



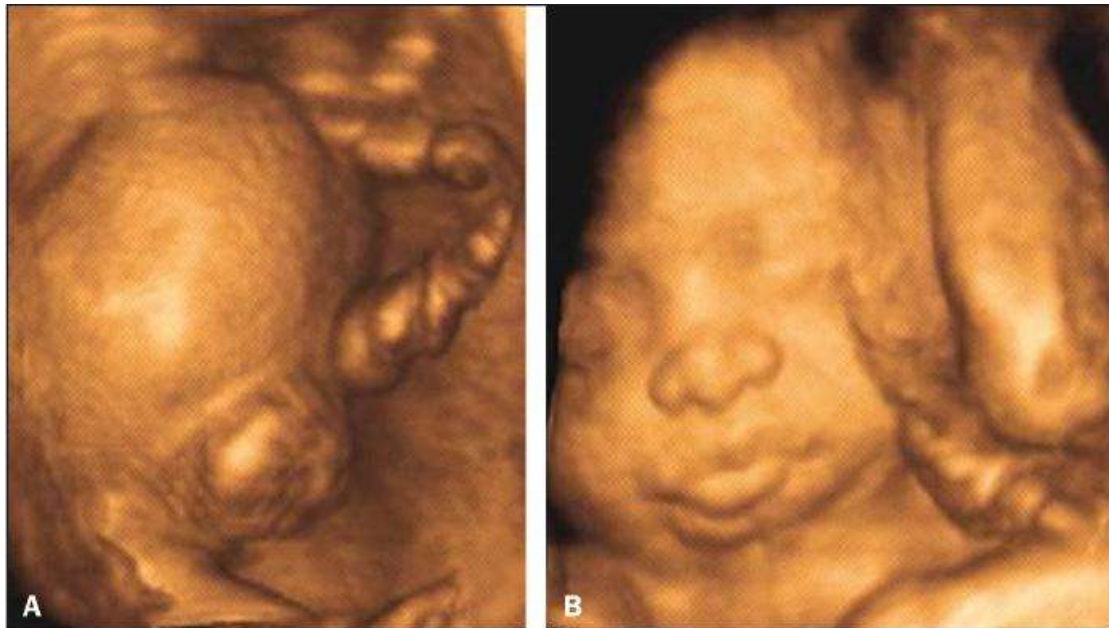
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΧΩΡΕΜΕΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΟΦΙΑ ΚΙΤΣΙΟΥ- ΤΖΕΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ

Διερεύνηση μεταλλάξεων του γονιδίου *CDKN1C* σε ασθενείς που παραπέμπονται για έλεγχο συνδρόμου Beckwith –Wiedemann



Καρακίτσου Αλεξάνδρα
ΑΜ: 20120547

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

Επιβλέπων Καθηγητής:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Ομότιμος Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
- Σοφία Κίτσιου-Τζέλη, Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
- Ελένη Φρυσίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής , Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

I. Περιεχόμενα

A. Περίληψη	4
B. Εισαγωγή	6
1. Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann(BWS).....	6
2. Κλινικά χαρακτηριστικά	7
3. Υπεύθυνος γενετικός τόπος για το BWS και η επιγενετική ρύθμισή του.	10
4. Γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann	13
5. Κύριες αιτίες του συνδρόμου Beckwith-Wiedemann.....	17
6. Παρόμοιοι φαινότυποι και διαφορική διάγνωση	19
7. Συσχέτιση κλινικών ευρημάτων με μοριακή αιτιολογία	22
8. Το γονίδιο CDKN1C	25
9. Η πρωτεΐνη CDKN1C(p57)	27
10. Το γονίδιο CDKN1C και σε άλλες ασθένειες.....	29
11. Κλινική και εργαστηριακή διάγνωση του BWS	33
C. Σκοπός μελέτης.....	36
D. Υλικά κα Μέθοδοι	37
1. Υλικό μελέτης	37
2. Μέθοδοι	38
2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα ολικού αίματος	38
2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του DNA	39
2.3. Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Methylation-specific MLPA® (MS-MLPA)	40
2.4. Αντιγραφή εξονίων του γονιδίου CDKN1C με την μέθοδο PCR.....	45
2.5. Σχεδιασμός εκκινητών	47
2.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....	53
2.7. Ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών μέσω πρωτοκόλλου ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatched Analysis)	54
2.8. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	57
2.9. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA/Αλληλούχιση κατά Sanger	58
C. Αποτελέσματα.....	63
D. Συζήτηση-Συμπεράσματα	76
E. Βιβλιογραφία.....	80
F. Εικόνες.....	88

A. Περίληψη

Το σύνδρομο Beckwith–Wiedemann (BWS, OMIM# 130650) είναι γενετική διαταραχή που σχετίζεται με σωματική υπερανάπτυξη (γιγαντισμό –μακροσωμία) ορατή ακόμα και πριν τη γέννηση. Έχει συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό (άντρες και γυναίκες) περίπου 1/13000 .

Οι ασθενείς με BWS εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, τα κυριότερα των οποίων είναι μακρογλωσσία, μακροσωμία, και εξόμφαλος/ομφαλοκήλη και διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου παιδικής ηλικίας, κυρίως όγκων “Wilms” και ηπατοβλαστωμάτων.

Το BWS είναι σύνδρομο που σχετίζεται με επιγενετικές αλλοιώσεις και διαταραχές του προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης και αφορά την περιοχή 11p15.5 του χρωμοσώματος 11 καθώς και τα γονίδια *IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1* και *KCNQ1OT1* που βρίσκονται στην περιοχή αυτή. Στη πλειοψηφία των περιπτώσεων (~85%) οι βλάβες είναι σποραδικές ενώ σε ποσοστό 15% υπάρχει οικογενειακό ιστορικό. Στις οικογενείς περιπτώσεις το BWS σχετίζεται κυρίως με μεταλλάξεις του γονιδίου *CDKN1C* (MIM:600856), κληρονομείται με αυτοσωματική επικρατική κληρονομικότητα και φαίνεται να παρουσιάζει ατελή διεισδυτικότητα που πιθανόν να σχετίζεται με τα υψηλά ποσοστά σωματικού και ιστοειδικού μωσαϊκισμού που παρατηρούνται στους ασθενείς .

Το γονίδιο *CDKN1C* υπόκειται σε γονιδιακή αποτύπωση και εκφράζεται μόνο από το μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο. Η πρωτεΐνη CDKN1C λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Για την πραγματοποίηση γονιδιακού ελέγχου χρησιμοποιήθηκε DNA, το οποίο είχε απομονωθεί από το περιφερικό αίμα 13 ασθενών (αγόρια-κορίτσια) με φυσιολογικό καρυότυπο που παραπέμφθηκαν από τους κλινικούς γενετιστές με κλινική εικόνα BWS. Στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκε έλεγχος για αλλαγές μεθυλίωσης των κέντρων γονιδιακής αποτύπωσης IC1 και IC2 γενετικό τόπο 11p15 μέσω MS-MLPA, 9 από τους οποίους βρέθηκαν να φέρουν αλλαγές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών στο γονίδιο *CDKN1C* μέσω πρωτοκόλλου ECMA καθώς και μέσω της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA.

Στο σύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν στο γονίδιο *CDKN1C* (4 συνολικά ασθενείς), παθολογικές μεταλλάξεις δεν βρέθηκαν σε κανέναν. Για την επιβεβαίωση των μεταλλάξεων ως μη παθολογικών έγινε επίσης έλεγχος σε δύο συγγενείς αυτών αλλά και σε 8 φυσιολογικά άτομα (control). Επιπλέον λόγω συσχέτισης του γονιδίου *CDKN1C* με το σύνδρομο Silver Russel πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε δύο (2) άτομα που παραπέμφθηκαν για SRS.

Συνοψίζοντας, στην μελέτη αυτή: α) δεν βρέθηκαν παθολογικές μεταλλάξεις σε κανέναν από τους ασθενείς που παραπέμφθηκαν, αλλά μόνο πολυμορφισμοί, καθώς και κάποιες μεταλλάξεις όπου η επίδραση τους μένει να επιβεβαιωθεί β) βρέθηκε ότι η συχνότητα της εμφάνισης διαγραμμένων αμινοξέων στον τομέα PAPA της πρωτεΐνης *CDKN1C*, στο φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρκετά μεγάλη καθώς τέσσερα στα οκτώ (4/8) φυσιολογικά άτομα παρουσίασαν διαγραφή αμινοξέων στον τομέα PAPA γ) διαπιστώθηκε ότι η πιθανότητα εμφάνισης παθολογικής μετάλλαξης στο γονίδιο *CDKN1C* σε περιπτώσεις ασθενών με BWS στον ελληνικό πληθυσμό είναι εξαιρετικά χαμηλή, κάτι το οποίο βέβαια έρχεται σε συμφωνία με την γενικότερη συχνότητα εμφάνισης που αναφέρεται στην βιβλιογραφία δ) τέλος η απουσία παθογόνων μεταλλάξεων δεν επιτρέπει συσχέτιση φαινοτύπου – γονοτύπου.

B. Εισαγωγή

1. Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann(BWS)

Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS)(BWS,OMIM 130650) είναι γενετική διαταραχή που εμφανίζεται στη νεογνική παιδική ηλικία και σχετίζεται με σωματική υπερανάπτυξη (γιγαντισμό –μακροσωμία), και αυξημένη προδιάθεση για την ανάπτυξη όγκων[1][2].



Εικόνα 1 Μακρογλωσσία σε ασθενή με BWS

Η διαταραχή αυτή έχει πληθυσμιακή συχνότητα εμφάνισης 1/13700, ίση σε άνδρες-γυναίκες και συναντάται σε όλα τα έθνη. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση των μονοζυγωτικών διδύμων, όπου παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά των θήλεων έναντι των αρρένων ασθενών [2].

Ο συνολικός αριθμός των καταγεγραμμένων βρεφών που γεννιούνται με σ. BW είναι πιθανά υποεκτιμημένος, επειδή πολλά νεογνά γεννιούνται με BWS, αλλά έχουν κλινικά χαρακτηριστικά λιγότερο εμφανή και ως εκ τούτου δεν εξακριβώνονται και δεν καταγράφονται[1] .

Η κλινική εικόνα ασθενών με BWS ποικίλει σημαντικά , καθώς εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, τα κυριότερα των οποίων είναι μακρογλωσσία (Εικόνα 1), μακροσωμία, εξόμφαλος/ομφαλοκήλη, βουβωνοκήλη, ανωμαλίες στις πτυχώσεις των αυτιών, και χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα μετά τη γέννηση (νεογνική υπογλυκαιμία)[1].

Το BWS αποτελεί ένα από τα σύνδρομα που σχετίζονται με επιγενετικές αλλοιώσεις και διαταραχές του προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης. Στη πλειοψηφία των περιπτώσεων (~85%) οι βλάβες είναι σποραδικές ενώ το 15% έχουν οικογενειακό ιστορικό. Η διεισδυτικότητα σε οικογενείς περιπτώσεις είναι υψηλή, αν ληφθεί

υπόψη ότι η γονιδιακή αποτύπωση σχετίζεται με την γονεϊκή προέλευση του αλληλομόρφου[1].

Μία ποικιλία γενετικών ή / και επιγενετικών αλλοιώσεων, συγκεκριμένων ρυθμιστικών γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11 στην περιοχή 11p15.5 αφορούν τον ρυθμό ανάπτυξης και σχετίζονται με τον φαινότυπο- γονότυπο /επιγονότυπο του BWS[1].

Η κρίσιμη περιοχή για το BWS περιλαμβάνει δύο τομείς: το κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1) που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *IGF2* και *H19* στον τομέα 1 και το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2), που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *CDKN1C*, *KCNQ10T1* και *KCNQ1* στον τομέα 2 (βλ.Εικόνα 4). Η διαφορική μεθυλίωση του IC1 και IC2 συνδέεται με την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στο πατρικό και μητρικό αλληλόμορφο σε υγιή άτομα[1].

2. Κλινικά χαρακτηριστικά

Οι ασθενείς με σύνδρομο Beckwith-Wiedemann εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών χαρακτηριστικών και τα διαγνωστικά κριτήρια ποικίλουν.

Προγεννητικά συχνά παρατηρούνται αυξημένη ποσότητα αμνιακού υγρού (πολυδράμνιο) [3][4], προωρότητα και εμβρυϊκή μακροσωμία, σε ποσοστό που μπορεί να αγγίζει και το 50%. Άλλα χαρακτηριστικά που εμφανίζονται προγεννητικά, επίσης στην πλειοψηφία των ασθενών, είναι μεγάλος ομφάλιος λώρος, διευρυμένος πλακούντας και μέσοι όροι βάρους εμβρύων σχεδόν διπλάσιοι από το κανονικό βάρος για την ηλικία κύησης[4].

Έμβρυα με BWS αναπτύσσονται με αυξημένο ρυθμό κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης και κατά τα πρώτα

χρόνια της ζωής τους, όμως το ύψος τους ως ενήλικες παραμένει τυπικά στο



Εικόνα 2 Τυπικός φαινότυπος ασθενή με BWS, με μακρογλωσσία και εξόμφαλο

ανώτατο φυσιολογικό όριο. Ο ρυθμός ανάπτυξης συνήθως επιβραδύνεται γύρω στην ηλικία των επτά με οκτώ χρόνων. Ένας τρόπος εμφάνισης ανώμαλης ανάπτυξης είναι και με την μορφή ημιυπερπλασίας ή / και μακρογλωσσίας. Η ημιυπερπλασία (εφόσον υπάρχει), μπορεί να γίνει αντιληπτή κατά τη γέννηση, αλλά μπορεί να γίνει περισσότερο ή λιγότερο εμφανής καθώς ο ασθενής μεγαλώνει. Η ημιυπερπλασία μπορεί να επηρεάσει τμηματικά περιοχές του σώματος ή επιλεγμένα όργανα και ιστούς. Όταν επηρεάζονται πολλά μέρη του σώματος, η ημιυπερπλασία μπορεί να χαρακτηριστεί ως ομόπλευρη εάν περιορίζεται στη μία πλευρά του σώματος ή ως ετερόπλευρη εάν εμφανίζεται σε αντίθετες πλευρές του σώματος [5]. Το ιδιαίτερα μεγάλο μήκος της γλώσσας μπορεί να οδηγήσει σε δυσκολίες στην διατροφή, στην ομιλία και λιγότερο συχνά, σε υπνική άπνοια[1][3].

Ένα προσωπίο νεογνού με BWS μπορεί να περιλαμβάνει επίσης προεξέχοντες οφθαλμούς με υπερκόγχιες πτυχές, αιμαγγειωματώδεις σπίλους προσώπου, υποπλασία μέσου προσώπου με προέχουσα κάτω γνάθο, αναδιπλώσεις στον πρόσθιο λοβό του αυτιού (Εικόνα 3) και κοιλώματα στην όπισθεν έλικα του πτερυγίου[1][3][6].



Εικόνα 3 Αναδίπλωση πρόσθιου λοβού του αυτιού σε ασθενή με BWS

Το προσωπίο BWS συχνά όμως εξομαλύνεται κατά την διάρκεια της παιδικής ηλικίας τόσο, ώστε χρειάζεται να γίνει αξιολόγηση των πρώιμων παιδικών φωτογραφιών, για την εκτίμηση των εφήβων ή ενηλίκων με υποψία για σ. BW [1].

Αναφέρεται επίσης υπογλυκαιμία σε 30-50% των βρεφών με BWS[3], η οποία πιθανότατα προκαλείται από υπερπλασία των κυττάρων των νησιδίων του παγκρέατος και από υπερινσουλιαιμία. Οι περισσότερες περιπτώσεις υπογλυκαιμίας είναι ήπιες και παροδικές. Ωστόσο, σε πιο σοβαρές περιπτώσεις BWS η υπογλυκαιμία μπορεί να παραμείνει και αν δεν γίνει αντιληπτή ή δεν χορηγηθεί θεραπεία, εγκυμονεί σοβαρό κίνδυνο για αναπτυξιακές βλάβες[1].

Σε βρέφη με BWS υπάρχει μια αυξημένη συχνότητα δυσπλασιών και διαφόρων επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένων ελαττωμάτων του κοιλιακού τοιχώματος (ομφαλοκήλη, και κοιλιακός διαχωρισμός) [1][6] και οργανομεγαλία, σε όργανα όπως το συκώτι, ο σπλήνας, το πάγκρεας, τα νεφρά, ή τα επινεφρίδια.

Παθολογικά ευρήματα σε όργανα όπως τα επινεφρίδια, είναι η εμβρυονική κυτταρομεγαλία του φλοιού των επινεφριδίων ενώ στα νεφρά οι νεφρικές ανωμαλίες μπορεί να περιλαμβάνουν πρωτογενείς δυσπλασίες, μυελοειδή νεφρική δυσπλασία, νεφροασβέστωση, και νεφρολιθίαση[1].

Επιπλέον σε ένα 20% (με εύρος 9-34%) των παιδιών με BWS εμφανίζονται δυσπλασίες της καρδιάς, ενώ περίπου στο ήμισυ των περιπτώσεων αυτών η καρδιομεγαλία υποχωρεί από μόνη της[3][9].

Τέλος, υπάρχει μια αυξημένη προδιάθεση στους ασθενείς με BWS -συγκεκριμένα παρουσιάζουν 1.000 φορές αυξημένο κίνδυνο -για την ανάπτυξη εμβρυικών κακοηθειών[7], με πιο κοινές τον όγκο Wilms και το ηπατοβλάστωμα[8]. Άλλοι εμβρυικοί όγκοι περιλαμβάνουν ραβδομυοσάρκωμα, καρκίνωμα του φλοιού των επινεφριδίων και νευροβλάστωμα [1].

Οι περισσότεροι από τους όγκους που συνδέονται με BWS εμφανίζονται στα πρώτα 8-10 χρόνια ζωής των ασθενών με πολύ λίγα περιστατικά να αναφέρονται πέρα από αυτή την ηλικία. Ο συνολικός κίνδυνος για την ανάπτυξη όγκων σε παιδιά - ασθενείς εκτιμάται σε 7,5% (με εύρος 4-21 %) [1][3][9].

Ασθενείς με σοβαρή μορφή του BWS, διατρέχουν κίνδυνο πρόωρου θανάτου, οφειλόμενου σε επιπλοκές λόγω της μακρογλωσσίας, της υπογλυκαιμίας, της προωρότητας, της καρδιομυοπάθειας ή των όγκων.

Σε γενικές γραμμές, η διάγνωση υποστηρίζεται από την παρουσία τουλάχιστον τριών χαρακτηριστικών κλινικών ευρημάτων (π.χ. τρία μείζονα ή δύο μείζονα και ένα δευτερεύον) , ωστόσο η ανάπτυξη εμβρυονικών όγκων μπορεί να συνοδεύεται από «ηπιότερους» φαινοτύπους[3]. Θετική μοριακή εξέταση μπορεί να επιβεβαιώσει τη διάγνωση του συνδρόμου, όμως ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την ύπαρξη BWS[1] .

Η μετέπειτα ανάπτυξη σε ασθενείς με BWS που επιβιώνουν στην παιδική ηλικία, είναι συνήθως φυσιολογική και η πρόγνωση είναι γενικά καλή. Μόνες περιπτώσεις με κακή πρόγνωση σε ασθενείς είναι η ύπαρξη διπλασιασμού του τμήματος p15.5 του χρωμόσωματος 11 ή υπογλυκαιμία που διέφυγε της διάγνωσης. Κλινικά χαρακτηριστικά που μπορεί να παρουσιάσουν κατά την ανάπτυξη τους ασθενείς με κακή πρόγνωση, είναι η αργή ανάπτυξη, ο πόνος και οι παραμορφώσεις των

οστών[1].

3. Υπεύθυνος γενετικός τόπος για το BWS και η επιγενετική ρύθμισή του.

Όπως αναφέρθηκε το σύνδρομο BWS είναι ένα σύνδρομο το οποίο σχετίζεται με επιγενετικές αλλοιώσεις και διαταραχές του προτύπου γονιδιακής αποτύπωσης. Στην χρωμοσωμική περιοχή που ευθύνεται για το BWS, υπάρχουν κέντρα αποτύπωσης τα οποία ελέγχουν την έκφραση γονιδίων.

Ένα κέντρο αποτύπωσης (Imprinting Center - IC) είναι μια περιοχή του DNA που μπορεί να ρυθμίζει την *cis* έκφραση των αποτυπωμένων γονιδίων ακόμα και σε μεγάλες αποστάσεις. Τα ICs συνήθως χαρακτηρίζονται από διαφορική μεθυλίωση του DNA και διαφορικές τροποποιήσεις ιστονών, στο πατρικό και μητρικό αντίγραφο, αναφερόμενες επίσης ως περιοχές ελέγχου αποτύπωσης (ICR) ή διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (Differentially Methylated Regions - DMRs) [1]. Υπάρχουν δύο περιοχές αποτύπωσης στην κρίσιμη περιοχή για το BWS, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

Η κρίσιμη περιοχή για το BWS βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 στην 11p15.5 και περιλαμβάνει δύο τομείς: τον τομέα 1 (ICR1) όπου βρίσκεται το κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1) που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *IGF2* και *H19* και τον τομέα 2 όπου βρίσκεται το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2), που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *CDKN1C*, *KCNQ10T1* και *KCNQ1* [1].

Η πρώτη περιοχή ή τομέας 1 ICR1, είναι τελομερική και περιέχει τα αποτυπωμένα γονίδια *H19* και *IGF2*. Αναφέρεται επίσης ως, DMR1, ή H19DMR. Η ρύθμιση του εν λόγω τομέα ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1). Το IC1 είναι διαφορετικά μεθυλιωμένο, συνήθως μεθυλιωμένο στο πατρικό αλληλόμορφο και μη μεθυλιωμένο στο μητρικό αλληλόμορφο[1][10]. Χαρτογραφείται ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου *H19* και ρυθμίζει το *IGF2* και το *H19*.

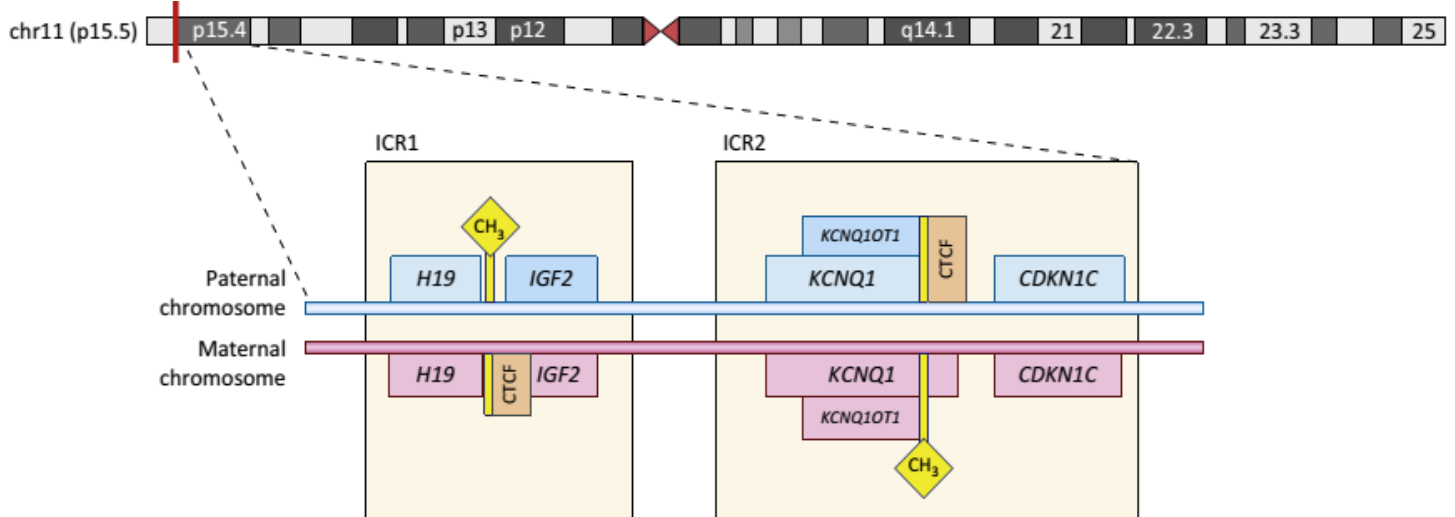
Το τελομερικό ICR1 προσδίδει διαφορετική αρχιτεκτονική στην χρωματίνη των δύο γονικών αλληλόμορφων, που οδηγεί σε αμοιβαία έκφραση του μη κωδικού RNA -

καταστολέα ανάπτυξης που εκφράζεται από το γονίδιο *H19* και του αυξητικού παράγοντα *IGF2*[10].

Ειδικότερα, το *H19* δίνει ένα μη-κωδικό, μη μεταφραζόμενο RNA που πιθανά λειτουργεί ως καταστολέας όγκου, και εκφράζεται από το μη μεθυλιωμένο μητρικό αλληλόμορφο [10].

Το *IGF2* είναι ένας ισχυρός παράγοντας της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα *H19* και *IGF2* είναι αμοιβαίως αποτυπωμένα γονίδια, με το *H19* να είναι μητρικά εκφραζόμενο και το *IGF2* πατρικά εκφραζόμενο. Τα δύο αυτά γονίδια συνεκφράζονται σε ιστούς ενδοδερμικής και μεσοδερμικής προέλευσης κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ανταγωνίζονται για τους ίδιους ενισχυτές [10].

Στο μητρικό αλληλόμορφο η ρύθμιση της μεταγραφής επιτυγχάνεται με τη σύνδεση του δακτύλου – ψευδαργύρου της πρωτεΐνης μονωτή CTCF (CCCTC-Binding factor) με τις αλληλουχίες θέσεων δέσμευσης του CTCF τις CTSs (CTCF binding sites), οι οποίες βρίσκονται εντός του IC1. Ο CTCF προσδέεται μόνο στη μη μεθυλιωμένη ακολουθία του μητρικού αλληλόμορφου, όπου δρα ως μονωτής σε ενισχυτές της έκφρασης του υποκινητή του *IGF2* [10][11].



Εικόνα 4. Πρότυπο μεθυλίωσης των ICR1 και ICR2 και σύνδεσης του CTCF μονωτή με αυτά στο πατρικό και το μητρικό αλληλίο

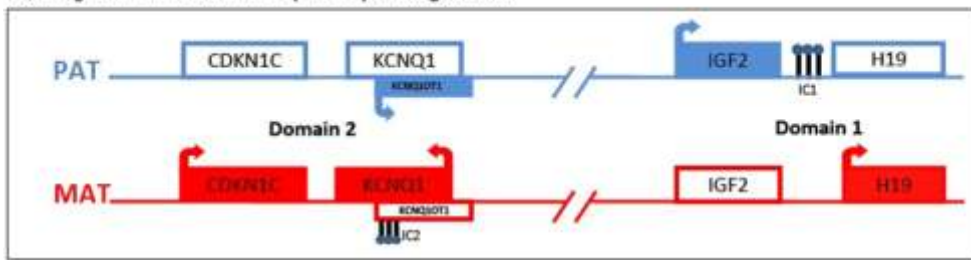
Μεθυλίωση του πατρικού αλληλόμορφου στις CTSs αποτρέπει τη σύνδεση του CTCF με το ICR1 και έτσι καταστέλλει την έκφραση του *H19* ενώ ταυτόχρονα πυροδοτεί την έκφραση του *IGF2* καθώς οι ενισχυτές είναι πλέον ελεύθεροι να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή του. Συνεπώς, η αποτυπωμένη έκφραση του *H19*

και η καταστολή του *IGF2* απαιτούν προκαθορισμένη σύνδεση CTCF στο μητρικό αλληλόμορφο [10].

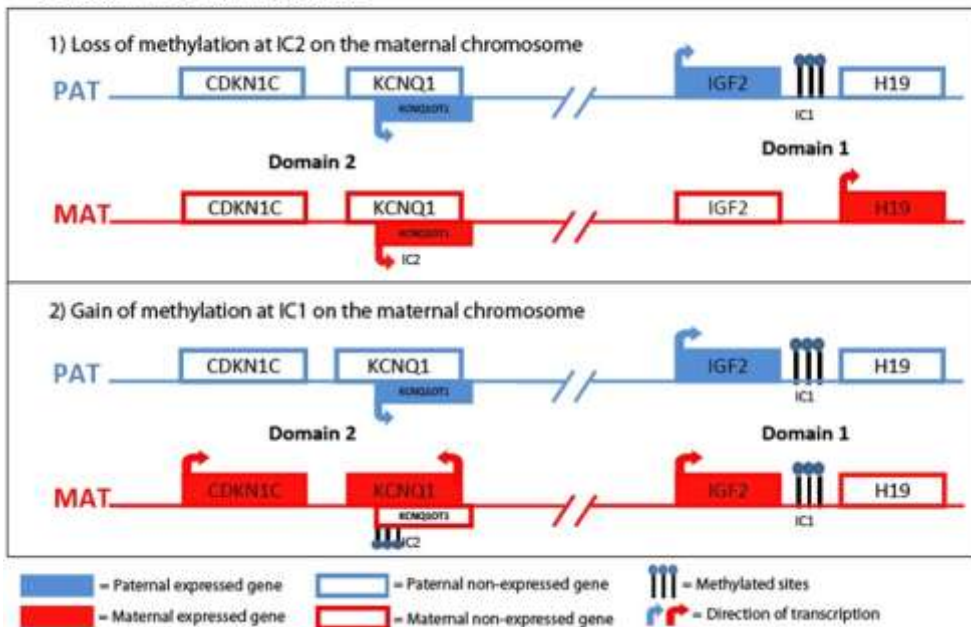
Διαγραφές στο μητρικό αλληλόμορφο που μειώνουν τον αριθμό των CTSs και διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του ICR1 έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα *IGF2* και την εμφάνιση του συνδρόμου BWS.

