεγάλα δάκτυλα κάτω άκρων
<b>Κρανιομετωπορινικό (CFNS)</b> OMIM: 304110	1979	1/120000	<b>EFNB1</b> (Xq12- Xq13.1)	<b>Θήλεα άτομα : συστονώση της στεφανιαίας ραφής</b> , κρανιοπροσωπική ασυμμετρία, υπερτελορισμός, , αντιμογγολοειδής θέση των έξω κανθών, στραβισμός, φαρδιά, δισχιδής μύτη, νύχια αυλακωμένα στον επιμήκη άξονα, συχνά <b>ανώμαλος θώρακας</b> , ήπια <b>δερματική συνδακτυλία</b> . <b>Άρρενα άτομα :</b> καθόλου ή ήπια κλινικά χαρακτηριστικά (υπερτελορισμός)



**Εικόνα 7:** Διαγνωστικά χαρακτηριστικά κρανιοσυνostέωσης. (a) Σχηματική απεικόνιση των ραφών του κρανίου. (b) Αξονική τομογραφία του κρανίου. (c,d) Συνοστέωση της οβελιαίας ραφής. (e,f) Συνοστέωση της μετωπιαίας ραφής. (g,h) Αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής. (i,j) Συνοστέωση της δεξιάς στεφανιαίας ραφής. (k-m) Συγγενείς ανωμαλίες ποδιών ή χεριών χαρακτηριστικές των συνδρόμων Pfeiffer (k), Apert (l) και CFNS (m). (n) Κρουζονοειδής εμφάνιση προσώπου. (o) Σοβαρός υπερτελορισμός, αυλακωμένο ακρορίνιο και συνοστέωση αριστερής στεφανιαίας ραφής στο CFNS. (p) Πτώση και συνοστέωση αριστερής στεφανιαίας ραφής στο σύνδρομο Saethre-Chotzen (Johnson and Wilkie, 2011).

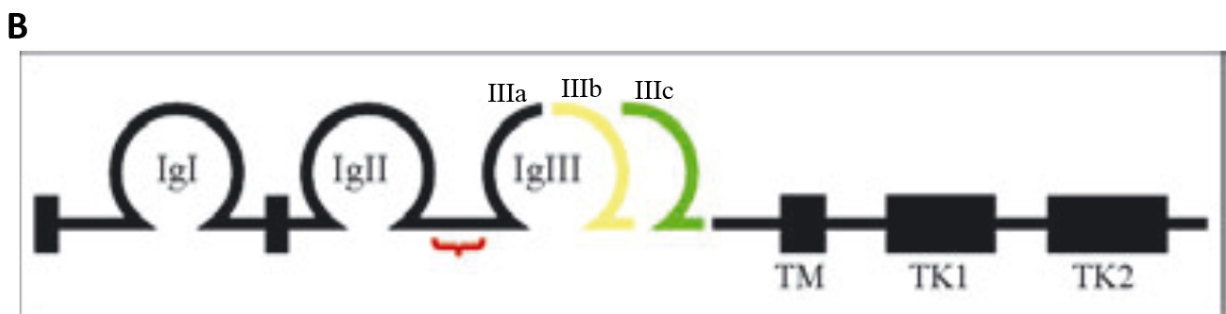
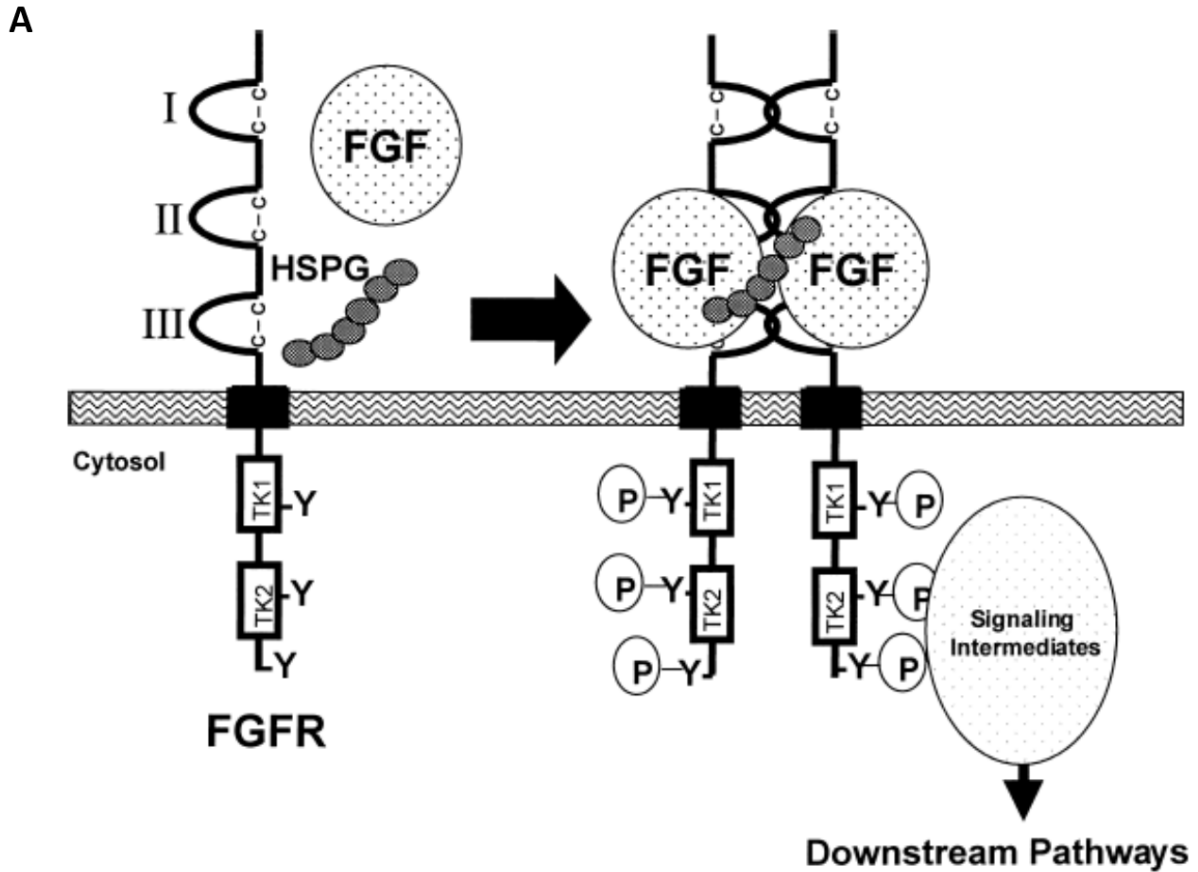


### **1B.3 ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ: ΥΠΕΥΘΥΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ, ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Τα γονίδια που μεταλλάσσονται πιο συχνά σε περιπτώσεις κρανιοσυνοστεώσεως είναι τα *FGFR2* (σε ποσοστό 32% όλων των γενετικών περιπτώσεων), *FGFR3* (25%), *TWIST1* (19%) και *EFNB1* (7%).

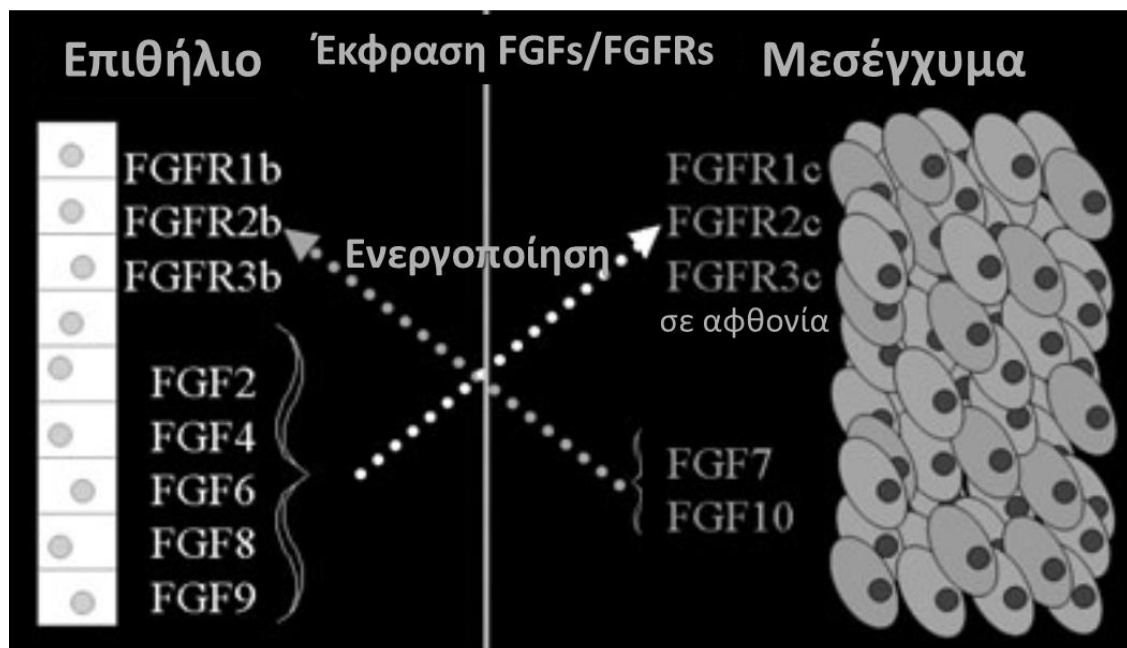
#### **1B.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ (FGFRs)**

Η οικογένεια των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) και αποτελείται από 4 μέλη (*FGFR1-4*). Κάθε υποδοχέας αποτελείται από 3 εξωκυττάριας περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (IgI, IgII και IgIII), μια μονής διάβασης διαμεμβρανική περιοχή (TM) και μια διαιρεμένη ενδοκυττάρια περιοχή κινάσης τυροσίνης (TK1/TK2). Οι θηλιές IgII και IgIII είναι κρίσιμες για την πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGFs), οι οποίοι αποτελούν τα μόρια-προσδέτες για τους FGFRs. Η δημιουργία ενός τριμοριακού συμπλόκου που περιλαμβάνει ένα μόριο αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), ένα μόριο υποδοχέα (FGFR) και ένα μόριο πρωτεογλυκάνης (heparan sulfate proteoglycan) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, είναι απαραίτητο για το διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, με συνέπεια την ενεργοποίησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μεταγωγής σήματος μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, που ελέγχουν κατά περίπτωση διάφορες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση (Εικόνα 8A). Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGFs) αποτελούν μια οικογένεια 22 δομικά παρόμοιων, μιτογόνων πολυπεπτιδίων και η σηματοδότηση που προάγουν, μέσω των υποδοχέων τους, παίζει πολύ κρίσιμο ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην οργανογένεση (Eswarakumar et al., 2005).



**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση των FGFRs. Κάθε υποδοχέας αποτελείται από 3 εξωκυττάριας περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (IgI, IgII και IgIII), μια μονής διάβασης διαμεμβρανική περιοχή (TM) και μια διαιρεμένη ενδοκυττάρια περιοχή κινάσης τυροσίνης (TK1/TK2). Η δημιουργία ενός τριμοριακού συμπλόκου που περιλαμβάνει ένα μόριο αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), ένα μόριο υποδοχέα (FGFR) και ένα μόριο πρωτεογλυκάνης (HSPG) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, είναι απαραίτητο για το διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, με συνέπεια την ενεργοποίησή του (A). Η θηλιά IgIII των FGFR1, 2 και 3 κωδικοποιείται από δύο εξόνια: το εξόνιο IIIa, το οποίο υπάρχει πάντα, και ένα από τα δύο εξόνια IIIb ή IIIc, δημιουργώντας έτσι 2 διαφορετικές ισομορφές για τον κάθε υποδοχέα, την ισομορφή b ή c, αντίστοιχα (B) (Cunningham et al, 2007).

Η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης μέσω των FGFRs ενισχύεται από την ποικιλία των ισομορφών που προκύπτουν λόγω εναλλακτικής συρραφής (alternative splicing) των μεταγράφων των FGFRs. Η σημαντικότερη εναλλακτική συρραφή είναι αυτή που συμβαίνει μεταξύ των εξονίων που κωδικοποιούν το C-τελικό μισό της τρίτης θηλιάς Ig (IgIII) των FGFR1, 2 και 3, αλλά όχι του FGFR4, και οδηγεί σε αλλαγή στην ειδικότητα πρόσδεσης των μορίων-προσδετών. Σε αυτούς τους τρεις υποδοχείς, η θηλιά IgIII κωδικοποιείται από δύο εξόνια: το εξόνιο IIIa, το οποίο υπάρχει πάντα, και ένα από τα δύο εξόνια IIIb ή IIIc, δημιουργώντας έτσι δύο διαφορετικές ισομορφές για τον κάθε υποδοχέα, την ισομορφή b ή c, αντίστοιχα (Εικόνα 8B). Οι καλύτερα μελετημένες ισομορφές είναι αυτές του FGFR2: η FGFR2b εκφράζεται κυρίως στα επιθήλια και ενεργοποιείται από μόρια-προσδέτες (FGFs) που συντίθενται ως επί το πλείστον στο μεσέγχυμα, ενώ η FGFR2c, η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία, απαντάται κυρίως στο μεσέγχυμα και αναγνωρίζει ως επί το πλείστον επιθηλιακά FGFs (Εικόνα 9) (Passos-Bueno et al., 2008, Eswarakumar et al., 2005).



**Εικόνα 9:** Έκφραση των ισομορφών b και c των υποδοχέων FGFR και των μορίων FGF που τους ενεργοποιούν (Cunningham et al, 2007).

Το γονίδιο *FGFR1* αποτελείται συνολικά από τουλάχιστον 21 εξόνια, το *FGFR2* από τουλάχιστον 22 εξόνια και το *FGFR3* από τουλάχιστον 19 εξόνια, τα οποία υπόκεινται σε εναλλακτική συρραφή, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών ισομορφών. Οι πρωτεϊνικές ισομορφές που απαντώνται πιο συχνά κωδικοποιούνται από 18 εξόνια και

περιλαμβάνουν περισσότερα από 800 αμινοξέα η καθεμία (NCBI, Ensembl, Genatlas, Ingersoll et al., 2001).

### **Μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR***

Όλες οι παθολογικές μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR1–3* που σχετίζονται με κρανιοσυνοστέωση δρουν επικρατώς και προσδίδουν ενίσχυση λειτουργίας στον μεταλλαγμένο υποδοχέα, μέσω διαφορετικών μηχανισμών: 1) διμερισμό και ενεργοποίηση του υποδοχέα, ανεξάρτητα από τους FGFs, 2) αυξημένη πρόσδεση των FGFs, 3) απώλεια της ειδικότητας πρόσδεσης των FGFs και 4) έκτοπη έκφραση κάποιας ισομορφής (Passos-Bueno et al., 2008).

### ***FGFR1***

Η πλειοψηφία των μεταλλαγών στο γονίδιο *FGFR1*, οι οποίες προκαλούν απώλεια λειτουργίας (loss of function), οδηγούν σε ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, IHH), μια σπάνια γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από απουσία ή ατελή σεξουαλική ωρίμανση, η οποία όταν συνοδεύεται από ανοσμία ονομάζεται σύνδρομο Kallmann (KS) (Raivio et al., 2009). Μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR1* απαντώνται επίσης σε ασθενείς με οστεογλοφονική δυσπλασία (osteoglophonic dysplasia), μια διαταραχή με κοινά χαρακτηριστικά σύνδρομων κρανιοσυνοστέωσης και νανισμού, όπως πρόωρη συνοστέωση των κρανιακών ραφών, προβάλλουσες υπερκόγχιες προεξοχές, χαμηλή ρινική άκανθα, ριζομελικό νανισμό και μη οστεοποιές οστικές βλάβες (White et al., 2005). Η πιο συχνή, ενεργοποιητική μεταλλαγή στον *FGFR1* είναι η p.Pro252Arg (c.755C>G) στο τμήμα που ενώνει τις περιοχές IgII και IgIII. Η μεταλλαγή αυτή έχει βρεθεί σε ετεροζυγωτία σε λίγες περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Pfeiffer (Muenke et al, 1994, Vogels & Fryns, 2006) και σε μια περίπτωση συνδρόμου Jackson-Weiss (Roscioli et al., 2000). Εκτός από τις συνδρομικές περιπτώσεις, έχει βρεθεί και μια μεταλλαγή στον *FGFR1*, η p.Ile300Thr (c.899T>C), σε μια περίπτωση μη συνδρομικής τριγωνοκεφαλίας (Εικόνα10) (Kress et al., 2000a).

### ***FGFR2***

Περίπου το 90% των συνδρόμων κρανιοσυνοστέωσης Apert, Crouzon, Pfeiffer και Jackson-Weiss και το 9% όλων των περιπτώσεων κρανιοσυνοστέωσης οφείλεται σε μεταλλαγές στον *FGFR2* (Εικόνα 10) (Passos-Bueno et al., 2008, Johnson & Wilkie, 2011).

Η πλειοψηφία των μεταλλαγών στο γονίδιο *FGFR2* είναι παρανοηματικές (missense) (μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 85 αμινοξικές αλλαγές) ή στις θέσεις συρραφής (splice-site type) (μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 16), ενώ έχουν αναφερθεί και μικρές ή μεγάλες ελλείψεις ή/και παρεμβολές (HGMD, τελευταία πρόσβαση 05/2015). Αρκετές από τις παρανοηματικές μεταλλαγές (~21%) είτε καταστρέφουν είτε δημιουργούν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Η ύπαρξη ενός ελεύθερου, εκτεθειμένου καταλοίπου κυστεΐνης μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, το διμερισμό και τη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα ανεξάρτητα από την ύπαρξη των μορίων-προσδετών (Wilkie et al., 1995b, Mangasarian et al., 1997). Μόνο στον *FGFR2* έχουν βρεθεί μεταλλαγές στις περιοχές IgI και IgII. Στην περιοχή IgI έχει αναφερθεί η μεταλλαγή p.Tyr105Cys (c.314A>G) που σχετίζεται με σπάνιες περιπτώσεις Crouzon (Pulleyn et al., 1996, Kan et al., 2002), ενώ στην περιοχή IgII έχει αναφερθεί η μεταλλαγή p.Ala172Phe (c.514-515GC>TT) που σχετίζεται με το σύνδρομο Pfeiffer. Η μεταλλαγή αυτή είναι ιστορικής σημασίας γιατί υπάρχει στην οικογένεια που περιγράφηκε αρχικά από τον Pfeiffer (1964), δίνοντας στο σύνδρομο το όνομά του (Kan et al., 2002).

Οι δύο πιο συχνές μεταλλαγές στο τμήμα που ενώνει τις περιοχές IgII και IgIII του *FGFR2* είναι οι p.Ser252Trp (c.755C>G) και p.Pro253Arg (c.758C>G), οι οποίες προκαλούν το 66% και 32.2% των περιπτώσεων συνδρόμου Apert, αντίστοιχα. Έχουν αναφερθεί σπάνιες περιπτώσεις μεταλλαγών των δύο αυτών αμινοξικών θέσεων με πολύ διαφορετικό φαινότυπο: συγκεκριμένα η p.Ser252Leu (c.755C>T) βρέθηκε σε ένα αγόρι με ήπιο Crouzon, καθώς επίσης και σε 3 φυσιολογικά άτομα της οικογένειάς του, η p.Ser252Phe (c.755-756CG>TT) σε έναν ασθενή με Apert και η διπλή αμινοξική αλλαγή p.Ser252Phe/Pro253Ser (c.755-757CGC>TCT) σε έναν ασθενή με ήπιο Pfeiffer (Oldridge et al., 1997).

Έχει δειχθεί ότι οι μεταλλαγές p.Ser252Trp και p.Pro253Arg προσδίδουν ενίσχυση λειτουργίας στον μεταλλαγμένο υποδοχέα, μέσω 2 διαφορετικών μηχανισμών: αυξημένη συνάφεια για πρόσδεση των FGFs και απώλεια της ειδικότητας πρόσδεσης των FGFs (Ibrahimi et al., 2004b).

Οι ανάλογες με τη μεταλλαγή p.Pro253Arg στον *FGFR2*, p.Pro252Arg στον *FGFR1* και p.Pro250Arg στον *FGFR3*, δρουν με παρόμοιο μηχανισμό, οδηγώντας σε αυξημένη συνάφεια για πρόσδεση των FGFs (Ibrahimi et al., 2004a).

Η πλειοψηφία των μεταλλαγών (94%) στο γονίδιο *FGFR2* συγκεντρώνονται στην IgIII θηλιά του υποδοχέα, η οποία κωδικοποιείται από τα εξόνια IIIa (εξόνιο 8) και IIIc (εξόνιο 10) (για την *FGFR2c* ισομορφή). Οι υπόλοιπες μεταλλαγές που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα

βρίσκονται διεσπαρμένες σε άλλα 7 εξόνια του γονιδίου, αρκετές εκ των οποίων απαντώνται στην περιοχή κινάσης τυροσίνης (TK1/TK2) (εξόνια 14-17) (Kan et al., 2002). Στη διαμεμβρανική περιοχή του FGFR2 έχει αναφερθεί μόνο μια μεταλλαγή (p.Gly384Arg, c.1150G>A), η οποία σχετίζεται με κраниσυνοστέωση, χωρίς όμως να μπορεί να προσδιοριστεί κάποιο γνωστό σύνδρομο (Pulleyn et al., 1996).

Αν και ορισμένες μεταλλαγές έχουν συσχετισθεί με περισσότερα από ένα σύνδρομα, και υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των μεταλλαγών που προκαλούν τα σύνδρομα Pfeiffer και Crouzon, σε αρκετές περιπτώσεις είναι εφικτός ο συσχετισμός γονοτύπου-φαινοτύπου. Για παράδειγμα, το σύνδρομο Crouzon συνδέεται στενά με αντικαταστάσεις στις αμινοξικές θέσεις (κατάλοιπα) p.Ser267, p.Cys278, p.Gln289, p.Gly338, p.Cys342, p.Ala344, p.Ser347 και p.Ser354, ενώ από την άλλη πλευρά σοβαρές περιπτώσεις συνδρόμου Pfeiffer σχετίζονται συχνότερα με μεταλλαγές στα κατάλοιπα p.Trp290, p.Tyr340, p.Cys342 και p.Ser351, όταν αυτά αντικαθίστανται από μια κυστεΐνη ή όταν χάνεται ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Στην εκδήλωση του φαινοτύπου δεν παίζει ρόλο μόνο ποιο κατάλοιπο αντικαθίσταται αλλά και από ποιο αμινοξύ, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι η αλλαγή των p.Trp290 και p.Tyr340 σε διαφορετικό αμινοξύ από κυστεΐνη (p.Trp290Arg/Gly, p.Tyr340His/Ser) προκαλεί σύνδρομο Crouzon και όχι Pfeiffer (Lajeunie et al., 2006). Μεταλλαγές σε κάποια από αυτά τα κατάλοιπα (π.χ. p.Cys342, p.Ala344) ορισμένες φορές μπορούν να οδηγήσουν και στο σύνδρομο Jackson-Weiss (Meyers et al., 1996). Δύο κοντινές μεταλλαγές (p.Ser372Cys και p.Tyr375Cys) στην περιοχή που ενώνει την IgIII με το διαμεμβρανικό τμήμα του FGFR2 έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Beare-Stevenson (Przylera et al., 1996). Η μεταλλαγή p.Tyr375Cys έχει βρεθεί επίσης σε μια περίπτωση με σοβαρή κλινική εικόνα συνδρόμου Pfeiffer (Kan et al., 2002).

Μια ενδιαφέρουσα κατηγορία μεταλλαγών στον FGFR2 είναι αυτές που σχετίζονται με την εναλλακτική συρραφή και συνδέονται κυρίως με το σύνδρομο Pfeiffer και συχνά με πιο σοβαρές ανωμαλίες στα άκρα (Passos-Bueno et al., 2008, Cornejo-Roldan et al., 1999). Μια επιπλέον ενδιαφέρουσα κατηγορία μεταλλαγών είναι η παρεμβολή στοιχείων Alu (Alu-element) ανοδικά (upstream) ή εντός του εξονίου IIIc (εξόνιο 10) του γονιδίου *FGFR2* σε 3 περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Apert (Oldridge et al., 1999, Bochukova et al., 2009). Τόσο οι μεταλλαγές συναρμογής που βρίσκονται ανοδικά του εξονίου 10 (ιντρόνιο 9) και έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Pfeiffer όσο και οι παρεμβολές Alu ανοδικά ή εντός του εξονίου IIIc, οι οποίες οδηγούν, επίσης, σε ανώμαλη συρραφή του εξονίου IIIc δρουν επικρατώς. Προσδίδουν ενίσχυση λειτουργίας στον μεταλλαγμένο υποδοχέα μέσω

ενός κοινού μηχανισμού που έχει ως αποτέλεσμα την έκτοπη έκφραση της FGFR2b μορφής σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης (Lajeunie et al., 2006, Oldridge et al., 1999, Bochukova et al., 2009).

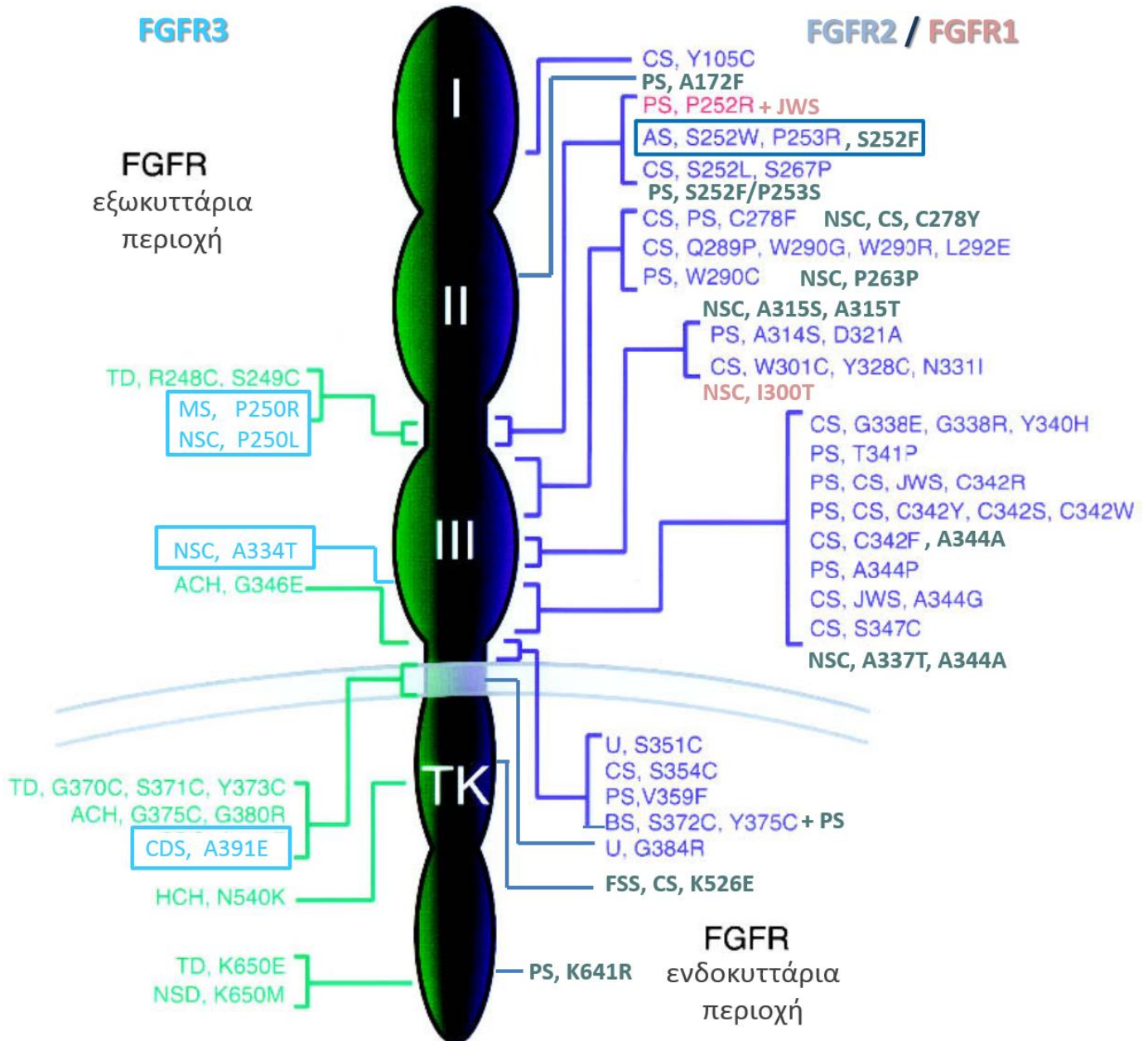
Η πλειοψηφία των μεταλλαγών του γονιδίου *FGFR2* προκαλεί τα πιο συχνά σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης, που χαρακτηρίζονται κυρίως από συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής. Ωστόσο έχουν αναφερθεί μεταλλαγές που προκαλούν κάποιες σπάνιες περιπτώσεις συνδρομών με συνοστέωση της οβελιαίας ραφής, όπως η p.Lys641Arg (c.1922A>G) (εξόνιο 16, περιοχή TK2) (Pfeiffer με σκαφοκεφαλία), η p.Ala344Ala (c.1032G>A) (εξόνιο 10) (έχει αναφερθεί και σε μια περίπτωση ήπιου συνδρόμου Crouzon, το οποίο αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως μη συνδρομική σκαφοκεφαλία αλλά μετά από χειρουργική επέμβαση συνοστεώθηκε αμφοτερόπλευρα και η στεφανιαία ραφή, γι' αυτό τελικά το χαρακτήρισαν ως ήπιο Crouzon) (Wilkie et al., 2006) και η p.Lys526Glu (c.1576A>G) (εξόνιο 14, περιοχή TK1) (οικογενές σύνδρομο σκαφοκεφαλίας, ένα μέλος είχε συνοστέωση της μετωπιαίας ραφής, McGillivray et al., 2005). Η p.Lys526Glu (c.1576A>G) αναφέρεται επίσης σε μια οικογένεια με ήπιο σύνδρομο Crouzon (δεν αναφέρει συνοστεωμένη ραφή, μειωμένη ή καθόλου διεισδυτικότητα, πολύ ήπια χαρακτηριστικά η ασθενής και ο πατέρας της, χωρίς κλινικό φαινότυπο η αδελφή της) (De Ravel et al., 2005).

Εκτός από τα σύνδρομα, μεταλλαγές στον *FGFR2* έχουν βρεθεί και σε κάποιες μη συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης. Σε περιπτώσεις μη συνδρομικής μονόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής έχουν βρεθεί στο εξόνιο IIIc οι μεταλλαγές: p.Ala315Ser (c.943G>T) (Johnson et al., 2000b), p.Ala337Thr (c.1009G>A) (Wilkie et al., 2006) και p.Ala344Ala (c.1032G>A) (Mulliken et al., 2004), η οποία, όπως προαναφέραμε έχει αναφερθεί και σε ήπιο Crouzon (Wilkie et al., 2006). Σε περιπτώσεις μη συνδρομικής συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής έχουν αναφερθεί οι μεταλλαγές p.A315T (εξόνιο IIIc) (Boyadjiev SA, 2007) και c.940-57C>T (ιντρόνιο 9) (Seto et al., 2007), ενώ η μεταλλαγή p.Pro263Pro (εξόνιο IIIa) έχει αναφερθεί σε μια περίπτωση μη συνδρομικής συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής (Seto et al., 2007). Σε περιπτώσεις μη συνδρομικής συνοστέωσης οβελιαίας/λαμβδοειδούς ραφής μονόπλευρα έχει αναφερθεί η μεταλλαγή p.Cys278Tyr (c.833G>A) (εξόνιο IIIa) (Kress et al., 2000b, Wilkie et al., 2006) , η οποία έχει αναφερθεί και σε περιπτώσεις συνδρόμου Crouzon.

### ***FGFR3***

Μέχρι στιγμής, στο γονίδιο *FGFR3* έχουν αναφερθεί 56 μεταλλαγές, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων σχετίζεται με 3 βασικές σκελετικές δυσπλασίες: αχονδροπλασία (ACH), υποχονδροπλασία (HCH) και θανατηφόρο δυσπλασία τύπου 1 και 2 (TDI και TDII) (HGMD, τελευταία πρόσβαση 05/2015). Μόνο 4 ετερόζυγες μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR3* έχουν συνδεθεί με κρανιοσυνοστέωση (Εικόνα 10). Οι μεταλλαγές p.Pro250Arg (c.749C>G) (εξόνιο 7, περιοχή σύνδεσης IgII-IgIII) και p.Ala391Glu (c.1172C>A) (εξόνιο 10, διαμεμβρανική περιοχή) προκαλούν δυο καλά χαρακτηρισμένα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης, το σύνδρομο Muenke (Muenke et al., 1997), το οποίο είναι και το πιο συχνό, και το σύνδρομο Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση (Meyers et al., 1995), αντίστοιχα. Οι δυο επιπλέον μεταλλαγές που έχουν αναφερθεί, η p.Pro250Leu και p.Ala334Thr σχετίζονται με μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση. Η p.Pro250Leu (c.749C>T) αναφέρεται σε έναν ασθενή με μη συνδρομική, μονόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής, η μητέρα του οποίου έφερε την ίδια μεταλλαγή και εμφάνιζε μακροκεφαλία (Schindler et al., 2002). Η p.Ala334Thr (c.1000G>A) αναφέρεται σε έναν ασθενή με ελαφρά σκαφοκεφαλία, η μητέρα και ο παππούς του οποίου έφεραν την ίδια μεταλλαγή, εμφανίζοντας ακόμα ηπιότερα κλινικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικό σχήμα κεφαλής (Barroso et al., 2011).



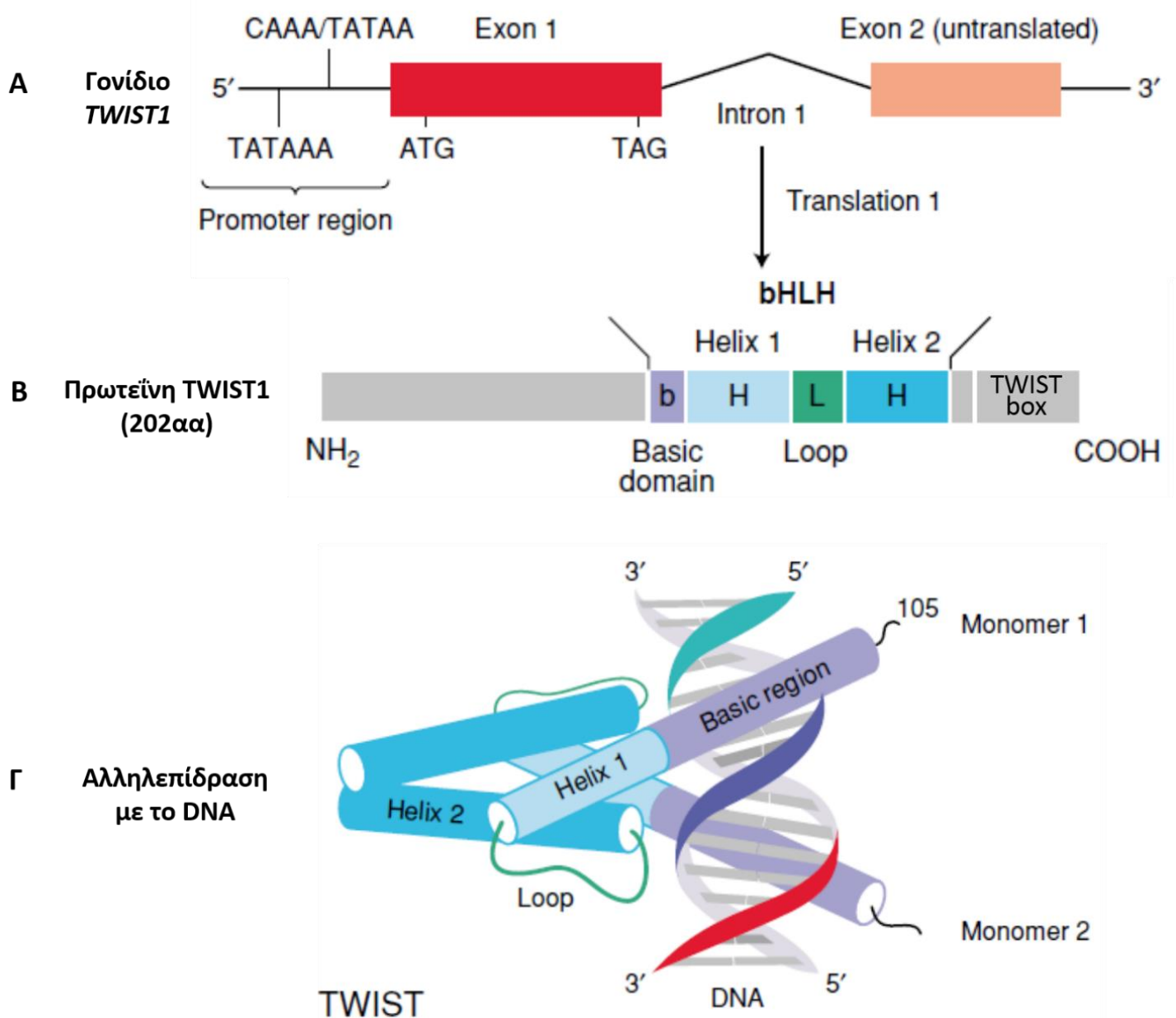


**Εικόνα 10:** Μεταλλαγές των FGFRs στις χονδροδυσπλασίες και στην κρανιοσυνοστέωση. (Αριστερά, πράσινο) Μεταλλαγές στον FGFR3, MS: Muenke, CDS: Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση, ACH: Αχονδροπλασία, TD: Θανατηφόρος δυσπλασία, HCH: Υποχονδροπλασία NSC: Μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση. (Δεξιά) Μεταλλαγές στους FGFR1 (ροζ) και FGFR2 (μπλε), CS: Crouzon, PS: Pfeiffer, AS: Apert, JWS: Jackson-Weiss, BS: Beare-Stevenson, FSS: οικογενές σύνδρομο σκαφοκεφαλίας, U: Μη προσδιορισμένο σύνδρομο (Ornitz and Marie, 2002, τροποποιημένο).

### **1B.3.2 TWIST1**

Το γονίδιο *TWIST1* (Εικόνα 11Α), το οποίο κωδικοποιεί έναν βασικό μεταγραφικό παράγοντα έλικας-θηλιάς-έλικας (basic helix-loop-helix transcription factor, bHLH) αποτελείται από 2 εξόνια. Το πρώτο περιλαμβάνει το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής (ATG), ακολουθούμενο από ένα συνεχές ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 606 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη μήκους 202 αμινοξέων. Το δεύτερο εξόνιο είναι μη μεταφράσιμο και περιέχει 2 πιθανά σήματα πολυαδενυλίωσης σε απόσταση 65 και 415 bp από το 5' άκρο του. Η πρωτεΐνη *TWIST1* (Εικόνα 11Β) χαρακτηρίζεται από δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές: μια περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA binding domain), η οποία περιλαμβάνει κυρίως βασικά αμινοξικά κατάλοιπα και το μοτίβο bHLH, το οποίο αποτελείται από μια μικρή α-έλικα (helix I), η οποία συνδέεται μέσω μιας θηλιάς με μια δεύτερη, μεγαλύτερη α-έλικα (helix II). Η περιοχή της θηλιάς είναι σημαντική για την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης και για την ορθή λειτουργικότητα των δυο α-ελίκων. Η περιοχή HLH είναι ικανή και αναγκαία για το διμερισμό της πρωτεΐνης, ο οποίος είναι απαραίτητος για την πρόσδεση στο DNA (Εικόνα 11Γ) (Massari & Murre, 2000). Ο *TWIST1* ανήκει στους Κλάσης II bHLH παράγοντες, των οποίων η έκφραση και η δράση είναι ιστοειδική. Σε αντίθεση με τους περισσότερους Κλάσης II παράγοντες οι οποίοι σχηματίζουν μόνο ετεροδιμερή με τις E-πρωτεΐνες, ο *TWIST1* μπορεί να σχηματίσει τόσο ετεροδιμερή όσο και ομοδιμερή, τα οποία προσδέονται σε συντηρημένες αλληλουχίες στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων-στόχων, που ονομάζονται E-boxes (5'-CANNTG-3'), ρυθμίζοντας τη μεταγραφή τους. Αν και δεν είναι πλήρως γνωστό το σύνολο των πρωτεϊνών που μπορούν να διμεριστούν με τον *TWIST1*, φαίνεται ότι το είδος του διμερούς που σχηματίζεται είναι σημαντικό για τον προσδιορισμό της δράσης του στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του (Connerney et al., 2006, Maia et al., 2012).

Ο παράγοντας *TWIST1* περιλαμβάνει επιπλέον λειτουργικά μοτίβα. Ένα από αυτά (αμινοξέα 30-64 στον άνθρωπο) προσδέεται στην ακετυλτρανσφεράση της ιστόνης p300 (Histone acetyltransferase p300), εμποδίζοντας τη δράση της (Hamamori et al., 1999). Ένα άλλο μοτίβο είναι το "Twist box", το οποίο βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 183-202 στον άνθρωπο), το οποίο αλληλεπιδρά με την περιοχή Runt (Runt-related factor DNA-binding domain) του *RUNX2*, ενός άλλου σημαντικού μεταγραφικού παράγοντα, εμποδίζοντας τη δράση του (Bialek et al., 2004). Επιπλέον σημαντικές περιοχές, όπως αλληλουχίες εντοπισμού στον πυρήνα (Nuclear localization sequences) εντοπίζονται εντός και εκτός της HLH περιοχής (Singh & Gramolini, 2009).



**Εικόνα 11:** Δομή και λειτουργία του *TWIST1*. Το γονίδιο (A), η πρωτεΐνη (B), ο διμερισμός του μεταγραφικού παράγοντα *TWIST1* και η αλληλεπίδρασή του με το DNA (Bonaventure & Ghouzzi, 2003).

Το σύνδρομο Saethre–Chotzen οφείλεται σε μεταλλαγές του γονιδίου *TWIST1* που προκαλούν απώλεια λειτουργίας, οδηγώντας σε απλοανεπάρκεια (haploinsufficiency) του μεταγραφικού παράγοντα *TWIST1*, όπως υποδεικνύεται από το γεγονός ότι και ετερόζυγες ελλείψεις ολόκληρου του γονιδίου *TWIST1* οδηγούν στον ίδιο φαινότυπο, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια (El Ghouzzi et al., 1997, Howard et al., 1997, Bourgeois et al.,

1998). Η απώλεια της λειτουργικότητας του TWIST1 λόγω των διαφορετικών μεταλλαγών του γονιδίου μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως αλλαγές στην σταθερότητα της πρωτεΐνης, απώλεια της ικανότητας διμερισμού ή πρόσδεσης στο DNA και έκτοπου εντοπισμού της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Μη νοηματικές (nonsense) μεταλλαγές ανοδικά ή εντός του μοτίβου bHLH έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερων πρωτεϊνών, οι οποίες αποδομούνται γρήγορα, ενώ παρανοηματικές μεταλλαγές κυρίως στις περιοχές των ελίκων (helix I ή II) έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πρωτεϊνών που αποτυγχάνουν να ετεροδιμεριστούν και εντοπίζονται, μη φυσιολογικά, στο κυτταρόπλασμα. Ορισμένες μεταλλαγές, κυρίως στην περιοχή της θηλιάς, οδηγούν σε απώλεια της ικανότητας αλληλεπίδρασης του παράγοντα με το DNA (El Ghouzzi et al., 2000, Maia et al., 2012). Ελάχιστες μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί στην περιοχή “TWIST1 box”, οδηγώντας σε προβληματική αλληλεπίδραση του TWIST1 με τον RUNX2 (Kress et al., 2006).

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πάνω από 100 διαφορετικές μεταλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνονται νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (παρανοηματικές και μη νοηματικές), ελλείψεις, παρεμβολές, διπλασιασμοί και σύνθετες αναδιατάξεις. Όλες οι σημειακές μεταλλαγές εντοπίζονται εντός της κωδικής περιοχής, ενώ δεν έχουν αναφερθεί μεταλλαγές εναλλακτικής συρραφής, μεταλλαγές στο ιντρόνιο ή στο δεύτερο εξόνιο του γονιδίου (Kress et al., 2006, Wilkie et al., 2006, HGMD, τελευταία πρόσβαση 05/2015). Αν και θεωρείται ότι μεταλλαγές στο γονίδιο *TWIST1* προκαλούν το σύνδρομο Saethre–Chotzen, έχουν αναφερθεί μεταλλαγές του γονιδίου και σε κάποιες μη συνδρομικές περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με βραχυκεφαλία έχουν αναφερθεί οι μεταλλαγές p.N114T, p.R118L και p.R118H (Stenirri et al., 2007), ενώ σε μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών με πλαγιοκεφαλία έχουν αναφερθεί η μεταλλαγή p.R154T (Stenirri et al., 2007) ή μικρή, εντός πλαισίου ανάγνωσης έλλειψη (in-frame deletion) delAla87-Gly92 (Mulliken et al., 2004). Μεταλλαγές στο “TWIST Box” έχουν αναφερθεί σε μια περίπτωση μη συνδρομικής συνοστεώσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής (p.Ala186Thr), της οβελιαίας ραφής (p.Ser188Leu) (Seto et al., 2007), ενώ η p.Ser201Tyr έχει αναφερθεί σε μια περίπτωση σκαφοκεφαλίας, αλλά και σε ένα άτομο χωρίς συνοστεώση (Kress et al., 2006). Σε μη συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστεώσης έχουν αναφερθεί επίσης η μεταλλαγή p.Thr121Ile, καθώς και κάποιες μικρές ελλείψεις ή παρεμβολές (Wilkie et al., 2006, Elanko et al., 2001, Kress et al., 2006), ενώ αλλαγές στην πολυγλυκινική περιοχή (Gly)5Ala(Gly)5 του TWIST1 (βρίσκεται μεταξύ του N-τελικού άκρου και της bHLH περιοχής και πιθανόν να λειτουργεί σαν ένας ευέλικτος συνδέτης μεταξύ των

λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης) έχουν αναφερθεί σε ασυμπτωματικά άτομα (Elanko et al., 2001).

### **1B.3.3 EFNB1**

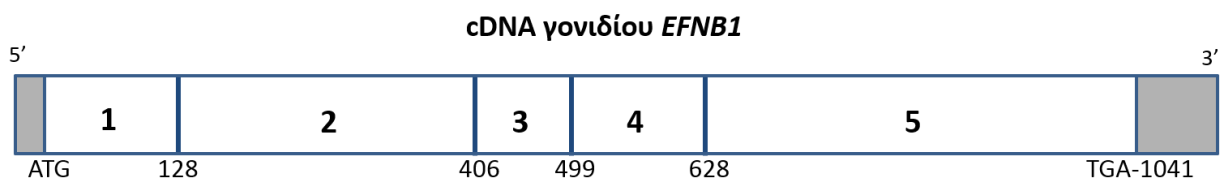
Το γονίδιο *EFNB1*, το οποίο βρίσκεται στο όριο των χρωμοσωμικών περιοχών Χq12 και Χq13.1 αποτελείται από 5 εξόνια (Εικόνα 12A) και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μήκους 346 αμινοξέων, την Epherin-B1 (Twigg et al., 2004). Η Epherin-B1 ανήκει στην Β-υποομάδα των μορίων-προσδετών (ligand) των υποδοχέων Eph (υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης) και αποτελείται από μια περιοχή epherin (epherin domain), μια διαμεμβρανική περιοχή, μια κυτταροπλασματική περιοχή που περιέχει αρκετά κατάλοιπα τυροσίνης και μια PDZ περιοχή (protein-protein interaction domain). Για τη λειτουργία των διαμεμβρανικών epherin είναι σημαντική η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης και η πρόσδεση πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο PDZ (Εικόνα 12B) (Kullander and Klein, 2002).

Οι υποδοχείς Eph αποτελούν τη μεγαλύτερη υποομάδα των υποδοχέων κινάσης-τυροσίνης, η οποία περιλαμβάνει 14 μέλη. Η ενεργοποίησή τους μέσω της σύνδεσης με τους προσδέτες τους, τις ephrins, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή σημάτων που ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Η επικοινωνία αυτή είναι πολύ σημαντική για πολλές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ζωής, συμπεριλαμβανομένου της σκελετικής και κρανιοπροσωπικής ανάπτυξης (Arvanitis and Davy, 2008). Οι υποδοχείς Eph είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και μπορούν να διαιρεθούν σε δυο υποομάδες: EphA και EphB. Αναλόγως, οι ephrins διαιρούνται σε προσδέτες epherin A (epherin A1-A6), οι οποίες συνδέονται με την εξωκυττάρια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης μέσω μια «άγκυρας» γλυκοφωσφατυδιλινοσιτόλης (glycosylphosphatidylinositol anchor), και σε προσδέτες epherin B (epherin B1-B3), οι οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαθέτουν μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή (Εικόνα 13). Τυπικά, οι Epherin A προσδέονται σε υποδοχείς EphA και οι epherin B σε υποδοχείς EphB, με εξαίρεση τον υποδοχέα EphA4, ο οποίος μπορεί να προσδένει τις περισσότερες από τις epherin A, καθώς επίσης και τις epherin B2 και epherin B3, αλλά όχι την epherin B1.

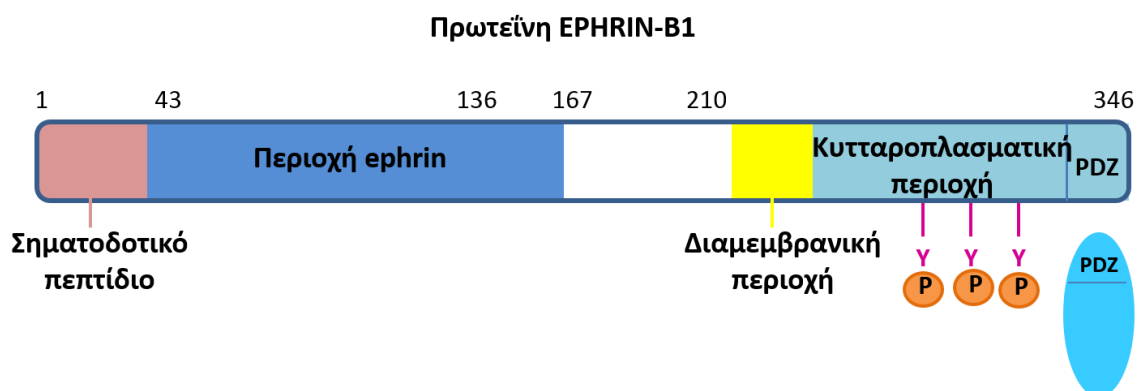
Ένα μοναδικό στοιχείο της αλληλεπίδρασης Eph/epherin είναι η αμφίδρομη σηματοδότηση (bidirectional signaling), η οποία έχει ως αποτέλεσμα τόσο εμπρόσθια σηματοδότηση (forward signaling) μέσω των υποδοχέων Eph, όσο και ανάστροφη (reverse) μέσω των προσδετών epherin, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο στα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς όσο και στα κύτταρα που εκφράζουν προσδέτες, αντίστοιχα

(Palmer and Klein, 2003, Edwards and Mundy, 2008). Ένα επιπλέον σημαντικό στοιχείο της αλληλεπίδρασης Ehh/ehrhin είναι ότι η λειτουργική σηματοδότηση πιθανόν να απαιτεί πολυμερισμό και ομαδοποίηση των συμπλόκων Ehh/ehrhin. Επειδή τόσο οι υποδοχείς Ehh όσο και οι ehrgins είναι διαμεμβρανικές ή στην περίπτωση των ehrgin A, προσδεσμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες, η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων είναι απαραίτητη για την πρόσδεση υποδοχέα-προσδέτη (Εικόνα 13). Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης κάθε προσδέτης ehrgin προσδέεται αρχικά σε έναν υποδοχέα Ehh μέσω μιας θηλιάς (ehrgin loop) η οποία εισχωρεί σε ένα κανάλι στην επιφάνεια του υποδοχέα, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές. Στη συνέχεια, δύο διμερή Ehh/ehrgin ενώνονται για να σχηματίσουν ένα τετραμερές σύμπλοκο με δομή που προσομοιάζει δακτύλιο (ring-like structure), στην οποία κάθε μόριο προσδέτη αλληλεπιδρά με δύο υποδοχείς και κάθε υποδοχέας με δύο προσδέτες (Himanen et al., 2001).

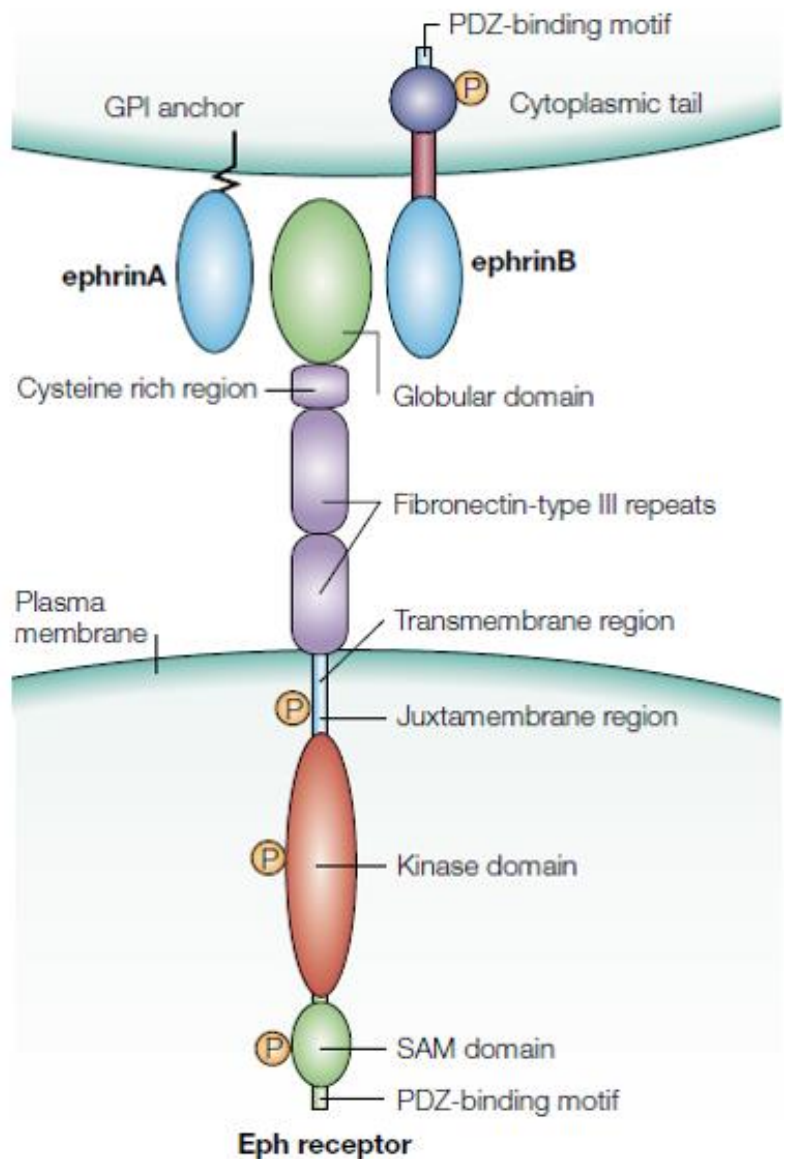
**A**



**B**



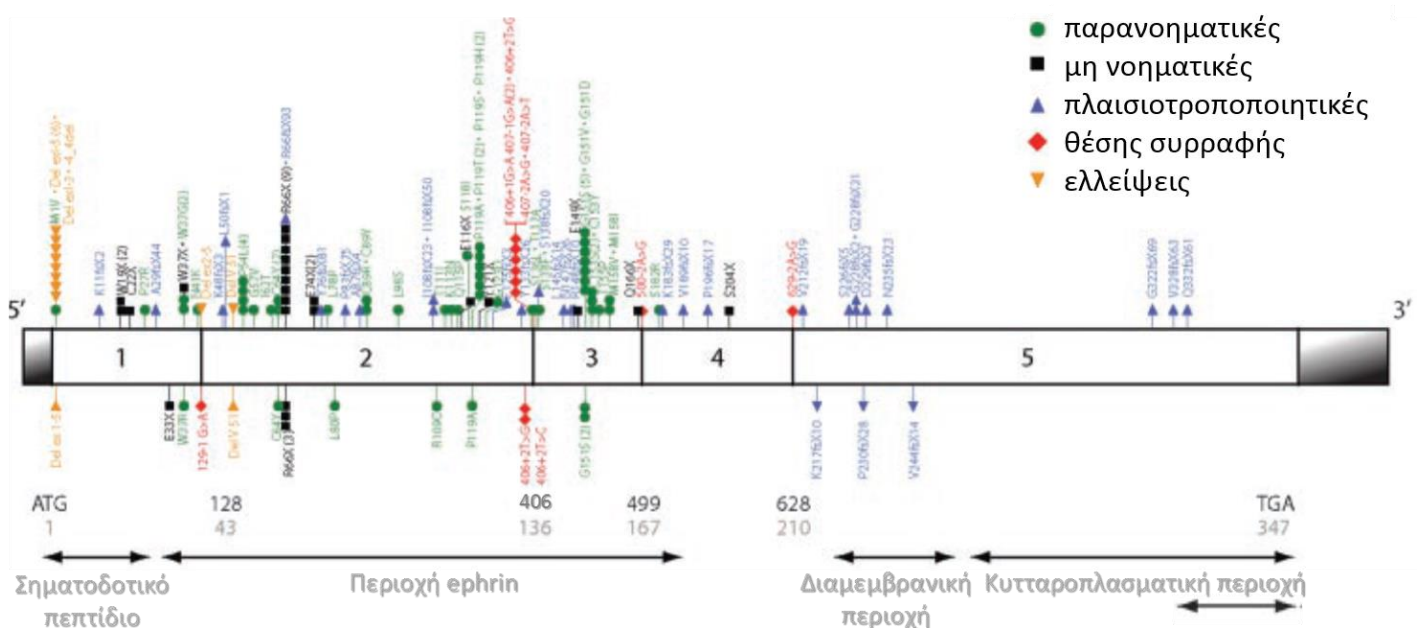
**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση του cDNA του γονιδίου *EFNB1*, το οποίο αποτελείται από 5 εξόνια (A) καθώς και της πρωτεΐνης EPHRIN-B1, που αποτελείται από μια περιοχή ehrgin, μια διαμεμβρανική περιοχή, μια κυτταροπλασματική περιοχή με αρκετά κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία φωσφορυλιώνονται, και μια PDZ περιοχή, όπου προσδέονται πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο PDZ (B).



**Εικόνα 13:** Οι ephrins και οι υποδοχείς τους. Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης ενός κυττάρου που εκφράζει ephrins (επάνω) με ένα κύτταρο που εκφράζει τους υποδοχείς τους Eph (κάτω) Kullander and Klein, 2002).

Μεταλλαγές στο γονίδιο *EFNB1* προκαλούν το Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (Εικόνα 14). Οι περισσότερες μεταλλαγές που έχουν αναφερθεί στο γονίδιο *EFNB1* είναι παρανοηματικές ή μη νοηματικές, ενώ έχουν αναφερθεί και αρκετές πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές (frameshift), μεταλλαγές που επηρεάζουν τη συρραφή, ελλείψεις και παρεμβολές. Η περιοχή ephrin της Ephrin-B1 κωδικοποιείται από τα εξόνια 2 και 3, τα οποία φέρουν την πλειοψηφία των μεταλλαγών. Νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις εντοπίζονται στα εξόνια 1-4 του γονιδίου (κωδικοποιούν για το σηματοδοτικό πεπτίδιο και τις εξωκυττάριες περιοχές), ενώ περίπου το 50% των πλαισιοτροποποιητικών ελλείψεων και παρεμβολών εντοπίζεται στα 2 τελευταία εξόνια του γονιδίου (4 και 5) (Passos-Bueno et al., 2008). Οι παρανοηματικές

μεταλλαγές αλλάζουν υψηλά συντηρημένα ανάμεσα στα είδη αμινοξέα στην εξωκυττάρια περιοχή της erhrin-B1 πρωτεΐνης και αναμένεται να παρεμποδίζουν την αναδίπλωση ή την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, όπως η erhrin-B2 και ο Ehb2, προκαλώντας απώλεια λειτουργίας. Οι πλαισιοτροποποιητικές, οι μη νοηματικές και οι μεταλλαγές θέσεων συρραφής που εντοπίζονται στα εξόνια 1–4 του γονιδίου *EFNB1* δημιουργούν πρώιμα κωδικόνια τερματισμού, οδηγώντας πιθανόν σε nonsense-mediated mRNA decay (NMD), αν και έχουν αναφερθεί τέτοιες περιπτώσεις μεταλλαγών που διαφεύγουν του NMD. Σε αυτές τις περιπτώσεις, όπως επίσης και στην περίπτωση των πλαισιοτροποποιητικών μεταλλαγών που εντοπίζονται στο τελευταίο εξόνιο του γονιδίου (κωδικοποιεί για τη διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης), πιθανόν να παράγονται ασταθείς, μικρότερες πρωτεΐνες, οι οποίες αποδομούνται γρήγορα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στο εξόνιο 5 έχουν αναφερθεί μόνο πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές, οι οποίες πιθανά να παρεμποδίζουν την ανάστροφη σηματοδότηση της Erhrin-B1 (Makarov et al., 2010, Wallis et al., 2008, Wieland et al., 2005, Twigg et al., 2006).



**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση των μεταλλαγών του γονιδίου *EFNB1* (Wallis et al., 2008).

Αναλογικά με το τι συμβαίνει στον άνθρωπο, στα ποντίκια ετερόζυγη έλλειψη της *Efnb1* οδηγεί σε προβληματική ανάπτυξη του κρανιακού θόλου όχι όμως και σε συνοστέωση



της στεφανιαίας ραφής. Ο διαχωρισμός των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι απαραίτητος για τη σωστή χωροταξική οργάνωση του σώματος του ζώου. Λόγω της τυχαίας απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X, τα *Efnb1*<sup>+/-</sup> θηλυκά άτομα είναι μωσαϊκά που φέρουν δύο κυτταρικούς πληθυσμούς (αυτούς που εκφράζουν και αυτούς που δεν εκφράζουν την ephrin B1), οι οποίοι διαχωρίζονται ο ένας από τον άλλο, δημιουργώντας ανωμαλίες στα όρια των ιστών, όπως για παράδειγμα στη στεφανιαία ραφή και στα άκρα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται κυτταρική παρεμβολή (cellular interference) (Twigg et al., 2013). Ο κυτταρικός διαχωρισμός και η έκτοπη έκφραση της ephrin B1 στα ετερόζυγα θηλυκά άτομα πιθανόν να επάγουν κρανιακές ανωμαλίες λόγω της παρεμπόδισης της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω χασμοσυνδέσμων (GJC: gap junction communication), οδηγώντας σε προβληματική διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, τα οποία αποτελούν την πηγή του οστεοπρογονικού κυτταρικού πληθυσμού του μετωπιαίου οστού (Davy et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, στα ημίζυγα άρρενα άτομα, τα κύτταρα των οποίων δεν εκφράζουν καθόλου την EFNB1, δεν διαταράσσονται τα όρια μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών, και πιθανόν ο λειτουργικός «πλεονασμός» (functional redundancy) μεταξύ των διαφορετικών ephrins να μετριάξει τις συνέπειες της έλλειψης έκφρασης της Ephrin-B1, εξηγώντας τον ήπιο φαινότυπο στα άρρενα άτομα με μεταλλαγές στο γονίδιο *EFNB1*. Το γεγονός ότι ο μωσαϊκισμός και ο διαχωρισμός κυττάρων που εκφράζουν και δεν εκφράζουν την ephrin B1 είναι ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στον παθολογικό φαινότυπο του Κρανιομετωπορινικού συνδρόμου ενισχύεται και από τη διαπίστωση ότι άρρενα άτομα με σοβαρό φαινότυπο είναι μωσαϊκά για μεταλλαγές ή ελλείψεις του γονιδίου *EFNB1* (Twigg et al., 2013).

Στο ποντίκι, την E14.5, μπορεί να εντοπιστεί έκφραση των ephrin-B1, EphB2 και EphB3 στα αναπτυσσόμενα μετωπιαία οστά και συγκεκριμένα οι Ephrin-B1 και EphB3 εκφράζονται σε όλο το οστό, ενώ η έκφραση του EphB2 περιορίζεται στην κοιλιακή επιφάνεια του οστού. Επιπλέον, η ephrin-B1 εκφράζεται έντονα στα στρώματα των μηνίγγων, τα οποία προέρχονται, όπως και τα μετωπιαία οστά από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας (NCCs: neural crest cells). Σε φυσιολογικά έμβρυα ποντικού, την E12.5, η οποία αντιστοιχεί στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των κρανιακών οστών, η ephrin-B1 εκφράζεται σε όλο το μεσέγχυμα της κεφαλής. Στα *Efnb1*<sup>+/-</sup> έμβρυα, η έκφραση της ephrin-B1 εμφανίζεται με μορφή μπαλωμάτων σε όλο το κρανιοπροσωπικό μεσέγχυμα και στον τελεγκέφαλο. Οι χασμοσύνδεσμοι είναι διακυτταρικά μεμβρανικά κανάλια, τα οποία μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, επιτρέποντας το πέρασμα μικρών μορίων απευθείας από

κύτταρο σε κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σπονδυλωτών, οι περιοχές επικοινωνίας μέσω χασμοσυνδέσμων (GJC) συμπίπτουν με αναπτυξιακά διαμερίσματα (developmental compartments). Παρεμπόδιση της GJC στα όρια της έκτοπης έκφρασης Erh/erhrin στα *Efnb1<sup>+/-</sup>* θηλυκά έμβρυα έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε ελλατωματική ανάπτυξη των μετωπιαίων οστών και πιθανόν πολυδακτυλία. Επιπλέον του πολύ σημαντικού τους ρόλου στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού ακτίνης, οι υποδοχείς Erh και οι erhrins είναι σημαντικοί στη ρύθμιση της επικοινωνίας μέσω χασμοσυνδέσμων και ως εκ τούτου εσφαλμένη ρύθμιση της GJC οδηγεί στο φαινότυπο των erhrin-B1 ετερόζυγων ατόμων.

## **1Γ. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ**

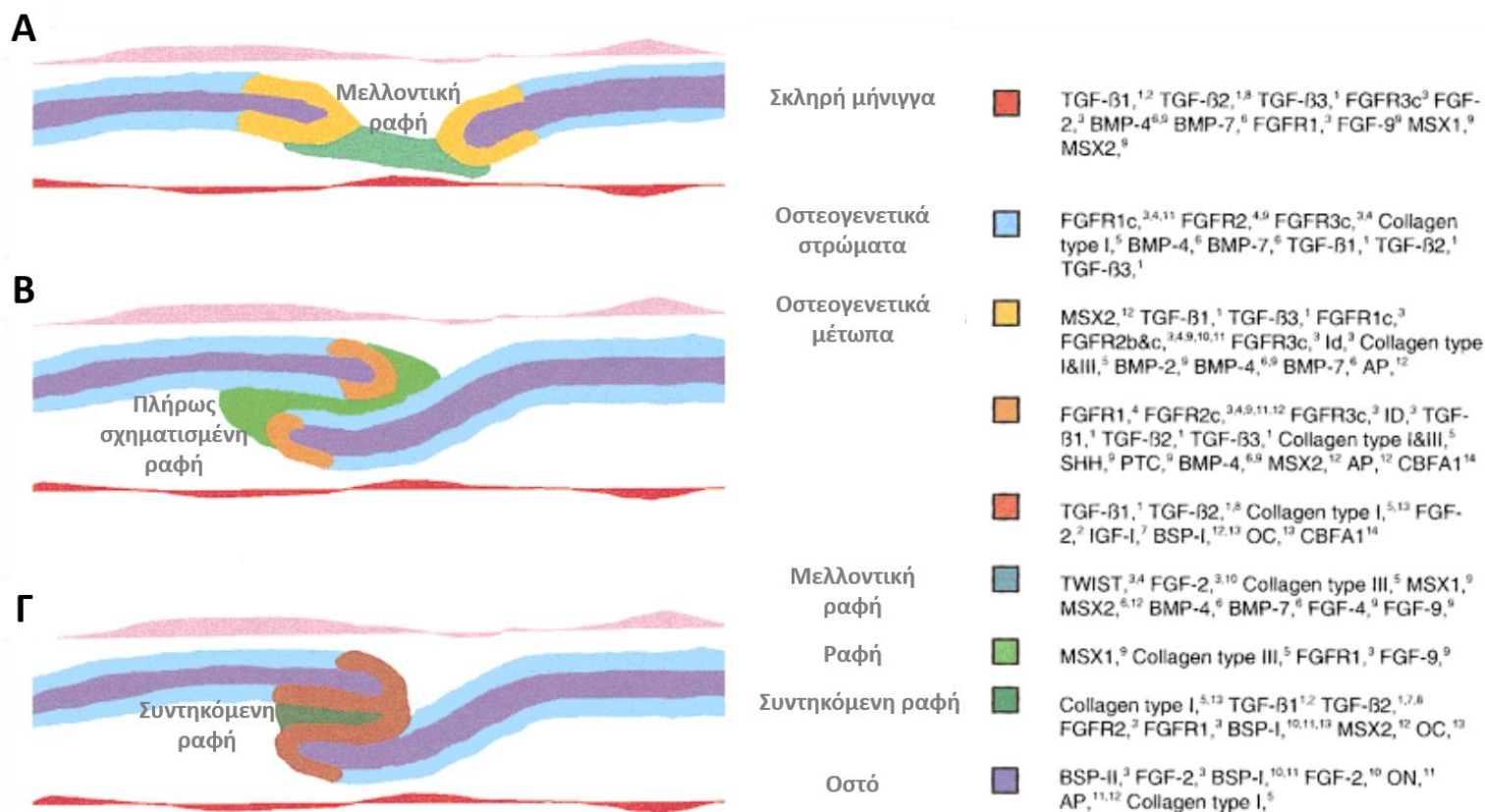
### **1Γ.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΡΑΦΕΣ**

Η ανάπτυξη των οστών του κρανίου, όπως και των υπολοίπων ιστών και οργάνων, βασίζεται στις συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή ομάδων κυττάρων. Αυτή η σηματοδότηση μπορεί να διευκολυνθεί μέσω απευθείας επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, καθώς επίσης και μέσω διαλυτών σηματοδοτικών μορίων, συνήθως παρακρινικές, μικρές πρωτεΐνες, ικανές να διαχέονται σε μικρές αποστάσεις, τους αυξητικούς παράγοντες (growth factors). Υπάρχουν 4 βασικές οικογένειες αυξητικών παραγόντων: οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors, FGFs), μέλη της υπερικογένειας του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης β (Transforming Growth Factor β, TGFβ) στην οποία, εκτός από τον TGFβ, ανήκουν και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), η οικογένεια ΗΗ (hedgehog) και η οικογένεια WNT (wingless). Οι αυξητικοί αυτοί παράγοντες μαζί με μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζουν την ανάπτυξη των περισσότερων ιστών του σώματος, συμπεριλαμβανομένων και των οστών (Witkowska-Zimny, 2012). Σημαντικοί για την

οστεοβλαστογένεση μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο RUNX2 (CBFA1), ο Osterix (Osx, SP7), η  $\beta$ -Catenin, οι πρωτεΐνες με μοτίβο έλικα-θηλιά-έλικα (Helix-loop-helix, HLH) ID και TWIST καθώς και οι πρωτεΐνες-ομοιωτικό κουτί (homeobox) Msx1, Msx2, Dlx5 και Dlx6 (Marie, 2008).

Η κατανόηση της ρύθμισης της μορφογένεσης των ραφών και των γεγονότων που συμβαίνουν κατά την πρώιμη συνοστέωσή τους απαιτεί την παρατήρηση της κατανομής και τον εντοπισμό της έκφρασης των παραγόντων που εμπλέκονται στη μορφογένεση των ραφών. Πριν από το σχηματισμό των ραφών, παράγοντες που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην επιθηλιο-μεσεγχυματική σηματοδότηση, όπως οι BMP-4, BMP-7, FGF-9, MSX1 και MSX2, καθώς επίσης και ο TWIST, εντοπίζονται στο μεσέγχυμα της μέλλουσας ραφής, στην υποκείμενη σκληρή μήνιγγα και στα οστικά μέτωπα που πλησιάζουν μεταξύ τους (Εικόνα 15A). Επίσης παρόντες είναι και οι υποδοχείς των FGFs (FGFR1-3) με τον FGFR2 να είναι απών από τη ραφή και τη σκληρή μήνιγγα, αλλά να εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα οστικά μέτωπα που πλησιάζουν μεταξύ τους. Οι TGF- $\beta$ 1, 2 και 3 είναι παρόντες στη σκληρή μήνιγγα και στα οστικά μέτωπα που πλησιάζουν μεταξύ τους, αλλά απουσιάζουν από το μεσέγχυμα της ραφής. Κατά τη διαδικασία της προσέγγισης και αλληλοεπικάλυψης των οστικών μετώπων (Εικόνα 15B) παράγοντες που σχετίζονται με σχηματισμό προτύπου, όπως οι SHH (Sonic Hedgehog), PTC (Patched Drosophila Homolog 1, PTCH1) και ID, είναι παρόντες, ενώ η έκφραση των TWIST και MSX2 μειώνεται. Ταυτόχρονα παρατηρείται διαφορεική κατανομή των συστατικών του εξωκυττάριου πλέγματος, με τους RUNX2, οστεοποντίνη (SPP1, OPN, OP, BSP-I), σιαλοπρωτεΐνη του οστού (IBSP, BSP-II), κολλαγόνο τύπου I, οστεονεκτίνη (SPARC, ON), αλκαλική φωσφατάση (ALP, AP) να απαντώνται στο οστό, ενώ τα κολλαγόνα τύπου I και III να εκφράζονται στα οστικά μέτωπα μαζί με τους FGFR1-3 και τους TGF- $\beta$ 1,2 και 3. Στο πλέγμα της ραφής εκφράζεται κυρίως κολλαγόνο τύπου III και ενώ εξακολουθούν να εκφράζονται οι FGF-9 και MSX1, ξεκινάει η έκφραση του FGFR1. Προκειμένου να χαρακτηριστούν οι υπό σύντηξη ραφές (Εικόνα 15Γ), συλλέχθηκαν στοιχεία τόσο από ραφές που φυσιολογικά συντήκονται, όπως η μεσομετωπιαία ραφή του αρουραίου και του ποντικού, όσο και από ραφές που κλείνουν ανώμαλα, είτε λόγω πειραματικών χειρισμών είτε ως αποτέλεσμα δράσης μεταλλαγμένων γονιδίων. Στο πλέγμα της ραφής η έκφραση των παραγόντων που σχετίζονται με το σχηματισμό του οστού, όπως το κολλαγόνο τύπου I, οι TGF- $\beta$ 1 και 2, οι FGFR1 και 2 και η BSP-I (SPP1) αυξάνεται, ενώ η έκφραση των RUNX2, FGF-2 και του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1) περιορίζεται στα οστικά μέτωπα. Η έκφραση των MSX1, ID, SHH, PTC και FGF-9 μειώνεται και

όταν έχει πλήρως ολοκληρωθεί η σύντηξη, η ραφή δε μπορεί να διακριθεί από το οστό (Orperman, 2000).

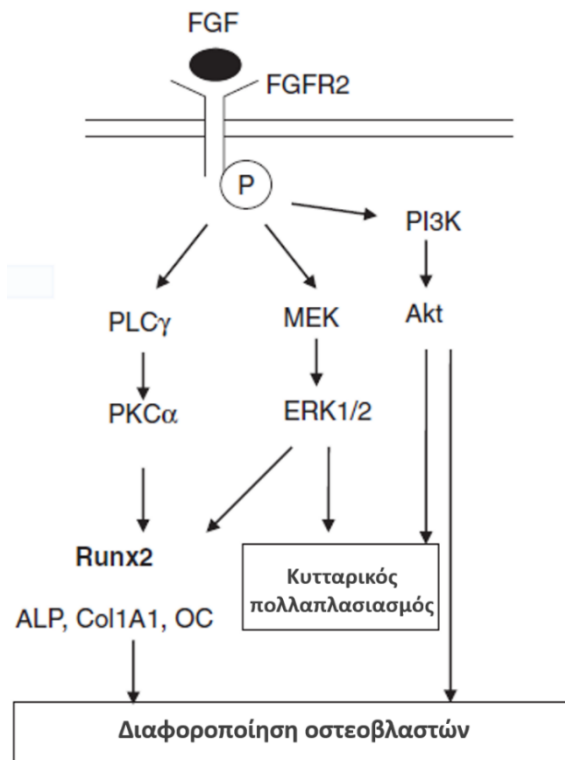


**Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση μιας μελλοντικής (Α), μιας πλήρως σχηματισμένης (Β) και μιας συντηκόμενης ραφής (Γ), όπου φαίνονται οι περιοχές των ραφών (πράσινο), των οστεογενετικών μετώπων (πορτοκαλί), του οστού (μπλε) και του περιόστεου (ροζ), καθώς και οι αναπτυξιακοί και μεταγραφικοί παράγοντες, οι υποδοχείς και τα συστατικά του εξωκυττάριου πλέγματος που είναι γνωστό ότι απαντώνται σε καθένα από τα στάδια της μορφογένεσης της ραφής (Orperman, 2000).

## 1Γ.2 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ FGF/FGFR ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΡΑΝΙΑΚΟΥ ΘΟΛΟΥ, ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ

Οι FGFs, μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων τους FGFRs, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του σκελετού τόσο κατά την εμβρυική όσο και μεταγεννητική περίοδο της ζωής. Ο διμερισμός και η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης στην κυταροπλασματική περιοχή των υποδοχέων οδηγεί στη φωσφορυλίωση σηματοδοτικών

πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πολλών διαφορετικών ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Στους οστεοβλάστες η σηματοδότηση FGF/FGFR ενεργοποιεί πληθώρα μονοπατιών με βασικότερα: το PLC/PKC (φωσφολιπάσης C -Phospholipase C, PLC / πρωτεϊνικής κινάσης C -Protein kinase C, PKC), το MAPK (mitogen-activated protein kinase/externally regulated kinase, ERK, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα ή εξωγενώς ρυθμιζόμενη κινάση) (MEK/ERK1/2) (Ras to mitogen-activated protein kinase) και το PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3 kinase-3-κινάση της φωσφατιδυλοϊσοσιτόλης/ Akt), τα οποία είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην έκφραση των οστεοβλαστικών γονιδίων (Εικόνα 16) (Miraoui & Marie, 2010, Marie, 2012, Du, 2012).

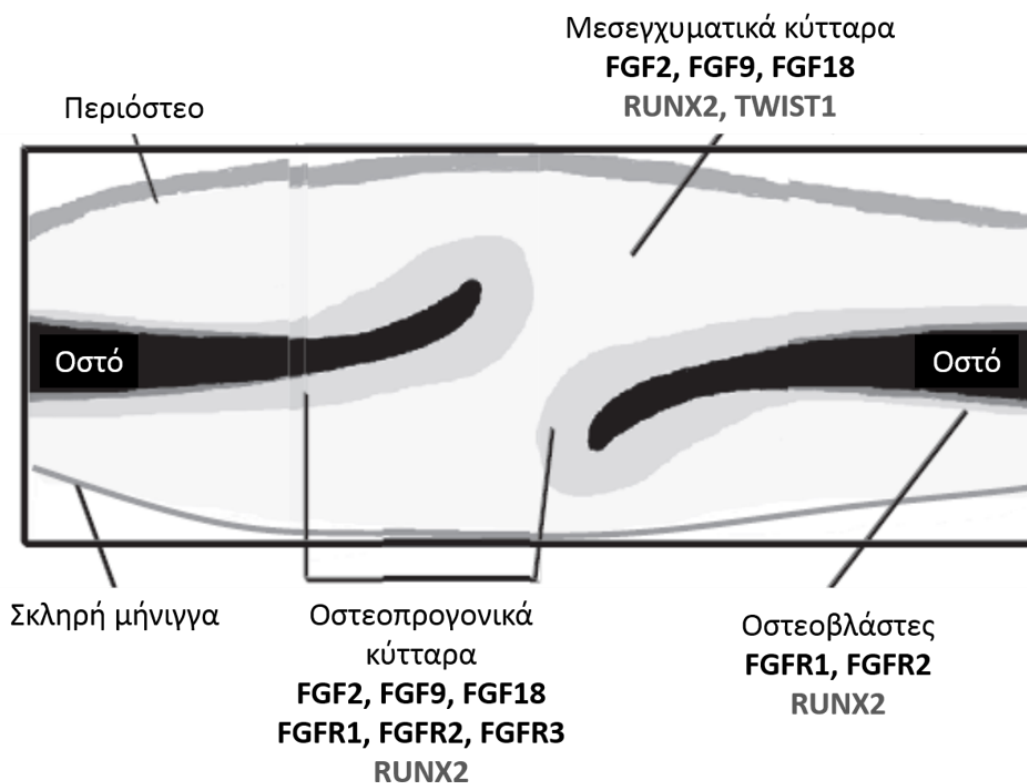


**Εικόνα 16:** Βασικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στους οστεοβλάστες από τη σηματοδότηση FGF/FGFR (Marie, 2012).

Η σημασία των FGFRs στη σκελετογένεση και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του κρανιακού θόλου και στο σχηματισμό των ραφών ενισχύεται από το γεγονός ότι τόσο μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας όσο και ενίσχυσης λειτουργίας στους FGFR1-3 προκαλούν πληθώρα κρανιοσκελετικών δυσπλασιών (Cohen 2006, Passos-Bueno et al., 2008).

Όπως προαναφέρθηκε, πληθώρα μεταλλαγών ενίσχυσης λειτουργίας στο γονίδιο *FGFR2* και ορισμένες μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR1* και *FGFR3* προκαλούν πρόωρη συνοστέωση των κρανιακών ραφών, υπογραμμίζοντας το ρόλο των υποδοχέων αυτών στη φυσιολογική ανάπτυξη του κρανιακού θόλου. Και οι τρεις αυτοί υποδοχείς βρέθηκε ότι

εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό στα οστεογενετικά μέτωπα των ραφών, με τον FGFR2 να είναι ο περισσότερο εκφραζόμενος (Rice et al., 2003). Η φυσιολογική ραφή αποτελείται από μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα και στη συνέχεια σε οστεοβλάστες που εναποθέτουν νέο οστικό πλέγμα κατά μήκος του άκρου της ραφής. Οι FGF2, 9 και 18 απαντώνται στα μεσεγχυματικά και οστεοπρογονικά κύτταρα, ενώ οι FGFR1 και FGFR2 εκφράζονται κυρίως στα οστεοπρογονικά κύτταρα και στους οστεοβλάστες (Εικόνα 17) (Marie, 2003).



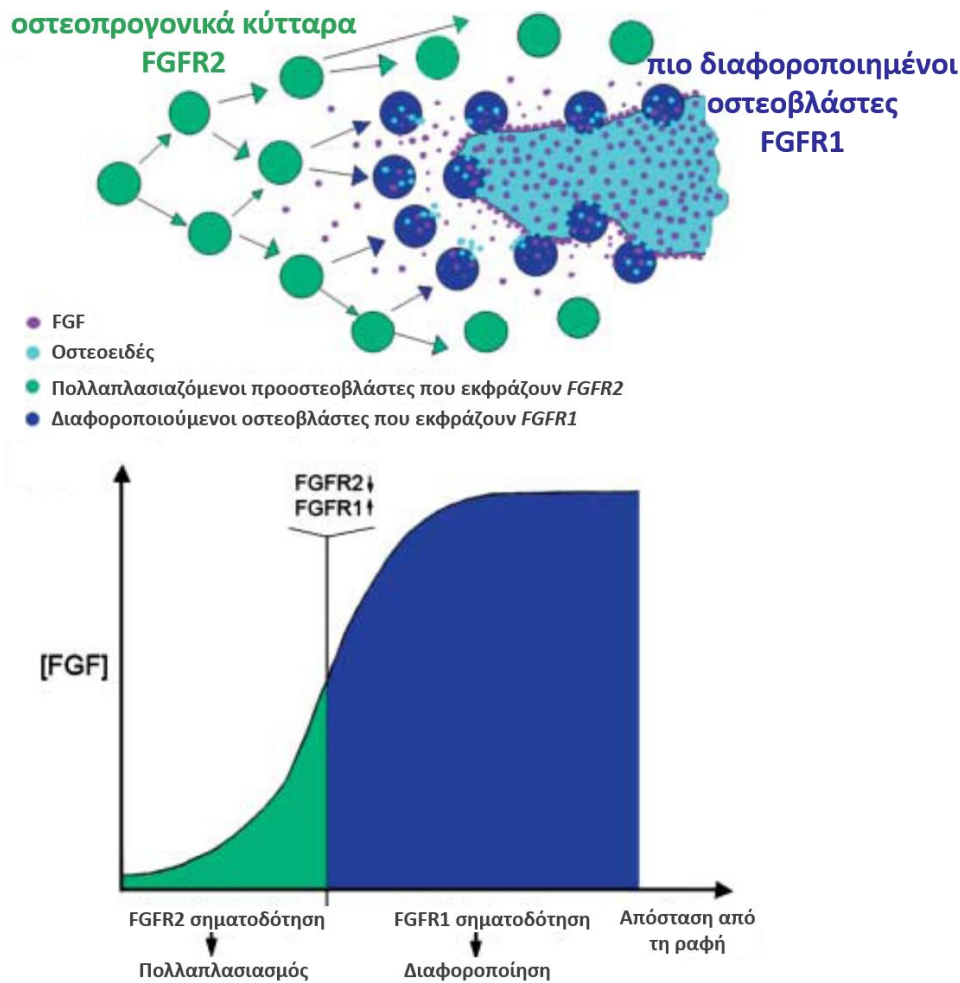
**Εικόνα 17:** Έκφραση παραγόντων στις αναπτυσσόμενες κρανιακές ραφές (Marie, 2003, τροποποιημένο).

Πρόσφατα πειράματα επιβεβαιώνουν την έκφραση και των 3 υποδοχέων FGFR1-3 καθώς επίσης και των μορίων-προσδετών τους, όπως οι FGF2, FGF9 και FGF18, στα αναπτυσσόμενα κρανιακά οστά εμβρύων ποντικού σε διαφορετικό βαθμό. Τα μετωπιαία οστά (προερχόμενα από το κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των παραγόντων αυτών σε σχέση με τα βρεγματικά (προερχόμενα από το παραξονικό μεσόδερμα) (Quarto et al., 2009). Επιπλέον φαίνεται ότι στις κρανιακές ραφές, ο FGFR2 εκφράζεται περισσότερο στα οστεοπρογονικά κύτταρα, ενώ ο FGFR1 σε πιο

διαφοροποιημένους οστεοβλάστες, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάβασης μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Πειραματικά δεδομένα με τη χρήση διαβρεγμένων με FGF2 σφαιριδίων στη στεφανιαία ραφή ποντικού έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα FGF σηματοδότησης προάγουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοπρογονικών κυττάρων μέσω του FGFR2, ενώ υψηλότερα επίπεδα FGF σηματοδότησης οδηγούν σε μείωση των επιπέδων του FGFR2 και αύξηση του FGFR1, που οδηγεί σε διαφοροποίηση (Iseki et al., 1999) (Εικόνα 18). Ο FGFR3 εκφράζεται, σε χαμηλότερα επίπεδα, στο κρανιακό περίοστεο και στα οστεογενετικά μέτωπα σε μεταγενέστερα στάδια κατά την ανάπτυξη των ραφών (Rice et al., 2000). Μετά την εγκαθίδρυση της FGF/FGFR σηματοδότησης στις ραφές, η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του κρανίου εξαρτάται από τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των οστεοπρογονικών κυττάρων. Αποσταθεροποίηση αυτής της ισορροπίας λόγω των μεταλλαγών στους FGFRs οδηγεί σε πρώιμη συνοστέωση των κρανιακών ραφών (Morriss-Kay and Wilkie, 2005).

Πάρα πολλά *in vitro* και *in vivo* πειράματα, τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπινους οστεοβλάστες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος των FGFR και ιδιαίτερα του FGFR2 στην παθογένεια της κρανιοσυνοστέωσης, με πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πειράματα σε κρανιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από έμβρυα και βρέφη με σύνδρομο Apert που έφεραν τη μεταλλαγή S252W στον FGFR2 έδειξαν αύξηση στη διαφοροποίηση και στο σχηματισμό του πλέγματος του οστού (αυξημένη έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης των οστεοβλαστών ALP, OC και COL1A1) (Lomri et al., 1998, Lemonnier et al., 2000, 2001). Αντίθετα, πειράματα σε οστεοβλάστες από μεταλλαγμένα ποντίκια που έφεραν είτε τη μεταλλαγή C342Y (προκαλεί το σύνδρομο Crouzon και σπάνια το Pfeiffer στον άνθρωπο) είτε την S252W (προκαλεί το σύνδρομο Apert) στον Fgfr2 έδειξαν παρεμπόδιση της διαφοροποίησης και επαγωγή της απόπτωσης (Mansukhani et al., 2000).

Πιο πρόσφατα πειράματα ενισχύουν την άποψη ότι η κρανιοσυνοστέωση λόγω των μεταλλαγών στον FGFR2 οφείλεται σε πρώιμη ή προβληματική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στα οστεογενετικά μέτωπα, στην οποία μπορεί να εμπλέκεται και η αύξηση του πολλαπλασιασμού τους.



**Εικόνα 18:** Σχέση μεταξύ της έκφρασης των FGFRs και της μετάβασης από τα πολλαπλασιαζόμενα οστεοπρογονικά κύτταρα στους διαφοροποιούμενους οστεοβλάστες στην άκρη του οστού στη στεφανιαία ραφή του ποντικού. **(Α)** Οι οστεοβλάστες (μπλε) εκφράζουν *Fgfr1* και εκκρίνουν πρωτεΐνες του πλέγματος του οστού (γαλάζιο) και FGF (μωβ). Οι FGF διαχέονται στις περιοχές των πολλαπλασιαζόμενων οστεοπρογονικών κυττάρων (πράσινο). **(Β)** Υποθετικό σχήμα όπου μια οριακή τιμή στη συγκέντρωση των FGF επηρεάζει την αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση από το *Fgfr2* στο *Fgfr1* και την αλλαγή στη συμπεριφορά των κυττάρων από τον πολλαπλασιασμό στη διαφοροποίηση (Morris-Kay & Wilkie, 2005).

Ιστολογικές αναλύσεις σε *Fgfr2<sup>+/-P253R</sup>* ποντίκια έδειξαν επιτάχυνση της οστεοποίησης του κρανίου τους, ως αποτέλεσμα της αυξημένης διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα οστεοποντίνης (μάρτυρας οστεοποίησης). Η αυξημένη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών επιβεβαιώθηκε και σε καλλιεργημένους οστεοβλάστες που απομονώθηκαν από το κρανίο του ποντικού, κατόπιν μέτρησης της έκφρασης του *Runx2*, της οστεοποντίνης και της οστεοκαλσίνης (δείκτες οστεοποίησης), η οποία βρέθηκε αυξημένη (Yin et al., 2008). Επιπλέον, σε καλλιέργειες από *Fgfr2<sup>+/-S252W</sup>* ποντίκια παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του πολλαπλασιασμού όσο και της διαφοροποίησης. Σε αυτό



το μοντέλο ποντικού με σύνδρομο Apert, η συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής συμβαίνει πολύ νωρίς στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και συνοδεύεται από μια αρχική αύξηση του πολλαπλασιασμού, ακολουθούμενη από επιτάχυνση της διαφοροποίησης, καθώς οι οστεοβλάστες αντικαθιστούν το μεσεγγύμα της ραφής. Οι ώριμοι οστεοβλάστες εισβάλλουν στις θέσεις όπου φυσιολογικά έπρεπε να σχηματιστούν οι ραφές, προκαλώντας τη συνοστέωσή τους. Προς το παρόν, η επικρατούσα άποψη για το πώς αναπτύσσονται τα οστεογενετικά μέτωπα και σχηματίζονται τα οστά του κρανίου είναι ότι τα αδιαφοροποίητα κύτταρα του μεσεγγύματος της ραφής στρατολογούνται ή επάγονται προς την οστεοβλαστική σειρά. Οι ερευνητές προτείνουν ότι το κρίσιμο γεγονός στην κρανιοσυνοστέωση που οφείλεται στον FGFR2 είναι η αποτυχία ανταπόκρισης σε σηματοδοτικά ερεθίσματα, τα οποία θα σταματούσαν την στρατολόγηση ή την ανάπτυξη και προώθηση των οστεοπρογονικών κυττάρων σε περιοχές όπου φυσιολογικά έπρεπε να σχηματιστούν οι ραφές (Holmes et al., 2009). Πρόσφατες μελέτες μεταλλαγών του FGFR2 σε οστεοβλάστες ποντικών (Suzuki et al., 2012, Tanimoto et al., 2004) και ανθρώπων (Park et al., 2012, Fanganiello et al., 2007) ενισχύουν την άποψη ότι η συνεχής ενεργοποίηση του FGFR2 προάγει την έκφραση των οστεοβλαστικών γονιδίων και το σχηματισμό οστού.

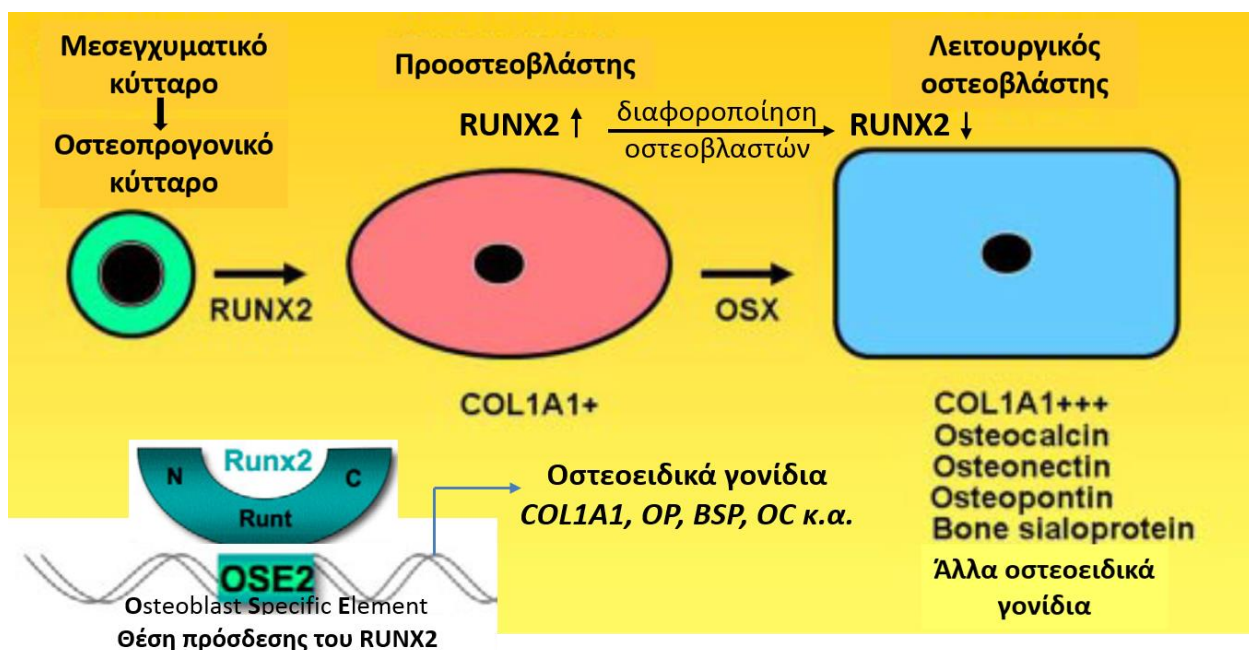
### **1Γ.3 Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ RUNX2 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΑΚΩΝ ΟΣΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ ΤΩΝ ΡΑΦΩΝ**

#### **1Γ.3.1 RUNX2 (RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2)**

Ο RUNX2 θεωρείται ο κυριότερος μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η έκφρασή του είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών κυττάρων προς την οστεοβλαστική σειρά. Πειράματα σε *Runx2<sup>-/-</sup> (Cbfa1<sup>-/-</sup>)* ποντίκια στα οποία παρατηρείται πλήρης έλλειψη σχηματισμού των οστών, δείχνουν ότι αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω αναστολής της ωρίμανσης των οστεοβλαστών σε πρώιμο στάδιο (Komori et al., 1997). Ο RUNX2 ανήκει στην οικογένεια των RUNX μεταγραφικών παραγόντων, η οποία περιλαμβάνει άλλα 2 μέλη, τον RUNX1 και RUNX3, και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας συντηρημένης αλληλουχίας 128 αμινοξέων, την περιοχή Runt (Runt domain). Ο RUNX2 αποτελείται από μια υπομονάδα, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *RUNX2* (6p21.1) και προσδένεται μέσω της περιοχής Runt σε ένα κοινό μοτίβο στο DNA (TGPγGGTPγ, Pγ: πυριμιδίνη), το οποίο αρχικά

ονομάστηκε OSE2 (osteoblast specific element), και από μια β υπομονάδα, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *CBFB* και η οποία αυξάνει τη συγγένεια της α υπομονάδας για το DNA, χωρίς όμως να προσδέεται η ίδια στο DNA. Το OSE2 μοτίβο απαντάται στους υποκινητές όλων των κυρίαρχων οστεοβλαστικών γονιδίων, όπως του *COL1A1*, της οστεοποντίνης, της *BSP* και της οστεοκαλσίνης, καθιστώντας τα έτσι στόχους του *RUNX2*, ο οποίος ρυθμίζει την έκφρασή τους (Εικόνα 19) (Ducy et al., 1997).

Αν και ο *RUNX2* είναι πολύ σημαντικός για τη διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών, φαίνεται ότι δεν είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της έκφρασης των γονιδίων των κύριων πρωτεϊνών του οστικού πλέγματος στους ώριμους οστεοβλάστες κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη και διατήρηση των οστών. Ενώ εκφράζεται έντονα σε ανώριμους οστεοβλάστες, η έκφρασή του μειώνεται όσο προχωράει η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Εικόνα 19) (Maruyama et al., 2007).



**Εικόνα 19:** Διαφοροποίηση των οστεοπρογονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες μέσω του *RUNX2* και του *OSX* και γονίδια που εκφράζονται. Ο *RUNX2* προσδέεται μέσω της περιοχή Runt στο μοτίβο OSE2 (osteoblast specific element) του DNA που απαντάται στους υποκινητές όλων των κυρίαρχων οστεοβλαστικών γονιδίων, όπως του *COL1A1*, της οστεοποντίνης (*OP*), της *BSP* και της οστεοκαλσίνης (*OC*), ρυθμίζοντας την έκφρασή τους (Cohen, 2006, τροποποιημένο).

Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον *Runx2* εμφανίζουν οστεοπενία, ως αποτέλεσμα του μειωμένου αριθμού των πλήρως διαφοροποιημένων, ώριμων οστεοβλαστών παρά το γεγονός ότι αυξήθηκε ο αριθμός των λιγότερο ώριμων

οστεοβλαστών, δείχνοντας ότι ο Runx2, ενώ προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε πρώιμα στάδια, ρυθμίζει αρνητικά την τελική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και διατηρεί τα οστεοβλαστικά κύτταρα σε ανώριμο/πρωταρχικό στάδιο (Liu et al., 2001). Μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *RUNX2* που οδηγούν σε απλοανεπάρκεια προκαλούν κλειδοκρανιακή δυσπλασία (Cleidocranial dysplasia), μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται κυρίως από κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, καθυστερημένη συνοστέωση των ραφών και των πηγών του κρανίου και απλασία ή υποπλασία των κλειδών και κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα (Cohen, 2009). Έτσι, φαίνεται ότι η σωστή ποσότητα και η συντονισμένη χωροχρονική έκφραση του *RUNX2* παίζει κυρίαρχο ρόλο στην οστεοβλαστογένεση.

Ο *RUNX2* αλληλεπιδρά με πολλούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συν-ρυθμιστές για τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του, ενώ η έκφραση του ιδίου φαίνεται ότι επάγεται από τους παράγοντες BMPs και FGFs, ενώ έχει δειχθεί ότι ο TGF- $\beta$  αυξάνει ή μειώνει τη μεταγραφή του *RUNX2* ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Επιπλέον, φαίνεται ότι ο *RUNX2* έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει τόσο θετικά όσο και αρνητικά τον ίδιο του τον υποκινητή. Οι κύριοι παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του *RUNX2* διαφέρουν ανάλογα με το χρόνο και τη θέση, κατά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Komori, 2005). Στην αναπτυσσόμενη στεφανιαία ραφή του ποντικού, ο Runx2 εκφράζεται τόσο στα οστεοπρογονικά κύτταρα όσο και τους προστεοβλάστες, στο μεσέγγυμα της ραφής και στα οστεογενετικά μέτωπα, αλλά και σε ώριμους οστεοβλάστες (Εικόνα 17) (Rice et al., 2003).

Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας, ο *OSX* (SP7), δρα αμέσως μετά τον *RUNX2* και είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή των προ-οστεοβλαστών σε πλήρως λειτουργικούς οστεοβλάστες (Εικόνα 19) (Marie 2008, Cohen 2006, 2009).

### **1Γ.3.2 Ο *RUNX2*, το σηματοδοτικό μονοπάτι των *FGFs* και ο ρόλος του στην κρανιοσυνοστέωση**

Ο *RUNX2* φαίνεται ότι συμμετέχει στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με τους FGFRs, εφόσον η σηματοδότηση FGF/FGFR ενεργοποιεί την έκφραση καθώς επίσης και τη μεταγραφική δραστικότητα και ικανότητα πρόσδεσης του παράγοντα *RUNX2* στο DNA. Πειραματικά έχει δειχθεί ότι ο FGF2 προάγει την αύξηση της έκφρασης και τη μεταγραφική ενεργότητα του *RUNX2* είτε μέσω του PKC (Kim et al., 2003), είτε μέσω του MAPK μονοπατιού (Χiao et al., 2002). Επιπλέον, ο *RUNX2* ενεργοποιείται μέσω του PI3K/Akt μονοπατιού (Fujita et al., 2004), το οποίο επάγεται από τη σηματοδότηση FGF/FGFR (Choi et al., 2008).

Πειραματικά έχει δειχθεί ότι ο FGF18 προάγει την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών πολυδύναμων κυττάρων (Mesenchymal stem cells, MSCs) σε οστεοβλάστες μέσω επαγόμενης από τους FGFR1 και 2 ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών ERK1/2 (mitogen-activated protein extracellular signal-regulated kinases 1 and 2) και PI3K. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών από τον FGF18 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του RUNX2 (Hamidouche et al., 2010).

Ένας από τους τρόπους που πιθανόν να δρουν οι μεταλλαγές στους FGFRs που προκαλούν κраниοσυνοστέωση είναι μέσω του RUNX2. Πειραματικά βρέθηκε ότι μεταλλαγές ενίσχυσης λειτουργίας των γονιδίων *Fgfr1* και *Fgfr2* αυξάνουν την έκφραση του *Runx2*. Συγκεκριμένα, ποντίκια που έφεραν τη μεταλλαγή P250R στον *Fgfr1*, αντίστοιχη της μεταλλαγής P252R η οποία προκαλεί το σύνδρομο Pfeiffer στον άνθρωπο, είχαν πρόωρη συνοστέωση των ραφών, συνοδευόμενη από επιτάχυνση του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών, αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και δραματική αύξηση της έκφρασης του RUNX2, η οποία επιβεβαιώθηκε και *in vitro* (Zhou et al., 2000). Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και σε ποντίκια που έφεραν τη μεταλλαγή C342Y στον *Fgfr2*, η οποία προκαλεί τα σύνδρομα Crouzon ή Pfeiffer στον άνθρωπο (Eswarakumar et al., 2004). Παρόλα αυτά, η επαγωγή του RUNX2 από τις ενεργοποιητικές μεταλλαγές του FGFR2 είναι αμφιλεγόμενη *in vitro*. Υπερέκφραση του FGFR2IIIc με ή χωρίς τη μεταλλαγή S252W, η οποία προκαλεί το σύνδρομο Apert, ενίσχυσε την έκφραση του RUNX2 mRNA (Tanimoto et al., 2004). Αντίθετα, σε οστεοβλαστικές κυτταρικές σειρές ποντικών, που έφεραν είτε τη μεταλλαγή C342Y είτε την S252W στον FGFR2, η έκφραση του RUNX2 παρέμεινε αμετάβλητη (Mansukhani, 2005). Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός ακόμα ο τρόπος με τον οποίο επιδρά ο RUNX2 στη συνοστέωση των ραφών, τα αποτελέσματα κυρίως από πειραματικά μοντέλα ποντικών δείχνουν ότι ο RUNX2 πιθανότατα εμπλέκεται στην παθογένεση της κраниοσυνοστέωσης που οφείλεται σε μεταλλαγές στους FGFRs. Η υπόθεση ότι πιθανά η αύξηση της έκφρασης του RUNX2 σχετίζεται με κраниοσυνοστέωση ενισχύεται και από το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί 2 περιπτώσεις ασθενών με κраниοσυνοστέωση [της δεξιάς στεφανιαίας ραφής στη μία περίπτωση (ένας ασθενής) και της μετωπιαίας στην άλλη (2 ασθενείς-ξαδέρφια)] με διπλασιασμό του γονιδίου *RUNX2* (Wilkie et al., 2006, Mefford et al., 2010). Όμως, στη δεύτερη περίπτωση (Mefford et al., 2010) έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του RUNX2 μεταξύ οστεοβλαστών από τους δύο ασθενείς, από φυσιολογικά άτομα και από ασθενείς με κраниοσυνοστέωση που δεν είχαν όμως διπλασιασμό του γονιδίου *RUNX2* και

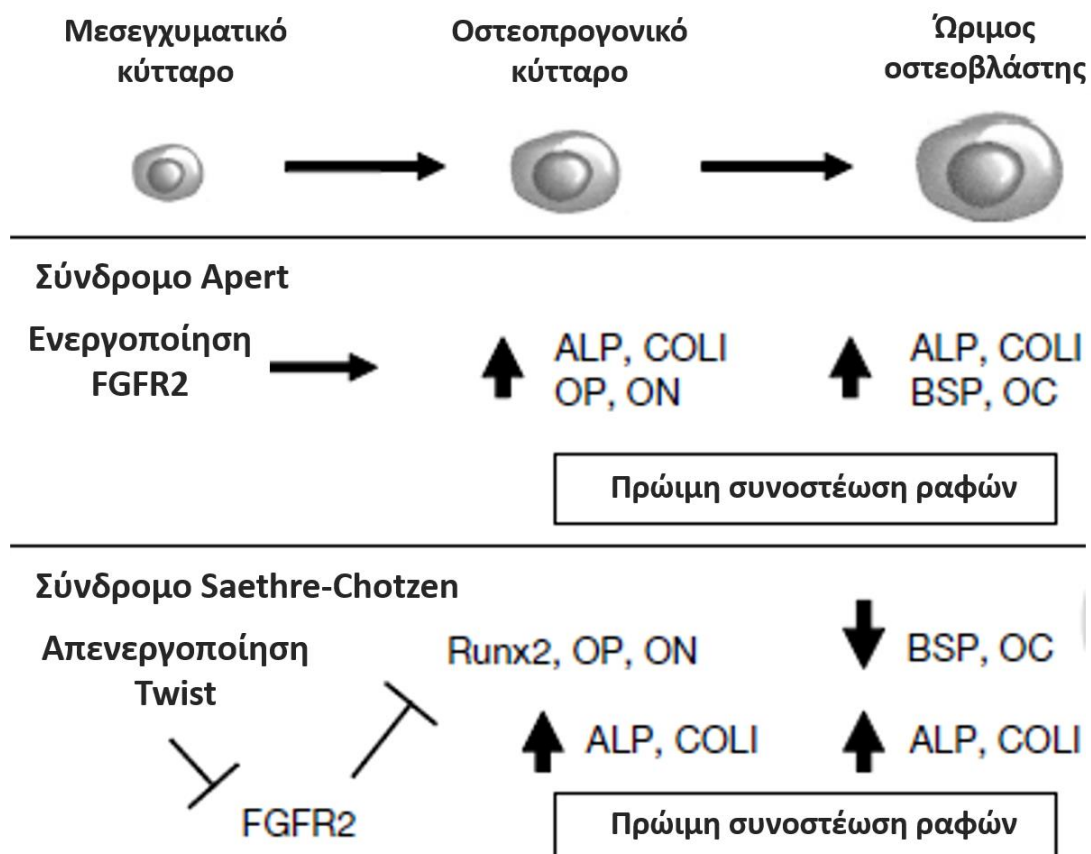
δε βρέθηκε διαφορά στην έκφραση. Ο ρόλος του RUNX2 στο σχηματισμό των ραφών και γενικά στην ανάπτυξη του σκελετού καθώς και η σημασία της έκφρασης του στα κατάλληλα επίπεδα και στον κατάλληλο χρόνο και χώρο κατά την εμβρυογένεση φαίνεται από το γεγονός ότι έναρξη της έκφρασής του νωρίς κατά την εμβρυογένεση σε ποντίκια προκάλεσε κρаниюσυνοστέωση, έκτοπο σχηματισμό οστού και ανωμαλίες στα άκρα (Maeno et al., 2011). Πιο πρόσφατα πειράματα ενισχύουν την άποψη ότι ο μηχανισμός μέσω του οποίου οι μεταλλαγές στους FGFRs προκαλούν κρаниюσυνοστέωση είναι η ενεργοποίηση του RUNX2. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η μεταλλαγή E731K στον FGFR2, η οποία προάγει την αυτοφωσφορυλίωσή του και ενεργοποιεί το μονοπάτι ERK-MAPK, διεγείρει τη μεταγραφική δράση του RUNX2 και συνεπώς την έκφραση οστεογενετικών δεικτών, σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου και ποντικού (Park et al., 2012).

#### **1Γ.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TWIST1 ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ**

Υπάρχουν πολλές πειραματικές ενδείξεις ότι ο TWIST1 παίζει αρνητικό ρόλο στα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, διατηρώντας τους στο στάδιο των οστεοπρογονικών κυττάρων και πιθανόν ελέγχει τη διαφοροποίησή τους μέσω πολλών διαφορετικών, άμεσων ή έμμεσων, μηχανισμών ανάλογα με το στάδιο της σκελετικής ανάπτυξης (Miraoui and Marie, 2010). Ο TWIST1 εντοπίζεται κυρίως στο μεσέγγυμα της ραφής (mid-sutural) (Johnson et al., 2000a, Rice et al., 2000) (Εικόνα 17) και η σημασία του στη σωστή ανάπτυξη των ραφών ενισχύεται από το γεγονός ότι μεταλλαγές ή ελλείψεις του γονιδίου *TWIST1* οδηγούν σε κρаниюσυνοστέωση στο σύνδρομο Saethre-Chotzen (Howard et al., 1997, el Ghouzzi et al., 1997, Johnson et al., 1998). Υπερέκφραση του TWIST1 βρέθηκε ότι εμποδίζει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (Bialek et al., 2004), ενώ η αποσιώπησή του προάγει τη διαφοροποίηση και την οστεογενετική ικανότητα καλλιεργημένων μεσεγγυματικών κυττάρων ανθρώπου και ποντικού (Miraoui et al., 2010). Σε ανθρώπινους κρνιακούς οστεοβλάστες βρέθηκε ότι η μεταλλαγή Y103X του TWIST1, η οποία προκαλεί απλοανεπάρκεια, προκάλεσε αύξηση του πολλαπλασιασμού αλλά και της οστεογένεσης *in vitro* και *in vivo*, χαρακτηριζόμενη από αυξημένη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I και της αλκαλικής φωσφατάσης αλλά μειωμένη έκφραση της οστεοκαλσίνης, της BSP και του RUNX2 που αποτελούν δείκτες διαφοροποιημένων οστεοβλαστών (Yousfi et al., 2001, 2002, Guenou

et al., 2005). Ποντίκια με έλλειψη OC εμφανίζουν φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από αυξημένη δημιουργία οστού (Yousfi et al., 2001). Φαίνεται λοιπόν ότι η απλοανεπάρκεια του TWIST1 προάγει την οστεογένεση, διαφοροποιώντας όμως παράλληλα την έκφραση ορισμένων γονιδίων-δεικτών διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Ενώ, σε ανθρώπινους οστεοβλάστες έλλειψη της bHLH του TWIST1 προκαλεί αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης και του κολλαγόνου τύπου I και μειωμένη έκφραση της OC (Yousfi et al., 2001, 2002, Guenou et al., 2005), οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του FGFR2 προκαλούν αύξηση της έκφρασης και των τριών αυτών γονιδίων σε οστεοβλάστες από ασθενείς με σύνδρομο Apert (Lomri et al., 1998, Lemonnier et al., 2000, 2001) (Εικόνα 20), υποδεικνύοντας ότι η πρώιμη οστεοποίηση του κρανίου στα σύνδρομα Saethre-Chotzen και Apert πιθανόν να προκύπτει από διαφορετικές ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κρανιακών οστεοβλαστών.

### Διαφοροποίηση οστεοβλαστών



**Εικόνα 20:** Μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην επαγόμενη από μεταλλάξεις στον FGFR2 και στον TWIST1 πρώιμη συνοστέωση των κρανιακών ραφών στον άνθρωπο. Στο σύνδρομο Apert, ενεργοποίηση του FGFR2 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οστεοβλαστικών μαρτύρων και εναπόθεση κολλαγόνου σε εμβρυϊκούς ή μεταγεννητικούς οστεοβλάστες. Στο σύνδρομο Saethre-Chotzen, απλοανεπάρκεια του TWIST1 έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή στην έκφραση του FGFR2 και του RUNX2 και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου σε μεταγεννητικούς οστεοβλάστες (Marie et al., 2008).

### **Πιθανοί μηχανισμοί ρύθμισης της οστεοβλαστογένεσης από τον TWIST1**

Αρκετές πειραματικές ενδείξεις συνδέουν τον TWIST1 με την έκφραση ή τη λειτουργικότητα του RUNX2. Μέσω του πλαισίου TWIST (TWIST box), ο TWIST1 αλληλεπιδρά παροδικά με τον RUNX2 (μέσω της περιοχής Runt), εμποδίζοντας τη λειτουργία του λόγω μείωσης της ικανότητας πρόσδεσής του στο DNA, χωρίς όμως να επηρεάζει την έκφρασή του (Bialek et al., 2004). Πειράματα σε ανθρώπινους κρανιακούς οστεοβλάστες έδειξαν ότι η απλοανεπάρκεια του TWIST1 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του RUNX2, καθώς επίσης και σε μειωμένη ικανότητα πρόσδεσής του στην OSE2 αλληλουχία-στόχο του στον υποκινητή της οστεοκαλσίνης. Αντίθετα, η απενεργοποίηση του TWIST1 δεν μετέβαλε την ικανότητα πρόσδεσης του RUNX2 στην ανάλογη αλληλουχία στον υποκινητή του COL1A1 στους μεταλλαγμένους οστεοβλάστες (Yousfi et al., 2002). Από την άλλη πλευρά, αυξημένη έκφραση (forced expression) του TWIST1 (και TWIST2) δεν βρέθηκε να μεταβάλλει τα επίπεδα των μεταγράφων του RUNX2, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι ο TWIST1 αλληλεπιδρά με το απομακρυσμένο (proximal) τμήμα του P1 υποκινητή του γονιδίου RUNX2, το οποίο φέρει ένα πλαίσιο E (E-box) (Zhang et al., 2008, Guenou et al., 2005).

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου ο TWIST1 πιθανόν να ρυθμίζει την οστεοβλαστογένεση είναι μέσω της σηματοδότησης FGF/FGFR (Miraoui and Marie, 2010, Marie et al., 2008). Στην αναπτυσσόμενη στεφανιαία ραφή του ποντικού κατά τις εμβρυϊκές ημέρες E14-18, η έκφραση του TWIST1 προηγείται αυτή των FGFRs. Επιπλέον, ο TWIST1 εντοπίζεται κυρίως στο μεσέγγυμα της ραφής, ενώ οι FGFRs κυρίως στα οστεογενετικά μέτωπα, αν και υπάρχει μικρή αλληλοεπικάλυψη της έκφρασης του TWIST1 με αυτή του FGFR2. Σε *Twist1*<sup>+/-</sup> ποντίκια παρατηρείται αύξηση της έκφρασης του FGFR2, ενώ μεταβάλλεται και η κατανομή του και εντοπίζεται σε έκτοπη θέση στο μεσέγγυμα της οβελιαίας ραφής (Johnson et al., 2000a, Rice et al., 2000, Connerney et al., 2006). Από την άλλη, σε κρανιακούς οστεοβλάστες από ασθενείς με σύνδρομο Saethre-Chotzen που έφεραν τη μεταλλαγή Y103X στον TWIST1 (έλλειψη της περιοχής bHLH) παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων mRNA του FGFR2, σχετιζόμενα με μειωμένη έκφραση του RUNX2, της BSP και της OC. Υπερέκφραση του TWIST1 αποκατέστησε τα επίπεδα mRNA του FGFR2, καθώς επίσης και των RUNX2, BSP και OC. Βρέθηκε επίσης ότι η μείωση της έκφρασης του RUNX2, οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη μείωση της έκφρασης του FGFR2. Ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) έδειξε ότι τόσο ο TWIST1 όσο και ο RUNX2 μπορούν να προσδεθούν στην ίδια περιοχή στον υποκινητή του γονιδίου *FGFR2*, υποδεικνύοντας πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ TWIST1 και RUNX2 στη

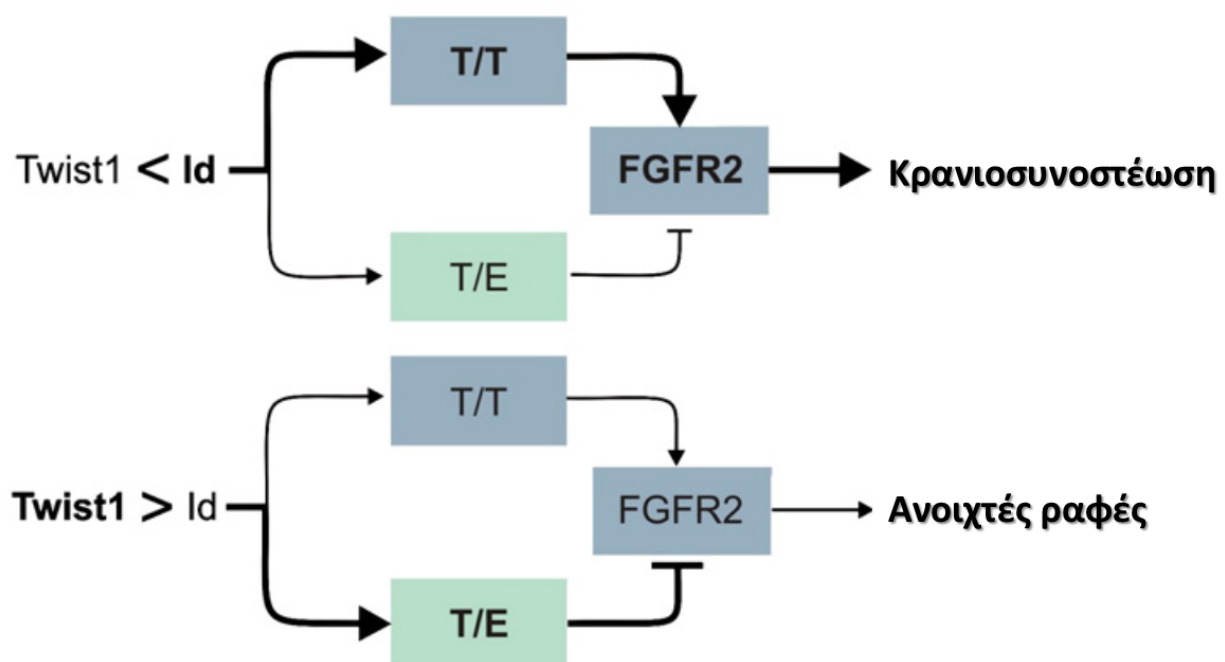
ρύθμιση του υποκινητή του *FGFR2*. Επιπλέον, τόσο ο *TWIST1* όσο και ο *RUNX2* πιθανόν να έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίσουν άμεσα την έκφραση του *FGFR2*, εφόσον ο *TWIST1* προσδένεται σε μια περιοχή στον υποκινητή του *FGFR2* που περιέχει μια αλληλουχία *CANNTG* και ο *RUNX2* σε τουλάχιστον μια θέση *OSE2* (Guenou et al., 2005). Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι όταν τα επίπεδα του *TWIST1* μειώνονται μεταβάλλεται η έκφραση των *FGFRs* και του *RUNX2* και πιθανόν ο *TWIST1* να δρα πριν από τη σηματοδότηση *FGF/FGFR* (Εικόνα 20).