Η δεύτερη περιοχή ή τομέας 2 (CR2) βρίσκεται κεντρομερικά και περιέχει τα αποτυπωμένα γονίδια *CDKN1C*, *KCNQ1*, και *KCNQ1OT1* καθώς και άλλα γονίδια (π.χ. *PHLDA*, *SLC22A18*). Αναφέρεται και ως διαφορεικά μεθυλιωμένη περιοχή 2 DMR2 , ή KvDMR1. Η ρύθμιση του εν λόγω τομέα ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2). Το IC2 βρίσκεται σε επικάλυψη με τα ιντρόνια 9/ 10 και το εξόνιο 10 του γονιδίου *KCNQ1*[10] και περιέχει τον υποκινητή για το *KCNQ1OT1* – ένα μη-κωδικό RNA με σημαντική ρυθμιστική λειτουργία [1][12]. Κανονικά είναι μεθυλιωμένη στο μητρικό αλληλόμορφο και μη μεθυλιωμένη στο πατρικό αλληλόμορφο. Η μεθυλίωση στο μητρικό αλληλόμορφο αναστέλλει την έκφραση του *KCNQ1OT1* αλλά επιτρέπει την έκφραση του *CDKN1C* και *KCNQ1*[10]. Το πατρικό αλληλόμορφο, το οποίο είναι μη μεθυλιωμένο, εκφράζει το *KCNQ1OT1*, το οποίο στη συνέχεια επιβάλλει αποσιώπηση σε γονίδια που υφίστανται αποτύπωση (Εικόνα 5). Ως αποτέλεσμα αυτού, τα γονίδια *CDKN1C* και *KCNQ1* εκφράζονται μόνο από το μητρικό αντίγραφο του γονιδίου. Παρόλο που η ακριβής ρύθμιση της περιοχής αυτής δεν είναι σαφής, είναι γνωστό ότι η απώλεια μεθυλίωσης στο IC2 του μητρικού αλληλομόρφου οδηγεί σε έκφραση του *KCNQ1OT1* και από τα δύο γονικά αλληλόμορφα. Έχει δειχθεί επίσης ότι άτομα με BWS και απώλεια της μεθυλίωσης στο IC2 στο μητρικό χρωμόσωμα έχουν μειωμένη έκφραση του *CDKN1C* [13].

A) Diagram of the normal 11p15 imprinting cluster



B) Diagrams of the 11p15 imprinting cluster illustrating two molecular mechanisms underlying Beckwith-Wiedemann syndrome



Εικόνα 5 Α) Φυσιολογική γονιδιακή αποτύπωση των γονιδίων στον τομέα 11p15, Β) Δύο περιπτώσεις μη φυσιολογικής γονιδιακής αποτύπωσης στον τομέα 11p15 που οδηγούν σε BWS. Αναδημοσίευση από [24] GeneReviews® [Internet]. Beckwith-Wiedemann syndrome

4. Γονίδια που σχετίζονται με το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann

Ένας αριθμός γονιδίων που βρίσκονται στην περιοχή 11p15 και είναι δυνατόν να υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση, έχουν ενοχοποιηθεί για το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS) περιλαμβανομένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστικούς παράγοντες ανάπτυξης [1]. Πολλές διαφορετικού είδους μοριακές αλλαγές στα γονίδια αυτά καθώς και στην ευρύτερη περιοχή μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση του συνδρόμου BW (Εικόνα 5).

IGF2 (MIM:147470)

Το γονίδιο *IGF2* (Insulin-like Growth Factor II) βρίσκεται στην περιοχή 11p15 με συντεταγμένες 2.150.345-2.179.610 και ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1). Κωδικοποιεί μια από τις τρεις πρωτεϊνικές ορμόνες που παρουσιάζουν παρόμοια δομή με την ινσουλίνη κι είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο ουδέτερο πεπτίδιο που πιστεύεται ότι εκκρίνεται από το ήπαρ και κυκλοφορεί στο αίμα. Έχει μιτογόνο δράση και συμμετέχει στην ρύθμιση της ανάπτυξης παίζοντας σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη[14].

Το *IGF2* είναι ένα αποτυπωμένο γονίδιο που κωδικοποιεί έναν, πατρικά εκφραζόμενο, εμβρυϊκό αυξητικό παράγοντα. Ωστόσο, στον ανθρώπινο εγκέφαλο μία απώλεια αποτύπωσης έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφή τόσο του γονιδίου *IGF2* όσο και του *H19* και από τα δύο γονικά αλληλόμορφα. Σε ασθενείς με BWS καθώς και σε ασθενείς με πολλαπλούς όγκους, μεταξύ των οποίων και όγκους Wilms, παρατηρήθηκε αυτή η διαταραχή της αποτύπωσης του *IGF2* με αποτέλεσμα την έκφραση του και από τα δυο αλληλόμορφα. Σε περιπτώσεις μοντέλων ζώων που χρησιμοποιούνται για την μελέτη του συνδρόμου, ποντίκια με μετάλλαξη στο πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο *IGF2* γεννιούνται μικρότερα σε μέγεθος από τα φυσιολογικά, ενώ όταν κληρονομείται η ίδια μετάλλαξη από το μητρικό αλληλόμορφο δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου[15]. Επίσης, σε περιπτώσεις υπερέκφρασης του *IGF2* ή διαταραχής λειτουργίας του υποδοχέα *IGF2* παρατηρείται υπερανάπτυξη των ποντικών [1][16].

H19 (MIM: 103280)

Το *H19* είναι ένα μητρικά εκφραζόμενο γονίδιο (imprinted maternally expressed transcript) και κωδικοποιεί ένα βιολογικώς δραστικό μη-κωδικό mRNA που πιθανόν λειτουργεί ως καταστολέας όγκου. Το γονίδιο βρίσκεται σε περιοχή του χρωμοσώματος 11p15 με συντεταγμένες 2.016.405-2.019.064, ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1) και βρίσκεται πλησίον του γονιδίου *IGF2*. Έχει ένα ρόλο στον περιορισμό του σωματικού βάρους και στην αρνητική ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων[22]. Το γονίδιο αυτό συμμετέχει επιπλέον στον

σχηματισμό ορισμένων τύπων καρκίνου και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης[17].

Οι περιοχές των *H19* και *IGF2* υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση έτσι ώστε το *H19* να εκφράζεται μόνο από το μητρικής προέλευσης χρωμόσωμα 11 και το *IGF2* να εκφράζεται μόνο από το πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα[17]. Το *H19* ασκεί μεταγραφική ρύθμιση σε άλλα γονίδια με τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης του μέθυλο CpG-τομέα δεσμευσής 1 (MBD1) η οποία αυξάνει την μεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3K9me3) σε στοχευμένες θέσεις[10]. Περίπου το 50% των ατόμων με BWS παρουσιάζουν έκφραση *IGF2* στους ιστούς και από τα δυο αλληλόμορφα καταδεικνύοντας μη συζευγμένη έκφραση του *IGF2* και *H19*, με τους περισσότερους ασθενείς να διατηρούν την φυσιολογική, μόνο από το μητρικό αλληλόμορφο, έκφραση του *H19*. Λιγότερο συχνά, έχουν αναφερθεί αλλαγές στην έκφραση ή μεθυλίωση του *H19* σε ασθενείς με BWS καθώς επίσης και στο σύνδρομο Silver-Russell [18] που είναι ο αντίποδας του συνδρόμου BW με ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν μικροσωμία και αργή έως καθόλου ανάπτυξη.

CDKN1C (MIM:600856)

Το γονίδιο *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C) βρίσκεται στην περιοχή 11p15 με συντεταγμένες 2.904.447-2.907.062 και ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2). Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p57 ή Kip2, μέλος της οικογένειας του αναστολέα της κυκλίνου - εξαρτώμενης κινάσης η οποία δρα αρνητικά στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτό το γονίδιο είναι ογκοκατασταλτικό και πιθανόν αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης του εμβρύου. Οι δύο αυτές λειτουργίες μαζί με την προτιμώμενη μητρική έκφραση (ατελή καταστολή της μεταγραφής του πατρικού αλληλόμορφου) του γονιδίου αυτού το καθιστούν ως ένα υποψήφιο γονίδιο για την εμφάνιση του BWS. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν αναφερθεί σε περίπου 5% των προσβεβλημένων ατόμων. Οι μεταλλάξεις του *CDKN1C* απαντώνται συχνότερα σε άτομα με ομφαλοκήλη, λυκόστομα, καθώς και σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ωστόσο, δεν μπορούν όλες οι περιπτώσεις κάθετης μεταβίβασης του BWS προς το παρόν να αποδοθούν σε μεταλλάξεις *CDKN1C* [19]. Περαιτέρω στοιχεία για το γονίδιο αυτό

αναφέρονται παρακάτω, καθώς μελετάται αναλυτικότερα στο πλαίσιο αυτής της εργασίας.

KCNQ1 (MIM:607542)

Το γονίδιο *KCNQ1* (potassium channel KQT - family member 1) βρίσκεται στην περιοχή 11p15 με συντεταγμένες 2.466.220-2.870.339 που ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2) και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη KvLQT1. Αποτελεί μέρος ενός τασεοελεγχόμενου διαύλου καλίου που απαιτείται για τη φάση της επαναπόλωσης του δυναμικού της καρδιακής δράσης. Το γονιδιακό προϊόν μπορεί να σχηματίσει ετεροπολυμερή με δύο άλλες πρωτεΐνες διαύλων καλίου, τις KCNE1 και KCNE3. Το γονίδιο φαίνεται να είναι μη-φυσιολογικά αποτυπωμένο σε διάφορα είδη καρκίνου καθώς και σε περιπτώσεις BWS. Έχει επίσης ενοχοποιηθεί σε τουλάχιστον δύο σύνδρομα καρδιακής αρρυθμίας, το σύνδρομο του βραχέος διαστήματος QT (Romano-Ward) και το σύνδρομο Jervell-LangeNielsen. Αυτό το γονίδιο εκφράζεται από το μητρικό αλληλόμορφο στους περισσότερους ιστούς, εκτός από την καρδιά όπου εκφράζεται διαλληλικά, και έχει τέσσερα μετάγραφα εναλλακτικού ματίσματος, δύο εκ των οποίων είναι μη μεταφραζόμενα[20].

KCNQ1OT1 (MIM: 604115)

Το *KCNQ1OT1*(*KCNQ1* opposite strand/antisense transcript 1) ή LIT1 βρίσκεται στην περιοχή 11p15 με συντεταγμένες 2.629.557-2.721.227 και ελέγχεται από το κέντρο αποτύπωσης 2 (IC2). Είναι αντι-νοηματικό μη κωδικό RNA μετάγραφο 91 kb πατρικής έκφρασης που προέρχεται από το ιντρόνιο 10 του *KCNQ1*. Σε ορισμένους τύπους κυττάρων εντοπίζεται, στον πυρήνα κοντά στον πυρηνίσκο. Παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική σίγηση του τόπου *KCNQ1* ρυθμίζοντας την μεθυλίωση ιστονών[1]. Αλληλεπιδρά με την χρωματίνη, και συγκεκριμένα με τη μεθυλτρανσφεράση της ιστόνης G9a (η οποία είναι υπεύθυνη για την μονο- και διμεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3, H3K9) και την Polycomb repressive complex 2 PRC2, υπεύθυνη για την τριμεθυλίωση του H3K27 [12]. Μία περιοχή 890 bp στο 5' άκρο του *KCNQ1OT1* δρα ως περιοχή αποσιώπησης. Αυτή η περιοχή ρυθμίζει τα επίπεδα CpG μεθυλίωσης των σωματικώς αποκτηθέντων διαφορικά

μεθυλιωμένων περιοχων- Differentially methylated region (DMRs), μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του *KCNQ1OT1* με χρωματίνη και με την DNA μεθυλτρανσφεράση 1 (DNMT1), αλλά δεν επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις των μεθυλτρανσφερασών των ιστονών με το *KCNQ1OT1*[21]. Ένα ποσοστό 50% των ατόμων με BWS παρουσιάζουν απώλεια αποτύπωσης στην 5' διαφορεικά μεθυλιωμένη περιοχή του υποκινητή (IC2) του γονιδίου *KCNQ1OT1* [22].

Άλλα αποτυπωμένα γονίδια.

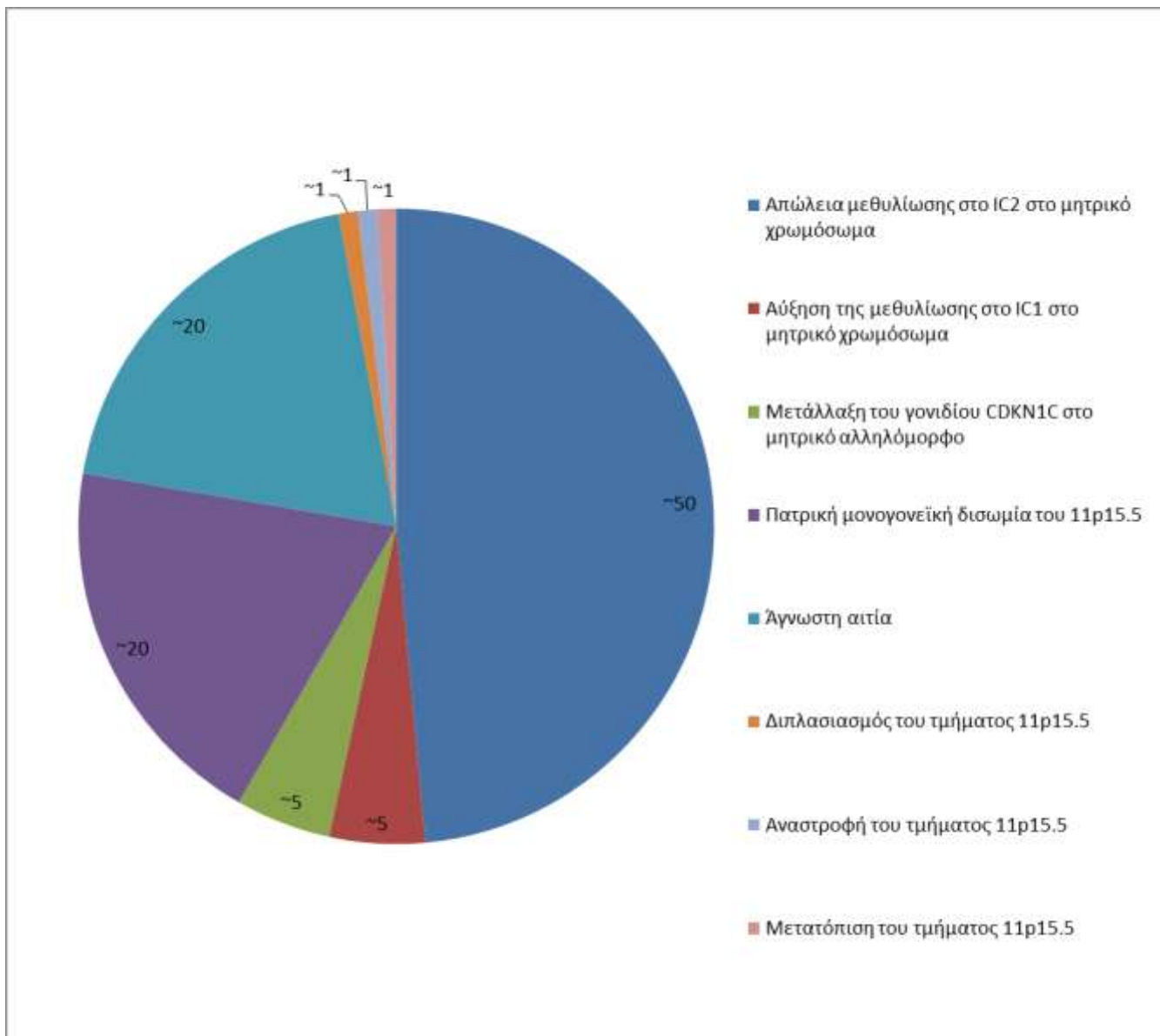
Στην περιοχή 11p15 εκτός από τα γονίδια που αναφέρονται παραπάνω υπάρχουν και άλλα γονίδια που φαίνεται να εμπλέκονται έμμεσα στο σύνδρομο BWS όπως τα αποτυπωμένα γονίδια, *PHLDA2* (γνωστό ως *IPL*, *HLDA2* ή *BWR1C*) [23][24]και *SLC22A18* (επίσης γνωστό ως *TSSC5*, *BWR1A* ή *ITM*) [24][25]. Και τα δύο γονίδια επιδεικνύουν επιλεκτική έκφραση του μητρικού αλληλόμορφου κατά την εμβρυϊκή ζωή και βρίσκονται κεντρομερικά του *CDKN1C*. Ενώ κανένα από τα δύο γονίδια δεν φαίνεται να εμπλέκεται άμεσα με το σύνδρομο BWS, και τα δύο πιστεύεται ότι έχουν ρυθμιστικές λειτουργίες, κατασταλτικές για την ανάπτυξη. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη *PHLDA2* έχει δειχθεί ότι είναι σημαντική για την κανονική ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου[25].

5. Κύριες αιτίες του συνδρόμου Beckwith-Wiedemann

Η διάγνωση με βάση την κλινική αξιολόγηση πρέπει να επιβεβαιωθεί από τον κυτταρογενετικό ή και μοριακό έλεγχο. Κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμες ανωμαλίες για το σύνδρομο BW που αφορούν το χρωμόσωμα 11p15 όπως διαπλασιασμοί, αναστροφές, ή μετατοπίσεις του τμήματος 11p15.5 έχουν βρεθεί σε ποσοστό μικρότερο του 1% των προσβεβλημένων ατόμων [24]. Η μοριακή γενετική εξέταση μπορεί να εντοπίσει επιγενετικές αλλαγές και αλλαγές του γονιδιώματος στο χρωμόσωμα 11p15 σε άτομα με BWS, χωρίς όμως να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις ασθενών, όπου ακόμα δεν έχει βρεθεί αιτιολογία για την εμφάνιση του συνδρόμου. Οι επιγενετικές αλλαγές και αλλαγές του γονιδιώματος στο χρωμόσωμα 11p15 που

έχουν καταγραφεί ως τώρα να προκαλούν το σύνδρομο και μπορεί να εντοπίσει η μοριακή γενετική εξέταση είναι οι εξής (Εικόνα 6):

- Απώλεια μεθυλίωσης στο κέντρο αποτύπωσης 2 IC2 στο μητρικό χρωμόσωμα στο 50% των ασθενών
- Αύξηση μεθυλίωσης στο κέντρο αποτύπωσης 1 IC1 στο μητρικό χρωμόσωμα σε ποσοστό περίπου 5% των περιπτώσεων
- Μεταλλάξεις του γονιδίου *CDKN1C* στο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο στο 40% των περιπτώσεων με οικογενειακό ιστορικό BWS και στο 5% -10% των περιπτώσεων χωρίς οικογενειακό ιστορικό.
- Πατρική μονογονεϊκή δισωμία του 11p15.5 στο 20% των ασθενών
- Υπομικροσκοπική γονιδιωματική μεταβολή στο χρωμόσωμα 11p15.5 σε περίπου 1% των περιπτώσεων[24]



Εικόνα 6 Αιτίες του συνδρόμου Beckwith-Wiedemann κατά μοριακό μηχανισμό

6. Παρόμοιοι φαινότυποι και διαφορική διάγνωση

Κατά την παραπομπή ασθενών με φαινότυπο BWS, σε κλινικούς γενετιστές γίνεται προσπάθεια συνολικής κλινικής εκτίμησης των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων. Η τελική αξιολόγηση αυτή γίνεται με την συνδρομή παρακλινικών εξετάσεων (π.χ., απεικόνιση του εγκεφάλου, μοριακών ή / και βιοχημικών εξετάσεων) αλλά και μέσω της συνεχούς παρακολούθησης των ασθενών, για την σωστή διάγνωση, καθώς αρκετά γενετικά σύνδρομα παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη με το BWS. Τέτοια γνωρίσματα είναι η εμφάνιση υπερανάπτυξης, υπερπλασίας, αναπτυξιακής καθυστέρησης, μακροσωμίας, οργανομεγαλίας, μακρογλωσσίας, νεφρικών

ανωμαλιών, όγκων τύπου Wilms, με πάραυτα φυσιολογικό καρυότυπο, χωρίς την παρουσία κάποιου ιστορικού υποξίας ή υπογλυκαιμίας. Παρακάτω παρατίθενται γενετικά σύνδρομα τα οποία φέρουν κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με το BWS.

Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) :Το σύνδρομο Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) είναι μια φυλοσύνδετη υπολειπόμενη ασθένεια που μοιράζεται πολλά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο BWS (π.χ., μακροσωμία, οργανομεγαλία, μακρογλωσσία, και νεφρικές ανωμαλίες). Διακρίνεται από την παρουσία δυσμορφικών στιγμάτων στο πρόσωπο, χειλοσχιστία, διαρθρωτικών καρδιακών ανωμαλιών / ανωμαλιών στην καρδιακή αγωγιμότητα και σκελετικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένης και της πολυδακτυλίας. Ο ασθενής μπορεί να παρουσιάζει και αναπτυξιακή καθυστέρηση. Παρά το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί άτομα με καρκινικούς όγκους, ο κίνδυνος εμφάνισης όγκων και το είδος των όγκων δεν έχουν κατηγοριοποιηθεί ακόμα για το σύνδρομο αυτό. Η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου GPC3 δίνει ένα ποσοστό εμφάνισης του συνδρόμου 37% -70% λόγω μετάλλαξης ή διαγραφής του γονιδίου. Το γονίδιο GPC3 κωδικοποιεί την γλυπικάνη-3, μια εξωκυτταρική πρωτεογλυκάνη που πιστεύεται ότι λειτουργεί στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης [2][24].

Perlman (PS): Το σύνδρομο Perlman (PS) είναι μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή με μακροσωμία και υψηλή συχνότητα εμφάνισης όγκου Wilms. Το προσωπείο έχει χαρακτηριστικά στοιχεία, η νεογνική θνησιμότητα είναι υψηλή και σημαντική πνευματική αναπηρία είναι συχνή. Το σύνδρομο PS πιστεύεται ότι διαφέρει γενετικά από BWS όμως το γονίδιο που προκαλεί PS δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί[2][24].

Costello (CS): Το σύνδρομο Costello (CS) μπορεί να ομοιάζει με το BWS στη νεογνική περίοδο, καθώς τα βρέφη που νοσούν παρουσιάζουν μακροσωμία. Οι ασθενείς παρουσιάζουν καρδιακές δομικές ανωμαλίες, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, ή αρρυθμίες. Με την πάροδο του χρόνου, τα άτομα με CS παρουσιάζουν καθυστέρηση σωματικής ανάπτυξης, και άλλα γνωρίσματα, συμπεριλαμβανομένων των αδρών χαρακτηριστικών του προσώπου[2][24].

Sotos: Το σύνδρομο Sotos είναι μια αυτοσωμική επικρατής διαταραχή στην οποία παρατηρείται χαρακτηριστικό προσωπείο, νοητική υστέρηση, και υπερανάπτυξη που αφορά τόσο το ύψος, όσο και την περίμετρο της κεφαλής. Περίπου το 85% των

ατόμων με σύνδρομο Sotos έχουν μια μετάλλαξη ή έλλειμμα του γονιδίου NSD1. Αν ο κλινικός φαινότυπος του ασθενούς με την μακροσωμία δεν συνοδεύεται από χαρακτηριστικά στοιχεία του BWS, θα πρέπει να ελεγχθεί για μεταλλάξεις στο γονίδιο NSD1[2][24].

Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome): Το σύνδρομο αυτό είναι μία αυτοσωματ

ική υπολειπόμενη διαταραχή που προκαλείται από την ανεπάρκεια του ενζύμου arylsulfatase B (αρυλσουλφατάσης- B). Κατά το πρώτο έτος της ζωής των παιδιών με αυτή τη διαταραχή μπορεί να παρουσιαστεί επιτάχυνση της ανάπτυξης και προχωρημένη οστική ηλικία, ενδεικτικά στοιχεία μιας κατάστασης υπερανάπτυξης. Ωστόσο, στην ηλικία των δύο έως τριών ετών η κλινική εικόνα του ασθενούς περιλαμβάνει θόλωση του κερατοειδούς, ηπατοσπληνομεγαλία, κοντό ανάστημα, πολλαπλή δυσόστωση, καρδιακές ανωμαλίες, και τραχιά χαρακτηριστικά του προσώπου[24].

Hemihyperplasia (Ημιυπερπλασία): Η ημι-υπερπλασία μπορεί να υπάρξει ως ένα μεμονωμένο εύρημα ή μπορεί να σχετίζεται με άλλα σύνδρομα όπως το σύνδρομο Proteus, το PTEN Hamartoma Tumor Syndrome, το σύνδρομο Klippel-Trenaunay-Weber και την νευροϊνωμάτωση τύπου 1 [5]. Αξίζει να σημειωθεί ότι μια υποομάδα των ατόμων με προφανή μεμονωμένη ημι-υπερπλασία, μπορεί στην πραγματικότητα να έχουν BWS με ελάχιστα κλινικά ευρήματα (Εικόνα 7). Ασυμμετρίες, όπως στο πρόσωπο ή το στήθος, θα πρέπει να αξιολογούνται για να αποκλειστούν η πλαγιοκεφαλία και οι παραμορφώσεις θωρακικού τοιχώματος. Τα



Εικόνα 7 Ασθενής με BWS και ημι-υπερπλασία

παιδιά με μεμονωμένη ημιυπερπλασία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά 5,9% και θα πρέπει να βρίσκονται υπό συνεχή παρακολούθηση για πιθανή εμφάνιση όγκων.[5][24].

7. Συσχέτιση κλινικών ευρημάτων με μοριακή αιτιολογία

Ανάπτυξη όγκων

Άτομα με BWS οφειλόμενη σε μονογονεϊκή δισωμία του γενετικού τόπου 11p15.5 ή υπερ-μεθυλίωση του γονιδίου *H19* του IC1 φέρουν το μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης όγκου Wilms ή ηπατοβλαστώματος. Αντίθετα ασθενείς με απώλεια μεθυλίωσης του μητρικού αλληλομόρφου στο IC2 φέρουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Στους όγκους που εμφανίζονται σε αυτή τη μοριακή υποομάδα δεν περιλαμβάνονται οι όγκοι Wilms. Τέλος, τα άτομα με μεταλλάξεις στο *CDKN1C*, παρά το γεγονός ότι είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, φαίνεται να έχουν τον χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης όγκων με μόνο ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων με ανάπτυξη όγκου να αναφέρεται[1][7][26].

Ημιυπερπλασία σε περιπτώσεις BWS.

Ημιυπερπλασία σε ασθενείς με BWS, φαίνεται να οφείλεται είτε σε μωσαϊκό μονογονεϊκής δισωμίας του γενετικού τόπου 11p15.5 είτε σε μοριακές μεταβολές στο IC2/IC1 [1][5].

Θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Έχει βρεθεί ότι η εμφάνιση BWS σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKN1C* σε περίπου 40% των περιπτώσεων [26][27] ή μικροελλείψεις στο IC1 και σπανιότερα στο IC2. [1]

Ομφαλοκήλη.

Η ομφαλοκήλη συνδέεται συνήθως με αλλοιώσεις στο IC2, π.χ απώλεια μεθυλίωσης (LOM), στο μητρικά κληρονομούμενο αλληλόμορφο[28] ή με κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο *CDKN1C* [1][26].

Αναπτυξιακή καθυστέρηση.

Αναπτυξιακή καθυστέρηση δεν εμφανίζεται συχνά σε ασθενείς με BWS, αλλά ευρήματα αυτής, συνδέονται κυρίως με κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμους διπλασιασμούς του γενετικού τόπου 11p15.5 του πατρικού αντιγράφου[1]είτε αποδίδονται σε επιπλοκές που σχετίζονται με την προωρότητα, είτε ακόμα και σε περιγεννητικές επιπλοκές, όπως η υπογλυκαιμία[29].

Σοβαρός φαινότυπος BWS.

Περιπτώσεις εμφάνισης σοβαρού φαινότυπου BWS φαίνεται να σχετίζονται, με πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης του τμήματος 11p15 του πατρικού χρωμοσώματος. Αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σοβαρού φαινότυπου BWS παρουσιάζουν τα



Εικόνα 8 Ημυπερπλασία , σοβαρή οργανομεγαλία και εξόμφαλος σε ασθενή με BWS

θήλεα μονοζυγωτικά δίδυμα έναντι των

αρρένων μονοζυγωτικών διδύμων, παρά το ότι η γενικότερη συχνότητα εμφάνισης, είναι ίση σε άνδρες και γυναίκες. Τα θήλεα μονοζυγωτικά δίδυμα, συνήθως φέρουν απώλεια της μεθυλίωσης στο IC2. Σε αντίθεση, τα λιγότερο συχνά παρατηρούμενα άρρενα μονοζυγωτικά δίδυμα εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών αλλοιώσεων που σχετίζονται με το BWS [1][5]

Υπογονιμότητα / υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART).