Οι εμφανείς διαφορές στη ρύθμιση των επιπέδων του *FGFR2* από τον *TWIST1* που προκύπτουν από τα πειραματικά δεδομένα σε ανθρώπινους οστεοβλάστες και στον ποντικό ίσως να σχετίζονται με το γεγονός ότι ο *TWIST1* μπορεί να αυξάνει ή να μειώνει την έκφραση του *FGFR2*, ανάλογα με την τοπική έκφρασή του και την ισορροπία μεταξύ των ομοδιμερών του και ετεροδιμερών που σχηματίζονται με τις *E*-πρωτεΐνες.

Οι *HLH* πρωτεΐνες μπορούν να διακριθούν σε 3 μεγάλες κατηγορίες: στους Κλάσης I *bHLH* παράγοντες (*E*-πρωτεΐνες), που εκφράζονται άφθονα στους περισσότερους ιστούς, στους Κλάσης II, ιστοειδικούς *bHLH* παράγοντες, στους οποίους ανήκει και ο *TWIST1* και στους *HLH Id* παράγοντες, οι οποίοι στερούνται της βασικής περιοχής πρόσδεσης στο DNA. Οι Κλάσης I παράγοντες μπορούν να σχηματίσουν είτε ομο- είτε ετεροδιμερή, ενώ οι Κλάσης II παράγοντες, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, δεν μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή και κατά προτίμηση ετεροδιμερίζονται με τις *E*-πρωτεΐνες. Οι *Id* πρωτεΐνες ετεροδιμερίζονται επίσης κατά προτίμηση με τις *E*-πρωτεΐνες, δρώντας ανταγωνιστικά και εμποδίζοντας τη δημιουργία Κλάσης I/II ετεροδιμερών (Massari & Murre, 2000). Ο *TWIST1*, αν και ανήκει στην Κλάση II, έχει δειχθεί πειραματικά ότι μπορεί να σχηματίσει είτε ομοδιμερή (*T/T*) είτε ετεροδιμερή με τις *bHLH E*-πρωτεΐνες (*T/E*), τα οποία φαίνεται να έχουν αντίθετη δράση στην έκφραση του *FGFR2*. Η αναλογία μεταξύ των διμερών αυτών συμπλόκων φαίνεται να καθορίζεται από τα σχετικά επίπεδα των πρωτεϊνών *Twist1* και *Id*. Όταν τα επίπεδα του *Id* είναι μεγαλύτερα από αυτά του *Twist1*, οπότε ευνοείται η δημιουργία ομοδιμερών (*T/T*) έναντι των ετεροδιμερών (*T/E*), λόγω της ανταγωνιστικής δράσης του *Id* στο σχηματισμό ετεροδιμερών, αυξάνεται η έκφραση του *FGFR2*, οδηγώντας σε κλείσιμο των ραφών. Αντίθετα, υψηλότερα επίπεδα του *Twist1* έναντι του *Id* (άρα και *T/E > T/T*) εμποδίζουν την έκφραση του *FGFR2*, διατηρώντας ανοιχτές τις ραφές του ποντικού (Εικόνα 21). Φυσιολογικά, στα οστεογενετικά μέτωπα των ραφών (όπου συνυπάρχουν ο *Twist1* και ο *Id*) εκφράζονται γονίδια που ρυθμίζονται από τα *T/T* διμερή, όπως ο *FGFR2* και η *περιοσίνη*, ενώ στο μέσο της ραφής, όπου απαντάται μόνο ο *Twist1*, εκφράζονται γονίδια που



ρυθμίζονται από τα T/E διμερή, όπως η θρομβοσπονδίνη (thrombospondin 1, TSP-1). Στα  $Twist1^{+/-}$  ποντίκια, λόγω της απλοανεπάρκειας του  $Twist1$ , ευνοείται η δημιουργία T/T ομοδιμερών, η οποία οδηγεί σε επέκταση της έκφρασης του FGFR2 στο μέσο της ραφής, αυξάνοντας έτσι την FGF σηματοδότηση (Connerney et al., 2006, Connerney et al., 2008). Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλαγές στο γονίδιο *TCF12* (Transcription Factor 12), το οποίο κωδικοποιεί μια κλάσης I bHLH E-πρωτεΐνη, που ετεροδιμερίζεται με τον TWIST1, συνδέονται με κρανιοσυστοστέωση (Sharma et al., 2013).



**Εικόνα 21:** Μοντέλο όπου η αναλογία ομοδιμερών (T/T) και ετεροδιμερών του  $Twist1$  με τις bHLH E πρωτεΐνες (T/E) φαίνεται να καθορίζεται από τα σχετικά επίπεδα των πρωτεϊνών  $Twist1$  και  $Id$ . Όταν τα επίπεδα του  $Id$  είναι μεγαλύτερα από αυτά του  $Twist1$  ευνοείται η δημιουργία ομοδιμερών (T/T) έναντι των ετεροδιμερών (T/E) και αυξάνεται η έκφραση του FGFR2, οδηγώντας σε κλείσιμο των ραφών. Αντίθετα, υψηλότερα επίπεδα του  $Twist1$  έναντι του  $Id$  (άρα και  $T/E > T/T$ ) εμποδίζουν τη έκφραση του FGFR2, διατηρώντας ανοιχτές τις ραφές (Connerney et al., 2008).



## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι σκελετικές δυσπλασίες, που επηρεάζουν κυρίως τον σκελετό, και οι κρανιοσυνοστεώσεις, που επηρεάζουν τον κρανιακό θόλο, αποτελούν τις δυο βασικές κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται οι κρανιοσκελετικές δυσπλασίες. Η κρανιοσυνοστεώση συνήθως ταξινομείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: μη συνδρομική, όπου η συνοστεώση είναι το μόνο πρωτεύον εύρημα και συνδρομική που μπορεί να αφορά μία ή περισσότερες ραφές, ενώ συνυπάρχουν και άλλες μορφογενετικές ανωμαλίες.

Η μεγάλη ετερογένεια και η αλληλοεπικάλυψη που παρουσιάζουν στα κλινικά τους χαρακτηριστικά τα σύνδρομα κρανιοσυνοστεώσης καθώς και η ύπαρξη μη συνδρομικών περιπτώσεων καθιστούν πολλές φορές δύσκολη την ακριβή διάγνωση και ως εκ τούτου τον περαιτέρω χειρισμό των περιστατικών αυτών. Η μοριακή διάγνωση ασθενών με κρανιοσυνοστεώση είναι πολύ σημαντική επειδή επιβεβαιώνει ή όχι την αρχική κλινική εκτίμηση. Επιπλέον μπορεί να καθοδηγήσει την περαιτέρω κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς και σε κάποιες περιπτώσεις πιθανά να προβλέψει τη μετεγχειρητική του πορεία, μετά την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής. Τέλος, επιτρέπει την κατάλληλη γενετική συμβουλευτική και καθιστά δυνατό τον προγεννητικό έλεγχο στις περιπτώσεις που τα πάσχοντα άτομα επιθυμούν απογόνους.

Οι περιπτώσεις της συνδρομικής κρανιοσυνοστεώσης στο σύνολο των περιπτώσεων είναι πολύ μικρή, παρόλα αυτά η γενετική τους ανάλυση έχει συμβάλει καταλυτικά στην κατανόηση σημαντικών μονοπατιών ανάπτυξης και σύντηξης των κρανιακών ραφών. Τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί πάρα πολλά *in vitro* και *in vivo* πειράματα, τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπινους οστεοβλάστες ή άλλες κυτταρικές σειρές προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος πολλών διαφορετικών παραγόντων και ιδιαίτερα της σηματοδότησης FGF/FGFR στη φυσιολογική ανάπτυξη του κρανιακού θόλου και στην κρανιοσυνοστεώση.

Με βάση τα παραπάνω σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

A) Η ανίχνευση της υποκείμενης μοριακής βλάβης σε ασθενείς με κρανιοσκελετικές ανωμαλίες, η οποία θα συμβάλλει στο βέλτιστο και λεπτομερή συσχετισμό γονοτύπου-φαινοτύπου. Ο μοριακός έλεγχος των ασθενών μπορεί να οδηγήσει σε μοριακή διάγνωση, η οποία θα επιτρέψει τη σωστή αντιμετώπιση των ασθενών.

Β) Η κατανόηση του σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί σε κρανιοσυνοστέωση. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν να διερευνηθούν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης δυο μεταγραφικών παραγόντων, του RUNX2 και του TWIST1, που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, καθώς επίσης και του γονιδίου *COL1A1*, που αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης των οστεοβλαστών μεταξύ ασθενών με κρανιοσυνοστέωση, συνδρομική ή μη, και φυσιολογικών ατόμων σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών που καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες ανάπτυξης.

Γ) Η προτυποποίηση της καλλιέργειας των δερματικών ινοβλαστών ως πιθανό μοντέλο μελέτης της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών, του οποίου η χρησιμότητα αξίζει να διερευνηθεί για δυο βασικούς λόγους. Πρώτον, είναι πολύ εύκολο να καλλιιεργηθούν άμεσα, λαμβάνοντας μια μικρή βιοψία από δέρμα κρανίου ή μηρού κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, σε αντίθεση με τη δυσκολία χειρισμών των ιστών από ραφές και των οστεοβλαστών. Δεύτερον, οι ινοβλάστες, λόγω της κοινής, μεσεγχυματικής προέλευσης σχετίζονται αναπτυξιακά με τους οστεοβλάστες, οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί ως “εκλεπτυσμένοι ινοβλάστες” (“sophisticated fibroblasts”) (Ducy et al., 2000), αντιπροσωπεύοντας έτσι έναν σχετικό με αυτούς κυτταρικό τύπο.



### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3Α. ΥΛΙΚΟ

##### ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΛΗΦΘΗΣΑΝ

Για την παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν βιολογικά υλικά από 50 ασθενείς με κρανιοσκελετικές ανωμαλίες που προσήλθαν στο Ελληνικό Κρασιοπροσωπικό Κέντρο (Νοσοκομείο ΜΗΤΕΡΑ) για αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής ή/και για παρακολούθηση της μετεγχειρητικής τους πορείας, εκτός από μια ασθενή χωρίς κρανιοσκελετικό πρόβλημα, που χειρουργήθηκε για την αφαίρεση συγγενούς σπίλου στην οπίσθια επιφάνεια του δεξιού μηρού (περίπτωση φυσιολογικού δείγματος ελέγχου).

Σε όλους τους ασθενείς έγινε λήψη περιφερικού αίματος για τον έλεγχο γενετικών μεταλλαγών σε επιλεγμένα γονίδια ή/και μικροελλείψεων/μικροδιπλασιασμών σε στοχευμένες χρωμοσωμικές περιοχές. Σε ορισμένους ασθενείς, που χειρουργήθηκαν για αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής λόγω κρανιοσυνοστέωσης, πλαγιοκεφαλίας εκ θέσεως ή για ανεξάρτητο λόγο (περίπτωση φυσιολογικού δείγματος ελέγχου) έγινε λήψη ιστοτεμαχίων από δέρμα κρανίου ή μηρού για την καλλιέργεια ινοβλαστών, για την πραγματοποίηση πειραμάτων προσδιορισμού της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων στα κύτταρα αυτά. Επίσης, ελήφθησαν αίματα γονέων των ασθενών, όπου αυτό ήταν δυνατό.

Η ηλικία των ασθενών αναφέρεται στην ηλικία που είχαν κατά τη λήψη των δειγμάτων, ενώ η κλινική περιγραφή τους αντικατοπτρίζει την αρχική τους εικόνα πριν από οποιαδήποτε χειρουργική αποκατάσταση.

##### ***Φυσιολογικά δείγματα ελέγχου***

**Ασθενής C1:** Θήλυ, ηλικίας 1 έτους και 2 μηνών που χειρουργήθηκε για την αφαίρεση συγγενούς σπίλου στην οπίσθια επιφάνεια του δεξιού μηρού. Ελήφθη μικρό τμήμα υγιούς δέρματος από το δεξιό μηρό για την καλλιέργεια ινοβλαστών, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί



ως φυσιολογικό δείγμα ελέγχου, με το οποίο θα συγκριθούν τα δείγματα ασθενών με κраниοσυνοστέωση κατά τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης.

**Ασθενής 51:** Άρρεν, ηλικίας 10 μηνών με πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως, χωρίς ύπαρξη συνοστεωμένων ραφών, αλλά με σοβαρή οστική παραμόρφωση και αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση (ευρήματα από αξονική και μαγνητική τομογραφία) (Εικόνα 22). Κατά τη χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, ελήφθη ιστοτεμάχιο δέρματος από το κраниό προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες. Το δείγμα αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως ένα επιπλέον φυσιολογικό δείγμα ελέγχου, όσον αφορά στην κраниοσυνοστέωση.



**Εικόνα 22:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 51. Πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως, χωρίς ύπαρξη συνοστεωμένων ραφών.

### **Δείγματα ασθενών με κраниοσκελετικές ανωμαλίες**

*Οι ασθενείς 1 και 3 είναι αδέρφια, χωρίς άλλο οικογενειακό ιστορικό.*

**Ασθενής 1:** Θήλυ, ηλικίας 6 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής. Η ασθενής έχει σκαφοκεφαλική εμφάνιση με προπέτεια του μετώπου και εισολκή του πτερίου. Εμφανίζει, επίσης, ψηλαφητή ακρολοφία στο ανώτερο τμήμα της μεσομετωπιαίας ραφής, χωρίς υποτελορισμό (Εικόνα 23).

**Ασθενής 3:** Άρρεν, ηλικίας 4 ετών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής καθώς και της συμβολής της οβελιαίας με τη λαμβδοειδή και με τη στεφανιαία ραφή, προκαλώντας έντονη κраниακή δυσμορφία και αμφιμετωπική

προβολή χαμηλής ινιακής περιοχής. Η οβελιαία ραφή καθώς και η αρχή της λαμβδοειδούς ήταν πολύ έντονα ψηλαφητές, ενώ τα οστά στην βρεγματοϊνιακή περιοχή ήταν εξαιρετικά λεπτά, αιμορραγικά και με σχεδόν ψηκτροειδή υφή.



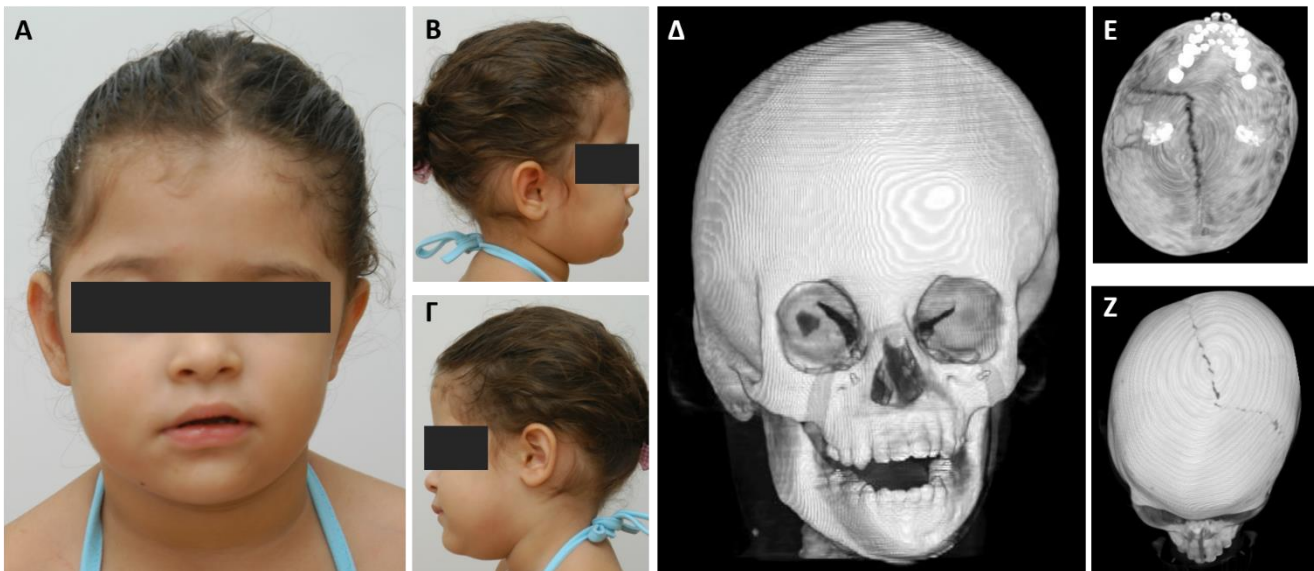
**Εικόνα 23:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 1. Μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής.

**Ασθενής 2:** Θήλυ, ηλικίας 10 μηνών με συνδρομική τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής, στένωση του πρόσθιου ημιμορίου του κρανίου και μικρού βαθμού υποτελορισμό. Δεν υπάρχει διαθέσιμη πλήρης κλινική περιγραφή, αν και αναφέρεται πιθανό Klippel-Feil, άλλα ευρήματα σε κορμό και άκρα καθώς και ανοσοανεπάρκεια (Εικόνα 24).



**Εικόνα 24:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 2. Συνδρομική τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής.

**Ασθενής 4:** Θήλυ, ηλικίας 6 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής (Εικόνα 25). Η ασθενής παρουσίαζε στραβισμό και μειωμένη οπτική οξύτητα (Δ.Ο.: 6/10 και Α.Ο.: 1/10), η οποία αποκαταστάθηκε μετά τη χειρουργική επέμβαση επιδιόρθωσης του σχήματος της κεφαλής (Α.Ο.: 10/10).



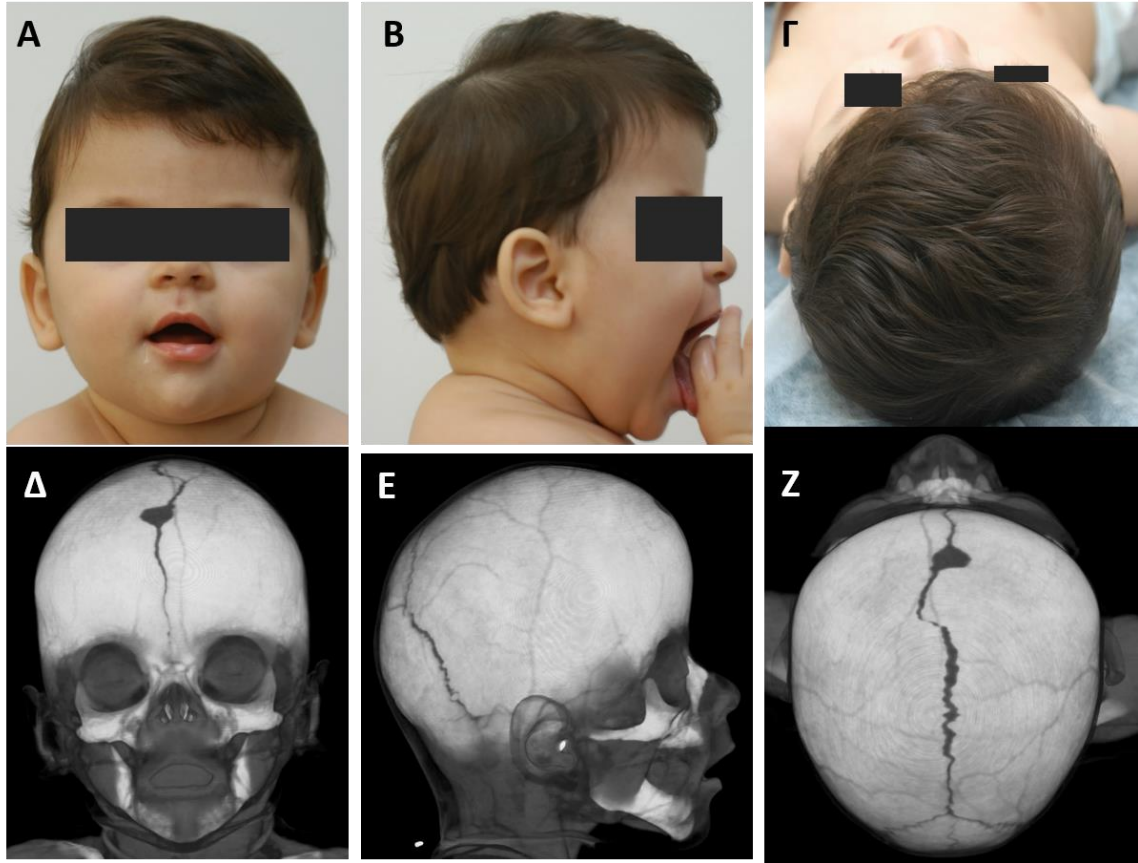
**Εικόνα 25:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 4 (μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής) (Α, Β, Γ) και τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (Δ, Ε, Ζ).

**Ασθενής 5:** Θήλυ, ηλικίας 4 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 6:** Θήλυ, ηλικίας 11 ετών με μέση κρανιοπροσωπική σχιστία, υπερτελορισμό, αναδίπλωση-περίσσεια δέρματος στη ρινική χώρα και φωκομέλια δεξιού άνω άκρου. Η ασθενής είναι προϊόν μονήρους κύησης κατόπιν εξωσωματικής γονιμοποίησης με δότη σπέρματος.

**Ασθενής 7:** Άρρεν, ηλικίας 5 ετών και 7 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής.

**Ασθενής 8:** Θήλυ, ηλικίας 3 ετών και 10 μηνών με μη συνδρομική βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής και αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση (Εικόνα 26).



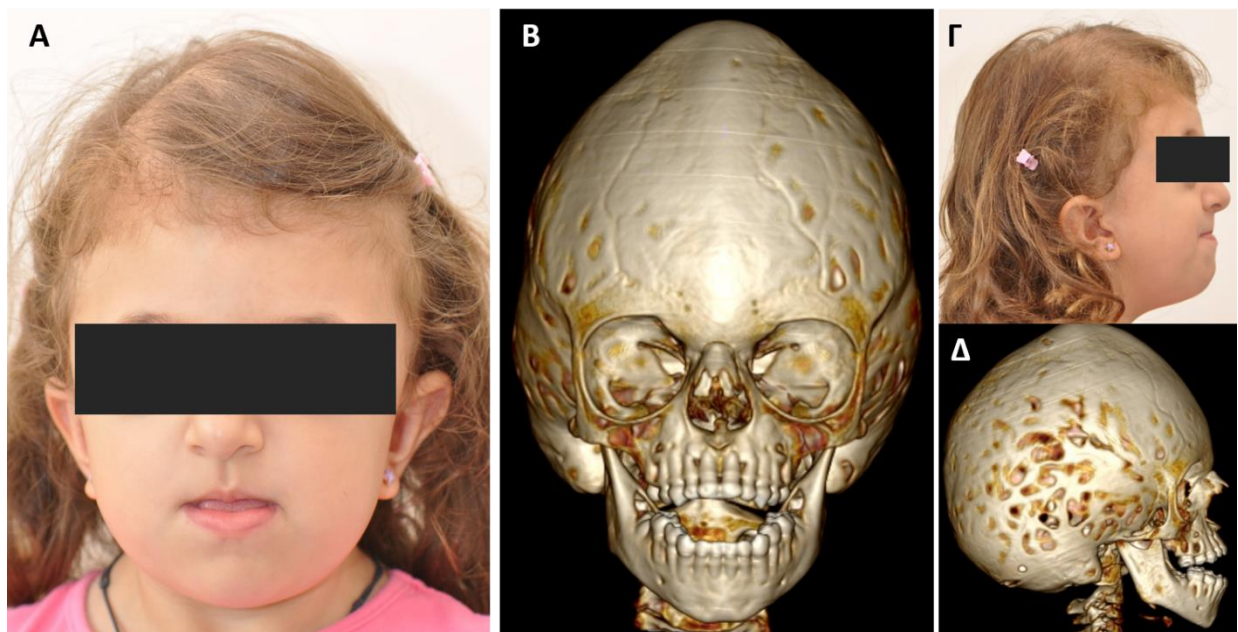
**Εικόνα 26:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 8 (μη συνδρομική βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής) (A, B, Γ) και τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (Δ, Ε, Ζ).

**Ασθενής 10:** Άρρεν, ηλικίας 11 ετών με σύνδρομο Crouzon, με βραχυκεφαλία και ήπια τριγωνοκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας, της μετωπιαίας και του πρόσθιου τμήματος της οβελιαίας ραφής. Εμφανίζει, επίσης, υποπλασία άνω γνάθου, αβαθείς οφθαλμικούς κόγχους, πρόπτωση βολβών, εξόφθαλμο, αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, στένωση υδραγωγού και υδροκέφαλο (Εικόνα 27). Κατά τη 2<sup>η</sup> χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίου δέρματος από το κρανίο προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες.



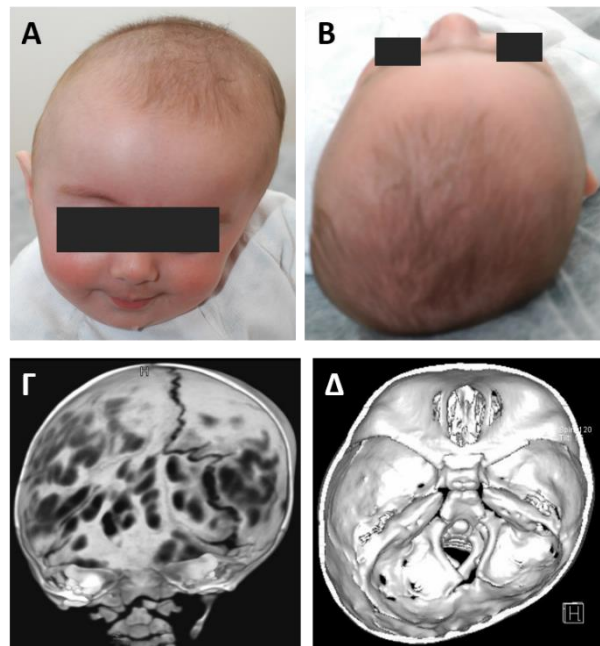
**Εικόνα 27:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 10. Σύνδρομο Crouzon, με βραχυκεφαλία και ήπια τριγωνοκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας, της μετωπιαίας και του πρόσθιου τμήματος της οβελιαίας ραφής.

**Ασθενής 11:** Θήλυ, ηλικίας 3 ετών και 10 μηνών με σύνδρομο Crouzon. Εμφανίζει οξυκεφαλία (πυραμιδικό σχήμα κεφαλής) λόγω συνοστέωσης όλων των κρανιακών ραφών (στεφανιαία, οβελιαία, μετωπιαία και λαμβδοειδή), αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, εξόφθαλμο, αβαθείς οφθαλμικούς κόγχους και υπερτελορισμό (Εικόνα 28). Αναφέρεται φυσιολογικός καρυότυπος.



**Εικόνα 28:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 11 (σύνδρομο Crouzon με οξυκεφαλία λόγω πανσυνόστωσης) (A, Γ) και οι αντίστοιχες τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (B, Δ).

**Ασθενής 12:** Άρρεν, ηλικίας 11 μηνών με μη συνδρομική δεξιά ινιακή πλαγιοκεφαλία, λόγω συνοστέωση της δεξιάς λαμβδοειδούς ραφής (Εικόνα 29). Ο ασθενής είναι προϊόν τρίδυμης κύησης κατόπιν εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τα υπόλοιπα έμβρυα ήταν ένα φυσιολογικό άρρεν κι ένα θήλυ που αναφέρεται ότι παρουσίαζε ορθοπαιδικές ανωμαλίες και συνδακτυλίες, πιθανόν λόγω ρήξης του αμνιακού σάκου.



**Εικόνα 29:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 12 (μη συνδρομική δεξιά ινιακή πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωση της δεξιάς λαμβδοειδούς ραφής (A, B) και οι αντίστοιχες αξονικές τομογραφίες (Γ, Δ).

**Ασθενής 13:** Θήλυ, ηλικίας 1 έτους με συνδρομική σκαφοκεφαλία, πιθανό σύνδρομο Crouzon ή Saethre-Chotzen, χωρίς εμφανή συνοστέωση των κρανιακών ραφών. Η ασθενής παρουσίαζε, επίσης, υπερτελορισμό, αβαθείς οφθαλμικούς κόγχους με πρόπτωση των βολβών, υποπλασία της άνω γνάθου, μη ψηλαφητές επιγονατίδες, αδυναμία πλήρους υπτιασμού στην άρθρωση του αγκώνα αμφοτερόπλευρα, ομφαλοκήλη, ελαφρώς αυξημένη απόσταση μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> δακτύλου στα κάτω άκρα αμφοτερόπλευρα και καρδιακό φύσημα. Η κλινική περιγραφή που υπήρχε στη διάθεση μας ήταν ελλειπής και ως εκ τούτου, παραπλανητική. Εκ των υστέρων, η ιατρική γνωμάτευση που παρελήφθη ανέφερε καρυότυπο φυσιολογικού θήλεος με σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής, αραχνοδακτυλία και ανωμαλίες θώρακος, χαρακτηριστικά που σε συνδυασμό με τον υπερτελορισμό και την ομφαλοκήλη παραπέμπουν στο σύνδρομο Shprintzen-Goldberg, που μπορεί να οφείλεται σε ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο *SKI* (1p36).

Οι ασθενείς 14 και 15 είναι μονοζυγωτικά δίδυμα, χωρίς άλλο οικογενειακό ιστορικό.

**Ασθενής 14:** Θήλυ, ηλικίας 5 ετών και 4 μηνών με σύνδρομο Apert. Η κλινική περιγραφή είναι ελλιπής, αλλά αναφέρονται μετρίου βαθμού πυργοκεφαλία, υπερτελορισμός, θολωτή υπερώα χωρίς σχιστία, αμφοτερόπλευρες συνδακτυλίες άνω και κάτω άκρων και δυσλειτουργία της κατ' ώμου άρθρωσης (Εικόνα 30Α-Δ).

**Ασθενής 15:** Θήλυ, ηλικίας 5 ετών και 4 μηνών με σύνδρομο Apert. Η κλινική περιγραφή είναι ελλιπής, αλλά αναφέρονται σοβαρού βαθμού πυργοκεφαλία, υδροκέφαλο, πλατύτητα μέσου τριτημορίου του προσώπου, θολωτή υπερώα χωρίς σχιστία, διαταραχή οδοντοφυΐας, ελαφρά κλίση της κεφαλής προς τα κάτω και δεξιά (Εικόνα 30Ε-Η), αμφοτερόπλευρες συνδακτυλίες άνω και κάτω άκρων και δυσλειτουργία της κατ' ώμου άρθρωσης.

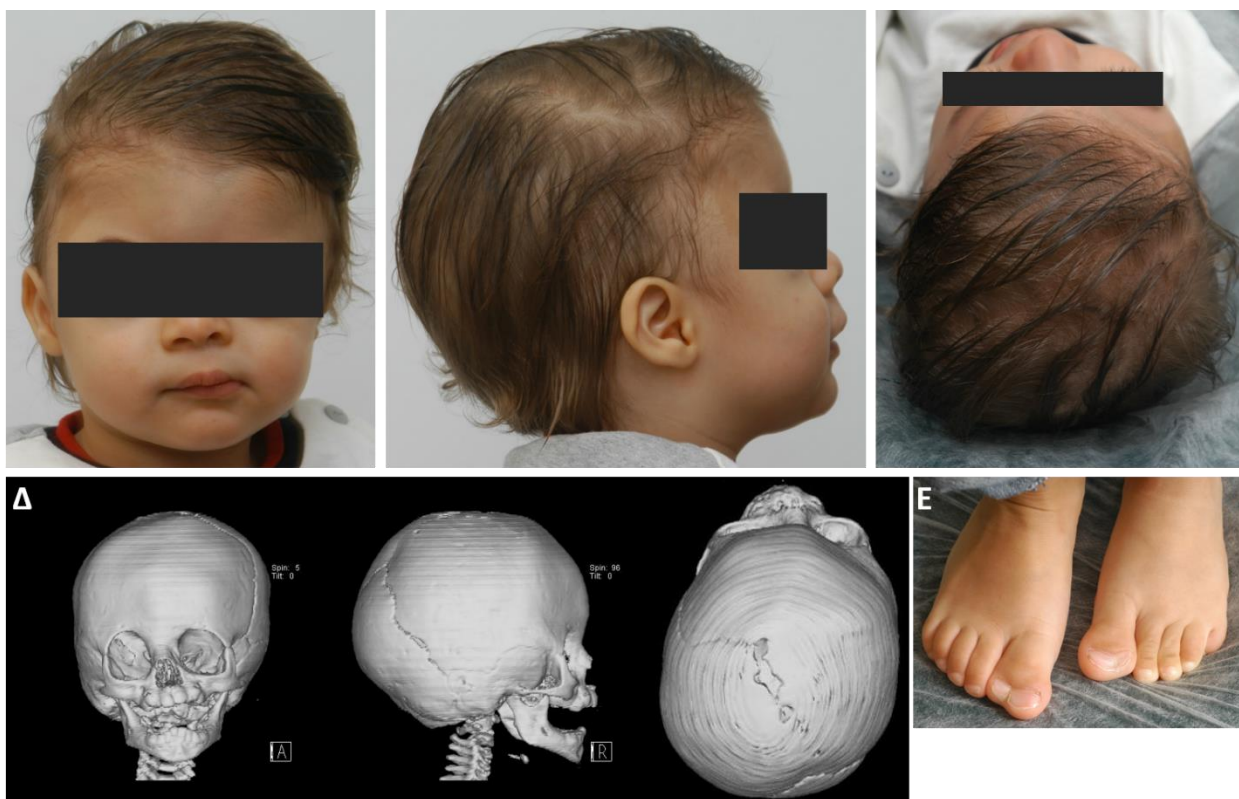


**Εικόνα 30:** Μετεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του προσώπου και των άνω άκρων των ασθενών 14 (Α-Δ) και 15 (Ε-Ζ). Μονοζυγωτικά δίδυμα με σύνδρομο Apert.

**Ασθενής 16:** Άρρεν, ηλικίας 9 ετών και 4 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής και συνδακτυλία 2/3 του αριστερού κάτω άκρου.

**Ασθενής 17:** Άρρεν, ηλικίας 1 έτους με αμφοτερόπλευρη ινιακή πλαγιοκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της λαμβδοειδούς ραφής και του οπίσθιου τμήματος της οβελιαίας ραφής, με απόλυτα πεπλατυσμένη τη βρεγματοϊνιακή χώρα αλλά χωρίς ενδοκρανιακή υπέρταση.

**Ασθενής 18:** Άρρεν, ηλικίας 3 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής ή πιθανό σύνδρομο Muenke, μετατόπιση του ριζορίνιου προς τα δεξιά και άνω, έντονη δυσμορφία του μετώπου, υποχώρηση του δεξιού οφθαλμικού κόγχου, στραβισμό του δεξιού οφθαλμού (Εικόνα 31Α-Δ) και εξαδακτυλία στο δεξιό κάτω άκρο (μεγάλο δάκτυλο) (Εικόνα 31Ε). Αναφέρεται ότι η μητέρα εμφανίζει εξαδακτυλία στο αριστερό άνω άκρο (μικρό δάκτυλο). Για τον ασθενή αναφέρεται φυσιολογικός καρυότυπος και μοριακός έλεγχος, ο οποίος ήταν αρνητικός για το εξόνιο 5 (παλιά ονομασία του εξονίου 7) του γονιδίου *FGFR1*, τα εξόνια 8 και 10 του *FGFR2* και τα εξόνια 7 και 10 του *FGFR3*.



**Εικόνα 31:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 18 (πιθανά συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής) (Α, Β, Γ) και οι αντίστοιχες τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (Δ). (Ε) Εξαδακτυλία στο δεξιό κάτω άκρο.



**Ασθενής 19:** Θήλυ, ηλικίας 6 ετών με μετωπιαία πλαγιοκεφαλία, πιθανόν συνδρομική, λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής, πάρεση του αριστερού προσωπικού νεύρου, στραβισμό του αριστερού οφθαλμού και διαταραχές συμπεριφοράς. Αναφέρεται μοριακός έλεγχος, ο οποίος ήταν αρνητικός για το εξόνιο 5 (παλιά ονομασία του εξονίου 7) του γονιδίου *FGFR1*, τα εξόνια 8 και 10 του *FGFR2* και τα εξόνια 7 και 10 του *FGFR3*.

**Ασθενής 20:** Άρρεν, ηλικίας 1 έτους και 2 μηνών με μη συνδρομική αριστερή πλαγιοκεφαλία, λόγω συνοστέωσης της αριστερής στεφανιαίας ραφής και ραιβόκρανο. Η αριστερή πλευρά του μετώπου του ασθενούς είναι αποπεπλατυσμένη, ο αριστερός οφθαλμικός κόγχος βρίσκεται υψηλότερα από τον δεξιό και το ριζορρίνιο έλκεται προς τα αριστερά.

**Ασθενής 22:** Θήλυ, ηλικίας 16 ετών με κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS), με συνοστέωση της δεξιάς στεφανιαίας ραφής, τυπική «μεφιστοφελική» δυσμορφία, μετατόπιση του δεξιού οφθαλμικού κόγχου και φρυδιού προς τα πάνω, υπερτελορισμό, αποπλάτυνση της δεξιάς πλευράς του μετώπου, φαρδιά μύτη με μετατόπιση του ριζορινίου προς τα δεξιά, συρρίκνωση του δεξιού πρόσθιου κρανιακού βόθρου και πρόσθια μετατόπιση του δεξιού λιθοειδούς οστού (Εικόνα 32). Στην οφθαλμολογική εξέταση διαπιστώνεται σοβαρή αμβλυωπία του δεξιού οφθαλμού, προκληθείσα από αστιγματισμό (αμετρωπία και ανισομετρωπία), αριστερή υποτροπία και εξωτροπία που προκαλούσαν ψευδοπτώση του αριστερού άνω βλεφάρου. Η ασθενής αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως πιθανό σύνδρομο Saethre-Chotzen ή περίπτωση μη συνδρομικής συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής.



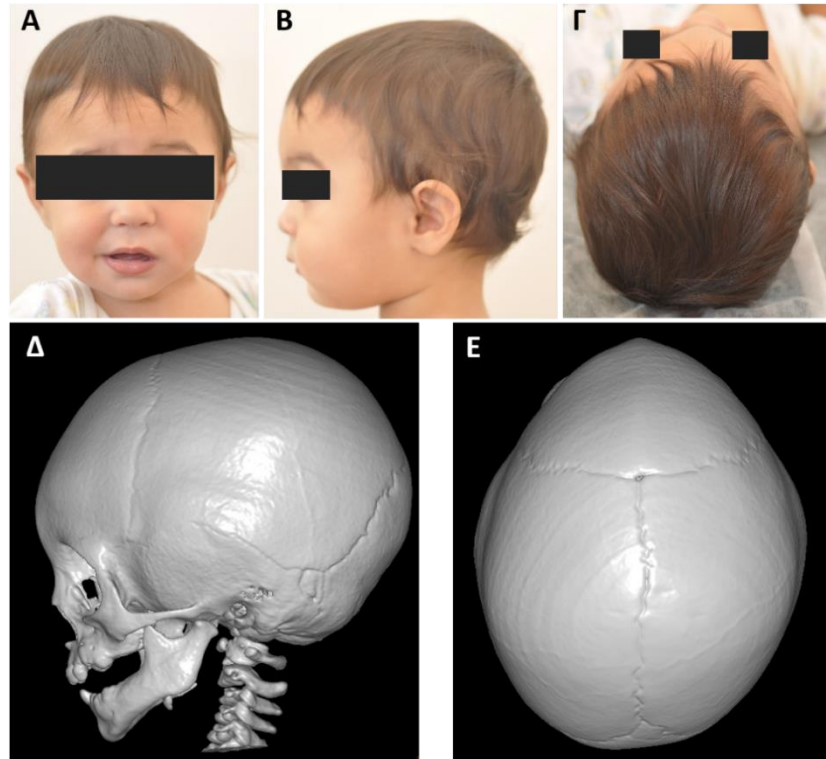
**Εικόνα 32:** Φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 22 (κραιομετωπορινικό σύνδρομο με συνοστέωση της δεξιάς στεφανιαίας ραφής) (A, B) και τρισδιάστατη αξονική τομογραφία (Δ) προεγχειρητικά και μετεγχειρητική φωτογραφία (Γ).

**Ασθενής 23:** Άρρεν, ηλικίας 3 ετών και 3 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία, πιθανότατα λόγω συνοστέωσης της περιοχής της συμβολής της οβελιαίας ραφής με τη λαμβδοειδή.

**Ασθενής 24:** Άρρεν, ηλικίας 6 ετών με μη συνδρομική τριγωνοκεφαλία, λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής. Αδυναμία υπτιασμού των άνω άκρων λόγω συνοστέωσης της κερκίδας και της ωλένης στην άρθρωση του αγκώνα, τόσο στον ασθενή όσο και στη μητέρα του.

**Ασθενής 25:** Άρρεν, ηλικίας 11 μηνών με μη συνδρομική τριγωνοκεφαλία, λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής και μικρού βαθμού υποτελορισμό. Ο ασθενής είναι προϊόν εξωσωματικής γονιμοποίησης και μέχρι την 6<sup>η</sup> εβδομάδα συμμετείχε σε δίδυμη κύηση, όπου και παλινδρόμησε το 2<sup>ο</sup> έμβρυο.

**Ασθενής 26:** Άρρεν, ηλικίας 1 έτους με μη συνδρομική τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής (Εικόνα 33).



**Εικόνα 33:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 26 (μη συνδρομική τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής) (A, B, Γ) και τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (Δ, Ε).

**Ασθενής 27:** Άρρεν, ηλικίας 3 ετών και 4 μηνών με μη συνδρομική βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 29:** Άρρεν, ηλικίας 7 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής.

**Ασθενής 31:** Άρρεν, ηλικίας 6.5 ετών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής. Ο ασθενής, που συμμετείχε σε δίδυμη κύηση, γεννήθηκε πρόωρα με καισαρική τομή στις 28 εβδομάδες, μετά από ρήξη του αμνιακού σάκου στις 27 εβδομάδες. Η δίδυμη αδελφή του ήταν φυσιολογική.

**Ασθενής 33:** Άρρεν, ηλικίας 16 ετών με ήπιο σύνδρομο Crouzon, με εξόφθαλμο, υποπλασία του μέσου τριτημορίου του προσώπου και ενδοκρανιακή υπέρταση, χωρίς άλλα στοιχεία σχετικά με τον αριθμό και το είδος των συνοστεωμένων ραφών (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 33. Ήπιο σύνδρομο Crouzon.

**Ασθενής 34:** Θήλυ, ηλικίας 22 ετών με σύνδρομο Crouzon, με πολλαπλές συνοστεώσεις, οπισθογναθισμό της άνω γνάθου και εξόφθαλμο (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 34. Σύνδρομο Crouzon.

**Ασθενής 35:** Άρρεν, ηλικίας 2 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής, διαφραγματοκήλη και κρυψορχία. Κατά τη 2<sup>η</sup> χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίου δέρματος από το κρανίο προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες.

**Ασθενής 36:** Θήλυ, ηλικίας 2 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική αριστερή πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της αριστερής στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 37:** Θήλυ, ηλικίας 7 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής. Στην ασθενή παράλληλα με το δικό μας έλεγχο πραγματοποιήθηκε μοριακός καρυότυπος με τη μέθοδο μικροσυστοιχιών συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-CGH).

**Ασθενής 38:** Θήλυ, ηλικίας 2 ετών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 39:** Άρρεν, ηλικίας 7 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής. Αναφέρεται συμβατικός καρυότυπος με φυσιολογικά αποτελέσματα άρρενος ατόμου καθώς και μοριακός καρυότυπος, με τη μέθοδο μικροσυστοιχιών συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (array-CGH) διακριτικής ικανότητας 1Mb χωρίς παθολογικά ευρήματα.

**Ασθενής 40:** Θήλυ, ηλικίας 19 ετών με κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS), με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, ήπιο υπερτελορισμό και στραβισμό (Εικόνα 36A, B). Το μέτωπο παρουσιάζει χαμηλή τριχοφυΐα και τριγωνική προβολή του τριχωτού της κεφαλής (Εικόνα 36Δ, E). Η ασθενής παρουσιάζει, επίσης, φαρδιά μύτη με εγκοπή, δυσμορφικό θώρακα με εισολκή του στέρνου και χαμηλή πρόσφυση των μαστών (Εικόνα 36Γ), δυσλειτουργία στις κατ' ώμων αρθρώσεις, σκολίωση, δερματική πολυσυνδακτυλία δεξιού άνω άκρου (εξαδακτυλία-επιπλέον δάκτυλο μεταξύ 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> δακτύλου, δερματική συνδακτυλία 4/5) και δερματική συνδακτυλία 3/4 του αριστερού κάτω άκρου (Εικόνα 36Ζ). Η ασθενής αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως πιθανό ήπιο σύνδρομο Apert ή Pfeiffer.



**Εικόνα 36:** Προεγχειρητικές (Α, Β) και μετεγχειρητικές (Δ, Ε) φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 40 (κρανιομετωπορινικό σύνδρομο με αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής). (Γ) Δυσμορφικός θώρακα με εισολκή του στέρνου και χαμηλή πρόσφυση των μαστών. (Ζ) Δερματική συνδακτυλία 3/4 αριστερού κάτω άκρου.

**Ασθενής 41:** Άρρεν, ηλικίας 6 μηνών με μη συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 42:** Άρρεν, ηλικίας 10 μηνών με μη συνδρομική αριστερή πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της αριστερής στεφανιαίας ραφής, έλξη της ρινός προς τα αριστερά και

έλξη του αριστερού οφθαλμικού κόγχου προς τα πάνω. Η πρόσθια πηγή παραμένει ανοιχτή (Εικόνα 37).



**Εικόνα 37:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 42. Αριστερή πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της αριστερής στεφανιαίας ραφής.

**Ασθενής 43:** Άρρεν, ηλικίας 2 μηνών με σύνδρομο Apert, με αμφοτερόπλευρη συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής, αβαθείς οφθαλμικούς κόγχους, υπερτελορισμό, υποπλασία ρινικών κοιλοτήτων, στένωση ρινικών χοανών, δυσπλασία άκρων χεριών και ποδών, συνδακτυλία άκρων χεριών και συνένωση, δακτύλων κάτω άκρων, κυρίως σε δερματικό επίπεδο, κάμψη προς τα έσω άκρων χεριών και ποδών.

**Ασθενής 44:** Θήλυ, ηλικίας 6 ετών και 3 μηνών με σύνδρομο Crouzon, με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, εξόφθαλμο, υποπλασία μέσου τριτημορίου του προσώπου (Εικόνα 38) και αμφοτερόπλευρη αρθρογρύπωση και συνοστέωση στις αρθρώσεις του αγκώνα. Κατά την 3<sup>η</sup> χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίων δέρματος τόσο από το κρανίο όσο και από την έξω επιφάνεια του δεξιού μηρού, προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες.



**Εικόνα 38:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 44 (σύνδρομο Crouzon με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής) (A, B) και τρισδιάστατη αξονική τομογραφία (Γ).

**Ασθενής 45:** Άρρεν, ηλικίας 9 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωση της οπίσθιας μοίρας της οβελιαίας ραφής. Κατά τη χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίου δέρματος από το κρανίο, προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες.

**Ασθενής 46:** Άρρεν, ηλικίας 10 μηνών με μη συνδρομική αριστερή ινιακή πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της αριστερής λαμβδοειδούς ραφής, αγγειακή δυσπλασία ράχης (οσφυϊκή μοίρα) και διάσταση λευκής γραμμής.

**Ασθενής 47:** Θήλυ, ηλικίας 7 ετών και 5 μηνών με πιθανό σύνδρομο Pfeiffer, με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, προπέτεια μετώπου, υπερτελορισμό, στραβισμό λόγω οστέινης δυσμορφίας, χαμηλή πρόσφυση των αυτιών (Εικόνα 39A, B, Γ), αμφοτερόπλευρη στένωση των έξω ακουστικών πόρων και, σε ήπιο βαθμό, φαρδιούς και κοντούς αντίχειρες.

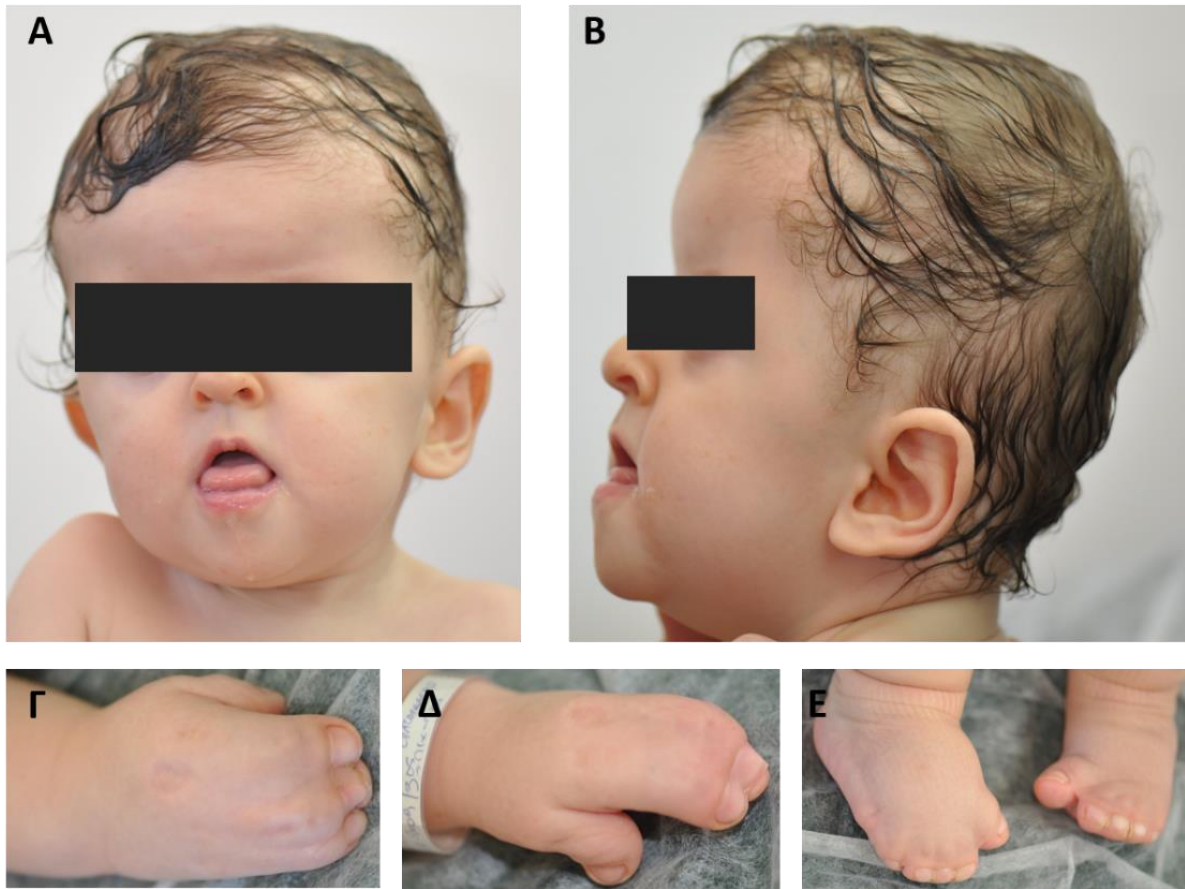




**Εικόνα 39:** Προεγχειρητικές (A, B) και μετεγχειρητικές (Γ) φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 47 (συνδρομική συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής αμφοτερόπλευρα) καθώς και του πατέρα της (Δ, Ε, Ζ).

**Ασθενής 48:** Θήλυ, ηλικίας 11 μηνών με σύνδρομο Apert, με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, διάσταση των κρανιακών οστών, αποπλάτυνση και εισολκή του μέσου τριτημορίου του προσώπου (Εικόνα 40Α, Β), έμμεσες ενδείξεις αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης (δακτυλικά εντυπώματα στο οπίσθιο τμήμα του κρανιακού σκελετού, βρεγματοϊνιακά), αμφοτερόπλευρη συνδακτυλία άνω και κάτω άκρων και κάμψη προς τα έσω άκρων χειρών και ποδών(Εικόνα 40Γ, Δ, Ε). Κατά τη χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίου

δέρματος από το κρανίο, προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες. Η ασθενής απεβίωσε μετεγχειρητικά.

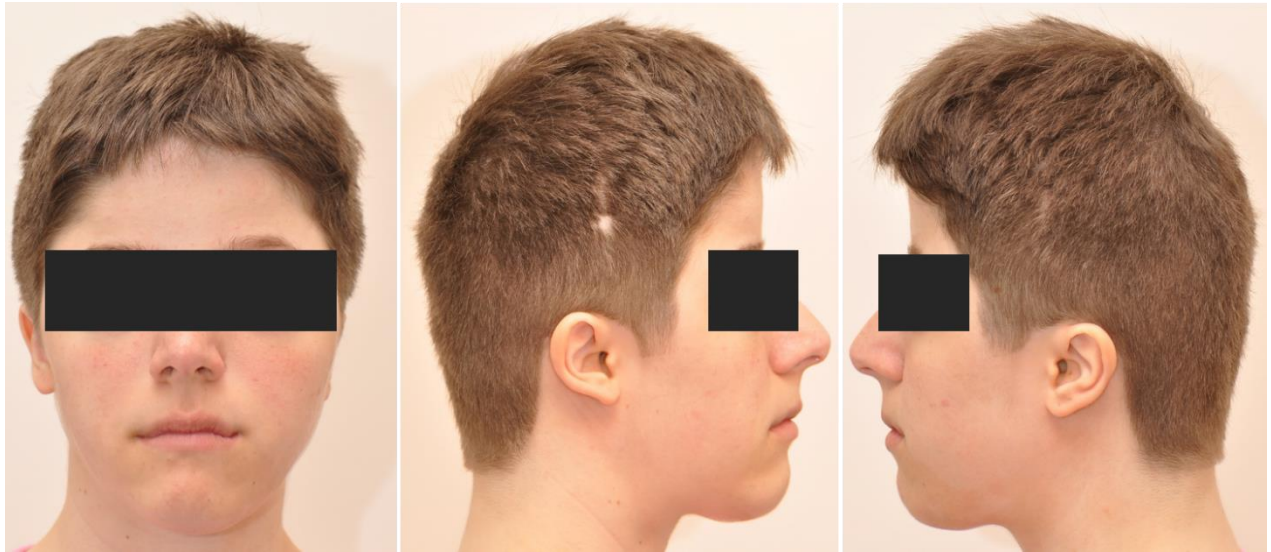


**Εικόνα 40:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 48 (σύνδρομο Apert με βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής) (**A, B**) καθώς και των άνω (**Γ, Δ**) και κάτω (**Ε**) άκρων της με αμφοτερόπλευρη συνδακτυλία.

**Ασθενής 49:** Άρρεν, ηλικίας 6 ετών και 2 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής. Ο ασθενής συμμετείχε σε δίδυμη κύηση.

**Ασθενής 52:** Θήλυ, ηλικίας 17 ετών με σύνδρομο Saethre-Chotzen, με βραχυκεφαλία και ελαφρά πυργοκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, ενδοκρανιακή υπέρταση, υπερβολική ανάπτυξη του οπίσθιου κρανιακού βόθρου, αντιμογγλοειδή θέση των έξω κανθών, ρηχούς οφθαλμικούς κόγχους, γαμψή μύτη και σκολίωση διαφράγματος (Εικόνα 41), χωρίς καμία νοητική ή μαθησιακή υστέρηση. Στην ασθενή είχε προηγηθεί, σε διαγνωστικό κέντρο του εξωτερικού, μοριακός έλεγχος που αποκάλυψε την ύπαρξη της μεταλλαγής Q122X στο γονίδιο *TWIST1*, την οποία έφεραν τόσο η μητέρα όσο και η αδελφή της. Αν και δεν υπάρχει κλινική περιγραφή αυτών, τόσο η μητέρα

όσο και η αδελφή είχαν φαινότυπο που συνάδει με το σύνδρομο Saethre-Chotzen. Σε αντίθεση με τις περισσότερες περιπτώσεις, όπου οι μεταλλαγές στα σχετιζόμενα με συνδρομική κρανιοσυνοστέωση γονίδια εμφανίζονται *de novo*, η ασθενής κληρονόμησε τη μεταλλαγή από τη μητέρα της. Κατά τη 2<sup>η</sup> χειρουργική επέμβαση για την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής, έγινε λήψη ιστοτεμαχίου δέρματος από το κρανίο προκειμένου να καλλιεργηθούν ινοβλάστες.



**Εικόνα 41:** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες της ασθενούς 52 (σύνδρομο Saethre-Chotzen, με βραχυκεφαλία και ελαφρά πυργοκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής).

**Ασθενής 53:** Άρρεν, ηλικίας 6 μηνών με πιθανή συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς και πιθανά τμήματος της αριστερής στεφανιαίας ραφής και κλειστή πρόσθια πηγή. Ο δεξιός οφθαλμικός κόγχος βρίσκεται σε υψηλότερη θέση από τον αριστερό και ο ασθενής δε συντονίζει τα μάτια του για διοφθαλμική όραση. Η πλαγιοκεφαλία είναι έντονη και έχει επηρεάσει τη συμμετρία ολόκληρου του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος (Εικόνα 42 Α-Δ). Ο πατέρας του ασθενούς εμφανίζει έντονη βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, ψηλαφητό εξόγκωμα στην περιοχή της πρόσθιας πηγής και αποπεπλατυσμένο μέτωπο (Εικόνα 42 Ε,Ζ), ενώ η πατρική γιαγιά εμφανίζει πολύ ήπιο φαινότυπο (ήπια δεξιά πλαγιοκεφαλία) (Εικόνα 42 Η, Θ), πιθανόν λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής. Η μητέρα του ασθενούς και ο μεγαλύτερος αδελφός του είναι φυσιολογικοί, ενώ η αδελφή του εμφανίζει ήπια πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως. Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας γεννήθηκε η μικρότερη

αδελφή του ασθενούς (4<sup>ο</sup> παιδί), η οποία εμφανίζει δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής.



**Εικόνα 42 :** Προεγχειρητικές φωτογραφίες από διαφορετικές οπτικές γωνίες του ασθενούς 53 (πιθανή συνδρομική δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς και πιθανά τμήματος της αριστερής στεφανιαίας ραφής και κλειστή πρόσθια πηγή) (Α, Γ) και οι αντίστοιχες τρισδιάστατες αξονικές τομογραφίες (Β, Δ). Φωτογραφίες του πατέρα (Ε, Ζ) και της πατρικής γιαγιάς (Η, Θ) του ασθενούς.

**Ασθενής 54:** Άρρεν, ηλικίας 10 μηνών με μη συνδρομική τριγωνοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής και ανοιχτή πρόσθια πηγή.