Η υποβοηθούμενη αναπαραγωγή ART- Assisted Reproductive Tecnology- φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης BWS. Βρέφη που έχουν συλληφθεί μέσω υποβοηθούμενης αναπαραγωγής φαίνεται να είναι περισσότερο πιθανό να έχουν BWS, συγκριτικά με βρέφη που έχουν συλληφθεί φυσιολογικά. Ο κίνδυνος εμφάνισης BWS σε εξωσωματική γονιμοποίηση, σε ορισμένες μελέτες αγγίζει το ποσοστό 1/4000, 9 φορές μεγαλύτερος από τον κίνδυνο στο γενικό πληθυσμό[30][32].

Μελέτες έδειξαν ότι σε ασθενείς με BWS που έχουν συλληφθεί με εξωσωματική γονιμοποίηση, η αιτιολογία εμφάνισης του συνδρόμου στις πλείστες των περιπτώσεων, είναι η απώλεια της μεθυλίωσης στο *KCNQ1OT1* του ICR2 στο γενετικό τόπο 11p15 του μητρικού αλληλομόρφου[30][31]. Συγκριτικά, σε άτομα που προήλθαν από φυσιολογική σύλληψη, η απώλεια της μεθυλίωσης στο *KCNQ1OT1* του ICR2 παρατηρείται μόνο στο 50% του συνολικού πληθυσμού BWS. Το υπόλοιπο των περιπτώσεων BWS προκύπτουν από μονογονεϊκή δισωμία του χρωμοσώματος 11 (20%), αύξηση της μεθυλίωσης στο μητρικό αλληλόμορφο στο κέντρο αποτύπωσης 1 (IC1) σε περίπου(5%), ή άγνωστη μετάλλαξη (20%).

Η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης περιπτώσεων BWS που οφείλονται σε απώλεια της μεθυλίωσης στο *KCNQ1OT1* του ICR2, σε παιδιά που γεννήθηκαν με ποβοηθούμενη αναπαραγωγή, υποδεικνύει ότι η *in vitro* καλλιέργεια, με κάποιο τρόπο μπορεί να διαταράξει τη μεθυλίωση στο ωκύτταρο ή στο ζυγωτό και συγκεκριμένα να οδηγήσει στην απώλεια μεθυλίωσης του μητρικού αλληλομόρφου[30]. Εάν αυτή η υπόθεση είναι σωστή τότε οι μεταβολές στα ανθρώπινα πρωτόκολλα καλλιέργειας των εμβρύων ART θα μπορούσαν να μειώσουν (ή να αυξήσουν) τον κίνδυνο διαταραχής της αποτύπωσης[32].

Σε μελέτες εμβρυοκαλλιιεργειών ποντικού, διαπιστώθηκε ότι η απώλεια της αποτύπωσης στο γονίδιο *H19* ενισχύθηκε με καλλιέργεια σε συγκεκριμένο καλλιιεργητικό μέσο. Η απώλεια αποτύπωσης στο *H19* συνέβη μεταξύ των σταδίων των δύο κυττάρων και βλαστοκύστης. Τα στάδια στα οποία βρέθηκε η απώλεια μεθυλίωσης υποδηλώνουν ότι οι ακριβείς συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας των εμβρύων θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κίνδυνο των επιγενετικών αλλαγών και στην ανθρώπινη υποβοηθούμενη αναπαραγωγή[32].

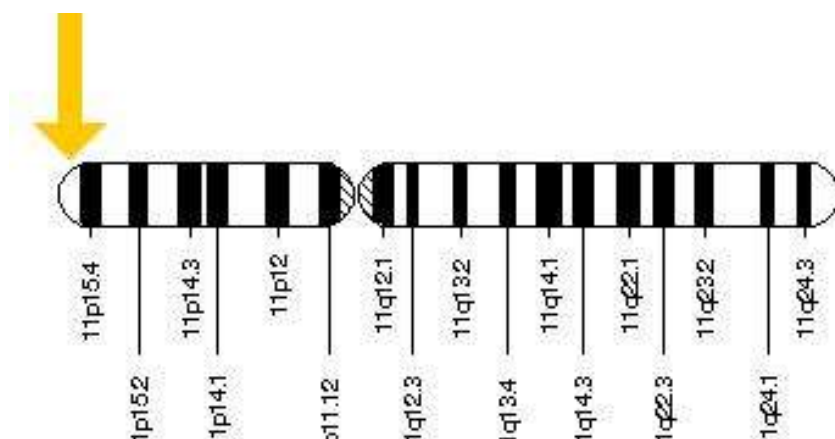
Παρόλο όμως που δεν υπάρχει συγκεκριμένη τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, που να έχει συσχετισθεί συγκεκριμένα με τον αυξημένο κίνδυνο επιγενετικών ανωμαλιών που οδηγούν στην εμφάνιση του BWS [1][31], τα στοιχεία υποδεικνύουν τη σημασία της ακριβούς καταγραφής των διαφορετικών τεχνικών της ART, ιδίως του πρωτοκόλλου διέγερσης, του ανθρώπινου χειρισμού, του σταδίου ωρίμανσης των γαμετών, των μέσων καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται σε κάθε βήμα και του χρονοδιαγράμματος της εμβρύο-μεταφοράς[31].

Πίνακας 1 Συσχέτιση κλινικών ευρημάτων με μοριακή αιτιολογία

Κλινικά χαρακτηριστικά		Μοριακή αιτιολογία	
Ημιυπερπλασία		Μονογονεϊκή δισωμία(το πιο σύνηθες) Προσθήκη μεθυλίωσης στο IC1(λιγότερο σύνηθες) Απώλεια μεθυλίωσης στο IC2 (λιγότερο σύνηθες)	
Θετικό οικογενειακό ιστορικό		Μετάλλαξη CDKN1C	Μετάθεση /Αναστροφή 11p15 Διπλασιασμός 11p15(κυτταρογενετικά ορατός)
Χειλιοσχιστία		Μετάλλαξη CDKN1C	
Ομφαλοκύλη		Μετάλλαξη CDKN1C Απώλεια μεθυλίωσης στο IC2	
Νεοπλασία			
Τύπος κακοήθειας	Κίνδυνος εμφάνισης όγκου		
Όγκος Wilms	Μεγαλύτερος του 25%	Μονογονεϊκή δισωμία	Προσθήκη μεθυλίωσης στο IC1
Ηπατοβλάστωμα			
Ηπατοβλάστωμα/ Άλλο	Μικρός ~5%	Απώλεια μεθυλίωσης στο IC2	
Όγκος μη-Wilms			
Μόνο νευροβλάστωμα	Μικρότερος του 5%	Μετάλλαξη CDKN1C	
Αναπτυξιακή καθυστέρηση		Διπλασιασμός 11p15(κυτταρογενετικά ορατός)	
Σοβαρός φαινότυπος BWS		Υψηλά επίπεδα μονογονεϊκής δισωμίας	
Μονοζυγωτικά δίδυμα			
Θηλυκά		Απώλεια μεθυλίωσης στο IC2	
Αρσενικά		Μονογονεϊκή δισωμία	Προσθήκη μεθυλίωσης στο IC1
BWS ακόλουθο υπογονιμότητας +/- ART		Απώλεια μεθυλίωσης στο IC2	

8. Το γονίδιο CDKN1C

Το γονίδιο *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C- αναστολέας της κυκλίνου-εξαρτώμενης κινάσης 1C) ανήκει στην οικογένεια CIP / kip γονιδίων, είναι μέρος ενός συμπλέγματος γονιδίων που εδράζονται στο μικρό (p) βραχίονα του χρωμοσώματος 11(11p15.5) και υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση[10]. Βρίσκεται 500 kb κεντρομερικά του γονιδίου IGF2 [33], έχει μήκος 2051 bp [10][34]και περιέχει τρία εξόνια-δύο εκ των οποίων κωδικοποιούν πρωτεΐνη- και δύο ιντρόνια



Εικόνα 9 Το γονίδιο 11 και η χρωμοσωματική περιοχή που εδράζεται το γονίδιο *CDKN1C*

πλούσια σε GC , μεγέθους 535 και 83 bp αντίστοιχα[8]. Το πρωτεϊνικό παράγωγο έχει μήκος 316 αμινοξέων και συναντάται με το όνομα CDKN1C, P57 ή KIP2[10][34]. Το γονίδιο αυτό είναι αποτυπωμένο, εκφραζόμενο κατά προτίμηση από το μητρικό αλληλόμορφο[34], χωρίς όμως αυτό να είναι απόλυτο [33].

Πράγματι, το πατρικό αλληλόμορφο έχει βρεθεί να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε διάφορους ιστούς και σε επίπεδα συγκρίσιμα με το μητρικό αλληλόμορφο στον εμβρυϊκό εγκέφαλο και σε ορισμένους εμβρυϊκούς όγκους [33]. Το πατρικά εκφραζόμενο *CDKN1C* αλληλόμορφο συμβάλλει σε ποσοστό μεταξύ 10% και 30% σε πολλαπλούς εμβρυϊκούς και ενήλικες ιστούς [27][38]. Αυτό μπορεί να εξηγήσει εν μέρει σπάνιες περιπτώσεις BWS με πατρική μετάδοση μιας παθογόνου *CDKN1C* μετάλλαξης[10].

Κοντά στο γονίδιο, η περιοχή KvDMR1 γνωστή ως κέντρο γονιδιακής αποτύπωσης 2 (ICR2) είναι αυτή που ελέγχει την αποτύπωση του *CDKN1C* καθώς και πολλά άλλα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης[1][12].

Η περιοχή 11p15.5 όπου εδράζεται το γονίδιο, έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται εκτός από το σ. Beckwith-Wiedemann (BWS) και σε σύνδρομα όπως το Silver-Russell syndrome (SRS) και το IMAGE syndrome , καθώς και σε σποραδικούς αλλά και οικογενείς καρκίνους .

Μεταλλάξεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου προκαλούν υπερανάπτυξη (BWS) ενώ μεταλλάξεις αύξησης λειτουργίας, στον τομέα δέσμευσης του PCNA οδηγούν σε περιορισμό της ανάπτυξης(SRS, IMAGE Syndrome)[10]. Όμως, μόνο μητρικά κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο *CDKN1C* σχετίζονται με αυτές τις διαταραχές της ανάπτυξης, λόγω της αποτύπωσης του γονιδίου[10].

Συγκεκριμένα για το BWS ,μόνο ένας μικρός αριθμός ασθενών, φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKN1C*[19] .Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί σε 5-10% των σποραδικών περιπτώσεων BWS [26][28], σε περίπου 40% των περιπτώσεων με προηγούμενο θετικό οικογενειακό ιστορικό[26][28]και απαντώνται συχνότερα σε άτομα με ομφαλοκήλη και υπερωισχιστία[1][35] (Πίνακας 1)

Τέλος, αρκετοί τύποι όγκων της παιδικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένων των όγκων Wilms, του καρκινώματος του φλοιού των επινεφριδίων και του ραβδομυοσαρκώματος, εμφανίζουν μια προτιμώμενη απώλεια του μητρικού

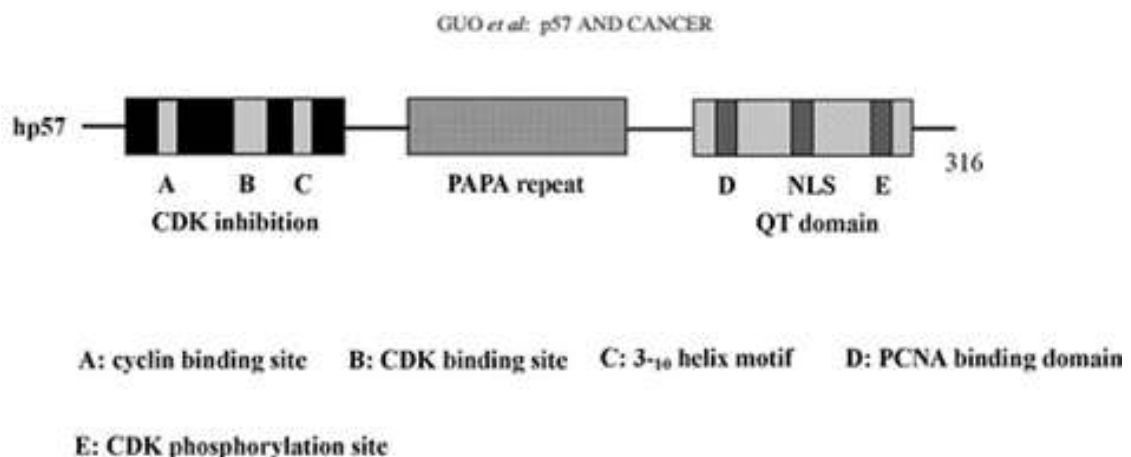
αλληλόμορφου 11p15, υποδηλώνοντας ότι η γονιδιακή αποτύπωση παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου, καθιστώντας το υποψήφιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο [43].

Όμως, παρότι η γονιδιακή αποτύπωση παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός ελέγχου της έκφρασης του. Σε ασθενείς με BWS και μειωμένη έκφραση του *CDKN1C*, παρά την φυσιολογική μεθυλίωση στο κέντρο αποτύπωσης 2(IC2), παρατηρήθηκε δραματική μείωση της διμεθυλιωμένης ιστόνης H3-K4 και αύξηση της διμεθυλιωμένης ιστόνης H3-K9 και HP1-γ στον υποκινητή του *CDKN1C*, υποδηλώνοντας ότι σε αυτές τις περιπτώσεις γονιδιακή απενεργοποίηση σχετίζεται με κατασταλτικές αλλαγές της χρωματίνης[28].

Άλλο παράδειγμα είναι η περιγραφή μιας σπάνια παραλλαγή πλήρους HYDM (υδατιδώδους μύλης), συχνά οικογενούς, η οποία παρουσιάζει μια δραματική υποέκφραση του *CDKN1C*. Σε αυτή την σπάνια παραλλαγή ένας γενετικός τόπος από άλλο χρωμόσωμα, ο 19q13.3-q13.4, φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου[36]. Σαν συμπέρασμα λοιπόν το γονίδιο *CDKN1C* μπορεί εμφανίζει μειωμένη έκφραση, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων που δεν περιλαμβάνουν μεθυλίωση του κέντρου αποτύπωσης [28][36].

9. Η πρωτεΐνη CDKN1C(p57)

Η πρωτεΐνη CDKN1C(p57 ή KIP2), είναι μια πρωτεΐνη 316 αμινοξέων που αποτελείται από τρεις (3) δομικά διακριτές περιοχές (Εικόνα 10): (i) τη N τερματική περιοχή αναστολής CDK (aa 1-110), (ii) μια κεντρική περιοχή που αποτελείται από



ένα εξαιρετικά πολυμορφικό επαναλαμβανόμενο εξανουκλεοτίδιο που κωδικοποιεί μια σειρά επαναλήψεων προλίνης-αλανίνης, PAPA-επαναλήψεις (aa 156-213) η οποία είναι επίσης αναγκαία για την αναστολή των CDK και είναι σημαντικά παρόμοια με τους CDK αναστολείς p21/Cip1 και p27/kip1 και τέλος (iii) μια εξαιρετικά διατηρημένη C-τερματική περιοχή (QT περιοχή) η οποία παρουσιάζει ομολογία με την p27/kip1 και περιέχει έναν τομέα δέσμευσης PCNA, που αποτρέπει την αντιγραφή του DNA in vitro και την είσοδο στην φάση S in vivo καθώς και ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) [7][8].

Η CDKN1C είναι ένας αναστολέας κυτταρικού κύκλου, και δεσμεύεται ισχυρά με αρκετά σύμπλοκα κυκλίνης /cdk [35]. Έτσι η πρωτεΐνη αυτή προκαλεί διακοπή του κύκλου του κυττάρου σε φάση G1 λειτουργώντας ως αρνητικός ρυθμιστής πολλαπλασιασμού των κυττάρων [3]. Έχει βρεθεί επίσης ότι η CDKN1C εμπλέκεται και στην ρύθμιση άλλων κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της απόπτωσης, της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, και της μετανάστευσης, μέσω των PAPA επαναλήψεων και του καρβοξυ-τελικού τμήματος της [7]. Εκφράζεται λόγω αποτύπωσης κυρίως από το μητρικό αλληλόμορφο σε καρδιά, εγκέφαλο, πνεύμονα, σκελετικούς μυς, νεφρούς, πάγκρεας και στους όρχεις, καθώς επίσης υψηλά επίπεδα παρατηρούνται κατά την εγκυμοσύνη στον πλακούντα της εγκύου [7][8][10]. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του *CDKN1C* είναι μεγαλύτερη στον ιστό των επινεφριδίων παρά στον εγκέφαλο ή τους μύες κατά την πρώιμη ανάπτυξη του ανθρώπου, με ανοσοϊστοχημικές μελέτες να δείχνουν την ισχυρότερη έκφραση του *CDKN1C* εντός ενός υποσυνόλου κυττάρων στην υποκαψική ή την αναπτυσσόμενη οριστική ζώνη των επινεφριδίων. [37].

10. Το γονίδιο *CDKN1C* και σε άλλες ασθένειες

Το γονίδιο *CDKN1C* είναι ένα μητρικά εκφραζόμενο γονίδιο και η πρωτεΐνη που εκφράζει ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχει δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις, αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων είτε τροποποιήσεις αποτύπωσης που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του, συνδέονται με τη διαταραχή υπερανάπτυξης, που καλείται σύνδρομο Beckwith-Wiedemann.

Όμως το γονίδιο *CDKN1C* δε συνδέεται μόνο με το σύνδρομο αυτό. Λόγω της φύσης του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, άλλα και λόγω της αποτύπωσης του, μεταλλάξεις ή αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφραση και την ρύθμιση του γονιδίου, με σημαντική απώλεια ή αύξηση λειτουργίας του, δίνοντας μια διαφορετική κλινική εικόνα κάθε φορά. Πρόσφατες λειτουργικές μελέτες εξηγούν την αυστηρή σύνδεση των *CDKN1C* μεταλλάξεων με κλινικά αντίθετους φαινοτύπους και με τον τρόπο αυτό συμβάλουν στην κατανόηση της λειτουργίας και ρύθμιση του γονιδίου σε συγκεκριμένες επιγενετικές ρυθμίσεις [10].

Σε γενικές γραμμές, μπορούν να διακριθούν τρεις τύποι μετάλλαξης σχετιζόμενοι με το γονίδιο *CDKN1C* : (i) σημειακές μεταλλάξεις *CDKN1C* απώλειας λειτουργίας που σχετίζονται με το BWS (ii) σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKN1C* που οδηγούν σε αύξηση της λειτουργίας του και προκαλούν σύνδρομο καθυστέρησης ανάπτυξης όπως το σύνδρομο IMAGe και το SRS (μέχρι τώρα έχουν εντοπιστεί μόνο στην περιοχή σύνδεσης με το PCNA-) και (iii) μεγάλες μεταβολές (όπως διαγραφές, επαναλήψεις, ή μονογονεϊκή δισωμία) στην περιοχή 11p15.5, των οποίων η επίδραση στην έκφραση του *CDKN1C* εξαρτάται από το μέγεθος τους και το γονιδιωματικό τους περιεχόμενο [10].

Επιπλέον πρέπει να επισημανθεί ότι πλέον έχει αποδειχθεί πως τροποποιήσεις αποτύπωσης γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης μείωσης ή αύξησης της έκφρασης του γονιδίου *CDKN1C*, μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω πολλαπλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων και άλλων εκτός της άμεσης μεθυλίωσης υποκινητή. Τέτοια παραδείγματα είναι η μεθυλίωση και αποακετυλίωση των ιστονών με αποτέλεσμα κατασταλτικές αλλαγές στην χρωματίνη[28][29] και η

απομακρυσμένη ρύθμιση έκφρασης αποτυπωμένων γονιδίων από τομείς που βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος ,από τα αποτυπωμένα γονίδια[36]

Παρακάτω αναφέρονται ασθένειες, σύνδρομα, ανωμαλίες κήσης, και κακοήθειες στα οποία το γονίδιο *CDKN1C* συμμετέχει:

Σύνδρομο Silver-Russell (SRS) :Το σύνδρομο Silver-Russell είναι μια διαταραχή της ανάπτυξης που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη πριν και μετά τον τοκετό .Είναι κλινικά και μοριακά ο αντίποδας του σ. Beckwith–Wiedemann . Βρέφη με Silver-Russell παρουσιάζουν χαμηλό βάρος γέννησης, αργή/ελάχιστη ανάπτυξη, αδυναμία πρόσληψης βάρους, κεφαλή ασυνήθιστα μεγάλη σε σύγκριση με το σώμα. Σε παιδική ηλικία οι ασθενείς είναι λεπτοί, χωρίς όρεξη, με πιθανόν χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα (υπογλυκαιμία), και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μαθησιακών δυσκολιών[39].

Η ακριβής αιτία είναι άγνωστη. Σε ένα 10% των περιπτώσεων του συνδρόμου βρέθηκε να σχετίζεται η μητρική μονογονεϊκή δισωμία (UPD) στο χρωμόσωμα 7[3].Όμως έχουν βρεθεί περιπτώσεις όπου εμπλέκονται γονίδια που εμφανίζουν αποτύπωση στο πατρικό αλληλόμορφο και η έκφρασή τους ελέγχεται από κεντρική περιοχή αποτύπωσης 1 (ICR1) όπως τα γονίδια *H19* και *IGF2* αλλά και τα γονίδια *CDKN1C*, *KCNQ1* όπου η έκφρασή τους ελέγχεται από κεντρική περιοχή αποτύπωσης 2 (ICR2) [39].

Συγκεκριμένα για το γονίδιο *CDKN1c* έχουν αναφερθεί περιπτώσεις SRS που οφείλονταν σε μητρική δισωμία του 11p15 που περιλαμβάνει τον κεντρομερικό τομέα ICR2 (συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *CDKN1C*), καθώς επίσης και οικογενείς περιπτώσεις SRS όπου εντοπίστηκε μετάλλαξη του γονιδίου *CDKN1C* στην περιοχή του τομέα δέσμευσης PCNA [39].

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις που παρατηρούνται στο σύνδρομο BWS, οι *CDKN1C* μεταλλάξεις που σχετίζονται με σύνδρομο καθυστέρησης της ανάπτυξης αντιπροσωπεύουν μεταλλαγές αύξησης λειτουργίας του γονιδίου[39].

Σύνδρομο IMAGE: Το σύνδρομο IMAGE είναι ένα αρκτικόλεξο για τα κύρια ευρήματα που εμφανίζουν οι ασθενείς και συγκεκριμένα, ενδομήτριο περιορισμό

ανάπτυξης (IUGR), μεταφυσιακή δυσπλασία (Metaphysial Dysplasia), τη συγγενή υποπλασία επινεφριδίων (Adrenal Hypoplasia Congenital), και ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος στους άρρενες, του συνδρόμου αυτού (Genitourinary System Anomalies)[37].

Η υποτονία και η αναπτυξιακή καθυστέρηση αναφέρονται σε ορισμένους ασθενείς, όμως φαίνεται πως η πλειοψηφία των ασθενών δεν εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά αυτά. Οι ασθενείς με σύνδρομο IMAGE, έχουν κοινά χαρακτηριστικά με ασθενείς με SRS, όπως ενδομήτριο περιορισμό ανάπτυξης και μεταγεννητική καθυστέρηση ανάπτυξης, με εξέχον μέτωπο. Ωστόσο, οι ασθενείς με σύνδρομο IMAGE συστηματικά εμφανίζουν νεογνική επινεφριδιακή ανεπάρκεια και δυσπλασία στη δομή των οστών η οποία δεν παρατηρείται σε ασθενείς με SRS[39].

Ισχυρές ενδείξεις για τη διάγνωση αποτελούν ο ενδομήτριος περιορισμός ανάπτυξης σε συνδυασμό με συγγενή υποπλασία επινεφριδίων, με ή χωρίς οικογενειακό ιστορικό συνδρόμου IMAGE[37][39].

Η διάγνωση επιβεβαιώνεται σε άτομα με εύρεση ετερόζυγης *CDKN1C* παθολογίας μεταλλαγής κοντά στην περιοχή σύνδεσης PCNA του μητρικά εκφραζόμενου αλληλομόρφου και οδηγεί σε απώλεια της περιοχής πρόσδεσης του PCNA [10][24][39].

Η *CDKN1C* παθολογία μεταλλαγή μεταδίδεται με αυτοσωμικό επικρατικό τρόπο. Ωστόσο, μόνο η μητρική μετάδοση της παθολογίας παραλλαγής οδηγεί στο σύνδρομο IMAGE. Κάθε απόγονος ασθενούς με το σύνδρομο έχει μια πιθανότητα 50% να κληρονομήσει την παθολογία παραλλαγή στο *CDKN1C* και να εμφανίσει το σύνδρομο[37].

Hydatidiform mole-υδατιδώδης μύλη (HYDM): Η υδατιδώδης μύλη είναι μια ανώμαλη κύηση, που χαρακτηρίζεται από την υπερπλασία τροφοβλάστης και υπερανάπτυξη των λαχνών του πλακούντα και κακή ανάπτυξη του εμβρύου[3].

Η γενετική βάση της εμφάνισης της στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι η ύπαρξη πατρικού γονιδιώματος σε περίσσεια, σε όλα τα χρωμοσώματα[3]. Μια πλήρης υδατιδώδης μύλη προκαλείται από ένα (συχνότητα εμφάνισης~90%) ή δύο (συχνότητα εμφάνισης ~10%) σπερματοζωάρια που γονιμοποιεί/-ούν ωάριο που έχει χάσει το DNA του (το σπέρμα τότε αναδιπλασιάζεται σχηματίζοντας ένα

"πλήρες" σύνολο 46 χρωμοσωμάτων). Ο γονότυπος είναι τυπικά 46 XX ή 46 XY (διπλοειδής και στις 2 περιπτώσεις).

Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις πλήρους HYDM οφείλονται σε πατρική μονογονεϊκή δισωμία UPD, έχει περιγραφεί μια σπάνια παραλλαγή, συχνά οικογενής, μη οφειλόμενη σε μονογονεϊκή δισωμία. Ασθενείς με πλήρη HYDM μη οφειλόμενη σε UPD, παρουσιάζουν μια σημαντική υποέκφραση του *CDKN1C*, με πρότυπο πανομοιότυπο με αυτό που παρατηρείται σε πλήρη HYDM οφειλόμενη σε UPD. Σε μελέτη του γονότυπου των ασθενών αυτών, εντοπίστηκε ομοζυγωτία στην χρωμοσωμική περιοχή 19q13.3-q13.4 παρόμοια με την οφειλόμενη σε UPD πλήρη HYDM. Συμπέρασμα αυτού του ευρήματος είναι ότι η πλήρης HYDM, μπορεί να προκύψει φαινοτυπικά σαν πλήρης HYDM οφειλόμενη σε πατρική μονογονεϊκή δισωμία, από μη φυσιολογική έκφραση αποτυπωμένων γονιδίων (όπως το *CDKN1C*) και φαίνεται ότι ένας γενετικός τόπος όπως ο 19q13.3-q13.4 μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση των αποτυπωμένων γονιδίων σε άλλα χρωμοσώματα[36].

Συσχέτιση με τον καρκίνο

Αρκετές έρευνες έχουν γίνει για την συμμετοχή του γονιδίου *CDKN1C* σε διάφορα είδη καρκίνου, είτε λόγω κάποιας μετάλλαξης πάνω στο ίδιο γονίδιο είτε λόγω κάποιας επιγενετικής μεταβολής στην αποτύπωση του γονιδίου.

Ωστόσο, η απενεργοποίηση λόγω μετάλλαξης στο *CDKN1C*, είναι σπάνια σε κακοήθειες[19] με λίγα περιστατικά, όπως για παράδειγμα ασθενείς με νευροβλάστωμα από μετάλλαξη στο *CDKN1C*[40]. Αντίθετα αρκετά συχνή είναι η υποβαθμισμένη ρύθμιση της έκφρασης του, μέσω ενός συνδυασμού επιγενετικών μεταβολών όπως απώλεια αποτύπωσης, μεθυλίωση του DNA, υπερμεθυλίωση υποκινητή, κατασταλτικής αποακετυλίωσης ιστόνης στον υποκινητή, αλλά και άλλων μηχανισμών όπως απώλεια ετεροζυγωτίας και διαφορετική ρύθμιση των microRNAs.

Συγκεκριμένα, ευρήματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση του *CDKN1C* συνήθως είναι μειωμένη, σε νεοπλασίες παγκρεατικού πόρου, καρκίνο του οισοφάγου μέσω ενός

συνδυασμού υπερμεθυλίωσης υποκινητή, αποακετυλίωση ιστόνης, είτε απώλεια του μητρικού αλληλόμορφου από το οποίο εκφράζεται το *CDKN1C*[27][41].

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η μειωμένη έκφραση του *CDKN1C* συμπίπτει με υπερέκφραση του PCNA (proliferating cell nuclear antigen) -παράγοντα απαραίτητου για την αντιγραφή του DNA-, δείχνοντας μια συνεισφορά στην εμφάνιση και εξέλιξη συγκεκριμένα σε καρκίνους του πνεύμονα, του παγκρέατος και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος[7][27].