**Ασθενής 55:** Άρρεν, ηλικίας 5 μηνών με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής.

Οι περιπτώσεις των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 2 , ενώ στον Πίνακα 3 περιγράφονται αναλυτικά τα κλινικά ευρήματα των ασθενών καθώς επίσης και τα υλικά τα οποία ελήφθησαν.

**Πίνακας 2:** Συνοπτική παρουσίαση περιπτώσεων ασθενών

	<b>ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΡΑΝΙΟΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ (Αρχική κλινική εκτίμηση)</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ</b>	<b>ΑΡΡΕΝΑ</b>	<b>ΘΗΛΕΑ</b>
<b>ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ</b>	Crouzon	5	2	3
	Apert	4 (2 είναι δίδυμα θήλεα)	1	3
	Crouzon ή Saethre Chotzen	2*	-	2
	Πιθανό Muenke ή μη συνδρομική συνοστέωση στεφανιαίας ραφής	1	1	-
	Πιθανό Pfeiffer	1	-	1
	CFNS	2	-	2
	Πιθανά συνδρομική πλαγιοκεφαλία (μονόπλευρη συνοστέωση στεφανιαίας ραφής)	2	1	1
	Συνδρομική τριγωνοκεφαλία	1	-	1
	<b>Σύνολο περιπτώσεων</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>13</b>
<b>ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ</b>	Πλαγιοκεφαλία (μονόπλευρη συνοστέωση στεφανιαίας ραφής)	8	4 (εκ των οποίων 2 είχαν επιπλέον ευρήματα)	4
	Βραχυκεφαλία (αμφοτερόπλευρη συνοστέωση στεφανιαίας ραφής)	2	1	1
	Ινιακή πλαγιοκεφαλία (συνοστέωση της λαμβδοειδούς ραφής ή/και της οπίσθιας πηγής)	3	3 (εκ των οποίων 1 είχε επιπλέον ευρήματα)	-
	Σκαφοκεφαλία	12 (2 είναι αδέρφια, άρρεν και θήλυ)	10 (εκ των οποίων 1 είχε επιπλέον ευρήματα)	2
	Τριγωνοκεφαλία	4	4 (εκ των οποίων 1 είχε επιπλέον ευρήματα)	-
	<b>Σύνολο περιπτώσεων</b>	<b>29</b>	<b>22</b>	<b>7</b>
<b>ΆΛΛΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ</b>	Μέση κρανιοπροσωπική σχιστία	1	-	1
	Ινιακή πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως	1	1	-
	Φυσιολογικό δείγμα ελέγχου	1	-	1

\*: Η μια ασθενής είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως σύνδρομο Crouzon και στην συνέχεια ως Saethre-Chotzen, διάγνωση με βάση το μοριακό έλεγχο στον οποίο ανιχνεύθηκε σε ετερόζυγη κατάσταση η μεταλλαγή p.Q122X (c.364C>T) στο γονίδιο *TWIST1*.

**Πίνακας 3:** Αναλυτική κλινική περιγραφή ασθενών και υλικά που ελήφθησαν

ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	ΣΧΗΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΥΝΟΣΤΕΩΜΕΝΗ ΡΑΦΗ	ΆΛΛΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	ΣΥΛΛΗΨΗ / ΚΥΗΣΗ	ΥΛΙΚΟ
1	ΘΗΛΥ αδελφή ασθενούς 3	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
2	ΘΗΛΥ	ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ	ελλιπής περιγραφή, αναφέρονται ευρήματα σε κορμό και άκρα, ανοσοανεπάρκεια	ΠΙΘΑΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ KLIPPEL-FEIL	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
3	ΑΡΡΕΝ αδελφός ασθενούς 1	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΠΙΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΟΒΕΛΙΑΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΩΤΕΡΟ ΤΜΗΜΑ ΛΑΜΒΔΟΕΙΔΟΥΣ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
4	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	στραβισμός, μειωμένη οπτική οξύτητα (Δ.Ο.: 6/10 και Α.Ο.: 1/10)	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
5	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
6	ΘΗΛΥ	ΜΕΣΗ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ ΣΧΙΣΤΙΑ	ΚΑΜΙΑ	υπερτελορισμός, αναδίπλωση-περίσσεια δέρματος στη ρινική χώρα, φωκομέλεια δεξιού άνω άκρου	ΜΕΣΗ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΗ ΣΧΙΣΤΙΑ	IVF/ ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
7	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
8	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
10	ΑΡΡΕΝ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ ΚΑΙ ΗΠΙΑ ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ, ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΟΒΕΛΙΑΙΑΣ	υποπλασία άνω γνάθου, αβαθείς οφθαλμικοί κόγχοι, πρόπτωση βολβών, εξόφθαλμος, αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, στένωση υδραγωγού, υδροκέφαλος	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
11	ΘΗΛΥ	ΟΞΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΛΕΣ (ΠΑΝΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ)	αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, εξόφθαλμος, αβαθείς οφθαλμικοί κόγχοι, υπερτελορισμός	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
12	ΑΡΡΕΝ	ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΛΑΜΒΔΟΕΙΔΗΣ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	IVF/ ΤΡΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα
13	ΘΗΛΥ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΠΙΘΑΝΑ ΚΑΜΙΑ (ελλιπής περιγραφή)	υπερτελορισμός, αβαθείς οφθαλμικοί κόγχοι με πρόπτωση των βολβών, υποπλασία άνω γνάθου, μη ψηλαφητές επιγονατίδες, αδυναμία πλήρους υπτιασμού στην άρθρωση του ακώνα αμφοτερόπλευρα, ομφαλοκήλη, ελαφρώς αυξημένη απόσταση μεταξύ 1 <sup>ου</sup> και 2 <sup>ου</sup> δακτύλου στα κάτω άκρα, καρδιακό φύσημα <i>Εκ των υστέρων αναφέρθηκαν συνοστέωση, αραχνοδακτυλία και ανωμαλίες θύρακος</i>	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON Ή SAETHRE CHOTZEN	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
14	ΘΗΛΥ δίδυμη αδελφή ασθενούς 15	ΠΥΡΓΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ; (ελλιπής περιγραφή)	υπερτελορισμός, θολωτή υπερώα χωρίς σχιστία, αμφοτερόπλευρη συνδακτυλία άνω και κάτω άκρων, δυσλειτουργία στις κατ' ώμων αρθρώσεις	ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT	Κ.Φ. / ΔΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα

ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	ΣΧΗΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΥΝΟΣΤΕΩΜΕΝΗ ΡΑΦΗ	ΆΛΛΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	ΣΥΛΛΗΨΗ / ΚΥΗΣΗ	ΥΛΙΚΟ
15	ΘΗΛΥ δίδυμη αδελφή ασθενούς 14	ΠΥΡΓΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ; (ελλυτής περιγραφή)	υδροκέφαλος, πλατύτητα μέσου τριτημορίου του προσώπου, θολωτή υπερώα χωρίς σχιστία, διαταραχή οδοντοφυΐας, ελαφρά κλίση της κεφαλής προς τα κάτω και δεξιά, αμφοτερόπλευρη συνδακτυλία άνω και κάτω άκρων, δυσλειτουργία στις κατ' ώμων αρθρώσεις	ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT	Κ.Φ. / ΔΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα
16	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ	συνδακτυλία 2/3 αριστερού κάτω άκρου	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
17	ΑΡΡΕΝ	ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΗ ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΛΑΜΒΔΟΕΙΔΗΣ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ ΚΑΙ ΟΠΙΣΘΙΟ ΤΜΗΜΑ ΟΒΕΛΙΑΙΑΣ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
18	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	μετατόπιση ριζορίνιου προς τα δεξιά και άνω, έντονη δυσμορφία μετώπου, υποχώρηση δεξιού οφθαλμικού κόγχου, στραβισμός δεξιού οφθαλμού, εξαδακτυλία κάτω άκρων (μεγάλο δάκτυλο)	ΠΙΘΑΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΜΥΕΝΚΕΉ ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
19	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	πάρεση αριστερού προσωπικού νεύρου, στραβισμός αριστερού οφθαλμού, διαταραχές συμπεριφοράς	ΠΙΘΑΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
20	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	ραιβόκρανο	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
22	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	τυπική «μεφιστοφελική» δυσμορφία, υπερτελορισμός, αποπλάτυση δεξιάς πλευράς του μετώπου, φαρδιά μύτη με μετατόπιση του ριζορίνιου προς τα δεξιά, σοβαρή αμβλυωπία δεξιού οφθαλμού, αριστερή υποτροπία και εξωτροπία	ΣΥΝΔΡΟΜΟ SAETHRE CHOTZEN Ή ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ (αρχικά) / ΚΡΑΝΙΟΜΕΤΩΠΟΡΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (CFNS)	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
23	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ ΣΤΗΝ ΟΠΙΣΘΙΑ ΠΗΓΗ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
24	ΑΡΡΕΝ	ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ	αδυναμία υπτιασμού άνω άκρων λόγω συνοστέωσης κερκίδας και ωλένης στην άρθρωση του αγκώνα	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
25	ΑΡΡΕΝ	ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ	μικρού βαθμού υποτελορισμός	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	IVF/ ΔΙΔΥΜΗ (μέχρι την 6η εβδομάδα)	DNA από περιφερικό αίμα
26	ΑΡΡΕΝ	ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
27	ΑΡΡΕΝ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
29	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
31	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΔΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα
33	ΑΡΡΕΝ		δεν υπάρχει πληροφορία	εξόφθαλμος, υποπλασία μέσου τριτημορίου του προσώπου, ενδοκρανιακή υπέρταση	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
34	ΘΗΛΥ		ΠΟΛΛΑΠΛΕΣ	οπισθογναθισμός άνω γνάθου, εξόφθαλμος	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα

ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	ΣΧΗΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΥΝΟΣΤΕΩΜΕΝΗ ΡΑΦΗ	ΆΛΛΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	ΣΥΛΛΗΨΗ / ΚΥΗΣΗ	ΥΛΙΚΟ
35	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	διαφραγματοκλήη, κρυσορχία	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
36	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
37	ΘΗΛΥ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΔΙΔΥΜΗ (μέχρι τη 2η εβδομάδα)	DNA από περιφερικό αίμα
38	ΘΗΛΥ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	IVF/ ΔΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα
39	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
40	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	ήπιος υπερτελορισμός, στραβισμός, χαμηλή τριχοφυΐα μετώπου, τριγωνική προβολή τριχωτού της κεφαλής, φαρδιά μύτη με εγκοπή, δυσμορφικός θώρακας με εισολκή του στέρνου και χαμηλή πρόσφυση μαστών, δυσλειτουργία στις κατ' ώμων αρθρώσεις, σκολίωση, δερματική πολυσυνδακτυλία δεξιού άνω άκρου, δερματική συνδακτυλία 3/4 αριστερού κάτω άκρου	ΠΙΘΑΝΟ ΗΠΙΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT'Η PFEIFFER (αρχικά) / ΚΡΑΝΙΟΜΕΤΩΠΟΡΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (CFNS)	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
41	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
42	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	έλξη της ρινός προς τα αριστερά, έλξη του αριστερού οφθαλμικού κόγχου προς τα πάνω	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
43	ΑΡΡΕΝ			αβαθείς οφθαλμικοί κόγχοι, υπερτελορισμός, υποπλασία ρινικών κοιλότητων, στένωση ρινικών χοανών, δυσπλασία άκρων χειρών και ποδών, συνδακτυλία άκρων χειρών, συνένωση δακτύλων κάτω άκρων, κυρίως σε δερματικό επίπεδο, κάμψη προς τα έσω άκρων χειρών και ποδών	ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
44	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	εξόφθαλμος, υποπλασία μέσου τριτημορίου του προσώπου, αμφοτερόπλευρη αρθρογύπωση, συνοστέωση στις αρθρώσεις του αγκώνα	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου και δεξιού μηρού
45	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
46	ΑΡΡΕΝ	ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΑΡΙΣΤΕΡΗ ΛΑΜΒΔΟΕΙΔΗΣ	αγγειακή δυσπλασία ράχης (οσφυϊκή μοίρα), διάσταση λευκής γραμμής	ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
47	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	υπερτελορισμός, προπέτεια μετώπου, στραβισμός λόγω οστένης δυσμορφίας, χαμηλή πρόσφυση αυτιών, αμφοτερόπλευρη στένωση έξω ακουστικών πόρων, φαρδιοί και κοντοί αντίχειρες σε ήπιο βαθμό	ΠΙΘΑΝΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ PFEIFFER	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
48	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	αποπλάτυνση και εισολκή μέσου τριτημορίου του προσώπου, έμμεσες ενδείξεις αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης	ΣΥΝΔΡΟΜΟ APERT	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από



ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	ΣΧΗΜΑ ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΥΝΟΣΤΕΩΜΕΝΗ ΡΑΦΗ	ΆΛΛΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	ΣΥΛΛΗΨΗ / ΚΥΗΣΗ	ΥΛΙΚΟ
				(δακτυλικά εντυπώματα στο οπίσθιο τμήμα του κρανιακού σκελετού, βρεγματοϊνιακά), αμφοτερόπλευρη συνδακτυλία άνω και κάτω άκρων, κάμψη προς τα έσω άκρων χειρών και ποδών			καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
49	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΔΙΔΥΜΗ	DNA από περιφερικό αίμα
51	ΑΡΡΕΝ	ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ ΕΚ ΘΕΣΕΩΣ	ΚΑΜΙΑ	σοβαρή οστική παραμόρφωση, αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση	ΙΝΙΑΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ ΕΚ ΘΕΣΕΩΣ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
52	ΘΗΛΥ	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ-ΕΛΑΦΡΑ ΠΥΡΓΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	ενδοκρανιακή υπέρταση, υπερβολική ανάπτυξη οπίσθιου κρανιακού βόθρου, αντιμογγολοειδής θέση έξω κανθών, ρηχοί οφθαλμικοί κόγχοι, γαμπή μύτη και σκολίωση διαφράγματος, χωρίς νοητική ή μαθησιακή υστέρηση	ΣΥΝΔΡΟΜΟ CROUZON (αρχικά) / ΣΥΝΔΡΟΜΟ SAETHRE CHOTZEN	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα, RNA → cDNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα κρανίου
53	ΑΡΡΕΝ	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ, ΠΙΘΑΝΑ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ, ΚΛΕΙΣΤΗ ΠΡΟΣΘΙΑ ΠΗΓΗ	ο δεξιός οφθαλμικός κόγχος βρίσκεται σε υψηλότερη θέση από τον αριστερό, έντονη ασυμμετρία ολόκληρου του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος	ΠΙΘΑΝΟΝ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
53F	ΑΡΡΕΝ πατέρας ασθενούς 53	ΒΡΑΧΥΚΕΦΑΛΙΑ	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΑΜΦΟΤΕΡΟΠΛΕΥΡΑ	ψηλαφητό εξόγκωμα στην περιοχή της πρόσθιας πηγής, αποπεπλατυσμένο μέτωπο	ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΜΥΕΝΚΕ διάγνωση λόγω οικογενειακού ιστορικού	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
53G	ΘΗΛΥ πατρική γιαγιά ασθενούς 53	ΠΟΛΥ ΗΠΙΑ ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ;		Κ.Φ.	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
53BS	ΘΗΛΥ μικρή αδελφή ασθενούς 53	ΠΛΑΓΙΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΔΕΞΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ	ελλιπής κλινική περιγραφή	ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΜΥΕΝΚΕ διάγνωση λόγω οικογενειακού ιστορικού	Κ.Φ. / ΜΟΝΗΡΗΣ	DNA από περιφερικό αίμα
54	ΑΡΡΕΝ	ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΜΕΤΩΠΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΤΡΙΓΩΝΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα
55	ΑΡΡΕΝ	ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	ΟΒΕΛΙΑΙΑ		ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΣΚΑΦΟΚΕΦΑΛΙΑ	δεν υπάρχει πληροφορία	DNA από περιφερικό αίμα

## **3B. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ**

### **3B.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ**

Η απομόνωση ολικού DNA από τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος (λευκοκύτταρα και δικτυοερυθροκύτταρα) βασίζεται στην ικανότητα δέσμευσης των νουκλεϊκών οξέων σε μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου (silica). Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με επώασή τους με ένα διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικών αλάτων (guanidine HCl), τα οποία αποσταθεροποιούν τους δεσμούς υδρογόνου, τις δυνάμεις van der Waals και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, και στο οποίο προστίθεται πρωτεΐνωση Κ. Κατά το στάδιο αυτό καταστρέφονται οι πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και των νουκλεασών, και αποσταθεροποιείται η σχέση των νουκλεϊκών οξέων με το νερό. Η ύπαρξη χαοτροπικών αλάτων, οι κατάλληλες συνθήκες pH και η προσθήκη απόλυτης αιθανόλης, η οποία αφυδατώνει το DNA, επιτρέπουν τη δέσμευση του DNA στην μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες απομακρύνονται, διαπερνώντας τη μεμβράνη. Στη συνέχεια ακολουθούν δυο στάδια έκπλυσης της μεμβράνης με διαλύματα που περιέχουν αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα πρωτεϊνών και άλλων ουσιών (π.χ. αίμη) καθώς και άλατα που πιθανόν να έχουν παραμείνει στη μεμβράνη. Προκειμένου να απομακρυνθεί εντελώς η αιθανόλη, πραγματοποιείται ένα στάδιο φυγοκέντρησης, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Τελικά στη μεμβράνη προστίθεται νερό, ώστε να εκλουσθεί το δεσμευμένο DNA.

Για την απομόνωση ολικού DNA από περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA (spin protocol) από λευκοκυτταρική στοιβάδα (200μl) μετά από φυγοκέντρηση 2.5ml περιφερικού αίματος σε φιαλίδιο Vacutainer® K2E (5.4mg) στις 3000rpm, για 15min, σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Η QIAamp DNA μεμβράνη έχει τη δυνατότητα να δεσμεύσει μέχρι 50μg DNA μεγέθους μέχρι 50 kb, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό του DNA που απομονώνεται είναι τμήματα μεγέθους 20-30 kb. Το απομονωμένο ολικό DNA εκλούσθηκε σε 200μl ddH<sub>2</sub>O και φυλάχθηκε στους -20°C.

## 3B.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι υποκείμενες μοριακές βλάβες σε επιλεγμένα τμήματα των γονιδίων *FGFR1-3*, *TWIST1* και *EFNB1* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ακολούθησε ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) ή/και πολυμορφισμού μήκους τμημάτων μετά από επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism). Για την ανίχνευση των μεταλλαγών p.P252R του γονιδίου *FGFR1*, p.P250R του γονιδίου *FGFR3* και p.S252W και p.P253R του γονιδίου *FGFR2* καθώς και για την επιβεβαίωση της ύπαρξης μεταλλαγών που ανιχνεύθηκαν με την ανάλυση αλληλουχίας DNA πραγματοποιήθηκε επώαση με περιοριστικά ένζυμα.

### 3B.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα τμήματα των γονιδίων που ενισχύθηκαν, τα μεγέθη των προϊόντων PCR καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 4, ενώ οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 4:** Γονίδια, προϊόντα PCR και οι αντίστοιχοι εκκινητές

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (bp)	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR
<b><i>FGFR1</i></b> (χρωμ.θέση <b>8p11.23- p11.22</b> )	NG_007729	εξόνιο 7	49099-49506	FGFR1 ex10(7)F	408 bp
		(νέα ονομασία εξονίου 5)		FGFR1 ex10(7)R	
<b><i>FGFR2</i></b> (χρωμ.θέση <b>10q26.13</b> )	AF360695	εξόνιο 8	51113-51437	FGFR2-ex8-F FGFR2-ex8-R	325 bp
		εξόνιο 10	53697-54046	FGFR2-ex10-F FGFR2-ex10-R	350 bp
		εξόνιο 14	72675-72924	FGFR2-ex14-F FGFR2-ex14-R	250bp
		εξόνιο 16	83172-83413	FGFR2-ex16-F FGFR2-ex16-R	242bp

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (bp)	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR
<b>FGFR3</b> (χρωμ.θέση 4p16.3)	AY768549	τμήμα εξονίου 5- τμήμα εξονίου 7	8665-9141	P5 P7	477bp
		εξόνιο 10	11366-11763	FGFR3-ex10-F FGFR3-ex10-R	398bp
		τμήμα εξονίου 10	11539-11702	ACH A ACH B	164bp
		εξόνιο 1	5708-6089	EFNB1 EX1F EFNB1 EX1R	401bp
<b>EFNB1</b> (χρωμ.θέση Xq13.1)	(NC_000023) (παλιά ονομασία) NG_008887	εξόνιο 2	(9547-9932) 14538-14905	EFNB1-ex2-F EFNB1-ex2-R	386bp
		εξόνια 3-4	(10590-11157) 15581-16148	EFNB1 ex3-4 F EFNB1 ex3-4 R	568bp
		εξόνια 4-5	15850-16741	EFNB1 EX4-5F EFNB1 EX4-5R	892bp
		εξόνιο 1 (ORF)	216-1012	TWIST1-F TWIST1-R	797bp

Πίνακας 5: Αλληλουχίες εκκινήτων

ΓΟΝΙΔΙΟ/ΠΕΡΙΟΧΗ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
<b>FGFR1</b> εξόνιο 7	FOR <i>FGFR1 ex10(7)-F</i>	5'-TCCCATGACAAGTGCCTCC-3'	Seto et al., 2007
	REV <i>FGFR1 ex10(7)-R</i>	5'-ACCTCTGTTACTAGTCTGG-3'	
<b>FGFR2</b> εξόνιο 8	FOR <i>FGFR2-ex8-F</i>	5'-GGTCTCTCATTCTCCATCCC-3'	Kan et al., 2002
	REV <i>FGFR2-ex8-R</i>	5'-CCAACAGGAAATCAAAGAACC-3'	
<b>FGFR2</b> εξόνιο 10	FOR <i>FGFR2-ex10-F</i>	5'-TCAGTGTGCTCCGTGTCTC-3'	Seto et al., 2007
	REV <i>FGFR2-ex10-R</i>	5'-AAAAAAACCCAGAGAGAAAGAACAGTAT-3'	
<b>FGFR2</b> εξόνιο 14	FOR <i>FGFR2-ex14-F</i>	5'-TAGCTGCCCATGAGTTAGAGG-3'	Kan et al., 2002
	REV <i>FGFR2-ex14-R</i>	5'-ATCTGGAAGCCAGCCATTTC-3'	
<b>FGFR2</b> εξόνιο 16	FOR <i>FGFR2-ex16-F</i>	5'-CTGGCGGTGTTTTGAAATTAG-3'	Kan et al., 2002
	REV <i>FGFR2-ex16-R</i>	5'-CCTTCTCCTGGAACATTCTG-3'	

ΓΟΝΙΔΙΟ/ΠΕΡΙΟΧΗ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ		ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
<b>FGFR3</b> τμήμα εξονίου 5- τμήμα εξονίου 7	FOR	<i>P5</i>	5'-AACCCCACTCCCTCCATCTC -3'	Simsek et al., 2003
	REV	<i>P7</i>	5'-TGCGTCACTGTACACCTTGC -3'	
<b>FGFR3</b> εξόνιο 10	FOR	<i>FGFR3-ex10-F</i>	5'-TAGACTCACTGGCGTACTG -3'	παρούσα εργασία
	REV	<i>FGFR3-ex10-R</i>	5'-CGGGCAGGCAGCTCAGAA -3'	
<b>FGFR3</b> εξόνιο 10 (ACH)	FOR	<i>ACH A</i>	5'-AGGAGCTGGTGGAGGCTGA -3'	Shiang et al., 1994
	REV	<i>ACH B</i>	5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3'	
<b>EFNB1</b> εξόνιο 1	FOR	<i>EFNB1 EX1F</i>	5'-GGCAGAGGAAGGCGAGGCGA -3'	Wieland et al., 2004
	REV	<i>EFNB1 EX1R</i>	5'-CAACCCAGCCAAGTGCCCT -3'	
<b>EFNB1</b> εξόνιο 2	FOR	<i>EFNB1-ex2-F</i>	5'-GGCTCTGTCCGCTTCCCTG -3'	Wieland et al., 2004
	REV	<i>EFNB1-ex2-R</i>	5'-AGAGGATGGGATGGGCGG-3'	
<b>EFNB1</b> εξόνια 3-4	FOR	<i>EFNB1 ex3-4 F</i>	5'-GCTGAAGCAGAATGGGAGTTTC-3'	παρούσα εργασία
	REV	<i>EFNB1 ex3-4 R</i>	5'-GCCTAACAAGGTGACAGAGCAA-3'	
<b>EFNB1</b> εξόνια 4-5	FOR	<i>EFNB1 EX4-5F</i>	5'-GGGGAGCAGGCGTAGGGTTA -3'	Wieland et al., 2004
	REV	<i>EFNB1 EX4-5R</i>	5'-GCAAGGGGAGGGGGTGTG -3'	
<b>TWIST1</b> εξόνιο 1 (ORF)	FOR	<i>TWIST1-F</i>	5'-GTCCGTCCTCTGCTCTCT-3'	Seto et al., 2007
	REV	<i>TWIST1-R</i>	5'-CGGTCCTTACCTAGGTCTCC-3'	

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Mastercycler ep gradient (Eppendorf).

Οι αντιδράσεις για την ενίσχυση των τμημάτων *FGFR1-εξόνιο 7*, *FGFR2-εξόνιο 8*, *FGFR2-εξόνιο 10*, *FGFR2-εξόνιο 14*, *FGFR2-εξόνιο 16*, *FGFR3-εξόνιο 10*, *EFNB1-εξόνιο 1*, *EFNB1-εξόνιο 2*, *EFNB1-εξόνια 3-4* και *EFNB1-εξόνια 4-5* πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μl με τη χρήση της Platinum® Taq DNA πολυμεράσης (Invitrogen) (1.5units/αντίδραση), 1x ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Invitrogen), dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0.2mM το καθένα, MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1.5mM, το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών (20pmoles/αντίδραση από τον κάθε εκκινητή), 50-200ng DNA-μήτρα και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου.

Οι αντιδράσεις για την ενίσχυση των τμημάτων *FGFR3-εξόνια 5-7* και *FGFR3-τμήμα εξονίου 10 (ACH)* πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25μl με τη χρήση 1x ρυθμιστικού διαλύματος MasTaq MIX (HyTest) [το οποίο περιλαμβάνει, σε τελικές συγκεντρώσεις ανά αντίδραση: 16.6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67mM Tris-HCl (pH8.8 στους 25°C), 0.01% Tween 20, 0.2mM από το κάθε dNTP, 2mM MgCl<sub>2</sub> και 2.5units SmarTaq πολυμεράση], MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1.5mM, το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών (20pmoles/αντίδραση από τον κάθε εκκινητή), 50-200ng DNA-μήτρα και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου.

Η αντίδραση για την ενίσχυση του τμήματος *TWIST1-εξόνιο 1* πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl με τη χρήση της Platinum® Taq DNA πολυμεράσης (Invitrogen) (1.5

unit/αντίδραση), 2 M betaine (SIGMA), 1x ρυθμιστικού διαλύματος PCR (Invirtogen), dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0.2 mM το καθένα, MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1.5mM, το αντίστοιχο ζεύγος εκκινητών (20pmoles/αντίδραση από τον κάθε εκκινητή), 50-200ng DNA-μήτρα και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου. Η βεταΐνη (betaine) διευκολύνει την PCR σε περιπτώσεις που το DNA-μήτρα περιέχει περιοχές πλούσιες σε GC (GC-rich), μειώνοντας τη δημιουργία δευτεροταγών δομών στις περιοχές αυτές (Henke et al., 1997). Οι συνθήκες των αντιδράσεων φαίνονται στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6:** Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης (συνθήκες PCR)

Γονίδιο/τμήμα	Αρχική αποδιάταξη	Κύκλοι	Αποδιάταξη	Σύνδεση	Επιμήκυνση	Στάδιο τελικής επιμήκυνσης
<i>FGFR1-εξόνιο 7</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	55°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR2-εξόνιο 8</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	62°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR2-εξόνιο 10</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	55°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR2-εξόνιο 14</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	62°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR2-εξόνιο 16</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	62°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR3-εξόνια 5-7</i>	95°C για 6min	34	95°C για 1min	64°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR3-εξόνιο 10</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	64°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>FGFR3- τμήμα εξονίου 10 (ACH)</i>	94°C για 5min	30	94°C για 0:45min	65°C για 0:45min	72°C για 1:30min	72°C για 5min
<i>EFNB1-εξόνιο 1</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	68°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>EFNB1-εξόνιο 2</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	66°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>EFNB1-εξόνια 3-4</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	66°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>EFNB1-εξόνια 4-5</i>	94°C για 15min	36	94°C για 1min	66°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min
<i>TWIST1-εξόνιο 1</i>	94°C για 15min	35	94°C για 1min	62°C για 1min	72°C για 1min	72°C για 5min

### **3B.2.2 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων μετά από επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο δίκλωνο DNA, συνήθως παλίνδρομες, και κόβουν πάνω ή κοντά σε αυτές τις περιοχές. Με τη βοήθεια αυτών ανιχνεύεται η ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών ανάλογα με τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν μετά από επώαση με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο προϊόντων PCR, τα οποία αναλύονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Πραγματοποιήθηκε επώαση επιλεγμένων προϊόντων PCR στους 37°C για 4h, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας, χρησιμοποιώντας κατά περίπτωση τα περιοριστικά ένζυμα: *AccI* (NEW ENGLAND BioLabs), *Acil* (*SsiI*) (Fermentas), *BcnI* (*NciI*) (Fermentas), *MboI* (NEW ENGLAND BioLabs), *BglI* (NEW ENGLAND BioLabs), *MfeI* (NEW ENGLAND BioLabs), *MnII* (NEW ENGLAND BioLabs), *BpmI* (NEW ENGLAND BioLabs). Στον Πίνακα 7 φαίνονται οι μεταλλαγές οι οποίες ανιχνεύονται, το κατάλληλο ένζυμο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της κάθε μεταλλαγής, οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν καθώς και οι θέσεις στις οποίες κόβουν το DNA οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα μεγέθη των τμημάτων που προκύπτουν μετά από επώαση του κατάλληλου προϊόντος PCR με το αντίστοιχο για την ανίχνευση συγκεκριμένης μεταλλαγής ένζυμο φαίνονται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 7:** Πειραματικό πρωτόκολλο ανίχνευσης μεταλλαγών με περιοριστικά ένζυμα

Γονίδιο/ Περιοχή	Μεταλλαγή	Φυσιολογική αλληλουχία	Μεταλλαγμένη αλληλουχία	Περιοριστικό ένζυμο	Αλληλουχία που αναγνωρίζει και θέση που κόβει
<b><i>FGFR1</i></b> εξόνιο 7	p.P252R c.755C>G	ttc <u>c</u> t cac	ttc <u>cg</u> t cac	MnII	5'-CCTC(N) <sub>7</sub> <sup>↓</sup> ...-3' 3'-GGAG(N) <sub>6</sub> <sup>↑</sup> ...-5' (φυσιολογική)
<b><i>FGFR2</i></b> εξόνιο 8	p.S252W c.755C>G	cga <u>tc</u> g cct	cga <u>tg</u> g cct	MboI	5'-.. <sup>↓</sup> GATC....-3' 3'-....CTAG <sup>↑</sup> ...-5' (φυσιολογική)
<b><i>FGFR2</i></b> εξόνιο 8	p.P253R c.758C>G	tcg <u>c</u> t cac cgg ccc	tcg <u>cg</u> t cac cgg ccc	BglI	5'-GCCNNNN <sup>↓</sup> NGGC-3' 3'-CGGN <sup>↑</sup> NNNNCCG-5' (φυσιολογική)
<b><i>FGFR2</i></b> ιντρόνιο 10	1084+3A>G	gt <u>a</u> tatac	gt <u>g</u> tatac	AccI	5'-GT <sup>↓</sup> MKAC-3' 3'-CAKM <sup>↑</sup> TG-5' (μεταλλαγμένη)
<b><i>FGFR3</i></b> εξόνιο 7	p.P250R c.749C>G	tcc <u>cg</u> g cac	tcc <u>cg</u> g cac	BcnI ( <i>NciI</i> )	5'-CC <sup>↓</sup> SGG-3' 3'-GGG <sup>↑</sup> CC-5' (μεταλλαγμένη)

Γονίδιο/ Περιοχή	Μεταλλαγή	Φυσιολογική αλληλουχία	Μεταλλαγμένη αλληλουχία	Περιοριστικό ένζυμο	Αλληλουχία που αναγνωρίζει και θέση που κόβει
<b>FGFR3</b> εξόνιο 10	p.A391E c.1172C>A	gtg <b>g</b> cg gct	gtg <b>g</b> ag gct	Acil	5'-C <sup>↓</sup> CGC-3' 3'-GGC <sup>↑</sup> G-5' (φυσιολογική)
<b>EFNB1</b> εξόνιο 2	p.E125K c.373G>A	ctg <b>g</b> ag ttc	ctg <b>a</b> ag ttc	BpmI	5'-CTGGAG(N) <sub>16</sub> <sup>↓</sup> ..-3' 3'-GACCTC(N) <sub>14</sub> <sup>↑</sup> ..-5' (φυσιολογική)
<b>EFNB1</b> εξόνιο 5	p.L240fsX79 c.717_718ins.A	gca ttg ttc	gca <b>a</b> tt gtt c	MfeI	5'-C <sup>↓</sup> AATTG-3' 3'-GTAA <sup>↑</sup> C-5' (μεταλλαγμένη)
		<b>N: A, T, G ή C</b>	<b>S: C ή G</b>	<b>M: A ή C</b>	<b>K: G ή T</b>

**Πίνακας 8:** Ανίχνευση μεταλλαγών με AFLP

Γονίδιο/ Μεταλλαγή	Προϊόν PCR	Περιοριστικό ένζυμο	Μέγεθος προϊόντων PCR (bp)	Μεγέθη τμημάτων που προκύπτουν μετά από επώαση (bp)	
				Φυσιολογική αλληλουχία	Μεταλλαγμένη αλληλουχία
<b>FGFR1</b> p.P252R	<i>FGFR1</i> -εξόνιο 7	MnII	408	184, 106, 48, 30, 29, 11	184, 136, 48, 29, 11
<b>FGFR2</b> p.S252W	<i>FGFR2</i> -εξόνιο 8	MboI	325	153, 118, 54	172, 153
<b>FGFR2</b> p.P253R	<i>FGFR2</i> -εξόνιο 8	BglI	325	150, 110, 65	215, 110
<b>FGFR2</b> 1084+3A>G	<i>FGFR2</i> -εξόνιο 10	AccI	350	350	322, 28
<b>FGFR3</b> p.P250R	<i>FGFR3</i> -εξόνια 5-7	Bcni (NciI)	477	327, 150	231, 150, 96



Γονίδιο/ Μεταλλαγή	Προϊόν PCR	Περιοριστικό ένζυμο	Μέγεθος προϊόντων PCR (bp)	Μεγέθη τμημάτων που προκύπτουν μετά από επάωση (bp)	
				Φυσιολογική αλληλουχία	Μεταλλαγμένη αλληλουχία
<b>FGFR3</b> <b>p.A391E</b>	<i>FGFR3</i> -εξόνιο 10 <i>ACHA/B</i>	Acil (SsiI)	164	66, 57, 24, 17	83, 57, 24
<b>EFNB1</b> <b>p.E125K</b>	<i>EFNB1</i> -εξόνιο 2	BpmI	386	346, 40	386
<b>EFNB1</b> <b>p.L240fsX79</b>	<i>EFNB1</i> -εξόνια 4-5	MfeI	892/893	892	484, 409

### **3B.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

Για τον έλεγχο της ακεραιότητας των προϊόντων PCR καθώς και για τον διαχωρισμό βάσει μεγέθους των προϊόντων της επάωσης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες των επιθυμητών τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3% [1.5% SeaKem® LE (Lonza) και 1.5% NuSieve® GTG® (Lonza)] σε 1x TBE (90 mM Tris, 90mM Boric Acid, 2mM EDTA, pH 8) και 0.5μg/ml EtBr (SIGMA). Χρησιμοποιήθηκε η χρωστική gel loading dye Blue (6x) (BioLabs) και συνηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας 50bp DNA ladder (BioLabs) ή ο 50bp DNA step ladder (PROMEGA), ως δείκτης μεγέθους.

### **3B.2.4 Αντίδραση ανάλυσης αλληλουχίας DNA (Sequencing)**

Η αντίδραση για την ανάλυση αλληλουχίας των επιθυμητών τμημάτων DNA (προϊόντα PCR) βασίζεται στη μέθοδο Sanger (χρήση σημασμένων και τροποποιημένων νουκλεοτιδίων που προκαλούν λήξη της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA). Αυτή η μέθοδος λήξης της αλυσίδας απαιτεί ως καλούπι μονόκλωνο DNA, έναν εκκινητή (εμπρόσθιο-forward ή αναστροφο-reverse), DNA πολυμεράση, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια, ddNTPs, ως σημεία λήξης της αλυσίδας DNA (τα τέσσερα σημασμένα ddNTPs φθορίζουν σε διαφορετικό μήκος κύματος).

Η ανάλυση των αντιδράσεων για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA πραγματοποιείται σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχίας DNA. Τα δεδομένα που συλλέγονται αναλύονται από πρόγραμμα ανάλυσης αλληλουχιών και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης αποτυπώνεται με χρωματογραφία και παριστάνεται σε ένα διάγραμμα με κορυφές όπου κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα νουκλεοτίδιο (ηλεκτροφοριογράφημα). Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύγκριση των αλληλουχιών DNA των προς διερεύνηση δειγμάτων με τις γνωστές γονιδιακές αλληλουχίες (κατατεθειμένες στο NCBI) με τη χρήση προγράμματος.

Περίληπτικά, τα προς ανάλυση προϊόντα PCR καθαρίζονται, προκειμένου να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια της PCR, σε πλάκα 96 θέσεων με φίλτρο (96 well filter plate, Nucleofast® 96 PCR plate, MACHERY-NAGEL) με την εφαρμογή κενού, τα οποία στη συνέχεια αναδιαλύονται σε ddH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση ανάλυσης αλληλουχίας DNA πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl με τη χρήση 1x διαλύματος BigDye® Terminator v1.1, v3.1 sequencing buffer (Applied Biosystems), 1x διαλύματος BigDye® Terminator v1.1, cycle sequencing RP-100 (Applied Biosystems), 2.5-3 pmoles/αντίδραση από τον αντίστοιχο εκκινητή (εμπρόσθιο ή ανάστροφο), 1μl από το καθαρισμένο PCR προϊόν και ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του τελικού όγκου. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 95°C για 10min (για τα μεγάλα προϊόντα) και 30 ή 40 κύκλοι (ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος): 96°C για 10sec- 50°C για 5sec -60°C για 4sec. Πριν την ανάλυση αλληλουχίας DNA σε αυτόματο αναλυτή τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίζονται για την απομάκρυνση των αδέσμευτων ddNTPs με κολώνες που διαθέτουν φίλτρο (NucleoSEQ® columns, MACHERY-NAGEL), στις οποίες έχει επιστοιβαστεί υλικό διαχωρισμού illustra™ sephadex™ G-50 (GE Healthcare), το οποίο είχε προηγουμένως αναδιαλυθεί σε TE (10mM Tris-1mM EDTA). Τα προϊόντα της αντίδρασης sequencing, μετά τον καθαρισμό τους αναλύθηκαν σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών DNA ABI 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystems). Τα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων στα επιθυμητά τμήματα DNA αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Chromas Lite 2.01 και η σύγκριση των αλληλουχιών DNA των προς διερεύνηση δειγμάτων με τις γνωστές γονιδιακές αλληλουχίες (κατατεθειμένες στο NCBI) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ClustalW2 (EMBL-EBI) (ελεύθερη διαδικτυακή πρόσβαση).

### 3B.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ/ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ

#### ***Πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από τη δράση της λιγάσης (MLPA® : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)***

Η μέθοδος της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενης από τη δράση της λιγάσης (MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2002 (Schouten et al., 2002) και εφαρμόζεται για τη ανίχνευση γενετικών αλλαγών, κυρίως μικροελλείψεων ή/και μικροδιπλασιασμών, που είναι υπεύθυνες για μεγάλο αριθμό γενετικών νοσημάτων και οι οποίες δεν είναι ορατές στον συμβατικό καρυότυπο.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε ανιχνευτής αποτελείται από δύο ολιγονουκλεοτίδια (ζεύγος επιμέρους ανιχνευτών), τα οποία πρέπει να υβριδιστούν σε διαδοχικές DNA αλληλουχίες-στόχους, προκειμένου να ενωθούν μεταξύ τους με τη δράση της λιγάσης (Εικόνα 43). Με τη σύνδεση αυτή ο ανιχνευτής αποτελεί πια ένα μοναδικό μόριο, το οποίο μπορεί να πολλαπλασιαστεί εκθετικά κατά τη διάρκεια μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction). Σε αντίθεση με μια τυπική πολλαπλή PCR, στη μέθοδο MLPA, χρησιμοποιείται μόνο ένα ζεύγος εκκινητών για όλους τους ανιχνευτές, εκ των οποίων ο εμπρόσθιος εκκινητής είναι συνδεδεμένος με φθοριόχρωμα (6-FAM) στο 5' άκρο του. Το ένα από τα δύο ολιγονουκλεοτίδια από τα οποία αποτελείται ο ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία ίδια με το σημασμένο εκκινητή PCR και στο 3' άκρο του αλληλουχία που αναγνωρίζει το DNA-στόχο, ενώ το άλλο ολιγονουκλεοτίδιο του ανιχνευτή φέρει στο 5' άκρο του αλληλουχία που αναγνωρίζει το DNA-στόχο, στο 3' άκρο μια αλληλουχία συμπληρωματική ως προς το μη σημασμένο εκκινητή PCR και μεταξύ αυτών μια πρόσθετη ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία (stuffer), με διαφορετικό μήκος για κάθε ανιχνευτή (Εικόνα 43). Τόσο οι εκκινητές όσο και η πρόσθετη αλληλουχία δεν έχουν καμία ομολογία με τις περιοχές-στόχους. Θεμελιώδες για τη μεθοδολογία MLPA είναι το γεγονός ότι κατά την PCR δεν ενισχύεται η περιοχή-στόχος του DNA, αλλά οι ανιχνευτές που έχουν υβριδιστεί πάνω σε αυτή. Κάθε ανιχνευτής δημιουργεί ένα προϊόν PCR με μοναδικό μήκος και τα προϊόντα της PCR μπορούν να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση αυτόματου γενετικού αναλυτή. Η σύγκριση της έντασης φθορισμού των προϊόντων της αντίδρασης του υπό εξέταση δείγματος με φυσιολογικό πρότυπο οδηγεί στην ανίχνευση μικροελλείψης ή μικροδιπλασιασμού.

Η μέθοδος MLPA περιλαμβάνει 4 βασικά στάδια:

1) Αποδιάταξη του DNA-στόχου στους 98°C για 5min.

2) Υβριδισμός του DNA-στόχου με τα κατάλληλα ζεύγη επιμέρους ανιχνευτών παρουσία κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος στους 60°C για 16-20h. Κάθε ζεύγος επιμέρους ανιχνευτών αναγνωρίζει μια μοναδική περιοχή-στόχο στο DNA.

3) Αντίδραση σύνδεσης των υβριδισμένων ζευγών επιμέρους ανιχνευτών παρουσία λιγάσης και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος στους 54°C για 15min. Η σύνδεση των ζευγών επιμέρους ανιχνευτών θα πραγματοποιηθεί μόνο εφόσον έχουν υβριδιστεί πάνω στο DNA-στόχο.

4) PCR για τον πολλαπλασιασμό των ειδικών ανιχνευτών με τη χρήση ενός κοινού ζεύγους εκκινήτων. Η αντίδραση περιλαμβάνει 35 κύκλους (95°C, 30 sec- 60°C, 30 sec- 72°C, 30 sec) και ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 20min.



**Εικόνα 43:** Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου MLPA. Η αλληλουχία Y (μαύρο) στο ένα ολιγονουκλεοτίδιο του ανιχνευτή είναι ίδια με το σημασμένο με φθοριόχρωμα εκκινήτη PCR, ενώ στο άλλο ολιγονουκλεοτίδιο η αλληλουχία X (μαύρο) είναι συμπληρωματική του μη σημασμένου εκκινήτη. Εκτός από τις αλληλουχίες που είναι συμπληρωματικές με το DNA-στόχο (μπλε) και υπάρχουν και στα δύο ολιγονουκλεοτίδια, στο δεύτερο ολιγονουκλεοτίδιο υπάρχει επιπλέον μια πρόσθετη αλληλουχία διαφορετικού μήκους για κάθε ανιχνευτή (πράσινο).

Με τη μέθοδο MLPA είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων μέχρι 50 διαφορετικών αλληλουχιών DNA σε μια μόνο πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex PCR). Κάθε αντίδραση στο τελικό στάδιο της μεθόδου MLPA έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο αριθμό μοναδικών τμημάτων-προϊόντων PCR, μήκους 64-500nt. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Coffalyser v9.4).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής kit (MRC-Holland):

- SALSA MLPA KIT P080-B1 CRANIOFACIAL (ανιχνεύει ελλείψεις/διπλασιασμούς μιας ή περισσότερων αλληλουχιών στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *EFNB1* και *RUNX2*).
- SALSA MLPA KIT P064-B3 Mental Retardation-1 (μοριακή ανίχνευση συνδρόμων μικροελλείψεων DiGeorge, 1p-deletion, Williams, Prader-Willi, Smith-Magenis, Miller-Dieker, Sotos, Alagille και Saethre-Chotzen- γονίδιο *TWIST1*).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1) Αποδιάταξη 100-200ng του δείγματος DNA [συμπλήρωση με TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) μέχρι τελικού όγκου 5μl] στους 98°C για 5 min.

2) Προσθήκη 3μl κατάλληλου διαλύματος υβριδισμού [1.5μl μίγμα ανιχνευτών (συνθετικά και απομονωμένα από βακτήρια ολιγονουκλεοτίδια), 1.5μl διάλυμα MLPA (KCl, Tris-HCl, EDTA and PEG-6000. pH 8.5)] και επώαση στους 60°C για 17h.

3) Προσθήκη 32μl διαλύματος λιγάσης [3μl Ligase Buffer A (NAD, βακτηριακής προέλευσης, pH 3.5), 3μl Ligase Buffer B (Tris-HCl, μη ιονικά απορρυπαντικά, MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5), 1μl SALSA Ligase-65 (ένζυμο βακτηριακής προέλευσης), 25μl ddH<sub>2</sub>O] και επώαση στους 54°C για 15min.

4) 5μl από την αντίδραση της λιγάσης (βήμα 3) προστίθενται σε 20μl διαλύματος PCR [2μl SALSA PCR buffer (Tris-HCl, EDTA, KCl, μη ιονικά απορρυπαντικά, pH 8.5), 1μl PCR Primer Mix (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, ένα εκ των οποίων είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα 6-FAM, dNTPs, Tris, EDTA, pH 8), 1μl Enzyme dilution buffer (Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ 0.04 %, pH 8.5), 15.75μl ddH<sub>2</sub>O]. Η αντίδραση περιλαμβάνει 35 κύκλους (95°C για 30sec- 60°C για 30 sec- 72°C για 30sec) και ένα τελικό στάδιο στους 72°C για 20min.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR (βήμα 4) (0.7μl από την αντίδραση PCR, 12μl Hi-DiTM Formamide, 0.3μl GeneScan™ -500 LIZ® Size Standard) αναλύθηκαν σε αυτόματο γενετικό αναλυτή (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση ειδικού λογισμικού (Coffalyser v9.4).

### **3B.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA (FRAGMENT ANALYSIS) ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA (SEQUENCING) ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ**

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών DNA και περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR στα οποία είναι ενσωματωμένα φθοριοχρώματα (6-FAM, στην περίπτωση των προϊόντων της μεθόδου MLPA) ή των προϊόντων sequencing, τα οποία έχουν αποδιατακτεί προκειμένου να γίνουν μονόκλωνα, ανίχνευση του σήματος και ανάλυση του DNA με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού. Για την αποδιάταξη χρησιμοποιείται φορμαμίδη (Hi-Di™ Formamide, Genetic Analysis Grade) ως χημικός αποδιατακτικός παράγοντας και υψηλή θερμοκρασία (θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 5min). Για τον προσδιορισμό των μεγεθών των προϊόντων PCR χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο σύγκρισης μεγεθών DNA (internal lane size standard) που περιέχει σημασμένα με φθοριόχρωμα μονόκλωνα πρότυπα τμήματα DNA. Η ηλεκτροφόρηση ακολουθεί τις αρχές της κλασικής ηλεκτροφόρησης με τη διαφορά ότι η εισαγωγή του δείγματος στο πήκτωμα ακρυλαμίδης γίνεται με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Επιπλέον, το πήκτωμα είναι σε ρευστή μορφή και βρίσκεται στον αυλό τριχοειδούς σωληναρίου (capillary) και όχι σε επίπεδη επιφάνεια. Προκειμένου να διατηρηθούν οι αποδιατακτικές συνθήκες, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στους 60°C και προστίθεται ουρία (χημικός αποδιατακτικός παράγοντας) στο μέσο ηλεκτροφόρησης (πολυμερές βέλτιστης απόδοσης).

Καθώς τα δείγματα ηλεκτροφορούνται, τα μονόκλωνα τμήματα DNA διέρχονται μπροστά από ένα σημείο εκπομπής ακτινοβολίας (laser) με σειρά αυξανόμενου μεγέθους. Το laser εκπέμπει ακτινοβολία, η οποία όταν προσπίπτει σε μόρια με φθοριόχρωμα προκαλεί τη διέγερση και αποδιέγερση αυτού με αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας, που ανιχνεύεται από ειδική ψηφιακή κάμερα (CCD). Διαφορετικά φθοριοχρώματα εκπέμπουν και διαφορετική συχνότητα ακτινοβολίας. Η πληροφορία αυτή γίνεται ψηφιακή και μεταβιβάζεται στη κεντρική μονάδα του υπολογιστή, όπου και προβάλλεται με τη μορφή έγχρωμης κορυφής σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (λογισμικό συλλογής δεδομένων, Data Collection). Οι πληροφορίες αυτές αποθηκεύονται στο σκληρό δίσκο του υπολογιστή απ' όπου μπορούν να ανακτηθούν και να επεξεργαστούν.

Η επεξεργασία των πληροφοριών που συλλέγονται για κάθε δείγμα που ηλεκτροφορείται, πραγματοποιείται με την χρήση ειδικού λογισμικού επεξεργασίας

δεδομένων, με τη βοήθεια του οποίου προσδιορίζεται το μέγεθος και η σχετική ποσότητα των προϊόντων PCR ή η αλληλουχία των βάσεων.

Συγκεκριμένα, τα προϊόντα PCR που προέκυψαν μετά τη εφαρμογή της μεθόδου MLPA [0.7μl από την αντίδραση PCR, 12μl Hi-Di™ Formamide, 0.3μl GeneScan™-500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems)-εσωτερικό πρότυπο σύγκρισης μεγεθών DNA που περιέχει σημασμένα με φθοριόχρωμα LIZ μονόκλιωνα πρότυπα τμήματα DNA μήκους 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 και 500 βάσεων] αναλύθηκαν σε αυτόματο γενετικό αναλυτή ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές σωληνάριο (capillary), μήκους 47cm, διαμέτρου 50 μm (ID, 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) και πολυμερές βέλτιστης απόδοσης POP-4™ (310 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems). Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη χρήση του λογισμικού συλλογής δεδομένων 310 Data Collection Software (Applied Biosystems) επεξεργάστηκαν αρχικά με τη χρήση ειδικού λογισμικού επεξεργασίας δεδομένων, GeneMapper ID Software v3.7 (Applied Biosystems) και στη συνέχεια με το πρόγραμμα Coffalyser v9.4 (MRC-Holland). Τα προϊόντα της αντίδρασης sequencing, μετά τον καθαρισμό τους (1μl από την αντίδραση και 9μl Hi-Di™ Formamide) αναλύθηκαν σε αυτόματο γενετικό αναλυτή ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές σωληνάριο (capillary), μήκους 36cm, διαμέτρου 50 μm (ABI 3130xl/3100 36cm capillary array, Applied Biosystems) και πολυμερές βέλτιστης απόδοσης POP-7™ (ABI 3100 Genetic Analyzer Performance Optimized Polymer 7, Applied Biosystems). Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη χρήση του λογισμικού συλλογής δεδομένων 3130xl Data Collection Software (Applied Biosystems) αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Chromas Lite 2.01.

## **3Γ. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ**

### **3Γ.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ**

#### ***ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ***

Αρχικά, τα ιστοτεμάχια από δέρμα κρανίου ή μηρού, τα οποία λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της χειρουργικής αποκατάστασης κρανιοσυνοστέωσης, του σχήματος της κεφαλής (πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως) ή, στην περίπτωση του φυσιολογικού δείγματος, για αφαίρεση σπίλου, τοποθετούνται μέσα σε αποστειρωμένο σωλήνα universal με στείρο ισότονο διάλυμα HANK'S (GIBCO), το οποίο περιέχει αντιβιοτικά και ηπαρίνη.

#### ***ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ***

Μετά τον τεμαχισμό τμήματος του ιστού και την επίστρωσή του σε δύο ή τρεις 25cm<sup>2</sup> φιάλες καλλιέργειας 50ml (GREINER), προστίθενται 2ml καλλιεργητικού υλικού AMNIOGROW PLUS (complete medium) (CYTOGEN) σε κάθε φιάλη και τα δείγματα επώάζονται στους 37°C σε κλίβανο με pCO<sub>2</sub> 5%. Μετά από 6-7 ημέρες ελέγχεται η εξέλιξη της καλλιέργειας των κυττάρων, σε ανάστροφο μικροσκόπιο και πραγματοποιείται η πρώτη αλλαγή καλλιεργητικού υλικού. Μετά την παρέλευση 2-3 ημερών επαναλαμβάνεται ο έλεγχος της ανάπτυξης των κυττάρων στο μικροσκόπιο και εφόσον υπάρχει η αναμενόμενη ανάπτυξη των κυτταρικών αποικιών γίνεται ανακαλλιέργεια.

#### ***ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ***

Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας επιτρέπει το συγχρονισμό των κυτταρικών διαιρέσεων, καθώς και την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων σε όλη την επιφάνεια της φιάλης με αποτέλεσμα τη δυνατότητα περαιτέρω πολλαπλασιασμού τους. Κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας, αφού αφαιρεθεί το καλλιεργητικό υλικό, πραγματοποιείται επώαση των κυττάρων με 2ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA:0.05%/0.02% (w/v) σε PBS (BIOCHROM) στους 37°C για 5min μέχρις ότου αποκολληθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, ο μισός όγκος του διαλύματος με τα κύτταρα (1ml) μεταφέρεται σε νέα φιάλη και, τόσο στην παλιά όσο και στη νέα φιάλη, προστίθενται 2.5ml καλλιεργητικού υλικού



AMNIOGROW PLUS το οποίο αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης. Μετά την επώασή τους στους 37° C για 3-4h προκειμένου να ξανακολλήσουν τα κύτταρα, το υγρό περιεχόμενο των φιαλών απορρίπτεται και προστίθενται 3 ml νέου καλλιεργητικού υλικού AMNIO-GROW. Τα κύτταρα επώάζονται στους 37° C σε κλίβανο με pCO<sub>2</sub> 5% μέχρι να δημιουργήσουν ένα πυκνό στρώμα ομοιόμορφα κατανεμημένο σε όλη την επιφάνεια της φιάλης (συνήθως 1-2 ημέρες).

### **ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Για τη συλλογή των κυττάρων επαναλαμβάνεται η επεξεργασία τους με διάλυμα θρυψίνης/EDTA, ώστε να ξεκολλήσουν από τη φιάλη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλένονται με ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα HANK'S και, μετά από φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 7min σε RT, ώστε να απομακρυνθεί το υπερκείμενο, διαλυτοποιούνται σε 5-6ml PBS.

### **3Γ.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ**

Η απομόνωση του RNA, όπως και του DNA, βασίστηκε στην αρχή της απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων με τη χρήση μεμβράνης διοξειδίου του πυριτίου (silica). Αρχικά, τα κύτταρα λύονται και ομογενοποιούνται παρουσία αποδιατακτικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικών αλάτων (guanidine-thiocyanate), το οποίο απενεργοποιεί τις RNAses, ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του RNA που πρόκειται να απομονωθεί. Το δείγμα, μετά την προσθήκη αιθανόλης ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες δέσμευσης, προστίθεται στην κολώνα φυγοκέντρησης, όπου το RNA δεσμεύεται στη μεμβράνη. Μετά από 3 στάδια έκπλυσης της μεμβράνης, ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα πρωτεϊνών και αλάτων που πιθανόν να έχουν παραμείνει στη μεμβράνη, το RNA εκλύεται σε RNase free ddH<sub>2</sub>O.

Για την απομόνωση ολικού RNA από τις καλλιέργειες ινοβλαστών χρησιμοποιήθηκε το RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA από ζωικά κύτταρα με τεχνολογία φυγοκέντρησης (spin technology). Η RNeasy μεμβράνη έχει τη δυνατότητα να δεσμεύσει μέχρι 100 ng RNA μήκους >200 βάσεις.

Συγκεκριμένα, τα κύτταρα που συλλέχθηκαν σε PBS (phosphate buffered saline), όταν η καλλιέργεια είχε φτάσει σε πλήρη ανάπτυξη (confluent grow, ~3x10<sup>6</sup> κύτταρα), φυγοκεντρήθηκαν στις 1800rpm για 7min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Μετά την απομάκρυνση του PBS, το ίζημα (κύτταρα) αναδιαλύθηκε σε 350μl ρυθμιστικού διαλύματος

RLT , στο οποίο είχε προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας (10μl β-ME ανά 1ml διαλύματος RLT) και πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση (vortex) για 5-10min, ώστε να επιτευχθεί λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350μl 70% αιθανόλης και το δείγμα, μετά από ανάδευση, μεταφέρθηκε στην RNeasy κολώνα απομόνωσης ολικού RNA. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρίας και τελικά το απομονωμένο ολικό RNA εκλούσθηκε σε 50μl RNase free ddH<sub>2</sub>O και φυλάχθηκε στους -80°C.

Για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

### **3Γ.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε από τις καλλιέργειες των ινοβλαστών πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρησή του, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη της διπλής ζώνης (18S, 28S) που αντιστοιχεί στο rRNA και είναι ορατή σε πήκτωμα αγαρόζης λόγω της μεγάλης συγκέντρωσής του στα κύτταρα.

Η ηλεκτροφόρηση του RNA πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.1% SeaKem<sup>®</sup> LE (Lonza) σε 1x TAE (40mM Tris, 20mM Acetic Acid, 1mM EDTA, pH 8.3) (BIORAD) και 0.5μg/ml EtBr (SIGMA). Χρησιμοποιήθηκε η χρωστική gel loading dye Blue (6x) (BioLabs) και συνηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας pGEM<sup>®</sup> DNA marker (PROMEGA), ως δείκτης μεγέθους.

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του πηκτώματος και την ηλεκτροφόρηση του RNA είχαν υποστεί επεξεργασία με DEPC (AppliChem).