Απώλεια αποτύπωσης (loss of imprinting-LOI) / απενεργοποίηση του μητρικού αλληλομόρφου του *CDKN1C* στο IC2 παρατηρείται συχνά σε μια σειρά ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα, των ωοθηκών, των όρχεων, καθώς και διάφορων τύπων όγκων της παιδικής ηλικίας, που περιλαμβάνουν σαρκώματα των μαλακών ιστών, όγκο Wilms, καρκίνωμα του φλοιού των επινεφριδίων, ραβδομυοσάρκωμα, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνωμα του γαστρεντερικού σωλήνα, του ήπατος, του παγκρέατος, της κεφαλής, του λαιμού κ.α. [7][38][42][43].

Τέλος, σημειώνεται ότι ο εμβρυϊκός υπότυπος ραβδομυοσάρκωματος χαρακτηρίζεται από απώλεια ολόκληρου του μητρικού αλληλομόρφου το οποίο εκφράζει το *CDKN1C*[7].

11. Κλινική και εργαστηριακή διάγνωση του BWS

Οι στρατηγικές οι οποίες ακολουθούνται για τη διάγνωση ή για την επιβεβαίωση της διάγνωσης του BWS ενός ασθενούς από τους κλινικούς ιατρούς περιγράφονται με την σειρά πραγματοποίησής τους:

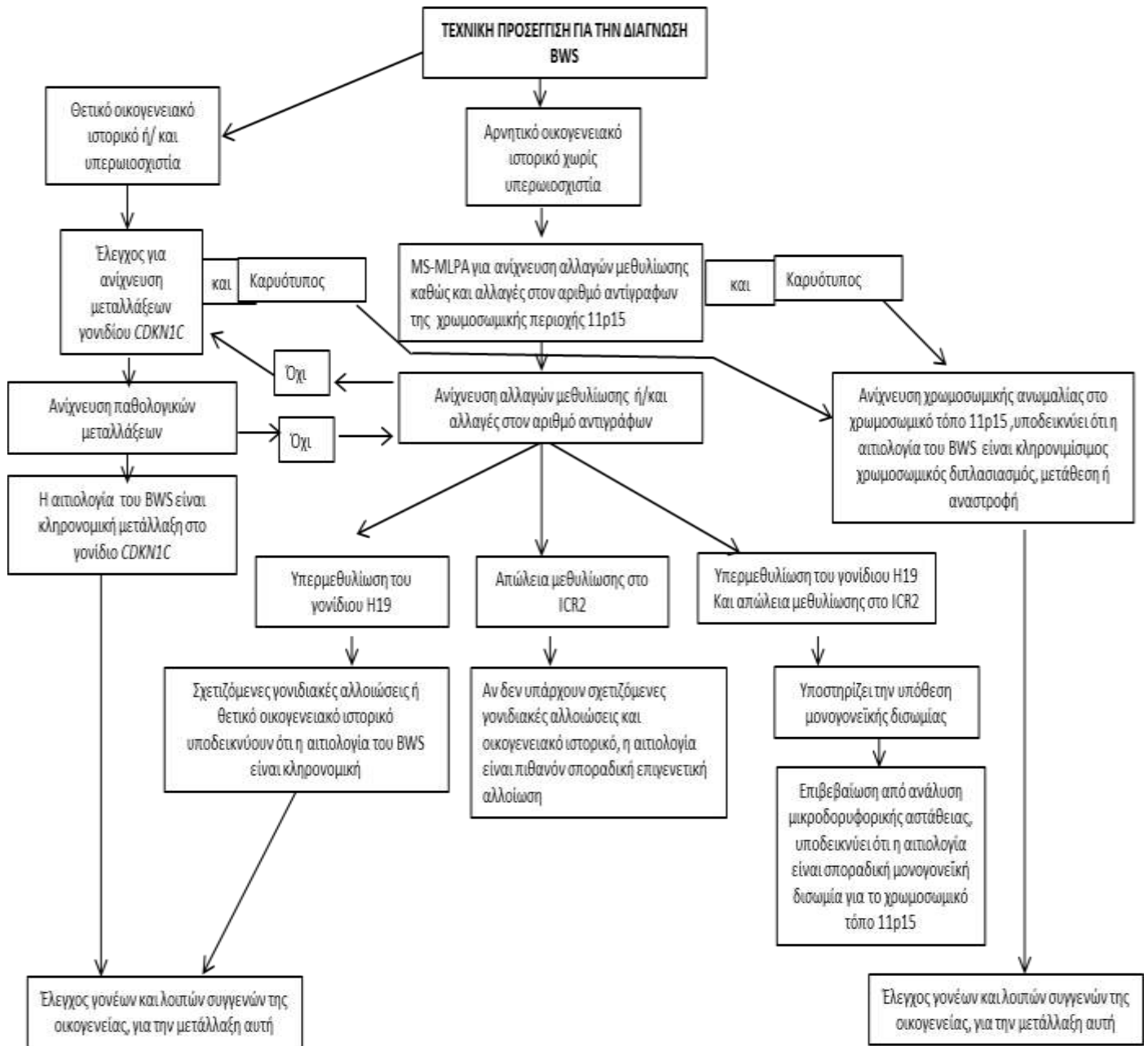
- Καρυότυπος για την εύρεση κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμων ανωμαλιών, ο οποίος μπορεί να πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τις μοριακές γενετικές εξετάσεις. Ωστόσο, αν ο ασθενής παρουσιάζει νοητική υστέρηση, ο καρυότυπος θα πρέπει να προηγείται.
- Εξέταση MS-MLPA για την διάγνωση αλλαγών της μεθυλίωσης των κέντρων γονιδιακής αποτύπωσης IC1 και IC2. Ταυτόχρονη αλλαγή στην μεθυλίωση τόσο στο IC1 όσο και στο IC2 υποδεικνύουν μονογονεϊκή δισωμία. Περαιτέρω εξετάσεις

μπορούν επίσης να πραγματοποιηθούν για την αξιολόγηση γονιδιακών μεταλλάξεων που οδηγούν σε αλλαγές μεθυλίωσης.

- Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *CDKN1C* για μεταλλάξεις. Η ανάλυση αλληλουχίας πραγματοποιείται σε οικογενείς περιπτώσεις BWS, σε ασθενείς BWS με υπερωισχιστία, ή σε άτομα που πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια για BWS, αλλά δεν έχουν καμία ανιχνεύσιμη κυτταρογενετική ανωμαλία, ανωμαλίες μεθυλίωσης, ή μονογονεϊκή δισωμία.

- Σε οικογενείς περιπτώσεις στις οποίες ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός και δεν έχει ανιχνευθεί κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο *CDKN1C* οι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται για κληρονομικά μικροελλείματα ή μικροδιπλασιασμούς με την βοήθεια της τεχνικής των microarrays[24].

Στο σχεδιάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 11) παρουσιάζεται η σειρά και η συλλογιστική κάτω από την οποία πραγματοποιούνται χρονικά οι εξετάσεις για την διάγνωση του συνδρόμου BW.



Εικόνα 11 Αλγόριθμος διαγνωστικής προσέγγισης για το BWS

C. Σκοπός μελέτης

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων που διαταράσσουν την σωστή λειτουργία του γονιδίου *CDKN1C* σε σειρά ασθενών με κλινικές ενδείξεις για BWS. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν ασθενείς που παραπέμφθηκαν για έλεγχο BWS και στους οποίους προηγήθηκε έλεγχος του προτύπου μεθυλίωσης της περιοχής 11p15 για τον αποκλεισμό των συχνότερων βλαβών που παρατηρούνται στο σύνδρομο.

D. Υλικά κα Μέθοδοι

1. Υλικό μελέτης

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και περιλαμβάνει ασθενείς οι οποίοι παραπέμπονται για σύνδρομο Beckwith-Wiedemann, από κλινικούς γενετιστές σε όλη την Ελλάδα. Στο διάστημα της μελέτης παραπέμφθηκαν 13 ασθενείς (6 αγόρια και 7 κορίτσια) ηλικίας από 2 μηνών έως 2 ετών (μέσος όρος 1,5 έτη) με κλινική ένδειξη για BWS και φυσιολογικό καρυότυπο. Σε αυτούς απομονώθηκε DNA από το περιφερικό αίμα και πραγματοποιήθηκε έλεγχος για αλλαγές μεθυλίωσης μέσω MS-MLPA, με την χρήση του kit SALSA MS-MLPA PROBEMIX ME030-C3 BWS/RSS. Για την πραγματοποίηση γονιδιακού ελέγχου για το *CDKN1C* χρησιμοποιήθηκαν δείγματα (4) ασθενών που ήταν αρνητικοί για αλλαγές μεθυλίωσης. Επιπλέον επειδή, όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, έχει περιγραφεί πιθανή συσχέτιση αλλοιώσεων του γονιδίου *CDKN1C* και με την εκδήλωση του Silver Russel (SRS) [39] πραγματοποιήθηκε έλεγχος και σε 2 άτομα που παραπέμφθηκαν για SRS. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την συναίνεση των γονέων των ασθενών, για την χρήση του γενετικού υλικού των ασθενών.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζουν ετερογένεια.

Ο ασθενής 231-12BW2C2 , αγόρι 2 μηνών παρουσίαζε ημιυπερτροφία αριστερού κάτω άκρου, μεγαλοσωμία, μεγάλο βάρος κατά την γέννηση, ομφαλοκήλη, οργανομεγαλία, καθώς και πτυχές στο λοβό του αυτιού.

Η ασθενής 292-13BW13C20, 1 έτους εμφάνιζε μακρογλωσσία, υποθυρεοειδισμό και αδρά χαρακτηριστικά προσώπου.

Η ασθενής 198-14BW17C12, 2 ετών παρουσίαζε μακρογλωσσία, μικρή υπερτροφία του δεξιού κάτω άκρου, μικρή ομφαλοκήλη, πτυχές στο λοβό του αυτιού και αμφοτερόπλευρο νεφροβλάστωμα.

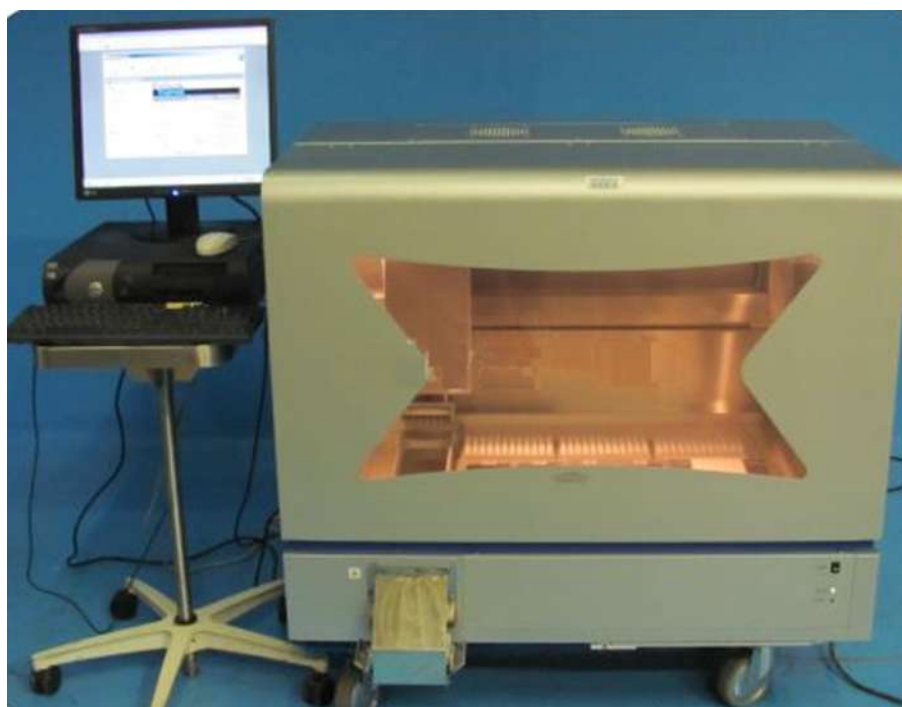
Η ασθενής 161-14BW5C7, 2 ετών εμφάνιζε μόνο μακρογλωσσία.

2. Μέθοδοι

2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα ολικού αίματος

Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιείται σε ρομποτικό σύστημα απομόνωσης «MagAttract^R DNA Blood Biorobot M48» της QIAGEN^R (Εικόνα 12) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του συστήματος MagAttract DNA Blood Midi Kit, Cat No 951356(QIAGEN,USA) και τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται βασίζεται στην πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K, σε συνδυασμό με διαδικασίες εξαλάτωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών, με αφυδάτωση και χρήση χαστροπικών αλάτων (συγκεκριμένα, άλατα οξικού καλίου και οξικού αμμωνίου). Η μόνη διαφορά αυτής της αυτοματοποιημένης μεθόδου από την κλασσική, είναι η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων στην επιφάνεια των οποίων δεσμεύεται το μόριο του DNA αποφεύγοντας την απομόνωσή του μέσω πολλαπλών φυγοκεντρήσεων. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πολλαπλές εκπλύσεις καθώς και μια τελική με



Εικόνα 12 Μηχάνημα MagAttract^R DNA Blood Biorobot M48 QIAGEN[®]

απεσταγμένο νερό, με σκοπό την αύξηση της καθαρότητας του DNA. Το καθαρό DNA είναι έτοιμο προς επεξεργασία και μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασίες 4° έως -80° C[44].

2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος της καθαρότητας του DNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000 Spectrometer (NanoDrop Technologies, USA)



Εικόνα 13 Φασματοφωτόμετρο Nanodrop-1000 Spectrophotometer

(Εικόνα 13) στα 220-275 nm. Για τον καθορισμό της συγκέντρωσης απαιτείται μόνο 1μl δείγματος, γεγονός το οποίο διευκολύνει τον καθαρισμό του οργάνου μεταξύ των εφαρμογών διαφορετικών δειγμάτων, εξασφαλίζοντας έτσι την υψηλή ακρίβεια καθώς και την επαναληψιμότητα. Το μηχάνημα παρέχει επίσης την δυνατότητα μέτρησης υψηλών συγκεντρώσεων χωρίς να χρειάζεται αραιώση(50x μεγαλύτερη συγκέντρωση από ένα κλασσικό φασματοφωτόμετρο), καθώς και αραιών συγκεντρώσεων με κατώτατο όριο 2ng/ml. Για τον καθορισμό της καθαρότητας του DNA, χρησιμοποιείται η αναλογία της απορρόφησης στα 260nm προς 280nm ,με μια αναλογία ~1,8 να είναι αποδεκτή. Μικρότερες αναλογίες υποδεικνύουν

μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, φαινόλες, ή άλλες ουσίες που απορροφούν στα 280 nm.

2.3. Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Methylation-specific MLPA® (MS-MLPA)

- **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA**

Η πολλαπλή ενίσχυση υβριδοποιημένων ανιχνευτών από το ένζυμο της λιγάσης - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), είναι μια παραλλαγή της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR η οποία επιτρέπει σε πολλαπλές αλληλουχίες στόχους να ενισχυθούν με ένα μόνο ζεύγος εκκινητών.

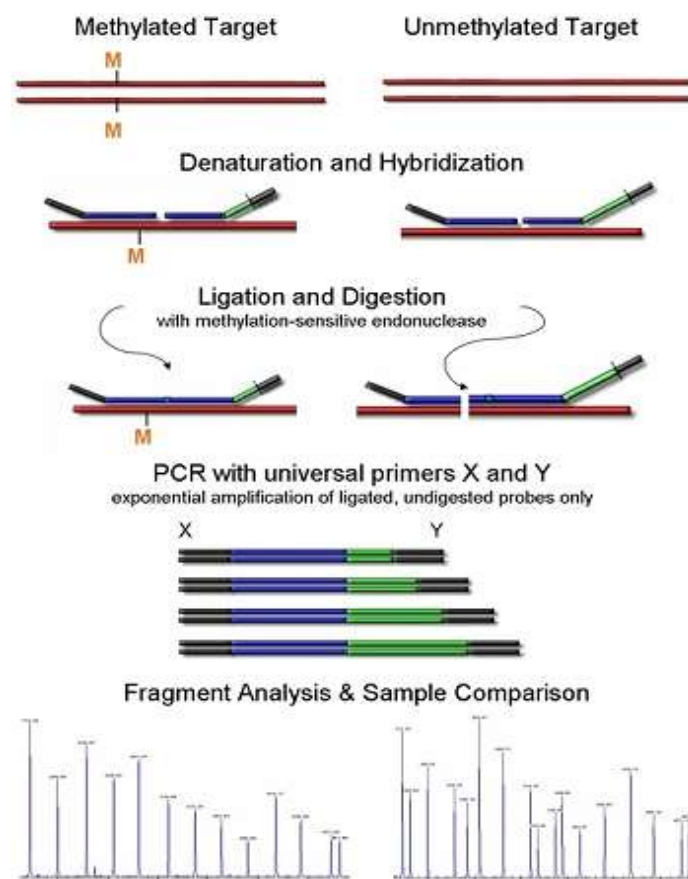
Κάθε ανιχνευτής αποτελείται από δύο ολιγονουκλεοτίδια που αναγνωρίζουν γειτονικές θέσεις στόχους στο DNA. Ο ένας ανιχνευτής περιέχει την αλληλουχία πρόσδεσης του εμπρόσθιου εκκινητή και ο άλλος ανιχνευτής περιέχει την αλληλουχία πρόσδεσης του ανάστροφου εκκινητή. Μόνο όταν και οι δύο ανιχνευτές υβριδοποιηθούν προς τους αντίστοιχους στόχους τους, μπορούν να δημιουργήσουν έναν πλήρη ανιχνευτή. Η σύνδεση του πλήρους ανιχνευτή γίνεται με την βοήθεια του ενζύμου λιγάση. Το πλεονέκτημα του διαχωρισμού του ανιχνευτή σε δύο μέρη είναι ότι μόνο οι συνδεδεμένοι ανιχνευτές, ενισχύονται στην συνέχεια μέσω της αντίδρασης PCR.

Η αλληλουχία κάθε ανιχνευτή έχει ένα μοναδικό μήκος, έτσι ώστε να μπορεί να διαχωριστεί και να αναγνωριστεί με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Ένας από τους δύο εκκινητές που συμμετέχει στην ενίσχυση ανιχνευτών είναι σημασμένος με φθοριόχρωμα. Με αυτόν τον τρόπο κάθε αμπλικόνιο παράγει μία φθορίζουσα κορυφή η οποία μπορεί να ανιχνευθεί από έναν αναλυτή DNA. Η μελέτη των αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά επεξεργασίας επιτρέπει την συγκριτική ανάλυση των προϊόντων που προκύπτουν από τις θέσεις υπό μελέτη με αυτά των θέσεων αναφοράς, προσδιορίζοντας τη σχετική ποσότητα του κάθε αμπλικονίου. Η αναλογία που προκύπτει αποτελεί μέσο υπολογισμού της σχετικής αναλογίας των αλληλουχιών στόχων στο δείγμα DNA[45].

- **Methylation-specific, MLPA MS-MLPA**

Η ειδική για μεθυλίωση MLPA (MS-MLPA) είναι μια ημι-ποσοτική μέθοδος για ανίχνευση μεθυλιωμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος. Η MS-MLPA είναι μια παραλλαγή της τεχνικής MLPA στην οποία επιτρέπεται η ταυτόχρονη μελέτη του αριθμού των αντιγράφων και του προτύπου μεθυλίωσης τους και επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός περιοριστικού ενζύμου ευαίσθητου στη μεθυλίωση, της ενδονουκλεάσης HhaI. Η MS-MLPA χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για την ανίχνευση των επιγενετικών τροποποιήσεων και από τις μεγαλύτερες εφαρμογές του αποτελούν η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε καρκινικά κύτταρα και σε ασθένειες που σχετίζονται με γονιδιακή αποτύπωση, όπως τα σύνδρομα Prader Willi, Angelman, Beckwith Wiedemann και Russell Silver.

Το πρωτόκολλο της MS-MLPA διαφέρει από την κλασική στο τελευταίο στάδιο, της λιγάσης και προυποθέτει την παρουσία δύο δειγμάτων (διαχωρισμός σε δύο φιαλίδια) ανά άτομο υπό μελέτη. Στο ένα φιαλίδιο ακολουθείται κλασική MLPA



Εικόνα 14 Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής MS-MLPA 1. αποδιάταξη DNA και υβριδισμό 41
MLPA ανιχνευτών 2. σύνδεση και πέψη 3. αντίδραση PCR 4. διαχωρισμός των ενισχυμένων
προϊόντων με τριχαιοειδή ηλεκτροφόρηση 5. ανάλυση των δεδομένων[46].

και αφορά τον αριθμό αντιγράφων ενώ στο δεύτερο προστίθεται το ειδικό για μεθυλίωση ένζυμο, και αφορά το πρότυπο μεθυλίωσης. (Εικόνα 14)

Υβρίδια των ανιχνευτών και μη μεθυλιωμένου δείγματος DNA στο δεύτερο φιαλίδιο πέπτονται από το ένζυμο. Οι ανιχνευτές που έχουν υποστεί πέψη δεν μπορούν να ενισχυθούν εκθετικά κατά τη διάρκεια της PCR και ως εκ τούτου δεν παράγουν σήμα κατά τη διάρκεια της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Αντίθετα, εάν το δείγμα DNA είναι μεθυλιωμένο, τα υβρίδια DNA-ανιχνευτή προστατεύονται από την πέψη του ενζύμου και οι προσδεμένοι ανιχνευτές δημιουργούν μια κορυφή κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

i. Συνοπτικό πρωτόκολλο MS-MLPA® για DNA ανάλυση

1. Αποδιάταξη του DNA

- Επώαση- 5 μl από το DNA (τελικής συγκέντρωσης/αντίδραση ~ 40-80 ng) DNA από κάθε προς εξέταση δείγμα για 5 min στους 98°C

2. Υβριδισμός ανιχνευτών για δείγμα DNA

- Ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα μείγματος, που αποτελείται από 1,5 μl SALSA probemix και 1,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος MLPA και ανάδευση
- Επώαση για 1 min στους 95°C και στην συνέχεια υβριδισμός για τουλάχιστον 16 ώρες στους 60°C

3. Αντίδραση σύνδεσης και σύνδεσης -πέψης των υβριδοποιημένων ανιχνευτών

- Μείωση της θερμοκρασίας του θερμοκυκλοποιητή στους 20°C,
- Προσθήκη 3 μl λιγάσης ρυθμιστικού διαλύματος A και 10 μl dH₂O σε κάθε δείγμα και ανάδευση.
- Μεταφορά 10 μl του συνολικού μείγματος σε ένα δεύτερο φιαλίδιο.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή, σε θερμοκρασία 48°C
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 10μl μείγματος Ligase-65 στο πρώτο φιαλίδιο (αντίδραση χωρίς πέψη)
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 10μl μείγματος Ligase-Digestion στο δεύτερο φιαλίδιο (αντίδραση με πέψη)
- Επώαση επί 30 λεπτά στους 48°C

- Αδρανοποίηση του ενζύμου λιγάσης για 5min στους 98°C
4. Ενίσχυση με PCR των συνδεδεμένων ανιχνευτών
- Ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου
 - Μεταφορά 10 μl σε ένα νέο σωλήνα
 - Προσθήκη 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος SALSA PCR + 26 μl dH₂O σε κάθε φιαλίδιο και ανάμειξη
 - Προσθήκη 5μl μείγματος πολυμεράσης σε θερμοκρασία δωματίου
 - Έναρξη PCR
5. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR
6. Αποτελέσματα και ανάλυση
- Καθορισμός του σχετικού μεγέθους των κορυφών φθορισμού
 - Σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα δείγματα αναφοράς
- Μείγμα Ligase-65: 1,5 μl ρυθμιστικού Ligase B + 8,25 μl dH₂O + 0,25 μl Ligase-65 ανά δείγμα
- Μείγμα Ligase -Digestion: 1,5 μl ρυθμιστικού Ligase B + 8,25μl dH₂O + 0,25μl Ligase - 65 + 0,5μl HhaI ανά δείγμα
- Μείγμα πολυμεράσης: 3,75μl dH₂O + 1 μl μείγματος PCR Primer +0,25μl SALSA polymerase ανά δείγμα

Πίνακας 2 Ανιχνευτές για το kit SALSA MS-MLPA PROBEMIX ME030-C3 BWS/RSS

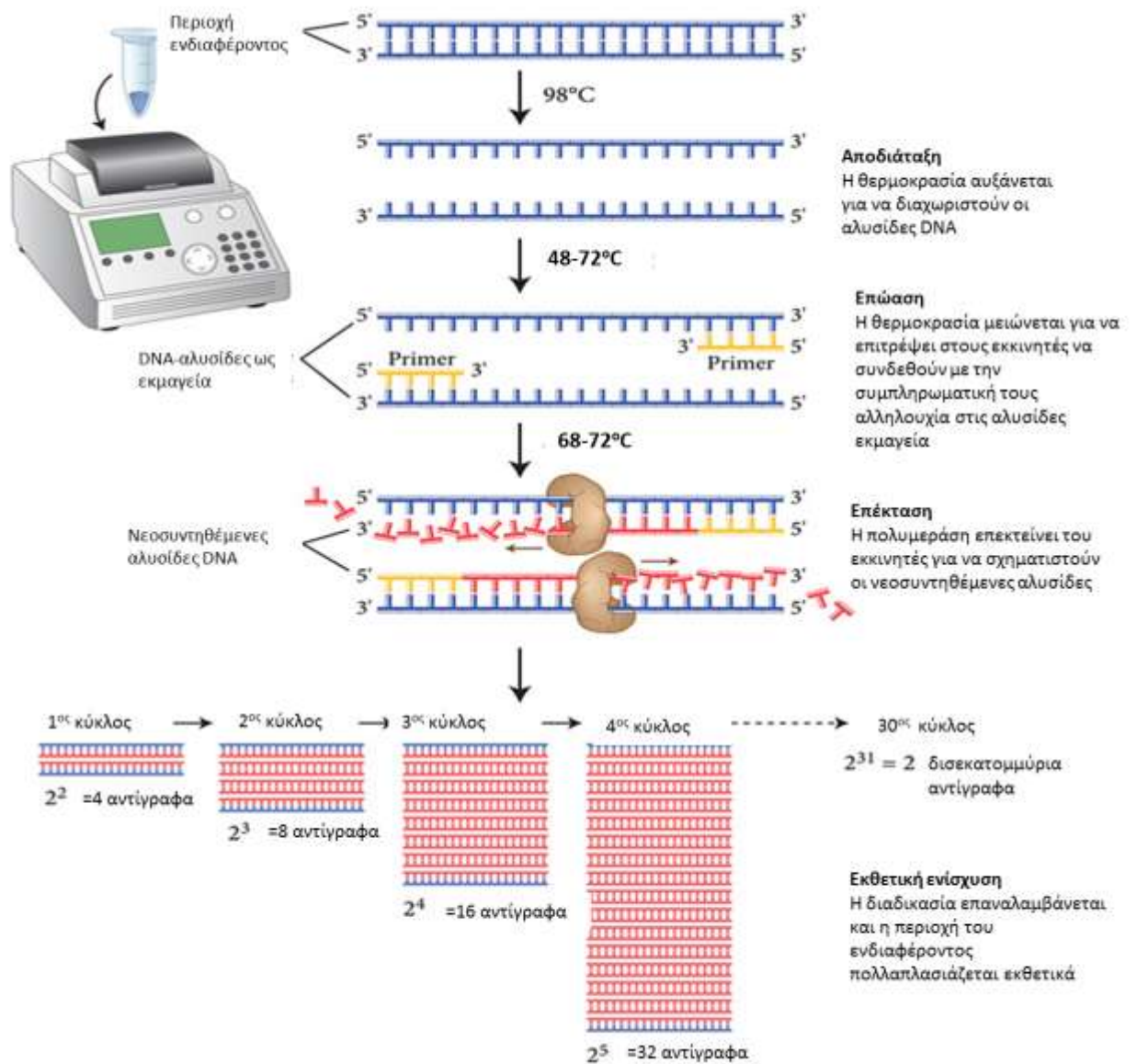
Length (nt)	SALSA MLPA probe	HhaI site	Signal reduction upon HhaI digestion of wild type DNA (from blood)*	Chromosomal position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
121	H19DMR probe 8743-L8763	Yes	50%	H19DMR
27	Reference probe 9761-L10175			16p13
135	KvDMR probe 7173-L6782	Yes	50%	KvDMR
142	H19DMR probe 8745-L8765	Yes	20-10%	H19DMR
148	Reference probe 3564-L2930	-		3p21
154	Reference probe 2944-L2376	-		7q31
160	H19 probe 2219-L1713	-		5' region
166	KvDMR probe 6276-L5782	Yes	50%	KvDMR
172	IGF2 probe 6269-L5775	Yes	100%	5' DMRO
178	Reference probe 6198-L5701	-		21q21
184	H19DMR probe 8744-L8764	-		H19DMR
190	H19 probe 10585-L11140	-		5' region
196	CDKN1C probe 6262-L5768	-		Exon 1
202	Reference probe 4487-L3876	-		1p35
214	H19 probe 10586-L11141	-		5' region
220	KCNQ1 probe 3539-L2905	-		Exon 2
229	H19 probe 6268-L5774	-		Exon 3
238	H19DMR probe 11080-L11762	Yes	50%	H19DMR
247	Methyl. ref. probe 5162-L4543	Yes	100%	17q21
256	Reference probe 1462-L0927	-		17p12
265	KCNQ1 probe 3550-L2916	-		Exon 12
277	KvDMR probe 7171-L6780	Yes	50%	KvDMR
284	IGF2 probe 6272-L5778	-		Exon 3
292	Reference probe 4231-L3567	-		8p23
301	H19DMR probe 6266-L5772	Yes	50%	H19DMR
310	Reference probe 4528-L3917	-		2q24
319	Reference probe 8761-L8801	-		10p11
328	KCNQ1 probe 3542-L4802	-		Exon 6
337	Reference probe 1590-L1162	-		13q14
346	Reference probe 4835-L4219	-		5p13
355	Methyl. ref. probe 3883-L3331	Yes	100%	20q13
364	KCNQ1 probe 3543-L4803	-		Exon 7
373	† KCNQ1 probe 3553-L2919	Yes	20-40% NOT WITHIN KvDMR	Exon 15
382	Reference probe 1922-L1466	-		1q21
393	KvDMR probe 7172-L6781	Yes	50%	KvDMR
400	KCNQ1 probe 3544-L2910	-		Exon 8
409	KCNQ1 probe 3555-L2921	-		Exon 16
418	Reference probe 1195-L0752	-		19q13
427	Reference probe 7258-L6829	-		16q24
436	KCNQ1 probe 3537-L2903	-		Alt exon
444	CDKN1C probe 6263-L5769	-		Exon 1
454	H19 probe 10588-L11143	-		5' region
463	Methyl. ref. probe 2260-L1747	Yes	100%	3p21
474	Reference probe 3984-L3251	-		11p1
481	Reference probe 6676-L6254	-		2q23

2.4. Αντιγραφή εξονίων του γονιδίου CDKN1C με την μέθοδο PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR), η οποία αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1987 από τον K. Mullis και τους συνεργάτες του, είναι η πλέον συνήθης μέθοδος για την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA in vitro. Με την βοήθεια της τεχνικής αυτής είναι δυνατή η αναπαραγωγή αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA μέχρι και 10^6 φορές. Η συγκεκριμένη μέθοδος χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία. Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής (συνήθως 25-35) που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στον χρόνο και στη θερμοκρασία:

1. Αποδιάταξη της μήτρας DNA σε θερμοκρασίες από $93-97^{\circ}\text{C}$ για 30-90 sec(template denaturation)
2. Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες στο DNA υπόστρωμα. Ο υβριδισμός των εκκινητών στη DNA μήτρα γίνεται σε θερμοκρασίες $50-70^{\circ}\text{C}$ για 30 sec ως 3min. Για κάθε ζεύγος εκκινητών, η θερμοκρασία υβριδισμού είναι συγκεκριμένη και εξαρτάται αποκλειστικά από το T_m τους το οποίο βρίσκεται βάσει της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων τους από τον τύπο $T_m=2(A+T)+4(G+C)$
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (primer extension) που έχουν υβριδοποιηθεί στην αλυσίδα με την βοήθεια ελεύθερων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και σύνθεση DNA με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Την αντίδραση καταλύει η θερμοανθεκτική πολυμεράση Taq και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η επιμήκυνση είναι $70-75^{\circ}\text{C}$ για 30 sec ως 3min. Στο τέλος κάθε κύκλου όλες οι δίκλωνες αλυσίδες

αποδιατάσσονται ξανά και η διαδικασία επαναλαμβάνεται από την αρχή.



Εικόνα 15 Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου PCR

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ετοιμασία του μείγματος με όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια

Στην συνέχεια παραλαμβάνονται τα προϊόντα PCR και διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης[47][48].

2.5. Σχεδιασμός εκκινητών

Ένα από τα πιο σημαντικά στάδια είναι ο σχηματισμός των εκκινητών της αντίδρασης PCR.

Η ικανότητα των εκκινητών να δεσμευτούν σε μια μοναδική θέση πάνω στην αλληλουχία DNA, προσδιορίζει την ειδικότητα που θα πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός. Για την αποφυγή μη ειδικού πολλαπλασιασμού υπάρχουν τρεις μεταβλητές οι οποίες θα πρέπει να προσεχθούν κατά το σχεδιασμό εκκινητών:

i) το μήκος των εκκινητών να κυμαίνεται μεταξύ 18-24 βάσεων.

Το μήκος αυτό θεωρείται κατάλληλο για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης των εκκινητών και πολλαπλασιασμού περιοχής διαφορετικής από αυτής που επιθυμούμε.

ii) η συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα συμπληρωματικότητας των βάσεων για την αποφυγή δημιουργίας διμερών μεταξύ τους.

iii) η αναλογία βάσεων για την σύσταση των εκκινητών.

Θα πρέπει τα T_m του κάθε ζεύγους εκκινητών να μην έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους ($T_m - 5$ °C), ώστε να μην υπάρχει μεγάλη απόκλιση στην θερμοκρασία υβριδισμού τους. Το T_m του εκάστοτε εκκινητή βρίσκεται από τον τύπο $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Επίσης θα πρέπει να αποφεύγεται η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, καθώς μειώνουν κατά πολύ την ειδικότητα υβριδισμού των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο *CDK1NC* για τον πολλαπλασιασμό όλων των εξονίων του (1 ως 3). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν εκ νέου στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. (Πίνακας 3) και (Εικόνα 16). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του εναλλακτικού μεταγράφου 1 του *CDKN1NC* (κωδικός γονιδίου ENSG00000129757) όπως αναφέρεται στο *ensembl* (www.ensembl.org).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να καλύπτονται όλα τα εξόνια του γονιδίου *CDKN1C*. Για την πιο εύκολη αντιγραφή των εξονίων κατά την διαδικασία της PCR, χωρίσαμε τα εξόνια

του γονιδίου σε επιμέρους τμήματα (αμπλικόνια) τα οποία σημειώνονται στην εικόνα 16 καθώς και στον πίνακα 3.

Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι για το σχεδιασμό των εκκινητών, στην αλληλουχία όλων των εμπρόσθιων εκκινητών, εκτός του επιμέρους τμήματος 1b, προστέθηκε η αλληλουχία του εκκινητή Universal primer M13 5'-gtaaacgacggccagt-3', καθώς και στην αλληλουχία όλων των οπίσθιων εκκινητών, εκτός του επιμέρους τμήματος 1b, προστέθηκε η αλληλουχία του εκκινητή Universal primer M13 5'-caggaacagctatgac-3'.

Οι αλληλουχίες αυτές προστέθηκαν για την απλούστευση της διαδικασίας αντίδρασης αλληλούχισης καθώς για το κάθε διαφορετικό αμπλικόνιο χρειάζεται τελικά μόνο ένα ζεύγος εκκινητών M13, και όχι διαφορετικά ζεύγη εκκινητών ανά αμπλικόνιο

Το γονίδιο *CDKN1C*

ENST00000414822

Chromosome 11: 2,904,443-2,907,111 reverse strand

>chromosome:GRCh37:11:2903843:2907711:-1

GGGCCTTAGGGCCAGCAGGTGTGTGAGGGCTCCAGGCGCGGGAGCCCTCGAAGGGACAC
CAGCCCAGCAGCAGCAGGCCGCGCGGGGGCAGCCGAAGACCCATCCGGCGCAGGCCAGG
GCCGAGCTGGCAGCGGCGGGTCCAAGCCTCGTCAGCTGGCGCAGGAGGCCACGGGCGAG
CGCGGGACGGAGCTGGGCGCCGGGGTCCGGACCGGGCCGGGGTTCGAGTTGGCCTGGCCG
GACACCGGACCCGCCAGGAGCCGGCCCTGCCGCGTGGGCTGAGGCCCCCGCCTGCAGA
CAAAGGAGCCGGCGGGGGGGCGGGAGCCGGGGGGTGGGGAGTGTTCAGGGGGGATGGG
GCGAGGGGGCGGGCGTCCGCGGTGTACGTTACCGCCCGCAGCGCCCTTTAACTCCCGCC
CCGCCCCGCTCACCGCCCCCTTCCCCTGCTACAGCGCGCTCGCCCCGCGGCCGCAATCA
GCCGCGCGCCCCGGCCGCGCGCCCCCGCCCCGGTGGGTGTGCGCGCG[GCCAATGG
GCGGTGCGCG]GGGGCCGGGCCGCGCGGGGCGGGGCGAGCGGGCGGCCGCAATCGCCGT
Exon1

GGTGTGTTGAAACTGAAAATACTACATTATGCTAATCGCGGCCGGGCCCGCGCGCACGG
GGGTGGGGCCCGCGCGTATAAAGGGGGCGCAGGCGGGCTGGGCGTTCCACAGGCCAAGTG
CGCTGTGCTCGAGGGGTGCCGGCCAGGCCTGAGCGAGCGAGCTAGCCAGCAGGCATCGAG
GGGGCGCGGCTGCCGTCCGGACGAGACAGGCCGAACCCGACGCAAGAGTCCACCACCGG
ACAGCCAGGTAGCCGCCGCGTCCCTCGCACACGAGAGTCGGGCGGCGGGGTCTCCCT
TGGC[CCCGGCTCCGCCCTCTCCTCCTCCTTTCCCTTCTTCTCGCTGTCTCTCCTC
TCTCGCTGCCCGCGTTTGC]GCAGCCCCGGGCCATGTCCGACGCGTCCCTCCGCAGCACAT
CCACGATGGAGCGTCTTGTGCCCGTGGGACCTCCAGTACTAGTGCACACCAGCGCCT
GCCGAGCCTCTTCGGGCCGGTGGACCACGAGGAGCTGAGCCGCGAGCTGCAGGCCCGCC
TGGCCGAGCTGAACGCCGAGGACCAGAACCCTGGGATTACGACTTCCAGCAGGACATGC
CGCTGCGGGGCCCTGGACGCCTGCAGTGGACCGAAGTGGACAGCGACTCGGTGCCCGCGT

Εμπρόσθιος
εκκινητής 1a

Ανάστροφος
εκκινητής 1a
+Εμπρόσθιος
εκκινητής 1b

TCTACCGCGAGACGGTGCAGGTGGGGCGCTGCCGCTGCTGCTGGCGCCGCGGGCCGTCG
CGGTCGCGGTGGCTGTCAGCCCGCCCCTCGAGCCGGCCGC[TGAGTCCCTCGACGGCCT]CG
AGGAGGCGCCGGAGCAGCTGCCTAGTGTCCCGGTCCCGGCCCGGCGTCCACCCCGCCCC
CAGTCCCGGTCTGGCTCCAGCCCCGGCCCCGGCTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCC
CGGCTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCCGGTCC
CGCCCCGGTCCAGTCGCGGCCCGGCCAGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCC
CCGCCCCGGCCCCGGCCCCGGACGCGGCGCCTCAAGAGAGCGCCGAGCAGGGCGCGAACC
AGGGGACGCGCGGCCAGGAGCCTCTCGCTGACCAGCTGCACTCGGGGATTCGGGACGTC
CCGCGGCCGGCACCGCGGCCAGCGCCAACGGCGCGGCGATCAAGAAGCTGTCCGGGC
CTCTGATCTCCG

Εμπρόσθιος
εκκινητής 1c +
Ανάστροφος
εκκινητής 1b

Intron 1

GTGAGCCCCGCACGGCCCCGCCCCGGCCCCGGCCCCGCTTTGTCCGGCCGGCCGGT
CCCCCAGCCCTCGGGGGCCTCGCTGGGTTCCCGC[CTCCTCCCGTGGCATTAA]AGGGCC
GCAGCGCTCAGGGCGCGGCTGCGCCCTTACCCCTCCCGCCCCGTTGTTGTGCCCTCC
AGCGGCTTCGCGCGGGCGGGGTGGGAGGCTGAATCCCGGCCGCGACCCCGGGAGCGCA
GTTTTCGCCCCCGGCCGCGGGAGCCCCTCCCGGGCGCGGCCGGGCGCCGTGAGCACGGC
GTGGAGGGGTTAAGCGCGGCGGCCCGGGGGGCTTGGCCGCGGACAAGGGAAAT
GCTTACACAGCACAT[TGCGCGGCGACGTAACA]AAGCTGACCCGCCGCGGACCTCGGCGC
GGGCGGGGACGCGCCCCACCCCGGCCGGCCCCGCGCCCCGCGCCCTCTCCCGCCCCCT
CTCGGTCTCCGGGCCGGCCCCGCCCTGACCGGCCGCGCGCGCTGTCGCCCGCAG

Ανάστροφος
εκκινητής 1c

Exon 2

ATTTCTTCGCCAAGCGCAAGAGATCAGCGCTGAGAAGTCGTCCGGCGATGTCCCCGCGC
CGTGTCCCTCTCAAGCGCCGCCCTGGCGTGGGCTCGGTGGAGCAGACCCCGCGCAAGA
GGTGCGGTGAGCCAA

Intron 2

GTGAGTACAGCGCACCTGGGGGGGCGCGGAGGGCCGACCCGCCGGGTCCCCGCCGGCTTT
GCTGACCGCCCCTCTCCTCGCAG

Exon 3

TTTAGAGCCCAAAGAGCCCCGAGGGAACCTGCCGGGGCAGCGGACGTTGGAAGGGCGCTG
GGCCTCGGCTGGGACCGTTCATGTAGCAGCAACCGCGGCGGCTGCC[GCAGAGCAGCGTTC
GGTT]TTGTTTTAAATTTTGA AAACTGTGCAATGTATTAATAACGTCCTTTTATATCTAAA
TGTATT[CTGCACGAGAAGGTACACT]GGTCCCAAGGTGTAAGCTTTAAGAGTCATTTATAT
AAAATGTTTAATCTCTGCTGAAACTCAGTGCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGGAA
AAAATAAAAAACCATGTATATTTGTACAAAAAGTTTTAAAGTTATACTAACTTATATTT
TCTATTTATGTCCAGGCGTGGACCGCTCTGCCACGCACTAGCTCGGTTATTGGTTATGCCA
AAGGCACTCTCCATCTCCACATCTGGTTATTGACAAGTGTAACTTTATTTTCATCGCGGA
CTCTGGGGAAGGGGGTCACTCACAAGCTGTAGCTGCCATACATGCCCATCTAGCTTGCGAG
TCTCTTCGCGCTTCGCTGTCTCTTATTATGACTGTGTTTATCTGAACTTGAAGACA
AGTCTGTTAAATGGTTCCTGAGCCGTCTGTACCACTGCCCGGCCCTCGTCCGCCGGG
TTCTAAATAAAGAGGCCGAAAAATGCTGCAACTCCAGTCTGTTTGTGCTTGTGCCTGCCT
CCAGTCCCTTCTCCTGCACCCCCAAA[AGCTGGAGAGCTGGAACG]CAGGAGAGAGCAGCC
CAAAGTGGGCATCCCCAGTCCATCCAAAAGGGGAAGCCTCTCTCTGGCTGGGCCTGGCC
CACCCCACCTGCTCCAGTCCCCTTATCTCAGGAGGGGCGGCCGCTGCACTGCACCCT
GCATTTATCACCTCTCACCTGCGGGGCTGCAGAAAGACAAGCCTGGACTTCATGTAGCCC
CAGGAGGCAGGGAGCACAGCCCCTGACTTGCTGCCAGACCCAGGCTTGTTTCAAGGAA
CCACCCGCAACCCTCTGCTGATGGGCTCAAGCCCCTGCTAGTTTGAAGATGCGCTGAGG

Ανάστροφος
εκκινητής 3a

Εμπρόσθιος
εκκινητής 2

Εμπρόσθιος
εκκινητής 3b

Ανάστροφος
εκκινητής 3b

TGGAGGGTGTGGAGCAGGGCTCCACCAAGACACAGCCAGTCCTCCAGACTTCTTCAGGCC
 TTGCACCAGGGTCTCCTGTTTTGTGGGCCAGGGTCTCCCTAGGTCTTGCCACAAGACAC
 TCAAAGTGTTC AAGGTCTAGTCACACCTGCAGTGGAGGAGGGGCAGCCTCGAAGCCTCTG
 AGGGGAGGCAGAAATGGGAGCACAAGGGGGAGGTGC

Εικόνα 16 Η αλληλουχία του γονιδίου CDKN1C. Στην εικόνα σημειώνονται τα αμπλικόνια στα οποία χωρίσαμε το γονίδιο για την μελέτη του, καθώς και οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το κάθε αμπλικόνιο.

Πίνακας 3 Εκκινητές γονιδίου CDKN1C

CDKN1NC ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ			
Αμπλικόνια	Εκκινητές	Αλληλουχία	Προϊόν σε bp
Αμπλικόνιο 1a.	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'-gtaaaacgacggccagtGCCAATGGGCGGTGCGCG-3'	0000446000
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-caggaaacagctatgacGCAAACGCGGGCAGCGAGA-3'	
Αμπλικόνιο 1b.	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'-TCTCGCTGCCCGCGTTTG -3'	00004180000
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-AGGCCGTGCGAGGGACTCA-3'	
Αμπλικόνιο 1c.	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'- gtaaaacgacggccagtTGAGTCCCTCGACGGCCT-3'	0000565000
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-caggaaacagctatgacTTAATGCCACGGGAGGAG-3'	
Αμπλικόνιο 2-3a.	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'-gtaaaacgacggccagtTGC GCGGCGACGTAAACA-3'	00005860000
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-caggaaacagctatgacAGTGTACCTTCTCGTG CAG-3'	
Αμπλικόνιο 3b	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'-gtaaaacgacggccagtGCAGAGCAGCGTTCGGTT-3'	0000665000
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-caggaaacagctatgacCGTTCAGCTCTCCAGCT-3'	

i. Αντιδραστήρια PCR

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε το Kit QIAGEN Multiplex PCR το οποίο περιλαμβάνει το QIAGEN Multiplex PCR Master Mix και το διάλυμα Q-Solution.

Το QIAGEN Multiplex PCR Master Mix περιέχει την DNA πολυμεράση HotStarTaq, ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl₂ και dNTPs.

Η DNA πολυμεράση HotStarTaq είναι μια τροποποιημένη μορφή της DNA πολυμεράσης Taq, η οποία σε συνθήκες περιβάλλοντος δεν έχει ενζυμική ενεργότητα γεγονός που δεν επιτρέπει την επιμήκυνση μη ειδικών εκκινητών που σχηματίζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες κατά τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης, και συνεπώς αποτρέπει την δημιουργία παραπροϊόντων.

Το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τον συνθετικό παράγοντα MP ο οποίος αυξάνει την τοπική συγκέντρωση των εκκινητών στο εκμαγείο, σταθεροποιεί τους ειδικά προσδεμένους εκκινητές και επιτρέπει την αποτελεσματική επέκταση τους. Το ρυθμιστικό διάλυμα επίσης περιέχει KCl και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ τα οποία διευκολύνουν την δράση του παράγοντα MP.

Το Q-Solution επιτρέπει την αποτελεσματική ενίσχυση περιοχών που ενισχύονται δύσκολα όπως περιοχών πλούσιων σε GC, δεν επηρεάζει την καθαρότητα του PCR προϊόντος και είναι μη τοξικό.

Για την εξασφάλιση της αντιγραφής περιοχών δυσπρόσιτων στο ένζυμο χρησιμοποιήθηκαν επιπροσθέτως κάποιοι ενισχυτικοί παράγοντες, οι Deaza-GTP Roche® και DMSO. Το Deaza-GTP συνδέεται ασθενώς με τις νουκλεοτιδικές βάσεις για την ελαχιστοποίηση των δευτεροταγών δομών DNA, ενώ είναι ένα καλό υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση. Το DMSO είναι πρόσθετο που καθιστά το DNA πιο προσιτό για ενίσχυση στο ένζυμο και βελτιώνει τον διαχωρισμό των κλώνων σε περιοχές πλούσιες σε GC.

Ενδεικτικά αναφέρονται οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μείγματος για αντίδραση PCR, τα προγράμματα και οι θερμοκρασίες των αντιδράσεων PCR (Πίνακες 4,5,6)[47][48].

Πίνακας 4 Αμπλικόνια και ποσότητες αντιδραστηρίων

AMPLICONS			
1a,1b,1c,2-3a		3b	
PREMIX		PREMIX	
MULTIPLEX 2.5 units	5 μ l	HOTSTAR 2.5 units	5 μ l
QSLN	1 μ l	MgCl ₂ 25 mM	0 μ l
MgCl ₂ 25 mM	0 μ l	H ₂ O	4 μ l
H ₂ O	1 μ l	PRIMER F 10 μ M	0,5 μ l
DMSO 5%	1 μ l	PRIMER R 10 μ M	0,5 μ l
Deaza-GTP 10 mM	0,25 μ l	DNA (20-50ng)	1 μ l
PRIMER F 10 μ M	0,5 μ l		
PRIMER R 10 μ M	0,5 μ l		
DNA (20-50ng)	1 μ l		

Πίνακας 5 Πρόγραμμα PCR για όλα τα αμπλικόνια

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR αμπλικόνια 1b,2-3a		
95°C	5min*	
94°C	1min	
zones T annealing	1.0sec	30cycles
72°C Extension	1.0sec	
72°C	10min	
4°C		

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR αμπλικόνια 1a,1c,3b		
95°C	5min*	
95°C	45sec	
zones T annealing	45sec	32cycles
72°C Extension	45sec	
72°C	10min	
4°C		

Πίνακας 6 Θερμοκρασίες PCR όλων των αμπλικόνια

Αμπλικόνια	Θερμοκρασία C°
1a	64000000
1b	58(56-64)
1c	56000000
2-3a	64(58-64)
3b	58 000000

2.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

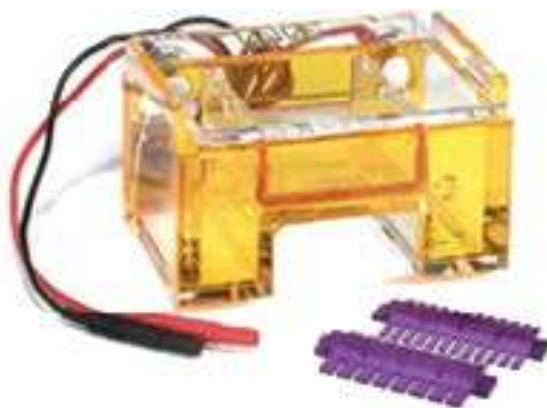
Μετά το τέλος της αντίδρασης PCR γίνεται έλεγχος, για την επιτυχία της αντίδρασης και για μέγεθος των προϊόντων της με σκοπό την επαλήθευση της απομόνωσης των σωστών προϊόντων. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η αγαρόζη(D-γαλακτόζη-3,6-άνυδρο L-γαλακτόζη) είναι γραμμικό πολυμερές, το οποίο έχει την τάση να σχηματίζει πήκτωμα. Λόγω της δομής διπλής έλικας που σχηματίζουν τα μόρια της, είναι δυνατή η δέσμευση νερού μέσα σε αυτή, δημιουργώντας έτσι πήκτωμα.

Τα προϊόντα της PCR μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε αυτό το πήκτωμα, του οποίου η συγκέντρωση καθορίζεται από το μέγεθος των προϊόντων (π.χ. 2-2.5% συγκέντρωση αγαρόζης για προϊόντα 100-500bp).

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι μια τεχνική ταχεία, εύκολα εφαρμόσιμη και στηρίζεται στην ιδιότητα του DNA, να είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι τα μόρια του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση τους μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα μόρια του DNA μετακινούνται γρήγορα προς το θετικό ηλεκτρόδιο, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια λόγω μεγέθους μετακινούνται πιο αργά. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Καθώς το πήκτωμα αγαρόζης λόγω της δομής του εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων DNA, αυτά διαχωρίζονται σε ζώνες. Οι ζώνες αυτές είναι μη ορατές με γυμνό μάτι, και για να μπορέσουν να γίνουν ορατές γίνεται χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Η χημική ουσία αυτή παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα του DNA, σχηματίζοντας σύμπλοκα με αυτή, τα οποία φθορίζουν ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την μετακίνηση των μορίων DNA μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης είναι: α) το μοριακό βάρος των μορίων του DNA, β) η συγκέντρωση της



Εικόνα 17. Συσκευή ηλεκτροφόρησης Thermo Scientific EC Classic™ (Fischer Scientific, UK)

αγαρόζης στο πήκτωμα, γ) η διαμόρφωση του DNA (κυκλική-γραμμική), δ) η εφαρμοζόμενη τάση του ρεύματος, ε) η παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών, στ) η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Για την παρασκευή του πηκτώματος απαιτούνται:

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-βορικό οξύ-EDTA (TBE 1x).

Αγαρόζη σε σκόνη (Certified Molecular Biology Agarose, Cat No 161-3102, Bio-Rad Laboratories).

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v παρασκευάζεται με 3 g αγαρόζης, 150 ml TBE και 12 μL βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε οριζόντια σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης, με χρωστική που αποτελείται από μπλε της βρωμοφαινόλης, φικόλη και H₂O. Η χρωστική χρησιμοποιείται προκειμένου το DNA που ηλεκτροφορείται να μην διαχέεται λόγω του μικρού βάρους του στο ρυθμιστικό διάλυμα αλλά και για τον ευκολότερο εντοπισμό του κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον, απαιτείται δείκτης μοριακού βάρους (μάρτυρας), ο οποίος δίνει χαρακτηριστικές ζώνες γνωστού μεγέθους κατά την ηλεκτροφόρηση, δίνοντας την δυνατότητα έτσι να μπορεί να υπολογιστεί το μέγεθος του δείγματος που ηλεκτροφορείται.

2,5 μL DNA από προϊόν PCR αναμειγνύονται με 2,5 μL χρωστικής και ηλεκτροφορούνται στα ~130 Volt παράλληλα με 2 μL δείκτη μοριακού βάρους φX174 DNA-HaeIII Digest 1.000 μg/ml, Cat No N3026s (New England Biolabs Inc., Εικόνα 17).

2.7. Ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών μέσω πρωτοκόλλου ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatched Analysis)

Η μέθοδος ECMA (Enzymatic Cleavage Mismatched Analysis) είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την αποκάλυψη μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών όπως αντικαταστάσεις, προσθήκες ή ελλείψεις μιας ή περισσότερων βάσεων του DNA. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε και τυποποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και βασίζεται στη χρήση του ενζύμου Surveyor™.

Η Surveyor Nuclease (Surveyor™) είναι μια DNA ενδονουκλεάση που ανήκει στην οικογένεια των CEL I νουκλεασών και έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τη θέση της μη συμπληρωματικότητας (mismatch) των βάσεων, σε ένα δίκλωνο μόριο DNA (ετεροδιμερές) που δημιουργείται μεταξύ του μεταλλαγμένου και του φυσιολογικού προϊόντος PCR και να κόβει σε εκείνο το σημείο προς το 3' τμήμα της θέσης αυτής .

Αρχικά στο πρώτο στάδιο της, σε θερμικό κυκλοποιητή γίνεται αποδιάταξη των αλυσίδων DNA των δειγμάτων και τυχαία επαναδιάταξη με αποτέλεσμα την εκ νέου δημιουργία ομοδιμερών ή ετεροδιμερών στη περίπτωση παρουσίας μεταλλάξεων. Στην συνέχεια, στο δεύτερο στάδιο, γίνεται πέψη των ετεροδιμερών που προέκυψαν, με το ένζυμο Surveyor™. Κατόπιν τα προϊόντα DNA ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης. Από τον αριθμό και το μέγεθος των θραυσμάτων που προκύπτουν παρέχονται πληροφορίες για τον αριθμό των μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών που υπάρχουν καθώς και για την πιθανή τους θέση.

Η μέθοδος δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό ή σήμανση για κάθε προϊόν PCR καθώς οι συνθήκες του σχηματισμού των ετεροδιμερών και της ενζυμικής πέψης είναι κοινές για όλα τα προϊόντα. Είναι γρήγορη, αποτελεσματική, ασφαλής, και πολύ απλή καθώς η ύπαρξη αλλοιώσεων γίνεται ορατή σε ένα απλό πήκτωμα αγαρόζης. Η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων με την μέθοδο ECMA είναι εφικτή σε κάθε κλασσικό εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής[49].

Όργανα-αντιδραστήρια και πειραματική πορεία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη τεχνική είναι:

- Surveyor Mutation Detection Kit, Cat No 706020 (Transgenomic®, UK) που περιέχει Surveyor Nuclease S και Surveyor Nuclease Enhancer S (104).
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA) 10% (v/v). Παρασκευάζεται από ακετυλιωμένη αλβουμίνη ορού βοός 10mg/ml, Cat No R3961 (Promega, USA).
- DNA προϊόντα PCR αλληλουχίας αναφοράς και αλληλουχίας προς μελέτη.
- Χρωστική Orange G 1X. Παρασκευάζεται από διάλυμα 6X Orange Loading Dye, Cat No R0631 (Fermentas, Canada).

- Δείκτης μοριακού βάρους 1 kb DNA ladder φX174 DNA-HaeIII Digest 1.000 µg/ml, Cat No N3026s (New England Biolabs Inc.).

Αρχικά πραγματοποιείται PCR της προς μελέτη αλληλουχίας και της αλληλουχίας ελέγχου όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στην συνέχεια πραγματοποιείται ανάμιξη των PCR προϊόντων ώστε κατά την επαναδιάταξη, σε περίπτωση ύπαρξης μεταλλάξεων, να σχηματιστούν ετεροδιμερή τα οποία θα αναγνωρίσει το ένζυμο. Η αναλογία ανάμιξης των προϊόντων PCR είναι 5 µl του προς εξέταση δείγματος με 5 µl δείγματος ελέγχου, υπό την προϋπόθεση ότι τα προϊόντα PCR έχουν περίπου την ίδια συγκέντρωση. Απαραίτητη είναι η χρήση δειγμάτων ελέγχου με γνωστή φυσιολογική αλληλουχία (αρνητικό δείγμα ελέγχου) καθώς και ενός ασθενούς με γνωστή μετάλλαξη (θετικό δείγμα ελέγχου). Έπειτα ακολουθεί αποδιάταξη και επαναδιάταξη των αλυσίδων DNA για τη δημιουργία ετεροδιμερών σε θερμικό κυκλοποιητή με βάση τις παρακάτω συνθήκες (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Συνθήκες 1^{ου} σταδίου της αντίδρασης ECMA.