### **3Γ.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ DNASE**

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα μόρια γενωμικού DNA που πιθανόν έχουν συναπομονωθεί με το RNA, ώστε το RNA να αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για τη δημιουργία cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, πραγματοποιείται επεξεργασία του με DNase. Συγκεκριμένα, 1.1μg RNA από κάθε μια από τις επιλεγμένες προς ανάλυση γονιδιακής έκφρασης καλλιέργειες ινοβλαστών, του οποίου η συγκέντρωση προσδιορίστηκε μετά από φωτομέτρηση σε φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) επεξεργάστηκε με την DNaseI (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [1.1μg RNA, 1μl 10x ρυθμιστικό διάλυμα DNaseI, 1μl DNaseI (Amplification Grade, 1U/μl), RNase

free ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 10μl- επώαση για 15min σε RT- απενεργοποίηση DNaseI: προσθήκη 1μl 25mM EDTA και επώαση στους 65°C για 10min]. Μετά από αυτή την επεξεργασία το RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

### **3Γ.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA**

Η δημιουργία cDNA από mRNA πραγματοποιείται με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το μονόκλωνο RNA δρα ως υπόστρωμα για τη δημιουργία συμπληρωματικού μονόκλωνου DNA (first strand cDNA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney murine leukemia virus), η οποία έχει δράση RNA- και DNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης, καθώς και ασθενή δράση RNase H, η οποία καταστρέφει το RNA από τα DNA:RNA υβρίδια που δημιουργούνται κατά την αντίδραση. Ως εκκινητές για την αντίδραση χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια (random hexamers) και όλιγο- dT. Τα υβρίδια που δημιουργούνται μεταξύ του mRNA υποστρώματος και των εκκινητών κατά την έναρξη της αντίδρασης, αποτελούν επίσης υποστρώματα για την RNase H, και ως εκ τούτου υπάρχει ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της αποικοδόμησης του RNA και της έναρξης της σύνθεσης του cDNA. Λόγω του ότι η δράση RNase H της MMLV είναι ασθενής, η χρήση της ενδείκνυται για τη δημιουργία πλήρους μήκους αντιγράφων cDNA από mRNA υποστρώματα μεγαλύτερα από 2-3kb.

Το απαλλαγμένο από DNA δείγμα RNA, μετά την επεξεργασία του με DNase I, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη δημιουργία cDNA με το RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το kit αυτό περιλαμβάνει ένα επιπλέον βήμα για να διασφαλίσει την πλήρη απομάκρυνση γενωμικού DNA από το δείγμα RNA. Συγκεκριμένα, σε 8μl διαλύματος επεξεργασμένου με DNaseI RNA (~790ng) προστέθηκαν 2μl ρυθμιστικού διαλύματος GE (5x gDNA elimination buffer) και ακολούθησε επώαση στους 42°C για 10min. Για την αντίδραση σύνθεσης του cDNA, ολόκληρη η προηγούμενη αντίδραση (10μl) προστέθηκε σε 10μl διαλύματος RT cocktail [4μl ρυθμιστικού διαλύματος BC3 (5x RT buffer 3), 1μl διαλύματος P2 (Primer & External control mix), 2μl διαλύματος RE3 (RT enzyme mix 3), 3μl RNase free ddH<sub>2</sub>O)]. Ακολούθησε επώαση στους 42°C για 15min και στη συνέχεια στους 95°C για 5min. Το cDNA (20μl) φυλάσσεται στους -

20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα προσδιορισμού έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).

### **3Γ.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)**

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το RNA που απομονώθηκε από την ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών στη νέα φιάλη καλλιέργειας, εκτός από το δείγμα του ασθενούς 52 που χρησιμοποιήθηκε το RNA από την ανακαλλιέργεια στην πρώτη φιάλη, το οποίο είχε προηγουμένως μετατραπεί σε cDNA μέσω της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

#### ***3Γ.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR)***

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) μπορεί να προσδιοριστεί η αρχική ποσότητα ενός δείγματος (π.χ. cDNA, η οποία αντικατοπτρίζει την αρχική ποσότητα του αντίστοιχου mRNA) με μεγάλη ειδικότητα και ακρίβεια. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης ως δείκτης δημιουργίας ειδικών προϊόντων σε κάθε κύκλο PCR. Μία από τις βασικές τεχνολογίες στην real time PCR είναι η TaqMan, η οποία εκμεταλλεύεται τη δράση εξωνουκλεάσης 5'-3' της DNA πολυμεράσης AmpliTaq, σε συνδυασμό με τους ανιχνευτές TaqMan® MGB (TaqMan® MGB Probes). Κάθε ανιχνευτής TaqMan® MGB αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο ειδικό για την αλληλουχία-στόχο (target-specific oligonucleotide) το οποίο φέρει:

- Μια φθορίζουσα χρωστική, στη συγκεκριμένη περίπτωση 6FAM™ (6FAM™ reporter dye) στο 5' άκρο του.
- Μία μη φθορίζουσα ουσία απόσβεσης (NFQ: nonfluorescent quencher) στο 3' άκρο του, η οποία χαμηλώνει το σήμα του υποβάθρου (background).
- Έναν προσδέτη μικρής αύλακας (MGB: minor groove binder), ο οποίος αυξάνει τη θερμοκρασία τήξης/υβριδοποίησης (Tm: melting temperature) χωρίς να αυξάνει το μήκος του ανιχνευτή.

Όταν ο ανιχνευτής TaqMan® MGB είναι άθικτος, μετά από ακτινοβόλησή του, η διεγερμένη φθορίζουσα χρωστική μεταφέρει ενέργεια στη γειτονική της μη φθορίζουσα ουσία απόσβεσης (η διαδικασία ονομάζεται μεταφορά ενέργειας Förster) και εμποδίζεται με αυτόν τον τρόπο η παραγωγή φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η δράση εξωνουκλεάσης 5'-3' της DNA πολυμεράσης AmpliTaq διασπά τον ανιχνευτή ανάμεσα στην ειδική φθορίζουσα χρωστική και τη μη φθορίζουσα ουσία απόσβεσης, μόνο εφόσον αυτός έχει υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία-στόχο. Η απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής από τη μη φθορίζουσα ουσία απόσβεσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού, η οποία αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση ειδικών προϊόντων PCR. Στη συνέχεια, τα τμήματα του ανιχνευτή απομακρύνονται από την αλληλουχία-στόχο και ολοκληρώνεται ο πολυμερισμός του κλώνου. Το 3' άκρο του ανιχνευτή είναι μπλοκαρισμένο ώστε να αποφευχθεί επέκτασή του από την πολυμεράση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο και δεν επηρεάζει την εκθετική αύξηση των προϊόντων PCR (Εικόνα 44).

Προκειμένου να προσδιοριστεί η έκφραση (mRNA) των γονιδίων COL1A1, RUNX2, TWIST1 και GAPDH (γονίδιο αναφοράς) χρησιμοποιήθηκαν τα TaqMan® Gene Expression Assays (6FAM™) (Applied Biosystems) Hs00164004\_m1 COL1A1, Hs00231692\_m1 RUNX2, Hs01675818\_s1 TWIST1 και Hs99999905\_m1 GAPDH και το TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems).

Κάθε TaqMan® Gene Expression Assay (20x) περιλαμβάνει ένα ζεύγος μη σημασμένων εκκινητών σε συγκέντρωση 18μM ο καθένας και ένα σημασμένο ανιχνευτή TaqMan® MGB (TaqMan® MGB Probe) σε συγκέντρωση 5μM.

Το TaqMan® Gene Expression Master Mix περιέχει τα εξής αντιδραστήρια: DNA πολυμεράση AmpliTaq Gold®, UP (Ultra Pure), το ένζυμο UDG (Uracil-DNA γλυκοζυλάση), dNTPs με dUTP και παθητική φθορίζουσα χρωστική αναφοράς ROX (ROX™ Passive Reference).

Η DNA πολυμεράση AmpliTaq Gold®, UP (Ultra Pure) ενεργοποιείται κατόπιν θέρμανσης στους 95 °C, εξασφαλίζοντας έτσι εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία (Hot Start) και έχει δράση εξωνουκλεάσης 5'-3'.

Η UDG αποτρέπει την επιμόλυνση με DNA προϊόντα PCR που περιέχουν ουρακίλη (dU-DNA).

Η παθητική φθορίζουσα χρωστική αναφοράς ROX κανονικοποιεί το προκύπτον φθορίζον σήμα σε σχέση με το ειδικό σήμα φθορισμού.

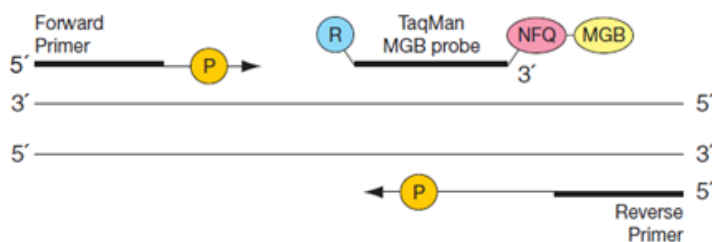
NFQ = Nonfluorescent quencher

MGB = Minor groove binder

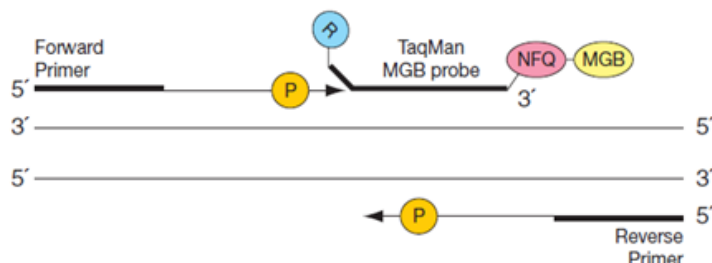
R = Reporter

P = AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP

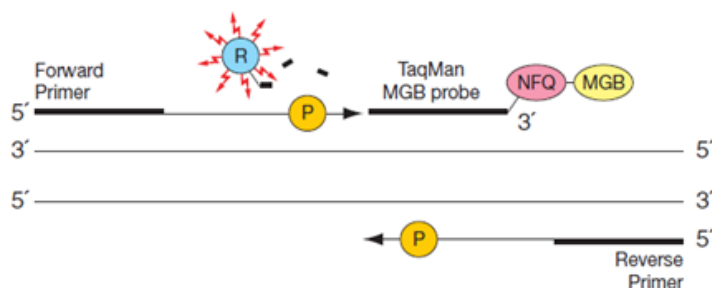
Πολυμερισμός



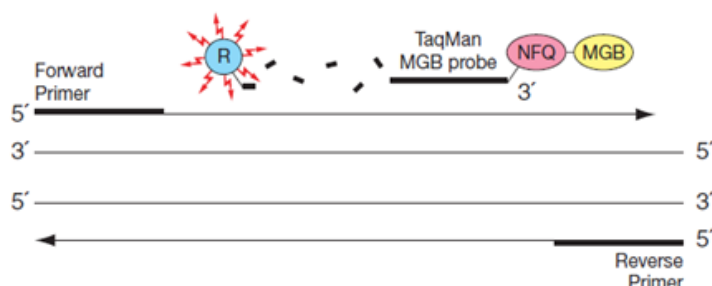
Εκτόπιση  
ανιχνευτή



Διάσπαση  
ανιχνευτή



Ολοκλήρωση  
πολυμερισμού



**Εικόνα 44:** Σχηματική απεικόνιση της αρχής TaqMan real time PCR. Λόγω της δράσης εξωνουκλεάσης 5'-3' της DNA πολυμεράσης AmpliTaq διασπάται ο ανιχνευτής, που έχει προηγουμένως υβριδοποιηθεί στην αλληλουχία-στόχο, και απομακρύνεται η ειδική φθορίζουσα χρωστική από τη μη φθορίζουσα ουσία απόσβεσης, επιτρέποντας έτσι την εκπομπή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού που ανιχνεύεται αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση ειδικών προϊόντων PCR.

Όλες οι αντιδράσεις Real time PCR (0.2μl cDNA, 20x TaqMan® Gene Expression Assay, 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix, RNase-free ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 20μl) πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), σε πλάκα 96 θέσεων (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems) και χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες από την εταιρία συνθήκες (στάδιο επώασης με UDG: 50°C για 2min, στάδιο αρχικής αποδιάταξης του cDNA

και ενεργοποίησης της πολυμεράσης AmpliTaq Gold, UP: 95°C για 10min, 40 κύκλοι PCR: 95°C για 15sec - 60°C για 1min / Standard mode thermal cycling conditions). Για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις της κάθε αντίδρασης real time PCR στο ίδιο πείραμα.

### **3Γ.6.2 Σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) της έκφρασης γονιδίων**

Ένας από τους τρόπους υπολογισμού της έκφρασης γονιδίων, αξιοποιώντας τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, είναι η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification), όπου για κάθε δείγμα η έκφραση του γονιδίου-στόχου μετράται με βάση την έκφραση ενός σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου-αναφοράς (*GAPDH*) και συγκρίνεται με την αντίστοιχη έκφραση ενός φυσιολογικού δείγματος ελέγχου. Για τον προσδιορισμό της ποσοτικής έκφρασης των προς εξέταση γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* εφαρμόστηκε η μέθοδος  $\Delta\Delta C_t$ , σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Applied Biosystems), και οι υπολογισμοί έγιναν με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος Microsoft Excel 2013. Συγκεκριμένα, η σχετική έκφραση του κάθε δείγματος για κάθε ένα από τα γονίδια-στόχους υπολογίζεται βάσει του τύπου:  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ενώ το εύρος τιμών της δίνεται από τους τύπους:  $2^{-(\Delta\Delta C_t+s)}$  και  $2^{-(\Delta\Delta C_t-s)}$ , όπου:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ δείγματος} - \Delta C_t \text{ δείγματος ελέγχου}$$

$$\Delta C_t = \text{Avg}C_t \text{ γονιδίου στόχου} - \text{Avg}C_t \text{ γονιδίου αναφοράς}$$

$$s = (s_1^2 + s_2^2)^{1/2} \text{ (τυπική απόκλιση) και}$$

$$s_1 = \text{STDEV γονιδίου στόχου, } s_2 = \text{STDEV γονιδίου αναφοράς}$$





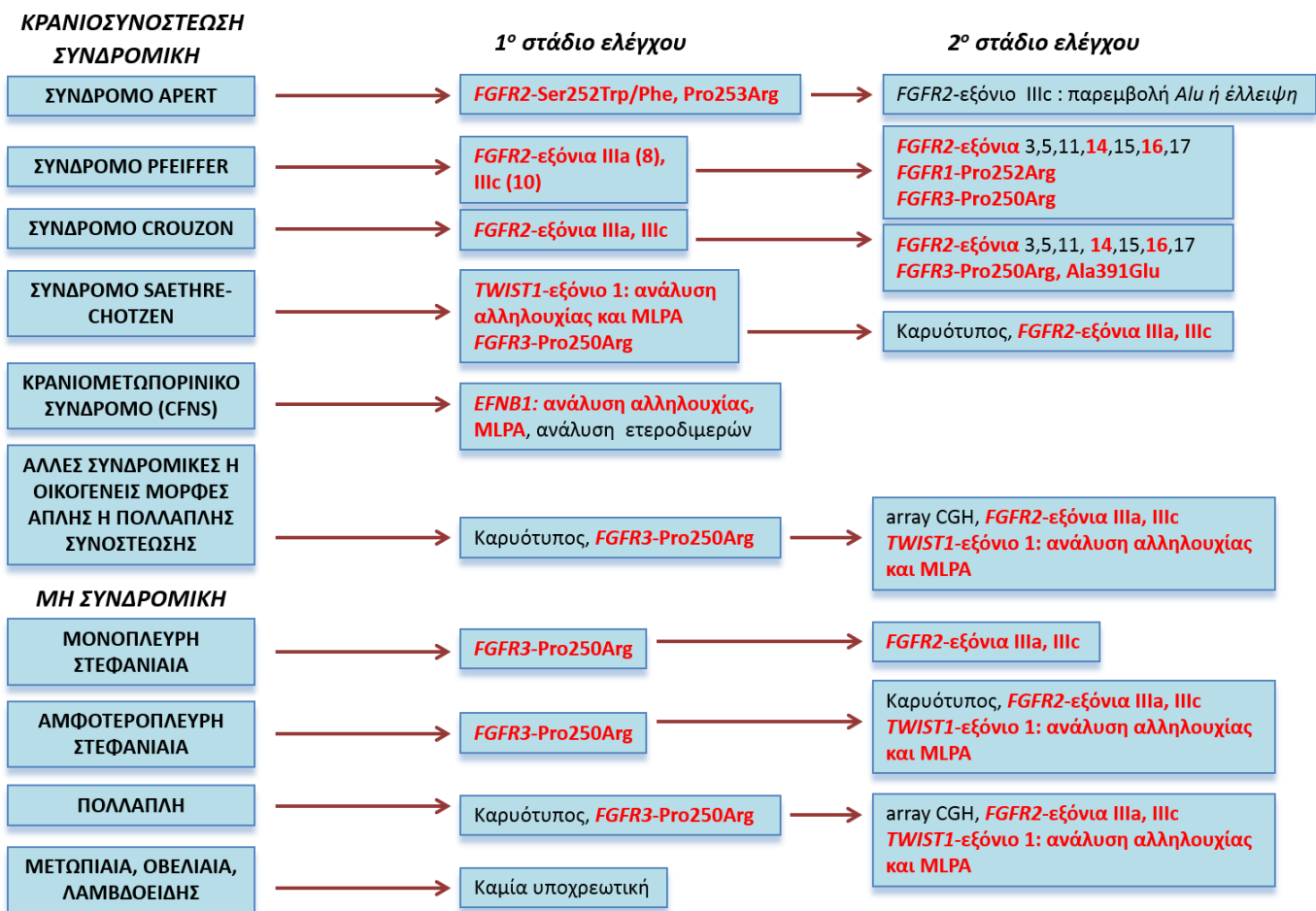
## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

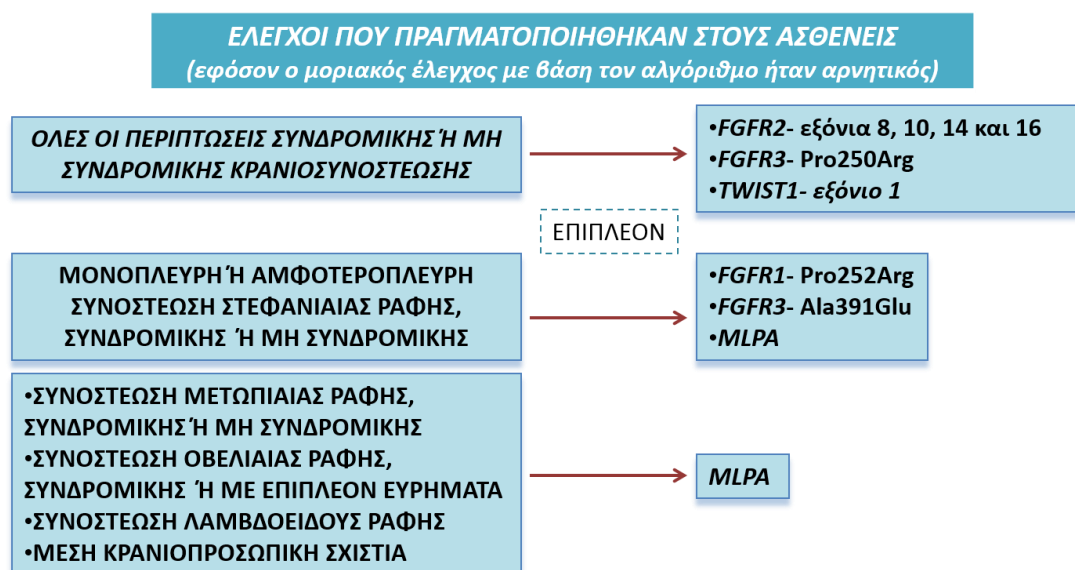
### 4Α. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ

Συνολικά σε 47 ασθενείς με κρανιοσκελετικές ανωμαλίες, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιλεγμένων γενετικών τόπων ανάλογα με την αρχική κλινική τους περιγραφή με βάση τον προτεινόμενο αλγόριθμο ελέγχου ασθενών με κρανιοσυνοστέωση (Johnson and Wilkie, 2011) (Εικόνα 45). Λόγω της αλληλοεπικάλυψης των κλινικών χαρακτηριστικών των συνδρόμων, της ελλιπούς κλινικής περιγραφής και της δυσκολίας διαχωρισμού τους καθώς επίσης και της ύπαρξης σπάνιων περιπτώσεων μη συνδρομικής συνοστέωσης με ευρήματα στα γονίδια *FGFR2* και *TWIST1* στις περιπτώσεις με αρνητικά αποτελέσματα από τον αρχικό έλεγχο με βάση τον αλγόριθμο των Johnson and Wilkie, 2011, ο μοριακός έλεγχος των ασθενών διευρύνθηκε πέραν του προτεινόμενου αλγορίθμου και διαμορφώθηκε ως εξής: όλες οι περιπτώσεις συνδρομικής ή μη συνδρομικής κρανιοσυνοστέωσης ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του γονιδίου *FGFR2*, στο εξόνιο 1 (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) του *TWIST1* και για τη μεταλλαγή Pro250Arg του γονιδίου *FGFR3*. Επιπλέον, στις περιπτώσεις μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, συνδρομικής ή μη συνδρομικής πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη των μεταλλαγών Pro252Arg στο γονίδιο *FGFR1*, Ala391Glu στο *FGFR3* καθώς και έλεγχος για την ύπαρξη μικροελλείψεων /μικροδιπλασιασμών στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *EFNB1* και *RUNX2* με τη μέθοδο της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενης από τη δράση της λιγάσης (MLPA). Η μεθοδολογία MLPA εφαρμόστηκε και στις περιπτώσεις συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής, συνδρομικής ή μη συνδρομικής, συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής, συνδρομικής ή με επιπλέον ευρήματα, συνοστέωσης της λαμβδοειδούς ραφής καθώς και στην περίπτωση της μέσης κρανιοπροσωπικής σχιστίας (Εικόνα 46).

Συνολικά, σε 14 από τους 47 ασθενείς επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση μετά από έλεγχο στα γονίδια *FGFR1* (εξόνιο 7- παλιά ονομασία: εξόνιο 5), *FGFR2* (εξόνια 8, 10, 14 και 16), *FGFR3* (εξόνια 7 και 10), *TWIST1* (εξόνιο 1-ολόκληρο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) και *EFNB1* (και τα 5 εξόνια).



**Εικόνα 45:** Προτεινόμενος αλγόριθμος ελέγχου ασθενών με κρανιοσυνοστέωση (Johnson and Wilkie, 2011). Με κόκκινο σημειώνονται οι έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

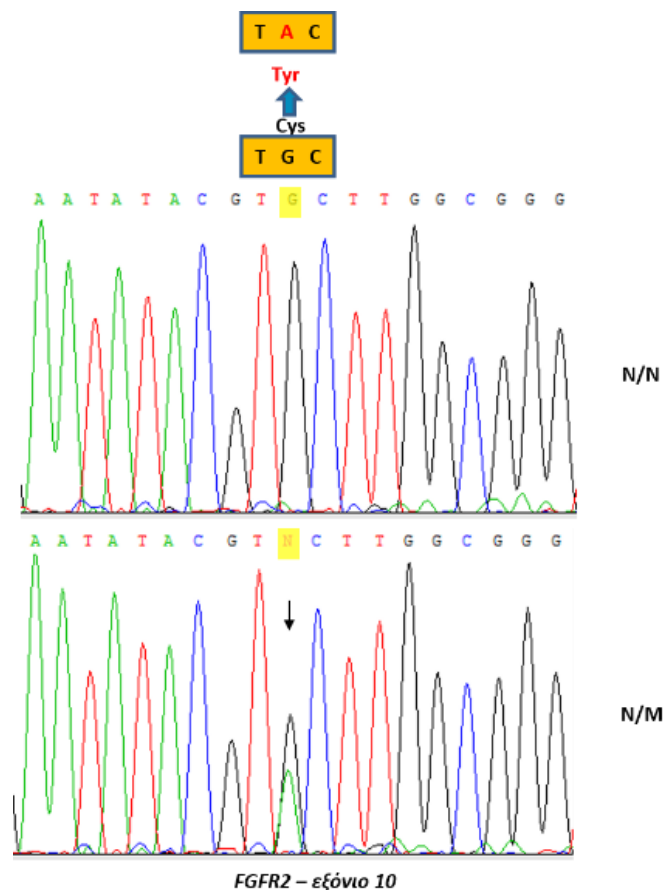


**Εικόνα 46:** Διαμορφωμένος αλγόριθμος ελέγχου ασθενών με κρανιοσυνοστέωση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

## 4Α.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ

### Ασθενής 10

Στον ασθενή 10 (άρρεν άτομο με σύνδρομο Crouzon), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 47), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.C342Y (c.1025G>A). Αν και δεν ήταν εφικτός ο έλεγχος των γονέων, πιθανόν η μεταλλαγή έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν αναφέρεται κλινικός φαινότυπος σε κανέναν γονέα. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 45 έτη και 6 μήνες και της μητέρας 35 έτη.

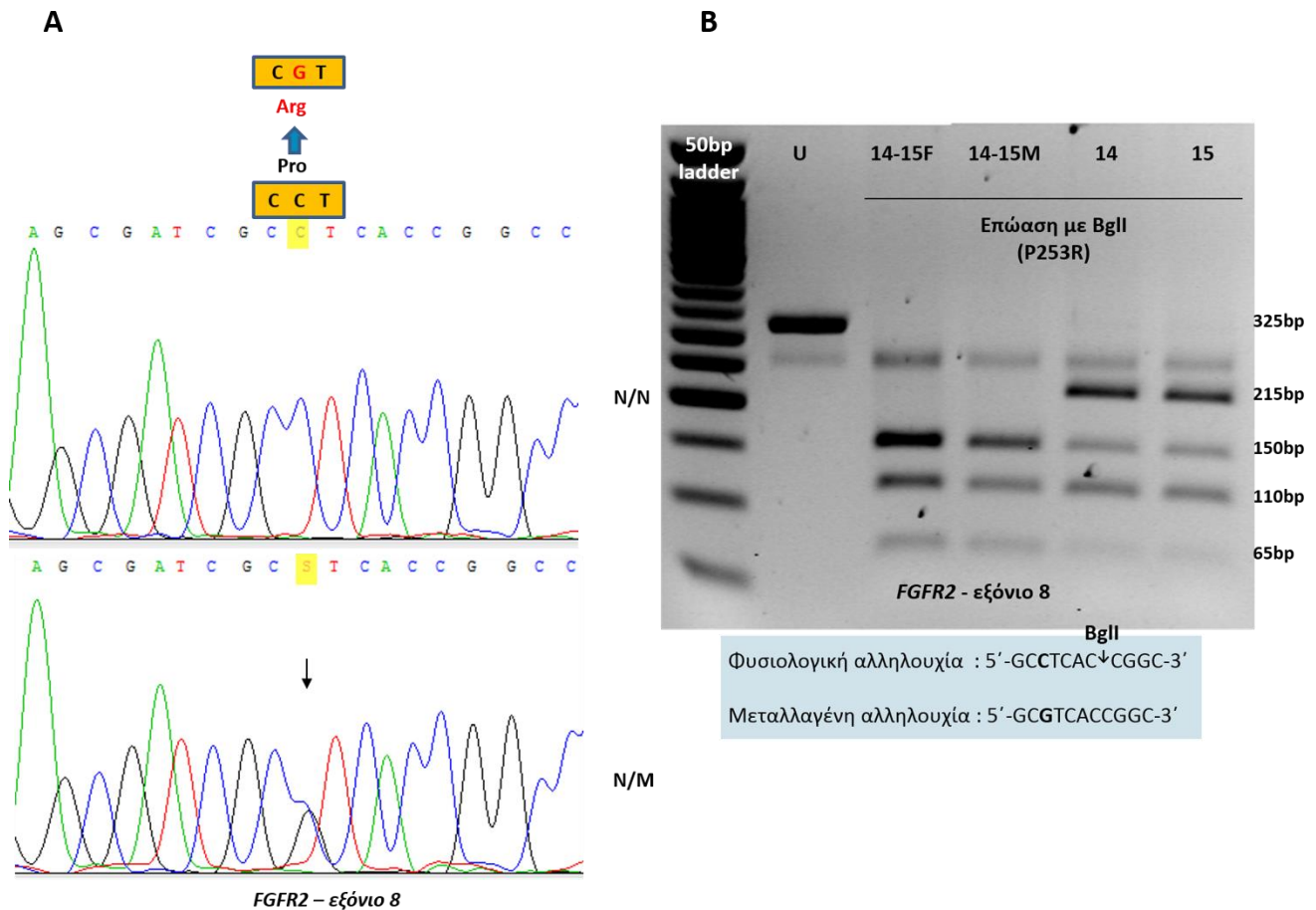


**Εικόνα 47:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και του ασθενούς 10 (κάτω).

### Ασθενείς 14 και 15

Οι ασθενείς 14 και 15 (θήλεια άτομα με σύνδρομο Apert) είναι μονοζυγωτικά δίδυμα. Στην ασθενή 14 μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 48A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.P253R (c.758C>G), η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε τόσο στην ίδια όσο και στη δίδυμη αδελφή της (ασθενή 15) μετά από επώαση του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Bgl*I (Εικόνα 48B), ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν

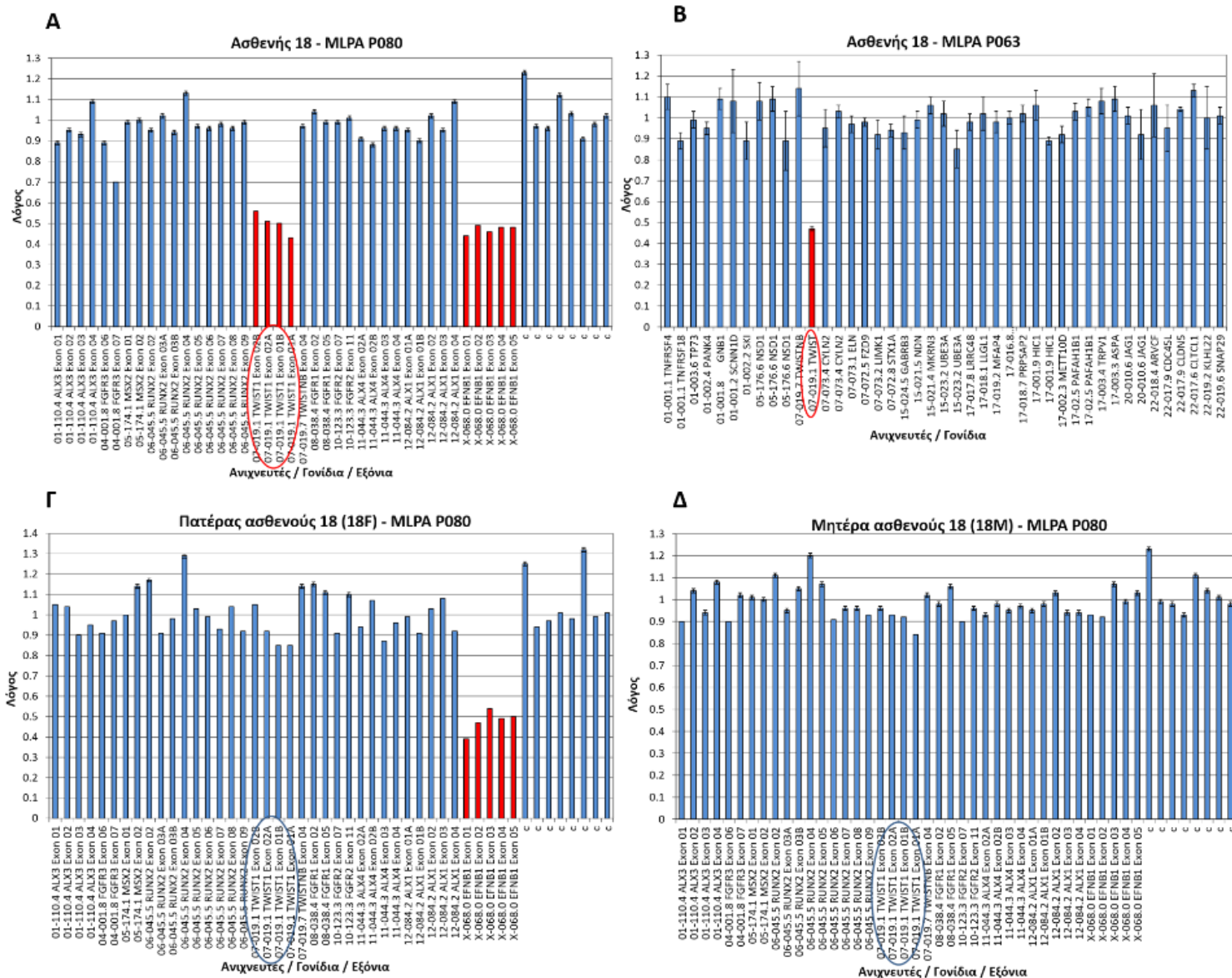
εντοπίστηκε στους γονείς και επομένως έχει προέλθει *de novo*. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 30 έτη και 6 μήνες και της μητέρας 23 έτη.



**Εικόνα 48:** **A.** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 14 (κάτω). **B.** Επάωση με περιοριστικό ένζυμο *BglII* του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* του πατέρα (14-15F), της μητέρας (14-15M) και των ασθενών 14 και 15 για την ανίχνευση της μεταλλαγής P253R. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

### Ασθενής 18

Στον ασθενή 18 (άρρεν άτομο με αρχική κλινική διάγνωση πιθανού συνδρόμου Muenke ή μη συνδρομικής δεξιάς πλαγιοκεφαλίας) διαπιστώθηκε ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1* με τη μέθοδο της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενης από τη δράση της λιγάσης (MLPA), το οποίο έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν εντοπίστηκε στους γονείς (Εικόνα 49). Η ηλικία των γονέων κατά τη σύλληψη ήταν 32 έτη.

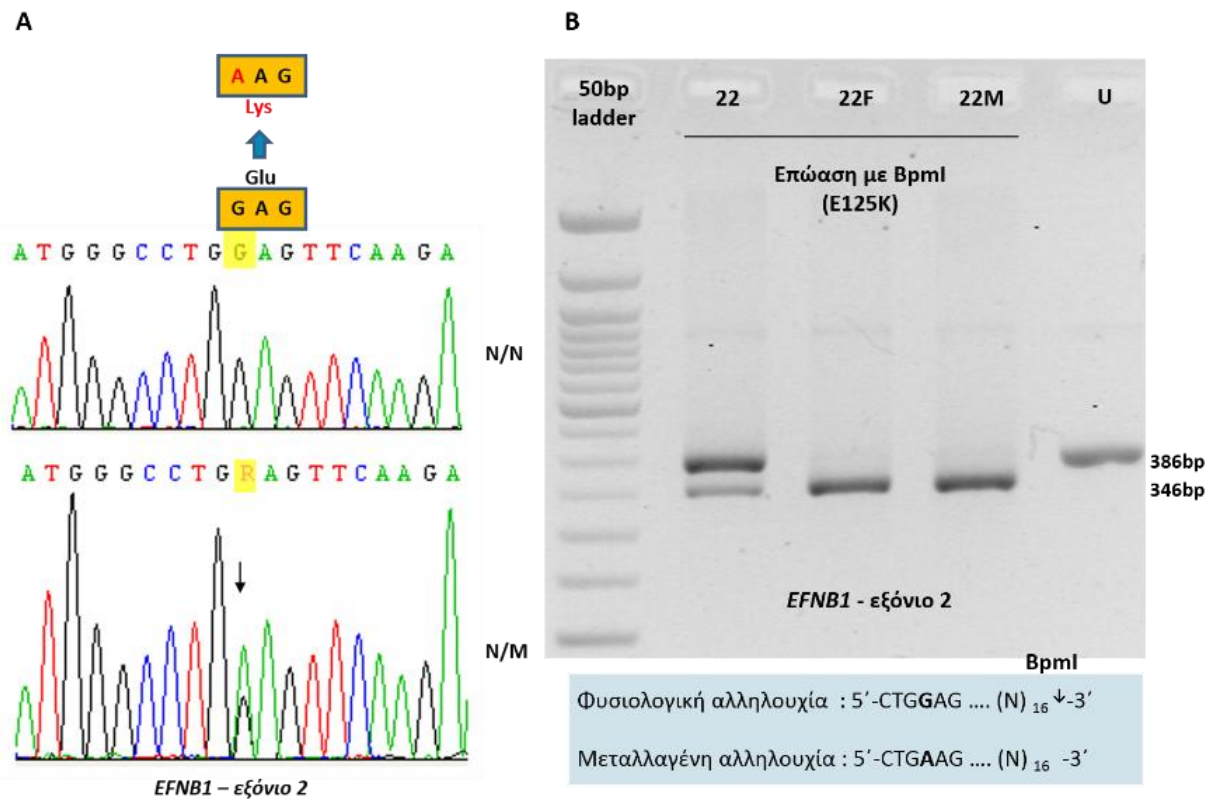


**Εικόνα 49:** Αποτελέσματα μεθόδου MLPA για τον ασθενή 18 και για τους γονείς του. Στον ασθενή 18 ανιχνεύθηκε ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1* με τη χρήση του μίγματος ανιχνευτών P080 (Α), το οποίο επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του μίγματος ανιχνευτών P063 (Β) και φαίνεται ότι έχει προέλθει *de novo*, εφόσον ο πατέρας (Γ) και η μητέρα του ασθενούς (Δ) δε φέρουν την έλλειψη.

### Ασθενής 22

Στην ασθενή 22 (θήλυ άτομο με κраниομετωπορινικό σύνδρομο, CFNS) μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 2 του γονιδίου *EFNB1* (Εικόνα 50A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.E125K (c.373G>A), η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση του προϊόντος PCR του εξονίου 2 του γονιδίου *EFNB1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BsmI* (Εικόνα 50B). Η μεταλλαγή p.E125K (c.373G>A)

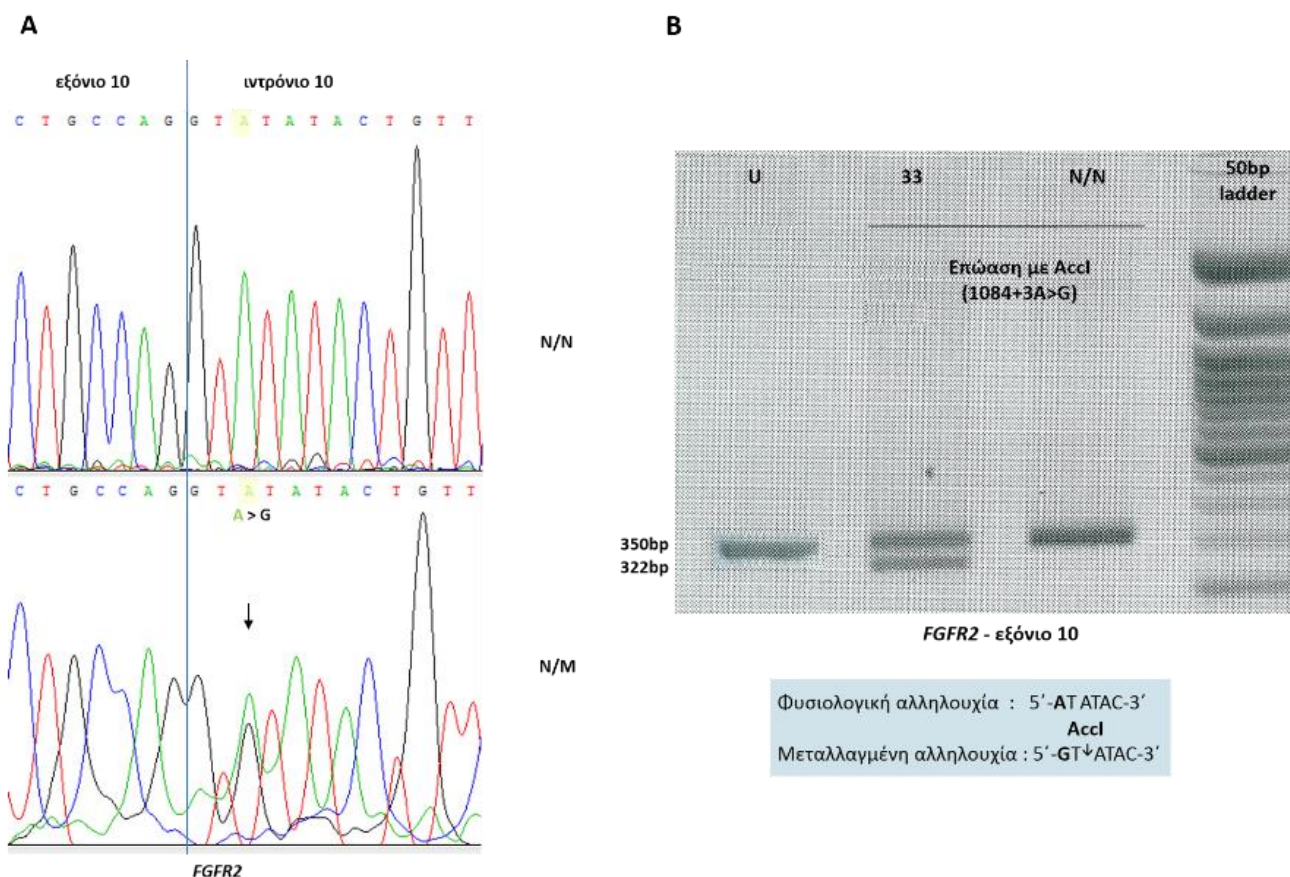
αναφέρεται για πρώτη φορά (νέα μεταλλαγή) και έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν εντοπίστηκε στους γονείς. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 26 έτη και της μητέρας 25 έτη.



**Εικόνα 50:** **A.** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 2 του γονιδίου *EFNB1* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 22 (κάτω). **B.** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο *BspI* του προϊόντος PCR του εξονίου 2 του γονιδίου *EFNB1* του πατέρα (22F), της μητέρας (22M) και της ασθενούς 22 για την ανίχνευση της μεταλλαγής E125K. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

### Ασθενής 33

Στον ασθενή 33 (άρρεν άτομο με σύνδρομο Crouzon), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 και τμήματος του ιντρονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 51A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η μεταλλαγή 1084+3A>G, η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση του προϊόντος PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση *AccI* (Εικόνα 51B). Αν και δεν ήταν εφικτός ο έλεγχος των γονέων, πιθανόν η μεταλλαγή έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν αναφέρεται κλινικός φαινότυπος σε κανέναν γονέα. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 34 έτη και της μητέρας 32 έτη.

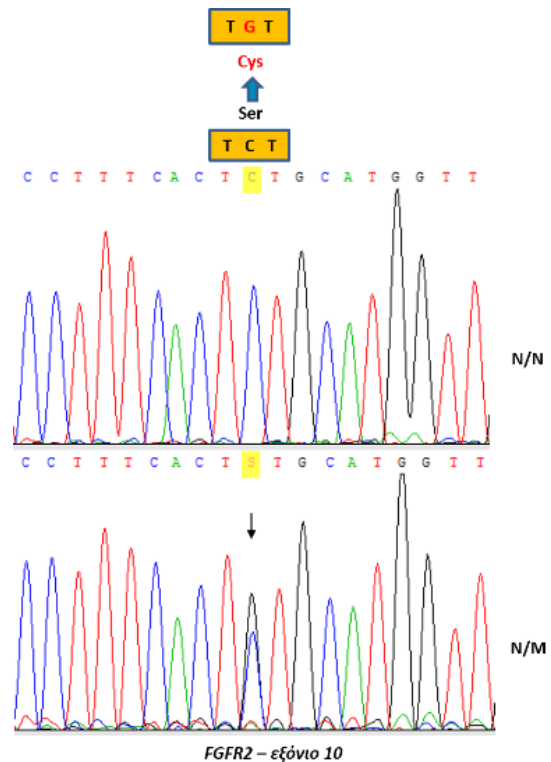


**Εικόνα 51:** **A.** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* (στο προϊόν PCR του οποίου περιλαμβάνεται και τμήμα του ιντρονίου 10) ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και του ασθενούς 33 (κάτω). **B.** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο *AccI* του προϊόντος PCR του εξονίου 10-τμήματος ιντρονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* του ασθενούς 33 και ενός φυσιολογικού δείγματος ελέγχου (N/N) για την ανίχνευση της μεταλλαγής 1084+3 A > G. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

### Ασθενής 34

Στην ασθενή 34 (θήλυ άτομο με σύνδρομο Crouzon), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 52), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.S354C (c.1061C>G). Αν και δεν ήταν εφικτός ο έλεγχος των γονέων, πιθανόν η μεταλλαγή έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν αναφέρεται κλινικός φαινότυπος σε κανέναν γονέα. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 37 έτη και της μητέρας 23 έτη.

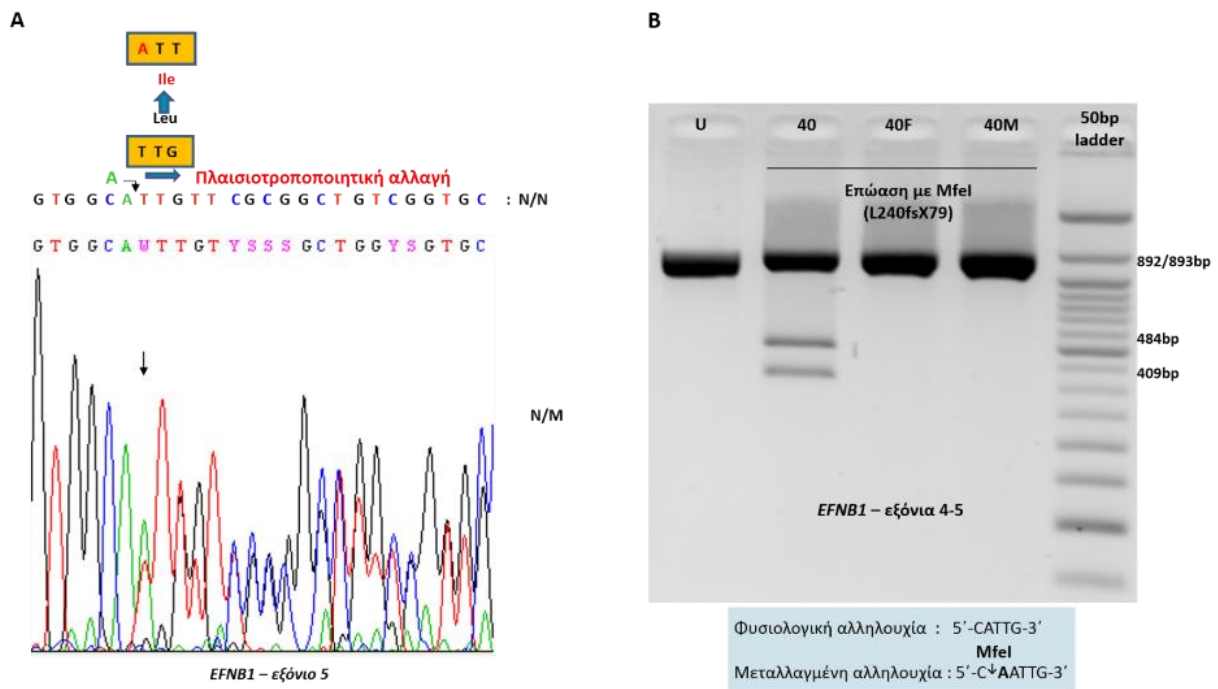




**Εικόνα 52:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 34 (κάτω).

#### Ασθενής 40

Στην ασθενή 40 (θήλυ άτομο με κρανιομετωπορινικό σύνδρομο, που αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως πιθανό ήπιο σύνδρομο Apert ή Pfeiffer), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 5 του γονιδίου *EFNB1* (Εικόνα 53A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή p.L240fsX79 (c.717\_718insA), η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση του προϊόντος PCR των εξονίων 4-5 του γονιδίου *EFNB1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *MfeI* (Εικόνα 53B). Η μεταλλαγή p.L240fsX79 (c.717\_718insA) αναφέρεται για πρώτη φορά (νέα μεταλλαγή) και έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν εντοπίστηκε στους γονείς. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 44 έτη και της μητέρας 31 έτη και 6 μήνες.

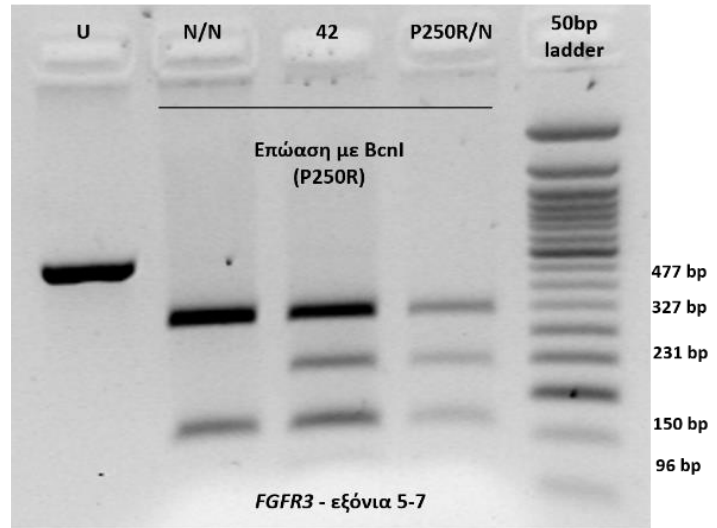


**Εικόνα 53:** **A.** Ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) του εξονίου 5 του γονιδίου *EFNB1* της ασθενούς 40, συγκρινόμενη με τη φυσιολογική αλληλουχία (N/N). **B.** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο *MfeI* του προϊόντος PCR των εξονίων 4-5 του γονιδίου *EFNB1* του πατέρα (40F), της μητέρας (40M) και της ασθενούς 40 για την ανίχνευση της μεταλλαγής L240fsX79. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

## Ασθενής 42

Στον ασθενή 42 (άρρεν άτομο με αρχική κλινική διάγνωση μη συνδρομικής αριστερής πλαγιοκεφαλίας), μετά από επώαση του προϊόντος PCR των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BclI* (Εικόνα 54), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.P250R (c.749C>G) στο εξόνιο 7 του γονιδίου. Δεν είναι γνωστό εάν η μεταλλαγή έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν ήταν εφικτός ο έλεγχος των γονέων, αν και υπάρχει πιθανότητα να κληρονομήθηκε από τη μητέρα στην οποία αναφέρεται παθολογικό σχήμα κεφαλής.

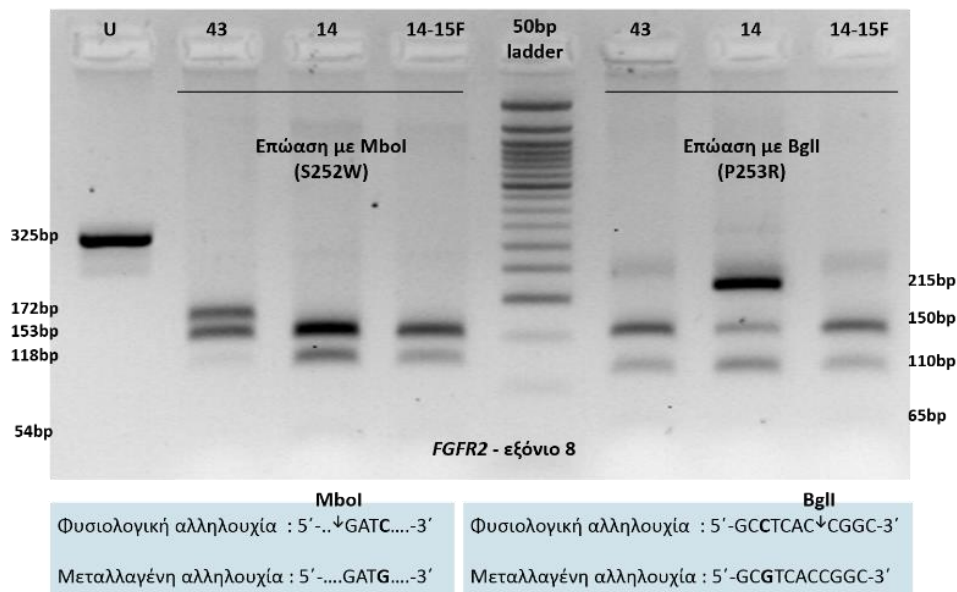
**Εικόνα 54:** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο BclI του προϊόντος PCR των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3* του ασθενούς 42 για την ανίχνευση της μεταλλαγής P250R, καθώς και ενός φυσιολογικού δείγματος ελέγχου (N/N) και ενός ετερόζυγου για τη μεταλλαγή δείγματος ελέγχου (P250R/N). U: ανεπώαστο προϊόν PCR.



Φυσιολογική αλληλουχία : 5'-CCCCG-3'  
 BclI  
 Μεταλλαγμένη αλληλουχία : 5'-CC↓CGG-3'

### Ασθενής 43

Στον ασθενή 43 (άρρεν άτομο με σύνδρομο Apert), μετά από επώαση του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες MboI και BglI προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη των μεταλλαγών p.S252W (c.755C>G) και p.P253R (c.758C>G), αντίστοιχα, ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή S252W (c.755C>G) (Εικόνα 55). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος γονέων, η μεταλλαγή αυτή πιθανότατα έχει προέλθει *de novo*.



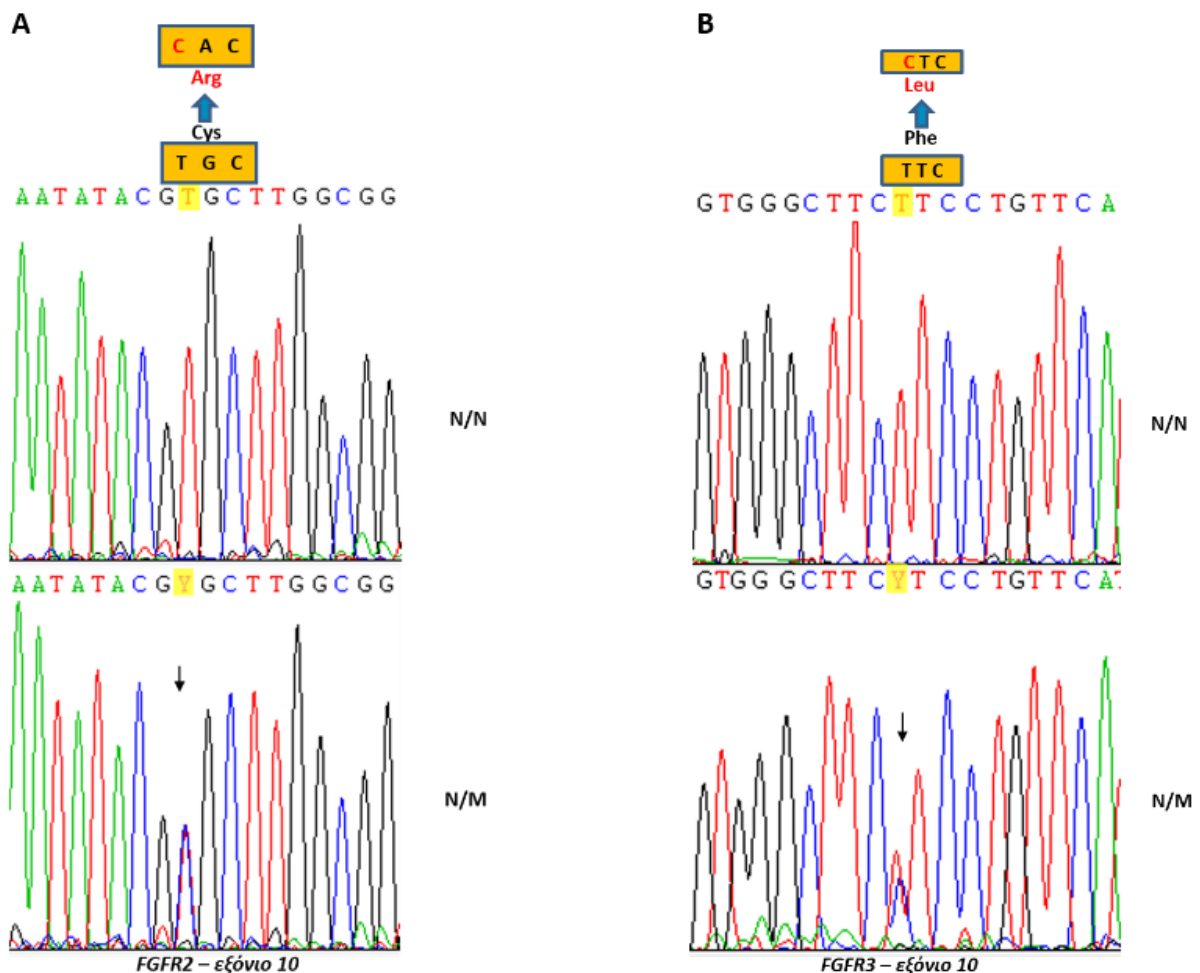
MboI  
 Φυσιολογική αλληλουχία : 5'-...↓GATC....-3'  
 Μεταλλαγμένη αλληλουχία : 5'-.....GATG....-3'

BglI  
 Φυσιολογική αλληλουχία : 5'-GCCTCAC↓CGGC-3'  
 Μεταλλαγμένη αλληλουχία : 5'-GCGTCACCGGC-3'

**Εικόνα 55:** Επώαση του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* του ασθενούς 43 με τα περιοριστικά ένζυμα MboI (αριστερά) και BglI (δεξιά) για την ανίχνευση των μεταλλαγών S252W και P253R, αντίστοιχα, όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη της μεταλλαγής S252W σε ετεροζυγωτία. Συνεπώαστηκαν προϊόντα PCR του πατέρα των ασθενών 14 και 15 (14-15F) ως φυσιολογικό δείγμα ελέγχου και της ασθενούς 14 ως ετερόζυγο δείγμα για τη μεταλλαγή P253R. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

#### Ασθενής 44

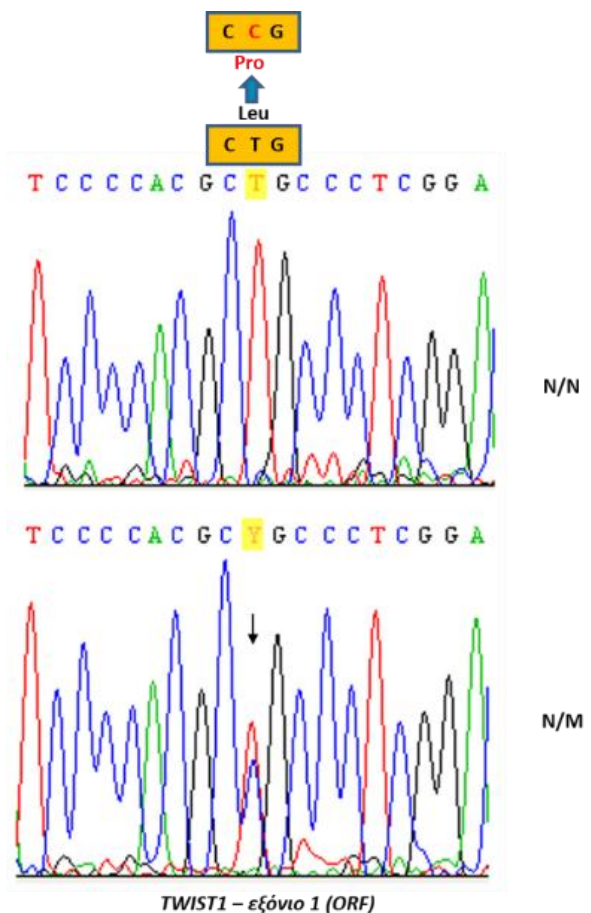
Στην ασθενή 44 (θήλυ άτομο με σύνδρομο Crouzon), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 56A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.C342R (c.1024T>C). Ο έλεγχος του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR3* με ανάλυση αλληλουχίας DNA ανέδειξε την ύπαρξη του πολυμορφισμού p.F384L (c.1150T>C) σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 56B). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος γονέων, η αιτιοπαθογόνος μεταλλαγή p.C342R (c.1024T>C) στο εξόνιο 10 του γονιδίου *FGFR2* πιθανότατα έχει προέλθει *de novo*, εφόσον δεν αναφέρονται κλινικά ευρήματα στους γονείς, ενώ ο πολυμορφισμός p.F384L (c.1150T>C) στο εξόνιο 10 του γονιδίου *FGFR3* είναι μητρικής προέλευσης.



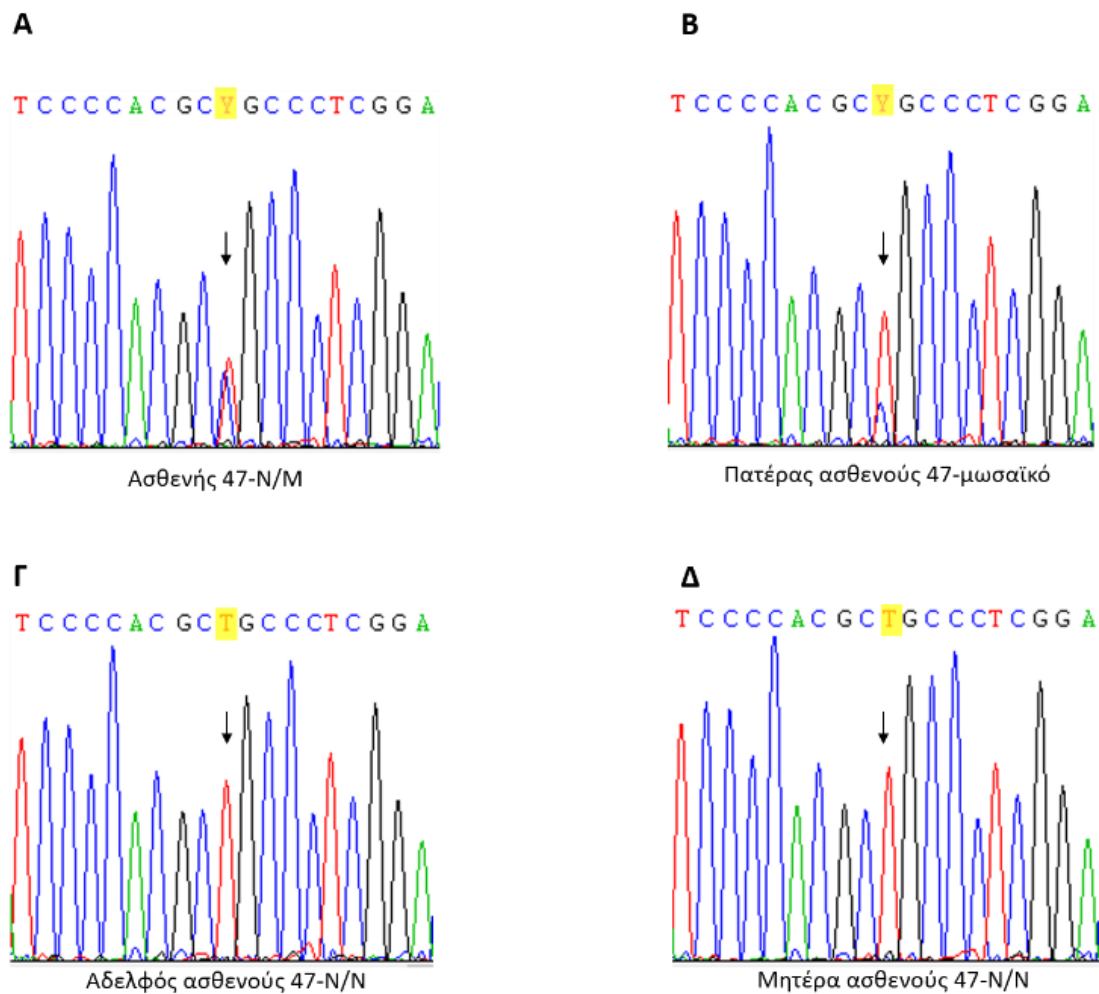
**Εικόνα 56:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR2* ενός φυσιολογικού δείγματος (**A**, επάνω) και της ασθενούς 44 (**A**, κάτω) και του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR3* ενός φυσιολογικού δείγματος (**B**, επάνω) και της ασθενούς 44 (**B**, κάτω).

### Ασθενής 47

Στην ασθενή 47 (θήλυ άτομο με αρχική κλινική διάγνωση πιθανού συνδρόμου Pfeiffer), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 1 (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) του γονιδίου *TWIST1*, εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.L138P (c.413T>C), η οποία αναφέρεται για πρώτη φορά (νέα μεταλλαγή) (Εικόνα 57, 58A). Μετά από έλεγχο των υπολοίπων μελών της οικογένειας, διαπιστώθηκε ότι ο πατέρας, ο οποίος εμφανίζει υποκλινικό φαινότυπο, είναι μωσαϊκό για τη μεταλλαγή (Εικόνα 58B), ενώ ο αδελφός και η μητέρα της ασθενούς είναι φυσιολογικοί (Εικόνα 58Γ και Δ, αντίστοιχα). Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 37 έτη και της μητέρας 35 έτη.



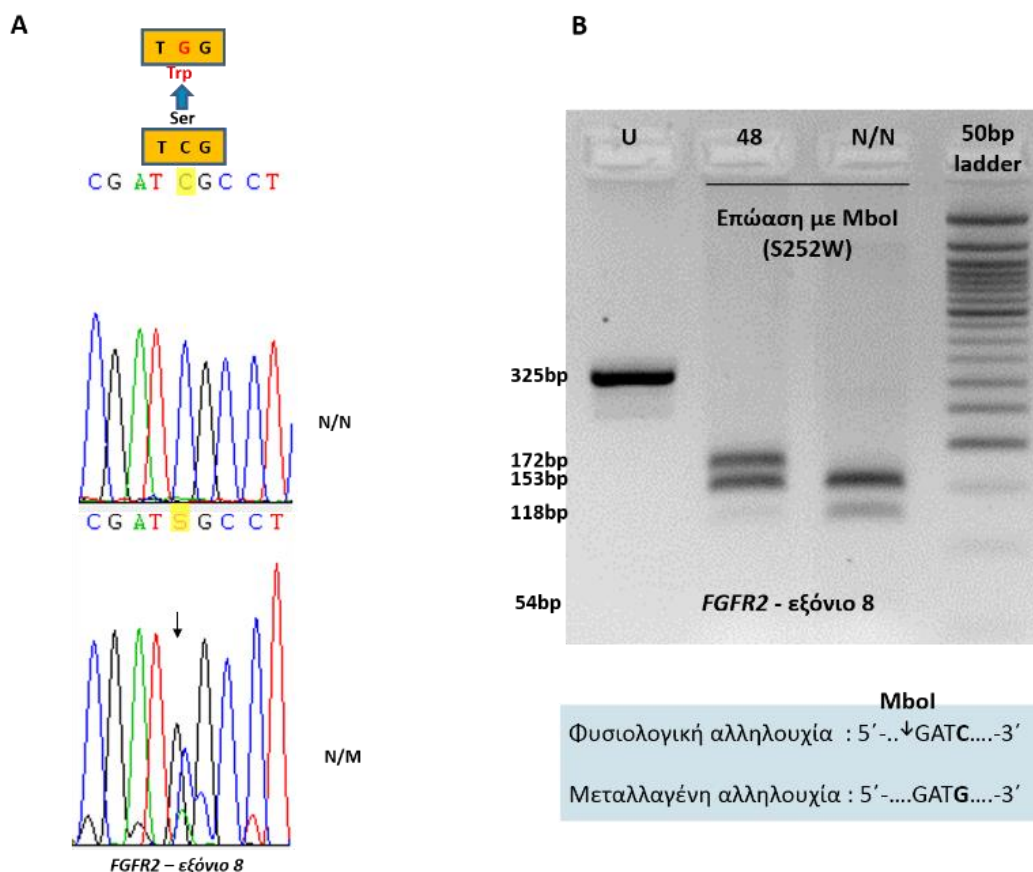
**Εικόνα 57:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 1 του γονιδίου *TWIST1* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 47 (κάτω).



**Εικόνα 58:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 1 του γονιδίου *TWIST1* της ασθενούς 47 (A), του πατέρα (B), του αδελφού (Γ) και της μητέρας της (Δ). Ο πατέρας της ασθενούς είναι μωσαϊκό για τη μεταλλαγή p.L138P (c.413T>C), ενώ ο αδελφός και η μητέρα της είναι φυσιολογικοί (N/N).

### Ασθενής 48

Στην ασθενή 48 (θήλυ άτομο με σύνδρομο Apert), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* (Εικόνα 59A), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή S252W (c.755C>G), η ύπαρξη της οποίας επιβεβαιώθηκε μετά από επώαση του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* με την περιοριστική ενδονουκλεάση MboI (Εικόνα 59B). Αν και δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος γονέων, η μεταλλαγή αυτή πιθανότατα έχει προέλθει *de novo*. Η ασθενής απεβίωσε μετεγχειρητικά.

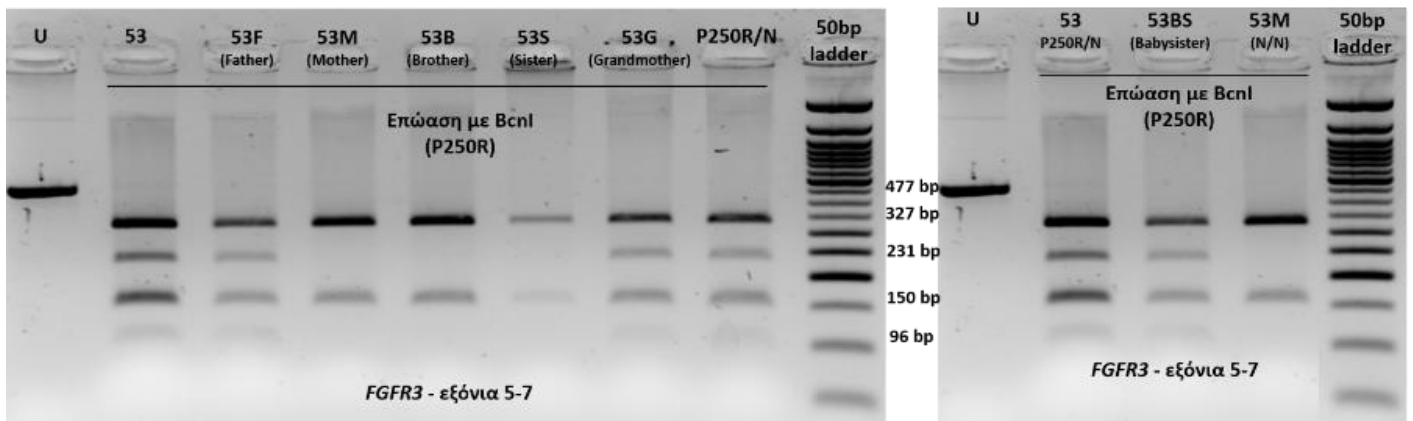


**Εικόνα 59:** **A.** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 48 (κάτω). **B.** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο *Mbol* του προϊόντος PCR του εξονίου 8 του γονιδίου *FGFR2* της ασθενούς 48 και ενός φυσιολογικού δείγματος ελέγχου για την ανίχνευση της μεταλλαγής S252W. U: ανεπώαστο προϊόν PCR.

### Ασθενής 53

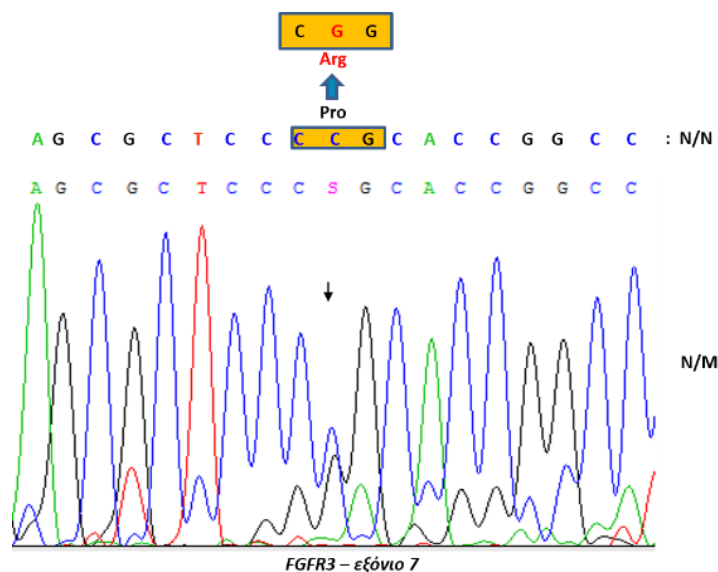
Στον ασθενή 53 (άρρεν άτομο με αρχική κλινική διάγνωση πιθανά συνδρομικής δεξιάς πλαγιοκεφαλίας), μετά από επώαση του προϊόντος PCR των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *BcnI* (Εικόνα 60), εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.P250R (c.749C>G) στο εξόνιο 7 του γονιδίου. Ταυτόχρονα ελέγχθηκαν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας του ασθενούς (Εικόνα 60). Από τον έλεγχο αυτό διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγή προήλθε από τον πατέρα του ασθενούς, ο οποίος την είχε κληρονομήσει από τη μητέρα του. Η πατρική προέλευση της μεταλλαγής ήταν αναμενόμενη, εφόσον ο πατέρας εμφάνιζε έντονη βραχυκεφαλία λόγω αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής. Τη μεταλλαγή έφερε, επίσης, η μικρότερη αδελφή του ασθενούς (4ο παιδί, το οποίο γεννήθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας), η οποία εμφανίζει δεξιά πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής. Τα

υπόλοιπα 3 μέλη της οικογένειας (η μητέρα, ο μεγαλύτερος αδελφός και η μεγαλύτερη αδελφή του ασθενούς) είναι φυσιολογικά. Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης της μεταλλαγής πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 7 του γονιδίου *FGFR3* του ασθενούς (Εικόνα 61). Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 28 έτη και της μητέρας 23 έτη.



Φυσιολογική αλληλουχία : 5'-CCCCG-3'  
 Bcni  
 Μεταλλαγμένη αλληλουχία : 5'-CC<sup>+</sup>CGG-3'

**Εικόνα 60:** Επώαση με περιοριστικό ένζυμο Bcni του προϊόντος PCR των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3* του ασθενούς 53 καθώς και του πατέρα του (53F), της μητέρας του (53M), του αδελφού του (B), της μεγαλύτερης και της μικρότερης αδελφής του (S και BS, αντίστοιχα), της πατρικής γιαγιάς του (G) και ενός ετερόζυγου για τη μεταλλαγή δείγματος ελέγχου (P250R/N) για την ανίχνευση της μεταλλαγής P250R. U: ανεπώαστο προϊόν PCR

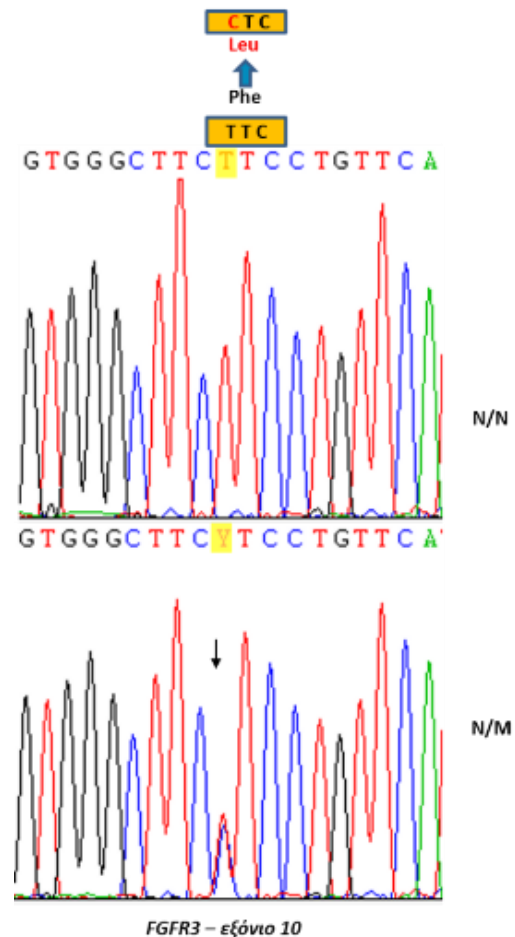


**Εικόνα 61:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 7 του γονιδίου *FGFR3* του ασθενούς 53, συγκρινόμενη με τη φυσιολογική αλληλουχία (N/N).



## Ασθενής 2

Στην ασθενή 2 (θήλυ άτομο με συνδρομική τριγωνοκεφαλία), μετά από ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR3* εντοπίστηκε ο πολυμορφισμός p.F384L (c.1150T>C) στο γονίδιο *FGFR3* (εξόνιο 10) (Εικόνα 62), ο οποίος, μετά από έλεγχο των γονέων, διαπιστώθηκε ότι είχε κληρονομηθεί από τον πατέρα. Ο μοριακός έλεγχος για την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του γονιδίου *FGFR2*, στο εξόνιο 1 του *TWIST1*, της μεταλλαγής Pro250Arg του γονιδίου *FGFR3* καθώς και μικροελλείψεων/μικροδιπλασιασμών στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *EFNB1* και *RUNX2* ήταν αρνητικός. Η ηλικία του πατέρα κατά τη σύλληψη ήταν 36 έτη και της μητέρας 26 έτη.



**Εικόνα 62:** Ανάλυση αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR3* ενός φυσιολογικού δείγματος (επάνω) και της ασθενούς 2.

## 4A.2 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Συνολικά, σε 14 από τους 47 ασθενείς επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση μετά από έλεγχο, ανάλογα με την περίπτωση, για την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του γονιδίου *FGFR2*, στο εξόνιο 1 του *TWIST1*, των μεταλλαγών P250R και A391E του γονιδίου *FGFR3*, της μεταλλαγής P252R του *FGFR1* καθώς και μικροελλείψεων/μικροδιπλασιασμών στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *EFNB1* και *RUNX2* (Πίνακες 9 και 10).

### **Συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης**

Συνολικά επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε 13 από τις 17 συνδρομικές περιπτώσεις που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Σε 4 από τους 5 ασθενείς με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Crouzon επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση, όπου εντοπίστηκαν γνωστές μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR2* (ασθενής 10: p.C342Y-c.1025G>A -εξόνιο 10, ασθενής 33: 1084+3A>G -ιντρόνιο 10, ασθενής 34: p.S354C-c.1061C>G -εξόνιο 10 και ασθενής 44: p.C342R-c.1024T>C-εξόνιο 10).

Και στους 4 ασθενείς με σύνδρομο Apert επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση, όπου εντοπίστηκαν οι 2 γνωστές μεταλλαγές στο εξόνιο 8 του γονιδίου *FGFR2* (ασθενείς 14 και 15 (δίδυμα): p.P253R-c.758C>G, ασθενείς 43 και 48: p.S252W-c.755C>G).

Στον ασθενή 18 με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Muenke ή μη συνδρομικής συνοστέωσης στεφανιαίας ραφής διαπιστώθηκε ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1*, υπεύθυνο για το σύνδρομο Saethre-Chotzen.

Και στις 2 ασθενείς (22 και 40) με κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS) επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση, όπου εντοπίστηκαν 2 νέες μεταλλαγές στο γονίδιο *EFNB1* (μεταλλαγές p.E125K-c.373G>A και p.L240fsX79-c.717\_718insA, αντίστοιχα).

Σε μια ασθενή (47) με πιθανό σύνδρομο Pfeiffer εντοπίστηκε η νέα μεταλλαγή p.L138P - c.413T>C (εξόνιο 1) στο γονίδιο *TWIST1*, υπεύθυνη για το σύνδρομο Saethre-Chotzen.

Σε έναν (53) από τους 2 ασθενείς με πιθανή συνδρομική πλαγιοκεφαλία εντοπίστηκε η μεταλλαγή p.P250R (c.749C>G) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *FGFR3*, η οποία προκαλεί το σύνδρομο Muenke.

Στη μια ασθενή (2) με συνδρομική τριγωνοκεφαλία εντοπίστηκε μόνο ο πατρικής προέλευσης πολυμορφισμός p.F384L (c.1150T>C) στο γονίδιο *FGFR3* (εξόνιο 10), ο οποίος

δεν θεωρείται αιτιοπαθογόνος και επομένως δεν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στα γονίδια που μελετήθηκαν.

Σε μια ασθενή (13) με αρχική κλινική διάγνωση πιθανού συνδρόμου Crouzon ή Saethre-Chotzen δεν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στα υπό μελέτη γονίδια.

#### ***Μη συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης***

Συνολικά επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε 1 από τις 29 περιπτώσεις με αρχική κλινική διάγνωση μη συνδρομικής κρανιοσυνοστέωσης που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Σε έναν (42) από τους 8 ασθενείς με αρχική κλινική διάγνωση μη συνδρομικής πλαγιοκεφαλίας εντοπίστηκε η μεταλλαγή p.P250R (c.749C>G) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *FGFR3*, υπεύθυνη για το σύνδρομο Muenke.

#### ***Άλλες περιπτώσεις κρανιοσκελετικών ανωμαλιών***

Στην ασθενή 6 με μέση κρανιοπροσωπική σχιστία δεν βρέθηκε καμία μεταλλαγή.

Πίνακας 9: Συνολικά αποτελέσματα μοριακού ελέγχου ασθενών

ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	Γενετικοί τόποι - μεταλλάξεις													MLPA P080-B1
		FGFR1	FGFR2				FGFR3		TWIST1	EFNB1					
		Μεταλλαγή P252R (εξόνιο7)	εξόνιο 8	εξόνιο 10	εξόνιο 14	εξόνιο 16	Μεταλλαγή P250R (εξόνιο7)	εξόνιο 10 (μεταλλαγή A391E) *	εξόνιο 1 (ORF)	εξόνιο 1	εξόνιο 2	εξόνιο 3	εξόνιο 4	εξόνιο 5	
1	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
2	ΘΗΛΥ		✓	✓	✓	✓	✓	F384L πολυμορφισμός πατρικής προέλευσης	✓						✓
3	ΑΡΡΕΝ														
4	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓
5	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
6	ΘΗΛΥ														✓
7	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
8	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
10	ΑΡΡΕΝ		✓	C342Y											
11	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
12	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
13	ΘΗΛΥ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
14	ΘΗΛΥ		P253R	✓	✓										
15	ΘΗΛΥ		P253R												
16	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
17	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
18	ΑΡΡΕΝ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				TWIST 1 ετερόζυγη έλλειψη
19	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓
20	ΑΡΡΕΝ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓
22	ΘΗΛΥ						✓	✓			E125K				
23	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
24	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
25	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
26	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						✓
27	ΑΡΡΕΝ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(v)	✓						✓
29	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
31	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
33	ΑΡΡΕΝ		✓	1084+3 A>G	✓		✓								
34	ΘΗΛΥ			S354C			✓								
35	ΑΡΡΕΝ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(v)	✓						✓
36	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(v)	✓						
37	ΘΗΛΥ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
38	ΘΗΛΥ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(v)	✓		✓				✓
39	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
40	ΘΗΛΥ						✓			✓	✓	✓	✓	L240fsX79	✓

ΑΥΞΩΝ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΦΥΛΟ	Γενετικοί τόποι - μεταλλαγές													MLPA P080-B1
		<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>				<i>FGFR3</i>		<i>TWIST1</i>	<i>EFNB1</i>					
		Μεταλλαγή P252R (εξόνιο7)	εξόνιο 8	εξόνιο 10	εξόνιο 14	εξόνιο 16	Μεταλλαγή P250R (εξόνιο7)	εξόνιο 10 (μεταλλαγή A391E) *	εξόνιο 1 (ORF)	εξόνιο 1	εξόνιο 2	εξόνιο 3	εξόνιο 4	εξόνιο 5	
41	ΑΡΡΕΝ	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(✓)	✓						
42	ΑΡΡΕΝ						P250R								
43	ΑΡΡΕΝ		S252W												
44	ΘΗΛΥ	✓	✓	C342R	✓	✓	✓	F384L πολυμορφισμός μητρικής προέλευσης							✓
45	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓		✓						
46	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓		✓						✓
47	ΘΗΛΥ						✓		L138P						
48	ΘΗΛΥ		S252W												
49	ΑΡΡΕΝ		✓	✓	✓	✓	✓		✓						
51	ΑΡΡΕΝ						✓								
53	ΑΡΡΕΝ						P250R								
53F	ΑΡΡΕΝ ΠΑΤΕΡΑΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ 53						P250R								
53G	ΘΗΛΥ ΠΑΤΡΙΚΗ ΠΑΠΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ 53						P250R								
53BS	ΘΗΛΥ ΜΙΚΡΗ ΑΔΕΛΦΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ 53						P250R								
54	ΑΡΡΕΝ			✓	✓	✓	✓		✓						✓
55	ΑΡΡΕΝ			✓	✓	✓	✓		✓						

\*: Ο έλεγχος του εξονίου 10 του γονιδίου *FGFR3* έγινε είτε με ανάλυση αλληλουχίας DNA του αντίστοιχου τμήματος, είτε στοχευμένα για τη μεταλλαγή A391E (αποτελέσματα εντός παρενθέσεων)

✓ : έλεγχος χωρίς ευρήματα / **Κόκκινο χρώμα**: ευρήματα (γνωστές μεταλλαγές) / **Ροζ χρώμα**: ευρήματα (νέες μεταλλαγές)

**Πίνακας 10:** Αρχική κλινική εκτίμηση και αποτελέσματα ασθενών με ευρήματα από το μοριακό έλεγχο

ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΣΥΝΟΣΤΕΩΜΕΝΗ ΡΑΦΗ	ΑΡΧΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	ΤΕΛΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΗ ΣΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ
2 θήλυ	Μετωπιαία	Συνδρομική συνοστέωση μετωπιαίας ραφής	p.F384L-c.1150T>C <i>FGFR3</i> (εξόνιο 10) (πολυμορφισμός πατρικής προέλευσης)	
10 άρρεν	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα, μετωπιαία και πρόσθιο τμήμα οβελιαίας	Σύνδρομο Crouzon	p.C342Y-c.1025G>A <i>FGFR2</i> (εξόνιο 10)	Σύνδρομο Crouzon
14 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα;	Σύνδρομο Apert	p.P253R-c.758C>G <i>FGFR2</i> (εξόνιο 8)	Σύνδρομο Apert
15 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα;	Σύνδρομο Apert	p.P253R-c.758C>G <i>FGFR2</i> (εξόνιο 8)	Σύνδρομο Apert
18 άρρεν	Δεξιά στεφαναία	Σύνδρομο Muenke ή μη συνδρομική συνοστέωση στεφαναίας ραφής	Ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου <i>TWIST 1</i>	Σύνδρομο Saethre-Chotzen
22 θήλυ	Δεξιά στεφαναία	Σύνδρομο Saethre-Chotzen ή μη συνδρομική συνοστέωση στεφαναίας ραφής (αρχικά) / Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο(CFNS)	p.E125K-c.373G>A <i>EFNB1</i> (εξόνιο 2) (νέα μεταλλαγή)	Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS)
33 άρρεν	Δεν υπάρχει πληροφορία	Σύνδρομο Crouzon	1084+3 A>G <i>FGFR2</i> (ιντρόνιο 10)	Σύνδρομο Crouzon
34 θήλυ	Πολλαπλή συνοστέωση	Σύνδρομο Crouzon	p.S354C-c.1061C>G <i>FGFR2</i> (εξόνιο 10)	Σύνδρομο Crouzon
40 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα	Πιθανό ήπιο σύνδρομο Apert ή Pfeiffer (αρχικά) / Κρανιομετωπορινικό (CFNS)	p. L240fsX79-c.717_718 ins.A <i>EFNB1</i> (εξόνιο 5) (νέα μεταλλαγή)	Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS)
42 άρρεν	Αριστερή στεφαναία	Μη συνδρομική συνοστέωση στεφαναίας ραφής	p.P250R- c.749C>G <i>FGFR3</i> (εξόνιο 7)	Σύνδρομο Muenke
43 άρρεν	Δεν υπάρχει πληροφορία	Σύνδρομο Apert	p.S252W-c.755C>G <i>FGFR2</i> (εξόνιο 8)	Σύνδρομο Apert
44 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα	Σύνδρομο Crouzon	p.C342R-c.1024T>C <i>FGFR2</i> (εξόνιο 10) p.F384L-c.1150T>C <i>FGFR3</i> (εξόνιο 10) (πολυμορφισμός μητρικής προέλευσης)	Σύνδρομο Crouzon
47 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα	Πιθανό σύνδρομο Pfeiffer	p.L138P-c.413T>C <i>TWIST1</i> (εξόνιο 1) (νέα μεταλλαγή)	Σύνδρομο Saethre-Chotzen
48 θήλυ	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα	Σύνδρομο Apert	p.S252W-c.755C>G <i>FGFR2</i> (εξόνιο 8)	Σύνδρομο Apert
53 άρρεν	Δεξιά στεφαναία, πιθανά τμήμα της αριστερής στεφαναίας, κλειστή πρόσθια πηγή	Πιθανά συνδρομική συνοστέωση στεφαναίας ραφής	p.P250R- c.749C>G <i>FGFR3</i> (εξόνιο 7)	Σύνδρομο Muenke
53F πατέρας ασθενούς 53	Στεφαναία αμφοτερόπλευρα	Σύνδρομο Muenke διάγνωση λόγω οικογενειακού ιστορικού	p.P250R- c.749C>G <i>FGFR3</i> (εξόνιο 7)	Σύνδρομο Muenke
53G πατρική γιαγιά ασθενούς 53	Δεξιά στεφαναία;		p.P250R- c.749C>G <i>FGFR3</i> (εξόνιο 7)	Σύνδρομο Muenke
53BS μικρή αδελφή ασθενούς 53	Δεξιά στεφαναία	Σύνδρομο Muenke διάγνωση λόγω οικογενειακού ιστορικού	p.P250R- c.749C>G <i>FGFR3</i> (εξόνιο 7)	Σύνδρομο Muenke

**Κόκκινο χρώμα:** γνωστές μεταλλαγές / **Ροζ χρώμα:** νέες μεταλλαγές / **Μπλε χρώμα:** πολυμορφισμός χωρίς κλινική σημασία  
**Μωβ χρώμα:** Μοριακή διάγνωση που δε συμφωνεί με την αρχική κλινική εκτίμηση

## **4B. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΚΑΙ *GAPDH* (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ**

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να διερευνηθεί η έκφραση δυο βασικών μεταγραφικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι της οστεοβλαστογένεσης, του *TWIST1* και του *RUNX2*, καθώς επίσης και του *COL1A1*, ως δείκτη διαφοροποίησης των οστεοβλαστών σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών από ασθενείς με κρανιοσυνοστέωση και φυσιολογικά δείγματα ελέγχου. Οι ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα αντιπροσωπεύουν 3 βασικές κατηγορίες δειγμάτων, ώστε να υπάρχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη κάλυψη διαφορετικών περιπτώσεων κρανιοσυνοστέωσης στα πειράματα προσδιορισμού της έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων: ασθενείς με μεταλλαγές στον *FGFR2* και μάλιστα με δυο διαφορετικά σύνδρομα, ασθενή με μεταλλαγή στον *TWIST1* και ασθενείς με μη συνδρομική συνοστέωση που δε φέρουν μεταλλαγές στα βασικότερα γονίδια που σχετίζονται με κρανιοσυνοστέωση. Εκτός από το φυσιολογικό δείγμα, υπάρχει ένα επιπλέον δείγμα ελέγχου από έναν ασθενή με κρανιακή ανωμαλία, χωρίς συνοστέωση. Συγκεκριμένα, τμήματα δέρματος μηρού ή/και κρανίου για την καλλιέργεια ινοβλαστών ελήφθησαν από τους ασθενείς 10, 35, 44, 45, 48, 51, 52 και C1 (φυσιολογικό δείγμα). Οι ασθενείς 10 και 44 είναι άτομα με σύνδρομο Crouzon, που φέρουν αντίστοιχα, τη μεταλλαγή C342Y και C342R στο γονίδιο *FGFR2*. Η ασθενής 44 φέρει επιπλέον τον πολυμορφισμό F384L στο *FGFR3*. Η ασθενής 48 με σύνδρομο Apert, η οποία απεβίωσε μετεγχειρητικά, έφερε τη μεταλλαγή S252W στο *FGFR2*. Η ασθενής 52 με σύνδρομο Saethre-Chotzen φέρει τη μεταλλαγή Q122X στο *TWIST1*. Οι ασθενείς 35 και 45 παρουσιάζουν μη συνδρομική μορφή συνοστέωσης (δεξιά πλαγιοκεφαλία και σκαφοκεφαλία, αντίστοιχα). Ο ασθενής 51 εμφανίζει πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως και χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον δείγμα ελέγχου μαζί με το φυσιολογικό δείγμα (C1) από θήλυ άτομο (Πίνακας 11). Η επιλογή της διερεύνησης της έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων στο μοντέλο των δερματικών ινοβλαστών βασίστηκε αφενός στον αναπτυξιακό συσχετισμό τους με τους οστεοβλάστες, αντιπροσωπεύοντας έτσι έναν σχετικό με αυτούς κυτταρικό τύπο, και αφετέρου στην ευκολία

να καλλιεργηθούν άμεσα, λαμβάνοντας μια μικρή βιοψία δέρματος κρανίου ή μηρού κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, σε αντίθεση με τη δυσκολία χειρισμών των ιστών από ραφές και των οστεοβλαστών.

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* και *GAPDH* (γονίδιο αναφοράς) μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με κρανιοσυνοστέωση απομονώθηκε ολικό RNA από τις καλλιέργειες των δερματικών ινοβλαστών. Με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής το RNA μετατράπηκε σε cDNA, το οποίο προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη χρήση της PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR).

**Πίνακας 11:** Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* και *GAPDH* (γονίδιο αναφοράς)

A/α δείγματος cDNA	RNA από καλλιέργεια ινοβλαστών από δέρμα :	A/α ασθενούς	Κλινική διάγνωση	Ηλικία ασθενούς	Συνοστεωμένη ραφή	Μοριακή διάγνωση
10R2e	κρανίου	10	Σύνδρομο Crouzon	11 ετών	στεφανιαία αμφοτερόπλευρα, μετωπιαία και πρόσθιο τμήμα οβελιαίας	C342Y ( <i>FGFR2</i> )
35R2d	κρανίου	35	Πλαγιοκεφαλία	2 ετών	δεξιά στεφανιαία	
44R1c	κρανίου	44	Σύνδρομο Crouzon	6ετών	στεφανιαία αμφοτερόπλευρα	C342R ( <i>FGFR2</i> )
44R2c	μηρού					F384L ( <i>FGFR3</i> ) πολυμορφισμός
45R2c	κρανίου	45	Σκαφοκεφαλία	9 μηνών	οβελιαία	
48R1d	κρανίου	48	Σύνδρομο Apert	11 μηνών	στεφανιαία αμφοτερόπλευρα	S252W ( <i>FGFR2</i> )
51R1c	κρανίου	51	Πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως	10 μηνών	καμία	
52R1b	κρανίου	52	Σύνδρομο Saethre-Chotzen	17 ετών	στεφανιαία αμφοτερόπλευρα	Q122X ( <i>TWIST1</i> )
C1R2 δείγμα ελέγχου	μηρού	C1	Φυσιολογικό θήλυ	14 μηνών	καμία	

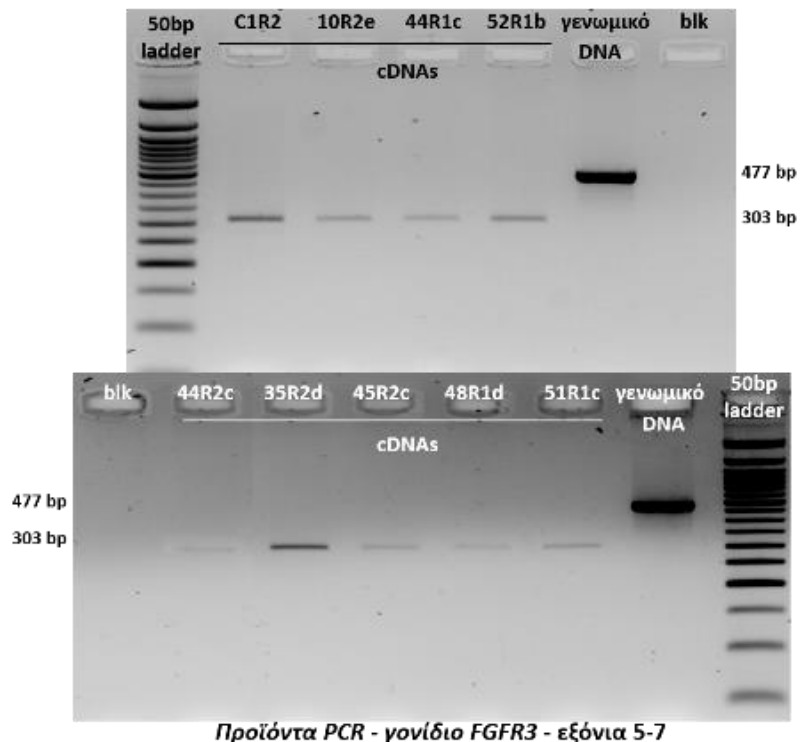


## 4B.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA

Σε όλες τις περιπτώσεις απομονώθηκε RNA από ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν από δέρμα κρανίου, εκτός από το δείγμα 44, από το οποίο καλλιεργήθηκε επιπλέον και δέρμα μηρού, και το δείγμα C1, από το οποίο καλλιεργήθηκε μόνο δέρμα μηρού (Πίνακας 11). Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το RNA που απομονώθηκε από την ανακαλλιέργεια των ινοβλαστών.

Για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης καθώς και φωτομέτρηση. Μετά την επεξεργασία του με την DNase I για την απομάκρυνση του γενωμικού DNA, το RNA μετατράπηκε σε cDNA με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης καθώς και της απουσίας γενωμικού DNA, το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR για τον πολλαπλασιασμό των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3*. Το προϊόν PCR του γενωμικού DNA είναι 477bp, ενώ του cDNA 303bp, εφόσον απουσιάζουν τα ιντρόνια 5 και 6 (Εικόνα 63).

**Εικόνα 63:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR των εξονίων 5-7 του γονιδίου *FGFR3* χρησιμοποιώντας ως μήτρα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης cDNA των επιθυμητών δειγμάτων καθώς και γενωμικό DNA, ως δείγμα ελέγχου.



Προϊόντα PCR - γονίδιο *FGFR3* - εξόνια 5-7

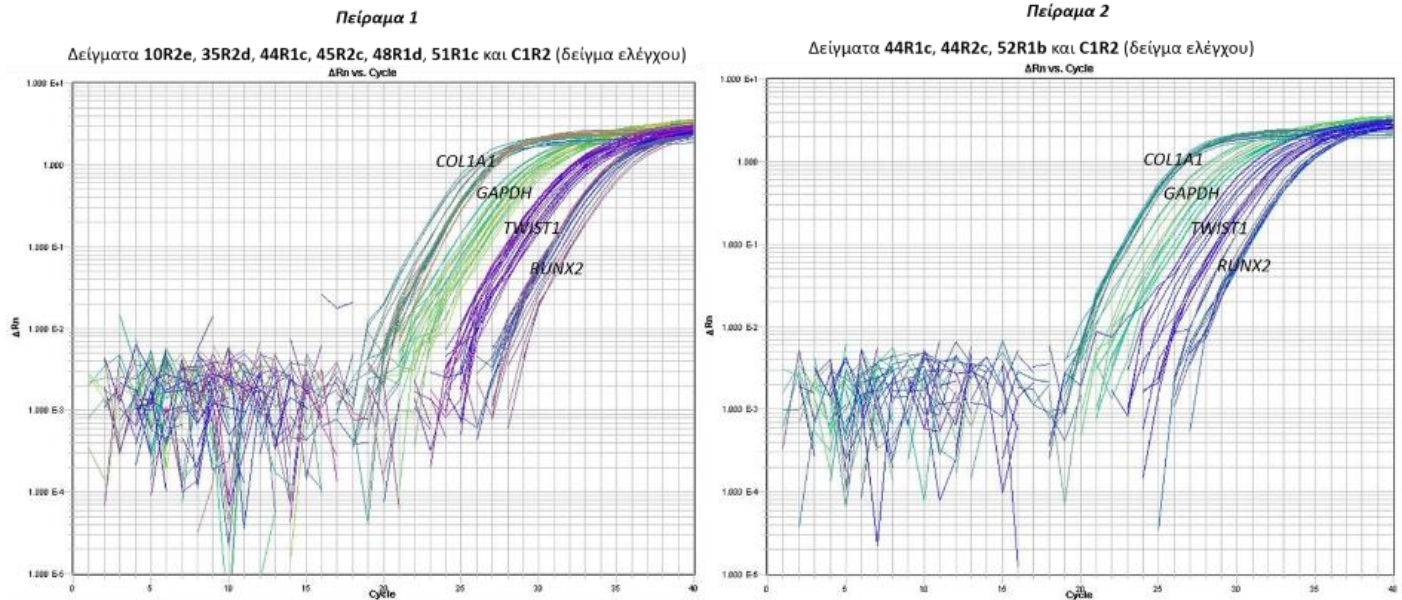
## 4B.2 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΚΑΙ *GAPDH* (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ

Στους καλλιεργημένους δερματικούς ινοβλάστες από δυο ασθενείς με σύνδρομο Crouzon, που έφεραν, αντίστοιχα, τη μεταλλαγή C342Y στο γονίδιο *FGFR2* ή τη μεταλλαγή C342R στο *FGFR2* και τον πολυμορφισμό F384L στο *FGFR3*, μια ασθενή με σύνδρομο Apert που έφερε τη μεταλλαγή S252W στο *FGFR2*, μια ασθενή με σύνδρομο Saethre-Chotzen που έφερε τη μεταλλαγή Q122X στο *TWIST1*, δυο ασθενείς με μη συνδρομική μορφή συνοστέωσης (δεξιά πλαγιοκεφαλία και σκαφοκεφαλία, αντίστοιχα), οι οποίοι δε φέρουν μεταλλαγές στο εξόνιο 7 του γονιδίου *FGFR1*, στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του *FGFR2*, στα εξόνια 7 και 10 του *FGFR3*, στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (εξόνιο 1) του *TWIST1* και σε όλα τα εξόνια (5) του *EFNB1* που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία αλλά ούτε και μικροελλείψεις/μικροδιπλασιασμούς στα παραπάνω γονίδια, σε έναν ασθενή με πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως και σε ένα φυσιολογικό θήλυ άτομο, που δεν έχουν κρανιοσυνοστέωση, διαπιστώθηκε έκφραση των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* και *GAPDH* (γονίδιο αναφοράς) (εικόνες 64, 65). Μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εμφάνιζε το γονίδιο *COL1A1* με μέσο όρο Ct των δειγμάτων που εξετάστηκαν 24,643, ακολουθούμενο από το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* με μέσο όρο Ct=26,029, το *TWIST1* με μέσο όρο Ct=30,415 και το *RUNX2* με μέσο όρο Ct=32,923.

Τιμές Cts

Πείραμα 1						Πείραμα 2					
#	Status	Sample	Detector	Task	Avg Ct	#	Status	Sample	Detector	Task	Avg Ct
1	✓	10R2e	FAM COL1A1	Target	24.883	1	✓	44R1c	FAM COL1A1	Target	24.644
2	✓	35R2d	FAM COL1A1	Target	23.608	2	✓	44R2c	FAM COL1A1	Target	24.478
3	✓	44R1c	FAM COL1A1	Target	24.211	3	✓	52R1b	FAM COL1A1	Target	24.608
4	✓	45R2c	FAM COL1A1	Target	24.888	4	✓	C1R2	FAM COL1A1	Target	24.932
5	✓	48R1d	FAM COL1A1	Target	24.725	5	✓	44R1c	FAM RUNX2	Target	32.824
6	✓	51R1c	FAM COL1A1	Target	25.200	6	✓	44R2c	FAM RUNX2	Target	32.798
7	✓	52R1b	FAM COL1A1	Target		7	✓	52R1b	FAM RUNX2	Target	31.699
8	✓	C1R2	FAM COL1A1	Target	24.892	8	✓	C1R2	FAM RUNX2	Target	32.592
9	✓	10R2e	FAM RUNX2	Target	33.094	9	✓	44R1c	FAM TWIST1	Target	29.768
10	✓	35R2d	FAM RUNX2	Target	32.875	10	✓	44R2c	FAM TWIST1	Target	30.762
11	✓	44R1c	FAM RUNX2	Target	32.929	11	✓	52R1b	FAM TWIST1	Target	29.038
12	✓	45R2c	FAM RUNX2	Target	33.645	12	✓	C1R2	FAM TWIST1	Target	30.785
13	✓	48R1d	FAM RUNX2	Target	34.113						
14	✓	51R1c	FAM RUNX2	Target	32.749						
15	✓	52R1b	FAM RUNX2	Target							
16	✓	C1R2	FAM RUNX2	Target	32.833						
17	✓	10R2e	FAM TWIST1	Target	30.069						
18	✓	35R2d	FAM TWIST1	Target	30.529						
19	✓	44R1c	FAM TWIST1	Target	30.041						
20	✓	45R2c	FAM TWIST1	Target	30.921						
21	✓	48R1d	FAM TWIST1	Target	31.275						
22	✓	51R1c	FAM TWIST1	Target	30.119						
23	✓	52R1b	FAM TWIST1	Target							
24	✓	C1R2	FAM TWIST1	Target	31.262						

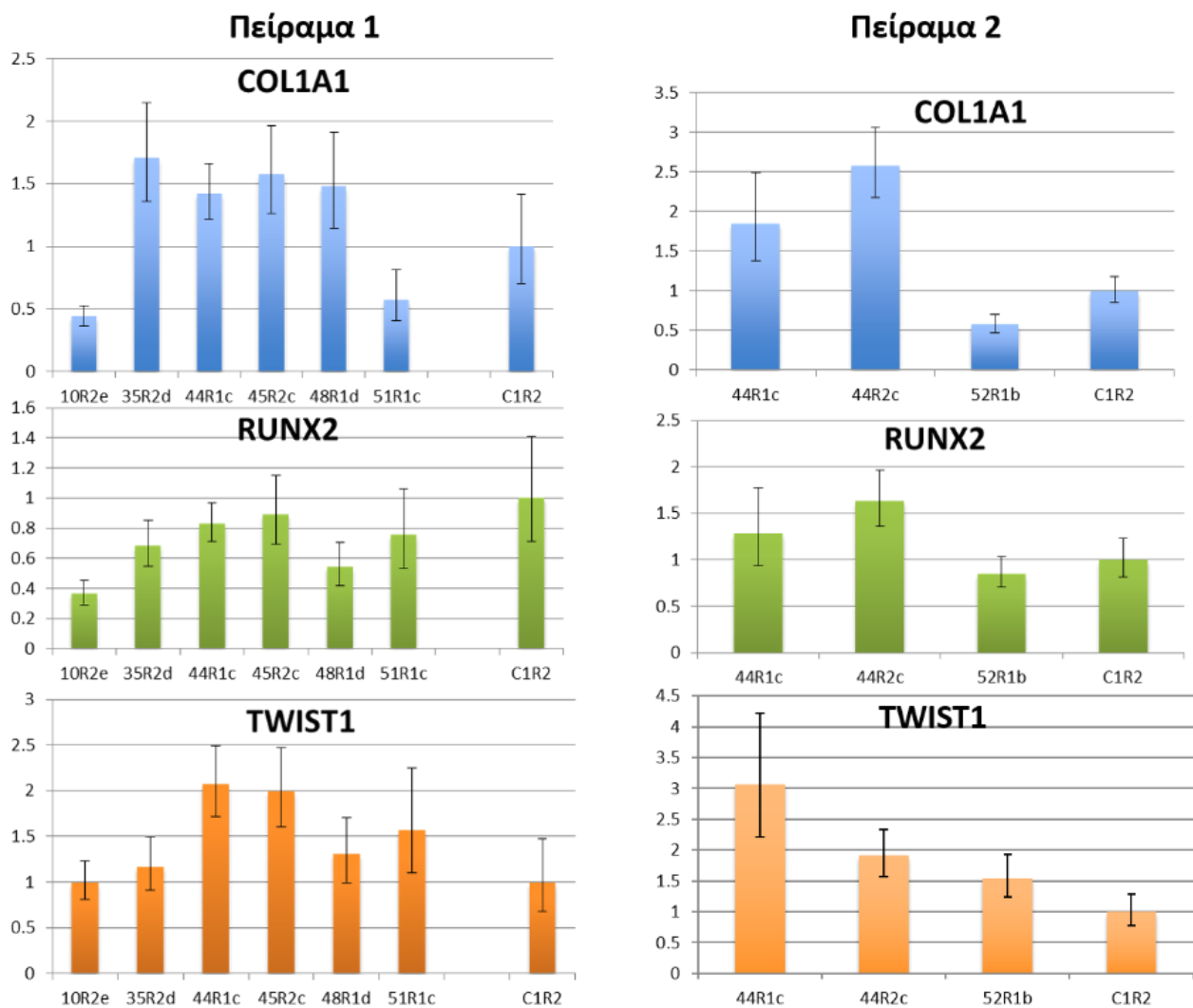
**Εικόνα 64:** Οι τιμές Cts από τα δυο πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, για κάθε ένα από τα δείγματα, όπως εμφανίζονται από το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων RQmanager.



**Εικόνα 65:** Καμπύλες έκφρασης των γονιδίων όλων των δειγμάτων από τα δυο πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, όπως εμφανίζονται από το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων RQmanager.

#### 4B.3 ΣΧΕΤΙΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ (RELATIVE QUANTIFICATION) ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ Ή ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ

Η σχετική έκφραση των προς εξέταση γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* προσδιορίστηκε με τη μέθοδο  $\Delta\Delta C_t$ , μετά από υπολογισμούς με τη βοήθεια προγράμματος Microsoft Excel 2013 (Εικόνα 66) καθώς και αυτόματα με τη χρήση ειδικού λογισμικού RQ Manager 1.2.1 (ABI) (Εικόνα 67). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων διαπιστώνονται διαφορές στα επίπεδα έκφρασης κάποιων από αυτά τόσο στους ασθενείς με συνδρομική όσο και μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση (εικόνα 68).

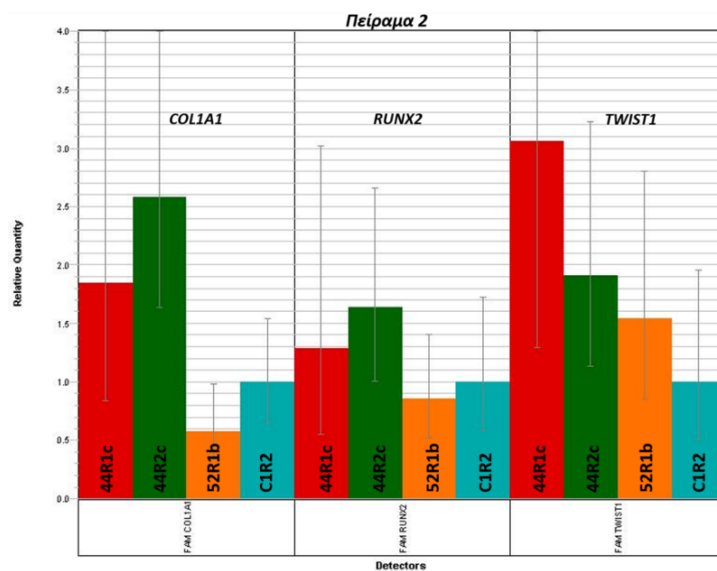
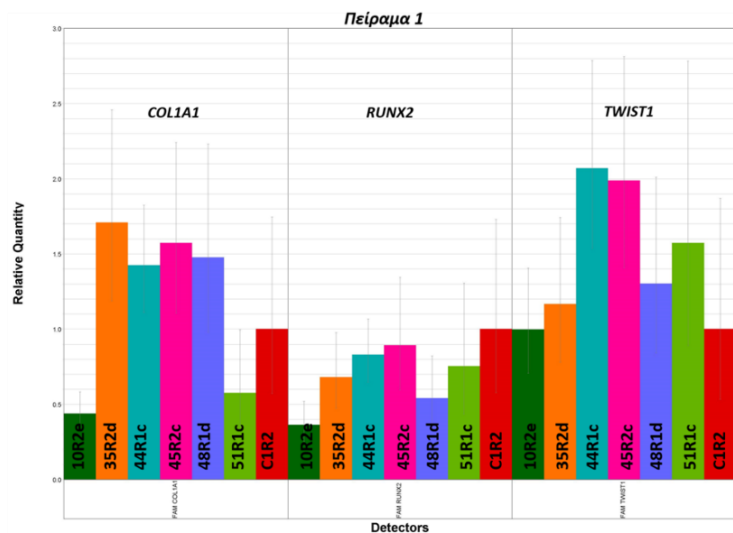


**Εικόνα 66:** Η σχετική έκφραση των προς εξέταση γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* για κάθε ένα από τα δείγματα συγκρινόμενη με αυτή του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου (C1R2), όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο  $\Delta\Delta C_t$ , μετά από υπολογισμούς με τη βοήθεια προγράμματος Microsoft Excel 2013.

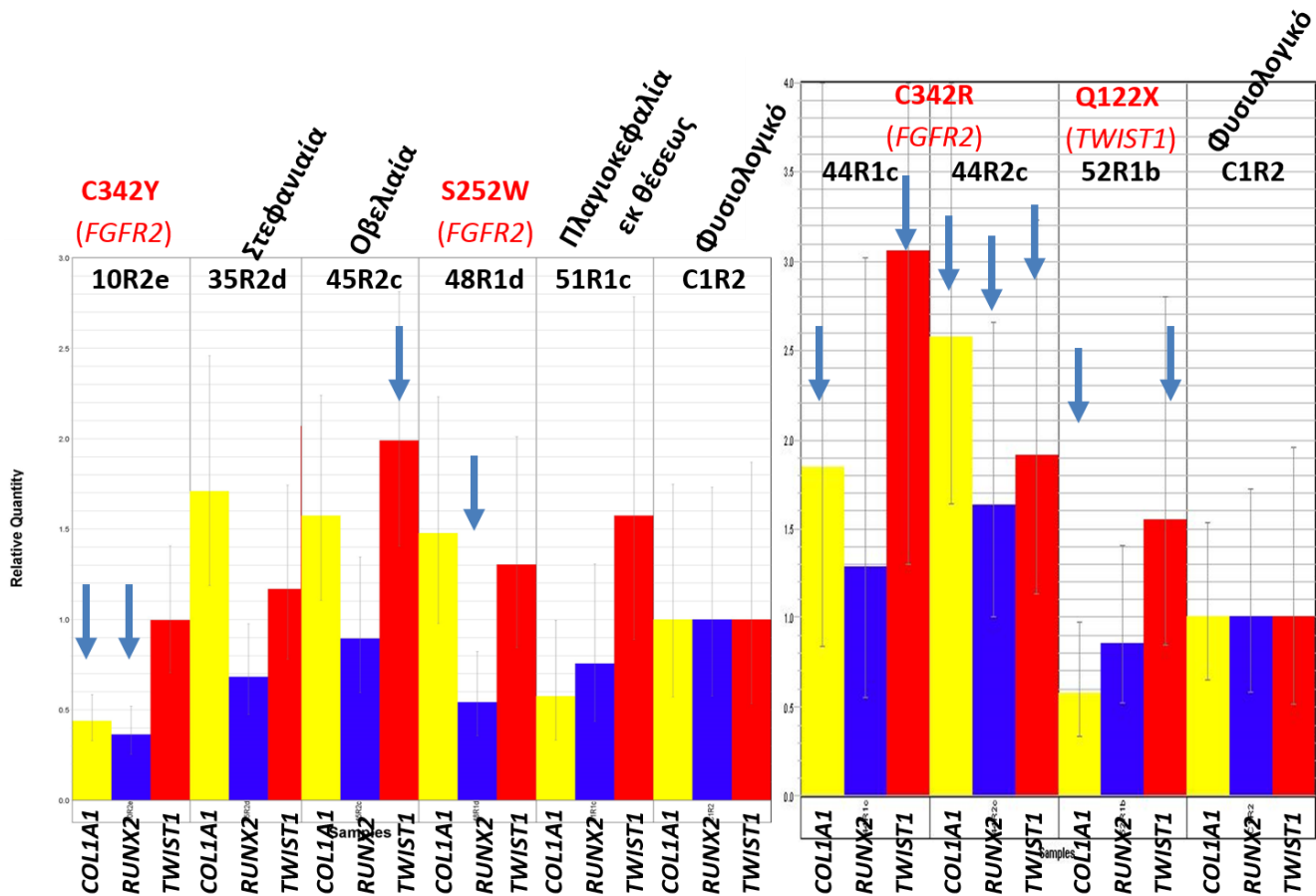
Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές στην έκφραση των προς μελέτη γονιδίων μεταξύ δειγμάτων ασθενών και του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου που προκύπτουν από την ανάλυση με τη μέθοδο  $\Delta\Delta C_t$ , μετά από υπολογισμούς με τη βοήθεια προγράμματος Microsoft Excel 2013 είναι οι εξής:

- Μείωση της έκφρασης των γονιδίων *COL1A1* και *RUNX2* στον ασθενή 10, 10R2e (άτομο με σύνδρομο Crouzon που φέρει τη μεταλλαγή C342Y στο γονίδιο *FGFR2*).

- Αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *COL1A1*, *TWIST1* και οριακά του *RUNX2* στην ασθενή 44, 44R1c και 44R2c (άτομο με σύνδρομο Crouzon που φέρει τη μεταλλαγή C342R στο γονίδιο *FGFR2* καθώς και τον άνευ κλινικής σημασίας πολυμορφισμό F384L στο γονίδιο *FGFR3*).
- Αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *TWIST1* στον ασθενή 45, 45R2c (άτομο με μη συνδρομική σκαφοκεφαλία που δε φέρει μεταλλαγή σε κάποιο από τα γονίδια που ελέγχθηκαν).
- Μείωση της έκφρασης του γονιδίου *RUNX2* στην ασθενή 48, 48R1d (άτομο με σύνδρομο Apert που φέρει τη μεταλλαγή S252W στο γονίδιο *FGFR2*).
- Μείωση της έκφρασης του γονιδίου *COL1A1* και αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *TWIST1* στην ασθενή 52, 52R1b (άτομο με σύνδρομο Saethre-Chotzen που φέρει τη μεταλλαγή Q122X στο γονίδιο *TWIST1*).



**Εικόνα 67:** Η σχετική έκφραση των προς εξέταση γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* για κάθε ένα από τα δείγματα συγκρινόμενη με αυτή του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου (C1R2), όπως προσδιορίστηκε αυτόματα με τη χρήση ειδικού λογισμικού RQ Manager 1.2.1 (ABI).



**Εικόνα 68:** Σχετική έκφραση των προς εξέταση γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* για κάθε ένα από τα δείγματα συγκρινόμενη με αυτή του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου (C1R2). Με βέλη σημειώνονται τα δείγματα στα οποία υπήρχε διαφορά στην έκφρασή τους σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, με βάση τα εύρη των τιμών τους.

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5Α. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ, ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΩΝ Ή ΜΙΚΡΟΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΩΝ

#### 5Α.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ

Η μοριακή διάγνωση ασθενών με κρανιοσυνοστέωση βασίζεται σε έναν αλγόριθμο, αυτό των Johnson and Wilkie, 2011, κατά τον οποίο όλες οι περιπτώσεις συνδρομικής ή μη συνδρομικής κρανιοσυνοστέωσης ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του γονιδίου *FGFR2*, στο εξόνιο 1 (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης) του *TWIST1* και για τη μεταλλαγή Pro250Arg του γονιδίου *FGFR3*. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένας αναβαθμισμένος αλγόριθμος, βασισμένος σε αυτόν των Johnson and Wilkie, 2011, αλλά επιπλέον, στις περιπτώσεις μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής, συνδρομικής ή μη συνδρομικής, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη των μεταλλαγών Pro252Arg στο γονίδιο *FGFR1*, Ala391Glu στο *FGFR3* καθώς και έλεγχος για την ύπαρξη μικροελλείψεων /μικροδιπλασιασμών στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *ALX1*, *ALX3*, *ALX4*, *EFNB1* και *RUNX2* με τη μέθοδο της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενης από τη δράση της λιγάσης (MLPA). Η μεθοδολογία MLPA εφαρμόστηκε και στις περιπτώσεις συνοστέωσης της μετωπιαίας ραφής, συνδρομικής ή μη συνδρομικής, συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής, συνδρομικής ή με επιπλέον ευρήματα, συνοστέωσης της λαμβδοειδούς ραφής καθώς και στην περίπτωση της μέσης κρανιοπροσωπικής σχιστίας. Με τον διευρυμένο αυτό μοριακό έλεγχο βρέθηκαν υπεύθυνες για την κρανιοσυνοστέωση μεταλλαγές (ή ελλείψεις) στα γονίδια που ελέγχθηκαν σε 14 από τους 47 υπό μελέτη ασθενείς, δηλαδή σε ποσοστό 29.8%. Ανάλογα ποσοστά προέκυψαν και από μια μεγάλη δεκαετή μελέτη στην οποία συμμετείχαν 326 παιδιά με κρανιοσυνοστέωση, όπου επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε ποσοστό 21.5% (Wilkie et al., 2010). Στα δείγματα που αναλύθηκαν, δεν πραγματοποιήθηκε



έλεγχος των ασθενών για την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 3,5,11,15 και 17 του γονιδίου *FGFR2*, καθώς και συμβατικός ή μοριακός καρυότυπος (array CGH), όπως προτείνεται από τους Johnson and Wilkie, 2011, γιατί τα κλινικά ευρήματα δεν υποδείκνυαν τις συγκεκριμένες αναλύσεις. Ο μοριακός καρυότυπος ίσως συνέβαλε στη διάγνωση της μιας ασθενούς με αρχική κλινική εκτίμηση πιθανής συνδρομικής πλαγιοκεφαλίας καθώς και στην περίπτωση της συνδρομικής τριγωνοκεφαλίας, ενώ ο έλεγχος των επιπλέον εξονίων του γονιδίου *FGFR2* πιθανόν να συνέβαλε στη διάγνωση της μιας περίπτωσης ασθενούς με σύνδρομο Crouzon, η οποία παρέμεινε αδιάγνωστη. Επιπλέον, με βάση τις αρχικές κλινικές εκτιμήσεις των ασθενών δεν απαιτήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη παρεμβολών Alu ή ελλείψεων στο εξόνιο 10 του γονιδίου *FGFR2* καθώς και ανάλυση ετεροδιμερών.

Και οι 14 ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν μεταλλαγές (ή έλλειψη) ανήκαν στην ομάδα των 25 ασθενών με αρχική κλινική διάγνωση συνδρόμου Apert, Crouzon, CFNS, Muenke, Pfeiffer και μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής (συνδρομικής ή μη). Αντίθετα δεν υπήρχαν θετικά αποτελέσματα για κανέναν ασθενή με συνοστέωση της οβελιαίας, μετωπιαίας ή λαμβδοειδούς ραφής, αποτελέσματα και ποσοστά που συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία (Wilkie et al., 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη όλοι οι ασθενείς στους οποίους βρέθηκαν μεταλλαγές αντιπροσωπεύουν συνδρομικές περιπτώσεις, όπως προκύπτει από τη μοριακή διάγνωση των περιστατικών αυτών, ανεξάρτητα από την αρχική κλινική τους διάγνωση, η οποία σε κάποιες περιπτώσεις δε συμφωνεί με το αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου.

## **5A2. ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ**

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν 17 συνδρομικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης όπου επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε 13 από αυτές. Επιπλέον ελέγχθηκαν 29 περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης αρχικά χαρακτηρισμένες ως μη συνδρομικές μορφές, όπου επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε μια μόνο από αυτές. Τέλος ελέγχθηκε μια περίπτωση μέσης κρανιοπροσωπικής σχιστίας (ασθενής 6) στην οποία ο μοριακός έλεγχος ήταν αρνητικός.

Σε 4 από τους 5 ασθενείς με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Crouzon επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση, όπου εντοπίστηκαν γνωστές μεταλλαγές στο γονίδιο *FGFR2*. Στους ασθενείς

10 και 44 εντοπίστηκαν σε ετεροζυγωτία δυο παρανοηματικές μεταλλαγές που αφορούν στην ίδια αμινοξική θέση, την C342. Μεταλλαγές του αμινοξικού καταλοίπου C342 έχουν βρεθεί συχνά σε άτομα με σύνδρομο Crouzon (Reardon et al., 1994) αλλά και σε άτομα με σύνδρομο Pfeiffer ή Jackson-Weiss. Συγκεκριμένα, η μεταλλαγή p.C342Y (c.1025G>A) την οποία φέρει ο ασθενής 10, έχει αναφερθεί και σε ασθενείς με σύνδρομο Pfeiffer (Passos-Bueno et al., 2008), ενώ η μεταλλαγή p.C342R (c.1024T>C) την οποία φέρει η ασθενής 44, έχει αναφερθεί σε δυο επιπλέον σύνδρομα: Pfeiffer (Cornejo-Roldan et al., 1999) και Jackson-Weiss (Park et al., 1995). Στην ασθενή 44 βρέθηκε, επίσης, σε ετεροζυγωτία ο πολυμορφισμός p.F384L (c.1150T>C) στο γονίδιο *FGFR3*, ο οποίος δε θεωρείται αιτιοπαθογόνος (Golla et al., 1997). Στην ασθενή 34 εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.S354C (c.1061C>G), η οποία έχει αναφερθεί συχνά σε άτομα με σύνδρομο Crouzon (Reardon et al., 1994). Οι μεταλλαγές C342Y και C342R υποκαθιστούν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, ενώ η S354C δημιουργεί ένα νέο. Η ύπαρξη ενός ελεύθερου, εκτεθειμένου καταλοίπου κυστεΐνης μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών με αποτέλεσμα το διμερισμό και τη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα ανεξάρτητα από την ύπαρξη των μορίων-προσδετών (Wilkie et al., 1995b). Ο μηχανισμός αυτός έχει δειχθεί πειραματικά για τη μεταλλαγή C342Y (Mangasarian et al., 1997).

Στον ασθενή 33 εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η μεταλλαγή 1084+3A>G στο ιντρόνιο 10 του γονιδίου *FGFR2*. Η μεταλλαγή αυτή είναι σπάνια και έχει αναφερθεί άλλες 3 φορές στη διεθνή βιβλιογραφία: σε μια οικογένεια με ήπιο σύνδρομο Crouzon (Kan et al., 2004), σε έναν ασθενή με σύνδρομο Pfeiffer (Cornejo-Roldan et al., 1999) και σε έναν μη χαρακτηρισμένο ασθενή με συνοστέωση της οβελιαίας και της λαμβδοειδούς ραφής (Mulliken et al., 1999). Η μεταλλαγή 1084+3A>G βρίσκεται στην 5' θέση συρραφής (5' splice site) και ενεργοποιεί τη χρήση μιας «κρυφής» 5' θέσης συρραφής που βρίσκεται εντός του εξονίου 10, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη εναλλακτική συρραφή του εξονίου 10 και τη δημιουργία μικρότερου μήκους mRNA (Kan et al., 2004).

Όσον αφορά στις περιπτώσεις συνδρόμου Apert επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση στο σύνολο των 4 ασθενών που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία. Στις δίδυμες ασθενείς 14 και 15 εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.P253R (c.758C>G), ενώ στους ασθενείς 43 και 48 η παρανοηματική μεταλλαγή p.S252W (c.755C>G) στο εξόνιο 8 του γονιδίου *FGFR2*. Περισσότερο από 98% των περιπτώσεων του συνδρόμου Apert οφείλονται στις δυο

αυτές μεταλλαγές. Η S252W είναι πιο συχνή και απαντάται σε ποσοστό 66% των ασθενών, ενώ η P253R σε ποσοστό 32% (Wilkie et al., 1995, Johnson and Wilkie, 2011). Οι μεταλλαγές αυτές προσδίδουν ενίσχυση λειτουργίας στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών: αυξημένη συνάφεια για πρόσδεση των FGFs και απώλεια της ειδικότητας πρόσδεσης των FGFs (Ibrahimi et al., 2004b).

Στην παρούσα εργασία, ο μοριακός έλεγχος ανέδειξε δυο ασθενείς με σύνδρομο Saethre-Chotzen, το οποίο οφείλεται σε μεταλλαγές ή ελλείψεις του γονιδίου *TWIST1* (Johnson et al., 1998) και δυο με σύνδρομο Muenke, το οποίο καθορίζεται από την ύπαρξη της μεταλλαγής p.P250R (c.749C>G) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *FGFR3* (Bellus et al., 1996, Muenke et al., 1997). Συγκεκριμένα, στον ασθενή 18 με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Muenke ή μη συνδρομικής συνοστέωσης στεφανιαίας ραφής διαπιστώθηκε ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1* και στην ασθενή 47 με πιθανό σύνδρομο Pfeiffer εντοπίστηκε η νέα μεταλλαγή p.L138P (c.413T>C) στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *TWIST1*. Οι ελλείψεις και οι μεταλλαγές του γονιδίου *TWIST1* οδηγούν σε απλοανεπάρκεια λόγω απουσίας ή απώλειας της λειτουργικότητας του πρωτεϊνικού προϊόντος ενός εκ των δυο αλληλομόρφων (El Ghouzzi et al., 1997, Howard et al., 1997, Bourgeois et al., 1998).

Η μεταλλαγή P250R εντοπίστηκε στους ασθενείς 53 και 42, οι οποίοι είχαν χαρακτηριστεί αρχικά ως πιθανά συνδρομική και μη συνδρομική πλαγιοκεφαλία, αντίστοιχα. Η μεταλλαγή P250R στον *FGFR3* είναι ανάλογη με τις μεταλλαγές P253R στον *FGFR2* και P252R στον *FGFR1* και δρα με παρόμοιο μηχανισμό, οδηγώντας σε αυξημένη συνάφεια για πρόσδεση των FGFs με αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα (Ibrahimi et al., 2004a).

Και στις 2 ασθενείς (22 και 40) με Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (CFNS) επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση, όπου εντοπίστηκαν 2 νέες μεταλλαγές στο γονίδιο *EFNB1* (μεταλλαγές p.E125K-c.373G>A και p.L240fsX79-c.717\_718insA, αντίστοιχα).

Στη μια ασθενή (2) με συνδρομική τριγωνοκεφαλία εντοπίστηκε μόνο ο πατρικής προέλευσης πολυμορφισμός p.F384L (c.1150T>C) στο γονίδιο *FGFR3* (εξόνιο 10), ο οποίος δεν θεωρείται αιτιοπαθογόνος (Golla et al., 1997) και επομένως δεν ήταν δυνατή η μοριακή διάγνωση του περιστατικού αυτού.

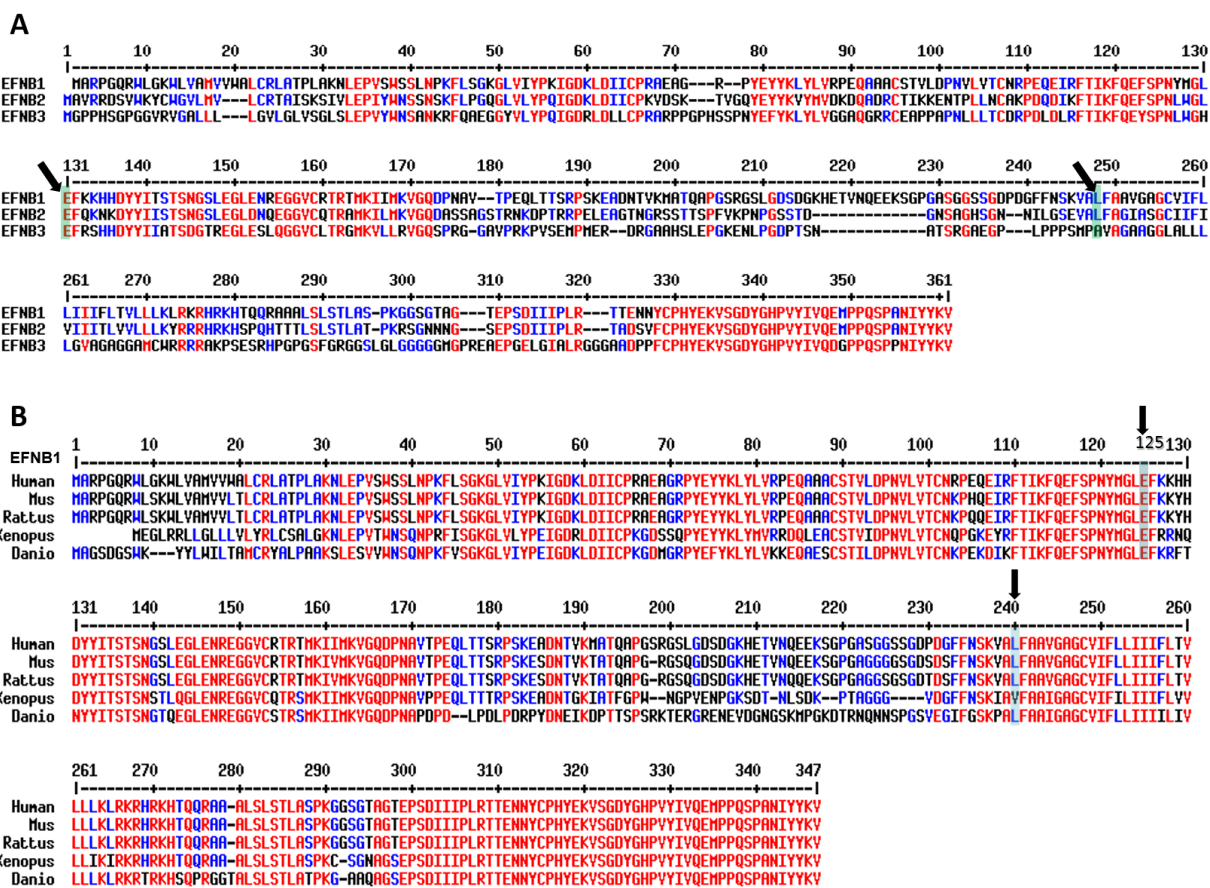
## 5A.3 ΝΕΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *EFNB1* ΚΑΙ *TWIST1*

### 5A.3.1 ΝΕΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *EFNB1*

Στην παρούσα εργασία, όπως αναφέρθηκε, ο μοριακός έλεγχος των δυο ασθενών (22 και 40) με Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο ανέδειξε δυο νέες μεταλλαγές στο γονίδιο *EFNB1*, την παρανοηματική p.E125K - c.373G>A και την πλαισιοτροποποιητική p.L240fsX79 - c.717\_718 ins A, αντίστοιχα, που δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Το γονίδιο *EFNB1* κωδικοποιεί για την μήκους 346 αμινοξέων πρωτεΐνη Ephrin-B1 (Twiggs et al., 2004), η οποία αποτελεί μόριο-προσδέτη για τους υποδοχείς κινάσης-τυροσίνης Eph. Η ενεργοποίησή τους μέσω της πρόσδεσης με τις ephrins έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή σημάτων που ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, σημαντική για πολλές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ζωής, όπως τη σκελετική και κраниοπροσωπική ανάπτυξη (Arvanitis and Davy, 2008). Το αμινοξύ E125 είναι υψηλά συντηρημένο τόσο ανάμεσα στις ανθρώπινες ephrins B (*EFNB1*, *EFNB2* και *EFNB3*), όσο και ανάμεσα στις *EFNB1* διαφορετικών ειδών, όπως του ποντικού, του αρουραίου, του βατράχου και του zebrafish (εικόνα 69). Ανάλυση της κρυσταλλοδομής του συμπλόκου του υποδοχέα EphB2 με το μόριο-προσδέτη ephrin B2 στον ποντικό, ανέδειξε ότι το αμινοξύ E128 της ephrin B2 του ποντικού το οποίο είναι ομόλογο του E125 της ephrin B1 στον ποντικό και στον άνθρωπο βρίσκεται μέσα στη θηλιά ephrin, σημαντική για το διμερισμό και την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς της. Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης κάθε προσδέτης ephrin αρχικά προσδένεται σε έναν υποδοχέα Eph μέσω αυτής της θηλιάς, η οποία εισχωρεί σε ένα κανάλι στην επιφάνεια του υποδοχέα, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές. Στη συνέχεια, δύο διμερή Eph/ephrin ενώνονται για να σχηματίσουν ένα τετραμερές σύμπλοκο με δομή που προσομοιάζει με δακτύλιο στην οποία κάθε μόριο-προσδέτη αλληλοεπιδρά με δύο υποδοχείς και κάθε υποδοχέα με δύο προσδέτες (Himanen et al., 2001) (εικόνα 70). Η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο (όξινο αμινοξύ) από τη θετικά φορτισμένη λυσίνη (βασικό αμινοξύ) στην αμινοξική θέση 125 της ephrin B1 μέσα στην περιοχή ephrin (εικόνα 71) αναμένεται να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της *EFNB1* (μόριο-προσδέτης) και των Eph υποδοχέων της. Τέτοιες παρανοηματικές μεταλλαγές στο εξόνιο 2 του

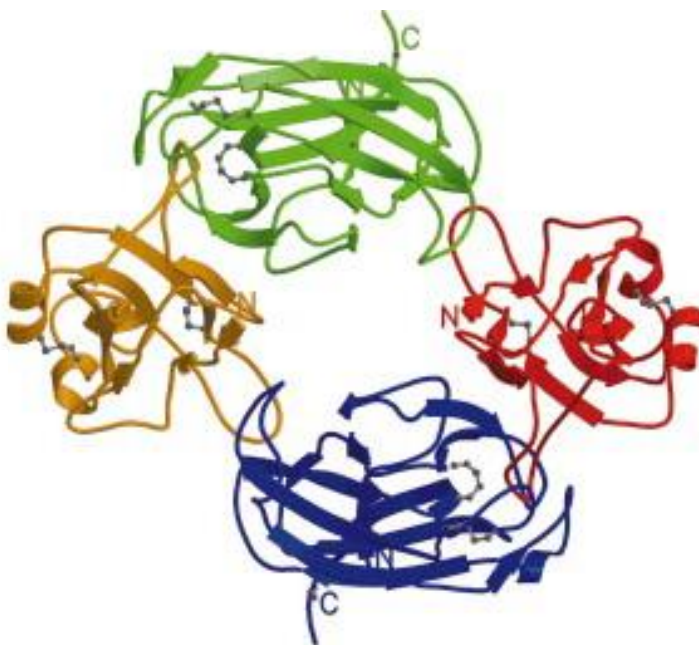
γονιδίου *EFNB1* που οδηγούν σε αμινοξική αντικατάσταση μέσα στην περιοχή αλληλεπίδρασης προσδέτη-υποδοχέα έχουν αναφερθεί πολλές φορές στη διεθνή βιβλιογραφία, οδηγώντας σε Κρανιομετωπορινικό σύνδρομο (Twigg et al., 2004, Wieland et al., 2004, Wieland et al., 2005, Twigg et al., 2006, Torri et al., 2007, Wallis et al., 2008).



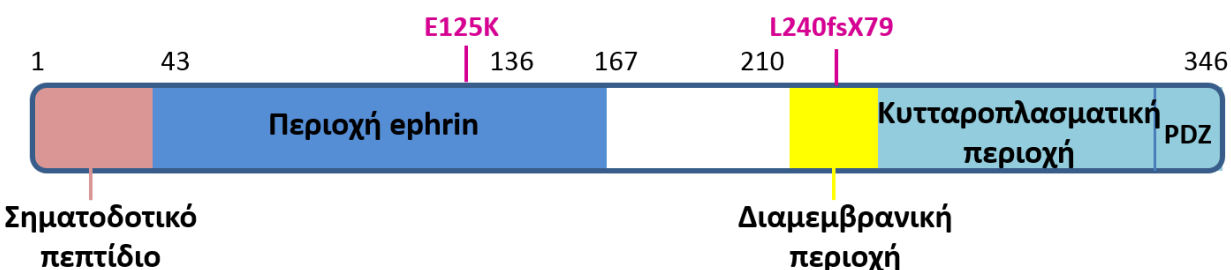
**Εικόνα 69:** Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ των διαφόρων ανθρώπινων ephrin B (EFNB1, EFNB2 και EFNB3) (A) και της EFNB1 μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, όπως του ανθρώπου, του ποτικού (*Mus musculus*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*), του βατράχου (*Xenopus laevis*) και του zebrafish (*Danio rerio*) (B).

Η μεταλλαγή L240fsX79 που προκαλείται από την παρεμβολή μιας αδενίνης μεταξύ των θέσεων 717\_718 του cDNA του γονιδίου *EFNB1* οδηγεί σε αλλαγή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και στη δημιουργία πρώιμου κωδικονίου λήξης, καταστρέφοντας έτσι τμήμα της διαμεμβρανικής καθώς και όλη την κυτταροπλασματική περιοχή της EFNB1 (εικόνα 71). Η μικρότερη και διαφορετική από τη φυσιολογική πρωτεΐνη που παράγεται λόγω της μεταλλαγής

αυτής πιθανόν να είναι ασταθής, ενώ η έλλειψη φυσιολογικής, ακέραιης κυτταροπλασματικής περιοχής προφανώς παρεμποδίζει την ικανότητα της EFNB1 για ανάστροφη σηματοδότηση στα κύτταρα που την εκφράζουν. Η αμφίδρομη σηματοδότηση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τόσο εμπρόσθια σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων Erh, όσο και ανάστροφη μέσω των προσδετών ephrin, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια τόσο στα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς όσο και στα κύτταρα που εκφράζουν προσδέτες, αντίστοιχα, (Palmer and Klein, 2003, Edwards and Mundy, 2008) αποτελεί μοναδικό στοιχείο της αλληλεπίδρασης Erh/ephrin και είναι σημαντική για τη σωστή κраниοπροσωπική ανάπτυξη. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι μέχρι στιγμής στο εξόνιο 5 έχουν βρεθεί μόνο πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις (Wallis et al., 2008).



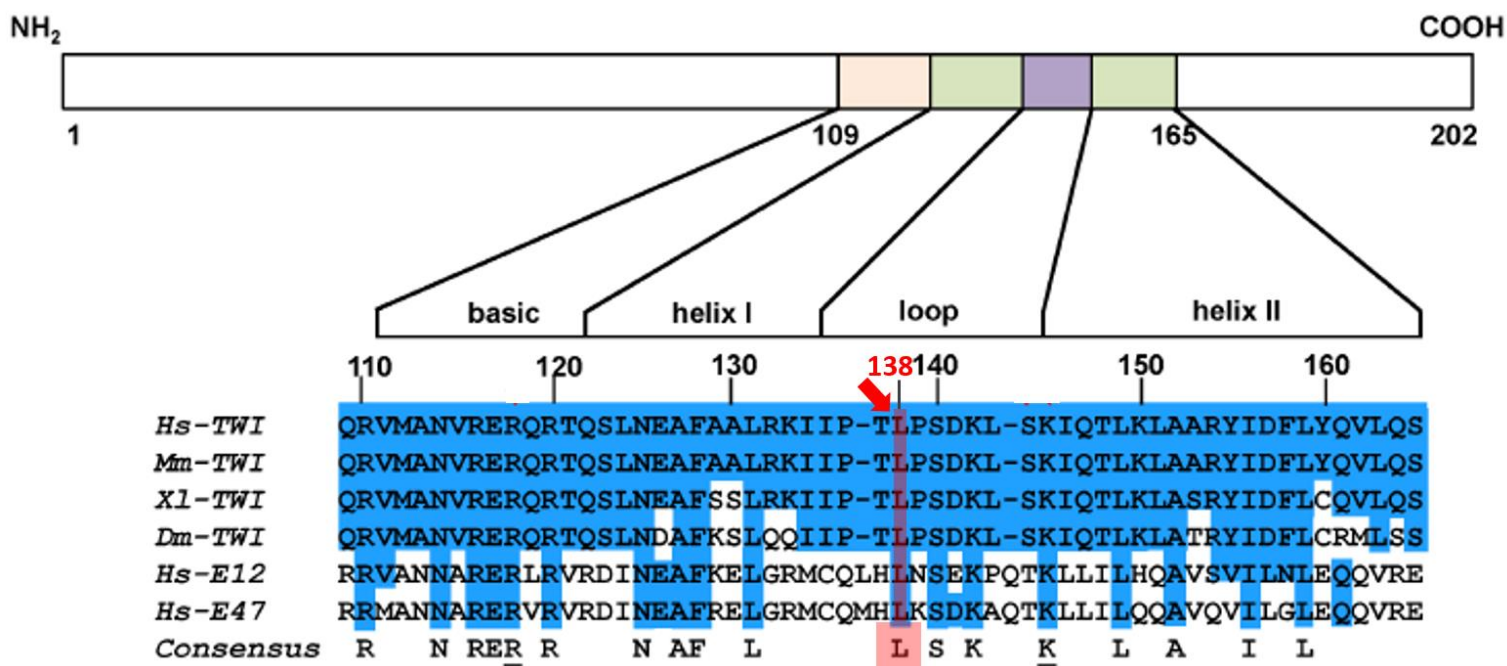
**Εικόνα 70:** Δομή του τετραμερούς συμπλόκου Ehb-ephrin B2, το οποίο δημιουργείται από δυο διμερή υποδοχέα/μορίου-προσδέτη (κόκκινο και πορτοκαλί: μόρια-προσδέτες ephrin B2, μπλε και πράσινο υποδοχείς Ehb) (Himanen et al., 2001).



**Εικόνα 71:** Σχηματική απεικόνιση της ανθρώπινης πρωτεΐνης EFNB1 και των δυο νέων μεταλλαγών, E125K και L240fsX79.

### **5A.3.2 ΝΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *TWIST1***

Ακολουθώντας το νέο διευρυμένο αλγόριθμο ελέγχου ασθενών με κρανιοσυνοστέωση που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία στην ασθενή 47 με λανθασμένη αρχική κλινική διάγνωση συνδρόμου Pfeiffer βρέθηκε η νέα παρανοηματική μεταλλαγή p.L138P - c.413T>C στο γονίδιο *TWIST1*. Μεταλλαγές ή ελλείψεις του γονιδίου *TWIST1* οδηγούν στο σύνδρομο Saethre-Chotzen (Johnson et al., 1998). Το αμινοξύ L138 βρίσκεται μέσα στην περιοχή HLH (helix I-loop-helix II) και συγκεκριμένα μέσα στη θηλιά (loop) του *TWIST1*, και είναι πολύ συντηρημένο τόσο ανάμεσα στους παράγοντες *TWIST1* διαφόρων ειδών, όπως του ποντικού, του βατράχου και της δροσόφιλας όσο και σε άλλες HLH πρωτεΐνες, όπως οι E12 και E47 (εικόνα 72), με τις οποίες ο *TWIST1* μπορεί και σχηματίζει ετεροδιμερή. Η πλειοψηφία των μεταλλαγών του *TWIST1* βρίσκεται μέσα στην υψηλά συντηρημένη HLH περιοχή του και οδηγούν σε απλοανεπάρκεια. Η απώλεια της λειτουργικότητας του πρωτεϊνικού προϊόντος του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου οφείλεται κυρίως στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού του ή την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Maia et al., 2012). Η αντικατάσταση της υδρόφοβης λευκίνης στην αμινοξική θέση 138 από την προλίνη, η οποία περιέχει μια δευτεροταγή αμινομάδα, δεν είναι υδρόφοβη και συχνά απαντάται στα σημεία κάμψης των πρωτεϊνικών αλυσίδων πιθανόν να παρεμποδίζει την πρόσδεση του παράγοντα *TWIST1* στο DNA, όπως αναμένεται να συμβαίνει και με άλλες παρανοηματικές μεταλλαγές που βρίσκονται μέσα στη θηλιά του μοτίβου HLH (El Ghouzzi et al., 2000).



**Εικόνα 72:** Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης TWIST1 και σύγκριση της αμινοξικής της αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, όπως του ανθρώπου, του ποντικού (*Mus musculus*), του βατράχου (*Xenopus laevis*) και της δροσόφιλας (*Drosophila melanogaster*), αλλά και με τις HLH πρωτεΐνες E12 και E47. Η νέα μεταλλαγή L138P βρίσκεται μέσα στην HLH θηλιά (Maia et al., 2012, τροποποιημένο).

## 5A.4 ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΩΣ

Όσον αφορά στις μεταλλαγές που προκαλούν τα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης δεν υπάρχει ικανοποιητικός συσχετισμός γονοτύπου-φαινοτύπου, αν και για παράδειγμα, στο σύνδρομο Apert η μεταλλαγή P253R στο γονίδιο *FGFR2* έχει συσχετισθεί με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σχιστίας υπερώας, αλλά με ηπιότερη συνδακτυλία, σε σχέση με την S252W (Wilkie et al., 1995, Johnson and Wilkie, 2011). Επιπλέον, για το σύνδρομο Saethre-Chotzen έχει παρατηρηθεί ότι μεγάλες ελλείψεις του γονιδίου *TWIST1* σχετίζονται με μαθησιακές δυσκολίες (Johnson et al., 1998, Kress et al., 2006).

Η ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων περιπτώσεων με γνωστές μεταλλαγές αλλά και η περιγραφή νέων μεταλλαγών θα συμβάλλει στο βέλτιστο και λεπτομερή συσχετισμό



γονοτύπου-φαινοτύπου για κάθε ένα από τα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης. Η δυνατότητα πρόβλεψης του φαινοτύπου γνωρίζοντας το υποκείμενο γενετικό αίτιο είναι πολύ σημαντική και καθοριστική για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς αλλά και προγεννητικά για την τύχη μιας κύησης.

Όπως διαπιστώνεται και στην παρούσα εργασία, η μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των κλινικών χαρακτηριστικών των συνδρόμων κρανιοσυνοστέωσης από τη μια πλευρά και η ετερογένεια στην κλινική εικόνα του ίδιου συνδρόμου, ειδικά του Muenke, από την άλλη, ακόμα και σε άτομα της ίδιας οικογένειας, καθιστούν δύσκολο το διαχωρισμό τους και τη σωστή διάγνωση, χωρίς τη συμβολή του μοριακού ελέγχου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα κλινικής ετερογένειας του συνδρόμου Muenke αποτελεί η οικογένεια του ασθενούς 53. Ο ασθενής 53, καθώς επίσης και η μικρότερη αδελφή του εμφανίζουν έντονη πλαγιοκεφαλία λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής, που έχει επηρεάσει τη συμμετρία ολόκληρου του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος. Έντονη δυσμορφία του προσώπου εμφανίζει και ο πατέρας του ασθενούς λόγω βραχυκεφαλίας, όπου η στεφανιαία ραφή είναι συνοστεωμένη αμφοτερόπλευρα. Αντίθετα, η πατρική γιαγιά εμφανίζει πολύ ήπιο φαινότυπο (ήπια δεξιά πλαγιοκεφαλία), πιθανόν λόγω συνοστέωσης της δεξιάς στεφανιαίας ραφής που διαπιστώθηκε μετά από επιστάμενο κλινικό έλεγχο και θα είχε διαφύγει αν δεν υπήρχε οικογενειακό ιστορικό, ώστε να ελεγχθούν όλα τα άτομα της οικογένειας. Σε αντίθεση με τον ασθενή 53, ο οποίος είχε χαρακτηριστεί από την αρχή ως πιθανά συνδρομική περίπτωση, ο ασθενής 42, ο οποίος αποτελεί επίσης μια περίπτωση συνδρόμου Muenke, είχε χαρακτηριστεί ως μη συνδρομική περίπτωση αριστερής πλαγιοκεφαλίας. Και στις δυο αυτές περιπτώσεις συνδρόμου Muenke η αρχική κλινική εκτίμηση ήταν λανθασμένη, υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα του μοριακού ελέγχου στη διάγνωση του συνδρόμου Muenke, όπως αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε μια μελέτη όπου συμμετείχαν 76 παιδιά με, φαινομενικά, μη συνδρομική συνοστέωση της στεφανιαίας ραφής, τα 29 από αυτά έφεραν τη μεταλλαγή Pro250Arg στο γονίδιο *FGFR3*, υπεύθυνη για το σύνδρομο Muenke (Thomas et al., 2005).

Λανθασμένη ήταν η αρχική κλινική διάγνωση και στις δυο περιπτώσεις συνδρόμου Saethre-Chotzen που αναφέρονται στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, ο ασθενής 18 με αρχική κλινική εκτίμηση συνδρόμου Muenke ή μη συνδρομικής συνοστέωσης στεφανιαίας ραφής διαγνώστηκε μοριακά με σύνδρομο Saethre-Chotzen, λόγω της ύπαρξης ετερόζυγης

έλλειψης του γονιδίου *TWIST1*, ενώ στην ασθενή 47, η οποία είχε αρχικά διαγνωστεί ως πιθανό σύνδρομο Pfeiffer, βρέθηκε η παρανοηματική μεταλλαγή p.L138P - c.413T>C στο εξόνιο 1 του γονιδίου *TWIST1*, που αναφέρεται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία.

Η δυσκολία χαρακτηρισμού των συνδρόμων καθώς και η συμβολή του μοριακού ελέγχου στη σωστή κλινική διάγνωση φαίνεται και στις δυο περιπτώσεις Κρανιομετωπορινικού συνδρόμου (ασθενείς 22 και 40). Και οι δυο αυτές ασθενείς είχαν χαρακτηριστεί αρχικά ως διαφορετικές συνδρομικές περιπτώσεις, αν και τελικά, μετά από εκτενέστερη κλινική εξέταση διαγνώστηκαν σωστά ως CFNS, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από το μοριακό έλεγχο, εφόσον ανιχνεύθηκαν δυο νέες μεταλλαγές του γονιδίου *EFNB1*. Συγκεκριμένα, στην ασθενή 22 εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η παρανοηματική μεταλλαγή p.E125K (c.373G>A) στο εξόνιο 2 και στη ασθενή 40 η πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή p.L240fsX79 (c.717\_718insA) στο εξόνιο 5 του γονιδίου *EFNB1*. Σε αυτές τις δυο περιπτώσεις CFNS, όπως και στις περιπτώσεις των συνδρόμων Apert και Crouzon, η λεπτομερής κλινική περιγραφή και ο σωστός χαρακτηρισμός των συνδρόμων καθοδήγησε το μοριακό έλεγχο προς τη σωστή κατεύθυνση, ώστε να ελεγχθούν τα κατάλληλα γονίδια. Αν και δεν υπάρχουν πολλά κλινικά δεδομένα για την περίπτωση των διδύμων ασθενών 14 και 15 με σύνδρομο Apert, φαίνεται ότι ακόμα και μεταξύ τους υπάρχουν μικρές διαφορές στην κλινική τους εικόνα. Η ασθενής 15 ανέπτυξε υδροκέφαλο και απαιτήθηκαν περισσότερες χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάστασή της.

Λόγω αυτών των ιδιαιτεροτήτων, η κλινική εξέταση των ασθενών με κρανιοσυνοστέωση πρέπει να πραγματοποιείται από έμπειρο κλινικό γενετιστή, ο οποίος θα συντάσσει λεπτομερή έκθεση, περιλαμβάνοντας όλα τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η ακριβής και ενδελεχής κλινική περιγραφή ενός ασθενούς με κρανιοσκελετικό σύνδρομο διευκολύνει και καθοδηγεί το μοριακό έλεγχο ώστε να είναι στοχευμένος και μπορεί να οδηγήσει σε μοριακή διάγνωση. Ο μοριακός έλεγχος είναι σημαντικό να είναι στοχευμένος και για οικονομικούς λόγους, εφόσον ο έλεγχος πολλών γενετικών τόπων ανεβάζει κατά πολύ το κόστος της εξέτασης και είναι χρονοβόρος. Η σχέση μεταξύ ολοκληρωμένης κλινικής περιγραφής και μοριακού ελέγχου είναι αμφίδρομη, εφόσον από τη μια η κλινική περιγραφή καθοδηγεί το μοριακό έλεγχο, ενώ από την άλλη η μοριακή διάγνωση συμπληρώνει και επιβεβαιώνει ή απορρίπτει την αρχική κλινική εκτίμηση.

## 5A.5 ΣΗΜΑΣΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΩΝ ΚΡΑΝΙΟΠΡΟΣΩΠΙΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ

Όπως αναφέρθηκε, η μοριακή διάγνωση των κρανιοπροσωπικών συνδρόμων είναι απαραίτητη για τον ορθό χαρακτηρισμό του συνδρόμου, εφόσον θα επιβεβαιώσει ή θα απορρίψει την αρχική κλινική εκτίμηση. Η γνώση του πραγματικού συνδρόμου από το οποίο πάσχει ο ασθενής, καθώς επίσης και της υποκείμενης μοριακής αιτιολογίας είναι πολύτιμη για την κατάλληλη κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς, εφόσον σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί ακόμα και να προβλέψει τη μετεγχειρητική του πορεία, μετά την αποκατάσταση του σχήματος της κεφαλής. Παιδιά που έφεραν μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR2*, *FGFR3* (P250R) και *TWIST1* υπεβλήθησαν σε πιο επίπονες χειρουργικές επεμβάσεις και απαιτήθηκε επαναληπτική χειρουργική επέμβαση σε ποσοστό 58%, συγκρινόμενα με αυτά χωρίς αποδεδειγμένη γενετική ανωμαλία ή με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπου το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 17% (Wilkie et al., 2010). Ειδικά σε ότι αφορά το σύνδρομο Muenke, η παρουσία της μεταλλαγής P250R στο γονίδιο *FGFR3* υποδηλώνει πενταπλάσια πιθανότητα για ανάγκη επανεγχείρησης σε σύγκριση με τις μη συνδρομικές περιπτώσεις συνοστέωσης της στεφανιαίας ραφής που δε φέρουν τη μεταλλαγή (Thomas et al., 2005). Ανάλογα, για τις συνδρομικές περιπτώσεις ασθενών με μοριακά διαπιστωμένη γενετική αιτιολογία που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη απαιτήθηκαν 2 ή ακόμα και 3 χειρουργικές επεμβάσεις για την αποκατάστασή τους και τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα πλήρως ικανοποιητικά, σε σύγκριση με τους ασθενείς με μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση, οι οποίοι χειρουργήθηκαν μόνο μια φορά και το λειτουργικό και αισθητικό αποτέλεσμα ήταν καλύτερο. Δεδομένου ότι τα σύνδρομα κρανιοσυνοστέωσης κληρονομούνται με τον επικρατή χαρακτήρα και επομένως υπάρχει 50% πιθανότητα κληρονομησης στους απογόνους, η μοριακή διάγνωση επιτρέπει την κατάλληλη γενετική συμβουλευτική και καθιστά δυνατό τον προγεννητικό έλεγχο. Σε αντίθεση με άλλες κρανιοσκελετικές δυσπλασίες, όπως η αχονδροπλασία, η υποχονδροπλασία και η θανατηφόρος δυσπλασία τύπου 1 και 2, οι οποίες εμφανίζουν υπερηχογραφικά ευρήματα προγεννητικά, η κρανιοσυνοστέωση είναι πολύ δύσκολο να διαπιστωθεί με τους τυπικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους που πραγματοποιούνται κατά την παρακολούθηση της κύησης. Μόνο για τις συνδρομικές περιπτώσεις που φέρουν έντονες ανωμαλίες στα άκρα, όπως το σύνδρομο Apert,

υπάρχει μικρή πιθανότητα να ανιχνευθούν υπερηχογραφικά και αυτό σε μεγάλη ηλικία κύησης. Επομένως, η δυνατότητα μοριακού ελέγχου του εμβρύου ήδη από την 9<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης με τη λήψη χοριακών λαχνών προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη γενετικού αιτίου κρανιοσυνοστέωσης, είναι πολύ σημαντική για την έκβαση της κύησης. Βέβαια, η λήψη αποφάσεων σχετικά με τη διακοπή της κύησης λαμβάνεται από τους γονείς. Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, η μητέρα του ασθενούς 53 έμεινε έγκυος για 4<sup>η</sup> φορά. Αν και στην οικογένεια δόθηκε γενετική συμβουλευτική, εφόσον είχε ολοκληρωθεί ο μοριακός έλεγχος του ασθενούς και είχε διαπιστωθεί ότι τόσο ο ίδιος όσο και ο πατέρας του έφεραν τη μεταλλαγή P250R στο γονίδιο *FGFR3*, επέλεξαν να μην κάνουν προγεννητικό έλεγχο, με αποτέλεσμα τη γέννηση ενός θήλεος ατόμου με σύνδρομο Muenke.

## **5B. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΚΑΙ *GAPDH* (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ) ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ**

### **5B.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟ ΧΡΗΣΙΜΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ - ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΚΑΙ *GAPDH* (ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ)**

Οι ινοβλάστες και οι οστεοβλάστες, έχουν κοινή, μεσεγχυματική προέλευση και σε επίπεδο κυτταρικής καλλιέργειας είναι πολύ δύσκολη η διάκριση μεταξύ τους. Το μόνο μορφολογικό χαρακτηριστικό που τους διαφοροποιεί είναι το γεγονός ότι οι οστεοβλάστες, συμπυκνώνονται σε ένα ασβεστοποιημένο εξωκυττάριο πλέγμα. Ενώ γενικά εκφράζουν τα ίδια γονίδια, η έκφραση δύο γονιδίων, του μεταγραφικού παράγοντα *RUNX2*, ο οποίος θεωρείται ο

πιο πρόωρος και ειδικός μάρτυρας της οστεογένεσης που επάγει την έκφραση οστεοβλαστοειδικών γονιδίων καθώς και της οστεοκαλσίνης, αρχικά θεωρούνταν ειδική για τους οστεοβλάστες (Ducy et al., 2000). Παρόλα αυτά υπάρχουν πολλές μετέπειτα πειραματικές ενδείξεις ότι ο RUNX2 εκφράζεται φυσιολογικά και στους δερματικούς ινοβλάστες, είτε ασθενώς (Komori et al., 1997), είτε σε συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά που παρατηρούνται στους οστεοβλάστες (Hjelmeland et al., 2005). Ο TWIST1, ένας άλλος σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται κυρίως σε μεσοδερμικής προέλευσης ιστούς, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή τους, είναι γνωστό ότι εκφράζεται επίσης τόσο σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες εμβρύων όσο και ενηλίκων (Wang et al., 1997). Τα κολλαγόνα αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που βοηθούν στην ενδυνάμωση και στήριξη πολλών ιστών, όπως τα οστά και το δέρμα. Το γονίδιο *COL1A1* κωδικοποιεί τμήμα του κολλαγόνου τύπου I, που αποτελεί την πιο άφθονη μορφή κολλαγόνου στο ανθρώπινο σώμα και έχει δειχθεί πειραματικά ότι εκφράζεται σε καλλιέργειες ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών (McFarland et al., 2011). Η έκφραση του γονιδίου *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (γονίδιο που συντηρεί την κυτταρική λειτουργία-housekeeping gene) το οποίο χρησιμοποιείται πάρα πολύ συχνά ως γονίδιο αναφοράς σε πειράματα έκφρασης καθώς και στην παρούσα εργασία, έχει διαπιστωθεί και αξιολογηθεί πειραματικά σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, μεταξύ των οποίων και οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες (Zainuddin et al., 2008).

Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας διαπιστώθηκε έκφραση των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* και *GAPDH* σε καλλιεργημένους δερματικούς ινοβλάστες, τόσο από άτομα χωρίς κρανιοσυνοστέωση, όσο και από ασθενείς με κρανιοσυνοστέωση που είτε έφεραν μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR2*, *FGFR3* και *TWIST1*, είτε όχι. Όπως ήταν αναμενόμενο, το πιο υψηλά εκφραζόμενο γονίδιο ήταν το *COL1A1*, ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες *TWIST1* και *RUNX2* φαίνεται να εκφράζονται πιο ασθενώς, με τον *RUNX2* να έχει τα χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης. Επομένως, επιβεβαιώνεται η έκφραση στους δερματικούς ινοβλάστες σημαντικών για το σχηματισμό των ραφών γονιδίων που είναι γνωστό ότι εκφράζονται στους οστεοβλάστες, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την κοινή προέλευση ινοβλαστών και οστεοβλαστών από μεσεγχυματικά κύτταρα και την κοινή μορφολογία τους δικαιολογούν τον χαρακτηρισμό των οστεοβλαστών ως “εκλεπτυσμένους” ινοβλάστες (“sophisticated fibroblasts”) (Ducy et al., 2000), καθιστώντας έτσι

τους δερματικούς ινοβλάστες ένα εύχρηστο, λόγω της ευκολίας καλλιέργειας και χειρισμού τους, πιθανό μοντέλο μελέτης έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών.

## **5B.2 ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RUNX2*, *TWIST1*, *COL1A1* ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ Ή ΜΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ**

### ***5B2.1 Προηγούμενες μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία***

Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί 6 σημαντικά πειράματα σε ανθρώπινα δείγματα στα οποία έγινε προσπάθεια να ταυτοποιηθούν γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση σε διαφορετικές περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης, με τη χρήση τεχνολογίας μικροσυστοιχιών, η οποία επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο της έκφρασης πολλών διαφορετικών γονιδίων. Οι Coussens et al., 2007 επέλεξαν να μελετήσουν τη διαφορική έκφραση γονιδίων σε ιστούς από συνοστεωμένες, υπό συνοστέωση και μη συνοστεωμένες ραφές ατόμων με συνδρομική ή μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση και από φυσιολογικά άτομα. Δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε οστεοβλάστες είτε από ασθενείς με σύνδρομο Apert (μεταλλαγή S252W στον FGFR2) και φυσιολογικά άτομα (Miraoui et al., 2010), είτε από ασθενείς με μη συνδρομικές μορφές κρανιοσυνοστέωσης της στεφανιαίας μονόπλευρα, της μετωπιαίας ή της οβελιαίας ραφής και φυσιολογικά άτομα (Stampfer et al., 2011). Δύο ομάδες ερευνητών μελέτησαν διαφορική έκφραση γονιδίων σε περιριστικούς ινοβλάστες από ασθενείς με σύνδρομο Apert ή Crouzon συγκρινόμενη με φυσιολογικά άτομα. Οι Carinci et al., 2002 σε έναν ασθενή με σύνδρομο Apert που έφερε τη μεταλλαγή P253R και σε δυο ασθενείς με Crouzon, όπου ο ένας έφερε τη μεταλλαγή G338R ενώ στον άλλον δε βρέθηκε μεταλλαγή και οι Fanganiello et al., 2007 σε 7 ασθενείς με Apert που έφεραν τη μεταλλαγή S252W. Μόνο οι Bochukova et al., 2009 πραγματοποίησαν πειράματα έκφρασης σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική ή μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση αλλά η σύγκριση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων έγινε μεταξύ των δύο αυτών ομάδων ασθενών και όχι με φυσιολογικά άτομα. Από την σύγκριση αυτών των πειραμάτων δυστυχώς δεν προκύπτουν κοινά αποτελέσματα σχετικά

με τη διαφορετική έκφραση γονιδίων που θα μπορούσαν να συμβάλουν στο φαινότυπο της κρανιοσυνοστέωσης, πιθανόν λόγω διαφορετικής προέλευσης και χειρισμού των δειγμάτων καθώς και μεθοδολογίας (διαφορετικές πλατφόρμες μικροσυστοιχιών). Επιπλέον, σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν αναφέρεται διαφορετική έκφραση των γονιδίων *TWIST1*, *RUNX2* και *COL1A1* μεταξύ δειγμάτων φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με κρανιοσυνοστέωση.

Εκτός των παραπάνω πειραμάτων όπου χρησιμοποιήθηκε τεχνολογία μικροσυστοιχιών, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα ελέγχου διαφορετικής έκφρασης γονιδίων μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και ασθενών με μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση με μεθοδολογία αλληλούχησης RNA (RNA-seq), όπου βρέθηκε αυξημένη η έκφραση του *TWIST1* σε μια υποομάδα ασθενών με διαφορετικές μορφές συνοστέωσης (Rojas-Peña et al., 2014). Η μεθοδολογία αλληλούχησης RNA χρησιμοποιεί τις τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) και επιτρέπει ταυτόχρονα τόσο την ανίχνευση νουκλεοτιδικών αλλαγών όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης ολόκληρου του “μεταγραφώματος” (transcriptome) χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό ολικό RNA (Wang et al., 2009).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω πειράματα, που στοχεύουν στην ταυτόχρονη ανάλυση έκφρασης πολλών διαφορετικών γονιδίων, τα τελευταία χρόνια έχει ακολουθηθεί μια διαφορετική προσέγγιση ώστε να ελεγχθεί η διαφοροποίηση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σχετικών με το σηματοδοτικό μονοπάτι της οστεοβλαστογένεσης. Προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος της σηματοδότησης FGF/FGFR, των μεταγραφικών παραγόντων *TWIST1* και *RUNX2*, αλλά και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση στην παθογένεια της κρανιοσυνοστέωσης έχουν πραγματοποιηθεί πολλά *in vitro* και *in vivo* πειράματα, τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. Η συντριπτική πλειοψηφία των πειραμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες κρανιακών οστεοβλαστών ανθρώπου ή ποντικού που έφεραν μεταλλαγές είτε στα γονίδια *FGFR1-3*, και κυρίως στο *FGFR2*, είτε στο *TWIST1*, αλλά και σε άλλα, σχετικά με το σηματοδοτικό μονοπάτι της οστεοβλαστογένεσης γονίδια και ελέγχθηκε η έκφραση γονιδίων όπως των ίδιων των *FGFR1-3*, του *TWIST1*, του *RUNX2*, άλλων δεικτών διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, όπως του *COL1A1*, και παραγόντων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και τη σύντηξη των κρανιακών ραφών. Στα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των προς εξέταση γονιδίων μεταξύ φυσιολογικών και μεταλλαγμένων δειγμάτων, σε καλλιεργητικές συνθήκες ανάπτυξης, διαφοροποίησης ή

μετά από επαγωγή ή αποσιώπηση της έκφρασης συγκεκριμένων παραγόντων ή προσθήκης παραγόντων που προάγουν την προς εξέταση σηματοδότηση, όπως οι FGFs. Αν και δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν οι ενεργοποιητικές μεταλλαγές των FGFRs καθώς και η απλοανεπάρκεια του TWIST1 στην πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών και τα αποτελέσματα των πειραμάτων συχνά δε συμφωνούν μεταξύ τους, συνάδουν, όμως, στο ότι η ενεργοποίηση της FGF/FGFR σηματοδότησης οδηγεί σε πρώιμη ή προβληματική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, στην οποία πιθανόν να παίζουν ρόλο και οι παράγοντες TWIST1 και RUNX2.

### **5B2.2 Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων TWIST1, RUNX2 και COL1A1 στους ινοβλάστες ασθενών με κρανιοσυνοστέωση**

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η έκφραση των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική κρανιοσυνοστέωση, που έφεραν μεταλλαγές είτε στο γονίδιο *FGFR2* (ασθενής 10-C342Y, ασθενής 44-C342R και ασθενής 48-S252W) είτε στο *TWIST1* (ασθενής 52-Q122X), από ασθενείς με μη συνδρομική συνοστέωση (35 και 45), από έναν ασθενή με πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως (51) και ένα φυσιολογικό άτομο (C1) μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες ανάπτυξης. Σε ορισμένους ασθενείς διαπιστώθηκαν διαφορές των επιπέδων έκφρασης κάποιων από τα γονίδια που ελέγχθηκαν, οι οποίες αν και μικρές υποδηλώνουν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης, τόσο μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων όσο και ανάμεσα στα παθολογικά δείγματα, συγκρινόμενα μεταξύ τους.

#### **5B2.2.1 Διαφορετικές μεταλλαγές στον FGFR2 οδηγούν σε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων TWIST1, RUNX2 και COL1A1**

##### **Σύγκριση με τη διεθνή βιβλιογραφία**

Αν και θα περίμενε κανείς ότι ενεργοποιητικές μεταλλαγές στον ίδιο υποδοχέα θα επηρέαζαν την έκφραση άλλων γονιδίων με τον ίδιο τρόπο, από τα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι δε συμβαίνει κάτι τέτοιο. Οι ασθενείς 10, 44 και 48 φέρουν μεταλλαγές στον *FGFR2*,



όμως το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν στους μεταλλαγμένους δερματικούς ινοβλάστες είναι διαφορετικό. Οι ασθενείς 10 και 44 είναι άτομα με σύνδρομο Crouzon που φέρουν μεταλλαγή στην ίδια αμινοξική θέση του FGFR2. Στον ασθενή 10, που φέρει τη μεταλλαγή C342Y, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων *COL1A1* και *RUNX2*, ενώ παρέμεινε αμετάβλητη η έκφραση του *TWIST1*. Αντίθετα, στην ασθενή 44, που φέρει τη μεταλλαγή C342R, καθώς και τον άνευ κλινικής σημασίας πολυμορφισμό F384L στον FGFR3, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων. Στην περίπτωση της ασθενούς 48 που φέρει τη μεταλλαγή S252W, επίσης στον FGFR2, η οποία προκαλεί το σύνδρομο Apert, παρατηρήθηκε, όπως και στον ασθενή 10, μείωση της έκφρασης του γονιδίου *RUNX2*, αλλά η έκφραση των *COL1A1* και *TWIST1* εμφανίζεται λίγο αυξημένη, εντός, όμως, φυσιολογικών ορίων. Τέτοιες διαφορές προκύπτουν και από πειραματικά δεδομένα άλλων ερευνητικών ομάδων. Πειράματα σε κρανιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από έμβρυα και βρέφη με σύνδρομο Apert που έφεραν τη μεταλλαγή S252W στον FGFR2 έδειξαν αύξηση στη διαφοροποίηση και στο σχηματισμό του πλέγματος του οστού, συνοδευόμενα από αυξημένη έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης των οστεοβλαστών ALP, OC και *COL1A1* (Lomri et al., 1998, Lemonnier et al., 2000, 2001). Αντίθετα, σε οστεοβλαστικές κυτταρικές σειρές ποντικών, που εξέφραζαν μεταλλαγμένους υποδοχείς FGFR2 που έφεραν είτε τη μεταλλαγή C342Y (προκαλεί το σύνδρομο Crouzon και σπάνια το Pfeiffer στον άνθρωπο) είτε την S252W (προκαλεί το σύνδρομο Apert), έδειξαν παρεμπόδιση της διαφοροποίησης και επαγωγή της απόπτωσης, συνοδευόμενη από δραματική μείωση της ALP, ενός εκ των δεικτών διαφοροποίησης (Mansukhani et al., 2000). Επιπλέον, η έκφραση του *RUNX2* καθώς επίσης και του *TWIST1* παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ σε καλλιεργητικές συνθήκες ανάπτυξης υπήρχε μείωση της έκφρασης του *COL1A1* και της οστεοκαλσίνης και σε συνθήκες διαφοροποίησης δεν επαγόταν ή επαγόταν ασθενώς η έκφραση γονιδίων του πλέγματος, όπως η οστεοκαλσίνη. Μετά από προσθήκη εξωγενώς μορίων FGF υπήρξε πρώιμη παροδική επαγωγή της έκφρασης του *TWIST1* (Mansukhani et al., 2005). Ποντίκια ετερόζυγα για τη μεταλλαγή C342Y στον *Fgfr2* εμφανίζουν κρανιοσυνοστέωση και αυξημένη έκφραση της οστεοποντίνης (*Spp1*) στον κρανιακό θόλο, ενώ τα ομόζυγα για τη μεταλλαγή άτομα, τα οποία πέθαιναν περιγεννητικά, εμφάνιζαν έντονη παραμόρφωση του κρανίου, πολλαπλές συνοστεώσεις στον σκελετό και αυξημένη έκφραση του *RUNX2* (Eswarakumar et al., 2004). Οι Tanimoto et al., 2004 αναφέρουν ενίσχυση της έκφρασης

του RUNX2 σε σταθερούς κλώνους ανθρώπινων MG63 κυττάρων οστεοσαρκώματος που υπερεκφράζουν τον FGFR2IIIc, με ή χωρίς τη μεταλλαγή S252W.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τους Mansukhani et al., 2005 μόνο ως προς τη μείωση της έκφρασης του COL1A1 στα κύτταρα με την μεταλλαγή C342Y στον FGFR2 και στην αμετάβλητη έκφραση του TWIST1 τόσο σε αυτά όσο και στα κύτταρα με τη μεταλλαγή S252W. Επιπλέον συμφωνούν με τους Lomri et al., 1998, Lemonnier et al., 2000, 2001 ως προς την αύξηση της έκφρασης του COL1A1 σε κύτταρα από ασθενείς με σύνδρομο Apert που φέρουν τη μεταλλαγή S252W, αν και στη δική μας περίπτωση η αύξηση ήταν οριακή. Οι διαφορές που παρατηρούνται στα πειραματικά αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πιθανόν να οφείλονται και στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά είδη κυττάρων (οστεοβλάστες ανθρώπου ή ποντικού, δερματικοί ινοβλάστες) και ότι η ποσοτικοποίηση της έκφρασης έγινε με διαφορετικό τρόπο (Northern, Southern, real-time PCR) και σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας (ανάπτυξης ή διαφοροποίησης).

Τα ευρήματά μας ότι διαφορετικές ενεργοποιητικές μεταλλαγές του FGFR2 μεταβάλλουν το πρότυπο έκφρασης άλλων γονιδίων με διαφορετικό τρόπο ενισχύεται και από πιο πρόσφατα ευρήματα άλλων ερευνητικών ομάδων. Τα πρότυπα διαφορετικής έκφρασης γονιδίων που προέκυψαν από τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης πολλών γονιδίων μεταξύ περισοτικών ινοβλαστών που έφεραν τη μεταλλαγή C342Y στον FGFR2 πριν και μετά την προσθήκη του FGF2 που προάγει την ενεργοποίηση του υποδοχέα, δεν συμπίπτουν με αυτά των ινοβλαστών που έφεραν τη μεταλλαγή S252W, μετά από την ίδια επεξεργασία (Yeh et al., 2013). Οι ίδιοι ερευνητές συνέκριναν με τον ίδιο τρόπο τα πρότυπα διαφορετικής έκφρασης γονιδίων μετά από ενεργοποίηση με τον FGF2, μεταξύ φυσιολογικών και μεταλλαγμένων (+/S252W) ινοβλαστών, τα οποία ήταν πολύ διαφορετικά αλλά δεν αναφέρουν διαφορετική έκφραση των γονιδίων COL1A1, RUNX2 και TWIST1, τα οποία ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία.

### ***Πιθανή ερμηνεία διαφορετικού προτύπου έκφρασης***

Οι διαφορές που παρατηρούνται στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των ινοβλαστών από ασθενείς με διαφορετικές μεταλλαγές μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι κάθε μεταλλαγή προσδίδει ενίσχυση λειτουργίας στον υποδοχέα με διαφορετικό τρόπο. Ο μηχανισμός που οδηγεί στη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα λόγω της μεταλλαγής S252W είναι η αυξημένη

συνάφεια και η απώλεια της ειδικότητας πρόσδεσης των FGFs (Ibrahimi et al., 2004b). Από την άλλη, μεταλλαγές στην αμινοξική θέση C342 καταστρέφουν το δισουλφιδικό δεσμό που από την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του FGFR2 προβλέπεται ότι δημιουργείται μεταξύ των καταλοίπων C278 και C342, έχοντας ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της δομής της IgIII και την ύπαρξη ενός ελεύθερου, εκτεθειμένου καταλοίπου κυστεΐνης που επιτρέπει το διμερισμό των υποδοχέων μέσω της δημιουργίας διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, οδηγώντας σε συνεχή ενεργοποίησή τους ανεξάρτητα από την ύπαρξη των μορίων-προσδετών (Wilkie et al., 1995b). Πράγματι έχει δειχθεί πειραματικά ότι η μεταλλαγή C342Y στον FGFR2 οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίησή του και ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό είναι η δυνατότητα σχηματισμού σταθερών διμερών μεταξύ των μεταλλαγμένων υποδοχέων, στον οποίο εμπλέκονται δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των ελεύθερων καταλοίπων κυστεΐνης, ανεξάρτητα από την παρουσία μορίων-προσδετών (FGFs). Επιπλέον, η αλλαγή της διαμόρφωσης της περιοχής IgIII στο μεταλλαγμένο υποδοχέα είχε ως αποτέλεσμα την εξαιρετικά μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης των FGF-1 και FGF-2 (Mangasarian et al., 1997). Για τη μεταλλαγή C342R δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα σχετικά με το μηχανισμό δράσης της αν και αναμένεται να είναι ο ίδιος με αυτόν της C342Y. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι και το αμινοξύ το οποίο θα αντικαταστήσει την κυστεΐνη παίζει ρόλο στην μετέπειτα έκφραση άλλων γονιδίων, όπως δείχνουν και οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* μεταξύ των ινοβλαστών από τους 2 ασθενείς που έφεραν τις μεταλλαγές C342Y και C342R.

Συνοψίζοντας, οι διαφορές που παρατηρούνται στην έκφραση του *RUNX2* ή και του *TWIST1* στους δερματικούς ινοβλάστες ασθενών με μεταλλαγές στον FGFR2 υποδηλώνουν από τη μια πλευρά ότι οι δυο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες πιθανόν να συμμετέχουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι με τον FGFR2, επηρεάζοντας τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών, εφόσον παρατηρούνται διαφορές και στα επίπεδα έκφρασης του δείκτη διαφοροποίησης *COL1A1*. Επιπλέον, αντίθετα από το αναμενόμενο, οι μεταλλαγές του FGFR2 που οδηγούν σε κраниοσυνοστέωση επηρεάζουν τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων *COL1A1*, *RUNX2* και *TWIST1* με διαφορετικό τρόπο. Από την άλλη πλευρά, όμως, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό με τις παρούσες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας. Εξάλλου φαίνεται ότι οι επιπτώσεις των ενεργοποιητικών

μεταλλαγών του FGFR2 στην έκφραση ορισμένων γονιδίων είναι διαφορετικές ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης. Μελέτη της έκφρασης του RUNX2 και της ALP σε κύτταρα μυελού των οστών (bone marrow stromal cells) από Fgfr2<sup>C342Y/+</sup> ποντίκια, τα οποία καλλιιεργήθηκαν σε συνθήκες διαφοροποίησης προς την οστεοβλαστική σειρά, ανέδειξε αυξημένα επίπεδα του mRNA αυτών των γονιδίων τις πρώτες μέρες, και μειωμένα μετά τη 12<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η μεταλλαγή αυτή προάγει την έκφραση οστεοβλαστικών γονιδίων στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης, ενώ αντίθετα εμποδίζει τη διαφοροποίηση σε μεταγενέστερα στάδια. Στο πειραματικό αυτό μοντέλο δεν υπήρξε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του COL1A1 μεταξύ μεταλλαγμένων και φυσιολογικών κυττάρων σε κανένα στάδιο διαφοροποίησης (Liu et al., 2013).

### **5B2.2.2 Διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *TWIST1*, *RUNX2* και *COL1A1* λόγω μεταλλαγής στον *TWIST1***

Διαφορετικό πρότυπο αλλαγής της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων συγκρινόμενα με αυτά των μεταλλαγών στον FGFR2 δίνει και η μεταλλαγή Q122X στον TWIST1. Στους δερματικούς ινοβλάστες από την ασθενή 52 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου *COL1A1* και αύξηση της έκφρασης του *TWIST1* σε σχέση με το φυσιολογικό δείγμα ελέγχου, ενώ η έκφραση του RUNX2 παρέμεινε αμετάβλητη. Η αύξηση της έκφρασης του TWIST1 σε αυτό το δείγμα δεν ήταν αναμενόμενη, εφόσον ο μηχανισμός δράσης των μεταλλαγών του TWIST1 που οδηγούν σε κρανιοσυνοστέωση είναι η απλοανεπάρκεια. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με αυτά άλλων πειραματικών ομάδων. Συγκεκριμένα, πειράματα σε ανθρώπινους κρανιακούς οστεοβλάστες που έφεραν τη μεταλλαγή Y103X στον TWIST1, η οποία, όπως και η Q122X, οδηγεί στη δημιουργία μικρότερου μήκους πρωτεΐνης, η οποία στερείται της λειτουργικής περιοχής HLH, έδειξαν αυξημένη έκφραση του *COL1A1* και μειωμένα επίπεδα mRNA του *TWIST1* και του *RUNX2* (Yousfi et al., 2001, Guenou et al., 2005). Οι διαφορές αυτές πιθανόν να προκύπτουν από το γεγονός ότι η μελέτη της έκφρασης έγινε σε δυο διαφορετικούς τύπους κυττάρων και επιπλέον το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν από ασθενή 17 ετών, ενώ αυτό των Yousfi et al., 2001 και των Guenou et al., 2005 ήταν από βρέφος 3,5 μηνών. Πιθανόν λοιπόν, στους δερματικούς ινοβλάστες της εφήβου ασθενούς να υπάρχει κάποιος μηχανισμός που να επάγει την υπερέκφραση του TWIST1 προκειμένου να

αναπληρώσει την απώλεια της μισής δόσης της *TWIST1* πρωτεΐνης λόγω της απλοανεπάρκειας που προκαλεί η μεταλλαγή Q122X. Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα στην έκφραση των *TWIST1* και *COL1A1* είναι ακριβώς αντίστροφα μεταξύ του δικού μας πειράματος και αυτών των Yousfi et al., 2001 και των Guenou et al., 2005, πιθανόν να υποδηλώνει ότι υπάρχει η ίδια λειτουργική σχέση μεταξύ τους, δηλαδή μείωση των επιπέδων του *TWIST1* προκαλεί αύξηση της έκφρασης του *COL1A1*, ενώ η αύξησή του το αντίστροφο, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

### **5B2.2.3 Διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *TWIST1*, *RUNX2* και *COL1A1* μεταξύ ασθενών με συνδρομική και μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση**

Και στις δυο περιπτώσεις μη συνδρομικής συνοστέωσης, οι οποίες δε φέρουν μεταλλάγες σε κάποιο από τα γενετικά τμήματα που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία, δηλαδή στο εξόνιο 7 του γονιδίου *FGFR1*, στα εξόνια 8, 10, 14 και 16 του *FGFR2*, στα εξόνια 7 και 10 του *FGFR3*, στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (εξόνιο 1) του *TWIST1* και σε όλα τα εξόνια (5) του *EFNB1*, αλλά ούτε και μικροελλείψεις/μικροδιπλασιασμούς στα παραπάνω γονίδια δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση των γονιδίων *RUNX2* και *COL1A1*. Αν και στον ασθενή 35 που παρουσίαζε μη συνδρομική συνοστέωση της δεξιάς στεφανιαίας ραφής η έκφραση του γονιδίου *TWIST1* παρέμεινε αμετάβλητη, στον ασθενή 45 (μη συνδρομική συνοστέωση της οβελιαίας ραφής) παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του *TWIST1*. Σύγκριση της έκφρασης του *RUNX2* μεταξύ οστεοβλαστών από ασθενείς με μη συνδρομική συνοστέωση της οβελιαίας, της μετωπιαίας, της στεφανιαίας ή της λαμβδοειδούς ραφής μονόπλευρα που δεν έφεραν όμως μεταλλάγες στα γονίδια *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2* και *EFNB1* (δυο από αυτούς με μετωπιαία συνοστέωση είχαν διπλασιασμό του γονιδίου *RUNX2*) και από φυσιολογικά άτομα δεν ανέδειξε διαφορές στα επίπεδα της έκφρασής του (Mefford et al., 2010). Δύο μόνο μεγάλες μελέτες έκφρασης γονιδίων έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα από ασθενείς με μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση, τα αποτελέσματα των οποίων δε συμφωνούν πλήρως μεταξύ τους (Stampfer et al., 2011, Rojas-Peña et al., 2014). Οι Stampfer et al., 2011 αναφέρουν ότι ενώ το πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων είναι αρκετά παρόμοιο για τη στεφανιαία και τη μετωπιαία συνοστέωση, δε συμβαίνει το ίδιο και για τις περιπτώσεις συνοστέωσης της οβελιαίας ραφής, πιθανόν λόγω του ότι η αιτιολογία της μορφής αυτής συνοστέωσης ποικίλει

περισσότερο από τις άλλες, οφειλόμενη τόσο σε γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Από τη άλλη οι Rojas-Peña et al., 2014 διαφοροποιούν τις περιπτώσεις κρανιοσυνοστεώσης με βάση τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης που βρήκαν σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ελέγχου και τις ομαδοποιούν σε 3 υποομάδες, οι οποίες όμως δε συμπίπτουν με την ομαδοποίηση ανάλογα με το ποια ραφή είναι συνοστεωμένη. Σε μια από αυτές τις υποομάδες βρήκαν αύξηση της έκφρασης του *TWIST1*, όπως και στο δικό μας δείγμα από τον ασθενή με μη συνδρομική συνοστεώση της οβελιαίας ραφής, ενώ σε καμία από τις 2 αυτές μελέτες δεν αναφέρεται διαφοροποίηση της έκφρασης του *RUNX2* ή του *COL1A1*.

Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, δεν υπήρχαν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* μεταξύ του δείγματος από τον ασθενή 52 που εμφάνιζε πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως και του φυσιολογικού δείγματος ελέγχου.

### **5B.3 ΔΥΣΚΟΛΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΙΔΑΝΙΚΟΥ ΜΟΝΕΛΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗΣ ΛΟΓΩ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Το μονοπάτι της οστεοβλαστογένεσης και κατ'επέκταση της δημιουργίας του κρανιακού θόλου και του σχηματισμού των ραφών είναι εξαιρετικά περίπλοκο λόγω της συμμετοχής σε αυτό πάρα πολλών παραγόντων. Το οστό αποτελεί έναν πολύ δυναμικό ιστό, ο οποίος ρυθμίζεται από ιστοειδικούς μεταγραφικούς και αναπτυξιακούς παράγοντες αλλά και ομοιωτικά γονίδια, οι οποίοι ενεργοποιούνται τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ιστών και των οργάνων στην εμβρυική ζωή, όσο και στο ώριμο οστό μεταγεννητικά. Τα μεμβρανώδη οστά από τα οποία αποτελείται το κρανίο σχηματίζονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται σε οστεοπρογονικά κύτταρα και στη συνέχεια σε οστεοβλάστες κάτω από την επιρροή ποικίλων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών. Κατά τη διαδικασία αυτή πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η μεταγραφική ρύθμιση των εμπλεκόμενων παραγόντων με την οποία καθορίζεται η χωροχρονική έκφραση των κατάλληλων γονιδίων. Η πολυπλοκότητα της οστεοβλαστογένεσης ενισχύεται περαιτέρω από την ανακάλυψη μετα-μεταγραφικής ρύθμισης κατά τη δημιουργία των οστών μέσω μη-κωδικών μικρο-RNAs (Witkowska-Zimny, 2012). Μια επιπλέον δυσκολία στη μελέτη σηματοδοτικών

μονοπατιών αποτελεί η αλληλεπίδρασή τους με άλλα παραπλήσια μονοπάτια. Εκτός των μονοπατιών που ενεργοποιούνται άμεσα από την FGF/FGFR σηματοδότηση και παίζουν ρόλο στην συνοστέωση των ραφών όπως του PLC/PKC, του MAPK και του PI3K/Akt, τα οποία είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην έκφραση οστεοβλαστικών γονιδίων (Miraoui & Marie, 2010, Marie, 2012, Du, 2012) υπάρχει αλληλεπίδραση και με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την τύχη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών και συμβάλλουν στην κρανιοσυνοστέωση, όπως τα WNT, BMP, EGFR και PDGFRα μονοπάτια. Η ποικιλία και η ιστοειδικότητα των παραγόντων που συμμετέχουν στην οστεοβλαστογένεση, η ενεργοποίησή τους σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη δημιουργία των κρανιακών ραφών και των οστών του κρανίου αλλά και η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών μεταξύ τους καθιστούν δύσκολη τη δημιουργία και ρύθμιση πειραματικών μοντέλων μελέτης της κρανιοσυνοστέωσης που να ανταποκρίνονται πλήρως στις πραγματικές συνθήκες.

## **5Γ. ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

Αν και απαιτείται περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* στους δερματικούς ινοβλάστες, τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της κρανιοσυνοστέωσης αλλά με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με την περίπτωση. Αντίθετα με τις προσπάθειες δημιουργίας ενός απλοποιημένου, ενιαίου μοντέλου το οποίο θα ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης, φαίνεται ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται τόσο από τις μεταλλάξεις του FGFR2, του TWIST1, αλλά και στις μη συνδρομικές περιπτώσεις είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους. Από όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πρώτη στοχευμένη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική ή μη συνδρομική συνοστέωση και από άτομα χωρίς συνοστέωση. Μόνο οι Bochukova et al., 2009 πραγματοποίησαν πειράματα έκφρασης σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική ή μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση με

τη χρήση τεχνολογίας μικροσυστοιχιών αλλά η σύγκριση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων έγινε μεταξύ των δυο αυτών ομάδων ασθενών και όχι με φυσιολογικά άτομα.

Η περαιτέρω μελέτη του συστήματος των δερματικών ινοβλαστών και η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας είναι απαραίτητες για την αξιοποίηση του μοντέλου αυτού στον έλεγχο της διαφοροποίησης της έκφρασης γονιδίων μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με κρανιοσυνοστέωση. Για παράδειγμα, ο έλεγχος της έκφρασης σχετικών με την οστεοβλαστογένεση γονιδίων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες διαφοροποίησης των ινοβλαστών προς την οστεοβλαστική σειρά και μάλιστα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, ώστε να ανταποκρίνεται περισσότερο στις πραγματικές συνθήκες διαφοροποίησης των οστεοβλαστών κατά το σχηματισμό και τη σύντηξη των κρανιακών ραφών. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι τόσο η έκφραση του *TWIST1* όσο και του *RUNX2* μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης των οστεοβλαστών είτε κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είτε μεταγεννητικά (Rice et al., 2000, Maruyama et al., 2007). Η διαφοροποίηση των ινοβλαστών προς την οστεοβλαστική σειρά μπορεί να επαχθεί είτε με την προσθήκη οστεογενετικών συμπληρωμάτων στο καλλιεργητικό υλικό, όπως dexamethasone, ασκορβικό οξύ, βιταμίνη D3, β-γλυκεροφωσφορικό (Witkowska-Zimny, 2012), είτε, επιπλέον, επάγοντας ή αποσιωπώντας συγκεκριμένους παράγοντες που παίζουν θετικό ή αρνητικό ρόλο στην οστεοβλαστογένεση, είτε, τέλος, με την προσθήκη, εξωγενώς, μορίων που προάγουν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με την κρανιοσυνοστέωση. Για παράδειγμα, υπερέκφραση του *RUNX2* σε δερματικούς ινοβλάστες ποντικού οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης οστεοβλαστικών μαρτύρων, όπως η *OC* και η *BSP* (Ducy et al., 1997). Επιπλέον, δερματικοί ινοβλάστες από *Smad3<sup>-/-</sup>* ποντίκια, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο που προάγει την οστεογένεση (β-γλυκεροφωσφορικό, ασκορβικό οξύ) απέκτησαν φαινότυπο που ομοιάζει στους οστεοβλάστες, συνοδευόμενο από ενεργοποίηση του *RUNX2*, έκφραση οστεοβλαστοειδικών γονιδίων, όπως τα *ALP*, *OC* και *BSP*, καθώς και την ικανότητα εναπόθεσης ασβεστίου και μεταλλοποίησης του εξωκυττάριου πλέγματος (Hjelmeland et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν συνολικά 9 διαφορετικές μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* και *EFNB1*, εκ των οποίων οι 3 ήταν νέες, μια ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1* και ένας πολυμορφισμός στον *FGFR3* μετά από στοχευμένο έλεγχο των επιθυμητών περιοχών. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε μοριακή διάγνωση σε 14 από τους 47 ασθενείς που



ελέγχθηκαν. Η δυνατότητα ελέγχου περισσότερων γενετικών τόπων είναι πολύ χρήσιμη στις περιπτώσεις ασθενών με κρανιοσκελετικές δυσπλασίες, όπου η υποκείμενη μοριακή αιτιολογία ποικίλλει και θα επιτρέψει τη μοριακή διάγνωση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο τόσο για το μοριακό έλεγχο όσο και για τον προσδιορισμό επιπέδων έκφρασης γονιδίων ασθενών με κρανιοσκελετικές δυσπλασίες αποτελεί η τεχνική της αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Αν και αρχικά η τεχνολογία NGS είχε χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος, έχουν αναπτυχθεί πολλές, πιο στοχευμένες εφαρμογές μεταξύ των οποίων το exome sequencing και το RNA sequencing. Το exome sequencing επιτρέπει τη μελέτη όλων των γνωστών περιοχών που κωδικοποιούν για γονίδια ενώ με το RNA sequencing ελέγχεται ολόκληρο το μεταγράφημα. Πρόσφατα με τη χρήση του exome sequencing προστέθηκε ένα νέο γονίδιο στη λίστα των γονιδίων που προκαλούν πρόωρη συνοστέωση των κρανιακών ραφών. Οι Sharma et al., 2013 εντόπισαν μεταλλαγές στο γονίδιο *TCF12* (Transcription Factor 12), το οποίο κωδικοποιεί μια Κλάσης I bHLH E-πρωτεΐνη, που ετεροδιμερίζεται με τον TWIST1, σε ασθενείς με κρανιοσυνοστέωση. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, οι Rojas-Reña et al., 2014 μελέτησαν την έκφραση πολλών γονιδίων μεταξύ φυσιολογικών δειγμάτων και ασθενών με μη συνδρομική κρανιοσυνοστέωση με τη μεθοδολογία αλληλούχησης RNA (RNA-seq). Η χρήση αυτών των τεχνικών επιτρέπει τον ταυτόχρονο έλεγχο πολλών διαφορετικών γενετικών τόπων, προσδιορίζοντας ποσοτικά τον αριθμό των αντιγράφων τους καθώς επίσης και τα επίπεδα έκφρασής τους, ενώ παράλληλα μπορεί να εντοπίζει μεταλλαγές σε αυτά (Koboldt et al., 2013, Wang et al., 2009). Η εφαρμογή της πολύτιμης αυτής τεχνολογίας στον τομέα των κρανιοσκελετικών δυσπλασιών θα συμβάλει καταλυτικά τόσο στην ανάδειξη της υποκείμενης γενετικής αιτιολογίας όσο και στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού που οδηγεί στις ανωμαλίες αυτές.



## **6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κρανιοσκελετικές δυσπλασίες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις σκελετικές δυσπλασίες και τις κρανιοσυνοστεώσεις. Η κρανιοσυνοστεώση, η πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών, διαιρείται σε μη συνδρομική και συνδρομική. Τα συχνότερα σύνδρομα κρανιοσυνοστεώσης Muenke, Crouzon και Crouzon με μελανίζουσα ακάνθωση, Apert, Pfeiffer, Saethre-Chotzen και CFNS οφείλονται σε μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR1-3*, *TWIST1* και *EFNB1*.

Οι υποδοχείς *FGFR1-3* και οι μεταγραφικοί παράγοντες *TWIST1* και *RUNX2* παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Πιθανόν να αλληλοεπιδρούν κατά την οστεοβλαστογένεση και τη δημιουργία των κρανιακών ραφών, δηλαδή να συμμετέχουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι, αν και λόγω των αμφιλεγόμενων πειραματικών δεδομένων, δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστός ο τρόπος. Η κρανιοσυνοστεώση λόγω μεταλλαγών στον *FGFR2* και ίσως στον *TWIST1* οφείλεται σε πρόωμη ή προβληματική διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στα οστεογενετικά μέτωπα, στην οποία μπορεί να εμπλέκεται και η αύξηση του πολλαπλασιασμού τους. Ενδεχομένως όμως, να προκύπτει μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι :

A) Η ανίχνευση της υποκείμενης γενετικής βάσης σε ασθενείς με κρανιοσκελετικές ανωμαλίες, η οποία θα συμβάλλει στο βέλτιστο και λεπτομερή συσχετισμό γονοτύπου-φαινοτύπου και στην καλύτερη διαχείριση των ασθενών.

B) Η κατανόηση του σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί σε κρανιοσυνοστεώση. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν να διερευνηθούν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων *RUNX2* και *TWIST1*, που είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών, καθώς και του γονιδίου *COL1A1*, που αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης των οστεοβλαστών μεταξύ ασθενών με κρανιοσυνοστεώση, συνδρομικού τύπου ή μη και φυσιολογικών ατόμων σε καλλιέργειες δερματικών ινοβλαστών που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες ανάπτυξης.

Γ) Η προτυποποίηση της καλλιέργειας των δερματικών ινοβλαστών ως πιθανό μοντέλο μελέτης της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών, του οποίου η χρησιμότητα αξίζει να διερευνηθεί για δύο βασικούς λόγους:

τον αναπτυξιακό συσχετισμό τους με τους οστεοβλάστες, αντιπροσωπεύοντας έναν σχετικό με αυτούς κυτταρικό τύπο και την ευκολία χειρισμού τους.

Για την παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν βιολογικά υλικά (αίμα/δέρμα) από 48 ασθενείς με κρανιοσκελετικές ανωμαλίες και 2 φυσιολογικά ως προς την κρανιοσυνοστέωση άτομα (πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως και φυσιολογικό δείγμα ελέγχου) που προσήλθαν στο Ελληνικό Κρανιοπροσωπικό Κέντρο του Νοσοκομείου ΜΗΤΕΡΑ.

Ο μοριακός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε με ανάλυση αλληλουχίας, AFLP ή/και MLPA επιλεγμένων γενετικών τόπων, ανέδειξε μεταλλαγές σε 14/46 ασθενείς με κρανιοσυνοστέωση (μοριακή διάγνωση σε ποσοστό περίπου 30%). Βρέθηκαν συνολικά 9 διαφορετικές μεταλλαγές στα γονίδια *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* και *EFNB1*, εκ των οποίων οι 3 ήταν νέες, μια ετερόζυγη έλλειψη του γονιδίου *TWIST1* και ένας πολυμορφισμός στον *FGFR3*. Δύο από τις νέες μεταλλαγές, η παρανοηματική E125K και η πλαισιοτροποποιητική L240fsX79, βρίσκονται στο γονίδιο *EFNB1*. Η μεταλλαγή E125K στην περιοχή *erhrip* της *EFNB1* αναμένεται να παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τους υποδοχείς της *Erh*. Η μεταλλαγή L240fsX79 οδηγεί στη δημιουργία μικρότερης, πιθανόν ασταθούς πρωτεΐνης. Η τρίτη νέα μεταλλαγή, η παρανοηματική L138P μέσα στην υψηλά συντηρημένη περιοχή HLH του παράγοντα *TWIST1* πιθανόν να παρεμποδίζει την πρόσδεσή του στο DNA.

Η σημασία του μοριακού ελέγχου ασθενών με κρανιοσυνοστέωση είναι μεγάλη γιατί επιτρέπει το βέλτιστο και λεπτομερή συσχετισμό γονοτύπου-φαινοτύπου για κάθε ένα από τα σύνδρομα και μπορεί να οδηγήσει σε μοριακή διάγνωση, επιτρέποντας τον ορθό χαρακτηρισμό του συνδρόμου, την κατάλληλη κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς, την παροχή γενετικής συμβουλευτικής και τον προγεννητικό έλεγχο.

Η μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* που είναι γνωστό ότι εκφράζονται στους οστεοβλάστες, παίζοντας σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους, πραγματοποιήθηκε σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική κρανιοσυνοστέωση, που έφεραν μεταλλαγές είτε στο γονίδιο *FGFR2*, είτε στο *TWIST1*, από ασθενείς με μη συνδρομική συνοστέωση, από έναν ασθενή με πλαγιοκεφαλία εκ θέσεως και ένα φυσιολογικό άτομο, μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες ανάπτυξης. Στους ασθενείς διαπιστώθηκαν διαφορές των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, οι οποίες αν και μικρές υποδηλώνουν ένα διαφορετικό πρότυπο

έκφρασης, τόσο μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων όσο και ανάμεσα στα παθολογικά δείγματα, συγκρινόμενα μεταξύ τους. Αν και απαιτείται περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* στους δερματικούς ινοβλάστες, τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι οι παράγοντες αυτοί εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι της κρανιοσυνοστέωσης αλλά με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με την περίπτωση. Αντίθετα με τις προσπάθειες δημιουργίας ενός απλοποιημένου, ενιαίου μοντέλου το οποίο θα ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις κρανιοσυνοστέωσης, φαίνεται ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται τόσο από τις μεταλλάξεις του *FGFR2*, του *TWIST1*, αλλά και στις μη συνδρομικές περιπτώσεις είναι πολύ διαφορετικά μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι η πρώτη στοχευμένη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *RUNX2*, *TWIST1* και *COL1A1* σε δερματικούς ινοβλάστες από ασθενείς με συνδρομική ή μη συνδρομική συνοστέωση και από άτομα χωρίς συνοστέωση.

## **7. SUMMARY**

## 7. SUMMARY

Cranioskeletal dysplasias can be divided into two major groups: skeletal dysplasias and craniosynostosis. Craniosynostosis, the premature fusion of cranial sutures is further divided into syndromic and non syndromic. The common craniosynostosis syndromes Muenke, Crouzon/Crouzon with acanthosis nigricans, Apert, Pfeiffer, Saethre-Chotzen and CFNS are caused by mutations in *FGFR1-3*, *TWIST1* and *EFNB1* genes.

FGF receptors 1-3 as well as the transcription factors *TWIST1* and *RUNX2* play very important roles in controlling osteoblast proliferation and differentiation. Probably, they interact during osteoblastogenesis and suture formation, thus belonging to the same pathway, even though the way they interact is not clear, due to inconsistency of experimental results.

Craniosynostosis induced by *FGFR2* and maybe *TWIST1* mutations is the result of premature or improper osteoblast differentiation at bone fronts in which increased cell proliferation maybe involved as well, following several different mechanisms.

The aims of this study are:

A) Detection of underlying genetic cause in patients with cranioskeletal dysplasias, which will contribute in more accurate genotype-phenotype correlation as well as in proper patient management.

B) Understanding the signaling pathway leading to craniosynostosis. In order to succeed this we chose to study relative expression levels of the transcription factors *RUNX2* and *TWIST1*, known to play important roles in the regulation of osteoblast differentiation, as well as *COL1A1*, as a differentiation marker, in patients with syndromic or non syndromic craniosynostosis and normal individuals, in skin fibroblast cell cultures under growth conditions.

C) Development of skin fibroblast cultures as a potential model for the study of differential expression of genes related to premature suture fusion. This model's utility is worth evaluating for two reasons: fibroblasts are developmentally related to osteoblasts, therefore representing a particularly relevant cell type and they can be easily cultured and manipulated.

For this study biological samples (blood/skin) were collected from 48 patients with cranioskeletal anomalies and from 2 normal regarding synostosis individuals (positional



plagiocephaly and normal control sample), who presented in the Hellenic Craniofacial center at MITERA Hospital.

Molecular analysis of selected genetic loci using sequencing, AFLP and/or MLPA revealed mutations in 14/46 craniosynostosis patients (molecular diagnosis at ~30%). In total, 9 different mutations were found in *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* and *EFNB1* genes, of which 3 were novel, a heterozygous *TWIST1* gene deletion and a *FGFR3* polymorphism. Two of the novel mutations, the missense E125K and the frameshift L240fsX79, are within *EFNB1* gene. E125K mutation, which lies within ephrin domain of *EFNB1*, is expected to disrupt the interaction between the Eph receptor and ephrin B1 ligand. L240fsX79 mutation results in a truncated, probably unstable protein product. The third novel mutation, missense L138P which lies within highly conserved HLH domain of *TWIST1*, possibly results in loss of DNA binding capacity of the transcription factor.

Molecular genetic testing of craniosynostosis patients is of great importance because it allows accurate genotype-phenotype correlation and can lead to molecular diagnosis, thus allowing proper patient's management, genetic counseling and prenatal diagnosis.

Study of relative expression levels of *RUNX2*, *TWIST1* and *COL1A1* genes, known to be expressed in osteoblasts and play important role in their proliferation and differentiation, was performed in skin fibroblasts from patients with syndromic craniosynostosis, carrying mutations either in *FGFR2* or *TWIST1* genes, from patients with non syndromic synostosis, from one patient with positional plagiocephaly and from a normal individual. Cells were cultured under growth conditions.

The differences in gene expression levels observed in our patients, although relatively small, reveal a differentiated expression pattern between pathogenic and normal samples, as well as among pathogenic samples compared to each other.

Even though further studies of *RUNX2*, *TWIST1* and *COL1A1* gene expression are required in skin fibroblasts, experimental results of this study point out that all of these genes are involved in craniosynostosis signaling pathway, but in different ways, depending on the context.

As opposed to the efforts in creating a simple, unifying model, applied to all craniosynostosis cases, it seems that signaling pathways triggered either by *FGFR2* and *TWIST1* mutations or in isolated synostosis cases are very different compared to each other.

These results are the first targeted study of *RUNX2*, *TWIST1* and *COL1A1* gene expression in skin fibroblasts from patients with syndromic or non syndromic craniosynostosis and from individuals without synostosis.

## **8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adès LC, Sullivan K, Biggin A, Haan EA, Brett M, Holman KJ, Dixon J, Robertson S, Holmes AD, Rogers J, Bennetts B (2006). FBN1, TGFBR1, and the Marfan-craniosynostosis/mental retardation disorders revisited. *Am J Med Genet A*. 140(10):1047-58.

Barroso E, Pérez-Carrizosa V, García-Recuero I, Glucksman MJ, Wilkie AO, García-Minaur S, Heath KE (2011). Mild isolated craniosynostosis due to a novel FGFR3 mutation, p.Ala334Thr. *Am J Med Genet A*. 155A(12):3050-3.

Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, Clarke LA, Szabo J, Francomano CA, Muenke M (1996). Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet*. 14:174–176.

Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sasic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6:423–435.

Bochukova EG, Roscioli T, Hedges DJ, Taylor IB, Johnson D, David DJ, Deininger PL, Wilkie AO (2009). Rare mutations of FGFR2 causing apert syndrome: identification of the first partial gene deletion, and an Alu element insertion from a new subfamily. *Hum Mutat*. 30(2):204-11.

Bochukova EG, Soneji S, Wall SA, Wilkie AO (2010). Scalp fibroblasts have a shared expression profile in monogenic craniosynostosis. *J Med Genet*. 47(12):803-8.

Bonaventure J, El Ghouzzi V (2003). Molecular and cellular bases of syndromic craniosynostoses. *Expert Rev Mol Med*. 5(4):1-17.

Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F (1998). The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 7:945–957.

Boyadjiev SA; International Craniosynostosis Consortium (2007). Genetic analysis of non-syndromic craniosynostosis. *Orthod Craniofac Res*. 10(3):129-37.

Carinci F, Bodo M, Tosi L, Francioso F, Evangelisti R, Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Baroni T, Stabellini G, Carinci P, Bellucci C, Lilli C, Volinia S (2002). Expression profiles of craniosynostosis-derived fibroblasts. *Mol Med*. 8(10):638-44.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 127(8):1671-9.

Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park CY, Shim WJ, Lim DS (2008). Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev.* 17(4):725-36.

Cochard L (2002). Άτλας βασικών ιατρικών επιστημών II. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

Cohen MM Jr (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140(23):2646-706.

Cohen MM Jr (2009). Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A* 149A(12):2629-46.

Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB (2006). Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Dev Dyn.* 235(5):1345-57.

Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Mercado MA, Dowell K, Yang X, Lindner V, Friesel RE, Spicer DB (2008). Twist1 homodimers enhance FGF responsiveness of the cranial sutures and promote suture closure. *Dev Biol.* 318(2):323-34.

Cornejo-Roldan LR, Roessler E, Muenke M (1999). Analysis of the mutational spectrum of the FGFR2 gene in Pfeiffer syndrome. *Hum Genet* 104(5):425-31.

Coussens AK, Wilkinson CR, Hughes IP, Morris CP, van Daal A, Anderson PJ, Powell BC (2007). Unravelling the molecular control of calvarial suture fusion in children with craniosynostosis. *BMC Genomics* 8:458.

Cunningham ML, Seto ML, Ratisoontorn C, Heike CL, Hing AV (2007). Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res.* 10(2):67-81.

De Ravel TJ, Taylor IB, Van Oostveldt AJ, Fryns JP, Wilkie AO (2005). A further mutation of the FGFR2 tyrosine kinase domain in mild Crouzon syndrome. *Eur J Hum Genet* 13(4):503-5.

Doherty ES, Lacbawan F, Hadley DW, Brewer C, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Rosenbaum K, Domingo DL, Hart TC, Brooks BP, Immken L, Lowry RB, Kimonis V, Shanske AL, Jehee FS, Bueno MR, Knightly C, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Muenke M (2007). Muenke syndrome (FGFR3-related craniosynostosis): expansion of the phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 143A(24):3204-15.

Du X, Xie Y, Xian CJ, Chen L (2012). Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol.* 227(12):3731-43.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289(5484):1501-4.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation* (1997). *Cell* 89(5):747-54.

Echelard Y, Vassileva G, McMahon AP (1994). Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS. *Development*. 120(8):2213-24.

Edwards CM, Mundy GR (2008). Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci*. 5:263–272.

El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*. 15(1):42-6.

El Ghouzzi V, Legeai-Mallet L, Aresta S, Benoist C, Munnich A, de Gunzburg J, Bonaventure J (2000). Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. *Hum Mol Genet*. 9(5):813-9.

Escobar LF, Hiatt AK, Marnocha A (2009). Significant phenotypic variability of Muenke syndrome in identical twins. *Am J Med Genet A*. 149A(6):1273-6.

Eswarakumar VP, Horowitz MC, Locklin R, Morriss-Kay GM, Lonai P (2004). A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12555–12560.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J (2005). Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16(2):139-49.

Fanganiello RD, Sertié AL, Reis EM, Yeh E, Oliveira NA, Bueno DF, Kerkis I, Alonso N, Cavalheiro S, Matsushita H, Freitas R, Verjovski-Almeida S, Passos-Bueno MR (2007). Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. *Mol Med*. 13(7-8):422-42.

Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, Ogita K, Komori T (2004). Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol*. 166(1):85-95.

Gilbert SF (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates - NCBI Bookshelf (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10065/>)

Glaser RL, Jiang W, Boyadjiev SA, Tran AK, Zachary AA, Van Maldergem L, Johnson D, Walsh S, Oldridge M, Wall SA, Wilkie AO, Jabs EW (2000). Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndrome and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet*. 66(3):768-77.

Golla A, Lichner P, von Gernet S, Winterpacht A, Fairley J, Murken J, Schuffenhauer S (1997). Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation P250R in a large craniosynostosis family. *J Med Genet*. 34(8):683-4.

Goriely A, McVean GA, van Pelt AM, O'Rourke AW, Wall SA, de Rooij DG, Wilkie AO (2005). Gain-of-function amino acid substitutions drive positive selection of FGFR2 mutations in human spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(17):6051-6.

Grabb and Smith's Plastic Surgery, Fifth edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, chapter 26.

Guenou H, Kaabeche K, Mée SL, Marie PJ (2005). A role for fibroblast growth factor receptor-2 in the altered osteoblast phenotype induced by Twist haploinsufficiency in the Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet.* 14(11):1429-39.

Hacker A, Guthrie S (1998). A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. *Development.* 125(17):3461-72.

Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, Nakatani Y, Keddes L (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 96(3):405-13.

Hamidouche Z, Fromigué O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC, Ebert R, Jakob F, Miraoui H, Marie PJ (2010). Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 224(2):509-15.

Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25(19):3957-8.

Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, Cowan CA, Henkemeyer M, Nikolov DB (2001). Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414:933–938.

Hjelmeland AB, Schilling SH, Guo X, Quarles D, Wang XF (2005). Loss of Smad3-mediated negative regulation of Runx2 activity leads to an alteration in cell fate determination. *Mol Cell Biol.* 25(21):9460-8.

Holmes G, Rothschild G, Roy UB, Deng CX, Mansukhani A, Basilico C (2009). Early onset of craniosynostosis in an Apert mouse model reveals critical features of this pathology. *Dev Biol.* 328(2):273-84.

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet.* 15(1):36-41.

Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, Jabs EW, Van Vliet G, Sack J, Flück CE, Miller WL (2005). Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet.* 76(5):729-49.

Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Linhardt RJ, Mohammadi M (2004a). Proline to arginine mutations in FGF receptors 1 and 3 result in Pfeiffer and Muenke craniosynostosis syndromes through enhancement of FGF binding affinity. *Hum Mol Genet* 13:69–78.

Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Itoh N, Linhardt RJ, Mohammadi M (2004b). Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct

pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Hum Mol Genet* 13:2313–2324.

Ingersoll RG, Paznekas WA, Tran AK, Scott AF, Jiang G, Jabs EW (2001). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2): genomic sequence and variations. *Cytogenet Cell Genet.*94(3-4):121-6.

Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM (1999). Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development* 126(24):5611-20.

Jabs EW, Müller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, et al (1993). A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75(3):443-50.

Janssen A, Hosen MJ, Jeannin P, Coucke PJ, De Paepe A, Vanakker OM (2013). Second family with the Boston-type craniosynostosis syndrome: novel mutation and expansion of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A.* 161(9):2352-7.

Jehee FS, Krepischi-Santos AC, Rocha KM, Cavalcanti DP, Kim CA, Bertola DR, Alonso LG, D'Angelo CS, Mazzeu JF, Froyen G, Lugtenberg D, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Passos-Bueno MR (2008). High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array-based comparative genome hybridisation. *J Med Genet.* 45(7):447-50.

Jenkins D, Baynam G, De Catte L, Elcioglu N, Gabbett MT, Hudgins L, Hurst JA, Jehee FS, Oley C, Wilkie AO (2011). Carpenter syndrome: extended RAB23 mutation spectrum and analysis of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mutat.* 32(4).

Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development.* 127(8):1607-16.

Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol.* 241(1):106-16.

Johnson D, Horsley SW, Moloney DM, Oldridge M, Twigg SR, Walsh S, Barrow M, Njølstad PR, Kunz J, Ashworth GJ, Wall SA, Kearney L, Wilkie AO (1998). A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am J Hum Genet.* 63(5):1282-93.

Johnson D, Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM (2000a). Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for twist in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev.* 91(1-2):341-5.

Johnson D, Wall SA, Mann S, Wilkie AO (2000b). A novel mutation, Ala315Ser, in FGFR2: a gene-environment interaction leading to craniosynostosis? *Eur J Hum Genet.* 8(8):571-7.

Johnson and Wilkie (2011). Craniosynostosis. *Eur.J.Hum.Genet.* 19(4):369-76.



Kan R, Twigg SR, Berg J, Wang L, Jin F, Wilkie AO (2004). Expression analysis of an FGFR2 IIIc 5' splice site mutation (1084+3A->G). *J Med Genet.* 41(8):e108.

Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO (2002). Genomic screening of fibroblast growth factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 70:472–486.

Kariminejad A, Kariminejad R, Tzschach A, Ullmann R, Ahmed A, Asghari-Roodsari A, Salehpour S, Afroozan F, Ropers HH, Kariminejad MH (2009). Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: association of extra copy of MSX2 with craniosynostosis. *Am J Med Genet A.* 149A(7):1544-9.

Kim HJ, Kim JH, Bae SC, Choi JY, Kim HJ, Ryoo HM (2003). The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *J Biol Chem.* 278(1):319-26.

Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA (2007). Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol.* 14(3):150-61. Review.

Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell.* 155(1):27-38.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-64.

Komori T (2005). Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95(3):445-53.

Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development (2011). *J Cell Biochem.* 112(3):750-5.

Kress W, Petersen B, Collmann H, Grimm T (2000a). An unusual FGFR1 mutation (fibroblast growth factor receptor 1 mutation) in a girl with non-syndromic trigonocephaly. *Cytogenet Cell Genet* 91:138–140.

Kress W, Collmann H, Bösse M, Halliger-Keller B, Mueller CR (2000b). Clustering of FGFR2 gene mutations in patients with Pfeiffer and Crouzon syndromes (FGFR2 associated craniosynostoses). *Cytogenet Cell Genet* 91:1347

Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Büsse-Ratzka M, Kunz J, Reinhart E, Schäfer WD, Sold J, Hoppe F, Pahnke J, Trusen A, Sörensen N, Krauss J, Collmann H (2006). Saethre-Chatzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet.* 14(1):39-48.

Lajeunie E, Cameron R, El Ghouzzi V, de Parseval N, Journeau P, Gonzales M, Delezoide AL, Bonaventure J, Le Merrer M, Renier D (1999). Clinical variability in patients with Apert's syndrome. *J Neurosurg.* 90(3):443-7.

Lajeunie E, Heuertz S, El Ghouzzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, Bonaventure J (2006). Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet* 14:289–298.

Lemonnier J, Delannoy P, Hott M, Lomri A, Modrowski D, Marie PJ (2000). The Ser252Trp fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) mutation induces PKC-independent downregulation of FGFR-2 associated with premature calvaria osteoblast differentiation. *Exp Cell Res* 256:158–67.

Lemonnier J, Hay E, Delannoy P, Lomri A, Modrowski D, Caverzasio J, Marie PJ (2001). Role of N-cadherin and protein kinase C in osteoblast gene activation induced by the S252W fibroblast growth factor receptor 2 mutation in Apert craniosynostosis. *J Bone Miner Res* 16:832–45.

Lenton KA, Nacamuli RP, Wan DC, Helms JA, Longaker MT (2005). Cranial suture biology. *Curr Top Dev Biol.*66:287-328.

Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT (2012). Cranial suture biology: from pathways to patient care. *J Craniofac Surg.* 1:13-9.

Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol.* 155(1):157-66.

Liu J, Kwon TG, Nam HK, Hatch NE (2013). Craniosynostosis-associated Fgfr2(C342Y) mutant bone marrow stromal cells exhibit cell autonomous abnormalities in osteoblast differentiation and bone formation. *Biomed Res Int.*2013:292506.

Lomri A, Lemonnier J, Hott M, de Parseval N, Lajeunie E, Munnich A, Renier D, Marie PJ (1998). Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J Clin Invest* 101:1310–7.

Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T (2011). Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. *Bone* 49(4):673-82.

Maia AM, da Silva JH, Mencialha AL, Caffarena ER, Abdelhay E (2012). Computational modeling of the bHLH domain of the transcription factor TWIST1 and R118C, S144R and K145E mutants. *BMC Bioinformatics* 13:184.

Makarov R, Steiner B, Gucev Z, Tasic V, Wieacker P, Wieland I (2010). The impact of CFNS-causing EFNB1 mutations on ephrin-B1 function. *BMC Med Genet.* 11:98.

Malgorzata Witkowska-Zimny (2012). Transcriptional Control of Osteogenesis, Osteogenesis, Prof. Yunfeng Lin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0030-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/osteogenesis/transcriptional-control-of-osteogenesis>

Mangasarian K, Li Y, Mansukhani A, Basilico C (1997). Mutation associated with Crouzon syndrome causes ligand-independent dimerization and activation of FGF receptor-2. *J Cell Physiol* 172(1):117-25.

Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 149:1297–308.

Mansukhani A, Ambrosetti D, Holmes G, Cornivelli L, Basilico C (2005). Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibit Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J Cell Biol* 168:1065–1076.

Marie PJ, Kaabeche K, Guenou H (2008). Roles of FGFR2 and twist in human craniosynostosis: insights from genetic mutations in cranial osteoblasts. *Front Oral Biol.* 12:144-59.

Marie PJ (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 473(2):98-105.

Marie PJ (2012). Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene* 498(1):1-4.

Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn.* 236(7):1876-90.

Massari ME, Murre C (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20(2):429-40.

McFarland KL, Glaser K, Hahn JM, Boyce ST, Supp DM. Culture medium and cell density impact gene expression in normal skin and abnormal scar-derived fibroblasts (2011). *J Burn Care Res.*32(4):498-508.

McGillivray G, Savarirayan R, Cox TC, Stojkoski C, McNeil R, Bankier A, Bateman JF, Roscioli T, Gardner RJ, Lamande SR (2005). Familial scaphocephaly syndrome caused by a novel mutation in the FGFR2 tyrosine kinase domain. *J Med Genet* 42:656–662.

Mefford HC, Shafer N, Antonacci F, Tsai JM, Park SS, Hing AV, Rieder MJ, Smyth MD, Speltz ML, Eichler EE, Cunningham ML (2010). Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including RUNX2 duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. *Am J Med Genet A.* 152A(9):2203-10.

Merrill AE, Bochukova EG, Brugger SM, Ishii M, Pilz DT, Wall SA, Lyons KM, Wilkie AO, Maxson RE Jr (2006). Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. *Hum Mol Genet* 15:1319–1328.

Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ, Graham JM Jr, Feingold M, Moeschler JB, Rawnsley E, Scott AF, Jabs EW (1996). FGFR2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing. *Am J Hum Genet*. 58(3):491-8.

Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW (1995). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet*. 11(4):462-4.

Miraoui H, Marie PJ (2010). Fibroblast growth factor receptor signaling crosstalk in skeletogenesis. *Sci Signal*. 3(146):re9.

Miraoui H, Marie PJ (2010). Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* 468 (1-2):1-7.

Miraoui H, Ringe J, Häupl T, Marie PJ (2010). Increased EFG- and PDGFalpha-receptor signaling by mutant FGF-receptor 2 contributes to osteoblast dysfunction in Apert craniosynostosis. *Hum Mol Genet*. 19(9):1678-89.

Miraoui H, Severe N, Vaudin P, Pagès JC, Marie PJ (2010). Molecular silencing of Twist1 enhances osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells: implication of FGFR2 signaling. *J Cell Biochem*. 110(5):1147-54.

Mizuguchi T, Matsumoto N (2007). Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J Hum Genet*.52(1):1-12.

Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, Wilkie AO (1996). Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nat Genet*. 13(1):48-53.

Moloney DM, Wall SA, Ashworth GJ, Oldridge M, Glass IA, Francomano CA, Muenke M, Wilkie AO (1997). Prevalence of Pro250Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis. *Lancet*. 349(9058):1059-62.

Morriss-Kay and Wilkie (2005). Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: insights from human genetics and experimental studies. *J.Anat*. 207:637-653

Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S, Winter RM (1994). A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*. 8(3):269-74.

Muenke M, Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Ades LC, Haan EA, Mulley JC, Cohen MM, Bellus GA, Francomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AO, Zackai EH (1997). A unique point mutation in the fibroblast

growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet.* 60:555–564.

Mulliken JB, Steinberger D, Kunze S, Müller U (1999). Molecular diagnosis of bilateral coronal synostosis. *Plast Reconstr Surg.* 104(6):1603-15.

Mulliken JB, Gripp KW, Stolle CA, Steinberger D, Müller U (2004). Molecular analysis of patients with synostotic frontal plagiocephaly (unilateral coronal synostosis). *Plast Reconstr Surg.* 113(7):1899-909.

Nacamuli RP, Fong KD, Warren SM, Fang TD, Song HM, Helms JA, Longaker MT (2003). Markers of osteoblast differentiation in fusing and nonfusing cranial sutures. *Plast Reconstr Surg* 112:1328–1335.- den to exo valei, mallon de tha to valo, opote n to sviso

Oldridge M, Lunt PW, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Muenke M, Moloney DM, Twigg SR, Heath JK, Howard TD, Hoganson G, Gagnon DM, Jabs EW, Wilkie AO (1997). Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the IgII-IgIII linker of FGFR2. *Hum Mol Genet.* 6(1):137-43.

Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AO (1999). De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet.* 64(2):446-61.

Online Mendelian Inheritance In Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>  
Πρόσβαση Μάιος 2015.

Opperman LA (2000). Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn.* 219(4):472-85.

Ornitz DM, Marie PJ (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16(12):1446-65.

Palmer A, Klein R (2003). Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev.* 17:1429–1450.

Park WJ, Meyers GA, Li X, Theda C, Day D, Orlow SJ, Jones MC, Jabs EW (1995). Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum Mol Genet.* 4(7):1229-33.

Park J, Park OJ, Yoon WJ, Kim HJ, Choi KY, Cho TJ, Ryoo HM (2012). Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem.* 113(2):457-64.

Passos-Bueno MR, Serti Eacute AE, Jehee FS, Fanganiello R, Yeh E (2008). Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. *Front Oral Biol.* 12:107-43. Review.

Przylepa KA, Paznekas W, Zhang M, Golabi M, Bias W, Bamshad MJ, Carey JC, Hall BD, Stevenson R, Orlow S, Cohen MM Jr, Jabs EW (1996). Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat Genet.* 13(4):492-4.

Pulleyn LJ, Reardon W, Wilkes D, Rutland P, Jones BM, Hayward R, Hall CM, Brueton L, Chun N, Lammer E, Malcolm S, Winter RM (1996). Spectrum of craniosynostosis phenotypes associated with novel mutations at the fibroblast growth factor receptor 2 locus. *Eur J Hum Genet.* 4(5):283-91.

Quarto N, Behr B, Li S, Longaker MT (2009). Differential FGF ligands and FGF receptors expression pattern in frontal and parietal calvarial bones. *Cells Tissues Organs* 190(3):158-69.

Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, Jacobson-Dickman E, Quinton R, Van Vliet G, Lavoie H, Hughes VA, Dwyer A, Hayes FJ, Xu S, Sparks S, Kaiser UB, Mohammadi M, Pitteloud N (2009). Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(11):4380-90.

Rannan-Eliya SV, Taylor IB, De Heer IM, Van Den Ouweland AM, Wall SA, Wilkie AO (2004). Paternal origin of FGFR3 mutations in Muenke-type craniosynostosis. *Hum Genet.* 115(3):200-7.

Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S (1994). Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 8(1):98-103.

Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, Maxson RE, Thesleff I (2000). Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* 127(9):1845-55.

Rice DP, Rice R, Thesleff I (2003). Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis. *Eur J Orthod.* 25(2):139-48.

Robin NH, Scott JA, Cohen AR, Goldstein JA (1998). Nonpenetrance in FGFR3-associated coronal synostosis syndrome. *Am J Med Genet.* 80(3):296-7.

Rojas-Peña ML, Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Arafat D, Schwartz Z, Boyan BD, Williams J, Gibson G (2014). Characterization of distinct classes of differential gene expression in osteoblast cultures from non-syndromic craniosynostosis bone. *J Genomics.* 2:121-30.

Roscioli T, Flanagan S, Kumar P, Masel J, Gattas M, Hyland VJ, Glass IA (2000). Clinical findings in a patient with FGFR1 P252R mutation and comparison with the literature. *Am J Med Genet* 93:22-28.

Schell U, Hehr A, Feldman GJ, Robin NH, Zackai EH, de Die-Smulders C, Viskochil DH, Stewart JM, Wolff G, Ohashi H, Price R A, Cohen MM Jr, Muenke M (1995). Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet.* 4(3):323-8.

Schindler S, Friedrich M, Wagener H, Lorenz B, Preising MN (2002). Heterozygous P250L mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in a case of isolated craniosynostosis. *J Med Genet* 39:764–766.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30(12):e57.

Seto ML, Hing AV, Chang J, Hu M, Kapp-Simon KA, Patel PK, Burton BK, Kane AA, Smyth MD, Hopper R, Ellenbogen RG, Stevenson K, Speltz ML, Cunningham ML (2007). Isolated sagittal and coronal craniosynostosis associated with TWIST box mutations. *Am J Med Genet A.* 143(7):678-86.

Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JA, Hoogeboom AJ, Brady AF, Jeelani NO, Lynch SA, Mulliken JB, Murray DJ, Phipps JM, Sweeney E, Tomkins SE, Wilson LC, Bennett S, Cornall RJ, Broxholme J, Kanapin A; 500 Whole-Genome Sequences (WGS500) Consortium, Johnson D, Wall SA, van der Spek PJ, Mathijssen IM, Maxson RE, Twigg SR, Wilkie AO (2013). Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet.* 45(3):304-7.

Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78(2):335-42.

Simsek M, Al-Gazali L, Al-Mjeni R, Bayoumi R (2003). Improved diagnosis of a common mutation (R248C) in the human growth factor receptor 3 (FGFR3) gene that causes type I Thanatophoric dysplasia. *Clin Biochem.* 36(2):151-3.

Singh S, Gramolini AO (2009). Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization. *BMC Cell Biol.* 10:47. doi: 10.1186/1471-2121-10-47.

Slater BJ, Lenton KA, Kwan MD, Gupta DM, Wan DC, Longaker MT (2008). Cranial sutures: a brief review. *Plast Reconstr Surg.* 121(4):170e-8e.

Stamper BD, Park SS, Beyer RP, Bammler TK, Farin FM, Mecham B, Cunningham ML (2011). Differential expression of extracellular matrix-mediated pathways in single-suture craniosynostosis. *PLoS One* 6(10):e26557.

Stenirri S, Restagno G, Ferrero GB, Alaimo G, Sbaiz L, Mari C, Genitori L, Maurizio F, Cremonesi L (2007). Integrated strategy for fast and automated molecular characterization of genes involved in craniosynostosis. *Clin Chem* 53(10):1767-74.

Suzuki H, Suda N, Shiga M, Kobayashi Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K (2012). Apert syndrome mutant FGFR2 and its soluble form reciprocally alter osteogenesis of primary calvarial osteoblasts. *J Cell Physiol.* 227(9):3267-77.

Tanimoto Y, Yokozeki M, Hiura K, Matsumoto K, Nakanishi H, Matsumoto T, Marie PJ, Moriyama K (2004). A soluble form of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) with S252W mutation acts as an efficient inhibitor for the enhanced osteoblastic differentiation caused by FGFR2 activation in Apert syndrome. *J Biol Chem* 279:45926–45934.

Thomas GP, Wilkie AO, Richards PG, Wall SA (2005). FGFR3 P250R mutation increases the risk of reoperation in apparent 'nonsyndromic' coronal craniosynostosis. *J Craniofac Surg.* 16(3):347-52; discussion 353-4.

Twigg SR, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, Wall SA, Morriss-Kay GM, Wilkie AO (2004). Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(23):8652-7.

Twigg SR, Matsumoto K, Kidd AM, Goriely A, Taylor IB, Fisher RB, Hoogeboom AJ, Mathijssen IM, Lourenco MT, Morton JE, Sweeney E, Wilson LC, Brunner HG, Mulliken JB, Wall SA, Wilkie AO (2006). The origin of EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome: frequent somatic mosaicism and explanation of the paucity of carrier males. *Am J Hum Genet.* 78(6):999-1010.

Twigg SR, Babbs C, van den Elzen ME, Goriely A, Taylor S, McGowan SJ, Giannoulatou E, Lonie L, Ragoussis J, Sadighi Akha E, Knight SJ, Zechi-Ceide RM, Hoogeboom JA, Pober BR, Toriello HV, Wall SA, Rita Passos-Bueno M, Brunner HG, Mathijssen IM, Wilkie AO (2013). Cellular interference in craniofrontonasal syndrome: males mosaic for mutations in the X-linked EFNB1 gene are more severely affected than true hemizygotes. *Hum Mol Genet.* 22(8):1654-62.

Van der Meulen J, van den Ouweland A, Hoogeboom J (2006). Trigenocephaly in Muenke syndrome. *Am J Med Genet A.* 140(22):2493-4.

Vasudevan PC, Twigg SR, Mulliken JB, Cook JA, Quarrell OW, Wilkie AO (2006). Expanding the phenotype of craniofrontonasal syndrome: two unrelated boys with EFNB1 mutations and congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Hum Genet.* 14(7):884-7.

Vissers LE, Cox TC, Maga AM, Short KM, Wiradjaja F, Janssen IM, Jehee F, Bertola D, Liu J, Yagnik G, Sekiguchi K, Kiyozumi D, van Bokhoven H, Marcelis C, Cunningham ML, Anderson PJ, Boyadjiev SA, Passos-Bueno MR, Veltman JA, Smyth I, Buckley MF, Roscioli T (2011). Heterozygous mutations of *FREM1* are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS Genet.* 7(9):e1002278.

Vogels A, Fryns JP (2006). Pfeiffer syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 1;1:19.

Wallis D, Lacbawan F, Jain M, Der Kaloustian VM, Steiner CE, Moeschler JB, Losken HW, Kaitila II, Cantrell S, Proud VK, Carey JC, Day DW, Lev D, Teebi AS, Robinson LK, Hoyme HE, Al-Torki N, Siegel-Bartelt J, Mulliken JB, Robin NH, Saavedra D, Zackai EH, Muenke M (2008). Additional EFNB1 mutations in craniofrontonasal syndrome. *Am J Med Genet A.* 146A(15):2008-12.



Wang JC, Steinraths M, Dang L, Lomax B, Eydoux P, Stockley T, Yong SL, Van Allen MI (2007). Craniosynostosis associated with distal 5q-trisomy: further evidence that extra copy of MSX2 gene leads to craniosynostosis. *Am J Med Genet A*. 143A(24):2931-6.

Wang SM, Coljee VW, Pignolo RJ, Rotenberg MO, Cristofalo VJ, Sierra F (1997). Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187(1):83-92.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 10(1):57-63.

White KE, Cabral JM, Davis SI, Fishburn T, Evans WE, Ichikawa S, Fields J, Yu X, Shaw NJ, McLellan NJ, McKeown C, Fitzpatrick D, Yu K, Ornitz DM, Econs MJ (2005). Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am J Hum Genet* 76:361–367.

Wieland I, Jakubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, Gerlach KL, Adams RH, Wieacker P (2004). Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. *Am J Hum Genet*. 74(6):1209-15.

Wieland I, Reardon W, Jakubiczka S, Franco B, Kress W, Vincent-Delorme C, Thierry P, Edwards M, Konig R, Rusu C, Schweiger S, Thompson E, Tinschert S, Stewart F, Wieacker P (2005). Twenty-six novel EFNB1 mutations in familial and sporadic craniofrontonasal syndrome (CFNS). *Hum Mutat*. 26:113–118.

Wieland I, Weidner C, Ciccone R, Lapi E, McDonald-McGinn D, Kress W, Jakubiczka S, Collmann H, Zuffardi O, Zackai E, Wieacker P (2007). Contiguous gene deletions involving EFNB1, OPHN1, PJA1 and EDA in patients with craniofrontonasal syndrome. *Clin Genet*. 72(6):506-16.

Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, Malcolm S, Winter R, Reardon W (1995a). Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet*. 9(2):165-72.

Wilkie AO, Morriss-Kay GM, Jones EY, Heath JK (1995b). Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr Biol* 5(5):500-7.

Wilkie AO, Bochukova EG, Hansen RM, Taylor IB, Rannan-Eliya SV, Byren JC, Wall SA, Ramos L, Venancio M, Hurst JA, O'Rourke AW, Williams LJ, Seller A, Lester T (2006). Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 140:2631–2639.

Wilkie AO, Byren JC, Hurst JA, Jayamohan J, Johnson D, Knight SJ, Lester T, Richards PG, Twigg SR, Wall SA (2010). Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics*. 126(2):e391-400.

Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT (2002). Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*. 277(39):36181-7.

Yeh E, Fanganiello RD, Sunaga DY, Zhou X, Holmes G, Rocha KM, Alonso N, Matsushita H, Wang Y, Jabs EW, Passos-Bueno MR (2013). Novel molecular pathways elicited by mutant FGFR2 may account for brain abnormalities in Apert syndrome. *PLoS One*. 8(4):e60439.

Yin L, Du X, Li C, Xu X, Chen Z, Su N, Zhao L, Qi H, Li F, Xue J, Yang J, Jin M, Deng C, Chen L (2008). A Pro253Arg mutation in fibroblast growth factor receptor 2 (*Fgfr2*) causes skeleton malformation mimicking human Apert syndrome by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *Bone*. 42(4):631-43.

Yoon SR, Qin J, Glaser RL, Jabs EW, Wexler NS, Sokol R, Arnheim N, Calabrese P (2009). The ups and downs of mutation frequencies during aging can account for the Apert syndrome paternal age effect. *PLoS Genet*. 5(7):e1000558.

Young ID (1987). Craniofrontonasal dysplasia. *J Med Genet*. 24(4):193-6.

Yousfi M, Lasmoles F, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ (2001). Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced *Twist* dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J Clin Invest*. 107(9):1153-61.

Yousfi M, Lasmoles F, Marie PJ (2002). *TWIST* inactivation reduces *CBFA1/RUNX2* expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 297(3):641-4.

Zainuddin A, Makpol S, Chua KH, Abdul Rahim N, Yusof YA, Ngah WZ (2008). *GAPDH* as gene for human skin fibroblast senescent model. *Med J Malaysia*. 63 Suppl A:73-4.

Zhang Y, Hassan MQ, Li ZY, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS (2008). Intricate gene regulatory networks of helix-loop-helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 105(2):487-96.

Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX (2000). A Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet* 9:2001–2008.