Στάδιο	Συνθήκες αντίδρασης
1. Αποδιάταξη του DNA	95°C για 2min
	85°C για 1min
2. Δημιουργία ετεροδιμερών	50°C για 1 min
3. Επανάληψη των σταδίων (1-2)	

Τα δείγματα στην συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο και προστίθεται σε αυτά Surveyor Nuclease S, Surveyor Nuclease Enhancer S και BSA 1%(αραίωση από 10% v/v) σε αναλογία 1:1:1. Για ποσότητα δείγματος 10 µl, προστίθεται συνολική ποσότητα 1,5µl με αυτή την αναλογία αντιδραστηρίων.

Στην συνέχεια τα δείγματα επώζονται σε θερμικό κυκλοποιητή για 35min στην θερμοκρασία δράσης του ενζύμου στους 46°C. Τέλος τα θραύσματα DNA ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Για την ανάλυση χρησιμοποιείται 1 µl χρωστικής Orange G 1X που αναμιγνύεται με το κάθε δείγμα. Τα θραύσματα DNA φωτογραφίζονται σε υπεριώδη ακτινοβολία ανά 15 min, 30 min και 1h[49].

2.8. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε μια δεύτερη αντίδραση για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA (Sequencing reaction). Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση αυτή, τα προϊόντα της PCR υποβάλλονται σε διαδικασία καθαρισμού. Η διαδικασία αυτή έχει στόχο την απομάκρυνση υπολειμμάτων της αντίδρασης PCR (εκκινητές, δινουκλεοτίδια κλπ). Ο καθαρισμός (1 step PCR clean up) έγινε σε ένα στάδιο με την χρήση ενός και μόνο ενζύμου (Exostar-Illustra) [48].

Το ένζυμο αυτό αποτελεί μείγμα αλκαλικής φωσφατάσης με εξωνουκλεάση 1, τα οποία έχουν ως στόχο την απομάκρυνση νουκλεοτιδίων και υπολειμμάτων εκκινητών. Είναι μια γρήγορη διαδικασία, χωρίς ενδιάμεσα στάδια που μπορεί να συντελέσουν στην απώλεια προϊόντων. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

Αρχικά χρησιμοποιείται μια ποσότητα 5μl από το PCR προϊόν στην οποία προστίθενται 2μl από το ένζυμο με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε με μικρές τροποποιήσεις οι οποίες φαίνονται παρακάτω (Πίνακες 8 και 9).

Πίνακας 8 Αντιδραστήρια για τον καθαρισμό PCR ενός βήματος

1 step PCR clean up	
Exostar-1	1μl
DNA(PCR product)	2,5μl

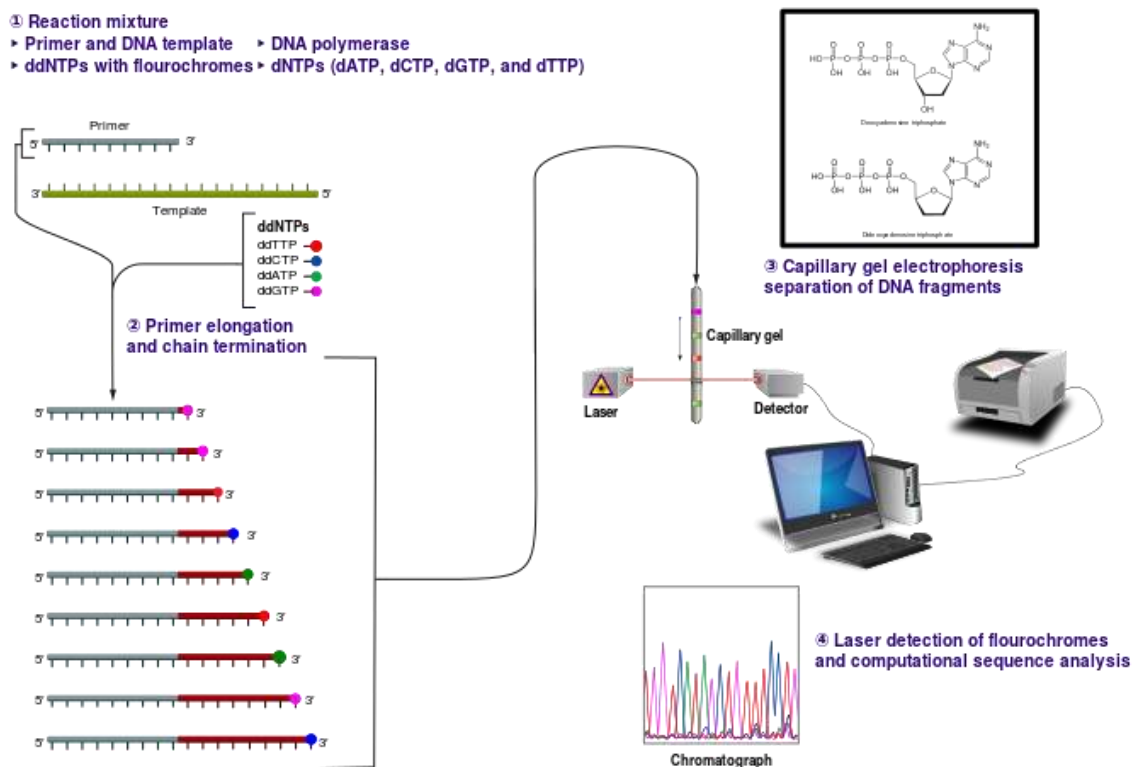
Πίνακας 9 Συνθήκες αντίδρασης καθαρισμού PCR

Συνθήκες αντίδρασης	
C°	Min
37	15
80	15

2.9. Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA/Αλληλούχιση κατά Sanger

Η αλληλούχιση του DNA είναι ο προσδιορισμός της ακριβούς αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε ένα δείγμα DNA. Η πιο δημοφιλής μέθοδος ανάλυσης καλείται μέθοδος κατά Sanger (το όνομά του από τον εφευρέτη του, Frederick Sanger). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής χρειάζεται εκτός από το DNA-μήτρα, του οποίου θα προσδιοριστεί η αλληλουχία, DNA Πολυμεράση I, ένα μίγμα τεσσάρων δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) και ένα μίγμα των αντίστοιχων διδεοξυνουκλεοτιδίων, ddATP ddGTP ddCTP ddTTP.

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην δυνατότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί κατά την αντιγραφή του DNA, εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και 2',3' τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) ως υποστρώματα, συνθετικά νουκλεοτίδια που δεν διαθέτουν την υδροξυλομάδα (-OH) στο 3' άτομο του άνθρακα. Ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο μπορεί να προστεθεί στον νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA σχηματίζοντας φωσφοδιεστερικό δεσμό με το προηγούμενο νουκλεοτίδιο, όμως η επιμήκυνση της αλυσίδας σταματά εκεί, καθώς δεν υπάρχει καμία 3'-OH για να συνδεθεί το επόμενο νουκλεοτίδιο. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή καλείται επίσης και μέθοδος τερματισμού αλυσίδας. Εάν ο λόγος των δεοξυνουκλεοτιδίων προς τα αντίστοιχα διδεοξυνουκλεοτίδια είναι αρκετά υψηλός, μερικοί κλώνοι DNA θα πετύχουν την προσθήκη αρκετών εκατοντάδων νουκλεοτιδίων πριν από την εισαγωγή του διδεοξυνουκλεοτιδίου εκδόχου του (Εικόνα 18). [50].



Εικόνα 18 Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA

Στην παρούσα εργασία για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser. Το σύστημα ηλεκτροφόρησης αυτό χρησιμοποιεί 8 τριχοειδή αγγεία τα οποία περιέχουν μια μήτρα διαχωρισμού, η οποία συντίθεται από ένα πολυμερές το POPTM. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται προκαλεί την μετακίνηση των αρνητικά φορτισμένων θραυσμάτων του DNA κατά μήκος του διαχωριστικού πολυμερούς. Στο εκάστοτε “κελί εντοπισμού” (detection cell), οι χρωστικές που είναι προσδεσμένες στο DNA διεγείρονται από ένα μικρό laser. Η δέσμη φωτός του laser κατευθύνεται κατά μήκος των τριχοειδών, και τα σημασμένα ddNTPs απορροφούν ποσότητα ενέργειας από την δέσμη φωτός αυτή και την αποδίδουν προς όλες τις κατευθύνσεις ως μεγαλύτερο μήκος κύματος. Με την ανάλυση δεδομένων από το λογισμικό, γίνεται η αντιστοίχιση των φθορισμών αυτών με 4 χρώματα τα οποία έχουν καθοριστεί για το κάθε ένα νουκλεοτίδιο της πρωτοταγούς δομής (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyser User Guide). Με το λογισμικό του συστήματος παράγεται το ηλεκτροφόρημα. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια

παρέχονται από την εταιρεία Big Dye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit. Στην συνέχεια για την ανάλυση και αποθήκευση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό BioEdit[51].

i. Πειραματική διαδικασία sequencing reaction

Η αντίδραση προετοιμάζεται στον πάγο και λαμβάνει χώρα σε θερμοκυκλοποιητή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στους πίνακες 10 και 11. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν είτε οι universal primers m-13, είτε στην περίπτωση του απλικονίου 1b οι εκκινητές της PCR αντίδρασης[51].

Πίνακας 10 Ποσότητες αντιδραστηρίων για το Sequencing Reaction mix

Sequencing Reaction Mix	Όγκος (μl)
BigDye Term Buffer(BigDye® Terminator)	1,75
BigDye Term Enzyme	0,25
Primer Forward ή Reverse(10 μM)	0,4
H2O	6,6
Προϊόν PCR	1
Τελικός όγκος	10

Πίνακας11 Συνθήκες και στάδια αντίδρασης Sequencing

Στάδια	Συνθήκες
1. Ενεργοποίηση ενζύμου	96°C για 1 min
2. Αποδιάταξη του DNA	96°C για 10 seq
3. Υβριδισμός εκκινητή	55°C για 5 seq
4. Επέκταση εκκινητή	60°C για 4 min
5. Επανάληψη σταδίων 2-4 24 φορές	-
6. Τέλος αντίδρασης	4 °C

Καθαρισμός της αντίδρασης αλληλούχισης με αιθανόλη

Για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής, απαιτείται επιπλέον καθαρισμός μετά την αντίδραση. Ο καθαρισμός που ακολουθήθηκε ήταν η διαδικασία κατακρήμνισης με αιθανόλη. Η κατακρήμνιση με αιθανόλη είναι μια ευρέως γνωστή διαδικασία για τον καθαρισμό ή την συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με την προσθήκη άλατος και αιθανόλης σε ένα διάλυμα το οποίο περιέχει DNA ή RNA. Με την παρουσία αλάτων, η αιθανόλη κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη παρατίθεται παρακάτω:

1. Για κάθε δείγμα παρασκευάζεται μίγμα από 55 μl αιθανόλης 100% και 2 μl οξικού αμμώνιου ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 7,5 M. Η αιθανόλη τοποθετείται σε σωληνάριο των 15ml και στη συνέχεια το οξικό αμμώνιο προστίθεται αργά στα τοιχώματα του σωληναρίου.
2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση ώστε το μίγμα να είναι ομοιογενές.
3. Σε κάθε δείγμα των 10 μl προστίθενται 29 μl μίγματος.
4. Το δείγμα τοποθετείται για 30 λεπτά στο ψυγείο.
5. Η ψυχόμενη φυγόκεντρος τίθεται σε λειτουργία ώστε να φθάσει την θερμοκρασία των 4°C.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2210g για 30 λεπτά στους 4°C.
7. Παρασκευάζουμε αιθανόλη 70%.
8. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αφαιρείται και προστίθενται 50 μl αιθανόλης 70%.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2210g για 3 λεπτά στους 4°C.
10. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται αναποδογυρισμένο να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
11. 10μl HiDi φορμαμίδιου προστίθενται στο βάθος των σωληναρίων και ακολουθεί ανάδευση 20 φορές με πιπέτα. Το φορμαμίδιο χρησιμοποιείται για σταθεροποίηση των μονόκλωνων αλυσίδων DNA.
12. Το δείγμα φορτώνεται σε plate και το plate καλύπτεται με πλαστικό κάλυμμα.
13. Ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρηση και κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή αλληλούχισης.

Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με χρήση του προγράμματος BioEdit Sequence Alignment Editor.

C. Αποτελέσματα

Για τον έλεγχο όλων των ασθενών (13) που παραπεμφθήκαν από τους κλινικούς ιατρούς με ένδειξη για BWS αρχικά πραγματοποιήθηκε η τεχνική MS-MLPA. Από τους 13 ασθενείς που παραπέμφθηκαν για BWS, 9 βρέθηκαν να φέρουν αλλαγές μεθυλίωσης σε κάποια από τα δύο κέντρα αποτύπωσης IC1 και IC2 στο γενετικό τόπο 11p15.

Στους υπόλοιπους 4 που δεν βρέθηκε κάποια αλλαγή στο πρότυπο μεθυλίωσης των κέντρων IC1 και IC2, πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια έλεγχος για την ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών στο γονίδιο *CDKN1C* μέσω πρωτοκόλλου ECMA και ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA.

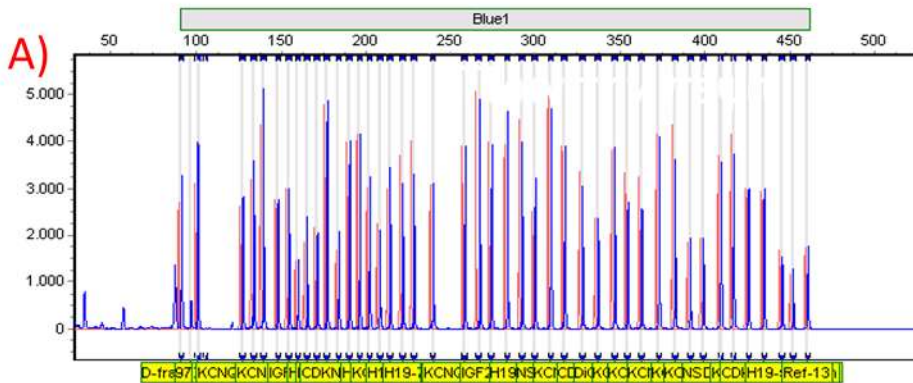
Σε αυτούς τους 4 ασθενείς, παθολογικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDKN1C* δεν βρέθηκαν σε κανέναν. Αντίθετα βρέθηκαν γνωστοί πολυμορφισμοί, αλλά και μεταλλάξεις άγνωστης κλινικής σημασίας.

Για την επιβεβαίωση των μεταλλάξεων ως μη παθολογικών έγινε επίσης έλεγχος σε δύο (2) συγγενείς αυτών καθώς επίσης σε οκτώ (8) φυσιολογικά άτομα (control). Τέλος, στα 2 άτομα που παραπέμφθηκαν για SRS και πραγματοποιήθηκε έλεγχος λόγω της πιθανής συσχέτισης των αλλοιώσεων του γονιδίου *CDKN1C* και με την εκδήλωση του Silver Russel (SRS), δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη.

Στην συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες εικόνες της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης δείγματος ασθενούς, με σύνδρομο BW στους οποίους επιβεβαιώθηκε η αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης στο IC2, καθώς και ενός φυσιολογικού ατόμου .

MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.95	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Internal Control Probe Normalization (Adjusted)
Report Time: 12/11/2013 - 14:57:54	Quantification By: Peak Height
Panel: BWSRS	Classification: Loss < 0.70 <= Equivalent <= 1.35 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Copy Number
Synthetic Used: dig 2_B07.fsa /// dig 3_C07.fsa /// dig 6_F07.fsa /// dig 7_G07.fsa /// dig4_D07.fsa /// undig 1_A08.fsa /// undig 2_B08.fsa /// undig 5_E08.fsa /// undig 6_F08.fsa /// undig 7_G08.fsa ...	

undig 8_H08.fsa -- Dye: Blue



Sample Name: undig 8
Machine: 3500 Instrument
Run Time: 12/18/2012 - 18:59:20 -> 12/18/2012 - 19:36:40

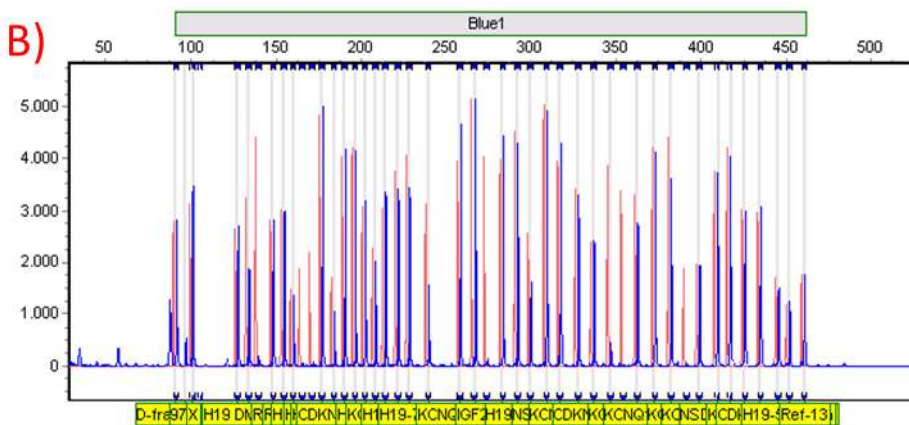
Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		



Probe Name	Bin Size	undig 8_H08
1 CDKN1C EXON3a	445.5	2
2 CDKN1C exon1b	347.1	2
3 CDKN1C Exon 1b	196.6	2
4 D-fragment	91.9	2
5 DiGCTRL Probe	355.0	2
6 H19 DMRAC1	133.9	2
7 H19- 5' region	214.2	2
8 H19-2	160.1	2
9 H19-3DMRAC1	184.2	2
10 H19-4 5' region	190.6	2
11 H19-5' region	451.9	2
12 H19-6 exon 5	228.5	2
13 H19-7DMRAC1	239.9	2
14 H19-DMRAC1	300.2	2
15 IGF2 5' DMRO	171.4	2
16 IGF2-2Exon7	283.8	2
17 KCNQ1 exon 3	221.9	2
18 KCNQ1 exon8	363.2	2
19 KCNQ1-2Exon13	266.8	2
20 KCNQ1-EXON17	410.1	2
21 KCNQ1-EXON2	434.9	2
22 KCNQ1-EXON9	399.6	2
23 KCNQ10T1 KvDMR/	274.4	2
24 KCNQ10T1-2KvDMR	165.3	2
25 KCNQ10T1KvDMR	392.0	2
26 KCNQ10T1KvDMR1	139.6	2
27 KCNQ1 Exon 7	328.0	2
28 KCNQ1exon15	373.6	2
29 NSD1-EXON22	417.6	2
30 NSD1 Exon 24	317.7	2
31 Ref 1	127.4	2
32 Ref 2	148.3	2
33 Ref 3	154.7	2
34 Ref 4	177.3	2
35 Ref 5	202.5	2
36 Ref 6	208.4	2
37 Ref 7	258.7	2
38 Ref-11	382.9	2
39 Ref-12	425.7	2
40 Ref-13	460.8	2
41 Ref-8	292.4	2
42 Ref-9	309.5	2
43 Ref10	337.2	2
44 X	101.6	2
45 Y	106.0	0

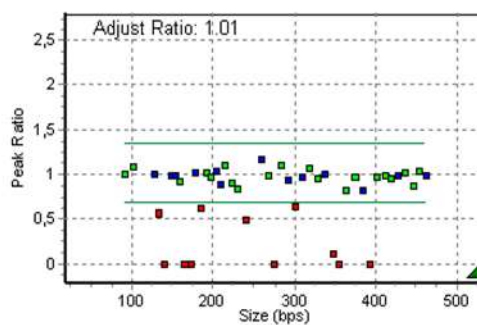
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.95	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Internal Control Probe Normalization (Adjusted)
Report Time: 12/11/2013 - 14:57:53	Quantification By: Peak Height
Panel: BWSRS	Classification: Loss < 0.70 <= Equivalent <= 1.35 < Gain
Control: Synthetic Control Sample	Report Value Type: Copy Number
Synthetic Used: dig 2_B07.fsa /// dig 3_C07.fsa /// dig 6_F07.fsa /// dig 7_G07.fsa /// dig4_D07.fsa /// undig 1_A08.fsa /// undig 2_B08.fsa /// undig 5_E08.fsa /// undig 6_F08.fsa /// undig 7_G08.fsa ...	

dig 8_H07.fsa -- Dye: Blue



Sample Name: dig 8
Machine: 3500 Instrument
Run Time: 12/18/2012 - 18:21:32 -> 12/18/2012 - 18:58:42

Conclusion		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

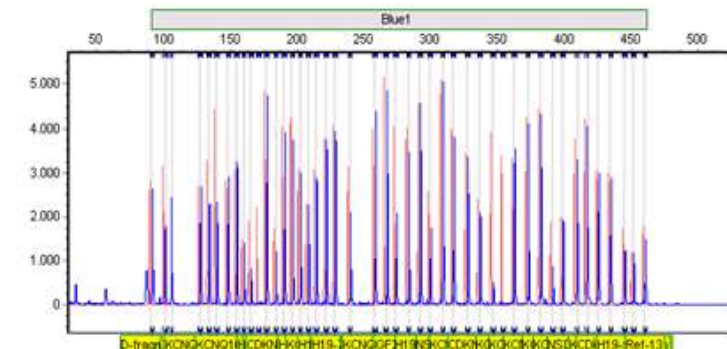


Probe Name	Bin Size	dig 8_H07
1 CDKN1C EXON3a	445.5	2
2 CDKN1C exon1b	347.1	0
3 CDKN1C Exon 1b	196.6	2
4 D-fragment	91.9	2
5 DiGCTRL Probe	355.0	0
6 H19 DMRAC1	133.9	1
7 H19- 5' region	214.2	2
8 H19-2	160.1	2
9 H19-3DMRAC1	184.2	1
10 H19-4 5' region	190.6	2
11 H19-5' region	451.9	2
12 H19-6 exon 5	228.5	2
13 H19-7DMRAC1	239.9	1
14 H19-DMRAC1	300.2	1
15 IGF2 5' DMRO	171.4	0
16 IGF2-2Exon7	283.8	2
17 KCNQ1 exon 3	221.9	2
18 KCNQ1 exon8	363.2	2
19 KCNQ1-2Exon13	266.8	2
20 KCNQ1-EXON17	410.1	2
21 KCNQ1-EXON2	434.9	2
22 KCNQ1-EXON9	399.6	2
23 KCNQ10T1 KvDMR/	274.4	0
24 KCNQ10T1-2KvDMR	165.3	0
25 KCNQ10T1KvDMR	392.0	0
26 KCNQ10T1KvDMR1	139.6	0
27 KCNQ1 Exon 7	328.0	2
28 KCNQ1exon15	373.6	2
29 NSD1-EXON22	417.6	2
30 NSD1 Exon 24	317.7	2
31 Ref 1	127.4	2
32 Ref 2	148.3	2
33 Ref 3	154.7	2
34 Ref 4	177.3	2
35 Ref 5	202.5	2
36 Ref 6	208.4	2
37 Ref 7	258.7	2
38 Ref-11	382.9	2
39 Ref-12	425.7	2
40 Ref-13	460.8	2
41 Ref-8	292.4	2
42 Ref-9	309.5	2
43 Ref10	337.2	2
44 X	101.6	2
45 Y	106.0	0

Εικόνα 19 Τυπική εικόνα αποτελεσμάτων MS-MLPA μετά από ανάλυση σε αυτόματο σύστημα τριχοειδούς αλεκτροφόρησης (ABI3500) και επεξεργασία με ειδικό λογισμικό Gene Marker 1.95 της Soft Genetics σε δείγμα ασθενή (406-12BW5C5. A) Αποτελέσματα πριν την πέψη με το ένζυμο HhaI και B) μετά την πέψη με το ένζυμο HhaI Παρατηρείται απώλεια μεθυσίωσης στο κέντρο αποτύπωσης IC2(KvDMR1)

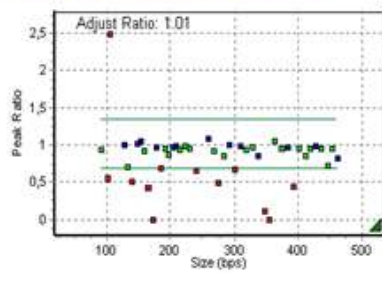
MLPA Analysis Report - SoftGenetics	
Software: GeneMarker V1.95	Analysis Type: MLPA
Project: Untitled	Compare Type: MLPA Ratio
Technician:	Normalization By: Internal Control Probe Normalization (Adjusted)
Report Time: 12/11/2013 - 14:57:52	Quantification By: Peak Height
Panel: BMSRS	Classification: Loss < 0.70 <= Equivalent <= 1.35 < Gain
Control: Synthetic Control Samples	Report Value Type: Copy Number
Synthetic Used: dig_2_B07.fsa // dig_3_C07.fsa // dig_6_F07.fsa // dig_7_G07.fsa // dig4_D07.fsa // undig_1_A08.fsa // undig_2_B08.fsa // undig_5_E08.fsa // undig_6_F08.fsa // undig_7_G08.fsa ...	

dig_2_B07.fsa -- Dye: Blue



Sample Name: dig_2
Machine: 3500 Instrument
Run Time: 12/18/2012 - 18:21:32 -> 12/18/2012 - 18:58:42

Conclusion	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

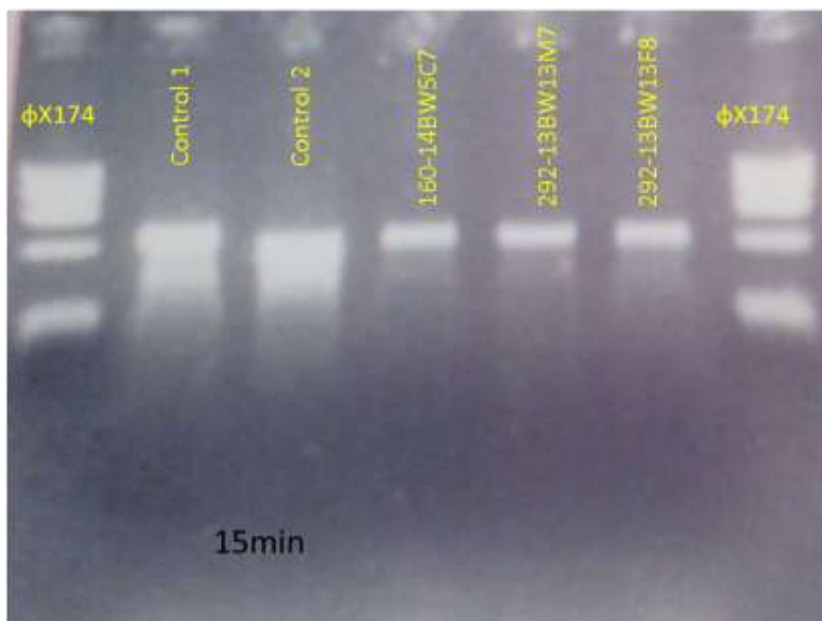


Probe Name	Bin Size	dig_2_B07
1 CDKN1C EXON3a	445.5	2
2 CDKN1C exon1b	347.1	0
3 CDKN1C exon 1b	196.6	2
4 D-fragment	91.9	2
5 DiGCTRL Probe	355.0	0
6 H19 DM/RAC1	133.9	2
7 H19-5' region	214.4	2
8 H19-2	160.1	2
9 H19-3DM/RAC1	184.2	1
10 H19-4 5' region	190.6	2
11 H19-5' region	451.9	2
12 H19-8 exon 5	228.5	2
13 H19-7DM/RAC1	239.9	1
14 H19-DM/RAC1	300.2	1
15 IGF2 5' DM/R0	171.4	0
16 IGF2-2Exon7	283.8	2
17 KCNG1 exon 3	221.8	2
18 KCNG1 exon8	383.2	2
19 KCNG1-2Exon13	266.8	2
20 KCNG1-EXON17	410.1	2
21 KCNG1-EXON2	434.9	2
22 KCNG1-EXON9	399.8	2
23 KCNG10T1 KvDM/R/	274.4	1
24 KCNG10T1-2kvDM/R	185.3	1
25 KCNG10T1kvDM/R	392.0	1
26 KCNG10T1kvDM/R	139.8	1
27 KCNG1Exon 7	328.0	2
28 KCNG1exon15	373.6	2
29 NSD1-EXON22	417.6	2
30 NSD1Exon 24	317.7	2
31 Ref 1	127.4	2
32 Ref 2	148.3	2
33 Ref 3	154.7	2
34 Ref 4	177.3	2
35 Ref 5	202.5	2
36 Ref 6	208.4	2
37 Ref 7	258.7	2
38 Ref-11	382.9	2
39 Ref-12	425.7	2
40 Ref-13	460.8	2
41 Ref-8	292.4	2
42 Ref-9	309.5	2
43 Ref10	337.2	2
44 X	101.6	1
45 Y	106.0	1

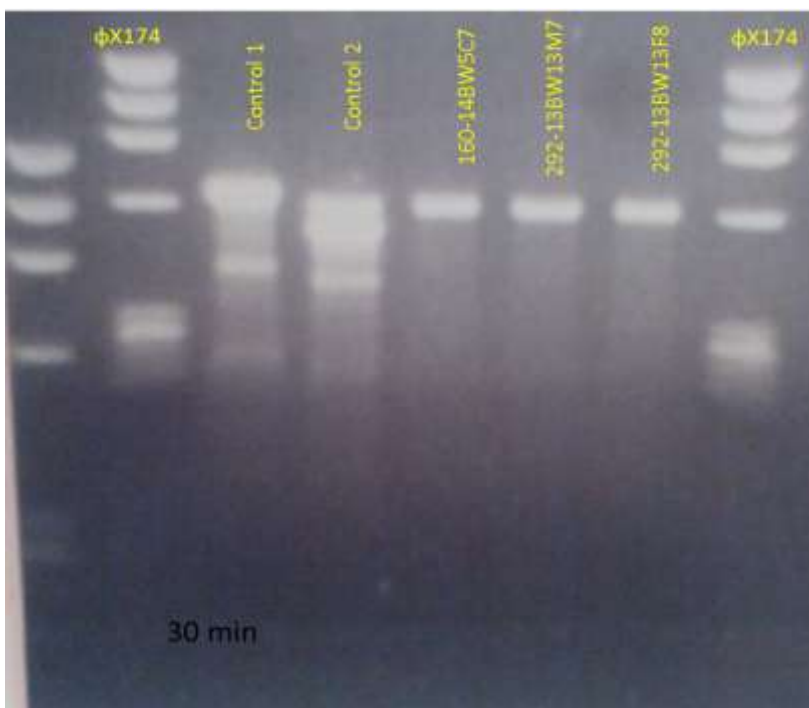
Εικόνα 20 Τυπική εικόνα αποτελεσμάτων MS-MLPA μετά από ανάλυση σε αυτόματο σύστημα τριχοειδούς αλκτροφόρησης (ABI3500) και επεξεργασία με ειδικό λογισμικό Gene Marker 1.95 της Soft Genetics σε δείγμα φυσιολογικού ατόμου . μετά την πέψη με ένζυμο HhaI.

Με την τεχνική ECMA εξετάστηκαν οι τέσσερις (4) ασθενείς που παραπέμφθηκαν για την ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών στο γονίδιο *CDKN1C*. Η τεχνική αυτή δεν κατέδειξε κάποιο εύρημα, καθώς δεν προέκυψαν πάνω από ένα θραύσματα για το κάθε ασθενή κατά την ηλεκτροφόρηση. Καθώς υπάρχει ένα μικρό ποσοστό μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών που μπορεί να διαφύγουν της τεχνικής ύψους 5-10%, έγινε περαιτέρω έλεγχος του κάθε ασθενούς με την μέθοδο ανάλυσης της πρωτοταγούς δομής του DNA κατά Sanger.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες εικόνες των ηλεκτροφορήσεων που πραγματοποιήθηκαν. Σημειώνεται πως στις εικόνες με τις ενδείξεις Control 1 και 2 αναφέρονται δείγματα ασθενών με γνωστές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες με την τεχνική ECMA.



Εικόνα 21.Εικόνα πηκτώματος αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ECMA ECMA για τμήμα του εξονίου1 (αμπλικόνιο 1C) στο χρονικό διάστημα των 15 min. Σημειώνεται ότι η εικόνα είναι μια ενδεικτική εικόνα τριών εκ των ασθενών καθώς και ότι με τις ενδείξεις Control 1-2 αναφέρονται δείγματα ασθενών με γνωστές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίσθηκαν σε προηγούμενες μελέτες με την τεχνική ECMA.



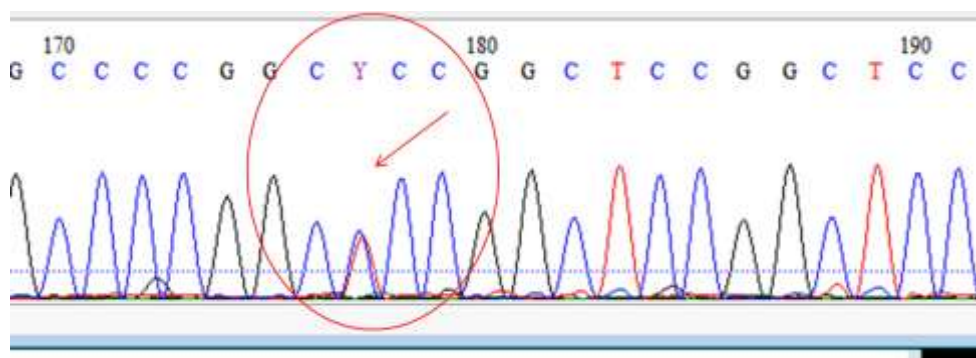
Εικόνα 22 .Εικόνα πηκτώματος αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ECMA για τμήμα του εξονίου1 (αμπλικόνιο 1C) στο χρονικό διάστημα των 30 min. Σημειώνεται ότι η εικόνα είναι μια ενδεικτική εικόνα τριών εκ των ασθενών καθώς και ότι με τις ενδείξεις Control 1-2 αναφέρονται δείγματα ασθενών με γνωστές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίσθηκαν σε προηγούμενες μελέτες με την τεχνική ECMA.



Εικόνα 23.Εικόνα πηκτώματος αгарόζης 2% των προϊόντων που λήφθηκαν μετά από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ECMA για τμήμα του εξονίου1 (αμπλικόνιο 1C) στο χρονικό διάστημα των 60 min (1h). Σημειώνεται ότι η εικόνα είναι μια ενδεικτική εικόνα τριών εκ των ασθενών καθώς και ότι με τις ενδείξεις Control 1-2 αναφέρονται δείγματα ασθενών με γνωστές μεταλλάξεις, οι οποίες εντοπίσθηκαν σε προηγούμενες μελέτες με την τεχνική ECMA.

1. Ασθενής 231-12BW2C2

Στον ασθενή 231-12BW2C2 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1(αμπλικόνιο 1c) γνωστός πολυμορφισμός c.- 947T>C.

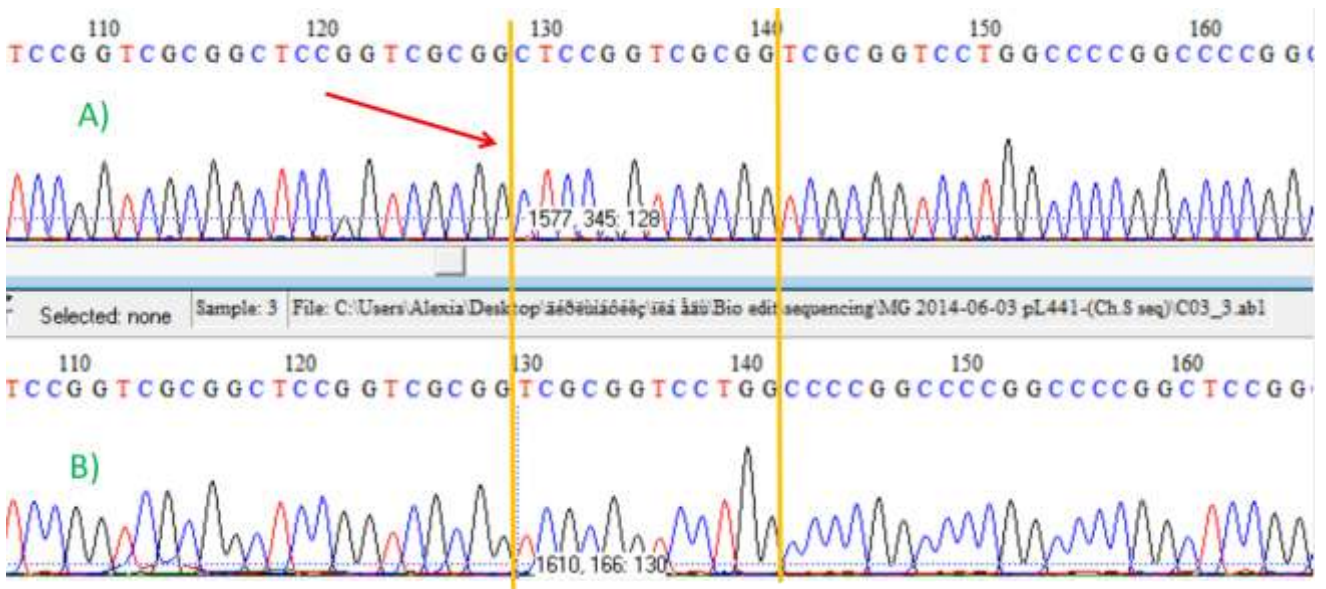


Εικόνα 24 Αλληλούχηση του αμπλικονίου 1c . στον ασθενή 231-12BW2C2 όπου παρατηρείται γνωστός πολυμορφισμός c.- 947T>C,

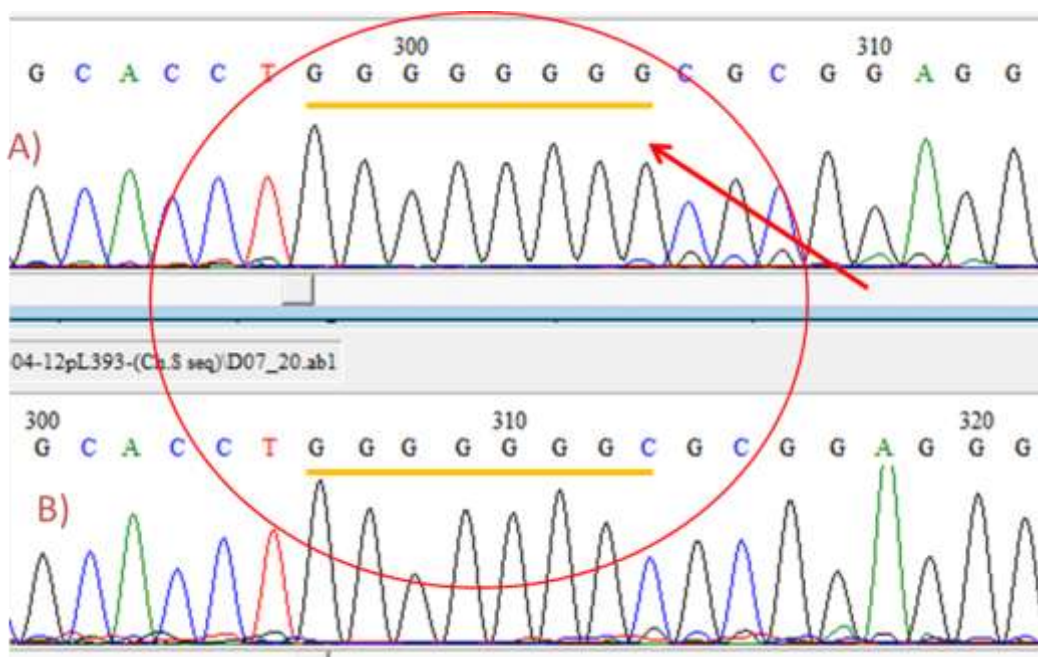
2. Ασθενής 292-13BW13C20

Στον ασθενή 292-13BW13C20 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1(αμπλικόνιο 1c) ομόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915del CTCCGGTCGCGG ,p. 171A-174V delAPVA.

Επίσης βρέθηκε στο ιντρόνιο 2 προσθήκη μιας βάσεως IVS2+24_IVS2+25insG



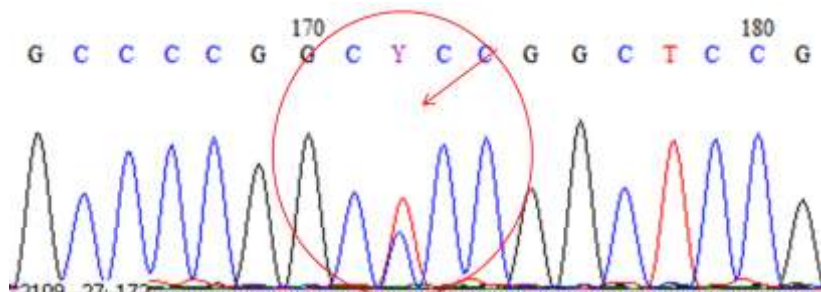
Εικόνα 25 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c στον ασθενή 292-13BW13C20 όπου παρατηρείται ομόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG ,p. 171A-174VdelAPVA Στην εικόνα α) η φυσιολογική αλληλουχία δείγματος ,και στην β) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου.



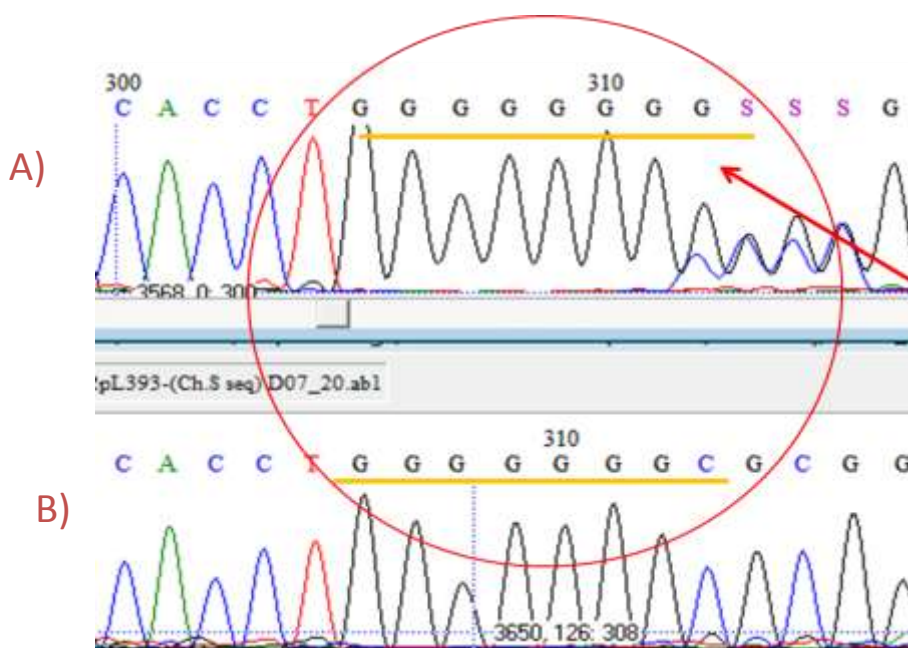
Εικόνα 26 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 2 στον ασθενή 292-13BW13C20 όπου παρατηρείται ομόζυγη προσθήκη μιας βάσης G 24 θέσεις μετά το τέλος του εξονίου 2, IVS2+24_IVS2+25insG. Στην εικόνα α) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος ,και στην β) η φυσιολογική αλληλουχία

3. Ασθενής 198-14BW17C12

Στον ασθενή 198-14BW17C12 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1(αμπλικόνιο 1c) γνωστός πολυμορφισμός c.- 947T>C.



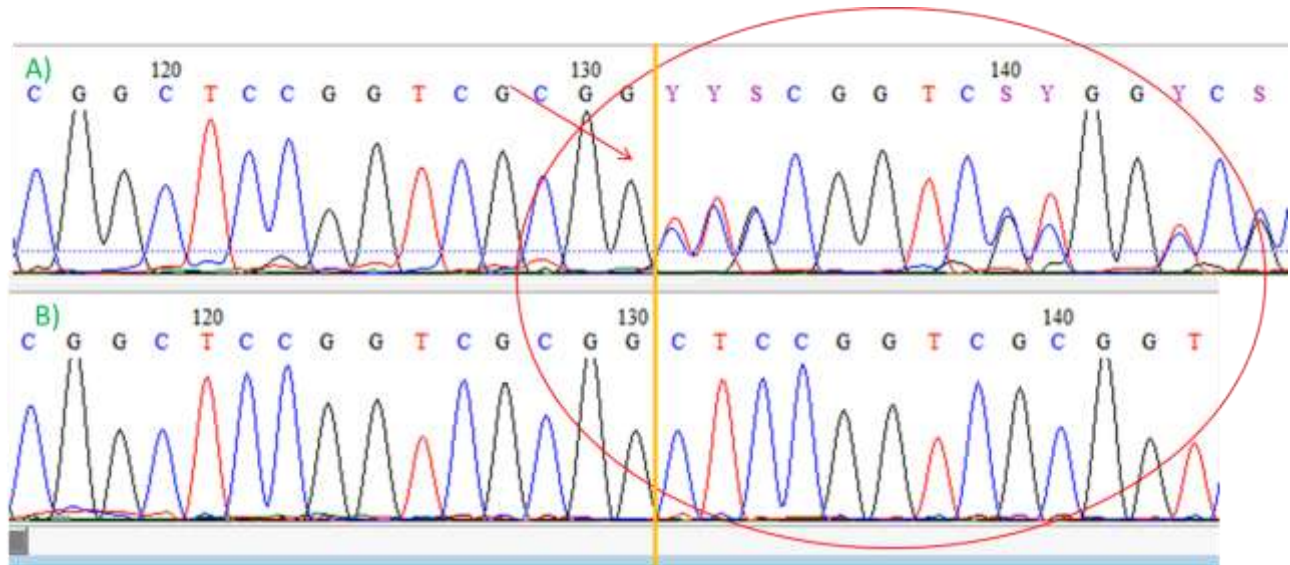
Εικόνα 27 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c του ασθενή 198-14BW17C12 όπου παρατηρείται γνωστός πολυμορφισμός c.- 947T>C,



Εικόνα 28 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 2 του ασθενή 198-14BW17C12 όπου παρατηρείται ετερόζυγη ένθεση μιας βάσης G 24 θέσεις μετά το τέλος του εξονίου 2, IVS2+24_IVS2+25insG στο ιντρονίο 2. Στην εικόνα α) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος, και στην β) η φυσιολογική αλληλουχία

4. Ασθενής 161-14BW5C7

Στον ασθενή 161-14BW5C7 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1(αμπλικόνιο 1c) ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων ,c. 904-915 delCTCCGGTTCGCGG , p. 171A-174VdelAPVA.

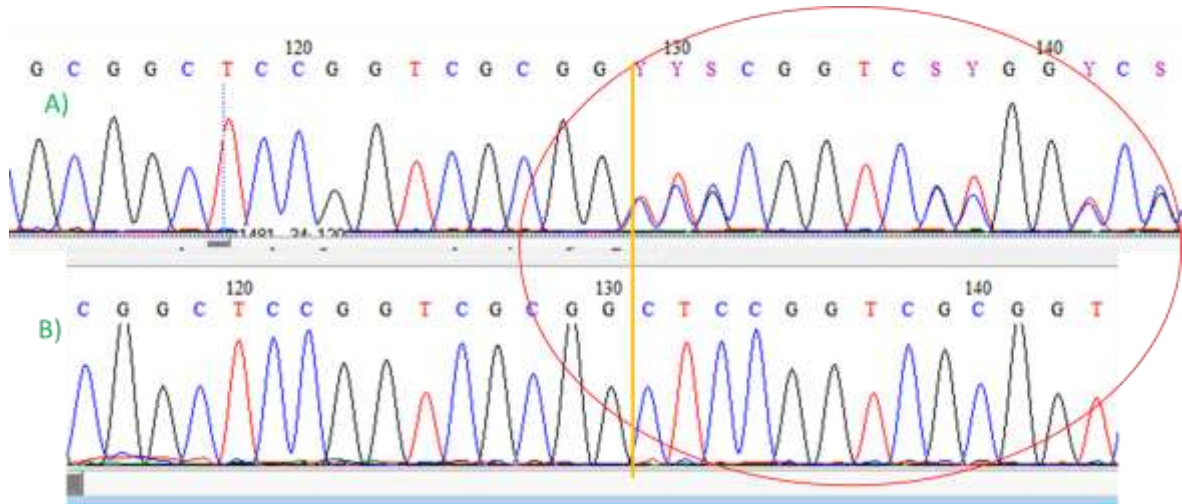


Εικόνα 29 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c 5. του ασθενή 161-14BW5C7 όπου παρατηρείται ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTTCGCGG , p. 171A-174VdelAPVA. . Στην εικόνα α) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος ,και στην β) η φυσιολογική αλληλουχία

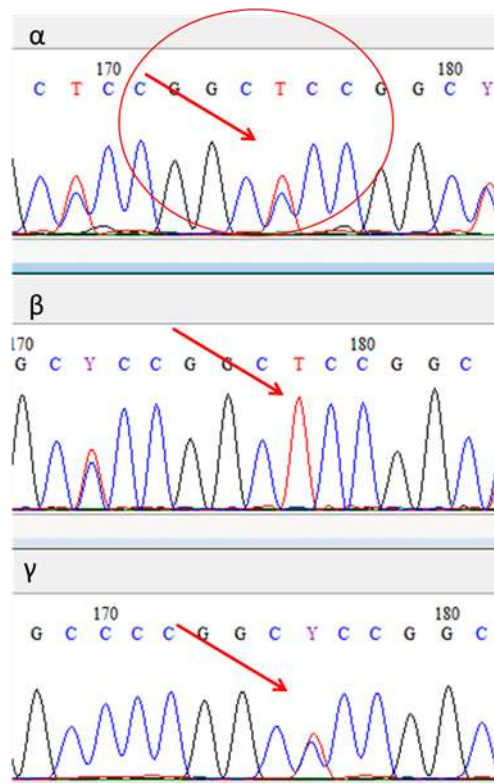
- Δείγματα ατόμων με Silver Russell
Οι ασθενείς 419-12SR4C9 και 189-14SR16C11 βρέθηκαν φυσιολογικοί για όλα τα εξόνια.

- Γονείς της ασθενούς 292-13BW13C20

a) Στη μητέρα 292-13BW13M7 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1 (αμπλικόνιο 1c) ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-175VdelAPVAV καθώς και γνωστός πολυμορφισμός c.- 947T->C.

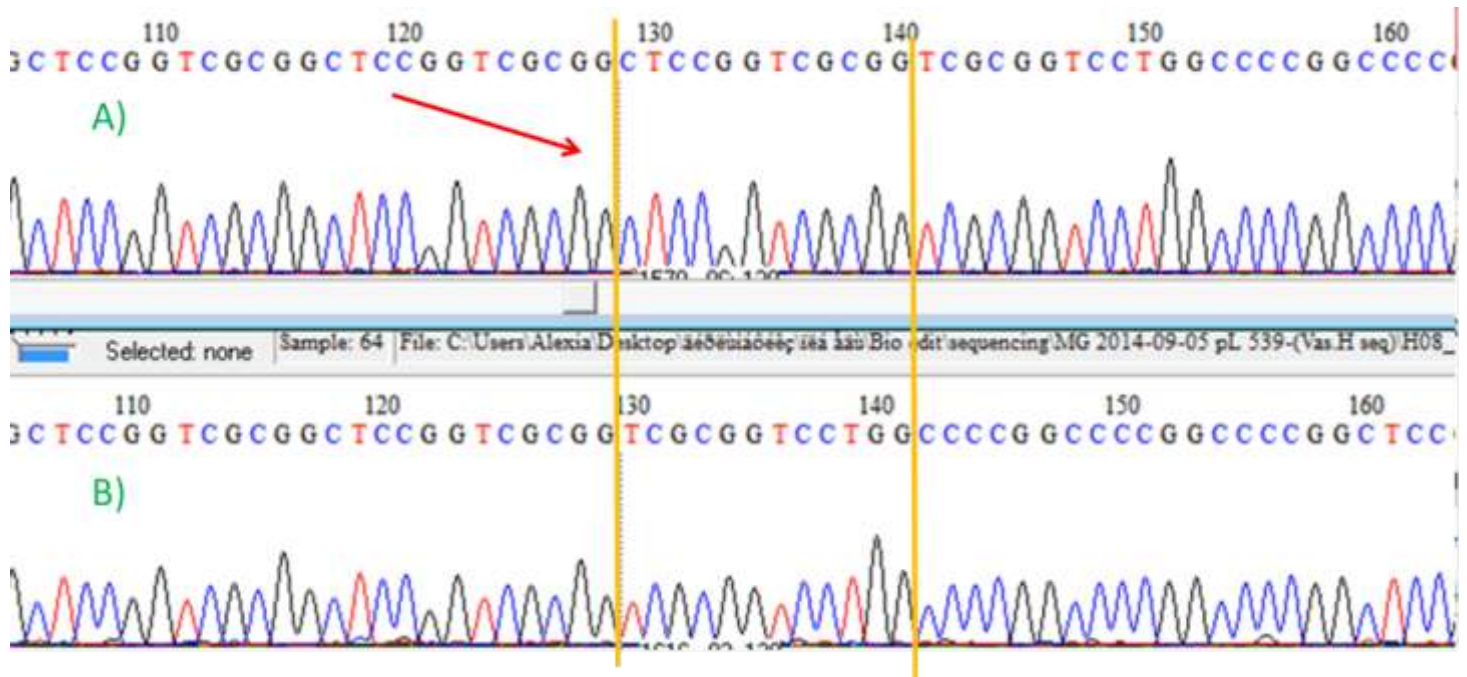


Εικόνα 30 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c στη μητέρα 292-13BW13M7 του ασθενούς 292-13BW13C20 όπου παρατηρείται ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-174VdelAPVA. Στην εικόνα α) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος ,και στην β) η φυσιολογική αλληλουχία



Εικόνα 31 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c στη μητέρα 292-13BW13M7 του ασθενούς 292-13BW13C20 όπου παρατηρείται γνωστός πολυμορφισμός c.- 947 T>C, Στην εικόνα α) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος στην οποία υπάρχει ασυμβατότητα μεταξύ των καμπύλων απεικόνισης των δύο αλληλομόρφων διότι υπάρχει ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG p. 171A-174VdelAPVA κ. Στην εικόνα β) απεικονίζεται η αλληλουχία ενός δείγματος στην οποία υπάρχει ασυμβατότητα μεταξύ των καμπύλων απεικόνισης των δύο αλληλομόρφων διότι υπάρχει ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-174VdelAPVA, χωρίς να υπάρχει όμως ο πολυμορφισμός c.- 947T>C,.Τέλος στην εικόνα γ) απεικονίζεται η αλληλουχία ενός δείγματος στην οποία υπάρχει ο πολυμορφισμός c.- 947T>C ,ενός κατά τα άλλα φυσιολογικού δείγματος

- b) Στον πατέρα 292-13BW13F8 βρέθηκε για τμήμα του εξονίου 1 (αμπλικόνιο 1c) ομόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-174VdelAPVA.

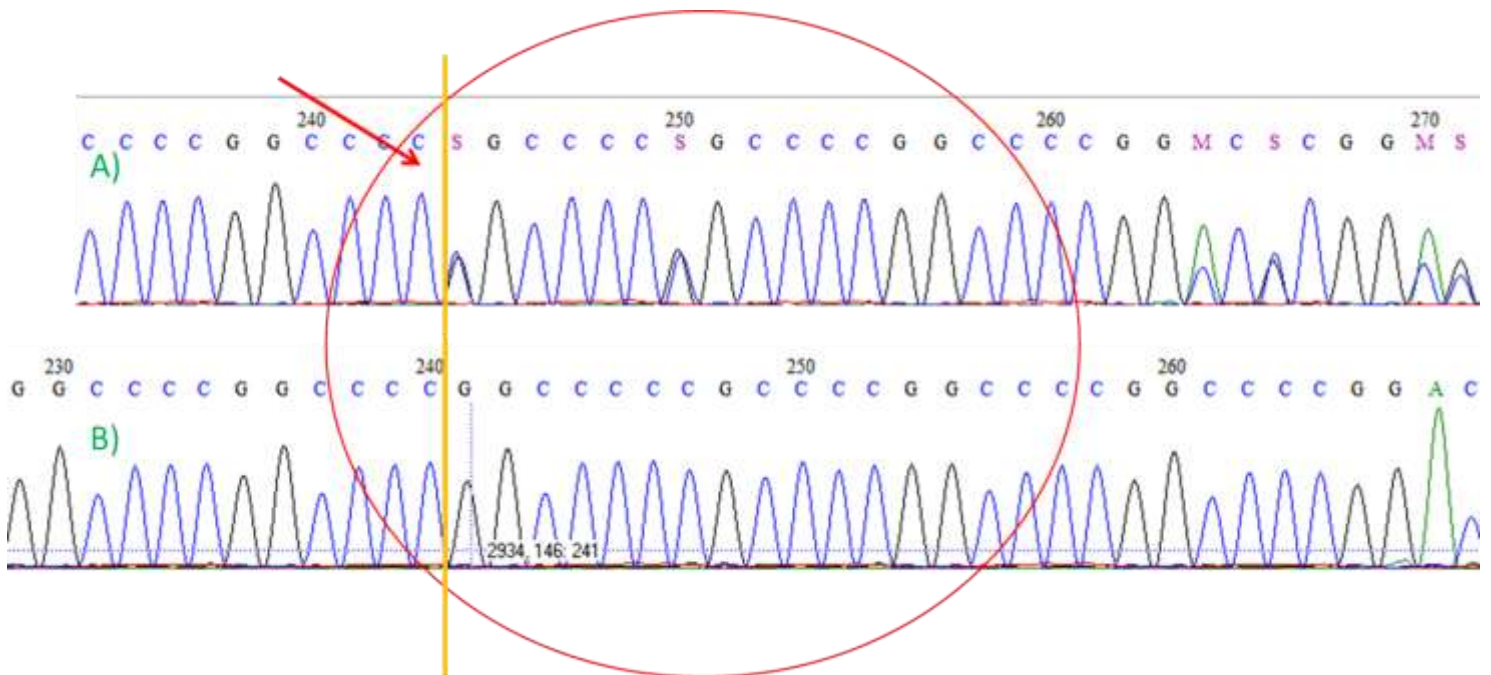


Εικόνα 32 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c στον πατέρα 292-13BW13F8 του ασθενούς 292-13BW13C20 όπου παρατηρείται ομόζυγη έλλειψη 12 βάσεων delCTCCGGTCGCGG ,c. 904-915,p. 171A-174VdelAPVA. Στην εικόνα α) η φυσιολογική αλληλουχία δείγματος ,και στην β) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου.

- Δείγματα φυσιολογικών-υγιών ατόμων (control).

Γενικότερα στην κατηγορία Control για τμήμα του εξονίου 1 (αμπλικόνιο 1c) βρέθηκαν

- Ετερόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-174VdelAPVA στο Control A
- Γνωστός πολυμορφισμός T>C, c.- 947 στα Control C, Control E, Control G
- Ομόζυγη έλλειψη 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG, p. 171A-174VdelAPVA στα Control D, Control F
- Ετερόζυγη έλλειψη 6 βάσεων c. 1016-1021 delGGCCCC , p. 209-210 delAP στο Control C



Εικόνα 33 Αποτέλεσμα αλληλούχησης του αμπλικονίου 1c στο ControlC όπου παρατηρείται ετερόζυγη έλλειψη 6 βάσεων ,c. 1016-1021 delGGCCCC p. 209-210del AP Στην εικόναα) απεικονίζεται η αλληλουχία του εξεταζόμενου δείγματος ,και στην β)η φυσιολογική αλληλουχία.

Πίνακας 12 Συνοπτική παρουσίαση ευρημάτων της παρούσας μελέτης

	Κωδικός	Αμπλικόνιο 1C	Αμπλικόνιο 2-3A
Ασθενείς			
1	231-12BW2C2	Πολυμορφισμός c.- 947T>C	Normal
2	292-13BW13C20	Ομόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	Ένθεση νουκλεοτιδίου G IVS2+24_ IVS2+25insG
3	198-14BW17C12	Πολυμορφισμός c.- 947T>C	Ένθεση νουκλεοτιδίου G IVS2+24_ IVS2+25insG
4	161-14BW5C7	Ετερόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	Normal
Control			
1	292-13BW13M7	Ετερόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG +Πολυμορφισμός c.- 947T>C	-
2	292-13BW13F8	Ομόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	-
A	-	Ετερόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	-
B	-	Normal	
C	-	Ετερόζυγο έλλειμμα c. 1016-1021 delGGCCCC+ Πολυμορφισμός c.- 947T>C	-
D	-	Ομόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	-
E	-	Πολυμορφισμός c.- 947T>C	-
F	-	Ομόζυγο έλλειμμα 904-915delCTCCGGTCGCGG	-
G	-	Πολυμορφισμός c.- 947T>C	-
H		Normal	-

Ασθενείς SR			
1	419-12SR4C9	Normal	Normal
2	189-14SR16C11	Normal	Normal

D. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία αποτελεί, εξ όσων γνωρίζουμε, την πρώτη προσπάθεια μελέτης του γονιδίου *CDKN1C* σε ασθενείς με πιθανό σύνδρομο Beckwith Wiedemann, BWS στην Ελλάδα και επέτρεψε την ανίχνευση μοριακών αλλοιώσεων που έχουν ήδη αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν πολυμορφισμούς ή μεταλλάξεις άγνωστης κλινικής σημασίας.

Από τους 13 ασθενείς που παραπέμφθηκαν για διερεύνηση BWS από κλινικούς γενετιστές στο διάστημα από 01/14 μέχρι 12/14, εννέα (9) άτομα (ποσοστό περίπου 69.2%) βρέθηκαν να φέρουν επιγενετικές αλλοιώσεις σε ένα από τα δύο κέντρα αποτύπωσης IC1 και IC2 της κρίσιμης για το σύνδρομο περιοχής 11p15.

Στους υπόλοιπους 4 ασθενείς που δεν βρέθηκε κάποια αλλαγή της μεθυλίωσης των κέντρων IC1 και IC2 πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ανίχνευση μεταλλάξεων/πολυμορφισμών του γονιδίου *CDKN1C* μέσω πρωτοκόλλου ECMA καθώς και άμεση ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA (direct sequencing). Σε 5-10% των σποραδικών περιπτώσεων BWS και περίπου 40% των περιπτώσεων με θετικό οικογενειακό ιστορικό BWS η εκδήλωση του συνδρόμου αποδίδεται στην παρουσία παθολογικών αλλοιώσεων που εμπίπτουν σε ένα ετερογενές φάσμα μεταλλάξεων του γονιδίου *CDKN1C*[26][28]. Μέχρι σήμερα, ο συνολικός αριθμός των παραλλαγών που έχουν χαρακτηριστεί είναι 62, περιλαμβάνουν 37 αντικαταστάσεις, 21 ελλείψεις, 2 ελλείψεις με ταυτόχρονη ένθεση βάσεων και 2 διπλασιασμούς με 53 από αυτές να αφορούν σε μοναδικές παραλλαγές [52]. Σαράντα δύο μεταλλάξεις επηρεάζουν την λειτουργία της πρωτεΐνης και 13 δεν έχουν ακόμη ταξινομηθεί γιατί δεν είναι αποδεδειγμένη η εμπλοκή τους στη διαταραχή της λειτουργίας της [52].

Μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπισθεί σημεία υψηλής μεταλλακτικότητας «hot spot» παρά τα σχετικά υψηλά ποσοστά εμφάνισης συγκεκριμένων αλλοιώσεων σε μελέτες που αναφέρονται στον ιταλικό πληθυσμό όπως η μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο c.845C στο εξόνιο 1 του γονιδίου. Η περιοχή αυτή φαίνεται να είναι μια ζώνη δυναμικά υψηλής μεταλλακτικότητας, καθώς 4 ασθενείς της μελέτης,

παρουσίαζαν διαφόρων ειδών μεταβολές σε αυτή τη θέση, όπως αντικαταστάσεις και ελλείμματα βάσεων[8].

Από την μελέτη στους ασθενείς που παραπέμφθηκαν, προέκυψε η ανίχνευση: α) ενός γνωστού πολυμορφισμού c.- 947T>C στο εξόνιο 1, β) προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου G 24 νουκλεοτίδια μετά το τέλος του εξονίου 2 (IVS2+24_ IVS2+25insG), γ) ενός ελλείμματος 12 βάσεων c. 904-915delCTCCGGTCGCGG στο εξόνιο 1.

Στην πρώτη περίπτωση της c.- 947T>C το τρινουκλεοτίδιο GCT μετατράπηκε σε GCC, μια συνώνυμη δηλαδή μετάλλαξη καθώς και τα δύο τρινουκλεοτίδια κωδικοποιούν για το αμινοξύ αλανίνη. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στον εξαιρετικά πολυμορφικό τομέα PAPA της πρωτεΐνης, ο οποίος αποτελείται από μια σειρά επαναλήψεων προλίνης-αλανίνης, PAPA-επαναλήψεις (aa 156-213)[7][8]. Η παραλλαγή αυτή βρέθηκε σε ετεροζυγωτία σε δύο από τους ασθενείς (231-12BW2C2 , 198-14BW17C12)

Στην δεύτερη περίπτωση της ιντρονικής παραλλαγής IVS2+24_ IVS2+25insG, η ένθεση γουανίνης 24 θέσεις μετά το τέλος του εξονίου2, στο ιντρόνιο 2, εύρημα που σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται να μην επηρεάζει την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης CDKN1C [52] Η IVS2+24_ IVS2+25insG βρέθηκε σε ομοζυγωτία σε έναν από τους ασθενείς (292-13BW13C20).

Στην τρίτη περίπτωση ανιχνεύθηκε γνωστό έλλειμμα 12 βάσεων (904-915delCTCCGGTCGCGG) (ensembl) [54] με αναμενόμενο αποτέλεσμα την, εντός πλαισίου ανάγνωσης, διαγραφή τεσσάρων αμινοξέων αλανίνης-προλίνης-βαλίνης-αλανίνης 171A-174VdelAPVA, από την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης CDKN1C [53]. Η μετάλλαξη βρίσκεται και αυτή στον εξαιρετικά πολυμορφικό τομέα PAPA της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει μια σειρά επαναλήψεων προλίνης-αλανίνης, PAPA-επαναλήψεις (aa 156-213)[7][8]. Το έλλειμμα αυτό βρέθηκε σε δύο από τους ασθενείς(292-13BW13C20 σε ομοζυγωτία και 161-14BW5C7σε ετεροζυγωτία). Για την διερεύνηση του κληρονομούμενου ή de novo χαρακτήρα της αλλοίωσης και τον πιθανό χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων ως παθολογικών ή μη, πραγματοποιήθηκε επίσης έλεγχος, στους γονείς της ασθενούς 292-13BW13C20 καθώς και σε 8 άτομα από το γενικό πληθυσμό χωρίς αναφορά κλινικών ενδείξεων για BWS (ομάδα control). Επίσης, λόγω συσχέτισης του γονιδίου *CDKN1C* με το

σύνδρομο Russell Silver πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος σε δύο ασθενείς που παραπέμφθηκαν για SRS.

Στη περίπτωση της ασθενούς 292-13BW13C20 η μητέρα έφερε το έλλειμμα 12 βάσεων σε ετεροζυγωτία ενώ ο πατέρας σε ομοζυγωτία χωρίς συνοδά κλινικά στοιχεία.

Στην περίπτωση των ασθενών με σύνδρομο SRS δεν εντοπίστηκε κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο *CDKN1C*.

Παράλληλα, σε τρία άτομα από τον φυσιολογικό πληθυσμό ανιχνεύθηκε τόσο σε ετεροζυγωτία (ένα -1- άτομο), όσο και σε ομοζυγωτία (δύο -2- άτομα) το έλλειμμα των 12 βάσεων 904-915delCTCCGGTCGCGG. Κατά τον έλεγχο του φυσιολογικού πληθυσμού βρέθηκαν επίσης τρία άτομα (Control C, Control E, Control G) που έφεραν σε ετεροζυγωτία τον πολυμορφισμό c.- 947T>C στο εξόνιο 1. Τέλος, ανιχνεύθηκε σε ένα άτομο από τον φυσιολογικό πληθυσμό (Control C) νέο έλλειμμα 6 βάσεων εντός πλαισίου ανάγνωσης c. 1016-1021 delGGCCCC, σε ετεροζυγωτία, διαγραφή δηλαδή δύο αμινοξέων αλανίνης-προλίνης p. 209-210 del AP, εύρημα το οποίο δεν βρέθηκε να αναφέρεται στην βιβλιογραφία.

Με βάση τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από την μελέτη των γονέων της ασθενούς 292-13BW13C20, αλλά και του φυσιολογικού πληθυσμού, η μετάλλαξη μπορεί να χαρακτηριστεί ως μη παθολογική στην περίπτωση του BWS. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει αφενός από το γεγονός ότι και οι δύο γονείς της ασθενούς εμφανίζονται φαινοτυπικά υγιείς - παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν το έλλειμμα των 12 βάσεων 904-915delCTCCGGTCGCGG-, και αφετέρου από την ανεύρεση στον γενικό πληθυσμό, τριών ατόμων, φαινοτυπικά υγιών, με το έλλειμμα αυτό. Βέβαια, καθώς η επίδραση της μετάλλαξης δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί, δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο να παίζει κάποιο ρόλο στην εκδήλωση άλλων ασθενειών. Η κλινική σημασία της μετάλλαξης αυτής χρήζει περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία όπως και στην βιβλιογραφία[1][4] παρουσιάζαν ετερογένεια. Τα συχνότερα αφορούσαν μακρογλωσσία, ημιυπερτροφία και πτυχές στο λοβό του αυτιού/κοιλώματα στην οπίσθια έλικα του πτερυγίου. Καθώς δεν βρέθηκαν παθογόνες

μεταλλάξεις σε κανέναν από τους ασθενείς, δεν μπορεί να γίνει κάποια συσχέτιση φαινοτύπου γονοτύπου για το γονίδιο *CDKN1C*.

Συνοψίζοντας, στην μελέτη αυτή: α) δεν βρέθηκαν παθολογικές μεταλλάξεις σε κανέναν από τους ασθενείς που παραπέμφθηκαν, αλλά μόνο πολυμορφισμοί, όπως και κάποιες μεταλλάξεις των οποίων η επίδραση μένει να επιβεβαιωθεί, β) βρέθηκε ότι η συχνότητα της εμφάνισης διαγραμμένων αμινοξέων στον τομέα ΡΑΡΑ της πρωτεΐνης *CDKN1C*, στο φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρκετά μεγάλη καθώς 4 στα 8 φυσιολογικά άτομα παρουσίασαν απαλοιφή αμινοξέων στον τομέα ΡΑΡΑ, γ) αναμένεται δε η πιθανότητα εμφάνισης παθολογικής μετάλλαξης στο γονίδιο *CDKN1C* σε περιπτώσεις ασθενών με BWS στον ελληνικό πληθυσμό να χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά χαμηλή, κάτι το οποίο βέβαια έρχεται σε συμφωνία με την γενικότερη συχνότητα εμφάνισης που αναφέρεται στην βιβλιογραφία και δ) η απουσία παθογόνων μεταλλάξεων δεν επιτρέπει συσχέτιση φαινοτύπου γονοτύπου.

E. Βιβλιογραφία

1. Cheryl Shuman and J Bruce Beckwith, Rosanna Weksberg Beckwith–Wiedemann syndrome *European Journal of Human Genetics* (2010) 18, 8–14; doi:10.1038/ejhg.2009.106; & 2010 Macmillan Publishers
2. Rosanna Weksberg,* Cheryl Shuman, and Adam C. Smith Beckwith – Wiedemann Syndrome *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)* 137C:12–23 (2005)
3. Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 1994; 46: 168-174. Munksgaard, 1994
4. Meredith Wilson, Gregory Peters, Bruce Bennetts, George McGillivray, Zan He Wu, Christopher Poon, and Elizabeth Algar The Clinical Phenotype of Mosaicism for Genome-Wide Paternal Uniparental Disomy: Two New Reports *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A:137–148 (2008)
5. H. Eugene Hoyme, Laurie H. Seaver, Kenneth Lyons Jones, Fortunato Procopio, Isolated Hemihyperplasia (Hemihypertrophy): Report of a Prospective Multicenter Study of the Incidence of Neoplasia and Review, William Crooks, Murray Feingold *American Journal of Medical Genetics* 79:274–278 (1998)
6. Lyle G. Best Familial Posterior Helical Ear Pits and Wiedemann-Beckwith Syndrome *American Journal of Medical Genetics* 4 0188-195 (1991)
7. Hui Guo, Tao Tian, Kejun Nan, Wenjuan Wang p57: A multifunctional protein in cancer (Review), *International Journal of Oncology*, 36:1321-1329 ,2010

8. Romanelli V, Belinchon A, Benito-Sanz S, Martinez-Glez V, Gracia-Bouthelier R, Heath KE, Campos-Barros A, Garcia-Minaur S, Fernandez L, Meneses H, Lopez-Siguero JP, Guillen-Navarro E, Gomez-Puertas P, Wesselink J-J, Mercado G, Esteban-Marfil V, Palomo R, Mena R, Sanchez A, del Campo M, Lapunzina P. CDKN1C (p57Kip2) analysis in Beckwith–Wiedemann syndrome (BWS) patients: Genotype–phenotype correlations, novel mutations, and polymorphisms. 2010, *Am J Med Genet Part A* 152A:1390–1397.

9. Tiong Y Tan, David J Amor Tumour surveillance in Beckwith–Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: A critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice *Journal of Paediatrics and Child Health* 42 (2006) 486–490

10. Thomas Eggermann, Gerhard Binder, Frederic Brioude, Eamonn R. Maher, Pablo Lapunzina, Maria Vittoria Cubellis, Ignacio Bergada, Dirk Prawitt, and Matthias Begemann, CDKN1C mutations: two sides of the same coin, *Trends in Molecular Medicine* November 2014, Vol. 20, No. 11 1471-4914/2014 101.

11. Amy T. Hark, Christopher J. Schoenherr, David J. Katz, Robert S. Ingram, John M. LeVorse & Shirley M. Tilghman, CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus, *Nature* 405, 486-489 (25 May 2000) doi:10.1038/35013106; Received 11 January 2000; Accepted 5 April 2000

12. Radha Raman Pandey, Tanmoy Mondal, Faizaan Mohammad, Stefan Enroth, Lisa Redrup, Jan Komorowski, Takashi Nagano, Debora Mancini-DiNardo, Chandrasekhar Kanduri, Kcnq1ot1 Antisense Noncoding RNA Mediates Lineage-Specific Transcriptional Silencing through Chromatin-Level Regulation *Volume 32, Issue 2, 24 October 2008, Pages 232–246* ,doi:10.1016/j.molcel.2008.08.022

13. N Diaz-Meyer, C D Day, K Khatod, E R Maher, W Cooper, W Reik, C Junien, G Graham, E Algar, V M Der Kaloustian, M J Higgins J Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith–Wiedemann syndrome *Med Genet* 2003;40:797–801

14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007335>

15. Anne Gabory, Marie-Anne Ripoche, Anne Le Digarcher, Françoise Watrin, Ahmed Ziyat, Thierry Forné, Hélène Jammes, Justin F. X. Ainscough, M. Azim Surani, Laurent Journot and Luisa, H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice *Development* 136, 3413-3421 (2009) doi:10.1242/dev.036061
16. Rolf Ohlsson¹, Anders Nyström¹, Susan Pfeifer-Ohlsson¹, Virpi Tökönen¹, Fredrik Hedborg¹, Paul Schofield², Folke Flam³ & Tomas J. Ekström¹ *Nature* IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith–Wiedemann syndrome *Genetics* 4, 94 - 97 (1993) doi:10.1038/ng0593-94
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=283120>
18. Angela Sparago, Flavia Cerrato, Maria Vernucci, Giovanni Battista Ferrero, Margherita Cirillo Silengo, Andrea Riccio, Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nature Genetics* 36, 958-960 (2004) Published online: 15 August 2004; | doi:10.1038/ng1410
19. Maxwell P. Lee,¹ Michael DeBaun, Gurvaneet Randhawa, Betty A. Reichard, Stephen J. Elledge, and Andrew P. Feinberg, Low Frequency of p57KIP2 Mutation in Beckwith-Wiedemann Syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 61:304-309, 1997
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3784>
21. Faizaan Mohammad, Tanmoy Mondal, Natalia Guseva, Gaurav Kumar Pandey and Chandrasekhar Kanduri *Kcnq1ot1* noncoding RNA mediates transcriptional gene

- silencing by interacting with Dnmt1 *Development* 137, 2493-2499 (2010)
doi:10.1242/dev.048181
22. Blik J1, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, Mannens MM, Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS, *Hum Mol Genet.* 2001 Mar 1;10(5):467-76
23. S. J. Tunster, B. Tycko, R. M. John, The Imprinted Phlda2 Gene Regulates Extraembryonic Energy Stores, *Mol Cell Biol.* 2010 Jan; 30(1): 295–306.doi:10.1128/MCB.00662-09 PMID: PMC2798284
24. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., GeneReviews® [Internet]. Beckwith-Wiedemann syndrome , editors, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015
25. Diem Dao, Dale Frank1, Naifeng Qian, Denise O'Keefe1, Robert J. Vosatka, Colum P. Walsh, Benjamin Tycko, IMPT1, an Imprinted Gene Similar to Polyspecific Transporter and Multi-Drug Resistance Genes *Hum. Mol. Genet.* (1998) 7 (4):597-608.doi: 10.1093/hmg/7.4.597.
26. Lam WW, Hatada I, Ohishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TR, Donnai D, Reik W, Schofield PN, Maher ER Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith Wiedemann syndrome(BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation *J Med Genet.* 1999 Jul;36(7):518-23.
27. Norihiro Sato,Hiroyuki Matsubayashi, Tadayoshi Abe, Noriyoshi Fukushima, and Michael Goggins,Clin Epigenetic Down-Regulation of CDKN1C/p57KIP2 in Pancreatic Ductal Neoplasms Identified by Gene Expression Profiling *Cancer Res* 2005;11(13)July 1, 2005

28. N Diaz-Meyer, Y Yang, S N Sait, E R Maher, M J Higgins, Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith–Wiedemann syndrome, *J Med Genet* 2005; 42:648–655. doi: 10.1136/jmg.2004.030593
29. Kate Gardiner, David Chitayat, Sanaa Choufani, Cheryl Shuman, Susan BlaserDeborah Terespolsky, Sandra Farrell, Rosemary Reiss, Shoshana Wodak, Shuye Pu, Peter N. Ray, Berivan Baskin, Rosanna Weksberg, Brain Abnormalities in Patients With Beckwith–Wiedemann Syndrome *Am J Med Genet Part A* 158A:1388–1394.
30. Jane Halliday, Kay Oke, Sue Breheny, Elizabeth Algar, David J. Amor, Beckwith-Wiedemann Syndrome and IVF: A Case Control Study, *Am. J. Hum. Genet.* 75:526–528, 2004
31. Christine Gicquel, Veronique Gaston, Jacqueline Mandelbaum, Jean-Pierre Siffroi, Antoine Flahault, Yves le Bouc, In Vitro Fertilization May Increase the Risk of Beckwith-Wiedemann Syndrome Related to the Abnormal Imprinting of the KCNQ1OT Gene *Am. J. Hum. Genet.* 72:1338–1341, 2003
32. Eamonn R. Maher Imprinting and assisted reproductive technology *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol. 14, Review Issue 1 R133–R138 doi:10.1093/hmg/ddi107
33. Shuhei Matsuoka, Jeffrey S. Thompson, Michael C. Edwards, Janet M. Barletta, Paul Grundy, Linda M. Kalkin, J. Wade Harper, Stephen J. Elledge, Andrew P. Feinberg Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2 on chromosome 11p15, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 3026-3030, April 1996 *Genetics*
34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1028>

35. Mong-Hong Lee, Inga Reynisdttir Joan Massague Cloning of p57K e2, a cyclin-dependent Kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution, , Genes & Development 9:639-649 9 1995 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/95d
36. Rosemary A. Fisher, Matthew D. Hodges, Helene C. Rees, Neil J. Sebire, Michael J. Seckl, Edward S. Newlands¹, David R. Genest³ and Diego H. Castrillon Human The maternally transcribed gene p57KIP2 (CDKN1C) is abnormally expressed in both androgenetic and biparental complete hydatidiform moles, Molecular Genetics, 2002, Vol. 11, No. 26 3267–3272
37. Valerie A. Arboleda, Hane Lee, Rahul Parnaik, Alice Fleming, Abhik Banerjee, Bruno Ferraz-de-Souza, Emmanuèle C. Délot, Imilce A. Rodriguez-Fernandez, Debora Braslavsky, Ignacio Bergadá, Esteban C. Dell'Angelica, Stanley F. Nelson, Julian A. Martinez-Agosto, John C. Achermann, and Eric Vilain, Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE Syndrome, Nat Genet. ; 44(7): 788–792. doi:10.1038/ng.2275
38. Syeling Lai, Helmuth Goepfert, Ann M. Gillenwater, Mario A. Luna, and Adel K. El-Naggar, Loss of Imprinting and Genetic Alterations of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p57KIP2 Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Vol. 6, 3172–3176, August 2000
39. F Brioude , I Oliver-Petit, A Blaise, F Praz, S Rossignol, M Le Jule, N Thibaud, A-M Faussat, M Tauber, Y Le Bouc, I Netchine, CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. J Med Genet 2013; 0:1–8. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101691
40. Véronique Gaston, Yves Le Bouc, Véronique Soupre, Lydie Burglen, Jean Donadieu, Hubert Oro, Georges Audry, Marie-Paule Vazquez and Christine Gicquel, Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome, European

41. Hidenobu Soejima, Tetsuji Nakagawachi, Wei Zhao, Ken Higashimoto, Takeshi Urano, Shiroh Matsukura, Yoshihiko Kitajima, Makoto Takeuchi, Masahiro Nakayama, Mitsuo Oshimura, Kohji Miyazaki, Keiichiro Joh and Tsunehiro Mukai, Silencing of imprinted CDKN1C gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer, *Oncogene* (2004) 23, 4380–4388 & 2004 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/04

42. Catia Giovannini, Laura Gramantieri, Manuela Minguzzi,, Francesca Fornari, Pasquale Chieco, Gian Luca Grazi, and Luigi Bolondi, CDKN1C/P57 Is Regulated by the Notch Target Gene Hes1 and Induces Senescence in Human Hepatocellular Carcinoma *The American Journal of Pathology*, Vol. 181, No. 2, August 2012 Copyright © 2012 American Society for Investigative Pathology, Published by Elsevier Inc.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.019>

43. Izuho Hatada¹, Johji Inazawa, Tatsuo Abe, Masahiro Nakayama, Yasuhiko Kaneko, Yoshihiro Jinno, Norio Niikawa, Hirofumi Ohashi, Yoshimitsu Fukushima, Kazuki Iida, Chikao Yutani, Shun-ichi Takahashi, Yoshihide Chiba, Sachiko Ohishi and Tsunehiro Mukai Genomic imprinting of human p57KIP2 and its reduced expression in Wilms' tumors *Human Molecular Genetics*, 1996, Vol. 5, No. 6 783–788

44. https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_064680.pdf.

45. http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wI2zCji-rCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g. MS-MLPA DNA protocol version MSTP-v001; last update 09-08-2013

46. http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhMUCJLqQzwZq_fiQWQTnAP-0V13AZUzpnKmyAPu7IsFt

47. <http://www.qiagen.com/gr/resources/resourcedetail?id=a541a49c-cd06-40ca-b1d2-563d0324ad6c&lang=en>
48. <http://www.qiagen.com/gr/resources/resourcedetail?id=70007df9-c707-42d1-8795-fe063af8912f&lang=en>
49. Vogiatzakis N, Kekou K, Sophocleous C, Kitsiou S, Mavrou A, Bakoula C, Kanavakis E. Screening human genes for small alterations performing an enzymatic cleavage mismatched analysis (ECMA) protocol. Mol Biotechnol. 2007 Nov 37(3):212-9
50. http://193.218.17.133/ex/downloads/brochures/life_science/ge_illustra_exostar.pdf
51. <http://sop.washington.edu/department-of-pharmaceutics/dna-sequencing-and-gene-analysis-center/principles-of-dna-sequencing/>
52. <http://databases.lovd.nl/shared/genes/CDKN1C>
53. Takashi Tokino, Tsutomu Urano , Tomohisa Furuhata, Mieko Matsushima Takashi Miyatsu Shin Sasaki, Yusuke Nakamura, Characterization of the human p57KIP2 gene: alternative splicing, insertion/deletion polymorphisms in VNTR sequences in the coding region, and mutational analysis, Hum Genet (1996) 97:625-631
54. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;g=ENSG00000129757;r=11:2883213-2885881;t=ENST00000414822;v=TMP_ESP_11_2906197_2906208;vdb=variation;vf=68779913

F. ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα εξωφύλλου: Edward Araujo , Christiane Simioni, Luciano Marcondes Machado Nardoza, Antonio Fernandes Moron, Prenatal diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome by two- and three-dimensional ultrasonography, Radiol Bras vol.46 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2013 On-line version ISSN 1678-7099, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842013000600012>
- Εικόνα 1: Annette Reuss, MD, Beckwith-Wiedemann syndrome, 11/08/2010 Beckwith-Wiedemann syndrome © Reuss www.TheFetus.net
- Εικόνα 2: ALBERT Y. F. KONG, ALEXANDER K. C. LEUNG,—Series Editor and WM. LANE M. ROBSON, Newborn With Macroglossia, Mass in Umbilical Area, and Hypoglycemia 28/11/12 <http://www.pediatricsconsultant360.com>
- Εικόνα 3: <http://www.rrnursingschool.biz/newborns-3/info-jnc.html>
- Εικόνα 4: Thomas Eggermann, Gerhard Binder, Frederic Brioude, Eamonn R. Maher, Pablo Lapunzina, Maria Vittoria Cubellis, Ignacio Bergada, Dirk Prawitt, and Matthias Begemann, CDKN1C mutations: two sides of the same coin, Trends in Molecular Medicine November 2014, Vol. 20, No. 11 1471-4914/2014 101.
- Εικόνα 5: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., GeneReviews® [Internet]. Beckwith-Wiedemann syndrome , editors, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015
- Εικόνα 7: http://bws-schweiz.ch/?page_id=528
- Εικόνα 8: <http://www.adamimages.com/>
- Εικόνα 9: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/HBB>
- Εικόνα 10: Hui Guo, Tao Tian, Kejun Nan, Wenjuan Wang p57: A multifunctional protein in cancer (Review), International Journal of Oncology, 36:1321-1329 ,2010
- Εικόνα 12: <https://www.al-tar.com/online-laboratory-store/qiagen-biorobot-m48-robotic-workstation>
- Εικόνα 13: <http://gcf.uta.edu/Nanodrop.html>
- Εικόνα 14: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhMUCJLqQzwZq_fiQWQTnAP-0V13AZUzpnKmyAPu7IsFt
- Εικόνα 17: <http://www.reactivosyequipos.com.mx/producto/19622-mini-camara-electroforetica-completa-horizontal-gel-de-7x8-cm>

- Εικόνα 18: https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing