



Γ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΩΝ

***“ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ NPC-1 ΚΑΙ NPC-2, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΤΗ ΝΟΣΟ NIEMANN-PICK ΤΥΠΟΥ C, ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ”***

Διδακτορική Διατριβή

Ιατρού Μπουντουβή Ευαγγελίας

Γ' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική,

Ιατρική Σχολή,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αθήνα, 2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1. Αργύριος Ντινόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδονευρολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών.
- 2. Ανδρέας Φρετζάγιας**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών.
- 3. Σοφία Κίτσιου-Τζέλη**, Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών.

Ημερομηνία υποβολής αίτησης: 14-1-2012

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς επιτροπής: 5-4-2012

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-6-2012

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής: 30-3-2018

Ημερομηνία υποστήριξης της διδακτορικής διατριβής: 14-9-2018

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης

Μέλη 7μελούς επιτροπής: Παπαευαγγέλου Βασιλική, Παπαδημητρίου Αναστάσιος, Τζιβγούλης Γεώργιος, Ντινόπουλος Αργύριος, Ατσιλάκος Αχιλλέας, Βάρτζελης Γεώργιος, Πονς-Ροντρίγκεθ Μαρία-Ροζέ

Βαθμός: “ΑΡΙΣΤΑ”

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

“ Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην πανάκεια και σ’ όλους τους Θεούς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας.

Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ’ αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ’ αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν’ αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν’ αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ’ όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε ν’ απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά”.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα δε,

Τον Αν. Καθηγητή Παιδονευρολογίας κ. **Αργύριο Ντινόπουλο**, ο οποίος με δέχθηκε στην ομάδα του και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Με κατεύθυνε, ως επιβλέπων και μέντορας, σε όλα τα στάδια της μελέτης και με βοήθησε στην εξαγωγή των τελικών συμπερασμάτων. Ταυτόχρονα, αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις και σε κλινικό επίπεδο, παρακολουθώντας τη συστηματική επιστημονική του προσέγγιση σε ένα εύρος περιστατικών ασθενών.

Την Μοριακή Βιολόγο και υπεύθυνη του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής, κ. **Άννα Παπαδοπούλου** για την πολύτιμη συμμετοχή της στον επιστημονικό σχεδιασμό, την υλικοτεχνική υποστήριξη, την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της εργασίας. Το σημαντικότερο δε όλων, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την αμέριστη συμπαράστασή της σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο. Η συμβολή της στη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής ήταν καθοριστική.

Τον Ομότιμο Καθηγητή Παιδιατρικής και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. **Αντρέα Φρετζάγια** καθώς και την Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής **Πολυξένη Νικολαΐδου-Καρπαθίου**, οι οποίοι αναγνωρίζοντας την θέλησή μου να ασχοληθώ με την έρευνα, με υποδέχθηκαν στην Γ' Παιδιατρική Κλινική και μου παρείχαν αβίαστα τη βοήθειά τους.

Την Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής και μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. **Σοφία Κίτσιου-Τζέλη**, η οποία με κατεύθυνε σε κρίσιμα σημεία της παρούσας εργασίας.

Την Διευθύντρια της MENN “Γαία”, κ. **Γεωργία Νύκταρη** –υπεύθυνη για την παιδιατρική παρακολούθηση του NPC ασθενούς 1- για την εμπιστοσύνη της και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Την Καθηγήτρια **Βασιλική Παπαευαγγέλου**, Διευθύντρια της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής, για την έμπρακτη της υποστήριξη και συμπαράσταση τόσο σε ερευνητικό, αλλά και σε κλινικό-εκπαιδευτικό επίπεδο, όντας ταυτόχρονα τα τελευταία έτη ειδικευόμενη της Γ' Παιδιατρικής κλινικής.

Την **Μαρία Μπουντουβή** για την ουσιώδη συνδρομή της στη συλλογή και διαχείριση των δειγμάτων από την ευρύτερη οικογένεια των NPC ασθενών, τον **Νικόλαο Μπουντουβή**, τη **Μαίρη Εμμανουήλ** και τη **Μαρία Τσιρούδα**.

Τέλος, τον **Σπύρο Κανελλάκη**, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, κυρίως όμως για τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο, και την υποστήριξή του σε όλα τα επίπεδα τα τελευταία χρόνια.

Σύντομο βιογραφικό σημείωμα

2009 Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών.
Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (7.90/10)

Εργασιακή-Ερευνητική απασχόληση

8/2015-παρόν Ειδίκευση στην Παιδιατρική, Γ' Παιδιατρική Κλινική, Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο "Αττικών"
Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα "*Hellenic Body Composition Study*" του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου

6/2011-6/2015 Συμμετοχή στις ερευνητικές δραστηριότητες του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

5/2013-7/2015 Ιατρός Διαγνωστικού Κέντρου

5/2012-5/2013 Ειδίκευση στη Νεογνολογία (Παιδιατρική) Γ.Ν.Αλεξάνδρα, Τμήμα Νεογνών-MENN
Συμμετοχή στην κλινική μελέτη: *Peyona Pass Study* (Publication: *Lista G, Fabbri L, et al: The Real-World Routine Use of Caffeine Citrate in Preterm Infants: A European Postauthorization Safety Study. Neonatology 2016, 109(3):221-227.*)

5/2012-5/2013

5/2012-9/2012 Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα στο Γ.Ν.Αλεξάνδρα, Τμήμα Νεογνών με θέμα: "*Διατροφή των εγκύων και επίπτωση στα Νεογνά*"

10/2011-11/2011 Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα "*Postmenopausal health study II*" του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου ως υπεύθυνη ιατρός των μετρήσεων

5/2011-5/2012 Ιατρός Πολυδύναμου Κέντρου

4/2010-5/2011 Ιατρός Υπόχρεος Υπηρεσίας Υπαίθρου Περιφερειακού Ιατρείου Ερατεινής, Φωκίδος

2/2010-3/2010 Μεταπτυχιακή Κλινική Άσκηση στο Νοσοκομείο "ΥΓΕΙΑ" (ΜΕΘ-Β' & Νευρολογική Κλινική)

1/2010-3/2010 Παρακολούθηση του Παιδονευρολογικού Ιατρείου της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής, ΓΠΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ", Υπεύθυνος: Αν.Καθηγητής Α. Ντινόπουλος

Μεταπτυχιακές σπουδές

2012-2018 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα:
"*Μελέτη των γονιδίων NPC-1 και NPC-2, τα οποία σχετίζονται με τη νόσο Niemann-Pick τύπου C, σε επιλεγμένες υπο-ομάδες του ελληνικού πληθυσμού.*"
Εισηγητής: Αν. Καθηγητής Α. Ντινόπουλος

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

1. Fotini-Helen Karachaliou, Helen Pergantou, Athina Dettoraki, **Evangelia Bountouvi**, Maria Kafetzi, Aspasia Fotinou, Vassiliki Papaevangelou, Helen Platokouki
“Effect of GH Treatment on Coagulation Parameters in Children with Growth Hormone Deficiency”
Endocrinology, Diabetes and Obesity, 2018; 1(1):4, doiQ 10.31532/EndocrinolDiabetesObes.1.1.004
2. Papadopoulou A, Gole E, Melachroinou K, Trangas T, **Bountouvi E**, Papadimitriou A.
“Clinical characterization of a novel calcium sensing receptor genetic alteration in a Greek patient with autosomal dominant hypocalcemia type 1.”
Hormones, 2017 Apr; 16(2):200-204. doi: 10.14310/horm.2002.1734.
3. **Evangelia Bountouvi**, Anna Papadopoulou, Marie T. Vanier, Georgia Nyktari, Spyridon Kanellakis, Helen Michelakakis and Argyrios Dinopoulos
“Novel NPC1 mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations”
BMC Medical Genetics, 2017, 18,51, doi 10.1186/s12881-017-0409-4
4. **Evangelia Bountouvi**, Konstantinos Douros and Anna Papadopoulou
“Can Getting Enough Vitamin D during Pregnancy Reduce the Risk of Getting Asthma in Childhood?”
Front. Pediatr., 26 April 2017, doi 10.3389/fped.2017.00087
5. Kanellakis S, Skoufas E, Khudokonenko V, Apostolidou E, Gerakiti L, Andrioti MC, **Bountouvi E**, Manios Y.
“Development and validation of two equations based on anthropometry, estimating body fat for the Greek adult population”
Obesity, 2017 Feb;25(2):408-416. doi: 10.1002/oby.21736. Epub 2017 Jan 10.
6. Papadopoulou A, **Bountouvi E**, Papaevaggelou V, Priftis KN.
“Maternal Vitamin D Status and Development of Asthma and Allergy in Early Childhood.”
Mini Rev Med Chem. 2015;15(11):900-12. Review.
7. Papadopoulou A, **Bountouvi E**, Gole E, Doulgeraki A, Tournis S, Papadimitriou A, Nicolaidou P.
“Identification of a novel nonsense mutation in the ligand-binding domain of the vitamin d receptor gene and clinical description of two Greek patients with Hereditary Vitamin D-Resistant Rickets and alopecia.”
Horm Res Paediatr. 2014;82(3):206-12

Συμμετοχή σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια με προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις

1. Μ.Σπανού, Μ.Τσιρούδα, Μ.Γιώργη, Μ.Κουτσάκη, **Ε.Μπουντουβή**, Σ.Ζουγανέλη, Κ.Αναγνωστοπούλου, Α.Ντινόπουλος
“Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία και Προοδευτική Μυοκλονική Επιληψία. Περιγραφή περίπτωσης παιδιατρικού ασθενούς”
12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επιληψίας, 18-20 Μαΐου 2018, Ιωάννινα
2. **Ε. Μπουντουβή**, Φ. Καραχάλιου, Κ. Κλεάνθους, Σ. Ασπρογέρακα, Κ. Δούρος, Α. Παπαδημητρίου, Β Παπαευαγγέλου

- “Χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση συσχετιζόμενη με νόσο Graves σε έφηβη ασθενή: περιγραφή περιστατικού.”
45^ο Πανελλήνιο Συνέδριο, Ενδοκρινολογίας, Μεταβολισμού και Σακχαρώδη διαβήτη, 9-12 Μαΐου 2018, Θεσσαλονίκη
3. **Μπουντουβή Ε.**, Γιώργη Μ., Τσιρούδα Μ., Σπανού Μ., Φρυγανάς Α., Γεωργάκη Ι., Παπαδοπούλου Α., Ντινόπουλος Α.
“*Ενδοραχιαία χορήγηση 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνης σε δύο ασθενείς με τη νόσο Niemann Pick type C.*”
17^ο Ετήσιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο, 8-9 Δεκεμβρίου 2017
 4. **Evangelia Bountouvi**, Konstantinos Theodoropoulos, Erato Atsali, Renata Moutsiou, Christina Tsalapaki, Pelagia Katsimbri, Sorina Boiu, Dimitrios T. Boumpas, Vana Papaevangelou
“*Whole-Body Magnetic Resonance Imaging (WBMRI) revealing an extensive muscle involvement in a child presenting with Gottrons papules and moderate muscle weakness—case report*” *Pediatric Rheumatology* 2017,15(Suppl 2):59, DOI 10.1186/s12969-017-0187-8
Proceedings of the 24th Paediatric Rheumatology European Society Congress: Part three: Athens, Greece. 14-17 September 2017.
 5. Papadopoulou Anna, Papadopoulos Iordanis, **Bountouvi Evangelia**, Gole Evangelia, Dinopoulos Argirios, Papaevangelou Vassiliki, Attilakos Achilleas
“*Clinical and genetic evaluation of 9 new osteoporosis-pseudoglioma (OPPG) cases associated with a LRP5 mutation. Response to treatment*”
Euromedlab Athens, 11-15 June 2017, Athens
 6. Feneli Karachaliou, Helen Pergadou, Anastasia Dettoraki, **Evangelia Bountouvi**, Maria Kafetzi, Aspasia Fotinou, Helen Platokouki & Vassiliki Papaevangelou
“*Effect of GH treatment on coagulation and fibrinolysis parameters in prepubertal children with growth hormone deficiency*” *Endocrine Abstracts* (2017) 49 EP885 | DOI:10.1530/endoabs.49.EP885
19th European Congress of Endocrinology Lisbon, Portugal 20-23 May 2017
 7. Φενέλη Καραχάλιου, **Ευαγγελία Μπουντουβή**, Μπετίνα Κάνδυλα, Κυριακή Καραβανάκη
“*Συσχέτιση στρατηγικών αντιμετώπισης αγχογόνων καταστάσεων με τη γλυκαιμική ρύθμιση εφήβων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1)*”
15^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, 15-18 Μαρτίου 2017, Αθήνα
 8. Φενέλη Καραχάλιου, Χ. Τσεντίδης, Κ. Αθανασάκης, **Ευαγγελία Μπουντουβή**, Ι. Κυριόπουλος, Κυριακή Καραβανάκη
«*Επίδραση του θεραπευτικού σχήματος στο άμεσο κόστος ιατρικής φροντίδας παιδιών και εφήβων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1)*”
15^ο Πανελλήνιο Διαβητολογικό Συνέδριο, 15-18 Μαρτίου 2017, Αθήνα
 9. Γαβρίλη Σ., Μπαγλατζή Λ., **Μπουντουβή Ε.**, Καμιζή Κ., Κατακουζηνός Δ., Παραμέρα Ε., Παπαθωμά Ε., Παπακωνσταντίνου Ε., Μπαρούτης Γ.
“*Διερεύνηση Μεταβολικών νοσημάτων βασισμένη σε διαμορφωμένο πρωτόκολλο σε μονάδα εντατικής νοσηλείας νεογνών*”
16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, 1-3 Νοεμβρίου 2014, Αθήνα
 10. A. Daraki, S. Gavrili, S. Zachaki, **E. Bountouvi**, D. Baroutis, E. Polycarpou, K.N. Manola, G. Baroutis
“*CYP2B6 genetic polymorphism and the risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates*”
XXIV European Congress of Perinatal Medicine, 4-7 July 2014, Florence, Italy
 11. Γιαννάκος Χ., **Μπουντουβή Ε.**, Στέφας Ν., Μπαγλατζή Λ., Παπαθωμά Ε., Γαβρίλη Σ.

“Επίδραση μουσικών προγραμμάτων στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Μέθοδος Sonatal. Ανασκόπηση.”

25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κοινωνικής Παιδιατρικής και προαγωγής της υγείας, 29 Αυγούστου-1 Σεπτεμβρίου 2013, Ιθάκη, Ελλάδα

12. S. Gavri, **E. Bountouvi**, S. Sevastiadou, E. Papathoma, M. Christaki, A.Katsafadou, G. Baroutis
“*Early diagnosis of Alagille syndrome in a neonate*”
XI World Congress of Perinatal Medicine, 19-22 June 2013, Moscow, Russia
13. **Evangelia Bountouvi**, Stauroula Gavri, Eugenia Papathoma, Alexandra Katsafadou, Efthimia Skevofilax, George Baroutis
“*Acute form of Citrullinemia type 1 in a newborn*”
5th Congress of the South East European Society of Perinatal Medicine and 4th Panhellenic Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 1-3 March 2013, Thessaloniki, Greece
14. Ε.Πρίφτη, Α.Παναγιώτου, **Ε.Μπουντουβή**, Α.Χαραλαμποπούλου, Ε.Κωστής, Θ.Κυριακόπουλος, Α.Παπαδημητρίου, Γ.Μπαρούτης, Κ.Τζανέτου
“*Συγγενής λοίμωξη από Listeria monocytogenes σε πρόωρα νεογνά: Περιγραφή δύο περιπτώσεων.*”
6^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα 27 Φεβρουαρίου - 1 Μαρτίου 2013
15. Σ.Κανελλάκης, Γ.Μοσχώνης, **Ε.Μπουντουβή**, Χ.Π.Λαμπρινού, Μ.Ανδριώτη, Χ.Φιλίππου, Ι.Μανιός
“*Συμπληρωματική χορήγηση φυλλοκινόνης ή μενακινόνης-7, μέσω εμπλουτισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων για 12 μήνες, μειώνει την απώλεια οστικής μάζας 2 χρόνια μετά την παρέμβαση. The Postmenopausal Study II*”
2^η Δημερίδα του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Καλλιθέα 1-2 Μαρτίου 2013
16. **Ε.Μπουντουβή**, Α. Παπαδοπούλου, Ε. Γκολέ, Α. Φρετζάγιας, Σ. Κίτσιου-Τζελέ, Α. Ντινόπουλος
“*Μελέτη των γονιδίων NPC1 και NPC2 σε ασθενείς στην Ελλάδα με υψηλή υποψία για τη νόσο Niemann Pick τύπου C*”
12^ο Πανελλήνιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο, Αθήνα 14-15 Δεκεμβρίου 2012
17. Σ. Γαβρίλη, Σ. Ζαχάκη, **Ε. Μπουντουβή**, Ε. Παπαθωμά, Γ. Μπαρούτης
“*Η επίδραση της διατροφής των μητέρων στα νεογνά τους, όσον αφορά στα στοιχεία ψευδαργύρου και μαγνησίου*”
24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Κοινωνικής Παιδιατρικής και Προαγωγής Υγείας, Καρπενήσι 14-16 Σεπτεμβρίου 2012

Βραβεία-Υποτροφίες

- Τρίμηνη κλινική μεταπτυχιακή υποτροφία στο Νοσοκομείο “ΥΓΕΙΑ”
- Υποτροφία Δήμου Ηλιουπόλεως ως πρωτεύουσα απόφοιτων Λυκείου του Δήμου

Διδακτική εμπειρία

ΔΕΠΥ, Μαθησιακές Δυσκολίες & τρόποι υποστήριξης των εκπαιδευτικών, Teacher Developmental Seminar

“There are but two roads that lead to an important goal and to the doing of great things: strength and perseverance. Strength is the lot of but a few privileged men; but austere perseverance, harsh and continuous, may be employed by the smallest of us and rarely fails of its purpose, for its silent power grows irresistibly greater with time.”

— *Johann Wolfgang von Goethe, Faust*

“Το σημαντικότερο είναι να κρατάμε το καλύτερο κομμάτι της ψυχής μας αλώβητο”

Στους γονείς μου,



Γ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΩΝ

***“ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ NPC-1 ΚΑΙ NPC-2, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ
ΤΗ ΝΟΣΟ NIEMANN-PICK ΤΥΠΟΥ C, ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ”***

Μπουντουβή Ευαγγελία

Γ' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική,

Ιατρική Σχολή,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	14
Abstract	16
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή.....	18
2. Η νόσος Niemann-Pick	22
2.1 Αθροιστικά Λυσοσωμικά Νοσήματα.....	22
2.2 Ιστορική αναδρομή.....	22
3. Η νόσος Niemann-Pick τύπου C	24
3.1 Επιδημιολογία	24
3.2 Αιτιολογία	25
3.3 Παθοφυσιολογία.....	25
3.3.1 Το κυτταρικό μονοπάτι μεταφοράς της χοληστερόλης και η νόσος NPC	25
3.3.2 Συσσώρευση λιπιδίων στους ιστούς.....	27
3.3.3 Αυτοφαγοκυττάρωση	30
3.3.4 Οξειδωτικό στρες	31
3.3.5 Τα παθογενετικά μονοπάτια στη νόσο NPC και οι προεκτάσεις τους	33
3.4 Κλινική Εικόνα.....	34
3.4.1 Κατηγοριοποίηση κλινικών φαινοτύπων	34
3.4.2 Συστηματικές εκδηλώσεις.....	36
3.4.3 Νευρολογικές εκδηλώσεις.....	38
3.4.4 Ψυχιατρικές εκδηλώσεις	40
3.4.5 Κλίμακα κλινικής αξιολόγησης ασθενών με NPC.....	40
3.5 Διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών	41
3.5.1 Κλινική προσέγγιση	42
3.5.2 Εργαστηριακή διερεύνηση	47
3.5.3 Διαγνωστικός Αλγόριθμος	54
3.6 Θεραπεία	55
3.6.1 Γενική Συμπτωματική Αγωγή	55
3.6.2 Ειδική θεραπεία.....	56
3.6.3 Αναπτυσσόμενες θεραπείες/κλινικές μελέτες	58
4. Τα γονίδια NPC1-2 και οι παραγόμενες πρωτεΐνες.....	61

4.1 Δομή και λειτουργία των γονιδίων <i>NPC1</i> και 2.....	61
4.2 Το μοντέλο συνεργικής δράσης των πρωτεϊνών <i>NPC1</i> και <i>NPC2</i>	63
4.3 Η ανεπάρκεια των NPC και οι κλινικές επιπτώσεις.....	65
4.3.1 Στους σπλαχνικούς ιστούς.....	65
4.3.2 Στον νευρικό ιστό-Νευροπαθοφυσιολογία.....	65
4.4 Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί.....	68
4.5 Γονιδιακός έλεγχος.....	69
Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5. Σκοπός και Κλινική σημασία	75
6. Υλικά και Μέθοδοι.....	77
6.1 Πληθυσμός της μελέτης	77
6.1.1 Ομάδα ασθενών που εμφανίζουν κλινική συμπτωματολογία υψηλής υποψίας για τη νόσο NPC (Suspicion Group -SGs)	77
6.1.2 Ομάδα NPC ασθενών (NPC) και συγγενών (Relatives Group-RG1 και 2)	79
6.1.3 Ομάδα ελέγχου	80
6.2 Συλλογή δειγμάτων	80
6.2.1 Ενημέρωση διαφόρων νεογνικών, παιδιατρικών και μονάδων ενηλίκων της χώρας.....	80
6.2.2 Σχεδιασμός δομημένων ερωτηματολογίων	80
6.2.3 Διαλογή δείγματος.....	81
6.2.4 Λήψη και μεταφορά των δειγμάτων.....	83
6.3 Γονοτύπηση.....	85
6.3.1 Απομόνωση DNA.....	85
6.3.2 Έλεγχος ποιότητας του DNA	87
6.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	88
6.3.4 Έλεγχος των προϊόντων της PCR.....	92
6.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	93
6.3.6 Άμεση αλληλούχιση της γενωμικής περιοχής (Sequencing) κατά Sanger.....	93
6.3.7 Μελέτη Απλοτύπων.....	98
6.3.8 Στατιστική Ανάλυση	99
7. Αποτελέσματα.....	100
7.1 Αριθμός τελικών δειγμάτων και είδος γενετικού ελέγχου	100
7.2 Κλινικά και δημογραφικά δεδομένα	102
7.2.1 Ομάδα ασθενών με κλινική/βιοχημική υποψία για τη νόσο NPC (SG).....	102

7.2.2 Ομάδα NPC ασθενών	107
7.3 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου	111
7.3.1 Ανιχνευθείσες <i>NPCI</i> μεταλλάξεις. NPC ασθενείς και γενεαλογία.....	111
7.3.2 Πολυμορφισμοί. Ομάδες SG, CG, NPCασθενής1/RG1.....	116
7.4 Συγκριτικός έλεγχος συχνότητας πολυμορφισμών και ανάλυση απλοτύπων.....	120
8. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	126
8.1 <i>NPCI</i> μεταλλάξεις.....	126
8.1.1 Είδος μεταλλάξεων και συσχετίσεις με βιοχημικό φαινότυπο.....	126
8.1.2 Μελέτη γενεαλογίας-απλοτύπων.....	129
8.1.3 Συσχετίσεις γονοτύπου-κλινικού φαινοτύπου.....	131
8.1.4 Παρακολούθηση-Θεραπευτική προσέγγιση NPC ασθενών.....	133
8.2 Ομάδα SG (SG-1,2 και 3)	138
8.2.1 Ανιχνευθέντες Πολυμορφισμοί.....	138
8.2.2 Περιορισμοί της μελέτης.....	140
9. Συμπεράσματα.....	143
Βιβλιογραφικές αναφορές.....	146
Παράρτημα	161

Περίληψη

Εισαγωγή: Η νόσος Niemann-Pick τύπου C (NPC) είναι μια λυσοσωμιακή αυτοσωμική υπολειπόμενη, νευροπλαγκτική και νευροεκφυλιστική διαταραχή με ποικίλες και προοδευτικές κλινικές εκδηλώσεις. Οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια, *NPC1* (~ 95% των οικογενειών) και *NPC2*. Σε αντίθεση με άλλους πληθυσμούς, τα δημοσιευμένα στοιχεία σχετικά με τη νόσο NPC στην Ελλάδα είναι σποραδικά.

Μέθοδοι: Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από τρεις ομάδες: α) 37 άτομα με υψηλή κλινική υποψία για τη νόσο (SGs) -που επιλέχθηκαν από 10 νοσοκομεία της Ελλάδας, με τη βοήθεια ερωτηματολογίων συμπληρωμένων από τους θεράποντες ιατρούς τους, σε μία περίοδο 4 ετών- β) δύο ασθενείς με βιοχημική διάγνωση NPC και άτομα από την ευρύτερη οικογένειά τους (NPC/RG1-2), γ) 90 υγιή άτομα ελληνικής καταγωγής (CG). Η γονοτύπηση στην ομάδα SGs και στους NPC ασθενείς διενεργήθηκε με άμεση αλληλούχηση του *NPC1* και -σε επιλεγμένες περιπτώσεις- του *NPC2*. Στοχευμένος γονιδιακός έλεγχος διεξήχθη στους συγγενείς των NPC ασθενών και στην ομάδα ελέγχου. Η προέλευση δύο νέων μεταλλάξεων μελετήθηκε με την ανάλυση επιλεγμένων εξονικών *NPC1* πολυμορφισμών, οι οποίοι παρουσίασαν την υψηλότερη συχνότητα στις ομάδες SGs και CG, μέσω του λογισμικού Harlore.

Αποτελέσματα: Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 26 γενετικές αλλαγές, 24 στο *NPC1* και 2 στο *NPC2*. Μεταξύ αυτών, τρεις ήταν παθογόνες μεταλλάξεις στο *NPC1* [*IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*), p.K1057R (*c.3170A>G*) και p.A1132P (*c.3394G>C*)], δύο σπάνιες γενετικές αλλαγές αμφίβολης κλινικής σημασίας (*c.709C>T*, rs80358251 στο *NPC1* και *c.441+1G>A*, rs140130028 στο *NPC2*) και δύο νέες μη παθογόνες *NPC1* αλλαγές (*IVS 7-16C>T* και *IVS20+22G> C*) σε εσονικές περιοχές. Οι δύο καινούριες *NPC1* μεταλλάξεις [*c.3591+3insT*, p.K1057K (*c.3170A>G*)] συνδέθηκαν με έναν μοναδικό απλότυπο. Η συχνότητα του πολυμορφισμού p.M642I (rs1788799) στην ομάδα ατόμων με υψηλή κλινική υποψία για τη νόσο (SGs) ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με την ομάδα

ελέγχου. Παράλληλα, μελετήθηκαν τα κλινικά, βιοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά των NPC ασθενών καθώς και οι μεταξύ τους συσχετίσεις. Ο ένας ασθενής εισήχθη σε πρόιμη θεραπεία μείωσης υποστρώματος και δεν παρουσίαζε εμφανή νευρολογική συμπτωματολογία 11,5 χρόνια μετά.

Συμπεράσματα: Οι γενετικές αλλαγές στα γονίδια *NPC1* και *NPC2* μελετήθηκαν για πρώτη φορά σε άτομα Ελληνικής καταγωγής. Η συχνότητα και το είδος των συχνότερων εξονικών πολυμορφισμών βρίσκεται κατά βάση σε συμφωνία με αυτή άλλων ευρωπαϊκών πληθυσμών. Ο NPC ασθενής 1 ταυτοποιήθηκε ως σύνθετος ετεροζυγώτης για δύο νέες μεταλλάξεις [*c.3591+3insT*, p.K1057K (*c.3170A>G*)]. Η μετάλλαξη ματίσματος, *IVS23+3insT*, σε ομοζυγωτία συνδέθηκε με σοβαρό βιοχημικό και κλινικό φαινότυπο και η μετάλλαξη missense p.K1057R (*c.3170A>G*) με το τυπικό βιοχημικό πρότυπο. Η ανάλυση του απλότυπου των δύο νέων μεταλλάξεων *IVS23+3insT* και p.K1057R κατέδειξε ένα μοναδικό απλότυπο για την κάθε μία. Η διαχρονική παρακολούθηση του NPC ασθενούς 1, ετεροζυγώτη για τις ανωτέρω μεταλλάξεις, μπορεί να συμβάλει στην αποσαφήνιση της πιθανής επίδρασης της εισαγωγής της θεραπείας υποστρώματος, πριν την εμφάνιση νευρολογικής συμπτωματολογίας. Παράλληλα, Ο NPC ασθενής 2 ταυτοποιήθηκε ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο p.A1132P, που συσχετίστηκε σε ομοζυγωτία με σοβαρό βιοχημικό φαινότυπο και την όψιμη βρεφική μορφή της νόσου. Ο ασθενής αυτός τέθηκε καθυστερημένα σε αγωγή με μιγλουστάτη και παρουσιάζει σαφή νευρολογική επιδείνωση. Στο πλαίσιο αυτό, και ως επέκταση της παρούσας μελέτης, λαμβάνει την φαρμακευτική ουσία 2-υδροξυ-προπυλ-κυκλδεξτρίνης μαζί με έναν ακόμη NPC ασθενή με θετικά αποτελέσματα.

Abstract

Background: Niemann-Pick type C disease (NPC) is an autosomal recessive, neurovisceral, lysosomal storage disorder with protean and progressive clinical manifestations, resulting from mutations in either of the two genes, *NPC1* (~95% of families) and *NPC2*. Contrary to other populations, published evidence regarding NPC disease in Greece is sparse.

Methods: The study population consisted of three groups: a) 37 Greek individuals with high clinical suspicion for the disease recruited in a 4-year period, via questionnaires completed by attendant physicians from 10 hospitals over Greece (SGs); b) two Greek biochemically diagnosed NPC patients –identified during recruitment- and their extended pedigrees (NPC/RG1-2); c) 90 healthy Greek individuals (CG). Genotyping was performed in the SGs and NPC patients by direct sequencing of the *NPC1* and –in selected cases- the *NPC2*. Targeted gene variations were studied in the NPC patients' relatives and the control group. The origin of two novel mutations was investigated through selected exonic *NPC1* polymorphisms, encountered more frequently in the SGs and in the CG, by the use of Haplore software.

Results: Overall, 26 genetic variations were identified, 24 in *NPC1* and 2 in *NPC2*. Among them, three *NPC1* pathogenic mutations [*IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*), p.K1057R (*c.3170A>G*) and p.A1132P (*c.3394G>C*)], two novel *NPC1* intronic non-pathogenic alterations (*IVS7-16C>T* and *IVS20+22G>C*) and two rare genetic alterations of equivocal clinical significance (*c.709C>T*; rs80358251 in *NPC1* and *c.441+1G>A*; rs140130028 in *NPC2*) were detected. The two novel mutations [*IVS23 + 3insT* (*c.3591 + 3insT*), p.K1057R (*c.3170A > G*)] were each associated with a specific haplotype. The distribution of p.M642I (rs1788799) in the Suspicion Group varied significantly compared to the control group. NPC patients' clinical, biochemical, molecular profiles and the possible correlations are presented. One NPC patient was entered to early treatment with miglustat and has presented no overt neurological impairment after 11.5 years.

Conclusions: Sequence variations of *NPC* genes were genotyped for first time in Greek individuals. The frequency and the type of the exonic polymorphisms observed in this subgroup of Greek population are mainly in accordance with other European populations. NPC patient 1 was compound heterozygous for two novel mutations [*IVS23 + 3insT (c.359 +3insT)*, p.K1057R (*c.3170A>G*)]. The splicing mutation *IVS23+3insT* was associated in homozygosity with a severe biochemical and clinical phenotype and the missense mutation p.K1057R (*c.3170A>G*) with the severe biochemical pattern. A possible founder effect for *IVS23+3insT* mutation was demonstrated in the Greek Island, as well as a different origin for each novel mutation. Longitudinal follow-up may contribute to clarify the possible effect of early miglustat therapy on the patient compound heterozygous for the two novel mutations. Furthermore, the mutant allele p.A1132P was associated in homozygosity with a severe biochemical phenotype and the infantile form of the disease. The patient, homozygous for this mutation, has been under miglustat therapy and exhibited progressive neurological deterioration. In this context, and as an extension of the present study, she also receives 2-hydroxy-propyl-cyclodextrin as well as another NPC patient with positive results.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η νόσος Niemann-Pick αποτελεί μία σπάνια νευροεκφυλιστική διαταραχή, που εντάσσεται στην ομάδα των αθροιστικών λυσοσωμιακών νοσημάτων. Περιλαμβάνει δύο σαφώς διακριτές ομάδες: την πρώτη -τύπος A και B-, όπου η αρχική διαταραχή έγκειται στην ανεπάρκεια του ενζύμου σφιγγομυελινάση και τη δεύτερη -τύπος C-, όπου η διαταραγμένη ενδοκυττάρια μεταφορά των λιπιδίων αποτελεί την κεντρική βιοχημική ανωμαλία (Longo, 2012).

Η νόσος Niemann-Pick τύπου C (NPC) (OMIM257220), που συνιστά αντικείμενο της παρούσας μελέτης, αποτελεί μία σπάνια -αλλά σοβαρή- λυσοσωμιακή και νευροεκφυλιστική διαταραχή. Σε κυτταρικό επίπεδο, χαρακτηρίζεται από ελαττωματική μεταφορά των λιπιδίων με επακόλουθο την ενδοκυττάρια συσσώρευση αυτών στο ώριμο σύμπλεγμα ενδοσώματος/λυσοσώματος, που εντοπίζεται σε κύτταρα νευρικών και σπλαχνικών ιστών (Vanier, 2010, Vanier, 2015). Ο κλινικός της φαινότυπος εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια, με συνδυασμό ειδικών και μη-ειδικών σπλαχνικών, νευρολογικών και ψυχιατρικών εκδηλώσεων και δύναται να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία από την ενδομήτρια έως και την ενήλικη ζωή (Mengel et al., 2013). Με εξαίρεση μία μικρή κατηγορία ασθενών, που πάσχουν από τη σοβαρή συστηματική, περιγεννητική μορφή της νόσου, τόσο η κλινική πορεία όσο και η πρόγνωση συσχετίζονται με την ηλικία έναρξης της νευρολογικής συμπτωματολογίας και είναι σοβαρότερες όσο νωρίτερα εμφανίζονται οι νευρολογικές εκδηλώσεις (Patterson et al., 2012). Βασικό κλινικό γνώρισμα της νόσου αποτελεί η προοδευτική νευρολογική επιδείνωση. Στα τελικά στάδια οι ασθενείς είναι κληήρεις και εμφανίζουν πλήρη νοητική έκπτωση (Yanjanin et al., 2010). Στην κλασική της μορφή η νευρολογική συμπτωματολογία εμφανίζεται στην πρώιμη παιδική ηλικία και οι περισσότεροι ασθενείς, εάν δεν τεθούν έγκαιρα σε θεραπευτική αγωγή, καταλήγουν μέσα στις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής

(Patterson and Pentchev, 1994). Από τον Ιανουάριο του 2009, εγκρίθηκε μία νέα φαρμακευτική ουσία, η μιγλουστάτη (Zavesca) για την αντιμετώπιση των νευρολογικών εκδηλώσεων της νόσου σε ενήλικες και παιδιά με NPC. Η θεραπεία αυτή, σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, όταν χορηγείται νωρίς με την έναρξη της νευρολογικής συμπτωματολογίας, μπορεί να σταθεροποιήσει ή και να επιβραδύνει την εξέλιξη της νευρολογικής νόσου (Patterson et al., 2015). Στην παρούσα φάση μελετώνται και νέες θεραπευτικές επιλογές με θετικά αποτελέσματα, όπως η κυκλοδεξτρίνη (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) (Vite et al., 2015) και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins)(Ingemann and Kirkegaard, 2014).

Πρόκειται για γενετική νόσο, που μεταβιβάζεται με αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και παρουσιάζει εκτιμώμενο επιπολασμό 1:90.000-104.000 ζώντων γεννήσεων (Vanier, 2010, Jahnova et al., 2014, Wassif et al., 2015). Έχει συσχετιστεί λοιπόν με μεταλλάξεις σε 2 ξεχωριστά γονίδια: στο *NPC-1* στην πλειονότητα των περιπτώσεων (95%) και στο *NPC-2* (Patterson and Pentchev, 1996). Το γονίδιο *NPC-1* κωδικοποιεί μια μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, ενώ το *NPC-2* μία μικρή διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα. Ο κλινικός φαινότυπος είναι πανομοιότυπος με μόνη διαφοροποίηση τη συχνότερη και σοβαρότερη πνευμονική προσβολή σε κάποιους ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPC-2*. Αν και η ακριβής λειτουργία των πρωτεϊνών NPC1 και NPC2 δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, θεωρείται ότι σε κυτταρικό επίπεδο δρουν συνεργικά στο μονοπάτι ρύθμισης της διακίνησης και ομοιόστασης της χοληστερόλης και των σφιγγολιπιδίων (Vance, 2010).

Το γονίδιο *NPC-1* παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία με περισσότερες από 400 μεταλλάξεις να έχουν ήδη περιγραφεί (www.hgmd.cf.ac.uk) (McKay Bounford and Gissen, 2014, Jahnova et al., 2014). Πολλοί ασθενείς είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες με ένα σημαντικό ποσοστό εξ αυτών να φέρουν νέες μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, κάποιες μεταλλάξεις παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα παγκοσμίως ή μεταξύ συγκεκριμένων πληθυσμών: η p.I1061T είναι η πιο συχνή στο

Δυτικό κόσμο, η p.P1007A (δεύτερη πιο συχνή) στη Γερμανία, η p.R1186H στην Τσεχία και η p.G992W σε άτομα με καταγωγή από τη Νέα Σκωτία του Καναδά (Ribeiro et al., 2001, Jahnova et al., 2014, Millat et al., 2005, Park et al., 2003, Millat et al., 1999, Sun et al., 2001, Fancello et al., 2009, Greer et al., 1998, Macias-Vidal et al., 2011). Παράλληλα, πληθώρα γενετικών πολυμορφισμών έχουν εντοπιστεί κατά μήκος ολόκληρου του γονιδίου, με ορισμένους από αυτούς να εμφανίζονται με υψηλή συχνότητα. Μεταξύ αυτών οι γενετικές αλλαγές c.387T>C (rs12970899), c.2793C>T (rs1140458), c.644A>G (rs1805081), c.1926G>C (rs1788799), c.2572A>G (rs1805082) και c.3797G>A (rs1805084) βρίσκονται σε εξόνια του *NPC-1* και αποτελούν συχνούς πολυμορφισμούς σε διάφορους πληθυσμούς παγκοσμίως (Ribeiro et al., 2001, Park et al., 2003, Bauer et al., 2002, Yamamoto et al., 1999). Επιπλέον, ορισμένοι εξ αυτών των πολυμορφισμών έχουν συσχετιστεί με νοσολογικές οντότητες όπως την παχυσαρκία (Meyre et al., 2009, Borbon et al., 2012a), τη νόσο Alzheimer (Erickson et al., 2008, Kresojevic et al., 2014) και την αθηρωμάτωση (Zhang et al., 2008, Yu et al., 2014, Ou et al., 2008). Γενικά, υποστηρίζεται ότι η επίδραση των γενωμικών αλλαγών του γονιδίου *NPC-1* στην λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού είναι σημαντική και αποτελεί ένα υποσχόμενο πεδίο έρευνας (Wassif et al., 2015).

Στην Ελλάδα κατά την έναρξη της μελέτης αυτής είχε περιγραφεί ένας μόνο ασθενής, σύνθετος ετεροζυγώτης για τις *NPC-1* μεταλλάξεις: p.F284Lfs*26 (c.852delT) και μία χρωμοσωμική απαλοιφή μεγέθους 432kb στο χρωμόσωμα 18q -η οποία περιλαμβάνει τα 10 πρώτα εξόνια του *NPC-1*- (Rodriguez-Pascau et al., 2012). Όσον αφορά στους γενετικούς πολυμορφισμούς των γονιδίων *NPC-1* και *NPC-2* δεν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα για τον ελληνικό πληθυσμό.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των γενετικών αλλαγών των γονιδίων *NPC1* και *NPC2* σε συγκεκριμένες υποομάδες του ελληνικού πληθυσμού. Μελετάμε τα συγκεκριμένα γονίδια σε ασθενείς με κλινική εικόνα υψηλής υποψίας για τη νόσο Niemann-Pick τύπου C, καθώς και επιλεγμένες γενετικές αλλαγές σε μία ομάδα υγιών ατόμων ελληνικής καταγωγής. Παράλληλα,

επεκτείναμε τη μελέτη στις ευρύτερες οικογένειες των NPC ασθενών, που ανιχνεύτηκαν και διερευνήσαμε τον κλινικό φαινότυπο και την ανταπόκριση των NPC ασθενών στη θεραπευτική παρέμβαση.

2. Η νόσος Niemann-Pick

2.1 Αθροιστικά Λυσοσωμιακά Νοσήματα

Η νόσος Niemann-Pick εντάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία, των Αθροιστικών Λυσοσωμιακών Νοσημάτων. Οι διαταραχές αυτές αποτελούν μια ετερογενή ομάδα απαρτιζόμενη από τουλάχιστον 41 βιοχημικά σχετιζόμενες, αλλά γενετικά διακριτές οντότητες. Ο αριθμός βαίνει αυξανόμενος, καθώς η πρόοδος στον χώρο της μοριακής βιοχημείας και γενετικής οδηγεί στον προσδιορισμό νέων διακριτών νοσημάτων (Meikle et al., 1999). Με ελάχιστες εξαιρέσεις, συνιστούν αυτοσωμικές υπολειπόμενες κληρονομικές διαταραχές, που παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλομορφία λόγω του ευρέως φάσματος των κλινικών εκδηλώσεων και της διακύμανσης της σοβαρότητας της εκάστοτε νόσου. Σε αρκετές περιπτώσεις το κλινικό φάσμα και η πρόγνωση συσχετίζονται με τον χρόνο έναρξης των συμπτωμάτων. Τα λυσοσώματα αποτελούν ετερογενή οργανίδια, που προέρχονται από την προσθήκη υδρολυτικών ενζύμων στα πρώιμα ενδοσώματα από το σύμπλεγμα Golgi. Γονιδιακές μεταλλάξεις και ανακατατάξεις σε κρίσιμες περιοχές του γονιδιώματος, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στα μονοπάτια της λυσοσωμιακής βιοσύνθεσης, προκαλούν ενζυμικές ανεπάρκειες. Η δυσλειτουργία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των αθροιστικών λυσοσωμιακών νοσημάτων, με κοινό χαρακτηριστικών την εναπόθεση υποστρωμάτων και προϊόντων του μεταβολισμού σε σπλαγχνικούς και νευρικούς ιστούς (Kasper and Harrison, 2005).

2.2 Ιστορική αναδρομή

Το επωνύμιο Niemann-Pick δόθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1920, βασισμένο στην πρωτοποριακή εργασία των επιστημόνων Albert Niemann και Ludwig Pick. Ο όρος αυτός καθιερώθηκε για τον χαρακτηρισμό μιας ετερογενούς ομάδας αυτοσωμικών υπολειπόμενων κληρονομικών διαταραχών εναπόθεσης λιπιδίων στα λυσοσώματα, με κοινά κλινικά χαρακτηριστικά την ηπατοσπληνομεγαλία, τη συσσώρευση σφιγγομυελίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τους

παρεγχυματικούς ιστούς, με ή χωρίς συνοδό νευρολογική συμμετοχή. Το 1958 οι Crocker και Farber έδειξαν την ύπαρξη ευρείας διακύμανσης στην ηλικία έναρξης και στην κλινική εικόνα της νόσου, καθώς και στο βαθμό εναπόθεσης σφιγγομυελίνης στους ιστούς. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ταξινόμηση της νόσου σε 4 υποκατηγορίες A-D. Ο τύπος A χαρακτηριζόταν από σοβαρή και πρόωμη νευρολογική επιδείνωση με μεγάλη συσσώρευση σφιγγομυελίνης στα σπλάχνα και τον εγκέφαλο, ενώ στον τύπο B παρατηρούταν ηπιότερη κλινική πορεία χωρίς νευρολογική συμμετοχή. Αναφορικά με τον τύπο C συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με υποξεία έναρξη νευρολογικών εκδηλώσεων και ηπιότερη συσσώρευση λιπιδίων στα σπλάχνα. Στον τύπο D κατατάχθηκαν ασθενείς με παρόμοια κλινική συμπτωματολογία με τον τύπο C και κοινή καταγωγή από τη Νέα Σκωτία του Καναδά. Ακολούθως, το 1966 ο Brady και οι συνεργάτες τους απέδειξαν την ύπαρξη σοβαρής ανεπάρκειας της σφιγγομυελινάσης στους τύπους A και B, αλλά όχι στους τύπους C και D της νόσου, υποδεικνύοντας ότι οι δύο τελευταίοι τύποι αποτελούν ξεχωριστές οντότητες (Vanier, 2010).

Μεταγενέστερες έρευνες οδήγησαν στην καθορισμό του τύπου C ως μία διαταραχή στην ενδοκυττάρια μεταφορά των λιπιδίων και ιδιαιτέρως της χοληστερόλης (Zervas et al., 2001b). Τη δεκαετία του 1990 ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια *NPC-1* και *NPC-2*. Έτσι, μεταλλάξεις σε αυτά συσχετίστηκαν με την εμφάνιση του κλινικού φαινοτύπου των ασθενών με νόσο Niemann-Pick τύπου C και D, αλλά και του τύπου E. Ο τύπος E είχε χρησιμοποιηθεί ιστορικά λανθασμένα από ορισμένους ερευνητές για να συμπεριλάβει ιδιαίτερα σπάνιες περιπτώσεις μεμονωμένης σπληνομεγαλίας σε ενήλικες χωρίς νευροπαθητική συμμετοχή. Σήμερα πλέον, η νόσος Niemann-Pick διακρίνεται σε δύο ομάδες. Συγκεκριμένα, τις διαταραχές που οφείλονται σε προέχουσα ανεπάρκεια του ενζύμου σφιγγομυελινάση -τύποι A, B και ενδιάμεσες μορφές- (μετάλλαξη στο *SMPD1*) και τη νόσο Niemann-Pick τύπου C (μεταλλάξεις στα *NPC-1* και *NPC-2*).

3. Η νόσος Niemann-Pick τύπου C

Η νόσος Niemann-Pick τύπου C (NPC) είναι μία μη τυπική αθροιστική λυσοσωμιακή διαταραχή, στην οποία δεν παρατηρείται ανεπάρκεια κάποιας λυσοσωμιακής υδρολάσης, αλλά συσσώρευση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων στο ώριμο σύμπλοκο ενδοσώματος/λυσόσωματος όλων των κυττάρων και των ιστών. Υπεύθυνες γενετικές αλλαγές είναι μεταλλάξεις σε ένα από δύο τα γονίδια *NPC-1* και *NPC-2*.

3.1 Επιδημιολογία

Πρόκειται για μία σπάνια γενετική νόσο, μεταδιδόμενη με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Η επίπτωση της υπολογίζεται, με βάση τους διαγνωσμένους ασθενείς, στις 1:90.000-104.000 ζώντων γεννήσεων (Vanier, 2010, Jahnova et al., 2014, Wassif et al., 2015), ενώ δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για τον ελληνικό πληθυσμό. Ωστόσο, ο υπολογισμός αυτός θεωρείται ότι υποεκτιμά το πρόβλημα, με αρκετούς ασθενείς να διαλάθουν της διάγνωσης. Η υποεκτίμηση της πραγματικής επίπτωσης οφείλεται στη διαγνωστική δυσκολία, λόγω της ευρύτητας των κλινικών εκδηλώσεων, της μειωμένης ευαισθητοποίησης για τη νόσο στην γενική κλινική πρακτική και της πολυπλοκότητας της εργαστηριακής διάγνωσης (Vanier, 2010). Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα πρόσφατης μαζικής ανάλυσης αλληλούχισης εξονίων από παράλληλες βάσεις δεδομένων, όπου η επίπτωση της νόσου κατά τη σύλληψη εκτιμήθηκε σε 1,12:100.000, ενώ υποστηρίζεται και η ύπαρξη ενός ήπιου φαινοτύπου της νόσου NPC με καθυστερημένη εμφάνιση και πιθανή επίπτωση της τάξεως του 1:19.000-36.000 (Wassif et al., 2015). Τέλος, μελέτες σε γεωγραφικά απομονωμένους πληθυσμούς της Νέας Σκωτίας του Καναδά και σε άτομα ισπανικής καταγωγής στο Νέο Μεξικό και το Κολοράντο έχουν αναδείξει αυξημένη συχνότητα φορείας παθογόνων μεταλλάξεων (Greer et al., 1999b).

3.2 Αιτιολογία

Η νόσος NPC οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο γονίδια: το *NPC1* στην πλειονότητα των περιπτώσεων (95%) και το *NPC2* (Patterson and Pentchev, 1996). Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε παρόμοια βλάβη σε κυτταρικό επίπεδο και πανομοιότυπο κλινικό φαινότυπο. Η πρωταρχική διαταραχή έγκειται στην ελαττωματική έξοδο της χοληστερόλης από το ώριμο ενδόσωμα/λυσόσωμα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων –ιδίως σφιγγολιπιδίων- στα διάφορα όργανα. Τα γονίδια αυτά καθώς και ο μηχανισμός της δράσης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν αναπτύσσονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.

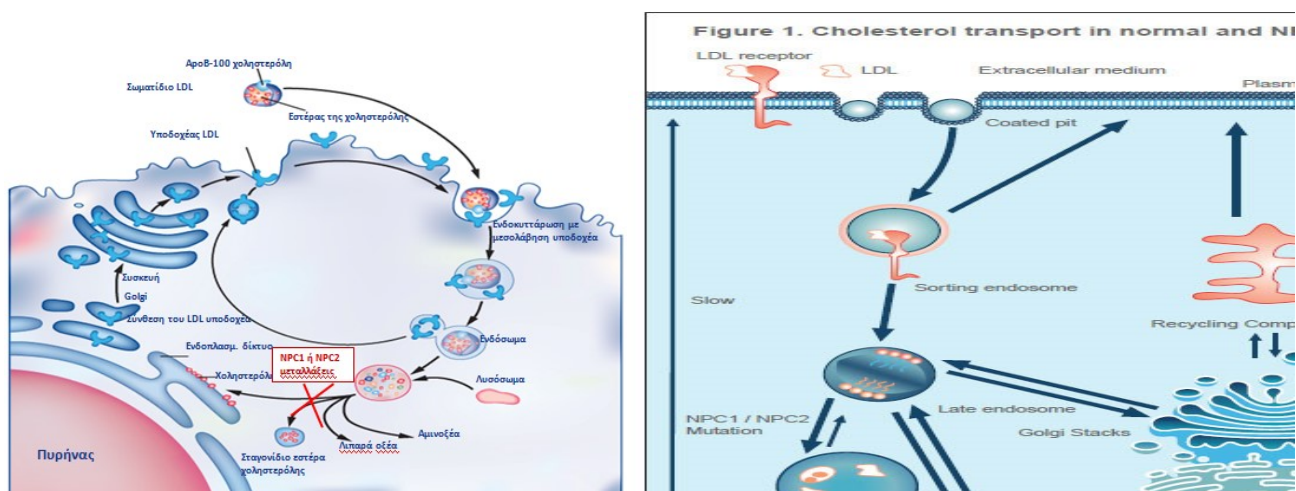
3.3 Παθοφυσιολογία

3.3.1 Το κυτταρικό μονοπάτι μεταφοράς της χοληστερόλης και η νόσος NPC

Η χοληστερόλη αποτελεί βασικό λιπίδιο του ανθρώπινου οργανισμού, όντας το ουσιαστικότερο δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και πρόδρομη ουσία των στεροειδών ορμονών και των χολικών οξέων. Τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν την ικανότητα να συνθέτουν χοληστερόλη ενδογενώς στο ενδοπλασματικό τους δίκτυο, αλλά και να την προσλαμβάνουν εξωγενώς από την χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL), με ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από ειδικούς υποδοχείς. Μετά τη διαδικασία ενδοκυττάρωσης, οι LDLs υφίστανται υδρόλυση στο ώριμο σύμπλεγμα ενδόσωμα/λυσόσωμα (ΩΕ/Λ) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της χοληστερόλης, η οποία ταχύτατα μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δίκτυο για να χρησιμοποιηθεί (Εικόνα 1α, β) (Maxfield and Wustner, 2002, Vance and Karten, 2014).

Στη νόσο NPC, όπως για πρώτη φορά αποδείχθηκε από τον Pentchev και συν. και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε από διάφορους ερευνητές, το πρόβλημα έγκειται στο μονοπάτι της μεταφοράς της εξωγενώς χορηγούμενης χοληστερόλης, με τη μορφή LDL (Pentchev et al., 1985). Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στα γονίδια *NPC-1* και *NPC-2* οδηγούν σε παρεμπόδιση της εξόδου της

ελεύθερης-μη εστεροποιημένης χοληστερόλης από το ΩΕ/Λ. Έτσι, μη εστεροποιημένη χοληστερόλη παγιδεύεται εντός του ΩΕ/Λ με αποτέλεσμα τη μείωση της χοληστερόλης που τελικά προσφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Εικόνα 1β) (Peake and Vance, 2010, Kristiana et al., 2008). Άμεσο επακόλουθο των ανωτέρω είναι η συσσώρευση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και διαφόρων άλλων λιπιδίων εντός των κυττάρων όλων των ιστών, γεγονός ιδιαίτερα επιβλαβές για τα νευρικά κύτταρα. Ακολούθως, διαταράσσονται οι επαγόμενοι από την LDL κυτταρικοί μηχανισμοί και ιδιαιτέρως η διαδικασία της εστεροποίησης. Πράγματι, η εστεροποίηση της χοληστερόλης είναι σημαντικά επηρεασμένη στα κύτταρα ασθενών με τη νόσο NPC. Αντίθετα, η μετακίνηση της ενδογενώς συντεθειμένης χοληστερόλης από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην κυτταρική μεμβράνη παραμένει ανέπαφη (Cruz et al., 2000). Επιπλέον, το κύτταρο φαίνεται να διατηρεί την ικανότητα απάντησης, όπως έχει παρατηρηθεί από πειράματα με τη χρήση λιπιδικών μορίων ικανών να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (Cruz and Chang, 2000).



Εικόνα 1. 1α) Το μονοπάτι κυκλοφορίας της χοληστερόλης 1β) Μεταφορά της χοληστερόλης σε φυσιολογικά και σε NPC κύτταρα

Συμπερασματικά λοιπόν, η διαταραχή στη μετακίνηση της ενδοκυττάριας χοληστερόλης συνιστά το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νόσου και κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της. Θεωρείται από τους περισσότερους ερευνητές πλέον, ως το κομβικό σημείο που επιφέρει

“αναδόμηση” στο λιπιδικό προφίλ των κυττάρων. Επηρεάζει δε σημαντικά πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου στα λυσοσώματα (πιθανόν μέσω της επαγωγής της συσσώρευσης των γλυκοσυλκεραμιδίων), το οξειδωτικό στρες, τα μονοπάτια μεταφοράς κυστιδίων με διαμεσολαβητές τις πρωτεΐνες Rab και τις διαδικασίες σχάσης/σύντηξης των συμπλεγμάτων ΩΕ/Λ (Vance and Karten, 2014). Επομένως, αν και η ελαττωματική μεταφορά της χοληστερόλης αποτελεί βασικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό, στο παθογενετικό καταρράκτη προστίθενται οι επαγόμενες διαταραχές στους μετέπειτα ομοιοστατικούς και μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου, οι οποίες δεν έχουν ακόμα διασαφηνιστεί πλήρως.

3.3.2 Συσσώρευση λιπιδίων στους ιστούς

Στη νόσο NPC παρατηρείται “αναδόμηση” του λιπιδικού προφίλ των κυττάρων στους διάφορους ιστούς, λόγω της υπέρμετρης εναπόθεσης διαφόρων λιπιδίων. Τα σημαντικότερα εξ αυτών είναι η μη εστεροποιημένη χοληστερόλη, η σφιγγομυελίνη, η σφιγγοσίνη/σφιγγανίνη τα γλυκοσφιγγολιπίδια, τα γαγγλιοσίδια (ιδιαίτερος τα GM2, GM3) και το λυσοδιφωσφατιδικό οξύ (BMP ή LBPA). Πιθανολογείται ότι το σύνολο των συσσωρευμένων λιπιδίων και επιπλέον –ίσως- μεταβολίτες συνεισφέρουν στην παθογένεση της νόσου. Ιδιαίτερο δε ενδιαφέρον παρουσιάζει η ετερογένεια των εναποτεθέντων λιπιδίων μεταξύ των σπλαχνικών και νευρικών ιστών.

3.3.2α Η εναπόθεση της χοληστερόλης και η σημασία της

Όσον αφορά στον πρωταρχικό βλαπτικό μεταβολίτη, δεδομένα από διάφορες μελέτες καταδεικνύουν τη μη εστεροποιημένη χοληστερόλη. Η εναπόθεση της φαίνεται ότι δευτερογενώς επιφέρει τη συγκέντρωση και των υπολοίπων λιπιδίων. Πράγματι, οι πρωτεΐνες NPC1 και NPC2 δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια τη χοληστερόλη αλλά όχι τα γαγγλιοσίδια ή τη σφιγγοσίνη (Kwon et al., 2009). Επιπλέον, μεταλλάξεις στο σημείο πρόσδεσης της αρκούν για να επάγουν το φαινότυπο της νόσου. Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι αν ανασταλεί η συσσώρευση των

γαγγλιοσιδίων (GM2 και GM3) και διατηρηθεί η εναπόθεση της χοληστερόλης στα κύτταρα η νευροεκφύλιση δε μεταβάλλεται (Li et al., 2008). Αναφορικά δε με την εναπόθεση της σφιγγομυελίνης, αυτή θεωρείται δευτερογενής, καθώς η συγκέντρωση της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης στο ΩΕ/Λ αναστέλλει την ενεργότητα της όξινης λυσοσωμιακής σφιγγομυελινάσης (Devlin et al., 2010). Επιπλέον, πιθανολογείται ότι η εναποτιθέμενη χοληστερόλη επιδρά και στη ρύθμιση της υδρόλυσης των γλυκοσυλκεραμιδίων. Αναφορικά με τη σφιγγοσίνη, έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευσή της προηγείται αυτή της χοληστερόλης, εντούτοις στα πειράματα αυτά είχε χρησιμοποιηθεί το αμφίφιλο U18666A, το οποίο επίσης αναστέλλει τη σύνθεση της χοληστερόλης (Lloyd-Evans et al., 2008). Τέλος, η κυκλοδεξτρίνη (2-hydroxypropyl-cyclodextrin), ένας ολιγοσακχαρίτης που δεσμεύει τη χοληστερόλη, προκαλεί σημαντική μείωση της εναποτιθέμενης χοληστερόλης με αποτέλεσμα τον περιορισμό της νευροεκφύλισης, την παράταση της ζωής στα πειραματόζωα και θετική επίδραση σε NPC ασθενείς, σύμφωνα με τρέχουσες κλινικές μελέτες (Tanaka et al., 2015, Ottinger et al., 2014, Ory et al., 2017).

3.3.2β Συσσώρευση λιπιδίων σε σπλαχνικούς ιστούς

Η δυσλειτουργία του ενδοκυττάριου μεταβολισμού των λιπιδίων, όπως παρουσιάστηκε ανωτέρω, επεξηγεί σε μεγάλο βαθμό τις μεταβολές που παρατηρούνται στους σπλαχνικούς ιστούς. Λιπιδικές εναποθέσεις παρατηρούνται κυρίως στο σπλήνα, σε μικρότερο βαθμό στο ήπαρ και ακόμη λιγότερο τους πνεύμονες (Xie et al., 1999). Στους ιστούς αυτούς δεν παρουσιάζεται ποσοτική κυριαρχία ενός συγκεκριμένου λιπιδίου παρά μάλλον ένα πρότυπο “λιπιδικού μείγματος”. Ειδικότερα, στα λιπίδια που εναποτίθενται συγκαταλέγονται κατά βάση η μη εστεροποιημένη χοληστερόλη και η σφιγγομυελίνη (αύξηση 2 έως 5 φορές στους NPC ασθενείς), το λυσοδιφωσφατιδικό οξύ (BMP), τα γλυκολιπίδια (ουσιαστικά γλυκοσυλκεραμίδια και λακτοσυλκεραμίδια), η ελεύθερη σφιγγοσίνη και η σφιγγανίνη (Vanier, 2015).

3.3.2γ Συσσώρευση λιπιδίων στους νευρικούς ιστούς. Το αίτιο του εγκεφάλου.

Η εναπόθεση των λιπιδίων στα νευρικά κύτταρα και κατ'επέκταση η παθοφυσιολογία του νευρικού συστήματος στη νόσο NPC είναι περισσότερο πολύπλοκη. Ιστορικά ο Crocker και συν, καθώς και αρκετοί ερευνητές αργότερα, διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της χοληστερόλης και της σφιγγομυελίνης δεν παρουσίαζαν εμφανή αύξηση στον εγκέφαλο τόσο πειραματόζωων όσο και ασθενών με NPC. Επίσης, η ελεύθερη σφιγγοσίνη είναι λιγότερο αυξημένη (3πλάσια) στον εγκέφαλο σε σχέση με το ήπαρ και το σπλήνα (20πλάσια) και τα γαλακτοσυλκεραμίδια μειωμένα (το πιο ειδικό λίπιδιο της μυελίνης). Αντίθετα, σημαντική αύξηση παρατηρείται στα επίπεδα των γλυκοσφιγγολιπιδίων, με τα γαγγλιοσίδια (GM2 και GM3) να αποτελούν τα κυρίαρχα εναποτιθέμενα λίπιδια στους νευρώνες (10πλάσια έως και 20πλάσια αύξηση). Συνεπώς, το μοτίβο των συσσωρευμένων λιπιδίων στον εγκέφαλο διαφέρει σημαντικά σε σχέση με αυτό των σπλαχνικών ιστών.

Η νευροεκφύλιση αποτελεί το σημαντικότερο κλινικό χαρακτηριστικό της νόσου, έτσι η επικράτηση της συσσώρευσης των γαγγλιοσιδίων στον εγκέφαλο δημιούργησε σύγχυση ως προς ρόλο της χοληστερόλης στη νευροπαθοφυσιολογία. Ο κρίσιμος ρόλος των γλυκοσφιγγολιπιδίων υποστηρίζεται και από πειράματα σε ποντίκια και αιλουροειδή, όπου η χρήση του αναστολέα της γλυκοζυλοτρανσεφάσης NB-DNJ φάνηκε να μειώνει την συγκέντρωση των γαγγλιοσιδίων στα κύτταρα με παράλληλη βελτίωση την πορείας της νευρολογικής εκφύλισης (Zervas et al., 2001b). Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες επανατοποθετούν τη χοληστερόλη σε κομβικό σημείο στη νευροπαθολογία της νόσου NPC.

Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης στον εγκέφαλο διαχωρίζεται από αυτόν της περιφέρειας, με την παρουσία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (μη διαπερατός από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος). Η χοληστερόλη κατά βάση συντίθεται τοπικά από τα νευρικά κύτταρα (κυρίως από τα ολιγοδενδροκύτταρα). Πιθανότατα όμως, ένα μικρό ποσοστό της χοληστερόλης των νευρώνων να

προέρχεται από την απολιποπρωτεΐνη E (Dietschy and Turley, 2001). Η εναπόθεση χοληστερόλης στον εγκέφαλο ασθενών με NPC δε φαίνεται να αυξάνεται, αντιθέτως φαίνεται να μειώνεται με την ηλικία. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην απομυελίνωση που παρατηρείται στη νόσο, καθώς η μυελίνη εμπεριέχει περίπου το 75% της συνολικής χοληστερόλης του εγκεφάλου (Xie et al., 2000). Επιπλέον, πειράματα σε πειραματόζωα καταδεικνύουν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPC-1* μειώνουν το σχηματισμό της μυελίνης (Yu and Lieberman, 2013). Εντούτοις, η χοληστερόλη φαίνεται τελικά να εναποτίθεται στα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, ενώ παρουσιάζεται μειωμένη στις νευρικές απολήξεις. Η μεταφορά της χοληστερόλης από τα κυτταρικά σώματα στις νευρικές απολήξεις είναι επίσης διαταραγμένη (Karten et al., 2003, Karten et al., 2002). Καταλήγοντας, η εναπόθεση της χοληστερόλης θεωρείται το κρίσιμο αίτιο της νευρολογικής εκφύλισης, ενώ πιθανότατα η μείωση της στις νευρικές απολήξεις να συμβάλλει στο νευρολογικό φαινότυπο. Αναλυτικότερα στοιχεία για τη νευροπαθοφυσιολογία της νόσου με βάση την δράση των παραγόμενων NPC πρωτεϊνών, παρατίθενται στο κεφάλαιο 4.

3.3.3 Αυτοφαγοκυττάρωση

Ανωμαλίες στη διαδικασία της αυτοφαγοκυττάρωσης έχουν περιγραφεί σε αρκετές διαταραχές του μεταβολισμού των λυσοσωμάτων. Αν και ο ρόλος της στη νόσο NPC δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, τα δεδομένα συγκλίνουν ότι είναι σημαντικός. Θεωρείται ότι επιδρά σε γεγονότα του μεταβολικού καταρράκτη που ακολουθούν τη διαταραχή της μετακίνησης της χοληστερόλης, στη τελική σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών και στη νευροπαθολογία. Σε NPC1 ανεπάρκεια παρατηρείται σταθερά αυξημένος αριθμός διαφόρων αυτοφαγοσωμάτων (π.χ. LC3 θετικά φορτισμένα κυστίδια) και ώριμων ενδοσωμάτων, ενώ πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν διαταραχή στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων (Maetzel et al., 2014, Sarkar et al., 2014). Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η ελαττωματική σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με τα ενδοσώματα αναστέλλει τη στρατολόγηση πολλαπλών μορίων του SNARE συμπλέγματος στα ώριμα ενδοσώματα, γεγονός που

οδηγεί σε δυσλειτουργία της κάθαρσης του αυτοφαγοκυτταρικού φορτίου. Σε αντίθεση με τις προηγηθείσες μελέτες, σε μια άλλη μελέτη δεν επιβεβαιώθηκε διαταραχή στη βιογένεση των αυτοσωμάτων ή ανωμαλία στην πρωτεολυτική λειτουργία, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η βλάβη εντοπίζεται στις διεργασίες αυτοφαγοκυτταρική σύντηξης (Elrick and Lieberman, 2013). Κατά συνέπεια, ουσίες που επάγουν τη λειτουργία του μηχανισμού της αυτοφαγοκυττάρωσης (όπως η ραπαμυκίνη) αποτελούν ενδιαφέρον πεδίο έρευνας στη θεραπεία της νόσου.

3.3.4 Οξειδωτικό στρες

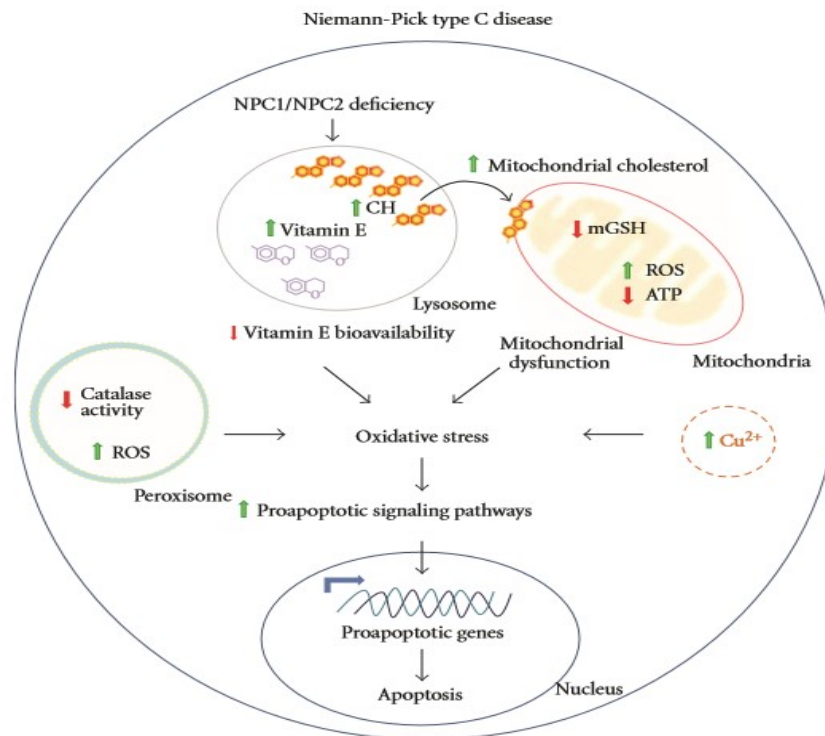
Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ως ένας ακόμη παράγοντας που συμβάλλει στη παθογένεια της νόσου, αν και ο υποκείμενος μηχανισμός δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Αυξανόμενος όγκος δεδομένων υπογραμμίζει, αφενός την παρουσία οξειδωτικής βλάβης στους NPC νευρώνες και αφετέρου τη σύνδεση της με την ίνωση και τον κυτταρικό θάνατο στο ήπαρ. Πράγματι, διάφορα προϊόντα οξείδωσης έχουν εντοπιστεί στο ήπαρ και τον εγκέφαλο NPC ποντικών, καθώς και σε κυτταρικά μοντέλα της νόσου. Επιπλέον, δείκτες του οξειδωτικού στρες έχουν ανευρεθεί αυξημένοι στον ορό NPC ασθενών (Vanier, 2015). Το ερώτημα που παραμένει ωστόσο, είναι ο τρόπος επαγωγής της οξειδωτικής βλάβης.

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν τα μιτοχόνδρια ως μία πιθανή πηγή της επαγόμενης οξείδωσης στη νόσο. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία φαίνεται να πηγάζει από τη συσσώρευση χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια. Αντανακλάται δε στην αλλαγή της μορφολογίας τους, την αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, τον περιορισμό της παραγόμενης ενέργειας (με τη μορφή ATP) και τη μείωση της ανηγμένης μιτοχονδριακής γλουταθειόνης (GSH). Η GSH συγκαταλέγεται στους κυριότερους παράγοντες σταθερότητας του δυναμικού οξειδοαναγωγής στα κύτταρα και αποτελεί το βασικότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό. Συνάμα, η βιταμίνη E -και ιδιαίτερα η δραστική της μορφή α -τοκοφερόλη- αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό. Στη νόσο NPC η βιταμίνη E φαίνεται να συσσωρεύεται στο $\Omega E/\Lambda$, με αποτέλεσμα τη μείωση της

βιοδιαθεσιμότητάς της και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κυττάρου. Επίσης, η βιταμίνη E έχει ανασταλτική δράση στην τοξική δράση της 7-κετοχοληστερόλη (7-KC), παράγωγο της οξείδωσης της χοληστερόλης (Fu et al., 2010).

Άλλες πιθανές αιτίες παραγωγής ελεύθερων ριζών είναι η μείωση της δραστηριότητας διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων, η συσσώρευση του χαλκού και η μεταβολή των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου. Στα υπεροξειδιοσώματα παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της καταλάσης και αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Επιπλέον, σε ποντίκια με NPC έχει παρατηρηθεί ηπατική συσσώρευση χαλκού, αυξημένα επίπεδα στον ορό και μειωμένη αποβολή του στα χολικά οξέα. Ο χαλκός μαζί με άλλα ιχνοστοιχεία έχει θεωρηθεί παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης οξειδωτικών βλαβών σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους, ενώ ασθένειες όπως η νόσος Wilson και η Menkes, έχουν αποδοθεί σε μεταλλάξεις πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον χαλκό. Η γρήγορη οξείδωση του χαλκού οδηγεί σε βλάβες σε διάφορα βιομόρια και στη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Συνεπώς, η ομοίωση του χαλκού, που ρυθμίζεται κυρίως από το ήπαρ, είναι σημαντική για την προστασία των κυττάρων από την οξείδωση. Τέλος, η αύξηση των γλυκοσφιγγολιπιδίων στα NPC κύτταρα προκαλεί διαταραχή των επιπέδων του ενδοκυττάρου ασβεστίου. Το γεγονός αυτό πιθανολογείται ότι ασκεί ιδιαίτερα βλαπτική δράση στα κύτταρα, καθώς η διατάραξη της ομοίωσης του ασβεστίου φαίνεται να διεγείρει το οξειδωτικό στρες και τον κυτταρικό θάνατο (Vazquez et al., 2012).

Συμπερασματικά, μεταβολές σε διάφορα ενδοκυττάρια οργανίδια, όπως τα λυσοσώματα, τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξειδιοσώματα, σε συνδυασμό με διαταραχή στη μεταφορά του χαλκού φαίνεται ότι διεγείρουν τις διεργασίες του οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούν προ-αποπτωτικά μονοπάτια και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο στη νόσο NPC (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Το οξειδωτικό στρες ως παθογενετικός μηχανισμός στη νόσο Niemann-Pick τύπου C. CH: μη εστεροποιημένη χοληστερόλη, ROS: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, mGSH: ανηγμένη μιτοχονδριακή γλουταθειώνης (Vazquez et al., 2012)

3.3.5 Τα παθογενετικά μονοπάτια στη νόσο NPC και οι προεκτάσεις τους

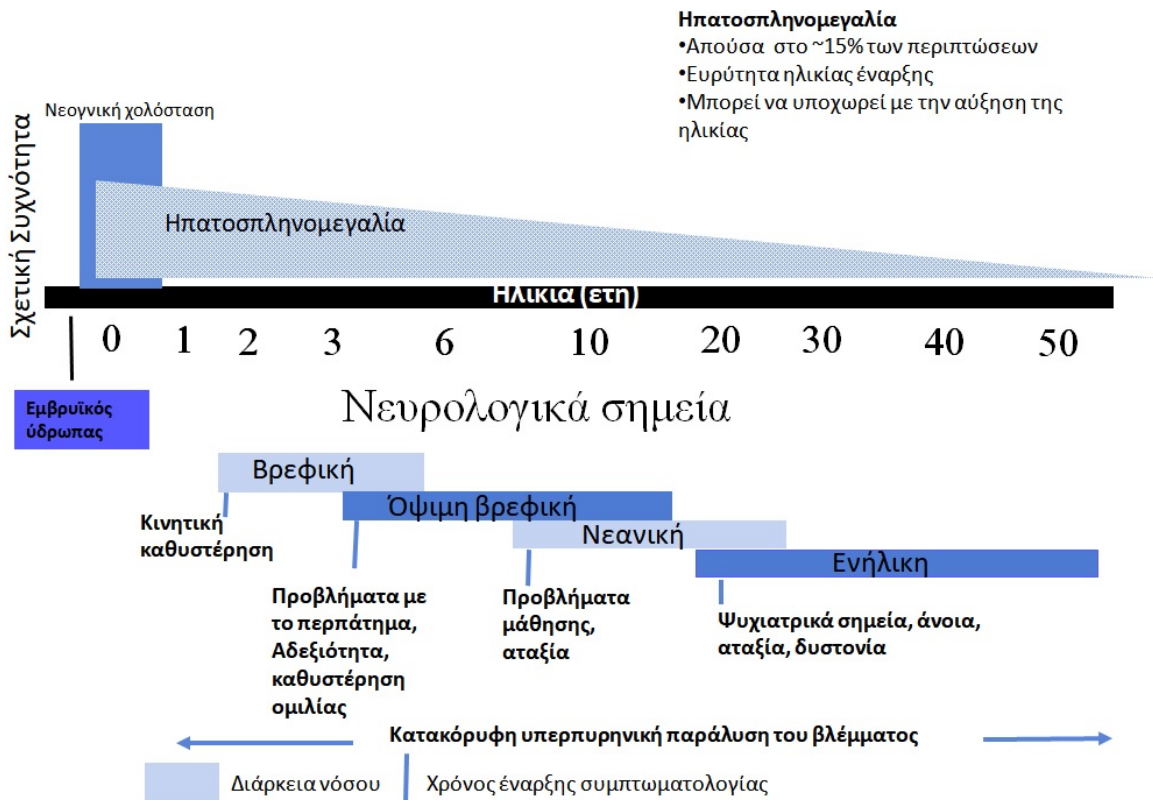
Μετά την ανακάλυψη των γονιδίων *NPC-1* και *NPC-2* ως υπεύθυνα για την εμφάνιση της νόσου NPC, τα τελευταία 20 έτη έχει διενεργηθεί πλήθος επιστημονικών μελετών στην προσπάθεια διαλεύκανσης των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών. Αν και πολλά σημεία παραμένουν δυσνόητα, η έρευνα στον τομέα αυτόν έριξε φως στο ενδοκυττάριο μονοπάτι μεταφοράς της χοληστερόλης. Υπό το πρίσμα αυτό, μελετώνται οι παθογενετικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην έκφραση άλλων νοσημάτων, όπως είναι η αθηρωμάτωση, η δυσλιπιδαιμία και η παχυσαρκία.

3.4 Κλινική Εικόνα

Κλινικό χαρακτηριστικό της νόσου Niemann-Pick τύπου C (NPC) συνιστά η προοδευτική νευροεκφύλιση. Η κλινική συμπτωματολογία, εκτός από τις νευρολογικές εκδηλώσεις, περιλαμβάνει ακόμη σπλαχνικά συμπτώματα και ψυχιατρικές διαταραχές. Οι ανωτέρω διαταραχές παρουσιάζουν διαφορετικό χρόνο εμφάνισης και ανεξάρτητη πορεία. Ο κλινικός φαινότυπος είναι εντυπωσιακά ετερογενής –ακόμη και σε αδέλφια με τη νόσο (Benussi et al., 2015)- με συνδυασμό ειδικών ή μη ειδικών συμπτωμάτων, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν από την εμβρυϊκή έως και την ενήλικη ζωή. Με εξαίρεση μια μικρή κατηγορία ασθενών που παρουσιάζει μόνο συστηματικές εκδηλώσεις, η ηλικία εκδήλωσης των νευρολογικών συμπτωμάτων επηρεάζει σημαντικά την εξέλιξη της νόσου και την πρόγνωση. Συγκεκριμένα, μικρότερη ηλικία έχει ισχυρά συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη και πρώιμο θάνατο (Vanier, 2010). Ο θάνατος, στην κλασική μορφή της νόσου, επέρχεται κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής, με κύρια αιτία την πνευμονία από εισρόφιση σε έδαφος δυσφαγίας (Patterson and Pentchev, 1996, Walterfang et al., 2012). Η μέση ηλικία έναρξης των νευρολογικών εκδηλώσεων είναι τα 10,9 (9,8) έτη, ενώ η ηλικία κατά την οποία τίθεται η διάγνωση της νόσου είναι κατά μέσο όρο τα 15 έτη, με μία διακύμανση της τάξεως των 12,2 χρόνων (Pineda et al., 2009, Patterson et al., 2013).

3.4.1 Κατηγοριοποίηση κλινικών φαινοτύπων

Όπως προαναφέρθηκε η ηλικία έναρξης των νευρολογικών σημείων είναι καθοριστική για την πορεία και την πρόγνωση της νόσου. Έτσι, η ταξινόμηση των ασθενών ανάλογα με την ηλικία απαρχής της νευρολογικής συμπτωματολογίας είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, τόσο στη μελέτη της νόσου, όσο και στην παρακολούθηση των ασθενών. Βέβαια, πρέπει να επισημάνουμε ότι οι νευρολογικές εκδηλώσεις ακολουθούν ένα συνεχές και προοδευτικό φάσμα και παρατηρείται επικάλυψη μεταξύ των κατηγοριών αυτών (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Κλινική συμπτωματολογία στη νόσο NPC προσαρμοσμένο από M.C. Patterson et al. Molecular Genetics and Metabolism (2012)

Έχουμε λοιπόν τη κατηγοριοποίηση σε 5 υποτύπους: 1) Νεογνική μορφή: Παρουσία κατά την προγεννητική (εμβρυϊκός ύδρωπας/ασκίτης) ή την νεογνική περίοδο (χολοστατικός ίκτερος, ηπατική ή/και πνευμονική ανεπάρκεια) συνήθως χωρίς νευρολογική συμπτωματολογία 2) Πρώιμη βρεφική μορφή (2μηνών-2ετών), 3) Όψιμη βρεφική-νηπιακή μορφή (2ετών-δετών), 4) Παιδική μορφή (6-16ετών), -που συνιστά τον κλασικό φαινότυπο της νόσου- και την 5) Εφηβική/ενήλικη μορφή (>16 ετών) (Vanier, 2010). Στην εικόνα 4 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των διαφόρων υποτύπων της νόσου.

ΝΡC κλινικός τύπος	ΗΛΙΚΙΑ ΕΝΑΡΞΗΣ	ΣΠΛΑΧΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ
Νεογνικός	Προ/περιγεννητική περίοδος (≤3μην.)	χολοστατικός ίκτερος (συχνά) ηπατοσπληνομεγαλία ηπατική/αναπνευστική ανεπάρκεια εμβρυικός ύδρωπας εμβρυικός ασκίτης (με ή χωρίς συνέχιση μετά τη γέννηση)	ΔΕΝ αναγνωρίζονται
Πρώιμος βρεφικός	3 μηνών-2ετών	Μεμονωμένη ηπατοσπληνομεγαλία ή ηπατοσπληνομεγαλία	Αναπτυξιακή καθυστέρηση Υποτονία Δια/χή ακοής VS GP (σπάνια αναγνωρίζεται)
Όψιμος βρεφικός-νηπιακός	2ετών-56ετών	Μεμονωμένη ηπατοσπληνομεγαλία ή ηπατοσπληνομεγαλία (συχνή)	Συχνές πτώσεις, αδεξιότητα Προοδευτική αταξία, δυστονία, δυσαρθρία, δυσφαγία Υποτονία Δια/χή ακοής Σπασμοί Καταπληξία VS GP (συχνά)
Νεανικός	6-15ετών	Μεμονωμένη ηπατοσπληνομεγαλία ή ηπατοσπληνομεγαλία (όχι πάντα)	Μαθησιακές δυσκολίες Συμπεριφοριστικές διατ/χές Συχνές πτώσεις, αδεξιότητα Προοδευτική αταξία, δυστονία, δυσαρθρία, δυσφαγία Μυόκλονος Σπασμοί Καταπληξία VS GP (συχνά)
Έφηβικός Ενηλίκων	>15ετών	Όργανομεγαλία Μεμονωμένη σπληνομεγαλία (σπάνια)	Αδεξιότητα Καταπληξία VS GP (συχνά) Ψυχιατρικές διατ/χές Πρώιμη άνοια Προοδευτική αταξία, δυστονία, δυσαρθρία, δυσφαγία Μύοκλονος Σπασμοί/επιληψία

Εικόνα 4. Κλινικοί φαινότυποι της νόσου NPC

3.4.2 Συστηματικές εκδηλώσεις

Συχνές σπλαχνικές εκδηλώσεις αποτελούν ο νεογνικός χολοστατικός ίκτερος, η ηπατομεγαλία και/ή σπληνομεγαλία, οι οποίες όταν είναι παρούσες προηγούνται της εμφάνισης της νευρολογικής συμπτωματολογίας (Garver et al., 2007, Imrie et al., 2007, Iturriaga et al., 2006). Η συχνότητα τους μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας εμφάνισης της νευρολογικής νόσου, ωστόσο, το 30% των ασθενών που εμφάνισαν νευρολογικά συμπτώματα στην ενήλικη ζωή έχουν θετικό ιστορικό όσον αφορά στις εκδηλώσεις αυτές (Patterson et al., 2013, Mengel et al., 2013). Η πρώιμη εμφάνιση

σπλαχνικών διαταραχών μπορεί να συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση των ασθενών. Εντούτοις, με εξαίρεση την ηπατική –και σπανιότερα- αναπνευστική ανεπάρκεια της νεογνικής μορφής, η εμφάνιση των οργανικών συμπτωμάτων δεν εμφανίζει συσχέτιση ούτε με την έναρξη ούτε με την πορεία της νευρολογικής βλάβης. Τα συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα δεν είναι συχνά. Σπανιότατα, σε ορισμένα νεογνά (ιδιαίτερα σε αυτά με μετάλλαξη στο *NPC-2*) παρατηρείται -μεμονωμένα είτε παράλληλα με την ηπατική νόσο- σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια σε έδαφος κυψελιδικής λιποπρωτεϊνώσεως, η οποία επίσης μπορεί να αποβεί θανατηφόρα (Patterson and Platt, 2004, Schofer et al., 1998).

Αναλυτικότερα, ο παρατεινόμενος νεογνικός χολοστατικός ίκτερος σε νεογνά με NPC εμφανίζεται κατά τις πρώτες ημέρες ή εβδομάδες της ζωής συνοδευόμενος σχεδόν στο 50% από προοδευτική ηπατοσπληνομεγαλία διαφόρου βαρύτητας. Κατά την περίοδο αυτή σε ένα 10% των ασθενών, ο ίκτερος επιδεινώνεται ραγδαία και τα νεογνά σύντομα υποκύπτουν πριν την ηλικία των 6 μηνών, σε έδαφος ηπατικής ανεπάρκειας. Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων υποστρέφει αυτόματα στους 2-3 μήνες, ενώ η σπληνομεγαλία και πολύ σπανιότερα η ηπατομεγαλία εμμένει για άλλοτε διαφορετικό διάστημα με ηπιότερη συνήθως μορφή (Kelly et al., 1993, Iturriaga et al., 2006). Αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό όλων των μορφών της νόσου, καθώς συνιστά την αρχική εκδήλωση στις περισσότερες περιπτώσεις νεογνικής-παιδικής και στο 30% των περιπτώσεων της ενήλικης μορφής (Elleder et al., 1984, Patterson et al., 2013). Η νόσος NPC αποτελεί την πιο συχνή γενετική αιτία νεογνικού ίκτερου μετά την ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης στον αγγλικό πληθυσμό και τη συχνότερη μεταβολική διαταραχή που εμφανίζεται με νεογνική χολόσταση (7,5%)(Odièvre, 1991). Παράλληλα, υπολογίζεται ότι το 30% των νεογνών που διαγιγνώσκονται με ιδιοπαθή χολοστατικό ίκτερο εν τέλει πάσχουν από Niemann-Pick τύπου C (Yerushalmi et al., 2002) .

Όσον αφορά στη σπληνομεγαλία, αυτή παρατηρείται στο 93% των ασθενών με NPC. Η ηλικία κατά την ανίχνευσή της ποικίλλει ευρέως και γενικά συμπίπτει με την ανεύρεση της

ηπατομεγαλίας όταν αυτή συνυπάρχει. Έχει αναφερθεί ένα σημαντικό ποσοστό εμφάνισης σπληνομεγαλίας κατά τη γέννηση, που κυμαίνεται από 30 έως και 100% ανάλογα με τη μορφή της νόσου (Garver et al., 2007, Mengel et al., 2013). Παρά το γεγονός ότι υποστρέφει σημαντικά τα επόμενα έτη, έχει παρατηρηθεί στην ενήλικη μορφή όχι μόνο ως περιγεννητικό συμβάν, αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις ως μεμονωμένη εκδήλωση της νόσου. Παράλληλα, μία ομάδα ασθενών ανεξαρτήτου ηλικίας εμφανίζεται αρχικά με μοναδική εκδήλωση τη σπληνομεγαλία (Mengel et al., 2013, Omarini et al., 1995, Imrie and Wraith, 2001).

3.4.3 Νευρολογικές εκδηλώσεις

Η νευροεκφύλιση συνιστά την προεξέχουσα και πιο σοβαρή, απειλητική για τη ζωή, πτυχή της νόσου. Κλινικές εκδηλώσεις από το νευρικό σύστημα αποτελούν η αδεξιότητα (87%), η άμβλυνοση των γνωσιακών λειτουργιών (62%) [μαθησιακές δυσκολίες (87%), πρόωμη άνοια], η αταξία (70%), η κάθετη υπερπυρηνική παράλυση σακκαδικών κινήσεων ή βλέμματος (Vertical Supranuclear Saccadic Palsy VSSP ή Gaze Palsy-VSGP) (70%), η δυσφαγία (52%), η δυστονία (46%), η δυσαρθρία (66%), η επιληψία (33%), η καταπληξία (26%) και σπάνια η περιφερική νευροπάθεια (Garver et al., 2007, Patterson et al., 2013). Οι αρχικές νευρολογικές εκδηλώσεις, στις περισσότερες περιπτώσεις, εμφανίζονται μεταξύ 4-10 ετών, αν και τα όρια μπορεί να επεκτείνονται από τη νεογνική περίοδο έως την ενήλικη ζωή (Imrie et al., 2007). Επιπλέον, ανάλογα με την ηλικία έναρξης των νευρολογικών εκδηλώσεων παρατηρούνται αρχικά διαφοροποιήσεις ως προς τα σημεία της νευρολογικής συμπτωματολογίας, η οποία ωστόσο σε όλες τις ηλικιακές ομάδες εμφανίζεται σταθερά προϊούσα (Mengel et al., 2017). Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των νευρολογικών συμπτωμάτων, ανάλογα με τον υπότυπο της νόσου, όπως προέκυψε από τη διεθνή βάση δεδομένων ασθενών με τη νόσο NPC (N=163) (Patterson et al., 2013).

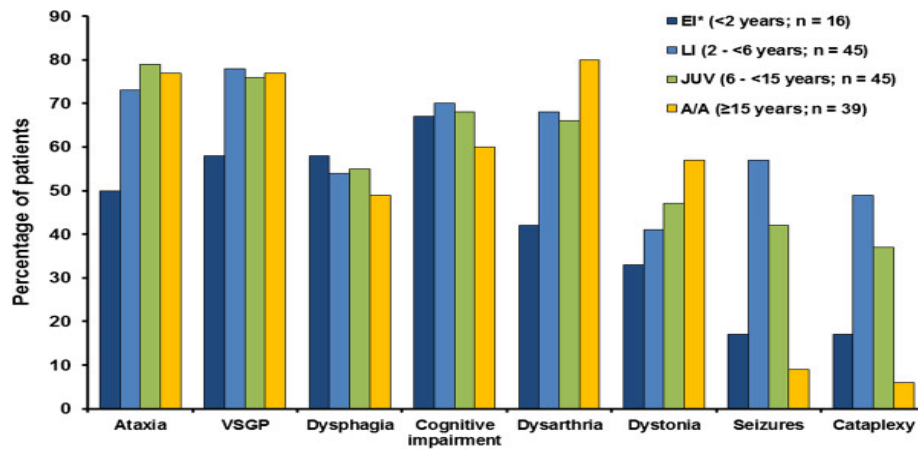
Ειδικότερα, η κάθετη παράλυση των σακκαδικών κινήσεων (VSSP), η οποία εξελίσσεται στην πορεία σε κάθετη παράλυση βλέμματος (VSGP), αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό και είναι συχνή

σε όλες της μορφές της νόσου. Αν και συχνά διαλάθει, η αρχική της εκδήλωση έγκειται σε καθυστέρηση της έναρξης των κάθετων σακκαδικών κινήσεων και αποτελεί πρώιμο ειδικό σημείο νευρολογικής επιδείνωσης. Σταδιακά παρατηρείται μείωση και εν τέλει πλήρη απώλεια της σακκαδικής ταχύτητας. Σε μετέπειτα στάδια διαταράσσονται και οι οριζόντιες σακκαδικές κινήσεις, με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη οφθαλμοπληγία (Strupp et al., 2014, Marc C. Patterson, 2017).

Παράλληλα, η καταπληξία -αν και όχι τόσο συχνή- αποτελεί ειδικό σημείο της νόσου. Χαρακτηρίζεται από αιφνίδια απώλεια μυϊκού τόνου -συνοδευόμενη ή όχι από ναρκοληψία- και επάγεται τυπικά από ερεθίσματα γέλιου (γελαστική καταπληξία). Δύναται να οδηγήσει σε πτώσεις και τραυματισμούς, όπως και η επιληψία. Μάλιστα, η καταπληξία σε κάποιες μορφές της νόσου συνυπάρχει με την επιληψία. Όσον αφορά στις επιληπτικές κρίσεις, συνήθως ανταποκρίνονται στα αντιεπιληπτικά φάρμακα. Ανθεκτική επιληψία είναι κακό προγνωστικό σημείο, ενώ κάποιες φορές με την εξέλιξη της νόσου παρατηρείται βελτίωση των σπασμών, πιθανότατα λόγω της συνεχούς απώλειας νευρικών κυττάρων (Vanier, 2010).

Η εμφάνιση προϊούσας αταξίας αποτελεί κοινό εύρημα. Η αδεξιότητα αποτελεί το πρωιμότερο σύμπτωμα, το οποίο συχνά υποδιαγιγνώσκεται ή και αρχικά λανθασμένα αποδίδεται σε άλλη νόσο. Ακολουθείται από διαταραχές στο βάδισμα με συχνές πτώσεις και έκδηλη αταξία. Η αδεξιότητα αποτελεί ένα ακόμη πρώιμο κλινικό σημείο ιδιάζουσας σημασίας, καθώς φαίνεται να προηγείται 2-4 έτη της έκδηλης εγκατάστασης παρεγκεφαλιδικής αταξίας (Iturriaga et al., 2006, Mengel et al., 2017).

Η άμβλυνση των γνωσιακών λειτουργιών αποτελεί ένα από τα πιο σταθερά νευρολογικά συμπτώματα, με συχνότητα 60-70% ανεξαρτήτως της μορφής της νόσου. Παρόλο που η προϊούσα γνωσιακή έκπτωση παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με NPC, συχνά υποεκτιμάται στην πρώιμη παιδική ηλικία. Στη βρεφική ηλικία αναγνωρίζεται ως αναπτυξιακή καθυστέρηση. Τέλος, σε παιδιά και εφήβους εκδηλώνεται συχνά με τη μορφή μαθησιακών διαταραχών και εξελίσσεται σε άνοια.



Εικόνα 5. Συχνότητα εμφάνισης νευρολογικών συμπτωμάτων ανάλογα με τη κατηγοριοποίηση στους κλινικούς φαινοτύπους. Δεδομένα από τη διεθνή βάση ασθενών με NPC (N=163). EI: Πρώιμη βρεφική μορφή LI: Όψιμη βρεφική-νηπιακή μορφή JUV:Παιδική μορφή A/A:Εφηβική/ενήλικη μορφή. Patterson et al. Orphanet Journal of Rare Diseases 2013

3.4.4 Ψυχιατρικές εκδηλώσεις

Οι ψυχιατρικές διαταραχές εμφανίζονται συχνότερα μεταξύ των εφήβων και ενήλικων ασθενών με τη νόσο NPC (Iturriaga et al., 2006, Imrie et al., 2007). Το 40% περίπου των ασθενών αυτών παρουσιάζουν ψυχιατρικά συμπτώματα, ποσοστό που πιθανόν υπερεκτιμάται λόγω της συνυπάρχουσας έκπτωσης των γνωσιακών λειτουργιών. Εντούτοις, ψυχωτικά συμπτώματα που προσομοιάζουν με τη σχιζοφρένεια εμφανίζονται έως και στο ένα τέταρτο αυτών των NPC ασθενών. Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί και άλλες ψυχιατρικές νόσοι, όπως η κατάθλιψη, η διπολική και η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Η κλινική αυτή έκφανση της νόσου είναι ένας σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, καθώς μπορεί να επισκιάσει συστηματικά ή ήπια νευρολογικά συμπτώματα, οδηγώντας σε σημαντική καθυστέρηση –αν όχι και αστοχία- της διάγνωσης (Bonnot et al., 2017, Hendriksz et al., 2017).

3.4.5 Κλίμακα κλινικής αξιολόγησης ασθενών με NPC

Η ποσοτικοποίηση της ανικανότητας που επιφέρουν οι νευρολογικές βλάβες είναι σημαντική τόσο για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου, όσο και για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπευτική παρέμβαση. Έχει προταθεί μία κλίμακα κλινικής αξιολόγησης του

βαθμού ανικανότητας, η οποία περιλαμβάνει τις εξής 4 παραμέτρους: το βάδισμα, την ομιλία, την κατάποση και την επιδεξιότητα (Εικόνα 6) (Iturriaga et al., 2006). Αν και δεν έχει επίσημα επικυρωθεί, χρησιμοποιείται με επιτυχία σε διάφορες έρευνες, είτε με αυτή τη μορφή ή τροποποιημένη ώστε να περιλαμβάνει περισσότερους τομείς.

Κλίμακα ανικανότητας¹

Περιπατητική ικανότητα	Βαθμολογία	Βαθμολογία*	Γλώσσα	Βαθμολογία	Βαθμολογία*
Φυσιολογικό	1	0	Φυσιολογικό	1	0
Αυτόνομη αταξική βόδιση	2	0.25	Μέτρια δυσαρθρία ^d	2	0.25
Περιπατητική ικανότητα υπό βοήθεια σε εξωτερικό χώρο	3	0.5	Σοβαρή δυσαρθρία ^e	3	0.5
Περιπατητική ικανότητα υπό βοήθεια σε εσωτερικό χώρο	4	0.75	Μη-λεκτική επικοινωνία	4	0.75
Καθηλωμένος σε αναπηρικό αμαξίδιο	5	1.0	Απουσία επικοινωνίας	5	1.0
Χειρισμοί	Βαθμολογία	Βαθμολογία*	Κατάποση	Βαθμολογία	Βαθμολογία*
Φυσιολογικό	1	0	Φυσιολογικό	1	0
Ήπια δυσμετρία / δυστονία ^a	2	0.33	Περιστασιακή δυσφαγία	2	0.33
Μέτρια δυσμετρία / δυστονία ^b	3	0.67	Καθημερινή δυσφαγία	3	0.67
Σοβαρή δυσμετρία / δυστονία ^c	4	1.0	Ρινογαστρικός σωλήνας ή σίπιση μέσω γαστρικού "button"	4	1.0

^aΑυτόνομοι χειρισμοί, ^bαπαιτεί βοήθεια για διάφορα θέματα, αλλά μπορεί να αυτοταϊστεί, ^cαπαιτεί βοήθεια για όλες τις δραστηριότητες, ^dκατανοητό, ^eκατανοητό μόνο σε συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας. *Τροποποιημένη κλίμακα

¹Iturriaga C et al. *J Neurol Sci* 2006;249:1-6

Εικόνα 6. Κλίμακα κλινικής αξιολόγησης NPC ασθενών

3.5 Διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μέση ηλικία έναρξης της νευρολογικών εκδηλώσεων είναι τα 10,9 (9,8) έτη. Δυστυχώς, η διάγνωση της νόσου NPC γίνεται με σημαντική καθυστέρηση, η οποία κυμαίνεται κατά μέσο όρο στην ηλικία των 15 ετών με μία διακύμανση από 0,1 έως 53,9 χρόνια (Yanjanin et al., 2010, Patterson et al., 2013, Pineda et al., 2009). Έτσι λοιπόν, η διάγνωση καθυστερεί κατά μέσο όρο 4,1 έτη από την απαρχή της νευρολογικής συμπτωματολογίας (Marc C. Patterson, 2017), περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών παρεμβάσεων. Σε πολλές περιπτώσεις, τη στιγμή της διάγνωσης αρκετοί νευρώνες έχουν ήδη υποστεί μη αντιστρεπτή βλάβη. Πιθανολογείται, μάλιστα η παρουσία ενός «θεραπευτικού παραθύρου» πριν την εμφάνιση μη αντιστρεπτών βλαβών (Pineda et al., 2009), κατά τη διάρκεια του οποίου η έναρξη της θεραπείας

αποδίδει το βέλτιστο όφελος και θα μπορούσε να ανακόψει σε κάποιο βαθμό τη φυσική πορεία της νόσου.

Η χρονική καθυστέρηση μεταξύ της κλινικής έναρξης, της διάγνωσης και της εισαγωγής της θεραπευτικής αγωγής είναι το αποτέλεσμα συνδυασμού διαφόρων παραγόντων. Η κλινική συμπτωματολογία είναι μη ειδική και ετερογενής, ενώ στην καθημερινή κλινική πρακτική η ευαισθητοποίηση σχετικά με αυτή τη σπάνια νόσο είναι μειωμένη. Παράλληλα, παρότι η συσσώρευση των λιπιδίων θεωρείται το κεντρικό σημείο της παθοφυσιολογίας, πολλές πτυχές των παθογενετικών μηχανισμών που οδηγούν σε αυτή και κατ'επέκταση στη νευροεκφύλιση παραμένουν αδιευκρίνιστες. Επιπλέον, παρά τη σημαντική πρόοδο στο τομέα της γενετικής και της βιοχημείας της νόσου, η εργαστηριακή προσέγγιση παραμένει πολύπλοκη και με υψηλό κόστος. Παρόλα αυτά, αν και μένουν αρκετοί περιορισμοί να ξεπεραστούν, ορισμένοι δείκτες διαλογής ασθενών με NPC έχουν βρει χρησιμότητα στη καθημερινή πρακτική.

3.5.1 Κλινική προσέγγιση

3.5.1α Σημεία κλινικής υποψίας της νόσου

Η κλινική ετερογένεια καθώς και η αλληλοεπικάλυψη της κλινικής συμπτωματολογίας με αυτήν άλλων νοσημάτων περιπλέκουν τη διαγνωστική διαδικασία. Αρκετές φορές τίθεται αρχικά λανθασμένη διάγνωση, που δεν αμφισβητείται έως ότου προστεθούν νέα συμπτώματα. Πρόσφατα έχουν αναγνωριστεί άτυπες μορφές της νόσου, ενώ έχει προταθεί ένας ηπιότερος φαινότυπος με καθυστερημένη έναρξη (Marc C. Patterson, 2017, Hendriksz et al., 2017, Wassif et al., 2015). Παρόλα αυτά, το ιστορικό και η λεπτομερής κλινική εξέταση είναι τα αρχικά βήματα, που θα συμβάλλουν στη διαφοροδιάγνωση από άλλες νευρολογικές και μεταβολικές διαταραχές. Χαρακτηριστικά, αν και μη ειδικά, σημεία και συμπτώματα αποτελούν ο νεογνικός χολοστατικός ίκτερος, η σπληνομεγαλία, η κάθετη υπερπυρηνική παράλυση των σακκαδικών κινήσεων, η γελαστική καταπληξία, η αταξία, η

δυσφαγία, η δυστονία, η γνωσιακή έκπτωση και οι ψυχώσεις. Μάλιστα, η συνδυαστική παρουσία ορισμένων σημείων και συμπτωμάτων σε έναν ασθενή –σπλαχνικών, νευρολογικών ή/και ψυχιατρικών- μπορεί να κατευθύνει ασφαλέστερα στην υποψία της νόσου (Πίνακας 1) (Mengel et al., 2013). Πρόσφατη δε αναθεώρηση των συστάσεων για τη διαγνωστική προσέγγιση επεκτείνει τον ανιχνευτικό έλεγχο σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών, με αυξημένο κίνδυνο NPC νόσησης (Πίνακας 2) (Marc C. Patterson, 2017).

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΣΗΜΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΙΣΧΥΡΗ ΥΠΟΨΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ NPC

		Κάθετη παράλυση βλέμματος
		Υποτονία
		Ψυχώσεις
Σπληνομεγαλία	+	Γελαστική καταπληξία
		Καθυστέρηση επίτευξης των αναπτυξιακών οροσήμων
		Δυστονία
Αταξία	+	Δυσαρθρία/Δυστονία
		Γνωσιακή Έκπτωση
Ψυχωτικά συμπτώματα	+	Γνωσιακή Έκπτωση

Πίνακας 1: Συνδυαστική παρουσία σημείων και συμπτωμάτων, που εγείρουν την υποψία της νόσου (Mengel et al., 2013)

Κλινική ομάδα ασθενών με αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο NPC	Σημεία υποψίας
Αταξία	Πρώιμη εμφάνιση (<40 έτη) “Αταξία με”: VSSP, δυστονία; γνωσιακή έκπτωση; άτυπες ψυχιατρικές διαταραχές; αυξημένα πελματιαία αντανακλαστικά; νοητική υστέρηση Αταξία χωρίς νευροπάθεια Άγνωστης αιτιολογίας
Νοητική υστέρηση/αναπτυξιακή καθυστέρηση	Σπλαχνικά σημεία, π.χ., (ηπατο-)σπληνομεγαλία Ήπια κινητική διαταραχή (αταξία/δυστονία), VSSP
Γνωσιακή έκπτωση/Πρώιμη άνοια	ηλικία ,40, νευρολογική συμπτωματολογία (π.χ., αταξία, VSSP, δυστονία)
Δυστονία	Γενικευμένη ηλικία <40 “Δυστονία με”: VSSP, γνωσιακή έκπτωση, ή ψυχιατρικές διαταραχές σε ηλικία <40
Μετωποκροταφική άνοια	Ανθεκτική στη θεραπεία
Ατυπη σχιζοφρένεια/Πρώιμη έναρξη ψυχώσεων	Νευρολογικά σημεία (π.χ., αταξία, VSSP, δυστονία) Οργανικά σημεία: οπτικές ψευδαισθήσεις, συνοδή γνωσιακή έκπτωση Βρεφική σπληνομεγαλία ή χολόσταση ή ηπατοσπληνομεγαλία ή
Σπλαχνικά συμπτώματα σε παιδιατρικούς ασθενείς	εμβρυϊκός/νεογνικός ασκίτης και νευρολογικά σημεία (π.χ., αταξία, VSSP, δυστονία)

VSSP: κάθετη υπερπυρηνική παράλυση σακκαδικών κινήσεων

Πίνακας 2: Κλινικές ομάδες ασθενών με αυξημένο κίνδυνο για τη νόσο NPC (Marc C. Patterson, 2017)

Το εύρος της κλινικής ετερογένειας της νόσου, ιδίως στην έναρξή της, έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να αξιολογούνται για πρώτη φορά από ιατρούς διαφόρων ειδικοτήτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη αναγκαιότητα της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπευτικής παρέμβασης οδήγησε στην ανάπτυξη από ομάδα επιστημόνων ενός αλγορίθμου ανίχνευσης ασθενών (άνω των τεσσάρων ετών) με κλινική υποψία για τη νόσο NPC (Εικόνα 7), που χρήζουν περαιτέρω εργαστηριακής διερεύνησης. Ο αλγόριθμος αυτός είναι εύχρηστος και συνιστά ένα εργαλείο αρχικής διαλογής, που απευθύνεται σε κλινικούς ιατρούς όλων των ειδικοτήτων με μικρή εμπειρία σχετικά με τη νόσο. Για κάθε σύμπτωμα προσδιορίστηκε μια βαθμολογία πρόβλεψης κινδύνου, με βάση τη δύναμη διάκρισης μεταξύ ασθενών

με τη νόσο NPC και αυτών χωρίς. Έτσι λοιπόν, ασθενείς με βαθμολογία ≥ 70 θεωρούνται ως υψηλού κινδύνου να νοσούν και θα πρέπει να παραπέμπονται σε ειδικά κέντρα, ασθενείς που συγκεντρώνουν βαθμολογία 40-69 θεωρούνται μέτριου κινδύνου και συνίσταται παρακολούθηση και επικοινωνία με ειδικό κέντρο, ενώ βαθμολογία < 40 υποδεικνύει μικρή πιθανότητα ύπαρξης της νόσου (Wijburg et al., 2012, Wraith et al., 2014). Η διακριτική ικανότητα πρόβλεψης των ασθενών βελτιώθηκε στη συνέχεια με την ενσωμάτωση της συνδυαστικής παρουσίας συμπτωμάτων και σημείων, που θεωρούνται ειδικότερος δείκτης της νόσου (Christian J Hendriks, 2015a). Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε ένας νέος αλγόριθμος κλινικής υποψίας, που αξιολογεί ασθενείς κάτω των τεσσάρων ετών (Pineda et al., 2016) (<http://www.npc-si.com/tools/>). Σημειώνεται ότι το εργαλείο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται εφόσον έχουν αποκλειστεί άλλα κοινά νοσήματα (3.5.1β) και λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλή ευαισθησία σε ασθενείς με λίγες ή άτυπες εκδηλώσεις (Allobaidy, 2015).

Indicators	Signs and symptoms					
	Visceral		Neurological		Psychiatric	
		Score		Score		Score
Very strong 40 points per item			• Vertical supranuclear gaze palsy • Gelastic cataplexy	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Strong 20 points per item	• Prolonged unexplained neonatal jaundice or cholestasis • Isolated unexplained splenomegaly (historical and/or current) with/without hepatomegaly	<input type="checkbox"/>			• Pre-senile cognitive decline and/or dementia	<input type="checkbox"/>
Moderate 10 points per item			• Ataxia, clumsiness or frequent falls • Dysarthria and/or dysphagia • Dystonia	<input type="checkbox"/>	• Psychotic symptoms (hallucinations, delusions and/or thought disorder)	<input type="checkbox"/>
Weak 5 points per item			• Acquired and progressive spasticity	<input type="checkbox"/>	• Treatment-resistant psychiatric symptoms • Other psychiatric disorders	<input type="checkbox"/>
Ancillary 1 point per item	• Hydrops fetalis • Siblings with fetal ascites	<input type="checkbox"/>	• Hypotonia • Delayed developmental milestones • Seizure (partial or generalised) • Myoclonus	<input type="checkbox"/>	• Disruptive or aggressive behaviour in adolescence and childhood	<input type="checkbox"/>

Category scores	<input type="text"/>	+	<input type="text"/>	+	<input type="text"/>
Category combination 40 points: visceral & psychiatric 40 points: visceral & neurological 20 points: neurological & psychiatric	Visceral & psychiatric <input type="text"/>	+	Visceral & neurological <input type="text"/>	+	Neurological & psychiatric <input type="text"/>
NP-C family relationship 40 points: parent/sibling 10 points: cousin	Parent or sibling with NP-C <input type="text"/>	+	Cousin with NP-C <input type="text"/>		
Risk Prediction Score	<input type="text"/> = sum of scores				

Εικόνα 7: Αλγόριθμος υποψίας της νόσου NPC. Τα συμπτώματα βαθμολογούνται ανάλογα με τη πιθανότητα συσχέτιση τους με θετική διάγνωση για τη νόσο. Ο συνδυασμός των συμπτωμάτων και το οικογενειακό ιστορικό προσδιορίζουν την τελική προγνωστική βαθμολογία για τη νόσο NPC. (Patterson et al. *Mol Genet Metab*_2012)

3.5.1β Διαφορική διάγνωση

Δεδομένου της κλινικής ετερογένειας και του ευρέος ηλικιακού φάσματος, η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει πλήθος νοσημάτων. Ωστόσο, η κατάταξη ανάλογα με την ηλικία και τα προεξάρχοντα συμπτώματα περιορίζει τον αριθμό αυτόν (Πίνακας 3).

Ηλικιακή Ομάδα	Συμπτώματα/Κλινικά σημεία	Συνήθη διαφορική διάγνωση
Προ/περιγεννητική περίοδος	Εμβρυϊκός ύδρωπας	Χρωμοσωμικές ανωμαλίες Συγγενή καρδιακή ανεπάρκεια Αιμοσφαιρινοπάθειες Συγγενής λοιμώξεις
	Παρατεινόμενος νεογνικός χολοστατικός ίκτερος	Ιδιοπαθής νεογνική ηπατίτιδα Ατρησία χοληφόρων/γαλακτοζαμία Ανεπάρκεια α1-αντιθρυπίνης Κυστική ίνωση, τυροσιναιμία τύπου I Νόσος Byler Υπεροξεισωματικές διαταραχές
Πρώιμη βρεφική (3μηνών-<2ετών) και όψιμη βρεφική/νηπιακή περίοδος (2-6ετών)	Μεμονωμένη Σπληνομεγαλία ή ηπατοσπληνομεγαλία	Μουκοπολυσακχαριδώσεις Ολυσασχαριδώσεις, σφιγγολιπιδώσεις (Gaucher, Niemann-Pick type A/B) Νόσοι άθροισης λιπιδίων (v. Wolman) Γλυκογονιάσεις
	Δυστονία	Διαταραχές της αναπνευστική αλύσου Ανεπάρκεια της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, ανεπάρκεια της βιταμίνης E Ανεπάρκεια του μεταφορέα της γλυκόζης 1 Ομοκυστεϊνουρία, v. Wilson Διαταραχές του κύκλου της ουρία Οργανική οξυουρία Μιτοχονδριακές διαταραχές
Νεανική περίοδος (6-15ετών)	Αταξία	Αταξία Friedreich's, αυτοσωμική υπολειπόμενη παρεγκεφαλική αταξία Προδευτική υπερπυρηνική παράλυση Πολυσυστηματική ατροφία Άνοια με σωματία Lewy
	Κάθετη Υπερπυρηνική Παράλυση Βλέμματος	Εγκεφαλοπάθεια Wernicke Επικρατητικές κληρονομικές αταξίες (SCA), v. Tay-Sachs, v. Wilson, ανεπάρκεια B12 v. Huntington v. Creutzfeldt Jakob
Εφηβική περίοδος (>15ετών)	Γελαστική Καταπληξία	Γελαστική επιληψία Ναρκοληψία
	Ψυχώσεις	Υστερία, Σχιζοφρένεια, v. Wilson Διαταραχές του κύκλου της ουρίας Οξεία ενδιάμεση πορφύρα Εγκεφαλοτενοντια ξανθομάτωση Ομοκυστινουρία

SCA: Spinocerebellar Ataxia

Πίνακας 3: Συνήθης διαφορική διάγνωση προσαρμοσμένη στα κυρίαρχα συμπτώματα της NPC για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες (Προσαρμοσμένο από Alobaidy et al *Int J Pediatr*, 2015)

3.5.2 Εργαστηριακή διερεύνηση

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος τόσο στον τομέα της φασματομετρίας, - επιτρέποντας την αναγνώριση διαφόρων υποψήφιων βιοδεικτών για τη νόσο NPC-, όσο και στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Έτσι τροποποιήθηκε σημαντικά η στρατηγική της εργαστηριακής προσέγγισης των NPC ασθενών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, η γνώση των οποίων είναι απαραίτητα για την επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού εξετάσεων. Έτσι, δύναται να επιτευχθεί η σωστή και έγκαιρη διάγνωση σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών.

3.5.2a Βιοχημικές αναλύσεις-βιοδείκτες

- i. Ο έλεγχος ρουτίνας συνήθως αποβαίνει φυσιολογικός σε ασθενείς που δεν παρουσιάζουν υπερσπληνισμό ή χολοστατική ηπατική νόσο. Ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθούν μειωμένα επίπεδα HDL στον ορό και γενικότερα ένα λιπιδαιμικό προφίλ ανάλογο της βλάβης (Vanier, 2010).
- ii. Η δραστηριότητα της όξινης σφινγγομυελινάσης είναι φυσιολογική ή αυξημένη στα λευκοκύτταρα, στοιχείο καθοριστικό στη διαφοροδιάγνωση του τύπου C από τους τύπους A και B.
- iii. Η μέτρηση της δραστηριότητας της χιτοτριοδάσης στο πλάσμα αποτέλεσε στο παρελθόν τη μοναδική προσέγγιση διαλογής των ασθενών. Πρόκειται, για μία ενδο-β-γλυκοσαμινιδάση που διαφοροποιείται από τη λυσοζύμη και εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών με NPC και ανευρίσκεται συνηθέστερα στη σπλαχνική νόσο (Imrie and Wraith, 2001), , ενώ δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της νευρολογικής εξέλιξης. Εντούτοις, δεν αποκλείεται η ανεύρεση φυσιολογικής τιμής σε NPC ασθενείς. Επιπλέον, αυξάνεται σημαντικά σε διάφορες διαταραχές αποθήκευσης των

λυσοσωμάτων (Guo et al., 1995), αλλά και σε συνήθεις νόσους όπως τα εγκεφαλικά έμφρακτα και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (Vanier et al., 2016). Ένα ποσοστό περίπου 10% του γενικού πληθυσμού παρουσιάζει μερική ή ολική ανεπάρκεια της χιτοτριοσίδασης λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που τη κωδικοποιεί (Ries et al., 2006). Συνεπώς, παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία και ειδικότητα για τη νόσο NPC. Έτσι, για την ερμηνεία του αποτελέσματος θα πρέπει να συνεκτιμάται η κλινική εικόνα και η λοιπή εργαστηριακή διερεύνηση (McKay Bounford and Gissen, 2014).

- iv. Ήδη έχουμε αναφερθεί στο ρόλο του οξειδωτικού stress στην παθοφυσιολογία της νόσου. Παράλληλα λοιπόν με τη συσσώρευση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης, παρατηρείται η δευτερογενής αύξηση οξειδωτικών παραγώγων. Αν και ο ακριβής μηχανισμός παραγωγής και δράσης των οξυστερολών στη νόσο δεν είναι σαφής, θεωρείται ότι παράγονται με μη ενζυματικό τρόπο από την αλληλεπίδραση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου με τη χοληστερόλη. Διάφορες οξυστερόλες έχουν βρεθεί αυξημένες σε ιστούς, στα μακροφάγα, αλλά και στον ορό πειραματόζωων και ασθενών με NPC (Zhang et al., 2008, Porter et al., 2010, Zampieri et al., 2009, Boenzi et al., 2014, Reunert et al., 2015). Πλήθος μελετών υποδεικνύει αυξημένες τιμές των οξυστερολών σε ασθενείς με μεταλλάξεις είτε στο *NPC1* είτε στο *NPC2* γονίδιο, με υψηλή ικανότητα διάκρισης των ασθενών-μαρτύρων (ανασκόπηση (Vanier et al., 2016)). Οι σημαντικότερες εξ αυτών είναι η 7-κετοχοληστερόλη (7-KC), η 7β-υδροχοληστερόλη (7β-HC) και η χολεσταν-3β,5α,6β-τριόλη (3β,5α,6β-triol), με την τελευταία να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία. Επιπλέον, τόσο στον εγκέφαλο όσο και στο πλάσμα των NPC ασθενών έχουν παρατηρηθεί μειωμένα επίπεδα της ενζυματικά (CYP46A1) παραγόμενης 24(S)-υδροξυχοληστερόλης, η οποία φαίνεται να ανακλά την ομοιόσταση της χοληστερόλης στον εγκέφαλο (Tortelli et al., 2014). Τα επίπεδα των οξυστερολών στο πλάσμα έχουν συσχετιστεί – αν και ασθενώς- με την ηλικία έναρξης, τη σοβαρότητα της νευρολογικής συμπτωματολογίας

αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπευτική παρέμβαση (Porter et al., 2010, Pajares et al., 2015, Tortelli et al., 2014). Εντούτοις, παρά την υψηλή ευαισθησία των δεικτών, η ειδικότητα είναι περιορισμένη με υψηλά επίπεδα οξυστερολών να ανευρίσκονται και σε φορείς της νόσου, αλλά και σε διάφορα νοσήματα συμπεριλαμβανομένου των νοσημάτων Niemann-Pick τύπου A και B (Klinke et al., 2015, Lin et al., 2014, Porter et al., 2010, Vanier et al., 2016, Papandreou and Gissen, 2016). Επιπλέον, οι αναλύσεις υλοποιούνται σε περιορισμένο αριθμό εργαστηρίων, ενώ είναι τα δείγματα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε διάφορους παράγοντες που αφορούν στη λήψη, μεταφορά και προετοιμασία προς ανάλυση (Helmschrodt et al., 2014). Η χρησιμότητα, όμως, των δεικτών αυτών ως αρχική μέθοδο εργαστηριακής διάγνωσης επί υποψίας της νόσου είναι αναμφισβήτητη δεδομένου της μη παρεμβατικής τους φύσης, της υψηλής τους ευαισθησίας, του σχετικά χαμηλού κόστους και του γρήγορου αποτελέσματος. Ήδη έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαλογή ασθενών, μόνες η σε συνδυασμό με άλλη μέθοδο, σε μεγάλες σειρές με θετικά αποτελέσματα (Reunert et al., 2016, Zhang et al., 2014).

- v. Τα λυσσοφιγγολιπίδια, θεωρούνται τοξικοί μεταβολίτες που συμβάλλουν στη παθοφυσιολογία της νόσου και ανευρίσκονται αυξημένα σε διάφορες σφιγγολιπιδώσεις (Lloyd-Evans and Platt, 2010). Πρόσφατα, ανευρέθηκαν υψηλές τιμές της λυσσοφιγγομυελίνης (SPC) και της γλυκοσφιγγοσίνης (GlcSph) σε ασθενείς με NPC (Welford et al., 2014, Giese et al., 2015). Σύμφωνα με δημοσιευμένη μελέτη η SPC παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στη διάκριση NPC ασθενών που δεν έχουν λάβει αγωγή από μάρτυρες, ανεξαρτήτου ηλικίας (Welford et al., 2014). Μάλιστα, πιο πρόσφατη μελέτη, υποδεικνύει τη λυσσοφιγγομυελινη-509 αποτελεσματικότερη από τη SPC στη διάκριση NPC ασθενών από μάρτυρες και φορείς της νόσου (Giese et al., 2015). Συνεπώς, τα λυσσοφιγγολιπίδια αποτελούν σημαντικούς εν δυνάμει βιοδείκτες για τη νόσο.

- vi. Μεταβολίτες χολικών οξέων στα ούρα: υψηλές συγκεντρώσεις του 3βeta-sulfooxy-7βeta-N-acetylglucosaminyl-5-cholen-24-oic οξέως (SNAG-Δ5-CA) και των συζυγών μορφών του (αμίδια γλυκίνης και ταυρίνης) (SNAG-Δ5-CG and SNAG-Δ5-CT) έχουν προσδιοριστεί σε NPC ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (Maekawa et al., 2013, Alvelius et al., 2001). Παράλληλα, το λυσοδιφωσφατιδικό οξύ (BMP ή LBPA), δείκτης φωσφολιπίδωσης επαγόμενης από τα φάρμακα, ανιχνεύεται επίσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις στα ούρα ασθενών σε σύγκριση με μάρτυρες (Liu et al., 2014). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τη 3β,5α,6β-τριυδροξυ-χολανολ-γλυκίνη ως δείκτη με μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την χολεσταν-3β,5α,6β-τριόλη (3β,5α,6β-triol) και με καλύτερη διακριτική ικανότητα μεταξύ φορέων και ασθενών. Σύμφωνα με τα ως τώρα δεδομένα, τα επίπεδά της παρουσιάζονται αυξημένα μόνο στους τύπους NP-A και B. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι η ανάλυση μπορεί να γίνει σε αποξηραμένες κηλίδες αίματος, στο πλάσμα και στα ούρα, ενώ δεν υπόκειται σε αυτοοξειδωση (Jiang et al., 2016, Mazzacuva et al., 2016).
- vii. Η CCL18, μία χυμοκίνη, η Thymus and activation-regulated chemokine (TARC), αναδείχθηκε ως πιθανός δείκτης για την παρακολούθηση συμπτωματικών ασθενών με νόσο Gaucher. Ωστόσο, θα πρέπει να εκπονηθούν περαιτέρω μελέτες για την ενδεχόμενη χρησιμότητά της στη νόσο NPC (Pineda et al., 2010, De Castro-Oros et al., 2017).

3.5.2β Ιστολογικές Μελέτες

- I. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η βιοψία ήπατος, η βιοψία του μυελού των οστών και η χρώση με φιλλιπίνη επιχρίσματος αυτού. Στις μελέτες αυτές αναδεικνύονται παθολογικά στοιχεία της νόσου, όπως πολυμορφικά κυτοπλασματικά σωματίδια στη βιοψία ήπατος και αφρώδη κύτταρα με ισχυρά θετική χρώση filipin αλλά και sea-blue ιστιοκύτταρα στη βιοψία του μυελού των οστών. Η χρησιμότητα τους όμως είναι περιορισμένη καθώς παρουσιάζουν

χαμηλή ευαισθησία τη τάξεως του 36% και 57% αντιστοίχως, ενώ αποτελούν επεμβατικές μεθόδους (Rodrigues et al., 2006). Σήμερα, δεδομένου της προόδου της μοριακής βιολογίας, οι διαγνωστικές αυτές μέθοδοι αποφεύγονται.

II. Δοκιμασία χρώσης φιλιπίνης (και λειτουργική δοκιμασία εστεροποίησης της χοληστερόλης)

Παραδοσιακά και για μεγάλη χρονική περίοδο αποτελούσε το “gold standard” της διαγνωστικής προσέγγισης. Πρόκειται για μία βιοχημική δοκιμασία, η οποία περιλαμβάνει την καλλιέργεια ινοβλαστών -από βιοψία δέρματος- σε μέσο εμπλουτισμένο με LDL, τη μονιμοποίηση, τη χρώση με filipin -ουσία που σχηματίζει συμπλέγματα με τη μη εστεροποιημένη χοληστερόλη- και στη συνέχεια τη μικροσκόπηση φθορισμού, όπου προσδιορίζεται η ενδοκυττάρια συσσωρευμένη χοληστερόλη (Vanier et al., 1991). Η δοκιμασία filipin λοιπόν, χρησιμοποιείται για να καταδείξει τη συσσώρευση της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης σε περιπυρηνικά κυστίδια (θετική χρώση φιλιπίνης). Σε φυσιολογικούς ινοβλάστες λιγότερο από το 10% των κυττάρων παρουσιάζει θετική χρώση. Ο «κλασσικός» ή «ενδιάμεσος» βιοχημικός φαινότυπος είναι παρών στο 80-85% των NPC ασθενών με το 80-100% των κυττάρων να έχουν θετική χρώση. Μόνο μία οντότητα παρουσιάζει παρόμοιο βιοχημικό προφίλ, η μουκολιπίδωση, με την κλινική της εικόνα ωστόσο να διαφοροποιείται σημαντικά. Συνεπώς, στη περίπτωση του κλασσικού-ενδιάμεσου βιοχημικού φαινοτύπου τίθεται η διάγνωση. Εν τούτοις, στο υπόλοιπο 15-20% των NPC ασθενών η εικόνα δεν είναι τυπική, με μικρότερο ποσοστό κυττάρων να παρουσιάζουν θετική χρώση («άτυπος» βιοχημικός φαινότυπος) (Patterson and Pentchev, 1994). Ο φαινότυπος αυτός μπορεί να ανευρίσκεται επίσης σε NPC ετεροζυγώτες, αλλά και σε άλλα νοσήματα, καθιστώντας τη διάγνωση επισφαλής (Vanier and Latour, 2015). Επιπλέον, πρόκειται για μια επεμβατική, χρονοβόρα και ιδιαίτερα απαιτητική εργαστηριακά μέθοδο, που διενεργείται σε συγκεκριμένα κέντρα. Σήμερα, με τη πρόοδο στον τομέα της γενετικής και της

φασματοσκοπίας, η χρήση της τείνει να περιοριστεί σε διαγνωστικά περίπλοκες περιπτώσεις. Αναμφίβολα όμως, παραμένει ένα αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο και μία αποτελεσματική μέθοδο λειτουργικής μελέτης της παθογένειας των καινούριων NPC μεταλλάξεων (Vanier et al., 2016, Papandreou and Gissen, 2016).

Η δοκιμασία εστεροποίησης της χοληστερόλης βασίζεται στην παρατηρούμενη διαταραχή της μεταφοράς της χοληστερόλης από το Ω/Λ στο ενδοπλασματικό δίκτυο στα NPC κύτταρα. Πρόκειται για μία απαιτητική εργαστηριακά μέθοδο με μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τη δοκιμασία filipin, οπότε πλέον έχει εγκαταλειφτεί (Vanier et al., 2016).

3.5.2γ Μοριακός έλεγχος

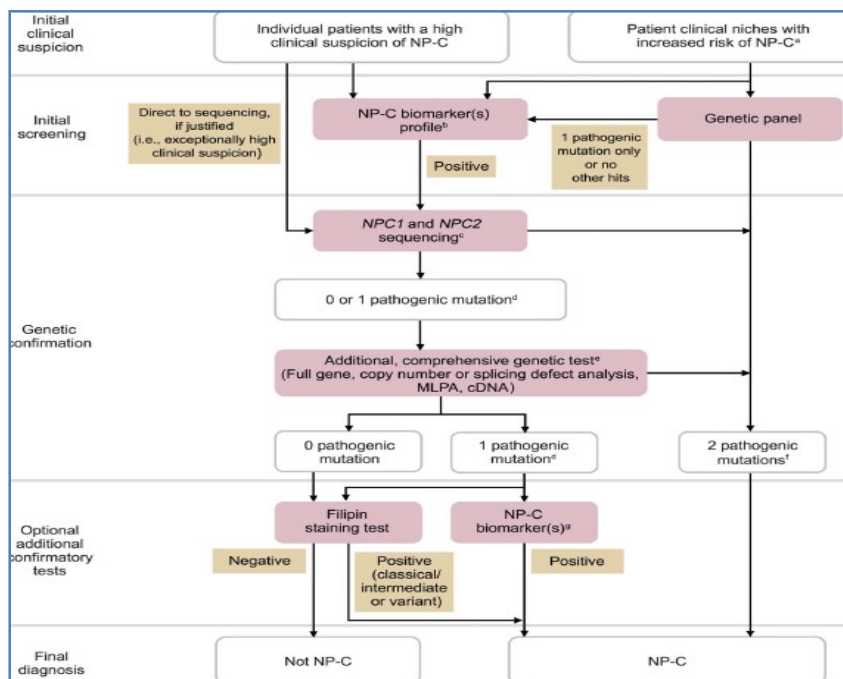
Η νόσος NPC ακολουθεί την αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και οφείλεται σε μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο *NPC1* (~95%) ή στο *NPC2* (~4%). Οι υπόλοιπες περιπτώσεις (~1%) αφορούν σε πάσχοντες με βιοχημικά ευρήματα ενδεικτικά της νόσου, στους οποίους ο γενετικός έλεγχος απέβη αρνητικός. Από την άλλη πλευρά, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις φορέων μεταλλάξεων με κλινική συμπτωματολογία (Cupidi et al., 2017). Το γονίδιο *NPC1* είναι μεγάλου μεγέθους και ιδιαίτερα πολυμορφικό με πάνω από 300 πολυμορφισμούς και ~400 μεταλλάξεις να έχουν περιγραφεί, ενώ ~23 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν δημοσιευτεί για το γονίδιο *NPC2* (Runz et al., 2008, McKay Bounford and Gissen, 2014, Marc C. Patterson, 2017). Στις μεταλλάξεις περιλαμβάνονται σημειακές αλλαγές (~70%), μεταθέσεις, απαλείψεις και μεταλλάξεις ματίσματος. Οι περισσότεροι ασθενείς μάλιστα είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες και πολύ εξ αυτών φέρουν νέες μεταλλάξεις. Περισσότερα στοιχεία, καθώς και οι μοριακοί μέθοδοι ανίχνευσης *NPC* μεταλλάξεων παρατίθενται στο Κεφάλαιο 4.

3.5.2δ Απεικονιστικές εξετάσεις

- I. Η μαγνητική και η αξονική τομογραφία εγκεφάλου (MRI/CT) είναι συνήθως φυσιολογικές μέχρι τα όψιμα στάδια και η απεικόνιση θεωρείται μη ειδική. Παρόλα αυτά, η εγκεφαλική ατροφία και συγκεκριμένα του ανώτερου/πρόσθιου παρεγκεφαλιδικού σκώληκα ή του μετωπιαίου φλοιού μπορεί να είναι παρούσα συνήθως σε ασθενείς με αργή εκφυλιστική νόσο. Σε πρόσφατη μελέτη μάλιστα, υποστηρίζεται ότι οι ακολουθίες διάχυσης, μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στη μικροδομή του εγκεφάλου που προκαλούνται από νευρομεταβολικές διαταραχές και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες της νόσου (Masingue et al., 2017). Άλλες διαταραχές μπορεί να περιλαμβάνουν λέπτυνση του μεσολοβίου και αυξημένο σήμα στην περικοιλιακή λευκή ουσία, που αντικατοπτρίζουν δευτεροπαθή απομυελίνωση (Wraith et al., 2009).
- II. Η μαγνητική φασματοσκοπία πρωτονίου (H-MRSI) είναι μια πιο ευαίσθητη και αντικειμενική τεχνική απεικόνισης στη νόσο NPC σε σχέση με τη κλασική MRI. Η H-MRSI παρέχει ποσοτικά δεδομένα επιτρέποντας την ταυτόχρονη μέτρηση της έντασης του σήματος του N-ακετυλ-ασπαρτικού οξέος (NA), των ουσιών που περιέχουν χολίνη (Cho), της κρεατίνης με φωσφοκρεατίνη (Cre) και του γαλακτικού οξέος (Lac) καθώς και την ταυτοποίηση των περιοχών ενδιαφέροντος. Σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο NPC ο λόγος NA/Cre είναι σημαντικά μειωμένος σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, ενώ σε άλλες ο λόγος Cho/Cre παρουσιάζεται αυξημένος (Tedeschi et al., 1998). Έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε μελέτες παρακολούθησης της θεραπείας σε ασθενείς με NPC με θετικά αποτελέσματα και έχει προταθεί ως ένας αντικειμενικός δείκτης ανταπόκρισης στη θεραπευτική παρέμβαση (Galanaud et al., 2009, Sedel et al., 2016), ωστόσο μένει να εξακριβωθεί η ευαισθησία της μεθόδου .

3.5.3 Διαγνωστικός Αλγόριθμος

Καταλήγοντας λοιπόν, η πολυπλοκότητα της κλινικής και εργαστηριακής διάγνωσης της νόσου είναι εμφανής. Βάσει των προαναφερθέντων, έχουν προταθεί διάφοροι διαγνωστικοί αλγόριθμοι (Patterson et al., 2012, Papandreou and Gissen, 2016). Παρακάτω παρατίθεται ο προσφάτως αναθεωρημένος αλγόριθμος από ομάδα ειδικών (Εικόνα 8), ο οποίος συμπεριλαμβάνει τα νεότερα δεδομένα που αφορούν στη σημασία του ελέγχου α) όχι μόνο σε μεμονωμένους ασθενείς, αλλά και σε ομάδες ασθενών με αυξημένο κίνδυνο νόσησης (Πίνακας 2), β) στη διαθεσιμότητα επιπλέον διαγνωστικών βιοδεικτών και γ) στην πρόοδο στον τομέα της μοριακής γενετικής. Σε πρώτη φάση προτείνει τον γενετικό έλεγχο και την ανάλυση των βιοχημικών δεικτών, καθώς επί θετικού αποτελέσματος τίθεται η διάγνωση της νόσου. Πλέον, επί ασαφών μόνο ευρημάτων, προτείνονται άλλες δοκιμασίες, όπως η δοκιμασία φιλιπίνης. Σημειώνεται βέβαια, ότι η εφαρμογή του διαγνωστικού αλγορίθμου, τροποποιείται ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των μεθόδων στις διάφορες χώρες (Marc C. Patterson, 2017).



Εικόνα 8: Προτεινόμενος διαγνωστικός αλγόριθμος για τη νόσο Niemann-Pick Type C At-risk patient: αναφέρονται στο Πίνακα 2. cDNA: complementary DNA; MLPA:multiplex ligation-dependent probe amplification (Marc C. Patterson, 2017).

3.6 Θεραπεία

3.6.1 Γενική Συμπτωματική Αγωγή

Η θεραπευτική προσέγγιση εστιάζει στην καθυστέρηση της εμφάνισης και αναχαίτισης της προοδευτικής νευροεκφύλισης, ελλείπει θεραπειών που μπορούν να προσφέρουν ίαση. Παράλληλα, προϋποθέτει την έγκαιρη-πρώιμη διάγνωση της νόσου και την ολιστική παρέμβαση από ομάδα θεραπόντων διαφορετικών ειδικοτήτων. Λόγω της σπανιότητας και της πολυπλοκότητας της νόσου προτείνεται η παρακολούθηση των ασθενών από εξειδικευμένα κέντρα με την απαραίτητη εμπειρία στη νόσο, αλλά και τη διαθεσιμότητα διαφόρων τεχνικών μέσων. Μέχρι πρόσφατα η θεραπευτική προσέγγιση περιοριζόταν στη συμπτωματική αντιμετώπιση των κλινικών εκδηλώσεων και επιπλοκών, όπως αυτή παρουσιάζεται στον Πίνακα 4 (Alobaidy, 2015).

Είδος θεραπευτικής παρέμβασης	
I. Συμπτωματική αγωγή	
Δυσκοιλιότητα	Διατροφή για την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας και της θρέψης
Δυσφαγία	Γαστροστομία
Έντονη σιελόρροια	Ατροπίνη <i>peros</i>
Διάρροιες λόγω της μιγλουστάτης	Αντιδιαρροϊκή αγωγή, μείωση της διατροφικής πρόσληψης σουκρόζης, μαλτόζης και λακτόζης
Επιληπτικοί σπασμοί	Αντιεπιληπτική αγωγή
Καταπληξία	Αντικαταθλιπτικά ή διεγέρτες του ΚΝΣ
Δυστονία	Αντιχολινεργικά φάρμακα, τριεξυφαινιδύλη βενζοδιαζεπίνες, γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)
Αϋπνία	Μελατονίνη
Πνευμονικές λοιμώξεις	Φυσιοθεραπεία, βρογχοδιαστολή και αντιμικροβιακή αγωγή
Υπνική άπνοια	Αερισμός θετικής πίεσης
Σπαστικότητα	Φυσιοθεραπεία
Διαταραχές συμπεριφοράς, ομιλίας ή μαθησιακές δυσκολίες	Παραπομπή σε ψυχιατρική ομάδα και ειδικό παιδαγωγό
II. Ειδική αγωγή για τη νόσο	Μιγλουστάτη (Zavesca) Μεταμόσχευση ιστών ή οργάνων (μυελός των οστών, ήπαρ, και αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα)
III. Νέες θεραπείες υπό μελέτη	Αναστολείς της αποκετυλάσης των ιστονών 2-υδροξυ-β-κυκλοδεξτρίνη Ακετυλο-DL-λευκίνη Αντιλιπιδαιμική αγωγή Κουρκουμίνη Arimoclomol

Πίνακας 4: Συμπτωματική αντιμετώπιση κλινικών εκδηλώσεων και επιπλοκών της νόσου NPC

3.6.2 Ειδική θεραπεία

3.6.2α Θεραπεία μείωσης υποστρώματος (μιγλουστάτη)

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στον τομέα της ειδικής θεραπείας, που στοχεύει σε επιμέρους σημεία της παθοφυσιολογίας της νόσου. Επί του παρόντος, υπάρχει στοχευμένη θεραπεία ελάττωσης του υποστρώματος, που αν και δεν προσφέρει ίαση, τροποποιεί θετικά την κλινική νευρολογική έκβαση της νόσου. Πρόκειται για τη φαρμακευτική ουσία *N*-butyl-deoxyojirimycin (μιγλουστάτη), η οποία αποτελεί έναν αντιστρεπτό αναστολέα της γλυκοζυλοκεραμιδικής συνθετάσης, ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο βιοσύνθεσης των γλυκοσφιγγολιπιδίων, οδηγώντας σε μειωμένη ενδοκυττάρια συσσώρευσή τους. Ένας δεύτερος πιθανός μηχανισμός δράσης του φαρμάκου είναι η δευτερογενής μείωση της απελευθέρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, διεργασία η οποία φαίνεται να συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου (Lloyd-Evans et al., 2003b, Lloyd-Evans et al., 2003a). Το μόριο αυτό χορηγείται από το στόμα, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και προκαλεί μερική αναστολή του ενζύμου, επιτρέποντας τη διατήρηση της βιοσυνθετικής λειτουργίας χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η ανάπτυξη (Santos et al., 2008). Το φαρμακευτικό αυτό σκεύασμα είναι ασφαλές και σε γενικές γραμμές καλώς ανεκτό. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες του περιλαμβάνονται κυρίως γαστρεντερικές διαταραχές, όπως διαρροϊκές κενώσεις, ναυτία, τεινεσμός, άτυπες κοιλιακές ενοχλήσεις και έμετοι. Αυτές προκαλούνται από την αναστολή ενζύμων διάσπασης των δι-σακχαριτών, με επακόλουθο την δυσαπορρόφηση υδατανθράκων, την ωσμωτική διάρροια και τη διαταραχή της εντερικής χλωρίδας (Brand et al., 2015). Εμφανίζονται μέχρι και στο 80% των ασθενών στην αρχή της αγωγής (Remenova et al., 2015) και αποτελεί το συχνότερο αίτιο διακοπής της (Hollak et al., 2009, Belmatoug et al., 2011). Ωστόσο, φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου, τα συμπτώματα αυτά υποχωρούν, ενώ η έναρξη της αγωγής με χαμηλότερα αρχικά δόσεις, διατροφή με περιορισμό της κατανάλωσης σουκρόζης, μαλτόζης και λακτόζης, αλλά και χορήγηση προβιοτικών (Remenova et al., 2015) αμβλύνουν τις εκδηλώσεις.

Αρχικά, η μιγλουστάτη (*Zavesca*) εγκρίθηκε για την θεραπεία της ενήλικης μορφής της νόσου Gaucher, ενώ τον Ιανουάριο του 2009 το φάρμακο εγκρίθηκε από τον ευρωπαϊκό φορέα για τη θεραπεία των νευρολογικών εκδηλώσεων της νόσου NPC. Αποτελεί τη μόνη εγκεκριμένη θεραπεία στην Ευρώπη και σε άλλες χώρες, αλλά όχι στις ΗΠΑ (Patterson et al., 2012). Ένδειξη για θεραπεία με μιγλουστάτη έχουν οι πάσχοντες από τη νόσο -παιδιά και ενήλικες-, άμεσα με την έναρξη των νευρολογικών ή νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων, καθώς η αγωγή επιδρά στη νευρολογική και όχι στη σπλαχνική νόσο. Δεδομένα από κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μιγλουστάτη δεν εμποδίζει, αλλά μπορεί τουλάχιστον να σταθεροποιήσει ή τουλάχιστον να επιβραδύνει την εξέλιξη ορισμένων νευρολογικών εκδηλώσεων, ιδιαίτερα στις μορφές με αργότερη εμφάνιση της νευρολογικής συμπτωματολογίας (εφηβική μορφή/ενήλικες) (Heron et al., 2012, Fecarotta et al., 2015a, Patterson et al., 2015, Walterfang et al., 2012, Pineda et al., 2010). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί προστατευτική επίδραση στις παρεγκεφαλιδικές και υποφλοιώδεις δομές του εγκεφάλου (Bowman et al., 2015, Masingue et al., 2017), αλλά και βελτίωση του λόγου Cho/Cr στην MRS εγκεφάλου (Sedel et al., 2016), μετά από αγωγή με μιγλουστάτη.

Εντούτοις, τα δεδομένα της μακροχρόνιας παρακολούθησης της επίδρασης της αγωγής στους NPC ασθενείς είναι σποραδικά. Επιπλέον, η ουσία αυτή δεν φαίνεται να έχει ουσιαστική επίδραση στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, η οποία θεωρείται πλέον πρωταρχικό και κεντρικό σημείο στον παθοφυσιολογικό καταρράκτη της νόσου. Έτσι λοιπόν, τα τελευταία χρόνια διεξάγεται σημαντικός αριθμός μελετών στο τομέα της θεραπείας, στοχεύοντας σε διαφορετικές πτυχές της παθογένειας.

3.6.2β Μεταμόσχευση ιστών και οργάνων

Μεταμόσχευση μυελού των οστών και ήπατος μπορούν να είναι αποτελεσματικές, αν και κατά τη φυσική πορεία της νόσου αμβλύνεται η ηπατοσπληνομεγαλία και η διήθηση των πνευμόνων, ενώ η παρέμβαση αυτή δεν φαίνεται να επιδρά στη νευρολογική νόσο. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη NPC1, η NPC2 πρωτεΐνη εκκρίνεται και επαναπροσλαμβάνεται από τα κύτταρα. Έτσι, ενθαρρυντικά

αποτελέσματα προκύπτουν από την μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στα πρώιμα στάδια της νόσου σε NPC2 ασθενείς (Patterson et al., 2012, Verot et al., 2007), δεδομένα τα οποία θα πρέπει να διερευνηθούν σε περαιτέρω μελέτες.

3.6.2γ Αντιλιπιδαιμική αγωγή

Αναφορικά με την αντιλιπιδαιμική αγωγή, αυτή φαίνεται να αμβλύνει το φορτίο της χοληστερόλης στο ήπαρ, χωρίς ωστόσο να επιδρά στις νευρολογικές εκδηλώσεις (Madra and Sturley, 2010).

3.6.3 Αναπτυσσόμενες θεραπείες/κλινικές μελέτες

- I. Η 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη είναι ένας μικρός κυκλικός ολιγοσακχαρίτης με υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και υδρόφοβο κέντρο. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, φαίνεται ότι δεσμεύει στο εσωτερικό του τη χοληστερόλη με αποτέλεσμα να την κινητοποιεί από το σύμπλοκο ενδοσώματος/λυσοσώματος στο ενδοπλασματικό δίκτυο με δράση μάλιστα δόσοεξαρτώμενη (σε μεγαλύτερες δόσεις παρατηρείται κινητοποίηση και από την κυτταροπλασματική μεμβράνη) (Abi-Mosleh et al., 2009).

Κατόπιν θετικών αποτελεσμάτων σε μελέτες σε πειραματόζωα (Vite et al., 2015), έχει συσταθεί στις Η.Π.Α. ομάδα συνεργασίας μεταξύ επιστημόνων, φιλανθρωπικών οργανώσεων, δημοσίων φορέων, ενώσεων ασθενών με τη νόσο και φαρμακευτικών εταιρειών στα πλαίσια ειδικού προγράμματος για σπάνια νοσήματα (Ottinger et al., 2014). Μέσω της συνεργασίας αυτής πραγματοποιούνται από το καλοκαίρι του 2015 κλινικές δοκιμές (Φάσεις II & III) σε ασθενείς με NPC που αφορούν παιδιά ηλικίας 6-12 ετών. Επίσης, πρόσφατα ξεκίνησε η διενέργεια κλινικών δοκιμών (Φάση I&II) στην Ευρώπη, σε ασθενείς με NPC. Επιπρόσθετα, το φαρμακευτικό προϊόν «2-υδροξυπροπυλο-β-

κυκλοδεξτρίνη» (*2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin*) έχει χαρακτηριστεί ως ορφανό φάρμακο για τη νόσο NPC από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμάκων (EMA) και από το δίκτυο ορφανών φαρμάκων των Η.Π.Α και έχει χορηγηθεί σε αρκετούς ασθενείς παγκοσμίως στο πλαίσιο της *πρώιμης πρόσβασης-παρηγορητικής χρήσης* (Matsuo et al., 2013, Matsuo et al., 2014, Tanaka et al., 2015, Maarup et al., 2015). Η μέχρι σήμερα εμπειρία από την χορήγηση του φαρμάκου υποδεικνύει ότι σε πολλές περιπτώσεις είναι ικανό να ανακόψει την εκφυλιστική εξέλιξη της νόσου ή ακόμη και να βελτιώσει την κατάσταση της υγείας ασθενών που πάσχουν από NPC -κυρίως σε περιπτώσεις όπου η αγωγή ξεκινάει έγκαιρα-, ώστε να αποκομίζεται το βέλτιστο όφελος. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται και από τα πρώτα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης που δημοσιεύτηκαν πρόσφατα (Ory et al., 2017, Erickson and Fiorenza, 2017).

- II. Η ακετυλο-dl-λευκίνη (Acetyl-DL-leukine) είναι ένα τροποποιημένο αμινοξύ το οποίο χορηγήθηκε σε μία προοπτική ανοικτή μελέτη σε 12 ασθενείς ηλικίας 13-32 ετών, με θετική επίδραση στην παρεγκεφαλιδική συμπτωματολογία. Όσον αφορά στις ανεπιθύμητες ενέργειες, παροδική ζάλη παρουσίασε ένας ασθενής (Bremova et al., 2015).
- III. Οι αναστολείς της αποακετυλάσης των ιστονών (*Histone deacetylase inhibitors-HDAC*) φαίνεται να αυξάνουν την έκφραση της αλλοιωμένης NPC1 πρωτεΐνης (που παράγεται από NPC1 κύτταρα με παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις), να καθυστερούν την γρήγορη αποδόμηση των μεταλλαγμένων NPC1 πρωτεϊνών και να μειώνουν την ενδοκυττάρια συσσώρευση χοληστερόλης (Pipalia et al., 2011). Οι HDAC έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στη ψυχιατρική και στη νευρολογία ως σταθεροποιητικά φάρμακα. Η βορινοστάτη (vorinostat) χορηγείται από το στόμα, διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μελετάται σε ογκολογικούς ασθενείς (Helquist et al., 2013). Από τα μέσα του 2014 είναι σε εξέλιξη κλινική δοκιμή (φάση I/II) χορήγησης βορινοστάτης σε ασθενείς με NPC.

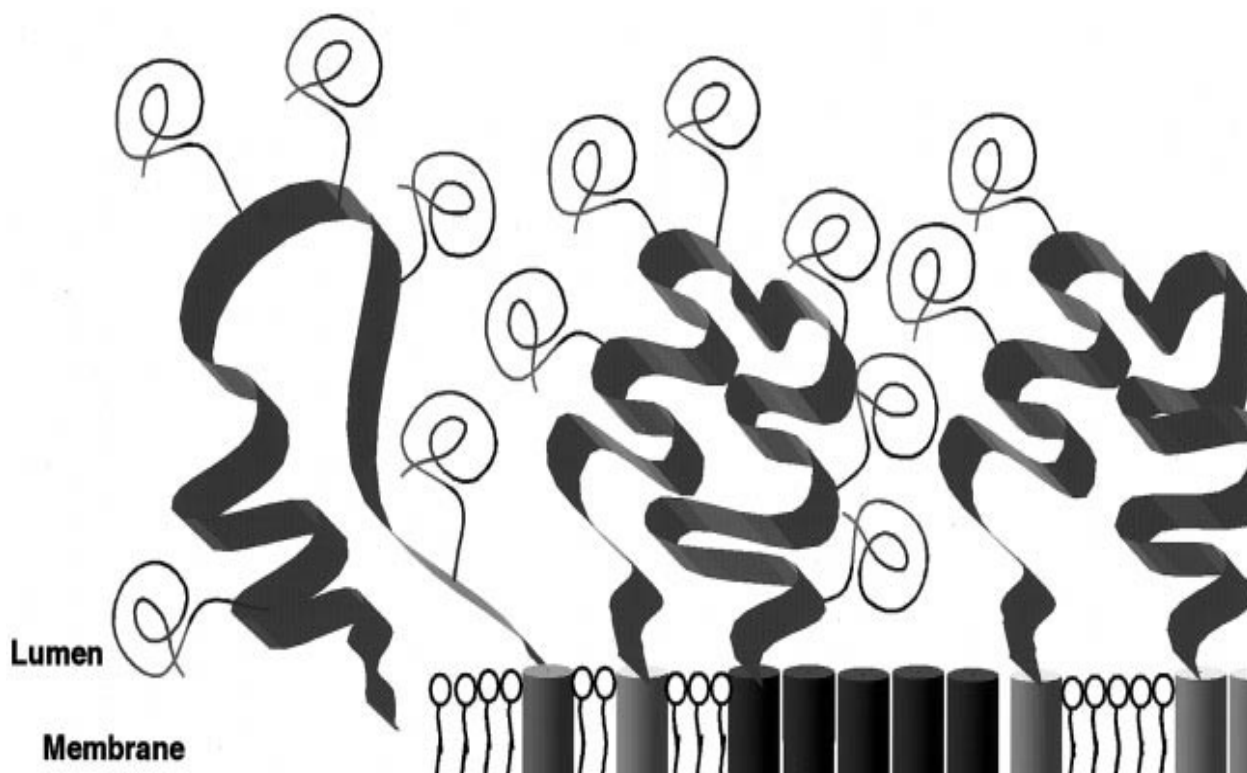
- IV. Η αριμοκλομόλη (arimoclomol) είναι μία πρωτεΐνη συν-επαγωγέας θερμικού σοκ 70/90. Η απάντηση θερμικού σοκ (heat shock response) συνιστά έναν ενδογενή μηχανισμό προστασίας των κυττάρων σε καταστάσεις stress. Προστατεύει τα κύτταρα από εκτενή καταστροφή και περιορίζει την παθολογική αναδίπλωση, τη συσσώρευση και την αποδόμηση των πρωτεϊνών. Η επαγωγή των πρωτεϊνών αυτών έχει φανεί ότι εξασθενεί την ενδοκυττάρια συσσώρευση της χοληστερόλης σε NPC κύτταρα (Ingemann and Kirkegaard, 2014). Επί του παρόντος, σχεδιάζεται κλινική μελέτη (φάση II/III) χορήγησης arimoclomol σε NPC ασθενείς (NCT02435030).
- V. Σύμφωνα με δημοσιευμένη μελέτη η κουρκουμίνη φέρεται να αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και να παρατείνει τη ζωή NPC ποντικών (Lloyd-Evans et al., 2008), εντούτοις άλλη μελέτη δεν υποστηρίζει την επίδραση της στη μεταβολή της νευρολογικής πορείας των πειραματόζωων (Borbon et al., 2012c). Επιπρόσθετα, διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες (βιταμίνη E, βιταμίνη C, N-ακετυλοκυστεΐνη) έχουν διερευνηθεί σε πειραματόζωα με μέτρια αποτελέσματα ως τώρα (Fu et al., 2013, Marin et al., 2014, Smith et al., 2009). Παρόλα αυτά, λόγω της χαμηλής τοξικότητας των ανωτέρω ουσιών χορηγούνται ως συμπληρωματικά βιταμινούχα σκευάσματα σε αρκετούς NPC ασθενείς.
- VI. Τέλος, με την ανάδειξη του ρόλου του οξειδωτικού stress στη παθογένεια της νόσου, παράλληλα με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών μελετάται ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη NPC τόσο στο επίπεδο της συμβολής τους στην παθογένεια, όσο και ως μέσο νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Torres et al., 2017).

4. Τα γονίδια NPC1-2 και οι παραγόμενες πρωτεΐνες

4.1 Δομή και λειτουργία των γονιδίων *NPC1* και 2.

Το γονίδιο *NPC1* εδράζεται στο χρωμόσωμα 18q11-q12 και χαρτογραφήθηκε το 1997 (Carstea et al., 1997). Πρόκειται για πολυμορφικό γονίδιο, μεγέθους (~57kb), που περιλαμβάνει 25 εξόνια (Carstea et al., 1993, Carstea et al., 1997, Morris et al., 1999, Bauer et al., 2002). Κωδικοποιεί μία γλυκοπρωτεΐνη [1278 αμινοξέα (aa), 1254 στην ώριμη πρωτεΐνη], η οποία έχει προταθεί ότι ανήκει στην οικογένεια των RND πρωτεϊνών (resistance-nobulation-cell division) (Gong et al., 2016). Περιλαμβάνει 13 διαμεμβρανικές περιοχές (Transmembrane helices TM), 3 διακριτούς τομείς στον ενδοκυττάριο χώρο του ώριμου ΩΛ/Ε [Α (N-terminal Domain, NTD): 24-264aa, C: 371-615aa και I (περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη-cysteine enriched loop): 855-1098aa], μία περιοχή ευαίσθητη στις στερόλες (Sterol-Sensitive-Domain, SSD: 615-797aa TMs 3-7) και ένα μοτίβο με δυο-λευκίνες στο C τελικό άκρο (στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου), το οποίο θεωρείται απαραίτητο για την αλληλεπίδραση και τη λειτουργία του ΩΛ/Ε (Poirier et al., 2013) (Εικόνα 9). Εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη των ώριμων ενδοσωμάτων και αλληλεπιδρά προσωρινά με τα λυσοσώματα και το trans-Golgi δίκτυο (Ioannou, 2000, Higgins et al., 1999, Scott and Ioannou, 2004, Davies and Ioannou, 2000). Στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (NTD) εμπεριέχεται μία θέση πρόσδεσης της χοληστερόλης (Xie et al., 2011), ενώ στην εξωκυττάρια περιοχή C απαντώνται οι περιοχές πρόσδεσης του *NPC2* (Deffieu and Pfeffer, 2011) και των γλυκοπρωτεϊνών των φιλο-ιών (filovirus) (π.χ. Ebola) (Gong et al., 2016). Ο τομέας SSD παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με τον αντίστοιχο τομέα διαφόρων πρωτεϊνών, όπως των HMG-CoA αναγωγάσης, SCAP, Patched και NPC1-like. Ο ακριβής του ρόλος παραμένει άγνωστος, αν και πιστεύεται ότι είναι απαραίτητος για την εύρυθμη λειτουργία της πρωτεΐνης (Vanier, 2010). Τέλος, η ακριβής λειτουργία της περιοχής πλούσιας σε κυστεΐνη δεν έχει επίσης διευκρινιστεί. Εντούτοις, αποτελεί έναν τομέα με υψηλή διατήρηση μεταξύ των διαφορετικών

ειδών και θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς σε αυτή εδράζεται το 1/3 των περιγραφέντων μεταλλάξεων (Millat et al., 2001b).



Εικόνα 9: Παρουσιάζεται σχηματικά η δομή της NPC1 πρωτεΐνης με 13 διαμεμβρανικές περιοχές (I-XIII), 3 διακριτούς τομείς στον εξωκυττάριο χώρο και ένα μοτίβο διλευκίνης στο C τελικό άκρο (LLNF) (Yiannis A. Ioannou 2000).

Όσον αφορά στο γονίδιο *NPC2*, κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη αρχικά γνωστή ως HEI (Naureckiene et al., 2000). Έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 14q24.3 και περιέχει 5 εξόνια. Κωδικοποιεί μία μικρή διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη (151aa, 132 στην ώριμη πρωτεΐνη), η οποία εκκρίνεται και επαναπροσλαμβάνεται από τα κύτταρα και εντοπίζεται στα λυσοσώματα και τα ώριμα ενδοσώματα. Η πρωτεΐνη αυτή μεταφέρεται στο λυσόσωμα μέσω του υποδοχέα της 6- φωσφορικής μαννόζης, όπου και συνδέεται με την χοληστερόλη με υψηλή συγγένεια. Μία περιοχή σύνδεσης της χοληστερόλης μέσω αλειφατικής ένωσης έχει τοπογραφηθεί, με τη μετάλλαξη p.S120P (ταυτοποιημένη σε ασθενή με νεανική μορφή της νόσου (Verot et al., 2007)) να έχει συμβάλλει ουσιαστικά στην επιβεβαίωση της λειτουργικής της σημασίας (Infante et al., 2008). Επιπλέον,

λειτουργικές αλλά και *in silico* μελέτες αναδεικνύουν και μία περιοχή μεταφορά της χοληστερόλης (αλλά και άλλων στερολών), με διάφορες θέσεις αμινοξέων να θεωρούνται καίριες (McCauliff et al., 2015, Wang et al., 2010, Roongavanam et al., 2016). Υποστηρίζεται επίσης, ότι η γρήγορη έξοδος της χοληστερόλης από το ΩΕ/Λ ευοδώνεται από τη λειτουργία και την αλληλεπίδραση με διάφορες θέσεις των ενδο-λυσωσομιακών μεμβρανών (McCauliff et al., 2015). Στον Πίνακα 5 που ακολουθεί, συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των γονιδίων *NPCI-2* και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν.

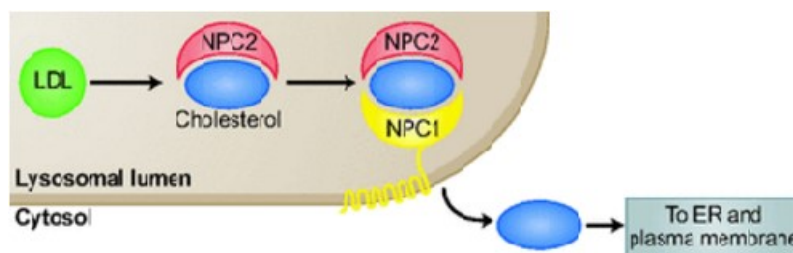
Γονίδιο	Χρωμόσωμα	a.a	Πρωτεΐνη	Ρόλος	Έκφραση	Μεταλλάξεις	Πολυμορφισμοί	Περιοχές πρωτεΐνης
<i>NPC-1</i>	18q11-q12	1278 (1254)	Δομική γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικών μεμβρανών	Διακίνηση και ομοιοστάση χοληστερόλης και άλλων λιπιδίων	Όλους ιστούς ↑ στο ήπαρ & στα όρνια ενδοσώματα	>400 Κυρίως σημειακές Σύνθετοι Ετεροζυγώτες 70%	>300 Συχνή εμφάνιση	<ul style="list-style-type: none"> • 3 διακριτούς τομείς στον εξοκυττάριο χώρο (NTD, C,I) • 13 διαμεμβρανικές (TM) • 6 μικρούς βράγχους στο κυτταρόπλασμα • μοτίβο διευκίνης στο C τελικό άκρο (LLNF) (κυτταρόπλασμα)
<i>NPC-2</i>	14q24.3	151 (131)	Διαλυτή γλυκοπρωτεΐνη		Λυσosώματα Επιδυμίδια (HEI)	~23 Κυρίως σημειακές	22	<ul style="list-style-type: none"> • Αναγνώρισης λιπιδίων • Σύνδεσης χοληστερόλης με υψηλή συγγένεια • Μεταφορά χοληστερόλης

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των γονιδίων *NPCI* και *NPC2*.

4.2 Το μοντέλο συνεργικής δράσης των πρωτεϊνών NPC1 και NPC2

Πλήθος μελετών σε πειραματικά μοντέλα και σε NPC ασθενείς, αλλά και μελέτες μοριακής βιολογίας και βιοχημείας αποδεικνύουν ότι μεταλλάξεις στα γονίδια *NPCI* και *NPC2*, οδηγούν στην ενδοκυττάρια συσσώρευση πανομοιότυπων λιπιδίων (Peake and Vance, 2010), αλλά και σε πανομοιότυπους κλινικούς φαινοτύπους, υπογραμμίζοντας ότι οι πρωτεΐνες δρουν διαδοχικά και

συνεργικά στην ενδοκυττάρια μεταφορά της χοληστερόλης (Vance, 2010). Αν και ο ακριβής ρόλος των γονιδίων αυτών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, το μοντέλο της συνεργικής δράσης (Εικόνα 10) - που επικρατεί στη βιβλιογραφία- προτείνει ότι η NPC2 δεσμεύει την χοληστερόλη, που προέρχεται από την ενδοκύττωση της LDL μέσω αλειφατικής ένωσης (Poongavanam et al., 2016), έτσι ώστε η υδροξυλική ομάδα να είναι εκτεθειμένη. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν οι περιοχές NTD και C της NPC1 με την NPC2 πρωτεΐνη, αποδεσμεύεται η χοληστερόλη από την NPC2 και μεταβιβάζεται “υδροφοβικά” στην περιοχή NTD της NPC1 (“hydrophobic hand-off”) (Gong et al., 2016). Η δράση των πρωτεϊνών αυτών θεωρείται ότι περιορίζεται στην έξοδο της χοληστερόλης από το λυσόσωμα (Vanier, 2010, Abi-Mosleh et al., 2009), ενώ η NPC1 δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην παλίνδρομη μεταφορά της χοληστερόλης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Peake and Vance, 2010). Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση των NPC1/NPC2 υποστηρίζεται ότι συνεισφέρει και στις ενδοκυττάριες διαδικασίες σύντηξης/σχάσης. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος των NPC1 και NPC2 στην ρύθμιση μεταφοράς άλλων λυσοσωμιακών φορτίων μέσω κυστιδίων μένει να εξακριβωθεί (Goldman and Krise, 2010). Τέλος, ο πιθανός ρόλος των NPC1/NPC2 στη μεταφορά της ενδογενώς συντεθειμένης χοληστερόλης αποτελεί επίσης ζήτημα προς διερεύνηση (Cruz and Chang, 2000).



Εικόνα 10: Το συνεργικό μοντέλο δράσης NPC1-NPC2 (Jean E. Vance, Dis Models & Mechanisms 2012)

4.3 Η ανεπάρκεια των NPC και οι κλινικές επιπτώσεις

4.3.1 Στους σπλαχνικούς ιστούς

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και συνήθως γίνονται εκδηλες στην πρώιμη παιδική ηλικία. Ωστόσο, η ηλικία έναρξης και η σοβαρότητα της νευρολογικής εκφύλισης παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση. Η καταστρεπτικότερη συνέπεια της ανεπάρκειας των NPC πρωτεϊνών είναι η προοδευτική νευροεκφύλιση, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η ανεπάρκεια των NPC πρωτεϊνών στον εγκέφαλο οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό πρόσληψης βάρους, ποικίλες νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, πρώιμη άνοια και πρόωρο θάνατο.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της κυκλοφορούσας LDL μεταβολίζεται στο ήπαρ, με αποτέλεσμα την υψηλή εναπόθεση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης στο όργανο αυτό. Επίσης, ο σπλήνας αποτελεί ένα ακόμη όργανο που παραβλάπεται. Μελέτες μάλιστα σε γενετικά τροποποιημένα NPC ποντίκια περιγράφουν χαρακτηριστικά λειτουργικής σπληνεκτομής. Άλλοι ιστοί που επηρεάζονται είναι ο πνευμονικός και ο μυελός των οστών, όπου εναποτίθενται αφθώδη κύτταρα (μακροφάγα). Τέλος, εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς έχει παρατηρηθεί σε ποντίκια με την αύξηση της ηλικίας.

4.3.2 Στον νευρικό ιστό-Νευροπαθοφυσιολογία

Αν και οι πρωτεΐνες NPC1 και NPC2 εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, οι καταστρεπτικότερες συνέπειες της ανεπάρκειας τους τυπικά παρατηρούνται στον εγκέφαλο. Πειράματα σε ποντίκια υποδεικνύουν ότι η επιλεκτική έκφραση της πρωτεΐνης NPC1 στον εγκέφαλο είναι σε θέση να αναχαιτίσει την έκφραση της νόσου, και αντιστρόφως, επιλεκτική νευρωνική της ανεπάρκεια προκαλεί την έκφραση του κλινικού φαινοτύπου. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ελαττωματική έξοδο της χοληστερόλης από το ΩΕ/Λ οδηγεί στην παθολογία του νευρικού συστήματος δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, η έκφραση του γονιδίου *NPC-1* στους νευρώνες και τα ολιγοδενδροκύτταρα θεωρείται σημαντική για το σχηματισμό και τη διατήρηση της μυελίνης, ενώ η επιλεκτική απαλοιφή του *NPC-1* στα αστροκύτταρα δεν επαρκεί για την εκδήλωση της νόσου.

Γενικά, αν και παρατηρούνται μεταβολές σε όλα τα νευρικά κύτταρα, θεωρείται ότι η ανεπάρκεια των NPC πρωτεϊνών κυρίως στους νευρώνες -και λιγότερο στα αστροκύτταρα ή τη μικρογλοία- αποτελεί το πρωταρχικό αίτιο της νευροπαθολογίας.

Προέχοντα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά είναι η νευρωνική συσσώρευση λιπιδίων, η ανάπτυξη φλεγμονωδών διαδικασιών και η νευροαξονική δυστροφία (Walkley and Suzuki, 2004). Η νευρωνική συγκέντρωση των λιπιδίων, οδηγεί σε νευροεκφύλιση με το σχηματισμό μεγανευρώνων, νευροϊνωδών πλεγμάτων και υπέρμετρη ανάπτυξη έκτοπων δενδριτών. Η πλειονότητα των δεδομένων πρόσφατων ερευνών συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη της φλεγμονής αναπτύσσεται αρχικά ως απάντηση στη νευροεκφύλιση. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, κυριαρχεί ο θάνατος των νευρώνων, με τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα. Αν και η απόπτωση των νευρώνων συμβαίνει και σε άλλες εγκεφαλικές περιοχές, όπως ο φλοιός και ο θάλαμος, ο σχηματισμός μεγανευρώνων και η ανάπτυξη έκτοπων δενδριτών κυριαρχούν στην παρεγκεφαλίδα. Ο μηχανισμός της αρχικά εκλεκτικής προσβολής των νευρικών κυττάρων παραμένει ασαφής.

Επιπρόσθετα, εντοπίζονται ελλείμματα και στη νευροδιαβίβαση. Οι συναπτικές μεμβράνες είναι σχετικά πλούσιες σε χοληστερόλη, η οποία είναι απαραίτητη σε διάφορα στάδια της νευροδιαβίβασης. Η δραστηριότητα των προ- και μετά- συναπτικών υποδοχέων επηρεάζεται από την περιεκτικότητα των μεμβρανών σε χοληστερόλη. Ο σχηματισμός των προσυναπτικών συμπλεγμάτων SNARE, η αλληλεπίδραση μεταξύ της συναπτοφυσίνης και της συναπτοβρενίνης, η σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με τις προσυναπτικές μεμβράνες και η στρατολόγηση των συναπτικών κυστιδίων κατά την ενδοκυττάρωση εξαρτώνται από την χοληστερόλη. Παράλληλα, η πρωτεΐνη NPC1 είναι παρούσα στα ανακυκλούμενα ενδοσώματα των προσυναπτικών αποληξέων των νευρώνων. Πειράματα σε νευρικούς ιστούς με NPC1 ανεπάρκεια καταδεικνύουν ότι η μορφολογία και η μετακίνηση των συναπτικών κυστιδίων, καθώς και η διαδικασία της εξωκυττάρωσης

διαταράσσονται, ενώ η αυτόματη νευροδιαβίβαση είναι αυξημένη. Παράλληλα, οι GABA-ανασταλτικές συνάψεις παραβλάπτονται περισσότερο από ότι οι γλουταμινεργικές συνάψεις. Συνεπώς, διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των ανασταλτικών και των διεργετικών μηχανισμών του εγκεφάλου. Έτσι, πειράματα σε τομές από τον ιππόκαμπο εγκεφάλων με ανεπάρκεια της NPC1 πρωτεΐνης υποδεικνύουν υπερδιέγερση. Τέλος, μεταβάλλεται μακροπρόθεσμα η συναπτική πλαστικότητα, ενώ οι προσυναπτικές βλάβες είναι ανεξάρτητες της παρουσίας των νευρογλοιακών κυττάρων.

4.4 Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί

Το γονίδιο *NPC1* είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό με πάνω από 400 παθογόνες μεταλλάξεις να έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα (www.hgmd.cf.ac.uk). Σε αυτές περιλαμβάνονται σημειακές μεταλλάξεις (70%), αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης, μεταλλάξεις ματίσματος, ενώ σπανιότερα περιγράφονται μεταθέσεις, απαλοιφές, ενθέσεις και μεταλλάξεις εντός των εσονίων (McKay Bounford and Gissen, 2014, Jahnova et al., 2014). Πολλοί NPC ασθενείς είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες, με ένα σημαντικό ποσοστό εξ αυτών να φέρει νέες μεταλλάξεις. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον περιορισμένο αριθμό λειτουργικών μελετών των μεταλλάξεων, δυσχεραίνει τη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου (Yang et al., 2005, Vanier, 2010). Ωστόσο, κάποιες συσχετίσεις γονότυπου με κλινικό ή βιοχημικό φαινότυπο, που αφορούν στη νευρολογική νόσο έχουν διατυπωθεί για μερικές συχνές μεταλλάξεις (McKay Bounford and Gissen, 2014, Millat et al., 1999, Vanier and Latour, 2015). Ορισμένες μεταλλάξεις είναι πιο συχνές παγκοσμίως ή σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Η p.I1061T είναι η πιο συχνή παθολογική γενετική αλλαγή στο δυτικό κόσμο (20-25%) και σε ομόζυγη κατάσταση έχει συσχετιστεί με τον κλασσικό βιοχημικό φαινότυπο και κλινικά με τη νεανική μορφή της NPC, ενώ σε ετερόζυγη κατάσταση δεν έχει συσχετιστεί με επιθετικές κλινικές μορφές. Η μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη, αν και λειτουργική, λόγω της παθολογικής αναδίπλωσης της αποδομείται γρήγορα. Η δεύτερη πιο συχνή μετάλλαξη στο δυτικό κόσμο και η συχνότερη στη Γερμανία είναι η p.P1007A, η οποία συνήθως απαντάται σε ηπιότερους κλινικούς φαινοτύπους και παρουσιάζει άτυπο βιοχημικό φαινότυπο. Άλλες συχνές μεταλλάξεις είναι η p.R1186H στην Τσεχία και η p.G992W, η οποία τυπικά περιγράφεται σε ασθενείς με καταγωγή από τη Νέα Σκωτία (Ribeiro et al., 2001, Jahnova et al., 2014, Millat et al., 2005, Park et al., 2003, Millat et al., 1999, Sun et al., 2001, Fancello et al., 2009, Greer et al., 1998, Macias-Vidal et al., 2011). Γενικά, μεταλλάξεις που οδηγούν σε μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες, αλλαγές του πλαισίου ανάγνωσης, απαλοιφές, αλλά και αυτές που εντοπίζονται στην περιοχή SSD του *NPC1* συσχετίζονται με σοβαρές μορφές της νόσου.

Πλήθος πολυμορφισμών (>300) κατά μήκος ολόκληρου του γονιδίου *NPCI* έχει ανιχνευθεί σε πολλαπλές μελέτες (Wassif et al., 2015). Κάποιες εξ αυτών παρουσιάζουν αυξημένη επίπτωση στο γενικό πληθυσμό. Μεταξύ αυτών, οι πολυμορφισμοί στα εξόνια: *c.387T>C* (rs12970899), *c.2793C>T* (rs1140458), *c.644A>G* (rs1805081), *c.1926G>C* (rs1788799), *c.2572A>G* (rs1805082) και *c.3797G>A* (rs1805084) έχουν επανειλημμένα περιγραφεί σε διάφορους πληθυσμούς στην Ευρώπη, τις ΗΠΑ και την Ιαπωνία (Ribeiro et al., 2001, Park et al., 2003, Bauer et al., 2002, Yamamoto et al., 1999).

Αναφορικά με το γονίδιο *NPC2*, έχουν περιγραφεί περίπου 23 διαφορετικές μεταλλάξεις (www.hgmd.cf.ac.uk), στις οποίες περιλαμβάνονται περίπου 17 σημειακές αλλαγές, που καταλήγουν σε αλλαγή αμινοξέως ή περικομμένη πρωτεΐνη, 2 μεταλλάξεις στις περιοχές ματίσματος και 3 μικρές απαλείψεις. Η μετάλλαξη E20X, που οδηγεί σε παθολογική πρωτεΐνη μικρότερου μεγέθους φαίνεται να εμφανίζεται συχνότερα και συσχετίζεται με σοβαρό κλινικό φαινότυπο, όπως και αρκετές άλλες ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις. Για τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις περιγράφεται ένα ευρύτερο φάσμα κλινικών φαινοτύπων. Εντούτοις, μεταλλάξεις στο *NPC2* έχουν περιγραφεί σε μικρό ποσοστό των οικογενειών με φορεία NPC μεταλλάξεων (~4-5%), γεγονός που καθιστά τις συσχετίσεις γονοτύπων-φαινοτύπων ακόμη δυσκολότερες (Millat et al., 2001a, Verot et al., 2007, Chikh et al., 2005).

4.5 Γονιδιακός έλεγχος

Αν και ο μοριακός έλεγχος δεν αποτελεί πάντα τον αρχικό κρίκο στη διαγνωστική αλυσίδα, ο ρόλος του είναι μεγάλης σημασίας, καθώς η ανίχνευση δύο παθογενετικών μεταλλάξεων, σε συνδυασμό με το μοριακό έλεγχο τουλάχιστον ενός γονέα, τεκμηριώνει τη διάγνωση (Patterson et al., 2012, Colin et al., 2016). Η γενετική ανάλυση είναι καθοριστική για τη διάγνωση σε περιπτώσεις

παθολογικών αποτελεσμάτων στους βιοχημικούς δείκτες, αλλά και σε αυτές με «άτυπο» βιοχημικό φαινότυπο στο τεστ φιλιπίνης (Patterson et al., 2012). Παράλληλα, αποτελεί τη μοναδική αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης φορέων της νόσου, καθώς τα αποτελέσματα των βιοχημικών αναλύσεων στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να είναι παρόμοια με αυτά των μαρτύρων (McKay Bounford and Gissen, 2014). Ο καθορισμός της υπεύθυνης μεταλλάξης είναι επίσης απαραίτητος και για τον προγεννητικό έλεγχο και την προγεννητική συμβουλευτική, ώστε να αποφευχθεί η γέννηση νέων πασχόντων (Vanier, 2010).

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί αλματώδης ανάπτυξη στον τομέα της μοριακής βιολογίας, με αποτέλεσμα ο γενετικός έλεγχος να είναι διαθέσιμος σε ολοένα και μεγαλύτερο αριθμό εργαστηρίων και να αποτελεί μέρος της διαγνωστικής ρουτίνας. Αυξανόμενος αριθμός ασθενών διαγιγνώσκεται πλέον μέσω του γονιδιακού ελέγχου, ως το πρώτο εργαλείο της διαγνωστικής προσέγγισης (Bauer et al., 2013a, Patterson et al., 2012) ή σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς δείκτες, ενώ πλέον συστήνεται η γενετική μελέτη όλων των ασθενών (McKay Bounford and Gissen, 2014, Marc C. Patterson, 2017). Η μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως κατά τη διαγνωστική προσέγγιση ενός ασθενούς είναι η άμεση αλληλούχιση cDNA ή gDNA (Sanger Sequencing) των εξονίων των γονιδίων *NPCI* και *NPC2*, καθώς και τμημάτων των περιοχών που περιβάλλουν τα εξόνια (εσόνια-ρυθμιστικές περιοχές). Η ανάλυση πραγματοποιείται σε αυτόματο γενετικό αναλυτή (DNA sequencer) (Fancello et al., 2009). Υπολογίζεται ότι μέσω της μεθόδου αυτής ανιχνεύονται 2 παθογενετικές μεταλλάξεις σε ένα ποσοστό πάνω από το 90% των NPC ασθενών. Ορισμένες πιο γρήγορες και άμεσες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τις πιο κοινές μεταλλάξεις, αν και η χρησιμότητά τους είναι περιορισμένη λόγω της ύπαρξης πολλών διαφορετικών μεταλλάξεων. (Millat et al., 2005).

Εντούτοις, η μοριακή ανάλυση εμφανίζει δυσκολίες λόγω της παρουσίας δύο υπεύθυνων γονιδίων, του μεγάλου μεγέθους του *NPCI*, του πλήθους και των διαφορετικών τύπων των μεταλλάξεων (αν και στο μεγαλύτερο ποσοστό τους πρόκειται για σημειακές μεταλλάξεις), καθώς και

της συχνότατης εμφάνισης σύνθετων ετεροζυγωτών. Έτσι, σε κάποιες περιπτώσεις βιοχημικά επιβεβαιωμένων ασθενών ή με συμβατή κλινική εικόνα, δεν ανευρίσκεται η μία ή και οι δύο γενετικές βλάβες. Εγείρονται λοιπόν ερωτήματα σχετικά με το βαθμό ειδικότητας των βιοχημικών και μοριακών εξετάσεων αφενός και αφετέρου με την πιθανότητα ύπαρξης ενός τρίτου γονιδίου NPC (Millat et al., 2005), αν και η άποψη αυτή εγκαταλείπεται τα τελευταία χρόνια. Η μέθοδος της αλληλούχισης είναι περιοριστική για την ανίχνευση απαλοιφών μεγάλου μήκους ή γενωμικών ανακατατάξεων. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις, καθώς και γενετικές αλλαγές σε μη κωδικοποιήσιμες περιοχές, πέραν των γειτνιαζουσών στα εξόνια εσονικών περιοχών, αν και σπάνιες, έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με NPC (Rodriguez-Pascau et al., 2012, Macias-Vidal et al., 2011, Di Leo et al., 2004, Rodriguez-Pascau et al., 2009). Στις περιπτώσεις αυτές, και με δεδομένη την ισχυρή υποψία της νόσου, ενδείκνυται η χρήση άλλων τεχνικών, πέραν της εργαστηριακής ρουτίνας, όπως η MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), LOH (Loss of Heterozygosity) και Whole Genome Sequencing. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι συστάσεις για τη διάγνωση ασθενών μέσω του μοριακού ελέγχου (Marc C. Patterson, 2017).

Ευρήματα μοριακού ελέγχου	Συστάσεις
2 παθογενικές μεταλλάξεις	Επιβεβαίωση σύνθετης ετεροζυγωτίας μέσω γενετικού ελέγχου των γονέων Επιβεβαίωση ισχυρής κλινικής υποψίας για τη νόσο NP-C (π.χ. κλινικά σημεία και προφίλ βιοδεικτών) και διενέργεια δοκιμασίας filipin
1 παθογενετική μετάλλαξη + 1 VUS	Διενέργεια περαιτέρω μοριακού ελέγχου (π.χ., full-gene sequencing, DNA array, MLPA, qPCR, cDNA sequencing) προς αναγνώριση επιπλέον μεταλλαγμένων αλληλίων Επιβεβαίωση ισχυρής κλινικής υποψίας για τη νόσο NP-C (π.χ. κλινικά σημεία και προφίλ βιοδεικτών) και διενέργεια δοκιμασίας filipin
1 παθογενετική μετάλλαξη μόνο ή 1 VUS μόνο	Διενέργεια περαιτέρω μοριακού ελέγχου (π.χ., full-gene sequencing, DNA array, MLPA, qPCR, cDNA sequencing) προς αναγνώριση επιπλέον μεταλλαγμένων αλληλίων Διενέργεια περαιτέρω μοριακού ελέγχου (π.χ., full-gene sequencing, DNA array, MLPA, qPCR, cDNA sequencing) προς αναγνώριση επιπλέον μεταλλαγμένων αλληλίων
Καμία παθογενετική μετάλλαξη	Επιβεβαίωση ισχυρής κλινικής υποψίας για τη νόσο NP-C (π.χ. κλινικά σημεία και προφίλ βιοδεικτών) και διενέργεια δοκιμασίας filipin

cDNA 5 complementary DNA; MLPA 5 multiplex ligation-dependent probe amplification; NP-C 5 Niemann-Pick disease type C; qPCR 5 quantitative PCR; VUS 5 variant of unknown significance.

Πίνακας 6: Συστάσεις διάγνωσης ασθενών μέσω μοριακού ελέγχου (Marc C. Patterson, 2017)

Τα πολυγονιδιακά πάνελ χρησιμοποιούνται ήδη για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε ασθενείς με NPC (Marc C. Patterson, 2017). Σε μία μελέτη εφαρμόστηκε πάνελ σχεδιασμένο για τη διερεύνηση μεταλλάξεων σε ασθενείς με κληρονομικές διαταραχές χολοστατικού ικτέρου. Ταυτοποιήθηκε έτσι ένας NPC ασθενής φορέας μίας καινούριας και μίας ήδη περιγραφείσας μετάλλαξης (Herbst et al., 2015). Επίσης, πολυγονιδιακό πάνελ 122 γονιδίων, που έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση αταξίας, εφαρμόστηκε σε άλλη μελέτη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα *NPC1* και *NPC2* γονίδια, σε άτομα με ανεξήγητη αταξία πρώιμης έναρξης. Η έρευνα αυτή οδήγησε στην αναγνώριση δύο NPC ασθενών, αλλά και στην παρατήρηση της αυξημένης επίπτωσης *NPC1* μεταλλάξεων μεταξύ των ασθενών της ομάδα ελέγχου (Synofzik et al., 2015). Επιπλέον, και άλλες εφαρμογές NGS, όπως η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ή όλων των εξονίων (Whole Genome Sequencing-WGS, Whole Exom Sequencing-WES), έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για τη μελέτη της γενετικής βάσης της νόσου, όσο και για τη διάγνωση ασθενών (Wassif et al., 2015). Σε μία μελέτη εφαρμόστηκε WES για τη διερεύνηση

δύο αδερφών, που οδήγησε στην ταυτοποίηση ομόζυγης μετάλλαξης στο γονίδιο *NPC2*. Το παράδειγμα αυτό, αν και τονίζει την αξία του NGS, υπογραμμίζει και την αναγκαιότητα της κλινικής ευαισθητοποίησης για τη νόσο, καθώς με βάση τον κλινικό φαινότυπο των ανωτέρω ασθενών θα μπορούσε να είχε επιλεγθεί μία λιγότερο πολύπλοκη μέθοδος, όπως η αλληλούχιση μόνο των γονιδίων *NPC1* και *NPC2* και όχι ολόκληρου του γονιδιώματος.

Αναμφίβολα, η μεθοδολογία του NGS ανοίγει νέους δρόμους τόσο στη διαγνωστική προσέγγιση, όσο και στη μελέτη της γενετικής βάσης της νόσου, της παθοφυσιολογίας, αλλά και στην ανάπτυξη συσχετίσεων γονοτύπων με κλινικούς φαινοτύπους (Dougherty et al., 2016). Παράλληλα, έχουν καθιερωθεί ως αξιόπιστες τεχνικές, και με την προϋπόθεση ότι επιλέγονται επί σωστών ενδείξεων, προσφέρουν εξοικονόμηση χρόνου με κόστος που περιορίζεται με την πάροδο του χρόνου, καθιστώντας τις διαθέσιμες σταδιακά σε μεγαλύτερο αριθμό εργαστηρίων. Ωστόσο, η ευρεία χρήση τους πρόκειται να οδηγήσει στην ανίχνευση πλήθους γενετικών αλλαγών, που απαιτούν προσεκτική ερμηνεία στο συσχετισμό τους με τον κλινικό φαινότυπο και στον χαρακτηρισμό τους. Η τεκμηρίωση νέων αλλαγών στην αλληλουχία των βάσεων –και ιδιαίτερα των παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων (missense)- ως παθογόνων περιλαμβάνει πολύπλοκες, συνδυαστικές, λειτουργικές αναλύσεις τόσο σε επίπεδο του gDNA, cDNA (Yamamoto et al., 2004), αλλά και λειτουργικότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης, όπως μελέτες mRNA ή *in silico* προγράμματα πρόβλεψης της δραστηριότητας της πρωτεΐνης (Min et al., 2015). Μέχρι και σήμερα, η ανίχνευση παθολογικής γενετικής αλλαγής με NGS, επιβεβαιώνεται με Sanger Sequencing.

Σε κάθε νέα διάγνωση ασθενούς με τη νόσο NPC, συμπτωματικού ή μη, ο μοριακός έλεγχος για τον ακριβή καθορισμό των παθογόνων μεταλλάξεων είναι απαραίτητος (Marc C. Patterson, 2017). Η αναγνώριση της υπαίτιας μετάλλαξης (ή μεταλλάξεων) επιτρέπει τον έλεγχο της οικογένειας του ασθενούς, ώστε να εντοπιστούν φορείς της μετάλλαξης ή ακόμη και πάσχοντες και ταυτόχρονα να προληφθεί η γέννηση ενός ακόμη πάσχοντος παιδιού (Yasmina Amraoui, 2013). Δεδομένου ότι

κάποιες μεταλλάξεις εμφανίζονται σε NPC ασθενείς με συγκεκριμένη καταγωγή, η γνώση του είδους των γενετικών αλλαγών των *NPC* γονιδίων, αλλά κυρίως του *NPC1* είναι απαραίτητη προς την κατεύθυνση αυτή. Στην Ελλάδα, τα δεδομένα σχετικά με τις μεταλλάξεις των *NPC1-2* είναι περιορισμένα (Mavridou et al., 2017, Rodriguez-Pascau et al., 2012, Mavridou et al., 2014), ενώ δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία αναφορικά με το είδος των πολυμορφισμών.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην Ελλάδα, τα δεδομένα σχετικά με τη νόσο NPC και τις μεταλλάξεις των *NPCI-2* είναι περιορισμένα, με έναν ασθενή να έχει περιγραφεί πριν την έναρξη της παρούσας μελέτης. Ο ασθενής είχε καταγωγή από την Ίο και ήταν σύνθετος ετεροζυγώτης [p.F284Lfs*26 (c.852delT) και 18q11–q12 εκτάσεως ~432kb] (Rodriguez-Pascual et al., 2012). Αναφορικά με το είδος και τη συχνότητα των πολυμορφισμών δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία στον ελληνικό πληθυσμό. Ο γενετικός έλεγχος του γονιδίου *NPCI* -και εκλεκτικά του *NPC2*-, σε επιλεγμένες ομάδες του ελληνικού πληθυσμού συνιστά αποτελεσματική μέθοδο διερεύνησης του είδους των γενετικών αλλαγών στα γονίδια αυτά και δύναται να συμβάλλει στην καλύτερη προσέγγιση της νόσου Niemann-Pick τύπου C.

5. Σκοπός και Κλινική σημασία

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο καθορισμός του είδους των γενετικών αλλαγών στο γονίδιο *NPCI* -και σε επιλεγμένες περιπτώσεις στο *NPC2*- σε μία ομάδα ασθενών με κλινική εικόνα ή βιοχημική εξέταση (δοκιμασία φιλιπίνης) υψηλής υποψίας για τη νόσο Niemann-Pick τύπου C, καθώς και επιλεκτικά σε μία ομάδα υγιών ατόμων ελληνικής καταγωγής.

Η κλινική της σημασία έγκειται:

- I. Στη διερεύνηση για πρώτη φορά της κατανομής των αλληλόμορφων του γονιδίου *NPCI* σε άτομα ελληνικής καταγωγής. Η γνώση του είδους των γενετικών αλλαγών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καλύτερη κατανόηση της νόσου και αποτελεί απαραίτητο βήμα για την πρόγνωση και την καλύτερη θεραπευτική παρέμβαση.
- II. Στην πιθανή ανίχνευση/γενετικό προσδιορισμό ασθενών αλλά και φορέων της νόσου NPC. Σε περίπτωση ταυτοποίησης ασθενούς, θα διεξάγεται περαιτέρω στοχευμένη γενετική μελέτη σε άτομα της ευρύτερης οικογένειας του. Δεδομένου της κληρονομικότητας της νόσου με τον

υπολειπόμενο τύπο καθώς και της σπανιότητάς της, είναι πιθανή η ανεύρεση γεωγραφικά απομονωμένων υποομάδων του γενικού πληθυσμού με αυξημένο επιπολασμό φορέας παθογενετικών μεταλλάξεων. Η μελέτη των υποομάδων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία τους και την πρόληψη της νόσου. Μέσω λοιπόν της ενημέρωσης και της προγεννητικής συμβουλευτικής είναι δυνατό να αποτραπούν νέες γεννήσεις ασθενών σε τέτοιους πληθυσμούς.

Με τον τρόπο αυτό:

- Προστατεύονται οι οικογένειες από ενδεχόμενο πλήγμα της θανατηφόρου αυτής νόσου.
 - Εξοικονομούνται χρήματα από το Εθνικό Σύστημα Υγείας, καθώς η παρακολούθηση και η θεραπεία ασθενών με Niemann-Pick τύπου C έχει υψηλό κόστος.
- III. Στη διερεύνηση για πρώτη φορά σε Ελληνικό πληθυσμό της συσχέτισης του γονότυπου ανιχνευθέντων ασθενών με τον κλινικό ή/και βιοχημικό του φαινότυπο, στο βαθμό και στις περιπτώσεις που αυτό είναι εφικτό.
- IV. Στην προοδευτική παρακολούθηση και ενδεχόμενη θεραπευτική παρέμβαση στους ασθενείς, που ενδέχεται να ανιχνευτούν.
- V. Στην προβολή του σπάνιου αυτού νοσήματος, ώστε να προωθηθεί η εξοικείωση του ιατρικού κόσμου και να διευκολυνθεί η αναγνώρισή του στην χώρα μας.

6. Υλικά και Μέθοδοι

6.1 Πληθυσμός της μελέτης

Το δείγμα της μελέτης περιλαμβάνει ασθενείς με κλινική συμπτωματολογία υψηλής υποψίας για τη νόσο Niemann-Pick τύπου C ή/και βιοχημική διάγνωση της νόσου και υγιή άτομα, που έχουν νοσηλευθεί ή επισκεφτεί τις νεογνικές, παιδιατρικές και νοσηλευτικές μονάδες ενηλίκων διαφόρων περιοχών της Ελλάδας. Επιπλέον, περιλαμβάνει την ευρύτερη οικογένεια των NPC ασθενών, στους οποίους κατά το γενετικό έλεγχο επιβεβαιώθηκε η νόσος. Έγγραφη συγκατάθεση δόθηκε από όλους τους συμμετέχοντες ή κηδεμόνες αυτών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους κανόνες βιοηθικής και δεοντολογίας, ύστερα από έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου 'ΑΤΤΙΚΟΝ' (Απόφαση 5^{ης} Συνεδρίασης 16-5-2012).

6.1.1 Ομάδα ασθενών που εμφανίζουν κλινική συμπτωματολογία υψηλής υποψίας για τη νόσο NPC (Suspicion Group -SGs)

Συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 47 Έλληνες ασθενείς όλων των ηλικιακών ομάδων στο διάστημα 4 ετών (Μάιος 2011-Μάιος 2015), σε συνεργασία με κλινικούς ιατρούς διαφόρων ειδικοτήτων από 11 διαφορετικά νοσοκομεία του Ελλαδικού χώρου. Η επιλογή των ασθενών βασίστηκε στην κλινική πορεία της νόσου και την κλασική κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την ηλικία έναρξης των νευρολογικών συμπτωμάτων (Patterson et al., 2012). Η υποκατηγοριοποίηση λοιπόν στην ομάδα αυτή έγινε ως εξής:

- Υποομάδα 1 (Suspicion Group 1, SG-1): άτομα ελεύθερα νευρολογικής συμπτωματολογίας, τα οποία παρουσιάζουν ή έχουν παρουσιάσει στο παρελθόν κλινικά σημεία υψηλής κλινικής υποψίας για τη νόσο.
- Υποομάδα 2 (Suspicion Group 2, SG-2): παιδιά ή έφηβοι με νευρολογικά συμπτώματα, σε συνδυασμό με σπλαχνικές ή/και ψυχιατρικές εκδηλώσεις.

- Υποομάδα 3 (Suspicion Group 3, SG-3): έφηβοι ή ενήλικες με ψυχιατρική συμπτωματολογία, σε συνδυασμό με νευρολογική ή/και σπλαχνική νόσο.

Συνολικά, στην ομάδα SG συμπεριλήφθησαν 37 άτομα, καθώς 8/47 δεν πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη, ενώ 2/47 είχαν θετικό τεστ φιλιπίνης, οπότε και συμπεριλήφθησαν στην ομάδα NPC ασθενών (αναλύεται παρακάτω). Σε ένα από τα 37 άτομα ελέγχθηκε με μοριακό έλεγχο μόνο το γονίδιο *NPC-2*.

Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη

1. Στην υποομάδα 1 (SG-1) συμπεριλαμβάνονται νευρολογικά ασυμπτωματικοί ασθενείς, με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:
 - Νεογνά και βρέφη ηλικίας 2 με 24 εβδομάδων, τα οποία πάσχουν από ιδιοπαθή νεογνική ηπατίτιδα-χολοστατικό ίκτερο και στα οποία έχουν αποκλειστεί άλλες γνωστές λοιμώδεις, μεταβολικές, γενετικές, δομικές ή τοξικές αιτίες.
 - Ορισμός χολοστατικού ικτέρου με βάση μετρήσεις στο αίμα (Moyer et al., 2004):
άμεση χολερυθρίνη > 1.0 mg/dl με συνολική χολερυθρίνη < 5mg/dl ή
άμεση χολερυθρίνη > 20% της συνολικής χολερυθρίνης όταν αυτή είναι > 5mg/dl.
 - Βρέφη, παιδιά και ενήλικες
 - με ιστορικό ιδιοπαθούς χολοστατικού ίκτερου, ο οποίος λύθηκε αυτόματα,
 - με ιστορικό ή παρούσα ηπατοσπληνομεγαλίας ή με μεμονωμένη, ανεξήγητη σπληνομεγαλία, στα οποία έχουν αποκλειστεί αλλά κοινά νοσήματα.
2. Οι ασθενείς των υποομάδων SG-2 και SG-3, με βάση το δημοσιευμένο κλινικό εργαλείο πρόγνωσης της κλινικής υποψίας της νόσου NPC [NPC suspicion index (NP-SI)] (Wijburg et al., 2012), θα πρέπει:

- α. να συγκεντρώνουν βαθμολογία ≥ 70 βαθμούς
 - β. στους ασθενείς με σκορ 40-69 ο μοριακός έλεγχος γίνεται επιλεκτικά, μετά από επικοινωνία με τον θεράποντα ιατρό και συζήτηση του περιστατικού
3. Να έχει προηγηθεί διερεύνηση και αποκλεισμός άλλων κοινών νοσημάτων
 4. Να έχει υπογραφεί έντυπο συγκατάθεσης από τον ίδιο ή τους γονείς στις περιπτώσεις ανηλίκων ή αντικειμενικής αδυναμίας συναίνεσης
 5. Ημεδαπή καταγωγή

Κριτήρια αποκλεισμού

1. Άρνηση έγγραφης συναίνεσης
2. Αλλοδαπή καταγωγή
3. Να μη έχουν αποκλειστεί κοινά νοσήματα
4. Για τις ομάδες SG-2 και SG-3 NP-SI < 40
5. Να μη πληρούν τα κριτήρια εισαγωγής

6.1.2 Ομάδα NPC ασθενών (NPC) και συγγενών (Relatives Group-RG1 και 2)

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ασθενείς με κλινική συμπτωματολογία και βιοχημική δοκιμασία συμβατή με τη νόσο NPC (θετικό τεστ φιλιπίνης), που προέκυψαν κατά τη συλλογή των δειγμάτων. Μετά την μοριακή επιβεβαίωση της διάγνωσης (NPC ασθενείς) η μελέτη επεκτάθηκε και σε άτομα από την ευρύτερη οικογένειά τους (Relatives Groups-RG1/2). Ειδικότερα, ελέχθησαν 75 άτομα από το γενεαλογικό δέντρο του πρώτου NPC ασθενούς (NPC ασθενής 1α) και 24 από του δεύτερου (NPC ασθενής 2).

Κριτήρια εισαγωγής στην ομάδα RG

1. Συγγενείς εξ αίματος οποιουδήποτε βαθμού και συγγενείς εξ αγχιστείας (σε περίπτωση άτομων με κοινή καταγωγή από γεωγραφικά απομονωμένη περιοχή)

2. Ενυπόγραφη συγκατάθεση συμμετοχής στη μελέτη

6.1.3 Ομάδα ελέγχου

Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από 90 άτομα άνω των 25 ετών, κάτοικοι της περιφέρειας Αττικής, αλλά με καταγωγή από διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου. Όλοι ήταν υγιείς, χωρίς ιστορικό νευρολογικών ή ψυχιατρικών συμπτωμάτων, παθολογικού λιπιδαιμικού προφίλ ή οργανομεγαλίας.

6.2 Συλλογή δειγμάτων

6.2.1 Ενημέρωση διαφόρων νεογνικών, παιδιατρικών και μονάδων ενηλίκων της χώρας

- Εστάλη γραπτή επιστολή, η οποία ενημέρωνε σχετικά με τα βασικά σημεία της παρούσας μελέτης και προσδιόριζε το προφίλ των ασθενών, που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής.
- Στην ενημέρωση των θεράποντων ιατρών σε διάφορα νοσοκομεία της χώρας συνέβαλε και η εταιρεία Actelion, η οποία διακινεί το φαρμακευτικό προϊόν Zavesca (μιγλουστάτη). Η ουσία αυτή, όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος, αποτελεί θεραπεία μείωσης υποστρώματος σε NPC ασθενείς με νευρολογική συμπτωματολογία.

6.2.2 Σχεδιασμός δομημένων ερωτηματολογίων

Σχεδιάστηκαν τρία διαφορετικά ερωτηματολόγια με βάση την κλινική συμπτωματολογία και πορεία της νόσου καθώς και την κλασική κατηγοριοποίηση των ασθενών ανάλογα με την ηλικία έναρξης των νευρολογικών συμπτωμάτων (Patterson et al., 2012). Τα ερωτηματολόγια είχαν σκοπό τον προσδιορισμό της κλινικής συμπτωματολογίας, ώστε να ανιχνευτούν οι κατάλληλοι ασθενείς για τη μελέτη (Παράρτημα Α).

- Το πρώτο ερωτηματολόγιο στόχευε σε ασθενείς με σπλαχνική νόσο –παρούσα ή ιστορικό αυτής- και συγκεκριμένα ανεξήγητη χολόσταση, ηπατοσπληνομεγαλία ή μεμονωμένη σπληνομεγαλία (Suspicion Group 1, SG-1).
- Το δεύτερο σε παιδιά ή εφήβους με νευρολογικά και οργανικά ή/και ψυχιατρικά συμπτώματα (Suspicion Group 2, SG-2)
- Το τρίτο σε εφήβους ή ενήλικες με ψυχιατρική και νευρολογική ή/και σπλαχνική νόσο (Suspicion Group 3, SG-3).

Όλα τα ερωτηματολόγια συμπληρώθηκαν από τους θεράποντες ιατρούς και επιστράφηκαν μαζί με τη φόρμα συγκατάθεσης, που υπογράφηκε από τους συμμετέχοντες ή νόμιμο εκπρόσωπό τους. Συγκεντρώθηκαν έτσι δεδομένα που περιελάμβαναν τα στοιχεία του θεράποντος ιατρού, στοιχεία επικοινωνίας, δημογραφικά στοιχεία, περιγεννητικό, ατομικό και κληρονομικό ιστορικό, ακριβή κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ιδιαίτερη έμφαση στα σημεία ενδιαφέροντος (νευρολογικά, ψυχιατρικά και σπλαχνικά), την ήδη διενεργηθείσα εργαστηριακή ή/και παρακλινική διερεύνηση του ασθενούς και τυχόν πρόσθετες παρατηρήσεις του θεράποντος ιατρού.

6.2.3 Διαλογή δείγματος

6.2.3a Ομάδα SG

Για τις ομάδες SG-2 και SG-3 ποσοτικοποιήθηκε η κλινική υποψία της νόσου με βάση το δημοσιευμένο εργαλείο προσδιορισμού της κλινικής υποψίας της νόσου NPC (NP-SI) (<http://www.npc-si.com/tools/>) (Wijburg et al., 2012). Το NP-SI εργαλείο βαθμολογεί κλινικά συμπτώματα-κλειδιά της νόσου, τον μεταξύ τους συνδυασμό και το θετικό κληρονομικό ιστορικό NPC νόσησης. Έτσι, ασθενείς με μικρή κλινική υποψία συγκεντρώνουν βαθμολογία <40, με μέτρια 40-69 και με υψηλή ≥ 70 (Εικόνα 11).

Το εργαλείο αυτό δεν εφαρμόστηκε για την ομάδα SG-1, καθώς θεωρήσαμε ότι το NP-SI δε θα μπορούσε να έχει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα σε αυτή. Η ομάδα SG-1 απαρτίστηκε από ασθενείς χωρίς νευρολογική συμπτωματολογία και με ηλικία <4ετών. Τα άτομα της ομάδας αυτής, εφόσον έχουν αποκλειστεί κοινά νοσήματα, εγείρουν κλινική υποψία για τη νόσο. Ωστόσο, με βάση το σχεδιασμό του NP-SI δεν αναμένεται να συγκεντρώσουν βαθμολογία ≥ 40 . Πράγματι, μεταγενέστερες δημοσιεύσεις του χρονικού διαστήματος συλλογής, διαλογής και ανάλυσης των δειγμάτων της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν το σκεπτικό αυτό (Jahnova et al., 2014, Wraith et al., 2014).

Ασθενείς των ομάδων SG-2 και 3 με προγνωστική βαθμολογία ≥ 70 συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, ενώ αυτοί με βαθμολογία <40 αποκλείστηκαν. Για εκείνους με βαθμολογία 40-69 καθώς και για τα άτομα της ομάδας SG-1, η εισαγωγή τους στην έρευνα αποφασίστηκε κατόπιν επικοινωνίας και συζήτησης του κάθε περιστατικού με τον εκάστοτε θεράποντα ιατρό.

Υποψία NPC	ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤ	ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤ.
Πολύ ισχυρή 40 pts / item		<ul style="list-style-type: none"> Κάθετη παράλυση βλέματος Γελαστική Καταπληξία 	
Ισχυρή 20 pts / item	<ul style="list-style-type: none"> Παρατεινόμενος, ανεξήγητος νεογνικός ίκτερος Μεμονωμένη σπληνομεγαλία (παρελθούσα ± παρούσα) με ή χωρίς σπληνομεγαλία 		<ul style="list-style-type: none"> Πρόωρη εκπτώση γνωστικών λειτουργιών ή άνοια
Μέτρια 10 pts / item		<ul style="list-style-type: none"> Αιτία, αδεξιότητα ή συχνές πτώσεις Δυσσθρία και/ή δυσφαγία Δυστονία 	<ul style="list-style-type: none"> Ψυχώσεις
Ασθενή 5 pts / item		<ul style="list-style-type: none"> Σπαστικότητα 	<ul style="list-style-type: none"> Ψυχιατρικά συμπτώματα ανθεκτικά στη θεραπεία Άλλες ψυχιατρικές διαταραχές
Συμπληρωματική 1 pt / item	<ul style="list-style-type: none"> Εμβρυικός άδρωπας Προηγούμενη κύηση με εμβρικό ασκίτη 	<ul style="list-style-type: none"> Υποτονία Αναπτυξιακή καθυστέρηση Σπασμοί (εστιακοί ή γενικευμένοι) Μυόκλωνος 	<ul style="list-style-type: none"> Αντικοινωνική ή επιθετική συμπεριφορά κατά την εφηβεία ή την παιδική ηλικία
Σκορ κατηγοριών			
Category combination 40 pts /org. & ψυχ. κατ. 40 pts /org. & νευρ. κατ. 20 pts /νευρ. & ψυχ. κατ.		Κατηγορία οργανικών Και ψυχιατρικών εκδηλώσεων	
		Οργανικές και νευρολογικές εκδηλώσεις	Νευρολογικές και ψυχιατρικές εκδηλώσεις
Οικογενειακό ιστορικό 40 pts / 1. βαθμού 10 pts / 2. βαθμού		<ul style="list-style-type: none"> Γονείς ή αδέρφια με NP-C Ξαδέρφια με NP-C 	
ΣΚΟΡ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ =			

Εικόνα 11: Ποσοτικό εργαλείο πρόγνωσης κλινικής υποψίας της νόσου NPC

6.2.3β Ομάδα NPC και RG1-2

Δύο από τα συλλεχθέντα δείγματα ανήκαν σε ασθενείς με κλινική συμπτωματολογία και βιοχημική δοκιμασία συμβατή με τη νόσο NPC (θετικό τεστ φιλιπίνης). Ο πρώτος ασθενής (NPC ασθενής 1) είχε καταγωγή από μία περιοχή της Κρήτης. Μεταβήκαμε στο νησί, όπου συλλέξαμε δείγματα από 75 άτομα του γενεαλογικού του δέντρου (RG-1). Ο δεύτερος ασθενής (NPC ασθενής 2) είχε καταγωγή από τη Σαντορίνη. Συλλέχθηκαν 24 δείγματα από άτομα της ευρύτερης οικογένειάς του, που διέμεναν στην Αττική (RG-2).

Όλα τα άτομα που συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα RG-1 και 2 συμπλήρωσαν μια τυποποιημένη φόρμα ύστερα από τη λήψη βραχέος ιστορικού (Παράρτημα Β). Έτσι συλλέχθηκαν πληροφορίες που περιελάμβαναν: στοιχεία επικοινωνίας, δημογραφικά στοιχεία, ηλικία, ατομικό ή κληρονομικό ιστορικό νευρολογικής, ψυχιατρικής και σπλαχνικής νόσου και τέλος ο βαθμός συγγένειας με τον ασθενή.

6.2.3γ Ομάδα ελέγχου

Τα δείγματα της ομάδας αυτή συλλέχθηκαν από υγιείς συνοδούς ασθενών, οι οποίοι προσήλθαν στα Εξωτερικά ιατρεία του Νοσοκομείου ‘Αττικών’ κατά την περίοδο 5/2011-5/2015. Αντίστοιχα με την ομάδα RG1-2 συλλέχθηκαν με τον ίδιο τρόπο οι απαιτούμενες πληροφορίες.

6.2.4 Λήψη και μεταφορά των δειγμάτων

Ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος σε αποστειρωμένα σωληνάκια vacutainer, τα οποία περιείχαν αντιπηκτικό διάλυμα EDTA 5% (γενικής αίματος) προκειμένου να ακολουθήσει η απομόνωση DNA. Η ποσότητα αίματος ήταν 3ml για νεογνά και 5ml για παιδιά ή ενήλικες. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C (κοινή ψύξη) μέχρι την αποστολή τους. Οι οδηγίες αυτές είχαν

αποσταλεί στους θεράποντες ιατρούς, μαζί με μία τυποποιημένη φόρμα για τον έλεγχο της τήρησης τους, το έντυπο συγκατάθεσης (Παράρτημα Γ) και τα δομημένα ερωτηματολόγια.

Σημειώνεται εδώ ότι από τις ομάδες NPC και RG1-2 ελήφθη επιπλέον δείγμα περιφερικού αίματος ίδιας ποσότητας, σε αποστειρωμένα σωληνάρια vacutainer χωρίς αντιπηκτικό. Μέσα σε 2 ώρες από τη λήψη τους, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 rpm, για 10 λεπτά. Συλλέχθηκε ο ορός, ο οποίος μοιράστηκε σε σωληνάρια erpendorf των 1,5 ml, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

6.3 Γονοτύπηση

Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA σε 228 δείγματα περιφερικού αίματος. Στη συνέχεια τα δείγματα επεξεργάστηκαν μέσω της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και διενεργήθηκε άμεση αλληλούχιση του γονιδίου *NPCI* (N=38), και σε επιλεγμένες περιπτώσεις στο *NPC2* (N=11), στις ομάδες SG (N=37) και NPC (N=2) (εξόνια 1 έως 25 για το *NPCI* και εξόνια 1-5 για το *NPC2*, καθώς και των γειτνιαζουσών εσονικών περιοχών). Με βάση τα αποτελέσματα του ανωτέρου ελέγχου, επιλέχθηκαν 6 εξόνια (εξόνια 4, 6, 12, 17, 18, 25), στα οποία ανιχνεύτηκαν πολυμορφισμοί (οι οποίοι δεν αναμένεται να οδηγούν σε παραγωγή παθολογικής πρωτεΐνης) με υψηλή συχνότητα εμφάνισης στην ομάδα SG και τα εξόνια 21, 22 και 23, στα οποία ανιχνεύτηκαν οι παθογόνες γενετικές αλλαγές στους 2 NPC ασθενείς. Ακολούθησε στοχευμένος μοριακός έλεγχος για τις συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές, με άμεση αλληλούχιση των 9 αυτών εξονίων σε 165 δείγματα. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από την ομάδα ελέγχου (CG, N=90) και την ομάδα των συγγενών του NPC ασθενούς 1 (RG1, N=75).

Ακολουθούν αναλυτικά οι τεχνικές που ακολουθήθηκαν.

6.3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA από λευκοκύτταρα ολικού αίματος πραγματοποιήθηκε με στήλες (εμπορικό kit: NucleoSpin® Dx Blood, Macherey-Nagel), σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

1. Μεταφορά 25 μ L πρωτεΐνάσης K σε σωληνάριο eppendorf 1.5 mL.
2. Προσθήκη 200 μ L ολικού αίματος και 200 μ L διαλύματος B3.
3. Ισχυρή ανακίνηση σε μηχάνημα Vortex για 10 δευτερόλεπτα.
4. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18–25°C).
5. Επώαση για 10 λεπτά στους 70°C.

6. Μετά την επώαση ακολούθησε ανάμειξη στο μηχάνημα Vortex για 5 δευτερόλεπτα. Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και κατακρήμνιση των πρωτεϊνών.
7. Προσθήκη 210 μL αιθανόλης στο μείγμα και ανακίνηση στο Vortex για 5 δευτερόλεπτα.
8. Μεταφορά του παραπάνω μείγματος σε νέο σωληνάριο στο οποίο έχει προσαρμοστεί η στήλη NucleoSpin.
9. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000 xg. Επανάληψη της φυγοκέντρησης σε υψηλότερες στροφές (15,000–20,800 xg), αν το διάλυμα δεν είχε περάσει εξ ολοκλήρου διαμέσου της μεμβράνης της στήλης. Το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και προσκολλάται στην μεμβράνη της στήλης κατά την φυγοκέντρηση, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά διαπερνούν την μεμβράνη και απορρίπτονται με τη μορφή διαλύματος.
10. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής που περιέχει το διάλυμα που φυγοκεντρήθηκε στο προηγούμενο βήμα και τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin σε ένα νέο σωληνάριο 2 mL.
11. Προσθήκη 500 μL διαλύματος BW στη στήλη.
12. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000 xg.
13. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin σε ένα νέο σωληνάριο 2 mL.
14. Προσθήκη 600 μL διαλύματος B5 στη στήλη.
15. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000 xg. Το αιθανολικό διάλυμα B5 καθαρίζει το DNA που έχει προσκολληθεί στη μεμβράνη από κυτταρικά ή πρωτεϊνικά υπολείμματα.
16. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin σε ένα νέο σωληνάριο 2 mL.
17. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000 xg. Στο βήμα αυτό στεγνώνει η μεμβράνη της στήλης από την αιθανόλη.
18. Τοποθέτηση της στήλης NucleoSpin σε ένα νέο σωληνάριο eppendorf 1,5 mL.
19. Προσθήκη 100 μL Buffer BE στο κέντρο της μεμβράνης. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14,000 xg.

20. Το διάλυμα που συλλέγεται μετά την φυγοκέντρηση περιέχει 40–60 ng/μL γενωμικού DNA.

21. Αποθήκευση DNA στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

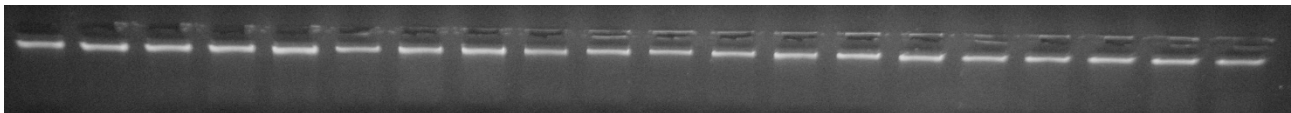
6.3.2 Έλεγχος ποιότητας του DNA

Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος και του μεγέθους του DNA που ηλεκτροφορείται.

Η προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης έγινε ως εξής:

- Μεταφορά 1 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος TBE 10X, σε κωνική φιάλη.
- Θέρμανση του διαλύματος σε θερμοαντική πλάκα μέχρι βρασμού.
- Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5μg/ml και ανάδευση. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία καρκινογόνος φθορίζουσα χρωστική, η οποία περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο, ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Με τον τρόπο αυτόν το DNA φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.
- Το διάλυμα αφήνεται να στερεοποιηθεί σε ειδικό εκμαγείο αφού τοποθετηθούν σε αυτό ειδικές «χτένες» έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης του DNA.
- Στη συνέχεια, 5 μl από κάθε δείγμα DNA αναμειγνύονται με 2 μl χρωστικής και τοποθετούνται στις αντίστοιχες θέσεις επάνω στο πήκτωμα, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση έγινε με μέσο το ρυθμιστικό διάλυμα TBE στα 100V/cm για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα

μεταφέρθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση και φωτογράφιση (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Στην εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης του DNA που απομονώθηκε από 20 δείγματα μας.

6.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση των 25 εξονίων του NPC1, των 5 εξονίων του NPC2, καθώς και των τμημάτων που τα περιβάλλουν, πραγματοποιήθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η PCR αποτελεί μία μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται η εκλεκτική αντιγραφή μιας μικρής αλληλουχίας DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω ανάλυση του συγκεκριμένου τμήματος.

Εφόσον είναι γνωστή η αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, σχεδιάζονται δύο ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους ~26 βάσεων στα δύο άκρα της υπό διερεύνηση περιοχής. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (primers) και οριοθετούν τα άκρα του τμήματος που θέλουμε να μελετήσουμε.

Για την πραγματοποίηση της PCR απαιτείται η παρουσία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) καθώς και Taq πολυμεράση, η οποία αποτελεί το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση πολλαπλασιασμού. Η πολυμεράση, αφού γίνει η αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA και οι εκκινητές προσδεθούν στις συμπληρωματικές θέσεις (όπως θα αναφερθεί παρακάτω), αρχίζει να επιμηκύνει τους εκκινητές προσθέτοντας συμπληρωματικά νουκλεοτίδια.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη των παρακάτω σταδίων:

- i) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία.
- ii) Σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στις δύο αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία (T_m) στην οποία πραγματοποιείται η σύνδεση εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών.
- iii) Επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη μέσω της πολυμεράσης των ελεύθερων νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται κυκλικά (25-35 κύκλοι). Η PCR εκτελείται σε ένα αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή τύπου PerkinElmer, στον οποίο οι αυξομειώσεις των θερμοκρασιών επιτυγχάνονται με μεγάλη ταχύτητα.

Για την πραγματοποίηση των PCR των γενωμικών περιοχών του γονιδίου *NPC1* και *NPC2*, που θέλαμε να πολλαπλασιάσουμε, χρησιμοποιήθηκαν 24 και 5 ζεύγη εκκινητών αντίστοιχα, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στα Πίνακα 7.

Εξόνιο	Ονομασία	Εκκινητές 5'-3'	Μήκος (βάσεις)	Θερμοκρασία PCR
<i>NPC1</i> 1	NPC1G1F	ACGCCTTCTCCTTCCTGAC	472	58
	NPC1G1R	CCACAGATGGAACAAGCTCA		
2	NPC1G2F	CAAAATGTTAAGTGCCTGTTGC	400	58
	NPC1G2R	TTGAGAGTCCGGATAAGA		
3	NPC1G3F	TTCACTGAGGAATGTTGACCT	240	54
	NPC1G3R	GCTGAGCATTACCAGTTCACAA		
4	NPC1G4F	TGTTCTCTGGTAATTTGTCACTTT	494	58
	NPC1G4R	AAGCAAGCGCTTTAAGGAGA		
5	NPC1G5F	TGGAGTTCGTGTTCCCTTC	397	58
	NPC1G5R	GGAACTTCCTGGTCTTAAGCAAT		
6	NPC1G6F	TGTTTTATGTATTTACAGTGGGCTTT	477	58
	NPC1G6R	TGCAATGGTATTCATGGAGGT		
7	NPC1G7F	CAGGAGGAGGAAGAAAGCAT	278	64
	NPC1G7R	CACACCACCTCACCCACTG		
8	NPC1G8F	CTCATATGTGTCCCCAGGTG	598	64
	NPC1G8R	GACATTCAGCCCCAAATCC		
9	NPC1G9F	CCTCAGGGCAATGCTGATTA	417	64
	NPC1G9R	TGTTGTTTGCTCACCTCTGG		
10	NPC1G10F	CAAAGGTGAGTGCTGAGCTG	394	62
	NPC1G10R	TCTGGGATTCAAGAGGTAAGAAA		
11	NPC1G11F	AGAGCCCAGAGATACAGTCCA	336	62
	NPC1G11R	AACTCAGATCTGCCATTGGTT		
12	NPC1G12F	AAAACGTGGCCTTTGATATCG	362	62
	NPC1G12R	AAAGAGGCAAAAATATGACGTT		
13	NPC1G13F	TCTAGGTTTAATACAGCCCTGTAAAGT	381	58
	NPC1G13R	CAGGTCACAACCTACGAATGC		
14	NPC1G14F	TCGTCTACTAATCATTTATTTTACCC	300	58
	NPC1G14R	CATGTTACAGGTAGCCAGCTC		

15-16	NPC1G15-16F NPC1G15-16R	CCTGTGCTGGCTCCTTGAT ATCTCCTTCCCAGGCTGTCT	559	58
17	NPC1G17F NPC1G17R	AATTGGACTCCTGGTGCTG CTGGAAACCCTGTCACCATT	394	58
18	NPC1G18F NPC1G18R	CTGGCACCTCTTATTCTCC GCATAAAAACAACCTTTCCAAGAA	400	58
19	NPC1G19F NPC1G19R	AAGTGCTCATGTAGTTTTCTTTGA ACACAGGGAGACCCAGCTTT	376	58
20	NPC1G20F NPC1G20R	TGACATGTGGCTGAAGCTTTT AGAGACGTTCCCATGCAACT	400	58
21	NPC1G21F NPC1G21R	CTTATCTGGGGCCTTCTTC CTGTGCTCAGAATGGAGCAG	486	58
22	NPC1G22F NPC1G22R	TTTCTGCAAGGGATGTTTCC CACTCATCCTGCCTCTCCAT	496	58
23	NPC1G23F NPC1G23R	GGTGTGATGGAGGCCTTGTA TTCATGAATTGCCTGAAAGC	398	58
24	NPC1G24F NPC1G24R	GTGGCGTGACCTGTTAAT TCAAATGACCATTAGTATGAGTTCAA	419	58
25	NPC1G25F NPC1G25R	AGGCTGGTCTCAAGCAATTC AGTTCACAGGCGCTACGTTT	359	58

Εξόνιο	Ονομασία	Εκκινητές 5'-3'	Μήκος	Θερμακρασία PCR
NPC2 1	NPC2G1F NPC2G1R	GCT GTG GTT ACT GGT GAC AGG TCC AAG GCT CAG CCT GGC CG	325	62
2	NPC2G2F NPC2G2R	CTA AAT GGG AGA GCA GAG CAC CCC TCC ATT CCC ATG CTT ATT C	292	62
3	NPC2G3F NPC2G3R	ATG CTT GCA CTG TGC TAG TAC TGA TGC CTA ACA CCG CAC CTA	477	60
4	NPC2G4F NPC2G4R	GGA GTT AGG AAG TTT GCT ACT G TGG CAC TGA TTT AGT TTC AGT C	267	60
5	NPC2G5F NPC2G5R	GCC CTG ACA GTG GAG GAA AG GGC CTG CCT TCC ATG GTT CT	536	62

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια *NPC1* και *NPC2*

Κατά την διαδικασία της PCR ακολουθήσαμε τη διαδικασία που παρατίθεται παρακάτω για κάθε εξόνιο ξεχωριστά:

Σε τελικό όγκο 50μl αναμειγνύονται:

- 1 μl dNTP's (200μM)*
- 1 μl από τα διαλύματα των 2 εκκινητών για το συγκεκριμένο εξόνιο (0,4μM έκαστο)
- 0,25 μl GoTaq πολυμεράση (Promega) (1,25U)
- 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος GoTaq buffer (Promega)
- 1 μl DNA (25-50ng)
- 4μl MgCl₂ 25mM (2mM)

- 32,75 μl dH₂O

*Στις παρενθέσεις δίνεται η συγκέντρωση της ουσίας στο τελικό διάλυμα.

Με βάση τη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών κάθε εξονίου (Πίνακας 7), από την οποία –όπως προαναφέρθηκε- εξαρτάται η θερμοκρασία ανασύστασης κάθε κύκλου PCR, για την ανάλυση όλων των εξονίων και των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου *NPC1* απαιτήθηκε η διενέργεια PCR σε 4 διαφορετικές συνθήκες και 2 διαφορετικές συνθήκες για το γονίδιο *NPC2*.

Οι συνθήκες PCR για το *NPC1* ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη στους 96 ° C για 5'

32' κύκλοι PCR που περιλαμβάνουν

- αποδιάταξη στους 96 ° C για 30''
- ανασύσταση στους T_m για 30'' (T_m= 54 ή 58 ή 60 ή 62 ° C ανάλογα με τους εκκινητές)
- επιμήκυνση στους 72 ° C για 20''
- τελική επιμήκυνση στους 72 ° C για 5'

Οι συνθήκες PCR για το *NPC2* ήταν:

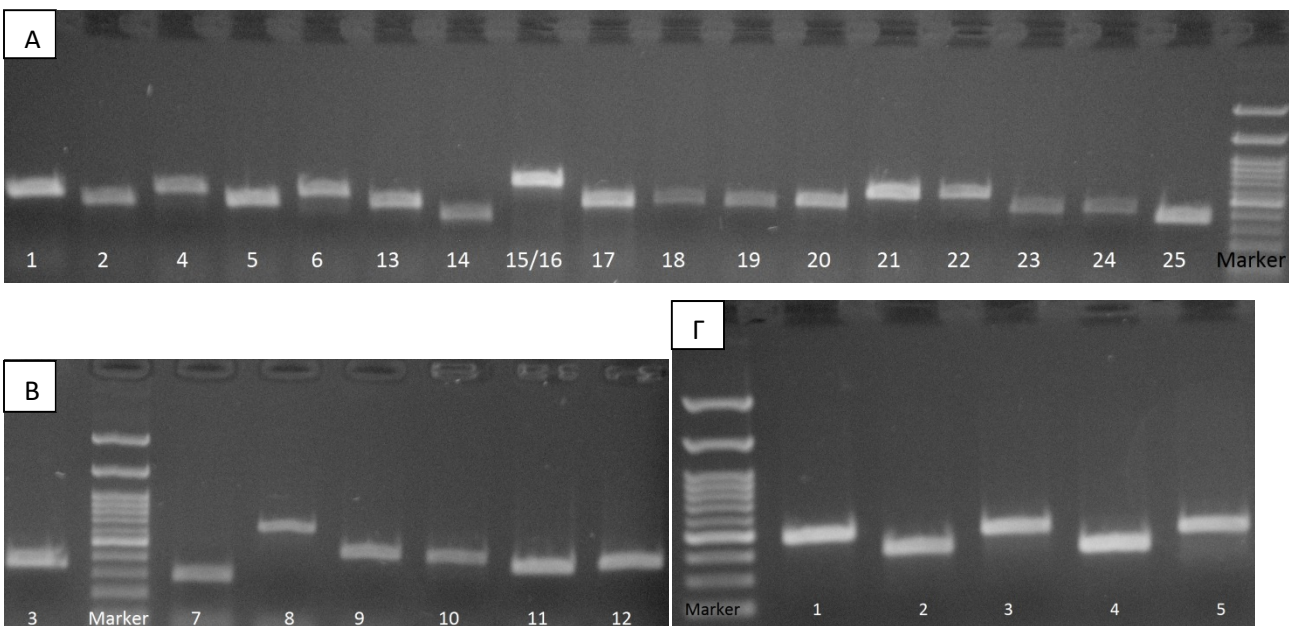
- Αρχική αποδιάταξη στους 96 ° C για 5'

40' κύκλοι PCR που περιλαμβάνουν

- αποδιάταξη στους 96 ° C για 60''
- ανασύσταση στους T_m για 60'' (T_m= 60 ή 62 ° C ανάλογα με τους εκκινητές)
- επιμήκυνση στους 72 ° C για 60''
- τελική επιμήκυνση στους 72 ° C για 5'

6.3.4 Έλεγχος των προϊόντων της PCR

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως και παραπάνω. Από κάθε προϊόν PCR 10 μl αναμείχθηκαν με 2 μl χρωστικής και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ανάλογες θέσεις επάνω στο πήκτωμα. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση και φωτογράφιση. Η ζώνη που προέκυπτε στην φωτογράφιση αντιστοιχούσε σε μέγεθος στην κάθε περιοχή που πολλαπλασιάσαμε. Το μέγεθος ελέγχονταν με την παράλληλη χρήση ειδικού δείκτη (marker), ο οποίος είχε τοποθετεί και αυτός σε μια από τις θέσεις στο πήκτωμα αγαρόζης και είχε ηλεκτροφορηθεί. Ο δείκτης αυτός δίνει στο πήκτωμα διαφορετικές ζώνες, που αντιστοιχούν σε διαφορετικό μέγεθος γενετικού υλικού. (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Στην εικόνα βλέπουμε τις ζώνες που προέκυψαν κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Α: παρουσιάζονται τα εξόνια 1,2,4-6 και 13-25 του *NPCI* παράλληλα με τον ειδικό δείκτη για 1 από τα δείγματά μας Β: απεικονίζονται εξόνια: 3 και 7-12 του *NPCI* για το ίδιο δείγμα Γ: εξόνια 1-5 του *NPC2* ενός άλλου δείγματός μας.

6.3.5 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR, ώστε να ακολουθήσει η περαιτέρω ανάλυσή τους, πραγματοποιήθηκε με στήλες (εμπορικό kit: High Pure PCR Product Purification kit, Roche Diagnostics).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Ανάμειξη σε καθαρό σωληνάριο eppendorf του συνολικού προϊόντος της PCR με 200 μl διαλύματος Binding Buffer.
2. Μεταφορά του διαλύματος σε νέο σωληνάριο στο οποίο έχει προσαρμοστεί ειδική στήλη με διηθητική μεμβράνη (High Pure Filter Tube).
3. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 13,000 xg.
4. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής, που περιείχε το διάλυμα που φυγοκεντρήθηκε στο προηγούμενο βήμα, και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο.
5. Καθαρισμός προϊόντος με προσθήκη 500 μl διαλύματος Wash Buffer.
6. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14,000 xg.
7. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο.
8. Καθαρισμός προϊόντος με προσθήκη 200 μl διαλύματος Wash Buffer.
9. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14,000 xg.
10. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο eppendorf 1,5 ml.
11. Προσθήκη 100 μl διαλύματος Elution Buffer.
12. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 14,000 xg.
13. Φύλαξη του καθαρισμένου προϊόντος PCR στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

6.3.6 Άμεση αλληλούχιση της γενωμικής περιοχής (Sequencing) κατά Sanger

Για τον προσδιορισμό των γενωμικών περιοχών που DNA, που πολλαπλασιάσαμε με PCR, ακολούθησε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing) με τη μέθοδο κατά Sanger.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το προς ανάλυση τμήμα του DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων αντιγράφων, τα οποία έχουν το ίδιο σημείο έναρξης αλλά διακόπτονται σε διαφορετικές θέσεις. Πραγματοποιείται επομένως μία νέα PCR (Cycle Sequencing), στην οποία χρησιμοποιούνται επιπλέον τροποποιημένα δεσοξυνουκλεοτίδια, τα οποία ονομάζονται διδεσοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), καθώς και 4 διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές (μία για κάθε βάση). Κατά την ενσωμάτωση των διδεσοξυνουκλεοτιδίων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα εμποδίζεται η περαιτέρω επιμήκυνσή της, καθώς αναστέλλεται ο σχηματισμός του φωσφοδιεστερικού δεσμού, με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μίγμα από σεσημασμένες αλυσίδες διαφορετικού μήκους.

Τα τελικά προϊόντα της ανωτέρω αντίδρασης αναλύονται όλα μαζί μέσω αυτοματοποιημένων γενετικών αναλυτών (DNA Sequencers), στους οποίους πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση με τριχοειδή. Στη συνέχεια ανιχνεύουν και καταγράφουν τον φθορισμό χρώματος και τα δεδομένα εξόδου ως χρωματογραφήματα κορυφής φθορίζοντων ιχνών, με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων. Τελικά, η αλληλουχία που αναλύεται εμφανίζεται με τη μορφή κορυφών (peaks) διαφορετικού χρώματος, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις βάσεις του DNA.

6.3.6.a Αντίδραση αλληλουχίας Cycle Sequencing (θερμοκύκλοι και σήμανση)

Η αντίδραση Cycle Sequencing, εκτελέστηκε σε αυτοματοποιημένο θερμικό κυκλοποιητή τύπου PerkinElmer, ακολουθώντας την διαδικασία, που παρατίθεται παρακάτω. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ίδιοι με αυτούς της αντίδρασης PCR (Πίνακας 7). Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται ένας εκκινητής από το κάθε ζεύγος -είτε ο forward είτε ο reverse-.

Σε τελικό όγκο 20 μl αναμειγνύονται:

- 4 μl Ready Reaction Premix (2,5X)
- 2 μl BigDye Sequencing Buffer (5X)
- 0,3 μl διαλύματος εκκινητή (0,4μM)
- 1 μl Template (καθαρισμένο PCR product)

- 12,7 μl dH₂O

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν οι ακόλουθες για όλες τις γενωμικές περιοχές που ελέχθησαν:

- Αρχική αποδιάταξη στους 96 ° C για 1' και στη συνέχεια 25' κύκλοι PCR που περιλαμβάνουν:
- αποδιάταξη στους 96 ° C για 10''
- ανασύσταση στους 50 ° C για 10''
- επιμήκυνση στους 60° C για 4'

6.3.6.β Καθαρισμός προϊόντων Cycle Sequencing

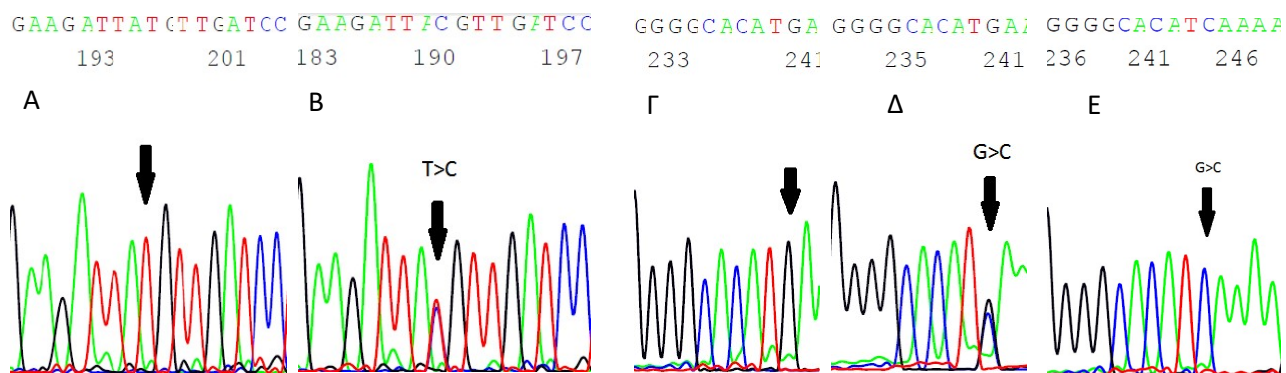
Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Μεταφορά 5 μl διαλύματος EDTA (125 mM) σε σωληνάριο eppendorf 1,5 ml.
2. Προσθήκη του προϊόντος της παραπάνω αντίδρασης.
3. Προσθήκη 60 μl αιθανόλης (100%) και ανάμειξη.
4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'.
5. Φυγοκέντρωση για 10' στους 4 ° C (14000 rpm).
6. Απομάκρυνση του περιεχομένου του σωληναρίου και προσθήκη 60 μl αιθανόλης (75%).
7. Φυγοκέντρωση για 10' στους 4 ° C (14000 rpm).
8. Απομάκρυνση του περιεχομένου.
9. Ανασύσταση σε 15 μl διαλύματος φορμαμιδίου.
10. Θέρμανση των δειγμάτων για 2' στους 92 ° C
11. Άμεση ψύξη σε πάγο για άλλα 2'

6.3.6.γ Ανάλυση των δειγμάτων στον αλληλουχητή γενωμικής ακολουθίας

Η ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο μηχάνημα αλληλούχισης, ABI 310. Τα αποτελέσματα των

αναλύσεων απεικονίστηκαν μέσω των ειδικών προγραμμάτων Chromas lite V.2.1.1 ή AB version 5.2 patch2 με τη μορφή κορυφών (peaks) διαφορετικού χρώματος, καθένα εκ των οποίων αντιστοιχούσε σε μία από τις τέσσερις βάσεις του DNA. Στην ομόζυγη μορφή εμφανιζόταν μία κορυφή που αντιστοιχούσε σε μία από τις τέσσερις βάσεις, ενώ στην ετερόζυγη μορφή προέκυπταν δύο ισο υψείς κορυφές (Εικόνα 14).

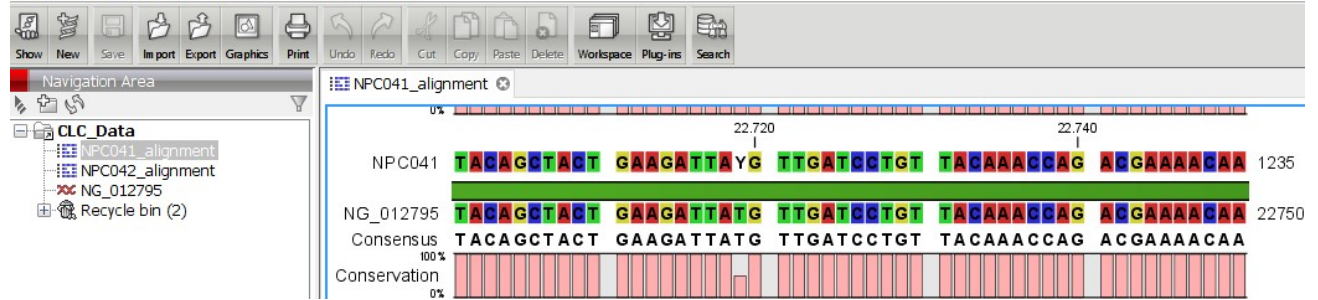


Εικόνα 14: Στην εικόνα εμφανίζεται το αποτέλεσμα του Sequencing τμήματος του γονιδίου *NPC1*, όπου εντοπίζονται 2 πολυμορφισμοί. **Εικόνες Α,Β:** τμήμα της αλληλουχίας του εξονίου 4 **Α:** κυρίαρχο αλλήλιο **Β:** αντικατάσταση της θυμίνης με την κυτοσίνη στο πολυμορφικό αλλήλιο (πολυμορφισμός p.Y129Y). **Εικόνες Γ,Δ,Ε:** τμήμα της αλληλουχίας του εξονίου 12 **Γ:** κυρίαρχο αλλήλιο **Δ:** αντικατάσταση της γουανίνης με κυτοσίνη στο ένα αλλήλιο (ετεροζυγωτία) **Ε:** και στα 2 αλλήλια (ομοζυγωτία) (πολυμορφισμός p.M642I).

6.3.6.δ Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των αλληλουχιών που προέκυψαν με αλληλουχίες αναφοράς των γονιδίων NPC1 και NPC2. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορική CLC Sequence Viewer v.5.1.2. και BLAST (Εικόνα 15). Κάθε αλλαγή που ανιχνεύθηκε διερευνήθηκε τόσο βιβλιογραφικά όσο και σε μεγάλες βάσεις γενωμικών αλλαγών του ανθρώπινου γονιδιώματος (www.hgmd.cf.ac.uk και <http://www.ensembl.org>).

File Edit Search View Toolbox Workspace Help



Εικόνα 15: Απεικονίζεται μέρος της πλατφόρμας επεξεργασίας του λογισμικού CLC Sequence Viewer 5.1.2. Παρουσιάζεται η σύγκριση της αλληλουχίας ενός από τα δείγματά μας με το κυρίαρχο αλληλόμορφο του *NPCI*. Το μικρότερο ύψος της κάθετης στήλης αντιπροσωπεύει τη γενετική αλλαγή στο εξόνιο 4 που παρουσιάστηκε στην Εικόνα 14B (πολυμορφισμός p.Y129Y).

6.3.7 Μελέτη Απλοτύπων

Στον NPC ασθενή 1 ανιχνεύθηκαν 2 καινούριες μεταλλάξεις, όπως θα αναλυθεί στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία αναφορικά με το είδος και τη συχνότητα των γενετικών αλλαγών του γονιδίου *NPCI* στον ελληνικό πληθυσμό. Η μελέτη λοιπόν της προέλευσης των μεταλλάξεων αυτών βασίστηκε στα δεδομένα που προέκυψαν από τη συγκριτική μελέτη των γενετικών αλλαγών στις ομάδες SG και CG. Οι έξι, λοιπόν, εξονικοί πολυμορφισμοί με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μελετήθηκαν περαιτέρω στην ομάδα των συγγενών του NPC ασθενούς 1 (RG1). Στη συνέχεια, η ανάλυση των απλοτύπων διενεργήθηκε μέσω του ειδικού προγράμματος βιοπληροφορικής Haplore (Zhang et al., 2005). Πρόκειται για ένα λογισμικό που λειτουργεί σε περιβάλλον DOS και χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο λογικών κανόνων, ώστε να εκτιμήσει τις συχνότητες όλων των δυνατών απλοτύπων για το κάθε μέλος ενός γενεαλογικού δέντρου. Αρχικά, ελέγξαμε ως προς την ισορροπία Hardy-Weinberg για κάθε πολυμορφισμό, το οποίο βασίζεται στη μαθηματικά αποδεδειγμένη αρχή ότι οι συχνότητες αλληλμόρφων και γονοτύπων σε έναν πληθυσμό θα παραμείνουν σταθερές από γενιά σε γενιά, ελλείψει άλλων εξελικτικών επιρροών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν όσοι πολυμορφισμοί πληρούσαν το κριτήριο και είχαν την απαραίτητη συχνότητα εμφάνισης. Με βάση αυτά τα στοιχεία εισάγαμε τον μαθηματικά κωδικοποιημένο γονότυπο κάθε ατόμου του γενεαλογικού δέντρου, που είχε αναλυθεί. Εφαρμόζοντας τον αντίστοιχο αλγόριθμο καταφέραμε να μελετήσουμε τις συμβατές διαμορφώσεις απλοτύπων που μας ενδιέφεραν (Εικόνα 16). Ωστόσο, καθώς το HAPLORE είναι σχεδιασμένο για τη μελέτη απλής γενεαλογίας (χωρίς βρόγχο), η εισαγωγή και ανάλυση των δεδομένων έγινε μελετώντας το αρχικό γενεαλογικό δέντρο σε 2 απλούστερα.

```

Haplotype Pair 1 is: 3 6
Haplotype Pair 2 is: 2 5

1 74 75 87 1 0
Total number of haplotype pairs is: 2
Haplotype Pair 1 is: 3 6
Haplotype Pair 2 is: 2 5
=====
## The following results list all haplotypes and their frequencies or counts
## ATTENTION: PLEASE REFER to the HELP FILE for MORE DETAILS!!!
=====
The total of 6 haplotypes are:
haplotype 1: 1 1 2 1 0.169600016
haplotype 2: 2 1 2 2 0.197703340
haplotype 3: 2 1 2 1 0.113066660
haplotype 4: 1 1 1 1 0.282666523
haplotype 5: 1 2 2 1 0.236960753
haplotype 6: 1 2 2 2 0.000002578

```

Εικόνα 16:

Απεικονίζεται η μορφή των αποτελεσμάτων που λαμβάνουμε από το λογισμικό HAPLORE για τη διαμόρφωση και τη συχνότητα όλων των πιθανών απλοτύπων στην ομάδα RG1, κατά τη μελέτη προέλευσης των 2 νέων μεταλλάξεων.

6.3.8 Στατιστική Ανάλυση

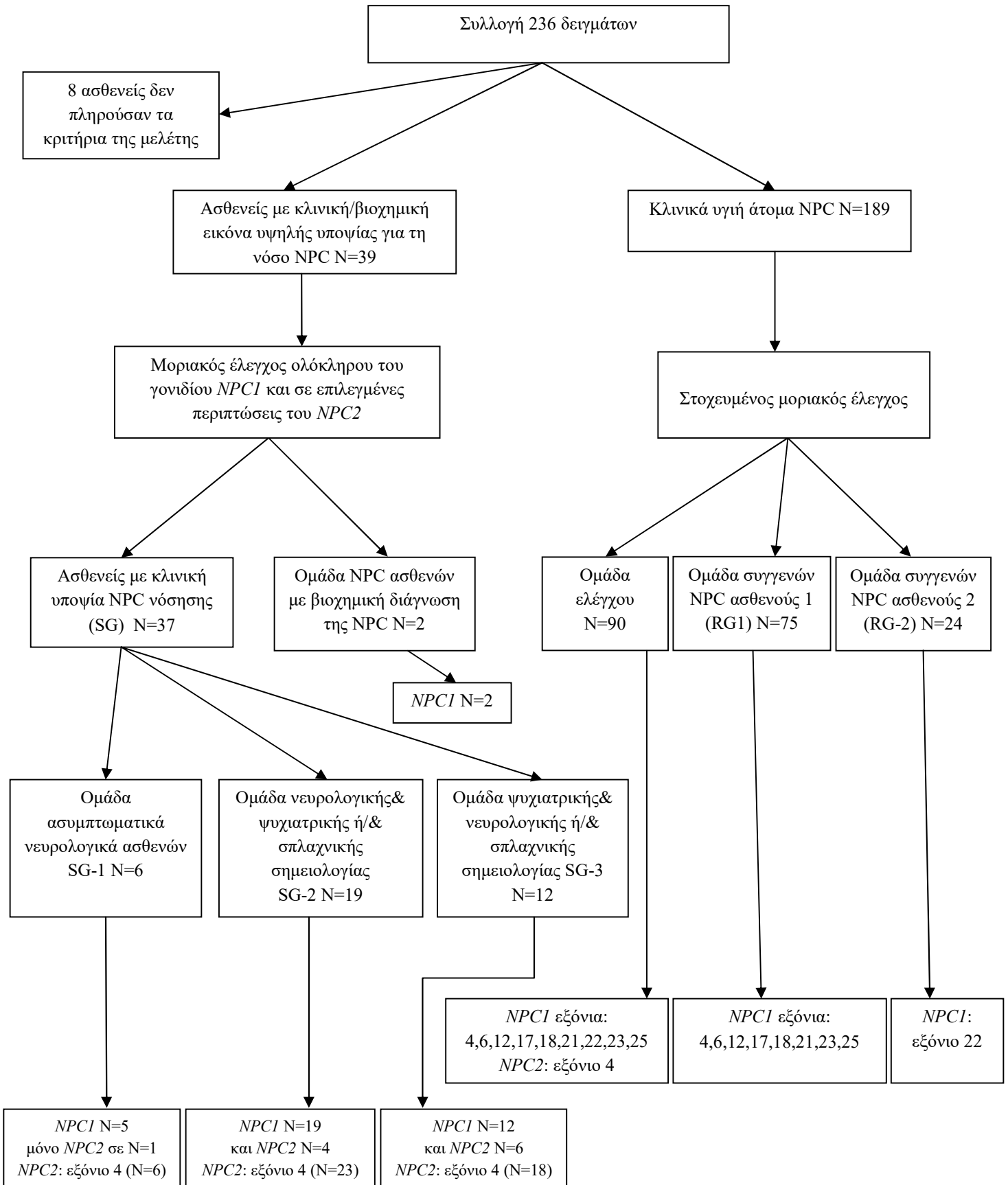
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (έκδοση 22). Τα περιγραφικά δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά και οι συνεχείς μεταβλητές στους πίνακες ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση και διάμεσος με μέγιστη και ελάχιστη τιμή. Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων και των γονοτύπων, που υπολογίστηκαν για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς ελέγχθηκαν για την ισορροπία Hardy-Weinberg. Στη συνέχεια διενεργήθηκε συγκριτικός έλεγχος της συχνότητας εμφάνισης αυτών μεταξύ των ομάδων SG και CG, καθώς και μεταξύ των RG1 και CG αντίστοιχα. Οι συσχετίσεις ανάμεσα στις κατηγοριοποιημένες μεταβλητές έγιναν χρησιμοποιώντας το Chi-Square (χ^2) test, και όπου η αναμενόμενη τιμή των κελιών ήταν κάτω από 5 με το Fisher's exact test. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας το 0,05.

7. Αποτελέσματα

7.1 Αριθμός τελικών δειγμάτων και είδος γενετικού ελέγχου

Συλλέχθηκαν συνολικά 236 δείγματα. Τα 47 αφορούσαν σε ασθενείς με κλινική ή/και βιοχημική εικόνα υψηλής υποψίας για τη νόσο NPC. Οκτώ από τους ασθενείς αποκλείστηκαν από τη μελέτη μετά την ανασκόπηση των ερωτηματολογίων και την επικοινωνία με τον εκάστοτε θεράποντα, λόγω μικρής κλινικής υποψίας για τη νόσο NPC ή ύπαρξης κοινών νοσημάτων που δεν είχαν αποκλειστεί. Δύο δείγματα ανήκαν σε ασθενείς με κλινική εικόνα και βιοχημική δοκιμασία συμβατή με τη νόσο NPC, οπότε μελετήθηκαν ξεχωριστά (ομάδα NPC ασθενών). Στα 39 λοιπόν άτομα των ομάδων SG και NPC, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρου του *NPC1* σε 38 δείγματα, εκ των οποίων 10 ελέγχθηκαν και για γενετικές αλλαγές στο *NPC2*, ενώ σε ένα δείγμα διενεργήθηκε αλληλούχιση μόνο του *NPC2*.

Οι υπόλοιποι 189 συμμετέχοντες ήταν κλινικά υγιή άτομα, που εντάχθηκαν στην ομάδα ελέγχου (CG, N=90) και στην ομάδα συγγενών των NPC ασθενών (RG1, N=75, RG-2, N=24). Στις ομάδες αυτές υλοποιήθηκε στοχευμένος μοριακός έλεγχος, με βάση τα αποτελέσματα από τις ομάδες SG και NPC. Συγκεκριμένα, στην ομάδα CG ελέγχθηκαν τα εξόνια του *NPC1* στα οποία ανιχνεύτηκαν πολυμορφισμοί με υψηλή συχνότητα (εξόνια 4,6,12,17,18,25), τα εξόνια που ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις (εξόνια 21,22,23) και επίσης το εξόνιο 4 του *NPC2*, όπου είχε ανιχνευτεί μία γενετική αλλαγή με μη καθορισμένη κλινική σημασία. Στην ομάδα RG-1 ελέγχθηκαν τόσο τα εξόνια όπου εδράζονταν οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί (4,6,12,17,18,25), όσο και αυτά με τις *NPC1* μεταλλάξεις (21, 23) του NPC ασθενούς 1. Τέλος, στην ομάδα RG-2 διενεργήθηκε έλεγχος μόνο στο εξόνιο 22 του *NPC1*, όπου είχε ταυτοποιηθεί η γενετική βλάβη στον NPC ασθενή 2 (στο διάγραμμα του ακολουθεί δίνονται σχηματικά τα στοιχεία αυτά).



7.2 Κλινικά και δημογραφικά δεδομένα

7.2.1 Ομάδα ασθενών με κλινική/βιοχημική υποψία για τη νόσο NPC (SG)

Συνολικά, τα 37 δείγματα της ομάδας αυτής προέρχονταν από 11 διαφορετικά νοσοκομεία της χώρας (2 από το Παίδων “Αγ. Σοφία”, 5 “Αιγινήτειο”, 7 “Αττικών”, 1 “Γεννηματά”, 1 “Ναυτικό Νοσοκομείο”, 13 Θεσσαλονίκη, 3 Κρήτη, 2 Πάτρα, 1 Αλεξανδρούπολη και 2 Ιωάννινα). Όλα τα άτομα της ομάδας αυτής είχαν Ελληνική καταγωγή. Οι ασθενείς, που παραπέμφθηκαν από νοσοκομεία της επαρχίας, είχαν καταγωγή από την ευρύτερη περιοχή που κάλυπτε το εκάστοτε νοσοκομείο, ενώ αυτοί που παραπέμφθηκαν από την Αττική κατάγονταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι θεράποντες ιατροί που παρέπεμψαν τα περιστατικά ασκούσαν διαφορετικές ειδικότητες: νεογνολογία (2/37), γενική παιδιατρική (6/37), παιδιατρική με εκπαίδευση σε μεταβολικά νοσήματα (3/37), παιδονευρολογία (11/37), γαστρεντερολογία (3/37), νευρολογία (8/37) και ψυχιατρική (4/37).

Τα βασικά δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών, η κατηγοριοποίηση τους σε υποομάδες και οι κλινικές εκδηλώσεις τους συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Συνολικά, συμπεριλήφθησαν 37 ασθενείς, εκ των οποίων 6 ταξινομήθηκαν στην υποομάδα SG-1, 19 στην SG-2 και 12 στην SG-3. Από αυτά 18/37 άνηκαν σε άρρενες (SG-1: 3/6, SG-2: 11/19, SG: 4/12) και τα υπόλοιπα σε θήλεα. Η ομάδα SG-1 απαρτίστηκε από άτομα ηλικίας <2 ετών, ενώ ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών για τις ομάδες SG-2 και SG-3 ήταν 11,6 (+/-7.8) και 37,2 (+/-18,4) και η διάμεσος 10(min-max 3-33) και 38(min-max 13-60) έτη, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος της ηλικίας εμφάνισης της συμπτωματολογίας ήταν 0.45(+/-0.33), 5.0(+/-7.0) και 10.5(+/-9.5) και η διάμεσος 0.5(min-max 0.1-1), 2(min-max 0.1-26) και 12(min-max 1-30) έτη για τις ομάδες SG1-2 και 3 αντίστοιχα.

Η ομάδα SG-1 συμπεριέλαβε άτομα με σπλαχνική μόνο νόσο και ειδικότερα ηπατοσπληνομεγαλία 4/6, χολοστατικό ίκτερο 3/6 και 1/6 πνευμονικά συμπτώματα. Όσον αφορά στον ασθενή με μόνο πνευμονολογικά συμπτώματα, επρόκειτο για θήλυ 12 μηνών με επανειλημμένες πνευμονικές λοιμώξεις για τις οποίες είχε διενεργηθεί πλήρης έλεγχος, χωρίς ανεύρεση της

υποκείμενης αιτίας. Ήταν το 3^ο παιδί φαινοτυπικά υγιών γονέων με κοινή καταγωγή από τη Νότια Κρήτη. Γεννήθηκε με φυσιολογικό τοκετό στις 39 εβδομάδες κύησης και νοσηλεύτηκε στη MENN για 10 ημέρες λόγω δυσκολίας σίτισης. Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του, εμφάνισε ίκτερο και τέθηκε σε φωτοθεραπεία για δύο 24ωρα. Από το οικογενειακό του ιστορικό, τα αδέρφια του απεβίωσαν σε ηλικία 22 και 10 μηνών αντίστοιχα με εικόνα πνευμονικής λοίμωξης. Διενεργήθηκε ενδελεχής έλεγχος στο βιολογικό υλικό των αποθανόντων μελών, χωρίς ωστόσο ανεύρεση υποκείμενης παθολογίας. Έχουν περιγραφεί περιπτώσεις *NPC2* ασθενών μικρής ηλικίας (<12μηνών) με μόνο κλινικό σύμπτωμα επανειλημμένες πνευμονικές λοιμώξεις. Έτσι, σε αυτόν τον ασθενή ελέγχθηκε μόνο το *NPC2*, καθώς η κλινική του συμπτωματολογία δεν στοιχειοθετούσε τη διενέργεια ελέγχου του *NPC1*. Το είδος και η συχνότητα εμφάνισης της σπλαχνικής συμπτωματολογίας ατόμων της ομάδας SG δίνεται σχηματικά στο Γράφημα 1.

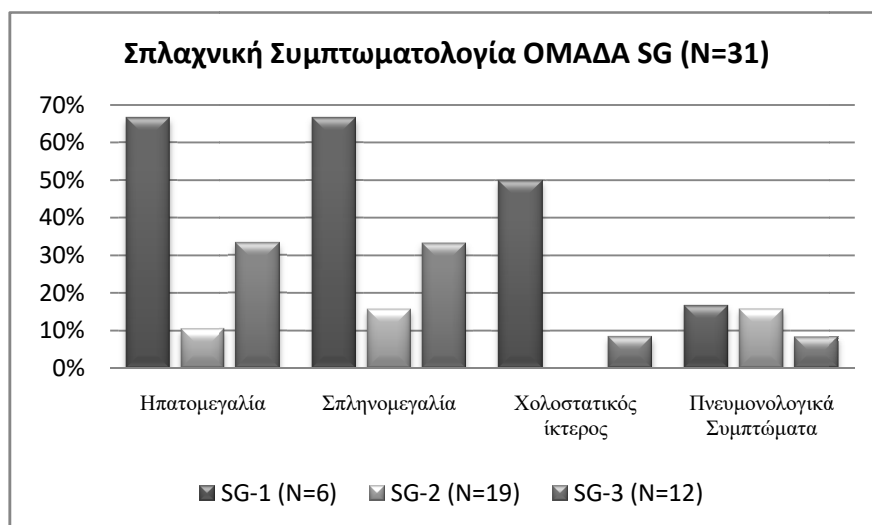
Το προγνωστικό εργαλείο εκτίμησης της κλινικής υποψίας της νόσου NP-SI, εφαρμόστηκε όπως έχει ήδη αναλυθεί, στις ομάδες SG-2 και SG-3. Ο μέσος όρος της βαθμολογίας ήταν 75.3(+/-45) και 109.3(+/-29.4) και η διάμεσος 62(min-max 40-203) και 112 (min-max 70-172), αντίστοιχα. Η ομάδα SG-2 συμπεριέλαβε άτομα με νευρολογική και ψυχιατρική ή/και σπλαχνική (παρούσα ή θετικό ιστορικό) νόσο και η SG-3 άτομα με ψυχιατρική και νευρολογική ή/και σπλαχνική (παρούσα ή θετικό ιστορικό) συμπτωματολογία. Με βάση τα στοιχεία από τα δομημένα ερωτηματολόγια, που συμπληρώθηκαν από τον θεράποντα ιατρό του κάθε ασθενούς, στις ομάδες SG2-3 τα συχνότερα νευρολογικά συμπτώματα ήταν: αταξία (20/31), κάθετη παράλυση βλέμματος (VSGP) (16/31), δυσπραξία (19/31), δυσαρθρία/δυσφαγία (17/31) και επιληψία (15/31). Τα συχνότερο ψυχιατρικό σύμπτωμα ήταν η γνωσιακή έκπτωση/πρώιμη άνοια (22/31), ακολουθούμενο από τις ψυχωτικές εκδηλώσεις (10/31).

Σε δύο από τους ασθενείς της ομάδας SG-2 (SG-205, SG-217) είχε διενεργηθεί δοκιμασία με χρώση φιλιπίνης σε καλλιέργεια ινοβλαστών δέρματος με αμφίβολο αποτέλεσμα. Ο SG-205, ήταν

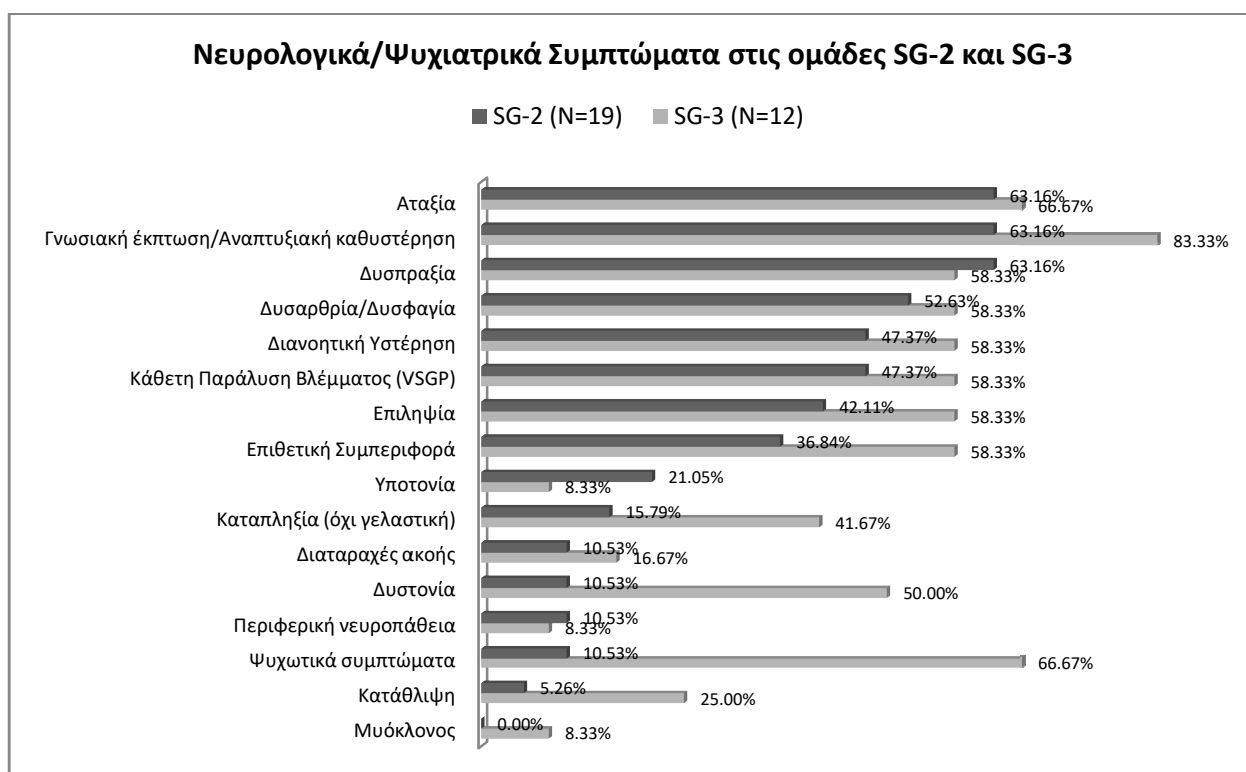
γυναίκα, ηλικίας 21 ετών με NP-SI 203. Η κλινική της εικόνα περιελάμβανε ήπια σπληνομεγαλία, VSGP, επιληψία, αταξία, δυσπραξία, πρόιμη άνοια και επιθετική συμπεριφορά. Η SG-217, ήταν κορίτσι 5 ετών με NP-SI 131. Γεννήθηκε πρόωρα και παρουσίαζε ηπατοσπληνομεγαλία, VSGP, βαρηκοΐα, δυσφαγία, δυσαρθρία, δυστονία, αταξία, επιληπτικές κρίσεις και σφαιρική αναπτυξιακή καθυστέρηση. Το είδος και η συνολική συχνότητα εμφάνισης των νευρολογικών και ψυχιατρικών συμπτωμάτων των ομάδων SG-2 και SG-3, δίδεται σχηματικά στο Γράφημα 2.

		SG-1	SG-2	SG-3
		(n=6)	(n=19)	(n=12)
Φύλο (άρρεν:θήλυ)		3:3	11:8	4:8
Ηλικία (έτη)	mean (SD)	1.15(+/-0.75)	11.6(+/-7.8)	37.2(+/-18.4)
	median (min-max)	1.1 (0.2-2)	10(3-33)	38(13-60)
Ηλικία έναρξης	mean (SD)	0.45(+/-0.33)	5.0(+/-7.0)	10.5(+/-9.5)
συμπτωμάτων (έτη)	median (min-max)	0.5(0.1-1)	2(0.1-26)	12(1-30)
NPC Suspicion Index	mean (SD)	-	75.3(+/-45)	109.3(+/-29.4)
(NP-SI)	median (min-max)	-	62(40-203)	112 (70-172)
Σπλαγχνικές εκδηλώσεις (παρούσα ή ιστορικό)				
Ηπατομεγαλία		4	2	4
Σπληνομεγαλία		4	3	4
Χολοστατικός ίκτερος		3	0	1
Πνευμονολογικά Συμπτώματα		1	3	1
Νευρολογικές εκδηλώσεις				
Κάθετη Παράλυση Βλέμματος (VSGP)		-	9	7
Δυσαρθρία/Δυσφαγία		-	10	7
Διαταραχές ακοής		-	2	2
Δυστονία		-	2	6
Αταξία		-	12	8
Δυσπραξία		-	12	7
Υποτονία		-	4	1
Μυόκλονος		-	0	1
Περιφερική νευροπάθεια		-	2	1
Διανοητική Υστέρηση		-	9	7
Επιληψία		-	8	7
Καταπληξία (όχι γελαστική)		-	3	5
Ψυχιατρικές εκδηλώσεις				
Γνωσιακή έκπτωση/Αναπτυξιακή καθυστέρηση		-	12	10
Ψυχωτικά συμπτώματα		-	2	8
Κατάθλιψη		-	1	3
Επιθετική Συμπεριφορά		-	7	7

Πίνακας 8. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά



Γράφημα 1: Δίδεται σχηματικά το είδος και η συχνότητα εμφάνισης των σπλαχνικών συμπτωμάτων της ομάδας SG, ανάλογα με την κατηγοριοποίησή τους στις υποομάδες.



Γράφημα 2: Δίδεται σχηματικά το είδος και η συνολική συχνότητα εμφάνισης των νευρολογικών και ψυχιατρικών συμπτωμάτων των ομάδων SG-2 και SG-3.

7.2.2 Ομάδα NPC ασθενών

NPC ασθενής 1α

Η NPC ασθενής 1 ήταν ένα κορίτσι 8 ετών χωρίς ουσιαστική νευρολογική συμπτωματολογία, το οποίο παρακολουθούταν από τη διάγνωση του στο παιδονευρολογικό ιατρείο της κλινική μας. Πρόκειται για το πρώτο παιδί φαινοτυπικά υγιών, μη συγγενών γονέων, με καταγωγή από την Κρήτη. Γεννήθηκε με καισαρική τομή, με ηλικία κύησης 39 εβδομάδων και βάρος γέννησης 3.2kg (~47 ΕΘ). Τόσο η εγκυμοσύνη όσο και το περιγεννητικό ιστορικό ήταν χωρίς επιπλοκές. Σε ηλικία 20 ημερών το νεογνό εισήχθη στη νεογνική μονάδα για τη διερεύνηση ίκτερου και ηπατοσπληνομεγαλίας.

Ο αρχικός εργαστηριακός έλεγχος ανέδειξε νεογνική ηπατίτιδα με αυξημένα ηπατικά ένζυμα (SGOT 270U/L, SGPT 69U/L), γ -GT (91U/L), ALP (722U/L), ολική χολερυθρίνη (193.2 $\mu\text{mol/L}$) και άμεση χολερυθρίνη στο 77% της ολικής (148,8 $\mu\text{mol/L}$). Η περαιτέρω διερεύνηση της νεογνικής χολόστασης και ο εκτενής έλεγχος μεταβολικών νοσημάτων ήταν εντός φυσιολογικών ορίων, με εξαίρεση τα αυξημένα επίπεδα χιτοτριουσιδάσης (390 nmol/hr/ml, φ.τ. 0-150 nmol/ml/h). Στη βιοψία μυελού των οστών ανευρέθηκαν αφθώδη κύτταρα συμβατά με τη νόσο NPC. Η νευρολογική εκτίμηση ανέδειξε ήπια καθυστέρηση της κεφαλής, ήπια κορμική υποτονία και ήπια υπεرتونία των άνω άκρων.

Η διάγνωση της νόσου Niemann-Pick τύπου C τέθηκε σε ηλικία 4 μηνών με βιοχημική και κυτταροχημική μελέτη σε καλλιέργεια ινοβλαστών από βιοψία δέρματος, όπου παρουσίασε τον κλασικό βιοχημικό φαινότυπο της νόσου. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία με χρώση φιλιπίνης αποκάλυψε μαζική συσσώρευση μη εστεροποιημένης χοληστερόλης σε περιπυρηνικά κυστίδια. Παράλληλα, στη λειτουργική δοκιμασία εστεροποίησης της LDL-προερχόμενης χοληστερόλης, ο πρώιμος ρυθμός εστεροποίησης ήταν σχεδόν μηδενικός (20 pmol/mg πρωτεΐνη/4,5ώρες, φτ: 2950 ± 1200 pmol/mg/4,5ώρες) (Vanier et al., 1991).

Σε ηλικία 7,5 μηνών τέθηκε σε αγωγή με μιγλουστάτη. Η αγωγή την περίοδο εκείνη (2004-2005) ήταν σε πειραματικό στάδιο όσον αφορά στη νόσο NPC. Η έναρξή της αποφασίστηκε με βάση

την ήπια υποτονία του βρέφους και κυρίως το ανησυχητικό οικογενειακό ιστορικό ενός β' ξαδέρφου, ο οποίος είχε καταλήξει από τη σοβαρή βρεφική μορφή της νόσου, σε νηπιακή ηλικία (αναλύεται παρακάτω). Ο χολοστατικός ίκτερος υποχώρησε σταδιακά σε ηλικία 6 μηνών, αλλά η ηπατοσπληνομεγαλία παρέμεινε, αν και ηπιότερη, κατά τη συνήθη πορεία της. Η υποτονία υποχώρησε πλήρως σε ηλικία ~20 μηνών και περπάτησε περίπου στην ηλικία των 16 μηνών. Η λοιπή σωματική και ψυχοκινητική της εξέλιξη ήταν σύμφωνα με την χρονολογική της ηλικία. Τα ευρήματα των νευροφυσιολογικών, νευροαπεικονιστικών και οφθαλμολογικών εξετάσεων παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων. Όλα αυτά τα χρόνια η νευρολογική εξέταση δεν αποκάλυψε παθολογικά ευρήματα, εκτός από μία ήπια διαταραχή συντονισμού των κινήσεων, που παρατηρήθηκε από την ηλικία των 20 μηνών. Η ήπια αυτή διαταραχή, χωρίς εμφανή νευρολογικά σημεία (αντανακλαστικά, βάδισμα μύτη-πτέρνα, ισορροπία στο ένα πόδι και παρεγκεφαλιδικές δοκιμασίες βρίσκονται εντός φυσιολογικών ορίων), παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου και ως εκ τούτου θα μπορούσε να θεωρηθεί ως εγγενές χαρακτηριστικό και όχι απαραίτητα ως εκδήλωση της νόσου. Γενικά, η θεραπεία, με δόση προσαρμοσμένη στην επιφάνεια σώματος, είναι καλά ανεκτή με εξαίρεση την περιστασιακή παρουσία μαλακών κοπράνων στην έναρξη της αγωγής, που υποχώρησε με προσωρινή δίαιτα χαμηλή σε δισακχαρίτες. Σήμερα, στην ηλικία των 12 ετών, το βάρος της είναι 62 κιλά, το ύψος της είναι 169,5 εκατοστά, έχει φυσιολογική έμμηνο ρύση (με πρόιμη εμμηναρχή στην ηλικία των 10 ετών) και ζει μία φυσιολογική ζωή, παρακολουθώντας επιτυχώς κανονικό σχολείο και συμμετέχοντας σε εξωσχολικές δραστηριότητες, όπως ζωγραφική και γυμναστική (μπαλέτο, κολύμπι και βόλεϊ).

NPC ασθενής 1β

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην πρόιμη κλινική και βιοχημική διάγνωση της NPC ασθενούς 1 συνέβαλλε το κληρονομικό της ιστορικό. Συγκεκριμένα, πρόκειται για έναν β' ξάδερφο, ο οποίος είχε καταλήξει το 1990 στην ηλικία των 3,5 ετών από τη νόσο. Ο ασθενής αυτός, ήταν αγόρι και είχε γεννηθεί μετά από φυσιολογική εγκυμοσύνη, σε τελειόμηνη ηλικία. Οι γονείς του ήταν φαινοτυπικά υγιείς, με κοινή καταγωγή από μία περιοχή της Κρήτης. Μετά τη γέννησή του, είχε νοσηλευτεί λόγω χολοστατικού ίκτερου, ο οποίος υποχώρησε σταδιακά. Ο κλινικός και εργαστηριακός έλεγχος που διενεργήθηκε τότε δεν αποκάλυψε την υποκείμενη νόσο. Ο ασθενής πήρε εξιτήριο με σύσταση για επανεκτίμηση μετά από 3 μήνες. Ωστόσο, ιατρική φροντίδα αναζητήθηκε από τους γονείς ένα χρόνο αργότερα, λόγω της καθυστέρησης κατάκτησης των αναπτυξιακών οροσήμων της ομιλίας και της βάδισης. Ο ασθενής επιδεινώθηκε προοδευτικά, πάσχοντας από τη σοβαρή πρόιμη βρεφική μορφή της νόσου, παρουσιάζοντας γενικευμένη υποτονία, βαριά κινητική καθυστέρηση της ανάπτυξης και ταχεία νευρολογική επιδείνωση. Η διάγνωση της νόσου τέθηκε σε ηλικία 2 ετών με βιοχημική και κυτταροχημική μελέτη σε καλλιέργεια ινοβλαστών από βιοψία δέρματος, όπου αναδείχθηκε ο κλασικός βιοχημικός φαινότυπος της νόσου.

NPC ασθενής 2

Η NPC ασθενής 2 ήταν ένα κορίτσι, το οποίο προσκομίστηκε στο παιδονευρολογικό ιατρείο της κλινική μας σε ηλικία 5 ετών, με βιοχημική δοκιμασία συμβατή με τη νόσο NPC. Πρόκειται για το πρώτο παιδί φαινοτυπικά υγιών, μη συγγενών γονέων, με κοινή καταγωγή από το Εμπόριο Σαντορίνης. Γεννήθηκε σε τελειόμηνη ηλικία στις 4/2/2006, με καισαρική τομή λόγω ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης. Από το ατομικό της ιστορικό αναφέρεται σε ηλικία 2 μηνών λοίμωξη από τον ιό CMV. Ωστόσο, η διάγνωση αυτή τέθηκε κατά τη διερεύνηση μέτριας ηπατοσπληνομεγαλίας και εμμένουσας τρανσαμιναιμίας. Κατέκτησε τα αναπτυξιακά ορόσημα σε φυσιολογικά (προς οριακά)

πλαίσια. Στην ηλικία των δύο ετών επαναξιολογήθηκε λόγω εμμένουσας σπληνομεγαλίας, τρανσαμιναιμίας και εμφάνισης αταξικής βάρδισης, χωρίς να τεθεί διάγνωση. Παρουσίασε προοδευτική επιδείνωση και στις κλινικές εκδηλώσεις προστέθηκε τρόμος, επιβράδυνση των κάθετων σακκαδικών κινήσεων των οφθαλμών, δυσπραξία, δυσαρθρία, σιελόρροια και ψυχοκινητική παλινδρόμηση. Σε ηλικία 5 ετών, μετά από κλινική και εργαστηριακή διερεύνηση στο νοσοκομείο Παίδων “Αγ. Σοφία”, ανευρέθηκαν αυξημένα επίπεδα χιτοτριοσιδάσης (310 nmol/hr/ml, φ.τ. 0-150 nmol/ml/h). Εν συνεχεία τέθηκε βιοχημικά η διάγνωση της νόσου NPC, με την ανάδειξη του κλασικού βιοχημικού φαινότυπου στη δοκιμασία φιλιπίνης. Από τον Ιανουάριο του 2011 ακολουθεί ειδικά προγράμματα φυσιοθεραπείας, λογοθεραπείας και εργοθεραπείας και από την ηλικία των 6 ετών ειδικό σχολείο με παράλληλη στήριξη. Τέθηκε σε αγωγή με μιγλουστάτη τον 6/2011, σε δόση που προσαρμόζεται ανάλογα με την επιφάνεια σώματος.

7.3 Αποτελέσματα μοριακού ελέγχου

Συγκεντρωτικά, η αλληλούχιση του γονιδίου *NPC1* (ομάδες SG και NPC N=39) και *NPC2* (11/37 ασθενείς της ομάδας SG) οδήγησε στην ανίχνευση 26 γενετικών αλλαγών. Από αυτές, 24 εντοπίστηκαν στο *NPC1* και 2 στο *NPC2*. Τρεις *NPC1* γενετικές αλλαγές ήταν νέες μεταλλάξεις, οι οποίες αναμένεται να έχουν επιβλαβή επίδραση στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και ανιχνεύτηκαν στους 2 NPC ασθενείς, επιβεβαιώνοντας τη προηγηθείσα βιοχημική τους διάγνωση. Αντίθετα, στους SG-205 και SG-217 της υπο-ομάδας SG2, οι οποίοι είχαν αμφίβολη δοκιμασία φιλιπίνης, δεν ανιχνεύτηκε παθογενετική αλλαγή. Δύο γενετικές αλλαγές, 1 στο *NPC1* και 1 στο *NPC2*, που ανιχνεύτηκαν σε 2 διαφορετικούς ασθενείς της ομάδας SG σε ετεροζυγωτία, παρουσιάζουν αμφίβολη κλινική σημασία. Τα ανωτέρω αποτελέσματα αναλύονται στη συνέχεια.

7.3.1 Ανιχνευθείσες *NPC1* μεταλλάξεις. NPC ασθενείς και γενεαλογία

Ο NPC ασθενής 1 ταυτοποιήθηκε ως σύνθετος ετεροζυγώτης μίας σημειακής μετάλλαξης στο εξόνιο 21, p.K1057R (*c.3170A>G*) (Εικόνα 18a), που οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος της πρωτεΐνης και μία μετάλλαξη προσθήκης βάσεως στην περιοχή ματίσματος του εξονίου 23, *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*) (Εικόνα 18b). Από τη στοχευμένη μοριακή ανάλυση στους γονείς διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη p.K1057R ήταν μητρικής και η *IVS23+3insT* πατρικής προέλευσης. Ο έλεγχος στους γονείς του αποθανόντος ασθενούς (NPC ασθενής 1β) αποκάλυψε και στους 2 την ίδια μετάλλαξη ματίσματος (*IVS23+3insT*). Κατά συνέπεια, η μετάλλαξη *IVS23+3insT* σε ομόζυγη κατάσταση, ταυτοποιήθηκε έμμεσα ως η υπαίτια γενετική αλλαγή του κλινικού φαινοτύπου του NPC ασθενούς 1β. Και οι δύο μεταλλάξεις δεν ανιχνεύθηκαν στις ομάδες CG (N=90) και SG (N=37), ούτε έχουν δημοσιευτεί στο παρελθόν. Αυτές οι γενωμικές αλλαγές μελετήθηκαν μεταξύ άλλων στην ομάδα συγγενών του NPC ασθενούς RG1, στους οποίους έγινε γενετική συμβουλευτική και ενημέρωση για το νόσημα.

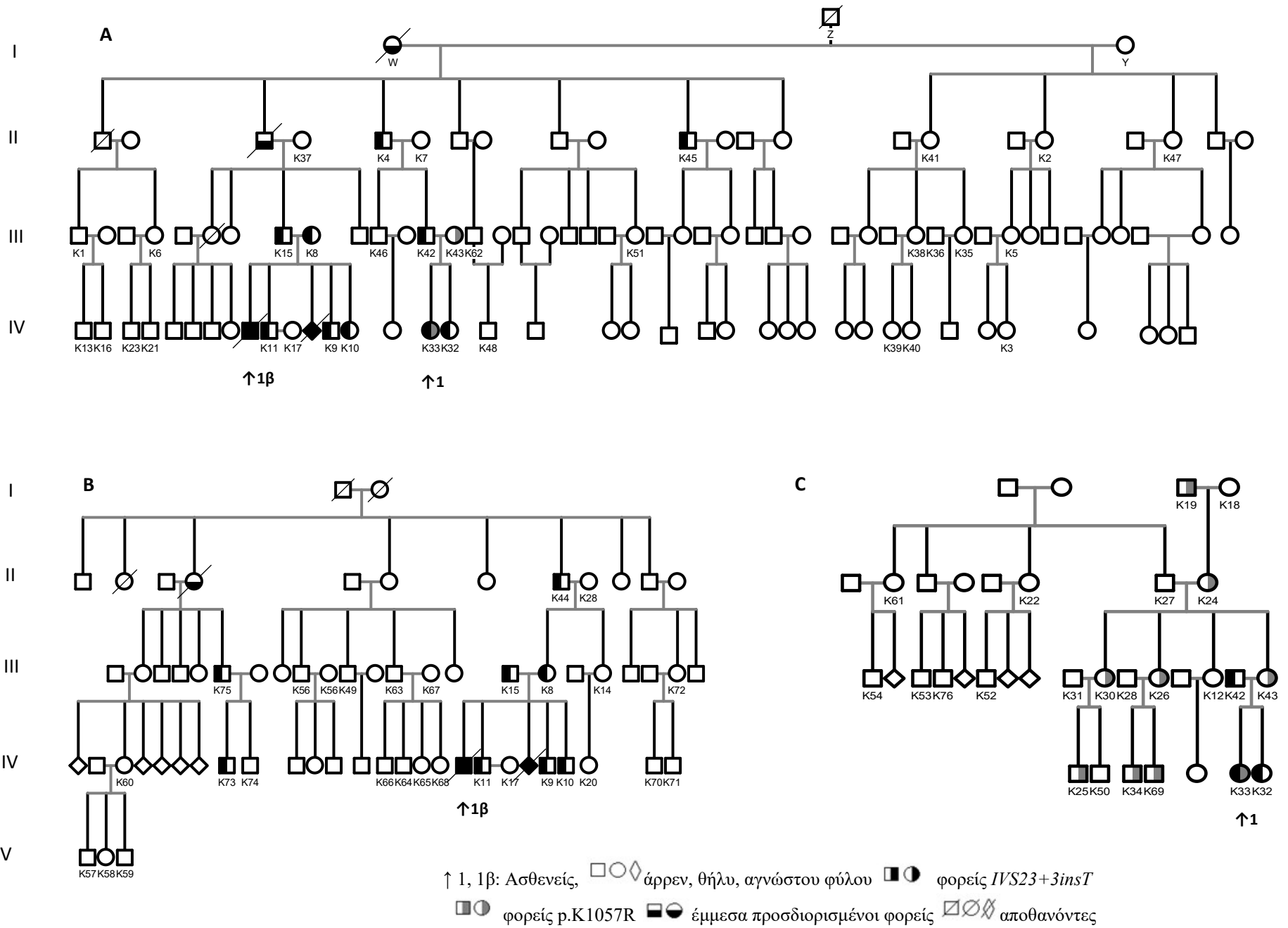
Οι NPC ασθενείς 1 και 1β σχετίζονταν μεταξύ τους όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 17a (δεύτερα ξαδέλφια από την πατρική πλευρά). Τα γενεαλογικά δέντρα των μητέρων του NPC ασθενούς 1β (K8) και του NPC ασθενούς 1 (K43) παρουσιάζονται στα σχήματα 17b και 17c, αντίστοιχα. Μεταξύ των τριών γενεαλογικών δέντρων δε διαπιστώθηκε συγγένεια εξ αίματος. Από τα δείγματα των 75 ατόμων που αναλύθηκαν, 40 ήταν άνδρες (52,6%) και 36 γυναίκες (47,4%). Ταυτοποιήθηκαν 20 φορείς (26,7%), 12 του μεταλλαγμένου αλληλίου *IVS23+3insT* και 8 του *c.3170A>G*. Κανένας από τους φορείς δεν ανέφερε παρούσα ή παρελθούσα σημειολογία συμβατή με τη νόσο NPC.

Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη *IVS23+3insT* εντοπίστηκε στα μέλη των γενεαλογικών δέντρων πατρικής προέλευσης, καθώς και σε αυτό της μητέρας του NPC ασθενούς 1β (12/55, 21,8%). Όλα τα άτομα αυτών των γενεαλογιών (Εικόνες 17a και 17b) -εκτός από τη μητέρα K43- μοιράζονταν κοινή γεωγραφική καταγωγή από μια επαρχιακή περιοχή των Χανίων Κρήτης (οι πρόγονοι και των δύο γονέων (K15, K8) προέρχονταν από δύο περιοχές, με απόσταση ~70 χιλιομέτρων). Οι γονείς του NPC ασθενούς 1β καθώς και τα τρία του αδέλφια ήταν όλοι φορείς της μετάλλαξης και μία εγκυμοσύνη είχε τερματιστεί λόγω θετικών προγεννητικών εξετάσεων για τη νόσο NPC. Ο πρόγονος Z παντρεύτηκε δύο φορές και υποθέτουμε ότι η W έφερε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *IVS23+3insT*, καθώς κανένας απόγονος της Y δεν έφερε τη μετάλλαξη.

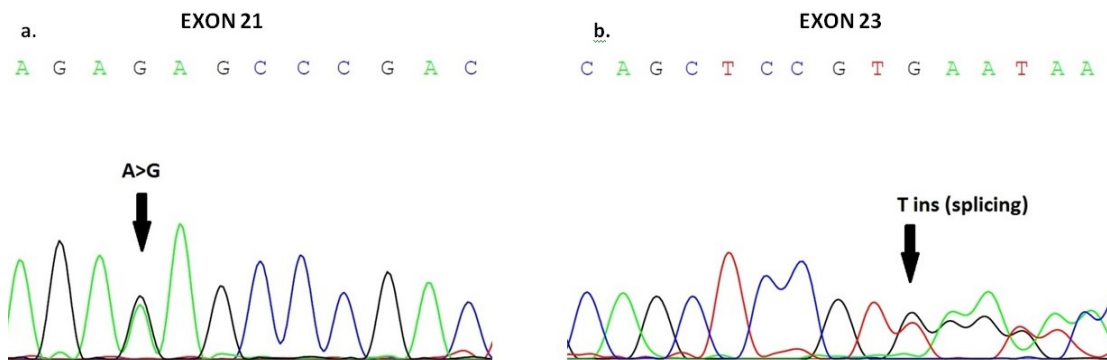
Αναφορικά με τη μετάλλαξη p.K1057R, αυτή ανιχνεύθηκε μόνο σε μέλη του μητρικού γενεαλογικού δέντρου του NPC ασθενούς 1 (8/21, 38,1%) (Εικόνα 17c). Το γενεαλογικό αυτό δέντρο δεν ήταν εφικτό να διερευνηθεί σε βάθος, καθώς δεν κατοικούσαν άλλοι συγγενείς στο νησί. Διαπιστώσαμε ότι η μετάλλαξη αυτή προερχόταν από έναν πρόγονο με καταγωγή από τη Μικρά Ασία. Οι γονείς του ανήκαν στον Ελληνισμό της Διασποράς, που εγκαταστάθηκε στις ακτές της Μικράς Ασίας πριν από αιώνες. Μετά την Καταστροφή της Μικράς Ασίας, το 1922, εξαναγκάστηκαν να μετοικήσουν στην Κρήτη. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει τον προσδιορισμό της προέλευσης της νέας αυτής μετάλλαξης.

Αναφορικά με την NPC ασθενή 2, προσδιορίστηκε και στα δύο αλληλόμορφα του εξονίου 22 η σημειακή μετάλλαξη p.A1132P (c.3394G>C) ως το γενετικό υπόβαθρο της NPC νόσου. Ο γονικός μοριακός έλεγχος επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα, καθώς και οι δύο γονείς ταυτοποιήθηκαν ως φορείς του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (Εικόνα 20). Επρόκειτο για μια νέα παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, η οποία δεν εντοπίστηκε στα άτομα των ομάδων CG (N=90) και SG (N=37). Εντούτοις, μεταγενέστερη δημοσίευση της εργαστηριακής ανάλυσης της παρούσας διατριβής αναφέρεται σε αυτή την παθογενετική αλλαγή (Mavridou et al., 2014).

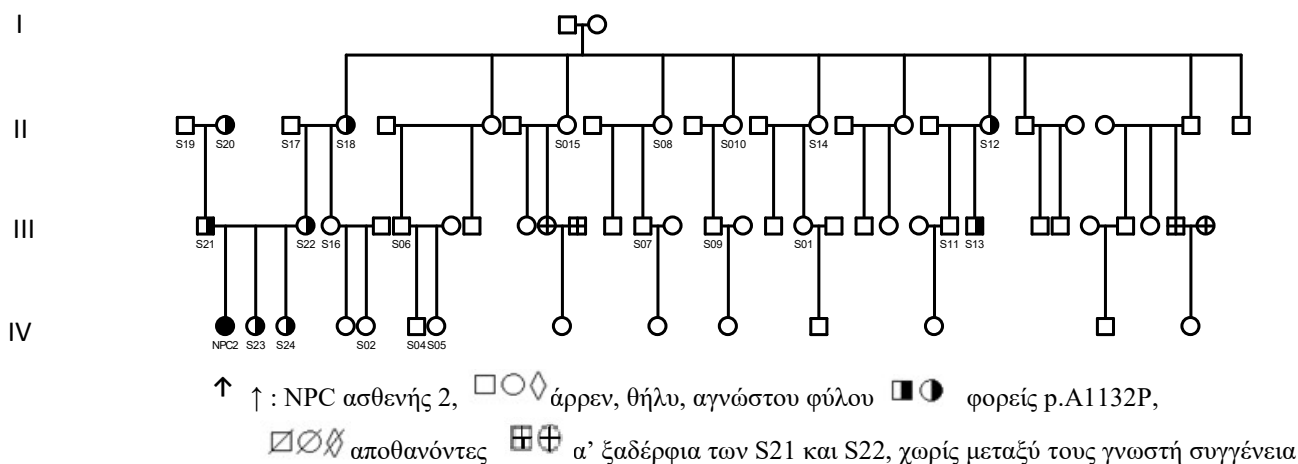
Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται το γενεαλογικό δέντρο της NPC ασθενούς 2. Μεταξύ των 24 ατόμων, στα οποία διενεργήθηκε ο στοχευμένος μοριακός έλεγχος, 9 ήταν άρρενες (37,5%) και 15 θήλεα (62,5%). Με βάση τα δεδομένα που συλλέχτηκαν από τα ερωτηματολόγια και το σύντομο ιατρικό ιστορικό δεν προέκυψε γνωστή συγγένεια. Ενδιαφέρουσα ωστόσο είναι η πληροφορία για ιστορικό μεμονωμένης σπληνομεγαλίας στη μητέρα της ασθενούς (φορέας). Από τους υπόλοιπους φορείς δεν προέκυψαν άλλες αναφορές σε συμπτωματολογία συμβατή με τη νόσο. Η παθογενετική αλλαγή ανιχνεύτηκε σε 8 δείγματα (33,3%). Όλα τα μέλη του γενεαλογικού δέντρου είχαν καταγωγή - τουλάχιστον από τη μία γονική πλευρά- από το Εμπόριο Σαντορίνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν 2 γάμοι μεταξύ 4 πρώτων ξαδέρφων των γονέων της NPC ασθενούς 2, χωρίς εμφανή συγγένεια μεταξύ τους. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το νόσημα και έγινε γενετική συμβουλευτική.



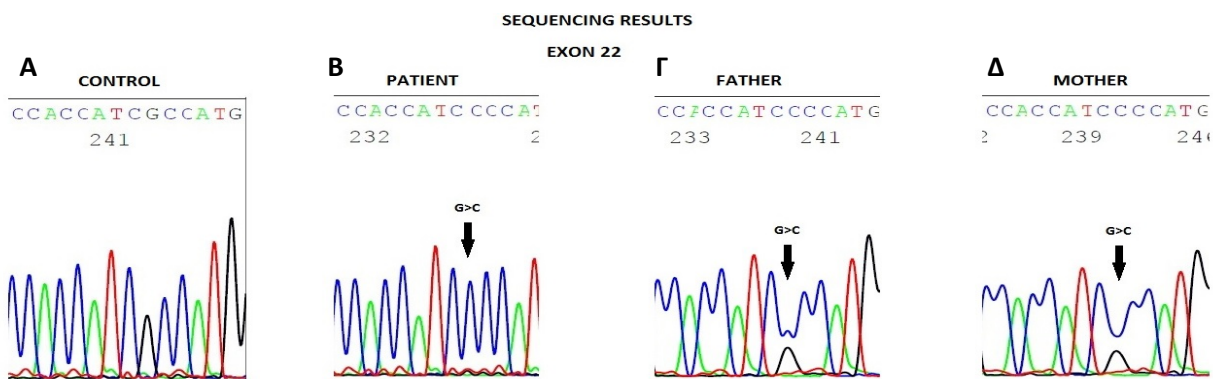
Εικόνα 17: Γενεαλογικά δέντρα **A:** των πατέρων των NPC ασθενών 1 και 1β, **B:** της μητέρας του NPC ασθενούς 1β **C:** της μητέρας του NPC ασθενούς 1



Εικόνα 18: Στην εικόνα εμφανίζεται το αποτέλεσμα του Sequencing των εξονίων του γονιδίου *NPCI* του NPC ασθενούς 1, όπου εντοπίζονται οι 2 νεοανιχνευθείσες μεταλλάξεις. **A:** τμήμα της αλληλουχίας του εξονίου 21 όπου φαίνεται η αντικατάσταση της αδενίνης σε γουανίνη στη θέση του νουκλεοτιδίου 3170 [p.K1057R (c.3170A>G)] **B:** φαίνεται η εισαγωγή μίας θυμίνης στην περιοχή ματίσματος του εξονίου 23 [*IVS23+3insT* (c.3591+3insT)]



Εικόνα 19: Γενεαλογικό δέντρο του NPC ασθενούς 2



Εικόνα 20: Στην εικόνα εμφανίζεται το αποτέλεσμα του Sequencing τμήματος της αλληλουχίας του εξονίου του *NPCI* γονιδίου, όπου εντοπίζεται η νέα μετάλλαξη [p.A1132P (c.3394G>C)] στον NPC ασθενή 2. **A:** κυρίαρχο αλληλίο **B:** αντικατάσταση της γουανίνης με την κυτοσίνη στο παθολογικό αλληλίο σε ομοζυγωτία (NPC ασθενής 2). **Γ&Δ:** αντικατάσταση της γουανίνης με την κυτοσίνη στο παθολογικό αλληλίο σε ετεροζυγωτία (πατέρας και μητέρα ασθενούς αντίστοιχα).

7.3.2 Πολυμορφισμοί. Ομάδες SG, CG, NPCασθενής1/RG1

Από τους 21 πολυμορφισμούς που ανιχνεύτηκαν στο *NPC1*, 9 εδράζονται σε εξόνια και 12 σε εσόνια. Οι ιντρονικοί πολυμορφισμοί *IVS7-16C>T* και *IVS20+22G>C* δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Δύο γενετικές παραλλαγές p.Y129Y (c.387T>C) και p.N931N (c.2793C>T), που δεν οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος της τελικής πρωτεΐνης (συνώνυμες) και τέσσερις, που καταλήγουν σε αλλαγή του αντίστοιχου αμινοξέος (παρερμηνεύσιμες) p.H215R (c.644A>G), p.M642I (c.1926G>C), p.I858V (c.2572A>G) και p.R1266Q (c.3797G>A) ήταν οι συχνότεροι εξονικοί πολυμορφισμοί του *NPC1* στην ομάδα SG. Αυτοί εδράζουν στα εξόνια 4,6,12,17,18,25 αντίστοιχα και μελετήθηκαν περαιτέρω στις ομάδες CG και RG1. Επιπρόσθετα, σε ένα δείγμα της υπό-ομάδας SG2 ανιχνεύτηκε η παρερμηνεύσιμη γενετική αλλαγή p.P237S (c.709C>T). Επρόκειτο για άρρενα ηλικίας 22 ετών (SG-206) με NP-SI 137, που παρουσίαζε ηπατοσπληνομεγαλία, προοδευτική αταξία, δυσπραξία, πρόωμη άνοια, επιληπτικές κρίσεις και ιστορικό πνευμονοπάθειας. Ο ασθενής αυτός ελέγχτηκε και με αλληλούχιση του γονιδίου *NPC2*, στο οποίο δεν εντοπίστηκε γενετική αλλαγή. Η αλλαγή αυτή, που εδράζει στο εξόνιο 6, δεν ανιχνεύτηκε στα υπόλοιπα άτομα της ομάδας SG καθώς και στις ομάδες CG, NPC ασθενείς/RG1, όπου αλληλουχήθηκε το εξόνιο 6 (N=202). Βιβλιογραφικά είχε αναφερθεί στο παρελθόν ως παθογόνος μετάλλαξη, σε μεταγενέστερες μελέτες όμως αντικρούστηκε η παθογονικότητά της (Blom et al., 2003, Yamamoto et al., 1999, Millat et al., 2001b, Kaminski et al., 2002, Sun et al., 2001, Park et al., 2003).

Η κατανομή των γονότυπων καθώς και των αλληλόμορφων των υπό μελέτη πολυμορφισμών, που ανιχνεύθηκαν στην ομάδα SG, καθώς και αυτοί που μελετήθηκαν περαιτέρω στις ομάδες CG, NPCασθενής1/RG1 παρουσιάζονται στους Πίνακες 9-12. Παρατηρήσαμε ότι όλοι οι Έλληνες φορείς του πολυμορφισμού p.N931N έφεραν στο γονότυπό τους και τον πολυμορφισμό p.M642I, σε αντίθεση με τους γονότυπους, που έχουν ανιχνευτεί σε άλλες μελέτες στη Νότια Ευρώπη (Ribeiro et al., 2001, Fernandez-Valero et al., 2005). Επιπροσθέτως, το αλληλόμορφο c.2793C>T (p.N931N) συνοδευόταν πάντοτε από τον ιντρονικό πολυμορφισμό *IVS18+70A>G*.

Οι γονοτυπικές συχνότητες των 3 ομάδων της μελέτης (SG, CG, NPCασθενής1/RG1) ελέχθησαν για το αν ακολουθούσαν την ισορροπία Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium). Εκτός από τον πολυμορφισμό p.N931N στο εξόνιο 18 για την ομάδα SG και τον p.I858V στο εξόνιο 17 για την ομάδα NPCασθενής1/RG1(N=76), δε διαπιστώθηκε άλλη διαφορά στην κατανομή των πολυμορφισμών. Το δείγμα, πλην των 2 αυτών περιπτώσεων, θεωρείται γενετικά ισορροπημένο καθώς για όλους τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς το p-value ήταν >0,05. Ο έλεγχος της γενετικής ισορροπίας του δείγματος σύμφωνα με τις αναμενόμενες συχνότητες όσον αφορά στον συνολικό πληθυσμό παρουσιάζεται επίσης στους Πίνακες 9-12.

Όσον αφορά στο *NPC2* ανιχνεύτηκαν δύο γενετικές αλλαγές. Η μία ήταν η *IVS4+IG>A* (rs140130028), η οποία αν και δεν έχει θεωρηθεί παθογόνος όσον αφορά στη νόσο NPC, παρουσιάζει αμφίβολη κλινική σημασία και εντοπίστηκε στην περιοχή ματίσματος του εξονίου 4 σε μία ασθενή της υποομάδας SG2 σε ετερόζυγη μορφή. Επρόκειτο για γυναίκα ηλικίας 33 ετών (SG-202), με NP-SI 75. Παρουσίαζε προοδευτική και φαρμακοανθεκτική κατάθλιψη, περιφερική νευροπάθεια και VSGP. Τα υπόλοιπα άτομα της ομάδας SG καθώς και η ομάδα CG ελέχθησαν επίσης για αυτήν την αλλαγή, η οποία δεν ανιχνεύτηκε ξανά (N=136). Η δεύτερη γενετική παραλλαγή ήταν η *IVS3+117_119insCAG*, η οποία δεν αναμένεται να είναι παθογενετική, εντοπίστηκε στην περιοχή του εσονίου 3. Πρόκειται για προσθήκη μίας τριπλέτας βάσεων (CAG) μεταξύ των θέσεων 117 και 119 από το τέλος του εξονίου 3. Στα δείγματα που αναλύθηκαν για το *NPC2* (N=12), παρατηρήθηκε σε 5 (45,45%) σε ετερόζυγη και σε 1 σε ομόζυγη κατάσταση (9,09%) (συχνότητα κυρίαρχου και μη αλληλίου 68,18% και 31,82% αντίστοιχα).

Πίνακας 9: Συχνότητα αλληλομόρφων, κατανομή γονοτύπων και έλεγχος γενετικής ισορροπίας των εξονικών πολυμορφισμών στην ομάδα SG (SG1-2&3)

Εξόνιο	rs#	c DNA	Πρωτεΐνη	Είδος	Αλληλόμορφα (N=72)		Γονότυπος (N=36)		HW Αναμενόμενο	x ²	p	
4	rs12970899	c.387T>C	p.Y129Y	Συνώνυμη	T:51/72	70.83%	TT	17	47.22%	18.10	0.734	0.391
					C:21/72	29.17%	TC	17	47.22%	14.90		
							CC	2	5.56%	3.10		
5	rs15108468 ₃	c.612C>T	p.T204T	Συνώνυμη	C:71/72	98.61%	CC	35	97.22%		ME	ME
					T:1/72	1.39%	CT	1	2.78%	ME		
							TT	0	0.00%	ME		
6	rs1805081	c.644A>G	p.H215R	Παρερμηνεύσιμη	A:47/72	65.28%	AA	15	41.67%	15.30	0.062	0.802
					G:25/72	34.72%	AG	17	47.22%	16.30		
							GG	4	11.11%	4.30		
12	rs80358251	c.709C>T	p.P237S	Παρερμηνεύσιμη	C:71/72	98.61%	CC	35	97.22%		ME	ME
					T:1/72	1.39%	CT	1	2.78%	ME		
							TT	0	0.00%	ME		
13	rs11301308 ₅	c.2073G>A	p.P691P	Συνώνυμη	G:19/72	26.39%	GG	4	11.11%	2.50	1.640	0.200
					C:53/72	73.61%	GC	11	30.56%	14.00		
							CC	21	58.33%	19.50		
17	rs1805082	c.2572A>G	p.I858V	Παρερμηνεύσιμη	G:71/72	98.61%	GG	35	97.22%		ME	ME
					A:1/72	1.39%	GA	1	2.78%	ME		
							AA	0	0.00%	ME		
18	rs1140458	c.2793C>T	p.N931N	Συνώνυμη	A:34/72	47.22%	AA	6	16.67%	8.00	1.838	0.175
					G:38/72	52.78%	AG	22	61.11%	17.90		
							GG	8	22.22%	10.00		
25	rs1805084	c.3797G>A	p.R1266Q	Παρερμηνεύσιμη	C:43/72	59.72%	CC	14	38.89%	14.00	0.646	0.422
					T:29/72	40.28%	CT	15	41.67%	15.00		
							TT	7	19.44%	7.00		
					G:68/72	94.44%	GG	32	88.89%	32.00	0.125	0.724
					A:4/72	5.56%	GA	4	11.11%	4.00		
							AA	0	0.00%	0.00		

ME: μη εφαρμόσιμο

Πίνακας 10: Συχνότητα αλληλομόρφων, κατανομή γονοτύπων και έλεγχος γενετικής ισορροπίας ιντρονικών πολυμορφισμών στην ομάδα SG (SG1-2&3)

rs#	c DNA	Αλληλόμορφα (N=72)		Γονότυπος		HW Αναμενόμενο	x ²	p	
rs2303880	IVS1-22A>G	A:67/72	93.06%	AA	31	86.11%	ME	ME	
		G:5/72	6.94%	AG	5	13.89%			
				GG	0	0/36			
Nέα αλλαγή	IVS 7-16C>T	C:71/72	98.61%	CC	35	97.22%	ME	ME	
		T:1/72	1.39%	CT	1	2.78%			
				TT	0	0.00%			
rs14446978 ₄	IVS7-40T>A	T:70/72	97.22%	TT	34	94.44%	ME	ME	
		A:2/72	2.78%	TA	2	5.56%			
				AA	0	0.00%			
rs2435307	IVS11+60G>A	C:70/72	97.22%	CC	34	94.44%	ME	ME	
		G:2/72	2.78%	CG	2	5.56%			
				GG	0	0.00%			
rs7239575	IVS18+70A>G	G:44/72	61.11%	GG	14	38.89%	13.4	0.152	0.700
		A:28/72	38.89%	GA	16	44.44%	17.1		
				AA	6	16.67%	5.4		
rs6507720	IVS19+28T>C	A:43/72	59.72%	AA	14	38.89%	14.00	0.646	0.422
		C:29/72	40.28%	AC	15	41.67%	15.00		
				CC	7	19.44%	7.00		
rs2510344	IVS24+34A>G	T:44/72	98.61%	TT	15	41.67%	13.4	1.190	0.275
		C:28/72	1.39%	TC	14	38.89%	17.1		
				CC	7	19.44%	5.4		
Nέα αλλαγή	IVS19+72C>A	C:71/72	61.11%	CC	35	97.22%	ME	ME	
		A:1/72	38.89%	CA	1	2.78%			
				AA	0	0.00%			
rs2510344	IVS20+22G>C	G:71/72	98.61%	GG	35	97.22%	ME	ME	
		C:1/72	1.39%	GC	1	2.78%			
				CC	0	0.00%			
rs2510344	IVS24+42G>C	A:45/72	62.50%	AA	14	38.89%	14.1	0.444	0.505
		G:27/72	37.50%	AG	15	41.67%	16.9		
				GG	7	19.44%	5.1		
rs2510344	IVS24-70T>C	G:69/72	95.83%	GG	33	91.67%	ME	ME	
		C:3/72	6.94%	GC	3	8.33%			
				CC	0	0.00%			
rs2510344	IVS24-70T>C	T:70/72	97.22%	TT	34	94.44%	ME	ME	
		C:2/72	2.78%	TC	2	5.56%			
				CC	0	0.00%			

ME: μη εφαρμόσιμο

Πίνακας 11: Συχνότητα αλληλομόρφων, κατανομή γονοτύπων και έλεγχος γενετικής ισορροπίας των υπό μελέτη εξονικών πολυμορφισμών στην ομάδα ελέγχου (CG)

Εξόνιο	rs#	c DNA	Πρωτεΐνη	Είδος	Αλληλόμορφα (N=180)		Γονότυπος (N=90)		HW Αναμενόμενο	x ²	p	
4	rs12970899	c.387T>C	p.Y129Y	Συνώνυμη	T: 136	75.5%	TT	48	53.33%	51,4	3,716	0.06
					C: 44	24.5%	TC	40	44.44%	33,2		
							CC	2	2.22%	5,6		
6	rs1805081	c.644A>G	p.H215R	Παρερμηνεύσιμη	A: 132	73.3%	AA	52	57.78%	46,2	3,850	0.06
					G: 48	26.7%	AG	28	31.11%	36,6		
							GG	10	11.11%	7,2		
12	rs1788799	c.1926G>C	p.M642I	Παρερμηνεύσιμη	G: 72	40.0%	GG	15	16.67%	15	0,069	0,80
					C: 108	60.0%	GC	42	46.67%	42		
							CC	33	36.67%	33		
17	rs1805082	c.2572A>G	p.I858V	Παρερμηνεύσιμη	A: 84	46.7%	AA	15	16.67%	20,1	3,795	0,06
					G: 96	53.3%	AG	54	60.00%	44,9		
							GG	21	23.33%	25,1		
18	rs1140458	c.2793C>T	p.N931N	Συνώνυμη	C: 114	63.3%	CC	45	50.00%	36,1	16,32	0,00
					T: 66	36.7%	CT	24	26.67%	41,8		
							TT	21	23.33%	12,1		
25	rs1805084	c.3797G>A	p.R1266Q	Παρερμηνεύσιμη	G: 177	98.3%	GG	87	96.67%		ME	ME
					A: 3	1.7%	GA	3	3.33%			
							AA	0	0.00%			

ME: μη εφαρμόσιμο

Πίνακας 12: Συχνότητα αλληλομόρφων, κατανομή γονοτύπων και έλεγχος γενετικής ισορροπίας των υπό μελέτη εξονικών πολυμορφισμών στην ομάδα NPC1/RG1

Εξόνιο	rs#	c DNA	Πρωτεΐνη	Είδος	Αλληλόμορφα (N=152)		Γονότυπος (N=76)		HW Αναμενόμενο	x ²	p	
4	rs12970899	c.387T>C	p.Y129Y	Συνώνυμη	T: 97	63.8%	TT	29	38.16%	31	0.938	0.33
					C: 55	36.2%	TC	39	51.32%	35.1		
							CC	8	10.53%	10		
6	rs1805081	c.644A>G	p.H215R	Παρερμηνεύσιμη	A: 117	77%	AA	44	57.89%	45	0.444	0.51
					G: 35	23%	AG	29	38.16%	26.9		
							GG	3	3.95%	4		
12	rs1788799	c.1926G>C	p.M642I	Παρερμηνεύσιμη	G: 44	28.9%	GG	4	5.26%	6.4	1.744	0.186
					C: 108	71.1%	GC	36	47.37%	31.3		
							CC	36	47.37%	38.4		
17	rs1805082	c.2572A>G	p.I858V	Παρερμηνεύσιμη	A: 69	46.6%	AA	3	3.95%	17.1	41	0.00
					G: 79	53.4%	AG	66	3.95%	37.9		
							GG	7	9.21%	21.1		
18	rs1140458	c.2793C>T	p.N931N	Συνώνυμη	C: 100	65.8%	CC	32	42.11%	33.6	0.640	0.42
					T: 52	34.2%	CT	37	48.68%	33.9		
							TT	7	9.21%	8.6		
25	rs1805084	c.3797G>A	p.R1266Q	Παρερμηνεύσιμη	G: 143	96.6%	GG	69	90.79%		ME	ME
					A: 5	3.4%	GA	5	6.58%			
							AA	0	0.00%			

ME: μη εφαρμόσιμο

7.4 Συγκριτικός έλεγχος συχνότητας πολυμορφισμών και ανάλυση απλοτύπων

Η κατανομή και η συχνότητα των γονότυπων και των αλληλόμορφων των υπό μελέτη πολυμορφισμών στις ομάδες: ελέγχου (CG), ασθενών με κλινική υποψία της νόσου (SG) και στην ευρύτερη οικογένεια του NPC ασθενούς 1 (NPC1/RG1) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 13 και 14, αντίστοιχα. Ο συγκριτικός έλεγχος διενεργήθηκε μεταξύ των ομάδων NPC1/RG1 και CG, καθώς επίσης και μεταξύ των SG και CG (p_1 και p_2 αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, η γονοτυπική κατανομή του p.M642I παρουσίαζε ασαφή τάση χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης του μη κυρίαρχου αλληλίου σε ετεροζυγωτία (CG) και υψηλότερη σε ομοζυγωτία (CC) στην ομάδα SG σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ο έλεγχος του πολυμορφισμού αυτού στην περαιτέρω ανάλυση σε επίπεδο αλληλομόρφων ανέδειξε στατιστικά σημαντικά συχνότερη παρουσία του μη κυρίαρχου αλληλίου στην ομάδα SG (73,6%vs60%, $p=0.042$). Δεν διαπιστώθηκε άλλη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων SG και CG.

Αντίθετα, η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης γονότυπου και αλληλίων μεταξύ των ομάδων NPCασθενής1/RG1 και CG αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές για τους πολυμορφισμούς p.Y129Y, p.I858V, p.N931N (Πίνακας 13) και p.Y129Y, p.M642I (Πίνακας 14) αντίστοιχα. Όσον αφορά στον p.Y129Y στην NPC1/RG1 παρατηρήθηκε στατιστικά μεγαλύτερη εμφάνιση του γονοτύπου CC, που αντιστοιχεί στο μη κυρίαρχο αλληλίο σε ομοζυγωτία, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με την συχνότερη παρουσία του αλληλομόρφου αυτού σε αυτόν τον πληθυσμό (36,2%vs24.5%). Παράλληλα, παρατηρήθηκε μία τάση σπανιότερης παρουσίας του γονοτύπου GG, που αντιστοιχεί στο κυρίαρχο αλληλίο του p.M642I πολυμορφισμού. Σε συμφωνία με αυτή την τάση, η σύγκριση της συχνότητας των αλληλίων ανέδειξε στατιστικά σημαντική συχνότερη εμφάνιση του μη κυρίαρχου αλληλομόρφου στην ομάδα NPC1/RG1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (71,1%vs60%, $p=0.035$). Υπενθυμίζουμε εδώ ο p.I858V στην ομάδα SG και p.N931N στην ομάδα NPC1/RG1 δεν ήταν σύμφωνες με την ισορροπία Hardy-Weinberg, επομένως η στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων για αυτούς τους πολυμορφισμούς παρουσιάζεται

με επιφύλαξη και ενδεχομένως γι αυτό να μην παρατηρήθηκε και σε επίπεδο αλληλίων. Όσον αφορά στους δύο αυτούς πολυμορφισμούς η προσπάθεια ερμηνείας είναι παρακινδυνευμένη.

Για τη μελέτη της προέλευσης/πιθανών απλοτύπων των δύο καινούριων μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στον NPC ασθενή 1, χρησιμοποιήθηκαν οι συχνότεροι εξονικοί πολυμορφισμοί: p.Y129Y, p.H215R p.M642I, p.N931N. Οι πολυμορφισμοί p.I858V και p.R1266Q αποκλείστηκαν, καθώς το κριτήριο ισορροπίας Hardy-Weinberg δεν πληρούταν για τον πρώτο και η συχνότητα του δεύτερου στην ομάδα αυτή ήταν μόνο 3,4%. Αρχικά, διενεργήθηκε συγκριτικός έλεγχος της κατανομής των αλληλίων των υπό μελέτη πολυμορφισμών μεταξύ των παρακάτω ομάδων (τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 15).

- φορείς *IVS23+3insT* (φορείς 1 N=24) vs φορείς p.K1057R 2 (φορείς 2 N=16) (p_1)
- φορείς 1 vs μη φορείς N=112 (από τα άτομα της ευρύτερης οικογένειας του NPC ασθενούς 1) (p_2)
- φορείς 2 vs άτομα μη φορείς (p_3)

Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των φορέων δεν ήταν μεγάλος (N=12+8=20), εντούτοις παρατηρήθηκαν ισχυρές συσχετίσεις για τους πολυμορφισμούς p.Y129Y και p.M642I. Ειδικότερα, η παρουσία του μη κυρίαρχου αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού p.Y129Y ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των φορέων 1 σε σύγκριση τόσο με τους φορείς 2 όσο και με τους μη φορείς (58,3% vs 6.3%, $p_1=0.001$ και vs 35.1%, $p_2=0.035$ αντίστοιχα). Επιπλέον, η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική και μεταξύ των ομάδων φορείς 2 και μη φορείς, με σαφώς μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου αυτού στην ομάδα φορείς 2 (6,3% vs 35.1%, $p=0.020$). Αντίστοιχα, όσον αφορά στο μη κυρίαρχο αλληλομόρφο C της γενετικής αλλαγής p.M642I, αυτό παρουσιάζονταν σπανιότερα στην ομάδα φορέων 2 σε σύγκριση τόσο με τους φορείς 1 όσο και με τους μη φορείς (31,1% vs 79,2% $p=0.002$ και vs 74,8%, $p=0.000$ αντίστοιχα).

Ακολούθησε η ανάλυση όλων των πιθανών απλοτύπων στους φορείς των δύο νέων μεταλλάξεων, μέσω του λογισμικού Harplore. Τα αποτελέσματα ήταν σε εναρμόνιση με την

προηγηθείσα στατιστική ανάλυση, τα δεδομένα της οποίας βρήκαν την ερμηνεία τους, βάση των απλοτύπων που προέκυψαν. Ειδικότερα, κάθε μία εκ των 2 νέων μεταλλάξεων συσχετίστηκε με ένα μοναδικό απλότυπο με βάση τους πολυμορφισμούς p.Y129Y, p.H215R p.M642I, p.N931N: η μετάλλαξη *IVS23+3insT* με τον απλότυπο (+, -, +, -) και το μεταλλαγμένο αλληλίο p.K1057R με τον απλότυπο (-, -, -, -), αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η διαφορά των δύο αυτών απλοτύπων εντοπίστηκε στις γενετικές αλλαγές p.Y129Y και p.M642I, για τις οποίες είχε προκύψει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 13: Κατανομή και συχνότητα γονοτύπων των υπό μελέτη πολυμορφισμών στις ομάδες NPCασθενής1/RG1, GC, SG.

	Κατανομή και Συχνότητα Γονοτύπων			p ₁	p ₂
p.Y129Y (c.387T>C)	TT	TC	CC		
NPCασθενής1/RG1	29 (38.2)	39 (51.3)	8 (10.5)*	* p₁=0.005	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	48 (53.4)	40 (44.4)	2 (2.2)*		
Suspicion Group (SG)	17 (45.9)	18 (48.6)	2 (5.4)		
Σύνολο	94	97	12		
p.H215R (c.644A>G)	AA	AG	GG		
NPCασθενής1/RG1	44 (57.9)	29 (38.2)	3 (3.9)	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	52 (57.8)	28 (31.1)	10 (11.1)		
Suspicion Group (SG)	15 (41.7)	17 (47.2)	4 (11.1)		
Σύνολο	111	74	17		
p.M642I (c.1926G>C)	GG	GC	CC		
NPCασθενής1/RG1	4 (5.3)*	36 (47.4)	36 (47.4)	* p₁=0.054	† p₂=0.051
Ομάδα ελέγχου (GC)	15 (16.7)*	42 (46.7) [†]	33 (36.7) [†]		
Suspicion Group (SG)	4 (11.1)	11 (30.6) [†]	21 (58.3) [†]		
Σύνολο	23	89	90		
p.I858V (c.2572A>G)	AA	AG	GG		
NPCασθενής1/RG1	2 (2.7)*	65 (87.8)*	7 (9.5)*	* p₁=0.001	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	15 (16.7)*	54 (60.0)*	21 (23.3)*		
Suspicion Group (SG)	6 (16.7)	22 (61.1)	8 (22.2)		
Σύνολο	23	141	36		
p.N931N (c.2793C>T)	CC	CT	TT		
NPCασθενής1/RG1	32 (35.2)	37 (48.7)*	7 (9.2)*	* p₁=0.04	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	45 (50.0)	24 (27.7)*	21 (23.3)*		
Suspicion Group (SG)	14 (38.9)	15 (41.7)	7 (19.4)		
Σύνολο	91	76	35		
p.R1266Q (c.3797G>A)	GG	GA	AA		
NPCασθενής1/RG1	69 (93.2)	5 (6.8)	0	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	87 (96.7)	3 (3.3)	0		
Suspicion Group (SG)	32 (88.9)	4 (11.1)	0		
Σύνολο	188	12	0		

NS: μη στατιστικά σημαντικό (non significant), p₁: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας του συγκριτικού ελέγχου των ομάδων NPC1/RG1 και CG, p₂: των ομάδων SG και CG.

Πίνακας 14: Κατανομή και συχνότητα αλληλίων των υπό μελέτη πολυμορφισμών στις ομάδες NPCασθενής1/RG1, GC, SG.

Κατανομή και συχνότητα αλληλίων			p ₁	p ₂
p.Y129Y (c.387T>C)	T	C		
NPCασθενής1/RG1	97 (63.8)	55 (36.2)	p₁ = 0.027	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	136 (75.5)	44 (24.5)		
Suspicion Group (SG)	52 (70.3)	22 (29.7)		
Σύνολο	285	121		
p.H215R (c.644A>G)	A	G		
NPCασθενής1/RG1	117 (77.0)	35 (23.0)	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	132 (73.3)	48 (26.7)		
Suspicion Group (SG)	47(65.3)	25 (34.7)		
Σύνολο	296	108		
p.M642I (c.1926G>C)	G	C		
NPCασθενής1/RG1	44 (28.9)	108 (71.1)	p₁ = 0.035	p₂=0.042
Ομάδα ελέγχου (GC)	72 (40.0)	108 (60)		
Suspicion Group (SG)	19 (26.4)	53 (73.6)		
Σύνολο	135	269		
p.I858V (c.2572A>G)	A	G		
NPCασθενής1/RG1	69 (46.60)	79 (53.4)	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	84 (46.7)	96 (53.3)		
Suspicion Group (SG)	34 (47.2)	38 (52.8)		
Σύνολο	187	213		
p.N931N (c.2793C>T)	C	T		
NPCασθενής1/RG1	100 (65.8)	52 (34.2)	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	114 (63.3)	66 (36.7)		
Suspicion Group (SG)	43 (59.7)	29 (40.3)		
Σύνολο	257	147		
p.R1266Q (c.3797G>A)	G	A		
NPCασθενής1/RG1	143 (96.6)	5 (3.4)	NS	NS
Ομάδα ελέγχου (GC)	177 (98.3)	3 (1.7)		
Suspicion Group (SG)	68 (94.4)	4 (5.6)		
Σύνολο	388	12		

NS: μη στατιστικά σημαντικό (non significant), p₁: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας του συγκριτικού ελέγχου των ομάδων NPC1/RG1 και CG, p₂: των ομάδων SG και CG.

Πίνακας 15: Κατανομή και συχνότητα αλληλίων των υπό μελέτη πολυμορφισμών στις ομάδες φορείς 1, 2 και μη φορείς.

	Κατανομή και συχνότητα αλληλίων		p ₁	p ₂₋₃
p.Y129Y (c.387T>C)	T	C		
Φορείς 1 (N=24)	10 (41,7) ^{1,2}	14(58,3) ^{1,2}	p₁ = 0.001	p₂ = 0.035 p₃ = 0.020
Φορείς 2 (N=16)	15 (93,8) ^{1,3}	1 (6,3) ^{1,3}		
Μη φορείς (N=112)	72 (64,9) ^{2,3}	39 (35,1) ^{2,3}		
Σύνολο (N=152)	97	54		
p.H215R (c.644A>G)	A	G		
Φορείς 1 (N=24)	20 (83,3)	4 (16,7)	NS	NS
Φορείς 2 (N=16)	14 (87,5)	2 (12,5)		
Μη φορείς (N=112)	82 (73,9)	29 (26,1)		
Σύνολο	116	35		
p.M642I (c.1926G>C)	G	C		
Φορείς 1 (N=24)	5 (20,8) ¹	19 (79,2) ¹	p₁ = 0.002	P₃=0.000 NS
Φορείς 2 (N=16)	11 (68,8) ^{1,3}	5 (31,3) ^{1,3}		
Μη φορείς (N=112)	28 (25,2) ³	83 (74,8) ³		
Σύνολο	44	107		
p.N931N (c.2793C>T)	C	T		
Φορείς 1 (N=24)	18 (75,0)	6 (25,0)	NS	NS
Φορείς 2 (N=16)	12 (75,0)	4 (25,0)		
Μη φορείς (N=112)	69 (62,2)	42 (37,8)		
Σύνολο	99	52		

NS: μη στατιστικά σημαντικό (non significant), p₁: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας του συγκριτικού ελέγχου μεταξύ των ομάδων φορείς 1 (*IVS23+3insT*) και φορείς 2 (p.K1057R 2), p₂: φορείς 1 και μη φορείς, p₃: φορείς 2 και μη φορείς

8. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η μοριακή ανάλυση με αλληλούχιση του γονιδίου *NPC1* -και σε επιλεγμένες περιπτώσεις του *NPC2*- διενεργήθηκε για πρώτη φορά σε υπο-ομάδες του Ελληνικού πληθυσμού και προσφέρει δεδομένα σχετικά με το είδος και τη συχνότητα των γενετικών παραλλαγών των *NPC* γονιδίων. Συνολικά, ανευρέθηκαν 26 γενετικές αλλαγές, 24 στο *NPC1* και 2 στο *NPC2*. Μεταξύ αυτών ανιχνεύθηκαν 3 καινούριες παθογενετικές μεταλλάξεις σε 3 NPC ασθενείς με βιοχημική διάγνωση της νόσου [p.K1057R (*c.3170A>G*) εξόνιο 21, p.A1132P (*c.3394G>C*) εξόνιο 22, *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*) εξόνιο 23], 2 αλλαγές με αμφίβολη κλινική σημασία [p.P237S (*c.709C>T*) στο *NPC1* και *IVS4+1G>A* στο *NPC2*] και 2 νέοι ιντρονικοί μη παθογόνοι πολυμορφισμοί (*IVS 7-16C>T* και *IVS20+22G>C*) στο γονίδιο *NPC1*. Παράλληλα, ανιχνεύθηκαν συνολικά 28 φορείς της νόσου στα 99 άτομα που ελέχθησαν προς την κατεύθυνση αυτή (~28,2%). Από τις τρεις νέες μεταλλάξεις, οι δύο δημοσιεύτηκαν από την ομάδα μας για πρώτη φορά και συνδέθηκαν η κάθε μία με έναν μοναδικό απλότυπο (Bountouni et al., 2017) (Παράρτημα Ε). Επιπρόσθετα, η γονοτύπηση των NPC ασθενών επέτρεψε τη μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ γονοτύπων και κλινικών/βιοχημικών φαινοτύπων σε αυτούς. Οι ασθενείς NPC 1 και 2 σήμερα είναι υπό παρακολούθηση και θεραπευτική αντιμετώπιση. Τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου στην ομάδα ασθενών με κλινική υποψία της νόσου επέτρεψαν την μελέτη της κατανομής των συχνότερων εξονικών πολυμορφισμών στην ομάδα υγιών ατόμων, δίνοντας μια αδρή εκτίμηση της συχνότητάς τους στον Ελληνικό πληθυσμό. Επιπλέον, μέσω αυτών μελετήθηκε η προέλευση των 2 καινούριων *NPC1* μεταλλάξεων, που ανιχνεύθηκαν στον NPC ασθενή 1.

8.1 *NPC1* μεταλλάξεις

8.1.1 Είδος μεταλλάξεων και συσχετίσεις με βιοχημικό φαινότυπο

Ανιχνεύθηκαν 3 καινούριες παθογόνες μεταλλάξεις σε 3 NPC ασθενείς με βιοχημική διάγνωση της νόσου. Ο NPC ασθενής 1 ταυτοποιήθηκε ως σύνθετος ετεροζυγώτης για τις

μεταλλάξεις p.K1057R (*c.3170A>G*) και *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*), ο αποθανόντας NPC ασθενής 1β (μέσω έμμεσου γενετικού ελέγχου του γονεϊκού DNA) ως ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*) και ο ασθενής NPC ασθενής 2 ως ομοζυγώτης για τη σημειακή μετάλλαξη p.A1132P (*c.3394G>C*).

Η *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*) (προσθήκη μίας βάσης T στην περιοχή ματίσματος του εσονίου 23) οδηγεί στην απαλοιφή του εξονίου 23 και κατά συνέπεια στη σύνθεση αλλοιωμένης πρωτεΐνης. Ο NPC ασθενής 1β κλινικά έπασχε από τη σοβαρή νευρολογική μορφή της νόσου NPC, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη αυτή επιφέρει πολύ σοβαρές συνέπειες στην λειτουργικότητα της NPC1 πρωτεΐνης. Μεταλλάξεις στην περιοχή ματίσματος του εξονίου 23 επηρεάζουν το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή παρουσιάζεται ιδιαίτερα ευαίσθητη σε επιβλαβείς γενετικές αλλαγές, καθώς έχουν ανιχνευτεί πέντε διαφορετικές μεταλλάξεις σε αυτήν (*IVS23+5G>A*, *IVS23+1G>A* -συχνή στην Πορτογαλία-, *IVS23+3G>C*, *IVS23+4delA* και *IVS23+4insG*) (Sun et al., 2001, Macias-Vidal et al., 2011, Ribeiro et al., 2001, Park et al., 2003). Σε ομόζυγη κατάσταση οι παραπάνω μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένης της νέας μετάλλαξης *IVS23+3insT* -που ανιχνεύσαμε-, συσχετίζονται βιοχημικά με σοβαρή διαταραχή στην ενδοκυττάρια μεταφορά χοληστερόλης (κλασσικός βιοχημικός φαινότυπος στη δοκιμασία φιλιπίνης και πολύ χαμηλό ρυθμό εστεροποίησης της LDL-εξωγενούς χοληστερόλης) (Sun et al., 2001, Macias-Vidal et al., 2011, Ribeiro et al., 2001).

Η δεύτερη, νέα, παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.K1057R αποτελεί μία σημειακή αλλαγή στη θέση 3170 του νουκλεοτιδίου της αδενίνης σε γουανίνη στο εξόνιο 21 και προκαλεί την αντικατάσταση της λυσίνης από την αργινίνη στο αμινοξύ 1057 της τελικής NPC1 πρωτεΐνης. Εδράζει στην -πλούσια σε κυστεΐνη- περιοχή L (αα 854-1098), μεταξύ των TM-8 και TM-9, και φαίνεται ότι διαταράσσει τη λειτουργία της. Πράγματι, η ακεραιότητα του βρόγχου L θεωρείται απαραίτητη για τη σωστή διακίνηση χοληστερόλης, ενώ πιθανολογείται και εμπλοκή του στην αποδέσμευση του λυσοσωμιακού φορτίου (Watari et al., 2000). Αναλογικά, ένας μεγάλος αριθμός

NPC1 μεταλλάξεων (1/3 των σημειακών-παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων) είναι συγκεντρωμένος σε αυτόν τον εξαιρετικά διατηρημένο -μεταξύ των περισσότερων *NPC1* ορθολόγων- βρόγχο (Park et al., 2003, Greer et al., 1999a), υποδεικνύοντας τη λειτουργική της σημασία (Millat et al., 2001b). Η επιβλαβής φύση της γενετικής αυτής αλλαγής υποστηρίζεται περαιτέρω από την απουσία της, στην ομάδα ελέγχου (N=90), στις ομάδες SGs (N=37) και στα υπόλοιπα μέλη της ομάδας RG1 (πατρικά γενεαλογικά δέντρα Εικόνες 17α και 17β). Σε βιοχημικό επίπεδο, οι μη συνώνυμες, σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή έχουν συσχετιστεί τόσο με ήπιες όσο και με σοβαρές διαταραχές στην ενδοκυττάρια μετακίνηση της χοληστερόλης (Park et al., 2003, Sun et al., 2001, Millat et al., 2001c). Υποστηρίζεται ότι στους σύνθετους ετεροζυγώτες ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ικανό να προκαλεί άτυπο βιοχημικό φαινότυπο είναι επαρκές για τη διατήρηση του φαινοτύπου αυτού ακόμη και αν το δεύτερο αλληλόμορφο συνδέεται με τον τυπικό φαινότυπο (Millat et al., 2001b, Macias-Vidal et al., 2011, Ribeiro et al., 2001, Park et al., 2003, Vanier and Latour, 2015). Συνεπώς, η μετάλλαξη p.K1057R συσχετίζεται με το τυπικό βιοχημικό φαινότυπο της νόσου, καθώς ο NPC ασθενής 1, φορέας των αλλήλων *IVS23+3insT* και p.K1057R, είχε τυπική δοκιμασία φιλιπίνης, και η μετάλλαξη *IVS23+3insT* συνδέεται με τον τυπικό βιοχημικό φαινότυπο (όπως αναλύθηκε ανωτέρω).

Η τρίτη μετάλλαξη, p.A1132P (c.3394G>C), ανιχνεύτηκε σε ομοζυγωτία στον NPC ασθενή 2. Πρόκειται για σημειακή παρερμηνεύσιμη αλλαγή στο εξόνιο 22, όπου η γουανίνη στη θέση του νουκλεοτιδίου 3394, αντικαθίσταται από μία κυτοσίνη. Έτσι, στην παραγόμενη πρωτεΐνη γίνεται αλλαγή του αμινοξέος αλανίνη σε προλίνη στη θέση 1132. Η μετάλλαξη αυτή εδράζει στον διαμεμβρανικό τομέα 10 (TM-X) της *NPC1* πρωτεΐνης και εντοπίζεται σε θέση καλά διατηρημένη μεταξύ των ορθολόγων (<http://www.ensembl.org>). Προβλέπεται ότι επιφέρει ουσιώδη μεταβολή στην τελική διαμόρφωση/τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, δεδομένου ότι τη θέση ενός μικρού και ουδέτερου αμινοξέος καταλαμβάνει η προλίνη. Ο πυρρολινιδικός δακτύλιος που εμπεριέχει, επιβάλλει δομική ακαμψία στον πεπτιδικό δεσμό που προηγείται της προλίνης στην πρωτεϊνική αλυσίδα και ενδεχομένως δημιουργεί ένα σημείο κάμψης στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Επρόκειτο

για μια νέα παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη, η οποία δεν εντοπίστηκε στα άτομα των ομάδων CG (N=90) και SG (N=37). Το μεταλλαγμένο αλληλίο p.A1132P φαίνεται ότι σχετίζεται με το κλασσικό βιοχημικό φαινότυπο της νόσου, δεδομένου ότι ο ομοζυγώτης NPC ασθενής 2, παρουσίαζε την κλασσική εικόνα στη δοκιμασία φιλιπίνης. Στην Ελλάδα, τα δεδομένα σχετικά με τις μεταλλάξεις των *NPC1-2* είναι περιορισμένα, με έναν ασθενή να έχει αναφερθεί κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής (Rodriguez-Pascau et al., 2012). Ωστόσο, πρόσφατα αναδρομικά στοιχεία δίνουν περαιτέρω πληροφορίες πάνω στο θέμα αυτό (Mavridou et al., 2017).

8.1.2 Μελέτη γενεαλογίας-απλοτύπων

Η καταγωγή του NPC ασθενούς 1 από έναν γεωγραφικά απομονωμένο πληθυσμό (μία περιοχή στην Κρήτη), σε συνδυασμό με την παρουσία στην οικογένεια ενός άλλου NPC ασθενούς, που απεβίωσε από τη νόσο, αποτέλεσε το έναυσμα για την διεύρυνση του ελέγχου στην ευρύτερη οικογένειά του. Πράγματι, παρατηρήθηκε υψηλός επιπολασμός NPC φορέων της νόσου στον πληθυσμό που μελετήθηκε (27%). Επιπλέον, η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλίων των γενετικών πολυμορφισμών p.Y129Y, p.M642I διέφεραν σημαντικά μεταξύ της ευρείας οικογένειας των NPC ασθενών 1, 1β (*NPC1/RG1*) και της ομάδας ελέγχου. Η στατιστική αυτή διαφορά μπορεί να δικαιολογηθεί και από το γεγονός ότι τα μέλη των γενεαλογικών δέντρων είτε σχετίζονταν ή προέρχονταν από μια συγκεκριμένη νησιωτική περιοχή (κλειστή περιοχή). Παράλληλα, η διαφορά αυτή αναδείχθηκε και στον συγκριτικό έλεγχο μεταξύ των φορέων των δύο μεταλλάξεων, παρά το μικρό μέγεθος του δείγματος, υποδεικνύοντας έτσι ισχυρή συσχέτιση. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω στην ανάλυση απλοτύπων, καθώς ο απλότυπος που συσχετίστηκε με κάθε καινούρια μετάλλαξη διέφερε ως προς την παρουσία/απουσία των 2 συγκεκριμένων πολυμορφισμών.

Οι πρόγονοι των γενεαλογιών 17a και 17b προέρχονταν από δύο εγγύς περιοχές και αν και δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός ενός κοινού προγόνου, η *IVS23+3insT* συνδέθηκε με έναν

μοναδικό απλότυπο. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση της “αρχής του ιδρυτή” (founder effect), η οποία θα μπορούσε να αποδειχθεί περαιτέρω μέσω μικροδορυφορικής ανάλυσης. Από την άλλη πλευρά, η μητρική μετάλλαξη p.K1057R (17c γενεαλογία) συσχετίστηκε με διαφορετικό απλότυπο, ο οποίος υποδεικνύει τη διαφορετική της προέλευση. Πράγματι, οι πρόγονοι της μητέρας του NPC ασθενούς 1 ανήκαν στον Ελληνισμό της Διασποράς και εγκαταστάθηκαν στο ελληνικό νησί μετά τη Μικρασιατική Καταστροφή το 1922. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει τον ακριβή προσδιορισμό της προέλευσης της νέας αυτής μετάλλαξης, λαμβάνοντας υπόψη ότι διάφορες εθνικότητες -ιδιαίτερα πριν από την καταστροφή- κατοικούσαν στις ακτές της Μικράς Ασίας και αρκετοί μικτοί γάμοι ενδεχομένως να είχαν τελεστεί.

Σε αντιστοιχία με τους NPC ασθενείς 1 και 1β, η καταγωγή του NPC ασθενής 2 ήταν επίσης από γεωγραφικά απομονωμένη περιοχή, το Εμπόριο της Σαντορίνης και μάλιστα έφερε την ανιχνευθείσα μετάλλαξη σε ομοζυγωτία. Στους 24 συγγενείς που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε, ως αναμενόταν, αυξημένη επίπτωση φορείας σε ποσοστό 33%. Η μητέρα της ασθενούς παρουσίαζε μεμονωμένη σπληνομεγαλία, που συγκαταλέγεται στα συμπτώματα της νόσου. Πράγματι, βιβλιογραφικά έχουν περιγραφεί ετεροζυγώτες με ήπια συμπτωματολογία (Harzer et al., 2014). Οι υπόλοιποι φορείς και από τις δύο γενεαλογίες δεν ανέφεραν συμπτώματα σχετιζόμενα με τη νόσο. Ωστόσο, η συλλογή των δεδομένων αυτών βασίζεται σε προφορικές πληροφορίες και ερωτηματολόγια.

Το γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς NPC 2 δεν μελετήθηκε εκτενώς από την ομάδα μας, γιατί αφενός ελήφθησαν δείγματα μόνο από τα μέλη που κατοικούσαν στην Αττική και αφετέρου διακόπηκε η παρακολούθηση της ασθενούς την περίοδο εκείνη και για 4 έτη. Περισσότερες πληροφορίες δίνονται σε άλλη μελέτη (Mavridou et al., 2014). Στους συγγενείς και των δύο γενεαλογιών έγινε ενημέρωση σχετικά με τη νόσο και δόθηκαν οδηγίες προγεννητικής συμβουλευτικής, ώστε να αποφευχθούν νέες γεννήσεις πασχόντων.

8.1.3 Συσχετίσεις γονοτύπου-κλινικού φαινοτύπου

Παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο στην μοριακή προσέγγιση της νόσου τα τελευταία έτη, η ασάφεια του ακριβούς μηχανισμού δράσης των πρωτεϊνών NPC1 και NPC2, η κλινική ποικιλομορφία, η ευρεία ετερογένεια των υπαίτιων αλληλίων και ο σημαντικός αριθμός “ιδιωτικών-οικογενειακών” μεταλλάξεων περιπλέκουν την ανάπτυξη συσχετίσεων μεταξύ της κλινικής πορείας και του γονοτύπου ή του βιοχημικού φαινοτύπου (Vance and Karten, 2014, Vanier, 2010). Η κλινική σοβαρότητα δεν φαίνεται να συμβαδίζει απαραίτητα με τον βαθμό διαταραχής της ενδοκυττάριας επεξεργασίας της LDL-χοληστερόλης. Πράγματι, ένα ποσοστό NPC ασθενών με τη μορφή των ενηλίκων εμφανίζει τον τυπικό βιοχημικό φαινότυπο στη δοκιμασία φιλιπίνης (Vanier and Latour, 2015). Επιπλέον, αν και η χοληστερόλη θεωρείται πλέον το κεντρικό λιπίδιο στην παθοφυσιολογία της νόσου, ο καταρράκτης των παθογενετικών μηχανισμών που ακολουθεί περιλαμβάνει και πλήθος άλλων διεργασιών (Zervas et al., 2001b, Zervas et al., 2001a, Lloyd-Evans et al., 2008, Vanier, 2015, Vanier, 2010). Έχει προταθεί ότι κάποιες μεταλλάξεις ενδεχομένως να μην παρεμποδίζουν τη διακίνηση της χοληστερόλης, αλλά διαφορετικά μονοπάτια της δράσης της πρωτεΐνης NPC1 (Davies et al., 2000, Zhang et al., 2001), ή να οδηγούν σε διαταραχή της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης και γρήγορη αποδόμησή της (Gelsthorpe et al., 2008, Zampieri et al., 2012) ή, ακόμη, ότι ενδεχομένως γενετικοί πολυμορφισμοί να συνεισφέρουν στον τελικό φαινότυπο (Bauer et al., 2002, Park et al., 2003, Blom et al., 2003).

Εν τούτοις, χαρακτηριστικές ανωμαλίες στη μεταφορά της ενδοκυττάριας χοληστερόλης παρατηρούνται τυπικά στην πρόωμη βρεφική μορφή της νόσου, ενώ ηπιότεροι υπότυποι (εφηβική/ενήλικη μορφή) συνήθως παρουσιάζουν "άτυπο" βιοχημικό φαινότυπο (Vanier and Latour, 2015). Επιπλέον, η απουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων πρωτεΐνης σε βιοχημικές μελέτες έχει συσχετισθεί με σοβαρές νευρολογικές εκδηλώσεις (Ribeiro et al., 2001, Millat et al., 2001c, Yamamoto et al., 2000). Μεταξύ των λίγων συσχετισμών γονότυπου-φαινοτύπου, η σημειακή μετάλλαξη p.I1061T έχει συνδεθεί με τον κλασικό βιοχημικό φαινότυπο και νεανικές μορφές της

νόσου, ενώ μεταλλάξεις που οδηγούν σε μικρότερου μεγέθους τελική πρωτεΐνη (nonsense), καθώς και μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης ή μεταλλάξεις που εδράζουν στην περιοχή ευαίσθητη για τις στερόλες έχει βρεθεί ότι ασκούν σημαντική επίδραση στην NPC1 πρωτεΐνη και αντιστοιχούν σε σοβαρές νευρολογικές μορφές της νόσου (Millat et al., 2005, Millat et al., 1999, Millat et al., 2001c, Fernandez-Valero et al., 2005, Vanier, 2010, Jahnova et al., 2014)

Η NPC ασθενής 1 [p.K1057R (*c.3170A>G*) και *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*)] ουσιαστικά δεν παρουσιάζει νευρολογική ή ψυχιατρική συμπτωματολογία έως την ηλικία των 12 ετών. Αντιθέτως, ο NPC ασθενής 1β (ομοζυγώτης *IVS23+3insT*), β' ξάδερφος της ασθενούς, έπασχε από τον πρώιμο βρεφικό υπότυπο και κατέληξε νωρίς σε ηλικία 3,5 ετών. Μοριακές μελέτες σε ολικό RNA από καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος NPC ασθενών με τις ομόζυγες μεταλλάξεις στο ίδιο σημείο ματίσματος του εξονίου 23 ανέδειξαν το σχηματισμό πανομοιότυπων, παθολογικών μεταγραφικών προϊόντων διαφόρων μεγεθών, ακόμη και με πλήρη απάλειψη του εξονίου (Ribeiro et al., 2001, Macias-Vidal et al., 2011), όπως και στην περίπτωση μας. Ο κλινικός φαινότυπος και των τριών προηγουμένως αναφερθέντων ασθενών με ομόζυγες μεταλλάξεις στην ίδια θέση (Ribeiro et al., 2001, Macias-Vidal et al., 2011) ήταν επίσης πολύ σοβαρός. Συμπερασματικά, η νέα μετάλλαξη *IVS23+3insT* συσχετίζεται σε ομόζυγη κατάσταση με σοβαρές κλινικές μορφές.

Η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.A1054T, η οποία εδράζει πλησίον της μετάλλαξης p.K1057R, έχει συσχετιστεί με πρώιμη/σοβαρή νευρολογική νόσο και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης σε μελέτες ανοσοαποτύπωσης (Millat et al., 2001c). Ενδεχομένως λοιπόν και η μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη (p.K1057R) να επιφέρει σοβαρές αλλαγές στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Παρόλο που δεν διενεργήθηκαν λειτουργικές δοκιμασίες, σύμφωνα με *in silico* μοντέλα πρόβλεψης η συγκεκριμένη αλλαγή μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Μάλιστα, έχουν ταυτοποιηθεί και ασθενείς με καθυστερημένη νευρολογική έναρξη (στην εφηβική/ενήλικη ζωή), ως σύνθετοι ετεροζυγώτες για ένα σοβαρό και ένα ηπίως μεταλλαγμένο αλληλίο του *NPC1*. Από την άλλη πλευρά όμως, οι δύο ασθενείς, που αναφέρονται στη

βιβλιογραφία, σύνθετοι ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη *IVS23+IG>A* (που αναμένεται να έχει παρόμοιο αντίκτυπο στην NPC1 πρωτεΐνη με τη *IVS23+3insT*) και τη p.A1035V (Ribeiro et al., 2001) ή p.I1061T (Jahnova et al., 2014) αντίστοιχα, εμφάνιζαν τον σοβαρό/πρώιμο βρεφικό κλινικό φαινότυπο και μάλιστα παρά το ότι η μετάλλαξη I1061T έχει συσχετιστεί με ηπιότερη νευρολογική πορεία σε πολλές μελέτες (Patterson et al., 2012, Vanier, 2010, Millat et al., 1999, Millat et al., 2005, Ribeiro et al., 2001, Wraith et al., 2009, Heron et al., 2012). Το γεγονός ότι η NPC ασθενής 1 τέθηκε σε θεραπεία πολύ νωρίς, σε νευρολογικά προσυμπτωματικό στάδιο, και παραμένει ασυμπτωματική δυσχεραίνει τον συσχέτισμό του συνδυασμού των δύο μεταλλαγμένων αλληλίων με την κλινική της εικόνα.

Ο NPC ασθενής 2 παρουσιάζει την όψιμη βρεφική μορφή της νόσου και είναι ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη p.A1132P, η οποίας σύμφωνα με *in silico* μοντέλα πρόβλεψης η συγκεκριμένη αλλαγή τροποποιεί τη λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Έχει περιγραφεί ένας ακόμη NPC ασθενής με τον ίδιο γονότυπο και κοινή καταγωγή, ο οποίος επίσης έπασχε από τον ίδιο υπότυπο. Συγκεκριμένα, επρόκειτο για κορίτσι με ιστορικό παρατεινόμενου ίκτερου, στο οποίο παρατηρήθηκε προϊούσα νευρολογική επιδείνωση από την ηλικία των 4 ετών και κατέληξε στην ηλικία των 14 (Mavridou et al., 2014). Συμπερασματικά λοιπόν, το παθολογικό αυτό αλληλίο σε ομόζυγη κατάσταση πιθανόν συνδέεται με σοβαρή νευρολογική μορφή της νόσου.

8.1.4 Παρακολούθηση-Θεραπευτική προσέγγιση NPC ασθενών

Στον NPC ασθενή 1 η θεραπεία μείωσης υποστρώματος (μιγλουστάτη) ξεκίνησε αμέσως μετά τη διάγνωση, ήδη από την ηλικία των 7,5 μηνών. Η χορήγηση της μιγλουστάτης ήταν σε πειραματικό στάδιο την περίοδο εκείνη και η έναρξή της αποφασίστηκε λαμβάνοντας υπόψη κυρίως την ταχέως εξελισσόμενη φυσική πορεία της νόσου στον ξάδερφό της και την παρουσία ήπιας αξονικής υποτονίας. Βρίσκεται υπό στενή παρακολούθηση τα τελευταία 11,5 χρόνια, με καλή ανοχή στο θεραπευτικό σχήμα και επί του παρόντος δεν εμφανίζει σαφή νευρολογική συμπτωματολογία.

Βιβλιογραφικά, οι ασθενείς με μετάλλαξη στην ίδια θέση ματίσματος σε ετεροζυγωτία (*IVS23+IG>A*) -όπως προαναφέρθηκε- παρουσίαζαν πολύ σοβαρό κλινικό φαινότυπο και ταχέως επιδεινούμενη κλινική εικόνα (Jahnova et al., 2014, Ribeiro et al., 2001), σαφέστατα διαφορετική από αυτή του NPC ασθενούς 1. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η πρόωμη εισαγωγή της θεραπείας μείωσης υποστρώματος, πριν την εμφάνιση της νευρολογικής συμπτωματολογίας, ενδεχομένως να είχε θετική επίδραση στην ασθενή μας. Ωστόσο, είναι δύσκολο να καταλήξουμε σε ένα βέβαιο συμπέρασμα δεδομένου ότι η διαταραχή NPC παρουσιάζει ευρεία ετερογένεια –ορισμένες φορές ακόμη και μεταξύ αδερφών (Benussi et al., 2015)-, η φυσική πορεία της νόσου στην ασθενή μας δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια -λόγω της πρόωμης έναρξης θεραπευτικής παρέμβασης- και τα δεδομένα όσον αφορά σε ασυμπτωματικούς νευρολογικά ασθενείς υπό θεραπεία μείωσης υποστρώματος είναι ασαφή και σποραδικά (Jahnova et al., 2014, Di Rocco et al., 2012, Di Rocco et al., 2015).

Σύμφωνα με τις δημοσιευμένες συστάσεις σχετικά με τη διαχείριση της νόσου, η έναρξη της θεραπείας μείωσης υποστρώματος θα πρέπει να γίνεται ταυτόχρονα με την εμφάνιση οποιουδήποτε νευρολογικού συμπτώματος ή ακριβώς πριν, όταν υπάρχει θετικό ιστορικό νόσησης σε αδέρφια στην οικογένεια (Patterson et al., 2012). Εντούτοις, περιγράφονται τρεις νευρολογικά ασυμπτωματικοί NPC ασθενείς, οι οποίοι τέθηκαν πρώιμα σε αγωγή στην ηλικία των 20, 7 και 19 μηνών, αντίστοιχα (Di Rocco et al., 2012, Fecarotta et al., 2015a, Jahnova et al., 2014). Ο πρώτος ασθενής εμφανίζει νευρολογικές εκδηλώσεις από την ηλικία των 10 ετών. Ο δεύτερος σε ηλικία 9 ετών παρουσιάζει νευρολογική συμμετοχή χαρακτηριζόμενη από ήπια γνωσιακή έκπτωση και ήπια διαταραχή κινητικού συντονισμού. Αντίθετα, ο αδερφός του, ο οποίος τέθηκε καθυστερημένα σε αγωγή, έπασχε από την πρόωμη βρεφική μορφή της νόσου με ταχεία προοδευτική νευρολογική συμπτωματολογία και βαριά νευροεκφύλιση έως την ηλικία των 8 ετών (Di Rocco et al., 2015, Di Rocco et al., 2012). Ο τρίτος ασθενής παραμένει ασυμπτωματικός στην ηλικία των 4,5 ετών, παρόλο που ήταν ομόζυγος για μια σοβαρή σημειακή μετάλλαξη (p.R1186H), η οποία έχει συσχετιστεί με σοβαρούς φαινοτύπους

και έναρξη της νευρολογικής συμπτωματολογίας κατά την βρεφική περίοδο (Jahnova et al., 2014). Παράλληλα, από τη συγκριτική περιγραφή 5 ζευγών αδερφών με τη νόσο NPC παρατηρείται η επιβράδυνση της νευρολογικής επιδείνωσης με την έναρξη της συμπτωματολογίας σε προσυμπτωματικό στάδιο και με καλύτερη ανταπόκριση στις ηπιότερες μορφές (Yasmina Amraoui, 2013). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι μελέτες σε πειραματικά μοντέλα της νόσου (ποντίκια και αιλουροειδή) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση της αγωγής από το προσυμπτωματικό στάδιο καθυστέρησε την έναρξη των νευρολογικών συμπτωμάτων και παρέτεινε τη διάρκεια ζωής των πειραματόζωων, μειώνοντας τη συσσώρευση γαγγλιοσιδίων και συνακολούθως το βαθμό νευροεκφύλισης (Zervas et al., 2001a, Zervas et al., 2001b). Δεδομένης λοιπόν της προοδευτικής συσσώρευσης υποστρώματος στους ιστούς των NPC ασθενών (Yanjanin et al., 2010), προτείνεται ένα κρίσιμο κατώφλι πριν την εμφάνιση νευρολογικών συμπτωμάτων, που αντικατοπτρίζει σημαντική και μη αναστρέψιμη νευρωνική απώλεια. Με την έναρξη της θεραπευτικής παρέμβασης μετά από το κρίσιμο αυτό σημείο φαίνεται να περιορίζεται το θεραπευτικό όφελος.

Γενικά, ο βέλτιστος χρόνος έναρξης της θεραπείας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, καθώς και το εάν η χορήγησή της καθυστερεί την εμφάνιση ή αμβλύνει τον καταρράκτη της επακόλουθης νευρολογικής επιδείνωσης παραμένουν ανοικτά ερωτήματα. Τα τελευταία χρόνια, επισταμένη έρευνα στον τομέα της διάγνωσης της νόσου οδήγησε στον εντοπισμό σχετικά αξιόπιστων βιολογικών δεικτών, που αφορούν κατά κύριο λόγο τη διάγνωση, ενώ όσον αφορά στην κλινική βαρύτητα τα στοιχεία παραμένουν ασαφή (Giese et al., 2015, Jiang et al., 2011, te Vruchte et al., 2014). Προς αυτή την κατεύθυνση, είναι πρωταρχικής σημασίας ο προσδιορισμός ενός ευαίσθητου δείκτη νευροεκφύλισης, ο οποίος θα μπορούσε να αντανάκλα τον βέλτιστο χρόνο έναρξης της θεραπευτικής παρέμβασης.

Αν και για ένα διάστημα 4 ετών (2012-2016) ο NPC ασθενής 2 διέκοψε την παρακολούθηση, από 1,5 έτους παρακολουθείται εκ νέου. Το παιδί πάσχει από τη όψιμη βρεφική μορφή της νόσου. Σε αντίθεση με την NPC ασθενή 1, η έναρξη της αγωγής με μιλγουστάτη ξεκίνησε ενώ ο ασθενής

παρουσίαζε ήδη επιβαρυνμένη νευρολογική εικόνα, γεγονός που περιορίζει το όφελος της. Επιπρόσθετα, αν και η θεραπεία έχει φανεί σε διάφορες μελέτες ότι σταθεροποιεί ή επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου, δεν αναστέλλει την πορεία της (Patterson et al., 2015, Fecarotta et al., 2015b, Ginocchio et al., 2013). Στις βαρύτερες μορφές της νόσου, όπως οι βρεφικοί υπότυποι, δεν φαίνεται να επιφέρει ουσιαστική βελτίωση (Patterson et al., 2010). Ως εκ τούτου η κλινική εικόνα του παιδιού είναι προϊούσα. Επί του παρόντος παρουσιάζει ψυχοκινητική καθυστέρηση, πρώιμη άνοια, έκδηλη αταξία με συχνές πτώσεις (φέρει νάρθηκες στήριξης), δυσμετρία, τρόμο, κάθετη παράλυση βλέμματος και δυσαρθρία με ενίοτε δύσληπτο λόγο. Επιπλέον, από 1,5 έτους εμφανίζει φαρμακοανθεκτικούς επιληπτικούς σπασμούς υπό τριπλή αντιεπιληπτική αγωγή (Depakine, Trileptal, Fycomba) με μέτριο έλεγχο των κρίσεων και διαταραχές ύπνου/εγρήγορσης.

Αποφασίστηκε λοιπόν από έτους να τεθεί σε αγωγή με ενδοραχιαία και ενδοφλέβια κυκλοδεξτρίνη, στο πλαίσιο πρώιμης πρόσβασης σε φαρμακευτική αγωγή, ώστε να αναχαιτιστεί η προϊούσα νευροεκφύλιση. Στο ίδιο πλαίσιο βρίσκεται εδώ και 1,5 χρόνο ένας ακόμη NPC ασθενής, σύνθετος ετεροζυγώτης (*c.2102dupA* στο εξόνιο 13 –μητρικής προέλευσης-και *c.3265G>A* στο εξόνιο 22 «de novo»). Η ανταπόκριση των ασθενών στην αγωγή αυτή είναι θετική και διενεργείται στο πλαίσιο επέκτασης της παρούσας μελέτης.

Η 2-υδροξυλοπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη είναι ένας μικρός κυκλικός ολιγοσακχαρίτης με υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και υδρόφοβο κέντρο. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως, φαίνεται ότι δεσμεύει στο εσωτερικό του τη χοληστερόλη με αποτέλεσμα να την κινητοποιεί από το σύμπλοκο ενδοσώματος/λυσosώματος στο ενδοπλασματικό δίκτυο με δράση δε δοσοεξαρτώμενη (σε μεγαλύτερες δόσεις παρατηρείται μεγαλύτερη κινητοποίηση από την κυτταροπλασματική μεμβράνη) (Abi-Mosleh et al., 2009). Κατόπιν θετικών αποτελεσμάτων σε μελέτες σε πειραματόζωα, έχει συσταθεί στις Η.Π.Α. ομάδα συνεργασίας μεταξύ επιστημόνων, φιλανθρωπικών οργανώσεων, δημοσίων φορέων, ενώσεων ασθενών με τη νόσο και φαρμακευτικών εταιρειών στα πλαίσια ειδικού προγράμματος για σπάνια νοσήματα (Ottinger et al.,

2014). Από το 2015 πραγματοποιούνται 2 ανεξάρτητες κλινικές δοκιμές (Φάσεις II & III) και (Φάση I&II) για τη χορήγηση 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη σε ασθενείς με NPC. Επιπρόσθετα, το φαρμακευτικό προϊόν «2-υδοξυλοπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη» (*2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin*) έχει χαρακτηριστεί ως ορφανό φάρμακο για τη νόσο NPC από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμάκων (EMA) και από το δίκτυο ορφανών φαρμάκων των Η.Π.Α και έχει χορηγηθεί σε αρκετούς ασθενείς παγκοσμίως στο πλαίσιο της πρώιμης πρόσβασης-παρηγορητικής χρήσης (Matsuo et al., 2013, Matsuo et al., 2014, Tanaka et al., 2015, Maarup et al., 2015). Η μέχρι σήμερα εμπειρία από την χορήγηση του φαρμάκου υποδεικνύει ότι είναι σε πολλές περιπτώσεις ικανό να ανακόψει την εκφυλιστική εξέλιξη της νόσου ή ακόμη και να βελτιώσει την κατάσταση της υγείας ασθενών που πάσχουν από NPC, κυρίως σε περιπτώσεις όπου η αγωγή ξεκινάει έγκαιρα πριν την εκδήλωση σοβαρών νευρολογικών συμπτωμάτων, καθώς και σε περιπτώσεις παιδιών μικρής ηλικίας. Πρόσφατη δημοσιευμένη κλινική μελέτη ενδοραχιαίας χορήγησης κυκλοδεξτρίνης έδειξε επιβράδυνση της νευροεκφυλιστικής πορείας της νόσου σε ασθενείς με NPC, με καλό προφίλ ασφάλειας φαρμάκου (Ory et al., 2017, Erickson and Fiorenza, 2017).

8.2 Ομάδα SG (SG-1,2 και 3)

8.2.1 Ανιχνευθέντες Πολυμορφισμοί

Το γονίδιο *NPC1* είναι μεγάλου μεγέθους και πολυμορφικό. Εκτός από μία πληθώρα παθογενετικών μεταλλάξεων, έχει προσδιοριστεί και ένας σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών, οι οποίοι δεν φαίνεται να προκαλούν τον κλινικό φαινότυπο της νόσου (Wassif et al., 2015).

Θεωρήσαμε λοιπόν ότι σε έναν πληθυσμό με υψηλή κλινική υποψία για τη νόσο NPC υπάρχει πιθανότητα ανεύρεσης παθογενετικών μεταλλάξεων, αλλά και σπάνιων πολυμορφισμών στα γονίδια *NPC1-2*. Πέραν λοιπόν των μεταλλάξεων που έχουν αναλυθεί ανωτέρω, ταυτοποιήθηκαν σε δύο ασθενείς δύο σπάνιοι πολυμορφισμοί σε ετεροζυγωτία, η *c.709C>T* (p.P237S) στο εξόνιο 6 του *NPC1* γονιδίου και η *IVS4+1G>A*, στη θέση ματίσματος μετά από το εξόνιο 4 του *NPC2*. Οι γενετικές αυτές αλλαγές δεν ανιχνεύτηκαν στην ομάδα ελέγχου GC (N=90) -αλλά ούτε και στην ομάδα NPC/RG1 (N=75) όσον αφορά στον πρώτο πολυμορφισμό. Οι γενετικές αυτές παραλλαγές αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως επιβλαβείς ή δυνητικά επιβλαβείς στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός *c.709C>T* (p.P237S) αν και αρχικά χαρακτηρίστηκε παθογόνος (Millat et al., 2001c, Yamamoto et al., 1999, Kaminski et al., 2002) στη συνέχεια με τον εμπλουτισμό των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίσεις επιπλέον ανθρώπινων γονιδιωμάτων, ο πολυμορφισμός χαρακτηρίστηκε ως καλοήθης, καθώς προσδιορίστηκε σε ποσοστό 2-4% σε μη νοσούντες (Park et al., 2003, Sun et al., 2001, Blom et al., 2003) (<http://www.ensembl.org>). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη NPC1-P237S αποδείχθηκε ότι απομάκρυνε αποτελεσματικά την ενδοκυττάρια συσσώρευση της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και προτάθηκε ως λειτουργική πρωτεΐνη, η οποία ωστόσο θα μπορούσε να συνεισφέρει στον NPC φαινότυπο (Kaminski et al., 2002, Blom et al., 2003). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο ίδιο αμινοξύ της παραγόμενης πρωτεΐνης έχει περιγραφεί η p.P237L παθογόνος μετάλλαξη (Fancello et al., 2009). Επιπρόσθετα, η συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού φαίνεται να είναι υψηλότερη σε NPC ασθενείς, καθώς έχει ανιχνευθεί επανειλημμένα κατά την μοριακή τους διερεύνηση (Millat et al., 2001c, Sun et al., 2001, Kaminski et

al., 2002, Yamamoto et al., 1999). Πρόσφατα δε δημοσιευμένη μελέτη υποδεικνύει τη συνύπαρξη του πολυμορφισμού αυτού με μία συγκεκριμένη μετάλλαξη (*c.1947+5G>C*) σε δύο μη σχετιζόμενους NPC ασθενείς (Salman et al., 2017).

Η δεύτερη γενετική αλλαγή, *IVS4+IG>A*, αρχικά χαρακτηρίστηκε ως πιθανά παθογόνος και έχει ανιχνευτεί –πάντα σε ετεροζυγωτία- σε ενήλικες ασθενείς με ψυχιατρική ή νευροεκφυλιστική συμπτωματολογία -και ιδίως σε ασθενείς με μετωποκροταφική άνοια- (Zech et al., 2013, Bauer et al., 2013a, Cupidi et al., 2017), όπως και στη δική μας περίπτωση. Ακολούθως, πρόσφατη μελέτη σε μεγάλες βάσεις γενετικών δεδομένων αμφισβητεί τη παθογονικότητα της ως προς τη νόσο (Wassif et al., 2015). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι οι ανωτέρω γενετικές παραλλαγές αν και δεν προκαλούν νόσο, η συνεισφορά τους στον τελικό φαινότυπο δεν μπορεί να αποκλειστεί με βεβαιότητα.

Ορισμένες από τις μη παθογόνες γενετικές παραλλαγές είναι επαναλαμβανόμενες σε διάφορες χώρες. Η συχνότητα και το είδος των συνηθέστερων πολυμορφισμών, που ανιχνεύτηκαν στους συμμετέχοντες της ομάδας ελέγχου (υποομάδα του ελληνικού πληθυσμού), βρίσκεται κατά βάση σε συμφωνία με την περιγραφείσα σε άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ιδιαίτερα δε αυτούς της Μεσογείου (ιταλικούς και ισπανικούς) (<http://www.ensembl.org>), προσφέροντας μια αδρή εκτίμηση για τη συχνότητα αυτών στον ελληνικό πληθυσμό.

Δεδομένης της ετερογενούς φύσης της νόσου, το δείγμα είναι σχετικά μικρό για να ανιχνεύσει στατιστικά σημαντικές πληροφορίες. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανομή του μη συνώνυμου πολυμορφισμού p.M642I (rs1788799) διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με κλινική συμπτωματολογία ύποπτη για τη νόσο NPC (SG) και της ομάδας ελέγχου (CG). Παρατηρήθηκε λοιπόν μεγαλύτερη συχνότητα του αλληλόμορφου I στην ομάδα SG. Σε περαιτέρω στατιστική ανάλυση, που διενεργήθηκε μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των επιμέρους ομάδων SG-1,-2 και -3 αντίστοιχα, φάνηκε η διαφορά αυτή να αποδίδεται κυρίως στις ομάδες με νευρολογική/ψυχιατρική συμπτωματολογία. Ενδιαφέρον είναι δε το γεγονός ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού έχει συσχετιστεί σε μελέτες με την παχυσαρκία και τη νόσο Alzheimer's

(Meyre et al., 2009, Erickson et al., 2008, Kresojevic et al., 2014). Πιθανότατα, επέκταση της μελέτης σε μία ομάδα μεγαλύτερου μεγέθους, με πιο ομοιογενή κλινικά χαρακτηριστικά θα μπορούσε να συμβάλλει προς την κατεύθυνση αυτή. Πράγματι, πρόσφατες γενετικές μελέτες σε ασθενείς με νευροεκφυλιστικά νοσήματα έδειξαν αυξημένο επιπολασμό μεταλλάξεων στα NPC γονίδια σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Cupidi et al., 2017, Synofzik et al., 2015). Μάλιστα, οι πρόσφατα αναθεωρημένες συστάσεις για την προσέγγιση και τη διάγνωση της νόσου, αλλά και άλλα δημοσιευμένα άρθρα, προτείνουν τη διενέργεια ελέγχου σε ομάδες ασθενών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα την αταξία πρώιμης έναρξης (Hendriksz et al., 2017, Marc C. Patterson, 2017).

Η πρωτεΐνη NPC1 θεωρείται ότι εμπλέκεται στην κλινική οντότητα της αθηρωμάτωσης (Yu et al., 2014), στην παθοφυσιολογία ορισμένων λοιμώξεων [Ebola virus (Gong et al., 2016), HIV (Tang et al., 2009) και μυκοβακτηριακές (Fineran et al., 2016)] και στην ογκολογία (Naren et al., 2016). Γενικά, ο αντίκτυπος των γενετικών παραλλαγών του γονιδίου *NPC1* στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται σημαντικός και δεδομένου του περιορισμένου αριθμού λειτουργικών μελετών του *NPC1*, αποτελεί ένα υποσχόμενο πεδίο για περαιτέρω έρευνα (Wassif et al., 2015)

8.2.2 Περιορισμοί της μελέτης

Οι υποομάδες SG-1,2 και 3 επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη με βάση την κλινική συμπτωματολογία και την φυσική πορεία της νόσου ή/και τον βιοχημικό φαινότυπο. Αποτελούνταν λοιπόν από ασθενείς με σημαντική υποψία NPC νόσησης (οι δύο NPC ασθενείς με τον κλασσικό βιοχημικό φαινότυπο μελετήθηκαν ως ξεχωριστή ομάδα NPCασθενείς/RG1-2, όπως προαναφέρθηκε). Δεδομένης της ευρείας ετερογένειας της νόσου, στο συλλεχθέν δείγμα παρατηρείται διακύμανση τόσο ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, όσο και το ηλικιακό φάσμα και την ηλικία έναρξης της συμπτωματολογίας. Αντανακλά λοιπόν την ποικιλομορφία της νόσου, γεγονός που υποστηρίζεται και από τα δημοσιευμένα στοιχεία της βάσης NPC ασθενών, όπου η

συμπτωματολογία και η ηλικία κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα με αυτά του δείγματός μας (Patterson et al., 2013). Εντούτοις, το γεγονός αυτό δυσχεραίνει τη γενετική προσέγγιση της νόσου.

Το εργαλείο πρόγνωσης της υποψίας νόσησης, NPC-SI, εφαρμόστηκε στους ασθενείς άνω των 4 ετών. Έντεκα ασθενείς από την ομάδα SG-2 συγκέντρωσαν βαθμολογία 40-70 και όλοι οι υπόλοιποι της ομάδας SG-2 και SG-3 ≥ 70 . Παρά λοιπόν την υψηλή κλινική υποψία δεν ανευρέθηκαν στην ομάδα SG σαφείς παθογόνες γενετικές αλλαγές. Το εργαλείο αυτό έχει ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα, και έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες (Wijburg et al., 2012). Πράγματι, στην καθημερινή κλινική πράξη είναι βοηθητικό στην διαγνωστική προσέγγιση της νόσου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα από πολλές ειδικότητες. Εντούτοις, έχουν περιγραφεί NPC ασθενείς με βαθμολογία < 70 και αντιστρόφως, αρκετοί ασθενείς με βαθμολογία ≥ 70 στους οποίους δεν επιβεβαιώνεται η νόσος (De Castro-Oros et al., 2017). Επίσης, φαίνεται ότι υποεκτιμά την σπλαχνική συμπτωματολογία και έχει μικρή διακριτική ικανότητα στα βρέφη (Wraith et al., 2014). Αντίθετα, όπως παρατηρήθηκε στη μελέτη μας, σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας με νευροεκφυλιστικά νοσήματα, όπου η νευρολογική και ψυχιατρική συμπτωματολογία είναι παρούσα με πολλαπλές εκδηλώσεις, η ευαισθησία φαίνεται να αυξάνεται και η ειδικότητα να μειώνεται. Προς επίλυση των προβλημάτων αυτών, πρόσφατα έχουν δημοσιευτεί αναθεωρήσεις (Pineda et al., 2016, Christian J Hendriksz, 2015b).

Παράλληλα με την κλινική ετερογένεια της νόσου, η σπανιότητά της είναι ένας επιπλέον παράγοντας που δυσχεραίνει την μελέτη της. Μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος, θα έδινε τη δυνατότητα ανεύρεσης περισσότερων παθογενετικών μεταλλάξεων. Πράγματι, σε πρόσφατη μελέτη με δείγμα 236 Ισπανών ασθενών με υποψία της νόσου, ταυτοποιήθηκαν 10 NPC ασθενείς και 8 αβέβαιοι NPC ασθενείς με μία μετάλλαξη (De Castro-Oros et al., 2017), ενώ σε άλλη περισσότερο εστιασμένη γενετική μελέτη σε 256 ενήλικες ψυχιατρικούς ασθενείς με μέτρια-υψηλή υποψία της νόσου τέθηκε η NPC διάγνωση σε μόλις 3 ασθενείς (Bauer et al., 2013b). Θα πρέπει βέβαια να λάβουμε υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης ότι η συλλογή των

δειγμάτων βασίστηκε σε ερωτηματολόγια, που συμπληρώθηκαν από διαφορετικούς θεράποντες με βάση την κλινική αξιολόγηση, χωρίς τυποποιημένους εξοπλισμούς ή δοκιμές. Παράλληλα, παρά το γεγονός ότι ακολούθησε και συζήτηση του περιστατικού με τον εκάστοτε θεράποντα, η πιθανότητα ύπαρξη κοινών νοσημάτων που δεν είχαν ελεγχθεί δεν μπορεί να αποκλειστεί με βεβαιότητα.

Στην ομάδα SG υπήρχαν και 2 ασθενείς με άτυπη δοκιμασία φιλιπίνης, στους οποίους δεν ανευρέθηκε μετάλλαξη. Περίπου 15-20% των επιβεβαιωμένων NPC ασθενών εμφανίζουν "άτυπο" φαινότυπο, ωστόσο η βιοχημική αυτή εικόνα απεικονίζεται και σε κυτταρικές σειρές NPC ετεροζυγώτων ή ασθενών που πάσχουν από άλλες διαταραχές με εμπλεκόμενες πρωτεΐνες στο μονοπάτι της νόσου NPC (Vanier and Latour, 2015, Platt et al., 2014, Wortmann et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, μεταλλάξεις που βρίσκονται σε εσόνια, καθώς και απαλοιφές μεγάλου μήκους δεν ανιχνεύονται με την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε (αλληλούχιση) και θα μπορούσαν να εξηγήσουν, εν μέρει, τις αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ της βιοχημικής διάγνωσης και της μοριακής επιβεβαίωσης της νόσου. Άλλες τεχνικές, όπως MLPA, μελέτη του RNA ή άλλοι βιοχημικοί δείκτες θα μπορούσαν να μας παρέχουν μια πληρέστερη εικόνα. Βέβαια, σε NPC ασθενείς συνήθως ανευρίσκεται τουλάχιστον μία παθογόνος γενετική αλλαγή, ενώ σπάνια μπορεί να παρατηρηθούν μεγάλες απαλοιφές σε ομοζυγωτία -κατά βάση- σε περιπτώσεις αιμομιξίας. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις όμως οδηγούν σε πολύ σοβαρές νευρολογικές μορφές της νόσου, ενώ ένας σημαντικός αριθμός των ασθενών της ομάδας SG ήταν έφηβοι ή νεαροί ενήλικες. Γενικά, έχει ενδιαφέρον να παρακολουθήσουμε την τελική διάγνωση των ασθενών αυτών.

9. Συμπεράσματα

1. Μοριακή ανάλυση με αλληλούχιση του γονιδίου *NPC1* -και σε επιλεγμένες περιπτώσεις του *NPC2*- διενεργήθηκε για πρώτη φορά σε υποομάδες του Ελληνικού πληθυσμού και προσφέρει δεδομένα σχετικά με το είδος και τη συχνότητα των γενετικών παραλλαγών, που εντοπίζονται στα *NPC* γονιδια.

2. Τα αποτελέσματα του γενετικού ελέγχου στην ομάδα ασθενών με κλινική υποψία της νόσου (SG) επέτρεψαν τη μελέτη της κατανομής των 6 συχνότερων πολυμορφισμών σε υγιή άτομα ελληνικής καταγωγής, δίνοντας μια αδρή εκτίμηση της συχνότητάς τους στον Ελληνικό πληθυσμό και βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μελετών σε διάφορα έθνη. Επιπλέον, μέσω αυτών μελετήθηκε η προέλευση των 2 καινούριων *NPC1* μεταλλάξεων, που ανιχνεύθηκαν στον NPC ασθενή 1.

3. Συνολικά, ανευρέθηκαν 26 γενετικές αλλαγές, 24 στο *NPC1* και 2 στο *NPC2*. Μεταξύ αυτών ανιχνεύτηκαν 3 καινούριες παθογενετικές μεταλλάξεις σε 3 NPC ασθενείς με βιοχημική διάγνωση της νόσου [p.K1057R (*c.3170A>G*) εξόνιο 21, p.A1132P (*c.3394G>C*) εξόνιο 22, *IVS23+3insT* (*c.3591+3insT*) εξόνιο 23], 2 νέοι μη παθογόνοι πολυμορφισμοί (*IVS 7-16C>T* και *IVS20+22G>C*) σε εσόνια στο γονίδιο *NPC1* και 2 σπάνιοι μη παθογόνοι γενετικοί πολυμορφισμοί με αμφίβολη κλινική σημασία σε ετεροζυγωτία, ένας στο γονίδιο *NPC1* και ένας στο γονίδιο *NPC2* [p.P237S (*c.709C>T*) στο *NPC1* και *IVS4+1G>A* στο *NPC2*].

4. Η καινούρια μετάλλαξη *IVS23+3insT* συσχετίστηκε με τον τυπικό βιοχημικό φαινότυπο και σε ομόζυγη κατάσταση με τον πρώιμο βρεφικό υπότυπο της νόσου.

5. Η νέα παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.K1057R συσχετίστηκε επίσης με το κλασσικό βιοχημικό πρότυπο.

6. Είναι δύσκολο να καταλήξουμε στην κλινική συσχέτιση του γενετικού συνδυασμού των δύο ανωτέρω μεταλλάξεων, δεδομένου ότι ο NPC ασθενής 1 -φορέας αυτών- έχει τεθεί σε θεραπεία μείωσης υποστρώματος τα τελευταία 11,5 έτη, όντας ουσιαστικά σε νευρολογικά ασυμπτωματικό

στάδιο. Ενδέχεται, η μακροπρόθεσμη παρακολούθησή του να μας προσφέρει περισσότερα στοιχεία στο θέμα αυτό.

7. Η ανάλυση του απλότυπου των δύο νέων μεταλλάξεων *IVS23+3insT* και p.K1057R κατέληξε στον προσδιορισμό ενός μοναδικού απλότυπου για την κάθε μία. Αποδεικνύεται έτσι η διαφορετική προέλευση της κάθε μετάλλαξης, ενώ υποστηρίζεται η ύπαρξη της “αρχής του ιδρυτή” (founder effect) για τη μετάλλαξη *IVS23+3insT* στο ελληνικό νησί.

8. Η μετάλλαξη p.A1132P συσχετίστηκε με τον κλασικό βιοχημικό φαινότυπο και πιθανότατα σε ομόζυγη κατάσταση σχετίζεται με την όψιμη βρεφική μορφή της νόσου.

9. Η κατανομή του μη συνώνυμου πολυμορφισμού p.M642I (rs1788799) διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με κλινική συμπτωματολογία ύποπτη για τη νόσο NPC (SG) και της ομάδας ελέγχου (CG). Ο πολυμορφισμός αυτός σε άλλες μελέτες έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικά νοσήματα και την παχυσαρκία. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται με επιφύλαξη λόγω του μεγέθους και της ετερογένειας του δείγματος. Μεγαλύτερος, πιο ομοιογενής πληθυσμός, καθώς επίσης και η χρήση τεχνικών μαζικής παράλληλης αλληλούχισης και βιοχημικών δεικτών, θα μπορούσε να οδηγήσει στον προσδιορισμό επιπλέον μεταλλάξεων ή/και στον συσχετισμό ήπιων γενετικών αλλαγών με συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά.

10. Ανιχνεύτηκαν συνολικά 28 φορείς της νόσου στα 99 άτομα που ελέγχθηκαν προς αυτήν την κατεύθυνση (~28,2%). Ένας φορέας παρουσίαζε ήπια σπληνομεγαλία, ένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου. Έγινε ενημέρωση σχετικά με το νόσημα στους πληθυσμούς αυτούς, ενώ διατηρείται ακόμη και σήμερα η επικοινωνία, στα πλαίσια του προγεννητικού ελέγχου. Η φύλαξη δειγμάτων ορού και γενετικού υλικού των φορέων δίνει την ευκαιρία μελλοντικής ανάλυσης τους σε μελέτη πιθανών βιοδεικτών της νόσου.

11. Ο NPC ασθενής 1 τέθηκε σε θεραπεία μείωσης υποστρώματος πριν την εμφάνιση νευρολογικής συμπτωματολογία (7,5 μηνών) και στην ηλικία των 12 ετών παραμένει ουσιαστικά ασυμπτωματικός. Ενδεχομένως, η πρώιμη εισαγωγή της θεραπείας να επιβράδυνε σημαντικά την

εμφάνιση της νόσου στον ασθενή μας. Περαιτέρω μελέτες πάνω στο θέμα αυτό, καθώς και η ανεύρεση βιοδεικτών που να αντανakλούν την πορεία της νευροεκφύλισης, αποτελούν σημαντικά πεδία έρευνας.

12. Ο NPC ασθενής 2 τέθηκε καθυστερημένα σε αγωγή με μιγλουστάτη και παρουσιάζει σαφή νευρολογική επιδείνωση. Στο πλαίσιο αυτό, και ως επέκταση της παρούσας μελέτης, λαμβάνει την φαρμακευτική ουσία 2-υδροξυ-προπυλ-κυκλδεξτρίνης μαζί με έναν ακόμη NPC ασθενή με θετικά αποτελέσματα.

13. Ο τελικός φαινότυπος της νόσου Niemann Pick τύπου C αποτελεί τη συνισταμένη αλληλεπίδρασης διαφόρων παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Έτσι λοιπόν, η συνδυαστική θεραπεία φαίνεται ότι έχει σημαντική θέση στη νόσο. Μάλιστα, επί της παρούσης διενεργούνται μελέτες στον τομέα της θεραπείας που στοχεύουν σε διαφορετικά μονοπάτια, τα τελικά αποτελέσματα των οποίων αναμένονται με ενδιαφέρον.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- ABI-MOSLEH, L., INFANTE, R. E., RADHAKRISHNAN, A., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2009. Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19316-21.
- ALOBAIDY, H. 2015. Recent advances in the diagnosis and treatment of niemann-pick disease type C in children: a guide to early diagnosis for the general pediatrician. *Int J Pediatr*, 2015, 816593.
- ALVELIUS, G., HJALMARSON, O., GRIFFITHS, W. J., BJORKHEM, I. & SJOVALL, J. 2001. Identification of unusual 7-oxygenated bile acid sulfates in a patient with Niemann-Pick disease, type C. *J Lipid Res*, 42, 1571-7.
- BAUER, P., BALDING, D. J., KLUNEMANN, H. H., LINDEN, D. E., ORY, D. S., PINEDA, M., PRILLER, J., SEDEL, F., MULLER, A., CHADHA-BOREHAM, H., WELFORD, R. W., STRASSER, D. S. & PATTERSON, M. C. 2013a. Genetic screening for Niemann-Pick disease type C in adults with neurological and psychiatric symptoms: findings from the ZOOM study. *Hum Mol Genet*, 22, 4349-56.
- BAUER, P., BALDING, D. J., KLUNEMANN, H. H., LINDEN, D. E., ORY, D. S., PINEDA, M., PRILLER, J., SEDEL, F., MULLER, A., CHADHA-BOREHAM, H., WELFORD, R. W., STRASSER, D. S. & PATTERSON, M. C. 2013b. Genetic screening for Niemann-Pick disease type C in adults with neurological and psychiatric symptoms: findings from the ZOOM study. *Hum Mol Genet*, 22, 4349-4356.
- BAUER, P., KNOBLICH, R., BAUER, C., FINCKH, U., HUFEN, A., KROPP, J., BRAUN, S., KUSTERMANN-KUHN, B., SCHMIDT, D., HARZER, K. & ROLFS, A. 2002. NPC1: Complete genomic sequence, mutation analysis, and characterization of haplotypes. *Hum Mutat*, 19, 30-8.
- BELMATOUG, N., BURLINA, A., GIRALDO, P., HENDRIKSZ, C. J., KUTER, D. J., MENGEL, E. & PASTORES, G. M. 2011. Gastrointestinal disturbances and their management in miglustat-treated patients. *J Inherit Metab Dis*, 34, 991-1001.
- BENUSSI, A., ALBERICI, A., PREMI, E., BERTASI, V., COTELLI, M. S., TURLA, M., DARDIS, A., ZAMPIERI, S., MARCHINA, E., PAGHERA, B., GALLIVANONE, F., CASTIGLIONI, I., PADOVANI, A. & BORRONI, B. 2015. Phenotypic heterogeneity of Niemann-Pick disease type C in monozygotic twins. *J Neurol*, 262, 642-7.
- BLOM, T. S., LINDER, M. D., SNOW, K., PIHKO, H., HESS, M. W., JOKITALO, E., VECKMAN, V., SYVANEN, A. C. & IKONEN, E. 2003. Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease. *Hum Mol Genet*, 12, 257-72.
- BOENZI, S., DEODATO, F., TAURISANO, R., MARTINELLI, D., VERRIGNI, D., CARROZZO, R., BERTINI, E., PASTORE, A., DIONISI-VICI, C. & JOHNSON, D. W. 2014. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease. *Clin Chim Acta*, 437, 93-100.
- BONNOT, O., GAMA, C. S., MENGEL, E., PINEDA, M., VANIER, M. T., WATSON, L., WATISSEE, M., SCHWIERIN, B. & PATTERSON, M. C. 2017. Psychiatric and neurological symptoms in patients with Niemann-Pick disease type C (NP-C): Findings from the International NPC Registry. *World J Biol Psychiatry*, 1-10.
- BORBON, I., CAMPBELL, E., KE, W. & ERICKSON, R. P. 2012a. The role of decreased levels of Niemann-Pick C1 intracellular cholesterol transport on obesity is reversed in the C57BL/6J, metabolic syndrome mouse strain: a metabolic or an inflammatory effect? *J Appl Genet*, 53, 323-30.
- BORBON, I., TOTENHAGEN, J., FIORENZA, M. T., CANTERINI, S., KE, W., TROUARD, T. & ERICKSON, R. P. 2012b. Niemann-Pick C1 mice, a model of "juvenile Alzheimer's disease", with normal gene expression in neurons and fibrillary astrocytes show long term survival and delayed neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 30, 875-87.
- BORBON, I. A., HILLMAN, Z., DURAN, E., JR., KIELA, P. R., FRAUTSCHY, S. A. & ERICKSON, R. P. 2012c. Lack of efficacy of curcumin on neurodegeneration in the mouse model of Niemann-Pick C1. *Pharmacol Biochem Behav*, 101, 125-31.
- BOUNTOUVI, E., PAPAPOPOULOU, A., VANIER, M. T., NYKTARI, G., KANELLAKIS, S., MICHELAKAKIS, H. & DINOPOULOS, A. 2017. Novel NPC1 mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations. *BMC Med Genet*, 18, 51.

- BOWMAN, E. A., WALTERFANG, M., ABEL, L., DESMOND, P., FAHEY, M. & VELAKOULIS, D. 2015. Longitudinal changes in cerebellar and subcortical volumes in adult-onset Niemann-Pick disease type C patients treated with miglustat. *J Neurol*, 262, 2106-14.
- BRAND, M., MULLER, A., ALSOP, J., VAN SCHAİK, I. N., BEMBI, B. & HUGHES, D. 2015. Results from a 9-year Intensive Safety Surveillance Scheme (IS(3)) in miglustat (Zavesca((R)))-treated patients. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 24, 329-33.
- BREMOVA, T., MALINOVA, V., AMRAOUI, Y., MENGEL, E., REINKE, J., KOLNIKOVA, M. & STRUPP, M. 2015. Acetyl-dl-leucine in Niemann-Pick type C: A case series. *Neurology*, 85, 1368-75.
- BUSSO, D., ONATE-ALVARADO, M. J., BALBOA, E., CASTRO, J., LIZAMA, C., MORALES, G., VARGAS, S., HARTEL, S., MORENO, R. D. & ZANLUNGO, S. 2014. Spermatozoa from mice deficient in Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) protein have defective cholesterol content and reduced in vitro fertilising ability. *Reprod Fertil Dev*, 26, 609-21.
- CARSTEA, E. D., MORRIS, J. A., COLEMAN, K. G., LOFTUS, S. K., ZHANG, D., CUMMINGS, C., GU, J., ROSENFELD, M. A., PAVAN, W. J., KRIZMAN, D. B., NAGLE, J., POLYMEROPOULOS, M. H., STURLEY, S. L., IOANNOU, Y. A., HIGGINS, M. E., COMLY, M., COONEY, A., BROWN, A., KANESKI, C. R., BLANCHETTE-MACKIE, E. J., DWYER, N. K., NEUFELD, E. B., CHANG, T. Y., LISCUM, L., STRAUSS, J. F., 3RD, OHNO, K., ZEIGLER, M., CARMİ, R., SOKOL, J., MARKIE, D., O'NEILL, R. R., VAN DIGGELEN, O. P., ELLEDER, M., PATTERSON, M. C., BRADY, R. O., VANIER, M. T., PENTCHEV, P. G. & TAGLE, D. A. 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, 277, 228-31.
- CARSTEA, E. D., POLYMEROPOULOS, M. H., PARKER, C. C., DETERA-WADLEIGH, S. D., O'NEILL, R. R., PATTERSON, M. C., GOLDIN, E., XIAO, H., STRAUB, R. E., VANIER, M. T. & ET AL. 1993. Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2002-4.
- CHIKH, K., RODRIGUEZ, C., VEY, S., VANIER, M. T. & MILLAT, G. 2005. Niemann-Pick type C disease: subcellular location and functional characterization of NPC2 proteins with naturally occurring missense mutations. *Hum Mutat*, 26, 20-8.
- CHRISTIAN J HENDRIKSZ, M. P., MICHAEL FAHEY, MARK WALTERFANG, MIRIAM STAMPFER, HEIKO RUNZ, MARC C. PATTERSON, JUAN V. TORRES, STEFAN A. KOLB 2015a. The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis. *Journal of Rare Disorders: Diagnosis & Therapy*, 1.
- CHRISTIAN J HENDRIKSZ, M. P., MICHAEL FAHEY, MARK WALTERFANG, MIRIAM STAMPFER, HEIKO RUNZ, MARC C. PATTERSON, JUAN V. TORRES, STEFAN A. KOLB 2015b. The Niemann-Pick Disease Type C Suspicion Index: Development of a New Tool to Aid Diagnosis. *Journal of Rare Disorders: Diagnosis & Therapy*, 1.
- COLIN, E., BARTH, M., BOUSSION, F., LATOUR, P., PIGUET-LACROIX, G., GUICHET, A., ZIEGLER, A., TRIAU, S., LOISEL, D., SENTILHES, L. & BONNEAU, D. 2016. In Utero Diagnosis of Niemann-Pick Type C in the Absence of Family History. *JIMD Rep*, 28, 105-110.
- CRUZ, J. C. & CHANG, T. Y. 2000. Fate of endogenously synthesized cholesterol in Niemann-Pick type C1 cells. *J Biol Chem*, 275, 41309-16.
- CRUZ, J. C., SUGII, S., YU, C. & CHANG, T. Y. 2000. Role of Niemann-Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem*, 275, 4013-21.
- CUPIDI, C., FRANGIPANE, F., GALLO, M., CLODOMIRO, A., COLAO, R., BERNARDI, L., ANFOSSI, M., CONIDI, M. E., VASSO, F., CURCIO, S. A., MIRABELLI, M., SMIRNE, N., TORCHIA, G., MURACA, M. G., PUCCIO, G., DI LORENZO, R., ZAMPIERI, S., ROMANELLO, M., DARDIS, A., MALETTA, R. G. & BRUNI, A. C. 2017. Role of Niemann-Pick Type C Disease Mutations in Dementia. *J Alzheimers Dis*, 55, 1249-1259.
- DAVIES, J. P., CHEN, F. W. & IOANNOU, Y. A. 2000. Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science*, 290, 2295-8.
- DAVIES, J. P. & IOANNOU, Y. A. 2000. Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem*, 275, 24367-74.

- DE CASTRO-OROS, I., IRUN, P., CEBOLLA, J. J., RODRIGUEZ-SUREDA, V., MALLEN, M., PUEYO, M. J., MOZAS, P., DOMINGUEZ, C. & POCOVI, M. 2017. Assessment of plasma chitotriosidase activity, CCL18/PARC concentration and NP-C suspicion index in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C: a prospective observational study. *J Transl Med*, 15, 43.
- DEFFIEU, M. S. & PFEFFER, S. R. 2011. Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 18932-6.
- DEVLIN, C., PIPALIA, N. H., LIAO, X., SCHUCHMAN, E. H., MAXFIELD, F. R. & TABAS, I. 2010. Improvement in lipid and protein trafficking in Niemann-Pick C1 cells by correction of a secondary enzyme defect. *Traffic*, 11, 601-15.
- DI LEO, E., PANICO, F., TARUGI, P., BATTISTI, C., FEDERICO, A. & CALANDRA, S. 2004. A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann-Pick type C disease. *Hum Mutat*, 24, 440.
- DI ROCCO, M., BARONE, R., MADEO, A. & FIUMARA, A. 2015. Miglustat Does Not Prevent Neurological Involvement in Niemann Pick C Disease. *Pediatr Neurol*, 53, e15.
- DI ROCCO, M., DARDIS, A., MADEO, A., BARONE, R. & FIUMARA, A. 2012. Early miglustat therapy in infantile Niemann-Pick disease type C. *Pediatr Neurol*, 47, 40-3.
- DIETSCHY, J. M. & TURLEY, S. D. 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*, 12, 105-12.
- DOUGHERTY, M., LAZAR, J., KLEIN, J. C., DIAZ, K., GOBILLOT, T., GRUNBLATT, E., HASLE, N., LAWRENCE, D., MAURANO, M., NELSON, M., OLSON, G., SRIVATSAN, S., SHENDURE, J., KEENE, C. D., BIRD, T., HORWITZ, M. S. & MARSHALL, D. A. 2016. Genome sequencing in a case of Niemann-Pick type C. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2, a001222.
- ELLEDER, M., SMID, F., HYNIOVA, H., CIHULA, J., ZEMAN, J. & MACEK, M. 1984. Liver findings in Niemann-Pick disease type C. *Histochem J*, 16, 1147-70.
- ELRICK, M. J. & LIEBERMAN, A. P. 2013. Autophagic dysfunction in a lysosomal storage disorder due to impaired proteolysis. *Autophagy*, 9, 234-5.
- ERICKSON, R. P. & FIORENZA, M. T. 2017. A hopeful therapy for Niemann-Pick C diseases. *Lancet*, 390, 1720-1721.
- ERICKSON, R. P., LARSON-THOME, K., WEBER, L., SZYBINSKA, A., MOSSAKOWSKA, M., STYCZYNSKA, M., BARCIKOWSKA, M. & KUZNICKI, J. 2008. Variation in NPC1, the gene encoding Niemann-Pick C1, a protein involved in intracellular cholesterol transport, is associated with Alzheimer disease and/or aging in the Polish population. *Neurosci Lett*, 447, 153-7.
- FANCELLO, T., DARDIS, A., ROSANO, C., TARUGI, P., TAPPINO, B., ZAMPIERI, S., PINOTTI, E., CORSOLINI, F., FECAROTTA, S., D'AMICO, A., DI ROCCO, M., UZIEL, G., CALANDRA, S., BEMBI, B. & FILOCAMO, M. 2009. Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics*, 10, 229-39.
- FECAROTTA, S., ROMANO, A., DELLA CASA, R., DEL GIUDICE, E., BRUSCHINI, D., MANSI, G., BEMBI, B., DARDIS, A., FIUMARA, A., DI ROCCO, M., UZIEL, G., ARDISSONE, A., ROCCATELLO, D., ALPA, M., BERTINI, E., D'AMICO, A., DIONISI-VICI, C., DEODATO, F., CAVIGLIA, S., FEDERICO, A., PALMERI, S., GABRIELLI, O., SANTORO, L., FILLA, A., RUSSO, C., PARENTI, G. & ANDRIA, G. 2015a. Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 22.
- FECAROTTA, S., ROMANO, A., DELLA CASA, R., DEL GIUDICE, E., BRUSCHINI, D., MANSI, G., BEMBI, B., DARDIS, A., FIUMARA, A., DI ROCCO, M., UZIEL, G., ARDISSONE, A., ROCCATELLO, D., ALPA, M., BERTINI, E., D'AMICO, A., DIONISI-VICI, C., DEODATO, F., CAVIGLIA, S., FEDERICO, A., PALMERI, S., GABRIELLI, O., SANTORO, L., FILLA, A., RUSSO, C., PARENTI, G. & ANDRIA, G. 2015b. Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 22.
- FERNANDEZ-VALERO, E. M., BALLART, A., ITURRIAGA, C., LLUCH, M., MACIAS, J., VANIER, M. T., PINEDA, M. & COLL, M. J. 2005. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*, 68, 245-54.

- FINERAN, P., LLOYD-EVANS, E., LACK, N. A., PLATT, N., DAVIS, L. C., MORGAN, A. J., HOGLINGER, D., TATITURI, R. V. V., CLARK, S., WILLIAMS, I. M., TYNAN, P., AL EISA, N., NAZAROVA, E., WILLIAMS, A., GALIONE, A., ORY, D. S., BESRA, G. S., RUSSELL, D. G., BRENNER, M. B., SIM, E. & PLATT, F. M. 2016. Pathogenic mycobacteria achieve cellular persistence by inhibiting the Niemann-Pick Type C disease cellular pathway. *Wellcome Open Res*, 1, 18.
- FU, R., WASSIF, C. A., YANJANIN, N. M., WATKINS-CHOW, D. E., BAXTER, L. L., INCAO, A., LISCUM, L., SIDHU, R., FIRNKES, S., GRAHAM, M., ORY, D. S., PORTER, F. D. & PAVAN, W. J. 2013. Efficacy of N-acetylcysteine in phenotypic suppression of mouse models of Niemann-Pick disease, type C1. *Hum Mol Genet*, 22, 3508-23.
- FU, R., YANJANIN, N. M., BIANCONI, S., PAVAN, W. J. & PORTER, F. D. 2010. Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C. *Mol Genet Metab*, 101, 214-8.
- GALANAUD, D., TOURBAH, A., LEHERICY, S., LEVEQUE, N., HERON, B., BILLETTE DE VILLEMEUR, T., GUFFON, N., FEILLET, F., BAUMANN, N., VANIER, M. T. & SEDEL, F. 2009. 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Mol Genet Metab*, 96, 55-8.
- GARVER, W. S., FRANCIS, G. A., JELINEK, D., SHEPHERD, G., FLYNN, J., CASTRO, G., WALSH VOCKLEY, C., COPPOCK, D. L., PETTIT, K. M., HEIDENREICH, R. A. & MEANEY, F. J. 2007. The National Niemann-Pick C1 disease database: report of clinical features and health problems. *Am J Med Genet A*, 143A, 1204-11.
- GARVER, W. S., NEWMAN, S. B., GONZALES-PACHECO, D. M., CASTILLO, J. J., JELINEK, D., HEIDENREICH, R. A. & ORLANDO, R. A. 2013. The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. *Genes Nutr*, 8, 271-87.
- GELSTHORPE, M. E., BAUMANN, N., MILLARD, E., GALE, S. E., LANGMADE, S. J., SCHAFFER, J. E. & ORY, D. S. 2008. Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *J Biol Chem*, 283, 8229-36.
- GIESE, A. K., MASCHER, H., GRITNER, U., EICHLER, S., KRAMP, G., LUKAS, J., TE VRUCHTE, D., AL EISA, N., CORTINA-BORJA, M., PORTER, F. D., PLATT, F. M. & ROLFS, A. 2015. A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 78.
- GINOCCHIO, V. M., D'AMICO, A., BERTINI, E., CERAVOLO, F., DARDIS, A., VERRIGNI, D., BEMBI, B., DIONISIVICI, C. & DEODATO, F. 2013. Efficacy of miglustat in Niemann-Pick C disease: a single centre experience. *Mol Genet Metab*, 110, 329-35.
- GOLDMAN, S. D. & KRISE, J. P. 2010. Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo. *J Biol Chem*, 285, 4983-94.
- GONG, X., QIAN, H., ZHOU, X., WU, J., WAN, T., CAO, P., HUANG, W., ZHAO, X., WANG, X., WANG, P., SHI, Y., GAO, G. F., ZHOU, Q. & YAN, N. 2016. Structural Insights into the Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection. *Cell*, 165, 1467-1478.
- GREER, W. L., DOBSON, M. J., GIROUARD, G. S., BYERS, D. M., RIDDELL, D. C. & NEUMANN, P. E. 1999a. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet*, 65, 1252-60.
- GREER, W. L., RIDDELL, D. C., GILLAN, T. L., GIROUARD, G. S., SPARROW, S. M., BYERS, D. M., DOBSON, M. J. & NEUMANN, P. E. 1998. The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097->T transversion in NPC1. *Am J Hum Genet*, 63, 52-4.
- GREER, W. L., RIDDELL, D. C., MURTY, S., GILLAN, T. L., GIROUARD, G. S., SPARROW, S. M., TATLIDIL, C., DOBSON, M. J. & NEUMANN, P. E. 1999b. Linkage disequilibrium mapping of the Nova Scotia variant of Niemann-Pick disease. *Clin Genet*, 55, 248-55.
- GUO, Y., HE, W., BOER, A. M., WEVERS, R. A., DE BRUIJN, A. M., GROENER, J. E., HOLLAK, C. E., AERTS, J. M., GALJAARD, H. & VAN DIGGELEN, O. P. 1995. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*, 18, 717-22.

- HARZER, K., BECK-WODL, S. & BAUER, P. 2014. Niemann-pick disease type C: new aspects in a long published family - partial manifestations in heterozygotes. *JIMD Rep*, 12, 25-9.
- HELMSCHRODT, C., BECKER, S., THIERY, J. & CEGLAREK, U. 2014. Preanalytical standardization for reactive oxygen species derived oxysterol analysis in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 446, 726-30.
- HELQUIST, P., MAXFIELD, F. R., WIECH, N. L. & WIEST, O. 2013. Treatment of Niemann--pick type C disease by histone deacetylase inhibitors. *Neurotherapeutics*, 10, 688-97.
- HENDRIKSZ, C. J., ANHEIM, M., BAUER, P., BONNOT, O., CHAKRAPANI, A., CORVOL, J. C., DE KONING, T. J., DEGTYAREVA, A., DIONISI-VICI, C., DOSS, S., DUNING, T., GIUNTI, P., IODICE, R., JOHNSTON, T., KELLY, D., KLUNEMANN, H. H., LORENZL, S., PADOVANI, A., POCOVI, M., SYNOFZIK, M., TERBLANCHE, A., THEN BERGH, F., TOPCU, M., TRANCHANT, C., WALTERFANG, M., VELTEN, C. & KOLB, S. A. 2017. The hidden Niemann-Pick type C patient: clinical niches for a rare inherited metabolic disease. *Curr Med Res Opin*, 33, 877-890.
- HERBST, S. M., SCHIRMER, S., POSOVSKY, C., JOCHUM, F., RODL, T., SCHROEDER, J. A., BARTH, T. F., HEHR, U., MELTER, M. & VERMEHREN, J. 2015. Taking the next step forward - Diagnosing inherited infantile cholestatic disorders with next generation sequencing. *Mol Cell Probes*, 29, 291-8.
- HERON, B., VALAYANNOPOULOS, V., BARUTEAU, J., CHABROL, B., OGIER, H., LATOUR, P., DOBBELAERE, D., EYER, D., LABARTHE, F., MAUREY, H., CUISSET, J. M., DE VILLEMEUR, T. B., SEDEL, F. & VANIER, M. T. 2012. Miglustat therapy in the French cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*, 7, 36.
- HIGGINS, M. E., DAVIES, J. P., CHEN, F. W. & IOANNOU, Y. A. 1999. Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Mol Genet Metab*, 68, 1-13.
- HOLLAK, C. E., HUGHES, D., VAN SCHAİK, I. N., SCHWIERIN, B. & BEMBI, B. 2009. Miglustat (Zavesca) in type 1 Gaucher disease: 5-year results of a post-authorisation safety surveillance programme. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 18, 770-7.
- IMRIE, J., DASGUPTA, S., BESLEY, G. T., HARRIS, C., HEPTINSTALL, L., KNIGHT, S., VANIER, M. T., FENSOM, A. H., WARD, C., JACKLIN, E., WHITEHOUSE, C. & WRAITH, J. E. 2007. The natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK. *J Inherit Metab Dis*, 30, 51-9.
- IMRIE, J. & WRAITH, J. E. 2001. Isolated splenomegaly as the presenting feature of Niemann-Pick disease type C. *Arch Dis Child*, 84, 427-9.
- INFANTE, R. E., WANG, M. L., RADHAKRISHNAN, A., KWON, H. J., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15287-92.
- INGEMANN, L. & KIRKEGAARD, T. 2014. Lysosomal storage diseases and the heat shock response: convergences and therapeutic opportunities. *J Lipid Res*, 55, 2198-210.
- IOANNOU, Y. A. 2000. The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab*, 71, 175-81.
- ITURRIAGA, C., PINEDA, M., FERNANDEZ-VALERO, E. M., VANIER, M. T. & COLL, M. J. 2006. Niemann-Pick C disease in Spain: clinical spectrum and development of a disability scale. *J Neurol Sci*, 249, 1-6.
- JAHNOVA, H., DVORAKOVA, L., VLASKOVA, H., HULKOVA, H., POUPETOVA, H., HREBICEK, M. & JESINA, P. 2014. Observational, retrospective study of a large cohort of patients with Niemann-Pick disease type C in the Czech Republic: a surprisingly stable diagnostic rate spanning almost 40 years. *Orphanet J Rare Dis*, 9, 140.
- JELINEK, D. A., MAGHSOODI, B., BORBON, I. A., HARDWICK, R. N., CHERRINGTON, N. J. & ERICKSON, R. P. 2012. Genetic variation in the mouse model of Niemann Pick C1 affects female, as well as male, adiposity, and hepatic bile transporters but has indeterminate effects on caveolae. *Gene*, 491, 128-34.
- JIANG, X., SIDHU, R., MYDOCK-MCGRANE, L., HSU, F. F., COVEY, D. F., SCHERRER, D. E., EARLEY, B., GALE, S. E., FARHAT, N. Y., PORTER, F. D., DIETZEN, D. J., ORSINI, J. J., BERRY-KRAVIS, E., ZHANG, X., REUNERT, J.,

- MARQUARDT, T., RUNZ, H., GIUGLIANI, R., SCHAFFER, J. E. & ORY, D. S. 2016. Development of a bile acid-based newborn screen for Niemann-Pick disease type C. *Sci Transl Med*, 8, 337ra63.
- JIANG, X., SIDHU, R., PORTER, F. D., YANJANIN, N. M., SPEAK, A. O., TE VRUCHTE, D. T., PLATT, F. M., FUJIWARA, H., SCHERRER, D. E., ZHANG, J., DIETZEN, D. J., SCHAFFER, J. E. & ORY, D. S. 2011. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J Lipid Res*, 52, 1435-45.
- KAMINSKI, W. E., KLUNEMANN, H. H., IBACH, B., ASLANIDIS, C., KLEIN, H. E. & SCHMITZ, G. 2002. Identification of novel mutations in the NPC1 gene in German patients with Niemann-Pick C disease. *J Inherit Metab Dis*, 25, 385-9.
- KARTEN, B., VANCE, D. E., CAMPENOT, R. B. & VANCE, J. E. 2002. Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J Neurochem*, 83, 1154-63.
- KARTEN, B., VANCE, D. E., CAMPENOT, R. B. & VANCE, J. E. 2003. Trafficking of cholesterol from cell bodies to distal axons in Niemann Pick C1-deficient neurons. *J Biol Chem*, 278, 4168-75.
- KASPER, D. L. & HARRISON, T. R. 2005. *Harrison's principles of internal medicine*, New York, McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
- KELLY, D. A., PORTMANN, B., MOWAT, A. P., SHERLOCK, S. & LAKE, B. D. 1993. Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *J Pediatr*, 123, 242-7.
- KIM, H., CHUN, Y., CHE, L., KIM, J. & LEE, S. 2017. The new obesity-associated protein, neuronal growth regulator 1 (NEGR1), is implicated in Niemann-Pick disease Type C (NPC2)-mediated cholesterol trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 1367-1374.
- KLINKE, G., ROHRBACH, M., GIUGLIANI, R., BURDA, P., BAUMGARTNER, M. R., TRAN, C., GAUTSCHI, M., MATHIS, D. & HERSBERGER, M. 2015. LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. *Clin Biochem*, 48, 596-602.
- KRESOJEVIC, N., DOBRICIC, V., SVETEL, M. & KOSTIC, V. 2014. Mutations in Niemann Pick type C gene are risk factor for Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 83, 559-62.
- KRISTIANA, I., YANG, H. & BROWN, A. J. 2008. Different kinetics of cholesterol delivery to components of the cholesterol homeostatic machinery: implications for cholesterol trafficking to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1781, 724-30.
- KWON, H. J., ABI-MOSLEH, L., WANG, M. L., DEISENHOFER, J., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. & INFANTE, R. E. 2009. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 137, 1213-24.
- LI, H., TURLEY, S. D., LIU, B., REPA, J. J. & DIETSCHY, J. M. 2008. GM2/GD2 and GM3 gangliosides have no effect on cellular cholesterol pools or turnover in normal or NPC1 mice. *J Lipid Res*, 49, 1816-28.
- LIAO, Y. J., FANG, C. C., YEN, C. H., HSU, S. M., WANG, C. K., HUANG, S. F., LIANG, Y. C., LIN, Y. Y., CHU, Y. T. & ARTHUR CHEN, Y. M. 2015. Niemann-Pick type C2 protein regulates liver cancer progression via modulating ERK1/2 pathway: Clinicopathological correlations and therapeutical implications. *Int J Cancer*, 137, 1341-51.
- LIN, N., ZHANG, H., QIU, W., YE, J., HAN, L., WANG, Y. & GU, X. 2014. Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease. *J Lipid Res*, 55, 338-43.
- LIU, N., TENGSTRAND, E. A., CHOURB, L. & HSIEH, F. Y. 2014. Di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate: A clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 279, 467-76.
- LLOYD-EVANS, E., MORGAN, A. J., HE, X., SMITH, D. A., ELLIOT-SMITH, E., SILLENCE, D. J., CHURCHILL, G. C., SCHUCHMAN, E. H., GALIONE, A. & PLATT, F. M. 2008. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med*, 14, 1247-55.
- LLOYD-EVANS, E., PELLER, D., RIEBELING, C., BODENNEC, J., DE-MORGAN, A., WALLER, H., SCHIFFMANN, R. & FUTERMAN, A. H. 2003a. Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *J Biol Chem*, 278, 23594-9.

- LLOYD-EVANS, E., PELLED, D., RIEBELING, C. & FUTERMAN, A. H. 2003b. Lyso-glycosphingolipids mobilize calcium from brain microsomes via multiple mechanisms. *Biochem J*, 375, 561-5.
- LLOYD-EVANS, E. & PLATT, F. M. 2010. Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic*, 11, 419-28.
- LONGO, D. L. 2012. *Harrison's principles of internal medicine*, New York, McGraw-Hill.
- MAARUP, T. J., CHEN, A. H., PORTER, F. D., FARHAT, N. Y., ORY, D. S., SIDHU, R., JIANG, X. & DICKSON, P. I. 2015. Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. *Mol Genet Metab*, 116, 75-9.
- MACIAS-VIDAL, J., RODRIGUEZ-PASCAU, L., SANCHEZ-OLLE, G., LLUCH, M., VILAGELIU, L., GRINBERG, D. & COLL, M. J. 2011. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clin Genet*, 80, 39-49.
- MADRA, M. & STURLEY, S. L. 2010. Niemann-Pick type C pathogenesis and treatment: from statins to sugars. *Clin Lipidol*, 5, 387-395.
- MAEKAWA, M., MISAWA, Y., SOTOURA, A., YAMAGUCHI, H., TOGAWA, M., OHNO, K., NITTONO, H., KAKIYAMA, G., IIDA, T., HOFMANN, A. F., GOTO, J., SHIMADA, M. & MANO, N. 2013. LC/ESI-MS/MS analysis of urinary 3beta-sulfooxy-7beta-N-acetylglucosaminyl-5-cholen-24-oic acid and its amides: new biomarkers for the detection of Niemann-Pick type C disease. *Steroids*, 78, 967-72.
- MAETZEL, D., SARKAR, S., WANG, H., ABI-MOSLEH, L., XU, P., CHENG, A. W., GAO, Q., MITALIPOVA, M. & JAENISCH, R. 2014. Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPS cells. *Stem Cell Reports*, 2, 866-80.
- MARC C. PATTERSON, M. P. C., MD; PAUL GISSEN, MD, PHD; MATHIEU ANHEIM, MD, PHD; PETER BAUER, PHD; OLIVIER BONNOT, MD, PHD; ANDREA DARDIS, PHD; CARLO DIONISI-VICI, MD; HANS-HERMANN KLÜNEMANN, MD; PHILIPPE LATOUR, PHARM D; CHARLES M. LOURENÇO, MD; DANIEL S. ORY, MD; ALASDAIR PARKER, MD, PHD; MIGUEL POCOVÍ, PHD; MICHAEL STRUPP, MD; MARIE T. VANIER, MD, PHD; MARK WALTERFANG, MBBS, PHD; THORSTEN MARQUARDT, MD, PHD 2017. Recommendations for the detection and diagnosis of Niemann-Pick disease type C. An update. *Neurology: Clinical Practice*, 7, 1-13.
- MARIN, T., CONTRERAS, P., CASTRO, J. F., CHAMORRO, D., BALBOA, E., BOSCH-MORATO, M., MUNOZ, F. J., ALVAREZ, A. R. & ZANLUNGO, S. 2014. Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice. *Nutrients*, 6, 3000-17.
- MASINGUE, M., ADANYEGUH, I., NADJAR, Y., SEDEL, F., GALANAUD, D. & MOCHEL, F. 2017. Evolution of structural neuroimaging biomarkers in a series of adult patients with Niemann-Pick type C under treatment. *Orphanet J Rare Dis*, 12, 22.
- MATSUO, M., SHRAISHI, K., WADA, K., ISHITSUKA, Y., DOI, H., MAEDA, M., MIZOGUCHI, T., ETO, J., MOCHINAGA, S., ARIMA, H. & IRIE, T. 2014. Effects of intracerebroventricular administration of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a patient with Niemann-Pick Type C disease. *Mol Genet Metab Rep*, 1, 391-400.
- MATSUO, M., TOGAWA, M., HIRABARU, K., MOCHINAGA, S., NARITA, A., ADACHI, M., EGASHIRA, M., IRIE, T. & OHNO, K. 2013. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. *Mol Genet Metab*, 108, 76-81.
- MAVRIDOU, I., COZAR, M., DOUZGOU, S., XAIDARA, A., LIANOU, D., VANIER, M. T., DIMITRIOU, E., GRINBERG, D., VILAGELIU, L. & MICHELAKAKIS, H. 2014. Niemann-Pick type C disease: a novel NPC1 mutation segregating in a Greek island. *Clin Genet*, 85, 543-7.
- MAVRIDOU, I., DIMITRIOU, E., VANIER, M. T., VILAGELIU, L., GRINBERG, D., LATOUR, P., XAIDARA, A., LYCOPOULOU, L., BOSTANTJOPOULOU, S., ZAFEIRIOU, D. & MICHELAKAKIS, H. 2017. The Spectrum of Niemann-Pick Type C Disease in Greece. *JIMD Rep*.
- MAXFIELD, F. R. & WUSTNER, D. 2002. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest*, 110, 891-8.
- MAZZACUVA, F., MILLS, P., MILLS, K., CAMUZEUX, S., GISSEN, P., NICOLI, E. R., WASSIF, C., TE VRUCHTE, D., PORTER, F. D., MAEKAWA, M., MANO, N., IIDA, T., PLATT, F. & CLAYTON, P. T. 2016. Identification of

- novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett*, 590, 1651-62.
- MCCAULIFF, L. A., XU, Z., LI, R., KODUKULA, S., KO, D. C., SCOTT, M. P., KAHN, P. C. & STORCH, J. 2015. Multiple Surface Regions on the Niemann-Pick C2 Protein Facilitate Intracellular Cholesterol Transport. *J Biol Chem*, 290, 27321-31.
- MCKAY BOUNFORD, K. & GISSEN, P. 2014. Genetic and laboratory diagnostic approach in Niemann Pick disease type C. *J Neurol*, 261 Suppl 2, S569-75.
- MEIKLE, P. J., HOPWOOD, J. J., CLAGUE, A. E. & CAREY, W. F. 1999. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*, 281, 249-54.
- MENGEL, E., KLUNEMANN, H. H., LOURENCO, C. M., HENDRIKSZ, C. J., SEDEL, F., WALTERFANG, M. & KOLB, S. A. 2013. Niemann-Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description. *Orphanet J Rare Dis*, 8, 166.
- MENGEL, E., PINEDA, M., HENDRIKSZ, C. J., WALTERFANG, M., TORRES, J. V. & KOLB, S. A. 2017. Differences in Niemann-Pick disease Type C symptomatology observed in patients of different ages. *Mol Genet Metab*, 120, 180-189.
- MEYRE, D., DELPLANQUE, J., CHEVRE, J. C., LECOEUR, C., LOBBENS, S., GALLINA, S., DURAND, E., VATIN, V., DEGRAEVE, F., PROENCA, C., GAGET, S., KORNER, A., KOVACS, P., KIESS, W., TICHET, J., MARRE, M., HARTIKAINEN, A. L., HORBER, F., POTOCZNA, N., HERCBERG, S., LEVY-MARCHAL, C., PATTOU, F., HEUDE, B., TAUBER, M., MCCARTHY, M. I., BLAKEMORE, A. I., MONTPETIT, A., POLYCHRONAKOS, C., WEILL, J., COIN, L. J., ASHER, J., ELLIOTT, P., JARVELIN, M. R., VISVIKIS-SIEST, S., BALKAU, B., SLADEK, R., BALDING, D., WALLEY, A., DINA, C. & FROGUEL, P. 2009. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet*, 41, 157-9.
- MILLAT, G., BAILO, N., MOLINERO, S., RODRIGUEZ, C., CHIKH, K. & VANIER, M. T. 2005. Niemann-Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab*, 86, 220-32.
- MILLAT, G., CHIKH, K., NAURECKIENE, S., SLEAT, D. E., FENSOM, A. H., HIGAKI, K., ELLEDER, M., LOBEL, P. & VANIER, M. T. 2001a. Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am J Hum Genet*, 69, 1013-21.
- MILLAT, G., MARCAIS, C., RAFI, M. A., YAMAMOTO, T., MORRIS, J. A., PENTCHEV, P. G., OHNO, K., WENGER, D. A. & VANIER, M. T. 1999. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet*, 65, 1321-9.
- MILLAT, G., MARCAIS, C., TOMASETTO, C., CHIKH, K., FENSOM, A. H., HARZER, K., WENGER, D. A., OHNO, K. & VANIER, M. T. 2001b. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*, 68, 1373-85.
- MILLAT, G., MARÇAIS, C., TOMASETTO, C., CHIKH, K., FENSOM, A. H., HARZER, K., WENGER, D. A., OHNO, K. & VANIER, M. T. 2001c. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*, 68, 1373-85.
- MIN, F., WANG, S. & ZHANG, L. 2015. Survey of Programs Used to Detect Alternative Splicing Isoforms from Deep Sequencing Data In Silico. *Biomed Res Int*, 2015, 831352.
- MORRIS, J. A., ZHANG, D., COLEMAN, K. G., NAGLE, J., PENTCHEV, P. G. & CARSTEA, E. D. 1999. The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 493-8.
- MOYER, V., FREESE, D. K., WHITINGTON, P. F., OLSON, A. D., BREWER, F., COLLETTI, R. B. & HEYMAN, M. B. 2004. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North

- American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 39, 115-28.
- NAREN, D., WU, J., GONG, Y., YAN, T., WANG, K., XU, W., YANG, X., SHI, F. & SHI, R. 2016. Niemann-Pick disease type C1(NPC1) is involved in resistance against imatinib in the imatinib-resistant Ph+ acute lymphoblastic leukemia cell line SUP-B15/RI. *Leuk Res*, 42, 59-67.
- NAURECKIENE, S., SLEAT, D. E., LACKLAND, H., FENSOM, A., VANIER, M. T., WATTIAUX, R., JADOT, M. & LOBEL, P. 2000. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*, 290, 2298-301.
- ODIEVRE, M. 1991. Clinical presentation of metabolic liver disease. *J Inherit Metab Dis*, 14, 526-30.
- OMARINI, L. P., FRANK-BURKHARDT, S. E., SEEMAYER, T. A., MENTHA, G. & TERRIER, F. 1995. Niemann-Pick disease type C: nodular splenomegaly. *Abdom Imaging*, 20, 157-60.
- ORY, D. S., OTTINGER, E. A., FARHAT, N. Y., KING, K. A., JIANG, X., WEISSFELD, L., BERRY-KRAVIS, E., DAVIDSON, C. D., BIANCONI, S., KEENER, L. A., RAO, R., SOLDATOS, A., SIDHU, R., WALTERS, K. A., XU, X., THURM, A., SOLOMON, B., PAVAN, W. J., MACHIELSE, B. N., KAO, M., SILBER, S. A., MCKEW, J. C., BREWER, C. C., VITE, C. H., WALKLEY, S. U., AUSTIN, C. P. & PORTER, F. D. 2017. Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1-2 trial. *Lancet*, 390, 1758-1768.
- OTTINGER, E. A., KAO, M. L., CARRILLO-CARRASCO, N., YANJANIN, N., SHANKAR, R. K., JANSSEN, M., BREWSTER, M., SCOTT, I., XU, X., CRADOCK, J., TERSE, P., DEHDASHTI, S. J., MARUGAN, J., ZHENG, W., PORTILLA, L., HUBBS, A., PAVAN, W. J., HEISS, J., C. H. V., WALKLEY, S. U., ORY, D. S., SILBER, S. A., PORTER, F. D., AUSTIN, C. P. & MCKEW, J. C. 2014. Collaborative development of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease. *Curr Top Med Chem*, 14, 330-9.
- OU, X., DAI, X., LONG, Z., TANG, Y., CAO, D., HAO, X., HU, Y., LI, X. & TANG, C. 2008. Liver X receptor agonist T0901317 reduces atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice by up-regulating NPC1 expression. *Sci China C Life Sci*, 51, 418-29.
- PAJARES, S., ARIAS, A., GARCIA-VILLORIA, J., MACIAS-VIDAL, J., ROS, E., DE LAS HERAS, J., GIROS, M., COLL, M. J. & RIBES, A. 2015. Cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency. *J Lipid Res*, 56, 1926-35.
- PAPANDREOU, A. & GISSEN, P. 2016. Diagnostic workup and management of patients with suspected Niemann-Pick type C disease. *Ther Adv Neurol Disord*, 9, 216-29.
- PARK, W. D., O'BRIEN, J. F., LUNDQUIST, P. A., KRAFT, D. L., VOCKLEY, C. W., KARNES, P. S., PATTERSON, M. C. & SNOW, K. 2003. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat*, 22, 313-25.
- PATTERSON, M. C., HENDRIKSZ, C. J., WALTERFANG, M., SEDEL, F., VANIER, M. T. & WIJBURG, F. 2012. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab*, 106, 330-44.
- PATTERSON, M. C., MENGEL, E., VANIER, M. T., SCHWIERIN, B., MULLER, A., CORNELISSE, P. & PINEDA, M. 2015. Stable or improved neurological manifestations during miglustat therapy in patients from the international disease registry for Niemann-Pick disease type C: an observational cohort study. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 65.
- PATTERSON, M. C., MENGEL, E., WIJBURG, F. A., MULLER, A., SCHWIERIN, B., DREVON, H., VANIER, M. T. & PINEDA, M. 2013. Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry. *Orphanet J Rare Dis*, 8, 12.
- PATTERSON, M. C. & PENTCHEV, P. G. 1994. Diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *J Pediatr*, 124, 655-6.
- PATTERSON, M. C. & PENTCHEV, P. G. 1996. Niemann-Pick; type C. *Neurology*, 46, 1785-6.
- PATTERSON, M. C. & PLATT, F. 2004. Therapy of Niemann-Pick disease, type C. *Biochim Biophys Acta*, 1685, 77-82.
- PATTERSON, M. C., VECCHIO, D., JACKLIN, E., ABEL, L., CHADHA-BOREHAM, H., LUZY, C., GIORGINO, R. & WRAITH, J. E. 2010. Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C. *J Child Neurol*, 25, 300-5.

- PEAKE, K. B. & VANCE, J. E. 2010. Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Lett*, 584, 2731-9.
- PENTCHEV, P. G., COMLY, M. E., KRUTH, H. S., VANIER, M. T., WENGER, D. A., PATEL, S. & BRADY, R. O. 1985. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8247-51.
- PINEDA, M., MENGEL, E., JAHNOVA, H., HERON, B., IMRIE, J., LOURENCO, C. M., VAN DER LINDEN, V., KARIMZADEH, P., VALAYANNOPOULOS, V., JESINA, P., TORRES, J. V. & KOLB, S. A. 2016. A Suspicion Index to aid screening of early-onset Niemann-Pick disease Type C (NP-C). *BMC Pediatr*, 16, 107.
- PINEDA, M., PEREZ-POYATO, M. S., O'CALLAGHAN, M., VILASECA, M. A., POCOVI, M., DOMINGO, R., PORTAL, L. R., PEREZ, A. V., TEMUDO, T., GASPAS, A., PENAS, J. J., ROLDAN, S., FUMERO, L. M., DE LA BARCA, O. B., SILVA, M. T., MACIAS-VIDAL, J. & COLL, M. J. 2010. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab*, 99, 358-66.
- PINEDA, M., WRAITH, J. E., MENGEL, E., SEDEL, F., HWU, W. L., ROHRBACH, M., BEMBI, B., WALTERFANG, M., KORENKE, G. C., MARQUARDT, T., LUZY, C., GIORGINO, R. & PATTERSON, M. C. 2009. Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab*, 98, 243-9.
- PIPALIA, N. H., COSNER, C. C., HUANG, A., CHATTERJEE, A., BOURBON, P., FARLEY, N., HELQUIST, P., WIEST, O. & MAXFIELD, F. R. 2011. Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5620-5.
- PLATT, F. M., WASSIF, C., COLACO, A., DARDIS, A., LLOYD-EVANS, E., BEMBI, B. & PORTER, F. D. 2014. Disorders of Cholesterol Metabolism and Their Unanticipated Convergent Mechanisms of Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 15, 173-194.
- PLATT, N., SPEAK, A. O., COLACO, A., GRAY, J., SMITH, D. A., WILLIAMS, I. M., WALLOM, K. L. & PLATT, F. M. 2016. Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C. *J Neurochem*, 136 Suppl 1, 74-80.
- POIRIER, S., MAYER, G., MURPHY, S. R., GARVER, W. S., CHANG, T. Y., SCHU, P. & SEIDAH, N. G. 2013. The cytosolic adaptor AP-1A is essential for the trafficking and function of Niemann-Pick type C proteins. *Traffic*, 14, 458-69.
- POONGAVANAM, V., KONGSTED, J. & WUSTNER, D. 2016. Computational Analysis of Sterol Ligand Specificity of the Niemann Pick C2 Protein. *Biochemistry*, 55, 5165-79.
- PORTER, F. D., SCHERRER, D. E., LANIER, M. H., LANGMADE, S. J., MOLUGU, V., GALE, S. E., OLZESKI, D., SIDHU, R., DIETZEN, D. J., FU, R., WASSIF, C. A., YANJANIN, N. M., MARSO, S. P., HOUSE, J., VITE, C., SCHAFFER, J. E. & ORY, D. S. 2010. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med*, 2, 56ra81.
- REMENOVA, T., MORAND, O., AMATO, D., CHADHA-BOREHAM, H., TSURUTANI, S. & MARQUARDT, T. 2015. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial studying the effects of *Saccharomyces boulardii* on the gastrointestinal tolerability, safety, and pharmacokinetics of miglustat. *Orphanet J Rare Dis*, 10, 81.
- REUNERT, J., FOBKER, M., KANNENBERG, F., DU CHESNE, I., PLATE, M., WELLHAUSEN, J., RUST, S. & MARQUARDT, T. 2016. Rapid Diagnosis of 83 Patients with Niemann Pick Type C Disease and Related Cholesterol Transport Disorders by Cholestantriol Screening. *EBioMedicine*, 4, 170-5.
- REUNERT, J., LOTZ-HAVLA, A. S., POLO, G., KANNENBERG, F., FOBKER, M., GRIESE, M., MENGEL, E., MUNTAU, A. C., SCHNABEL, P., SOMMERBURG, O., BORGGRAEFE, I., DARDIS, A., BURLINA, A. P., MALL, M. A., CIANA, G., BEMBI, B., BURLINA, A. B. & MARQUARDT, T. 2015. Niemann-Pick Type C-2 Disease: Identification by Analysis of Plasma Cholestane-3beta,5alpha,6beta-Triol and Further Insight into the Clinical Phenotype. *JIMD Rep*, 23, 17-26.
- RIBEIRO, I., MARCAO, A., AMARAL, O., SA MIRANDA, M. C., VANIER, M. T. & MILLAT, G. 2001. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet*, 109, 24-32.

- RIES, M., SCHAEFER, E., LUHRS, T., MANI, L., KUHN, J., VANIER, M. T., KRUMMENAUER, F., GAL, A., BECK, M. & MENGEL, E. 2006. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C. *J Inherit Metab Dis*, 29, 647-52.
- RODRIGUES, A. F., GRAY, R. G., PREECE, M. A., BROWN, R., HILL, F. G., BAUMANN, U. & MCKIERNAN, P. J. 2006. The usefulness of bone marrow aspiration in the diagnosis of Niemann-Pick disease type C in infantile liver disease. *Arch Dis Child*, 91, 841-4.
- RODRIGUEZ-PASCAU, L., COLL, M. J., VILAGELIU, L. & GRINBERG, D. 2009. Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease. *Hum Mutat*, 30, E993-E1001.
- RODRIGUEZ-PASCAU, L., TOMA, C., MACIAS-VIDAL, J., COZAR, M., CORMAND, B., LYKOPOULOU, L., COLL, M. J., GRINBERG, D. & VILAGELIU, L. 2012. Characterisation of two deletions involving NPC1 and flanking genes in Niemann-Pick Type C disease patients. *Mol Genet Metab*, 107, 716-20.
- RUNZ, H., DOLLE, D., SCHLITTER, A. M. & ZSCHOCKE, J. 2008. NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database. *Hum Mutat*, 29, 345-50.
- SALMAN, A., COUGNOUX, A., FARHAT, N., WASSIF, C. A. & PORTER, F. D. 2017. Association of NPC1 variant p.P237S with a pathogenic splice variant in two Niemann-Pick disease type C1 patients. *Am J Med Genet A*, 173, 1038-1040.
- SANTOS, M. L., RASKIN, S., TELLES, D. S., LOHR JUNIOR, A., LIBERALESSO, P. B., VIEIRA, S. C. & CORDEIRO, M. L. 2008. Treatment of a child diagnosed with Niemann-Pick disease type C with miglustat: A case report in Brazil. *J Inherit Metab Dis*, 31 Suppl 2, 357-61.
- SARKAR, S., MAETZEL, D., KOROLCHUK, V. I. & JAENISCH, R. 2014. Restarting stalled autophagy a potential therapeutic approach for the lipid storage disorder, Niemann-Pick type C1 disease. *Autophagy*, 10, 1137-40.
- SCHOFER, O., MISCHO, B., PUSCHEL, W., HARZER, K. & VANIER, M. T. 1998. Early-lethal pulmonary form of Niemann-Pick type C disease belonging to a second, rare genetic complementation group. *Eur J Pediatr*, 157, 45-9.
- SCHWERD, T., PANDEY, S., YANG, H. T., BAGOLA, K., JAMESON, E., JUNG, J., LACHMANN, R. H., SHAH, N., PATEL, S. Y., BOOTH, C., RUNZ, H., DUKER, G., BETTELS, R., ROHRBACH, M., KUGATHASAN, S., CHAPEL, H., KESHAV, S., ELKADRI, A., PLATT, N., MUISE, A. M., KOLETZKO, S., XAVIER, R. J., MARQUARDT, T., POWRIE, F., WRAITH, J. E., GYRD-HANSEN, M., PLATT, F. M. & UHLIG, H. H. 2017. Impaired antibacterial autophagy links granulomatous intestinal inflammation in Niemann-Pick disease type C1 and XIAP deficiency with NOD2 variants in Crohn's disease. *Gut*, 66, 1060-1073.
- SCOTT, C. & IOANNOU, Y. A. 2004. The NPC1 protein: structure implies function. *Biochim Biophys Acta*, 1685, 8-13.
- SEDEL, F., CHABROL, B., AUDOIN, B., KAPHAN, E., TRANCHANT, C., BURZYKOWSKI, T., TOURBAH, A., VANIER, M. T. & GALANAUD, D. 2016. Normalisation of brain spectroscopy findings in Niemann-Pick disease type C patients treated with miglustat. *J Neurol*, 263, 927-936.
- SMITH, D., WALLOM, K. L., WILLIAMS, I. M., JEYAKUMAR, M. & PLATT, F. M. 2009. Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiol Dis*, 36, 242-51.
- STRUPP, M., KREMMYDA, O., ADAMCZYK, C., BOTTCHE, N., MUTH, C., YIP, C. W. & BREMOVA, T. 2014. Central ocular motor disorders, including gaze palsy and nystagmus. *J Neurol*, 261 Suppl 2, S542-58.
- SUBRAMANIAN, K. & BALCH, W. E. 2008. NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15223-4.
- SUN, X., MARKS, D. L., PARK, W. D., WHEATLEY, C. L., PURI, V., O'BRIEN, J. F., KRAFT, D. L., LUNDQUIST, P. A., PATTERSON, M. C., PAGANO, R. E. & SNOW, K. 2001. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am J Hum Genet*, 68, 1361-72.

- SYNOFZIK, M., HARMUTH, F., STAMPFER, M., MULLER VOM HAGEN, J., SCHOLS, L. & BAUER, P. 2015. NPC1 is enriched in unexplained early onset ataxia: a targeted high-throughput screening. *J Neurol*, 262, 2557-63.
- TANAKA, Y., YAMADA, Y., ISHITSUKA, Y., MATSUO, M., SHIRAIISHI, K., WADA, K., UCHIO, Y., KONDO, Y., TAKEO, T., NAKAGATA, N., HIGASHI, T., MOTOYAMA, K., ARIMA, H., MOCHINAGA, S., HIGAKI, K., OHNO, K. & IRIE, T. 2015. Efficacy of 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in Niemann-Pick Disease Type C Model Mice and Its Pharmacokinetic Analysis in a Patient with the Disease. *Biol Pharm Bull*, 38, 844-51.
- TANG, Y., LEO, I. C., COLEMAN, E. M., BROUGHTON, R. S. & HILDRETH, J. E. 2009. Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J Virol*, 83, 7982-95.
- TATEISHI, H., MONDE, K., ANRAKU, K., KOGA, R., HAYASHI, Y., CIFTCI, H. I., DEMIRCI, H., HIGASHI, T., MOTOYAMA, K., ARIMA, H., OTSUKA, M. & FUJITA, M. 2017. A clue to unprecedented strategy to HIV eradication: "Lock-in and apoptosis". *Sci Rep*, 7, 8957.
- TE VRUCHTE, D., SPEAK, A. O., WALLOM, K. L., AL EISA, N., SMITH, D. A., HENDRIKSZ, C. J., SIMMONS, L., LACHMANN, R. H., COUSINS, A., HARTUNG, R., MENGEL, E., RUNZ, H., BECK, M., AMRAOUI, Y., IMRIE, J., JACKLIN, E., RIDDICK, K., YANJANIN, N. M., WASSIF, C. A., ROLFS, A., RIMMELE, F., WRIGHT, N., TAYLOR, C., RAMASWAMI, U., COX, T. M., HASTINGS, C., JIANG, X., SIDHU, R., ORY, D. S., ARIAS, B., JEYAKUMAR, M., SILLENCE, D. J., WRAITH, J. E., PORTER, F. D., CORTINA-BORJA, M. & PLATT, F. M. 2014. Relative acidic compartment volume as a lysosomal storage disorder-associated biomarker. *J Clin Invest*, 124, 1320-8.
- TEDESCHI, G., BONAVIDA, S., BARTON, N. W., BETOLINO, A., FRANK, J. A., PATRONAS, N. J., ALGER, J. R. & SCHIFFMANN, R. 1998. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in the clinical evaluation of patients with Niemann-Pick type C disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65, 72-9.
- TORNE, S., DARANDALE, S., VAVIA, P., TROTTA, F. & CAVALLI, R. 2013. Cyclodextrin-based nanosponges: effective nanocarrier for tamoxifen delivery. *Pharm Dev Technol*, 18, 619-25.
- TORRES, S., MATIAS, N., BAULIES, A., NUNEZ, S., ALARCON-VILA, C., MARTINEZ, L., NUNO, N., FERNANDEZ, A., CABALLERIA, J., LEVADE, T., GONZALEZ-FRANQUESA, A., GARCIA-ROVES, P., BALBOA, E., ZANLUNGO, S., FABRIAS, G., CASAS, J., ENRICH, C., GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2017. Mitochondrial GSH replenishment as a potential therapeutic approach for Niemann Pick type C disease. *Redox Biol*, 11, 60-72.
- TORTELLI, B., FUJIWARA, H., BAGEL, J. H., ZHANG, J., SIDHU, R., JIANG, X., YANJANIN, N. M., SHANKAR, R. K., CARILLO-CARASCO, N., HEISS, J., OTTINGER, E., PORTER, F. D., SCHAFFER, J. E., VITE, C. H. & ORY, D. S. 2014. Cholesterol homeostatic responses provide biomarkers for monitoring treatment for the neurodegenerative disease Niemann-Pick C1 (NPC1). *Hum Mol Genet*, 23, 6022-33.
- VANCE, J. E. 2010. Transfer of cholesterol by the NPC team. *Cell Metab*, 12, 105-6.
- VANCE, J. E. & KARTEN, B. 2014. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res*, 55, 1609-1621.
- VANIER, M. T. 2010. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 16.
- VANIER, M. T. 2015. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J Inherit Metab Dis*, 38, 187-99.
- VANIER, M. T., GISSEN, P., BAUER, P., COLL, M. J., BURLINA, A., HENDRIKSZ, C. J., LATOUR, P., GOIZET, C., WELFORD, R. W., MARQUARDT, T. & KOLB, S. A. 2016. Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Mol Genet Metab*, 118, 244-54.
- VANIER, M. T. & LATOUR, P. 2015. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test. *Methods Cell Biol*, 126, 357-75.
- VANIER, M. T., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C., ROUSSON, R., GAZZAH, N., JUGE, M. C., PENTCHEV, P. G., REVOL, A. & LOUISOT, P. 1991. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta*, 1096, 328-37.
- VAZQUEZ, M. C., BALBOA, E., ALVAREZ, A. R. & ZANLUNGO, S. 2012. Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 205713.

- VEROT, L., CHIKH, K., FREYDIERE, E., HONORE, R., VANIER, M. T. & MILLAT, G. 2007. Niemann-Pick C disease: functional characterization of three NPC2 mutations and clinical and molecular update on patients with NPC2. *Clin Genet*, 71, 320-30.
- VITE, C. H., BAGEL, J. H., SWAIN, G. P., PROCIUK, M., SIKORA, T. U., STEIN, V. M., O'DONNELL, P., RUANE, T., WARD, S., CROOKS, A., LI, S., MAULDIN, E., STELLAR, S., DE MEULDER, M., KAO, M. L., ORY, D. S., DAVIDSON, C., VANIER, M. T. & WALKLEY, S. U. 2015. Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Sci Transl Med*, 7, 276ra26.
- WALKLEY, S. U. & SUZUKI, K. 2004. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta*, 1685, 48-62.
- WALTERFANG, M., CHIEN, Y. H., IMRIE, J., RUSHTON, D., SCHUBIGER, D. & PATTERSON, M. C. 2012. Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: systematic literature review and evidence from studies with miglustat. *Orphanet J Rare Dis*, 7, 76.
- WANG, M. L., MOTAMED, M., INFANTE, R. E., ABI-MOSLEH, L., KWON, H. J., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 2010. Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab*, 12, 166-73.
- WASSIF, C. A., CROSS, J. L., IBEN, J., SANCHEZ-PULIDO, L., COUGNOUX, A., PLATT, F. M., ORY, D. S., PONTING, C. P., BAILEY-WILSON, J. E., BIESECKER, L. G. & PORTER, F. D. 2015. High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genet Med*.
- WATARI, H., BLANCHETTE-MACKIE, E. J., DWYER, N. K., WATARI, M., BURD, C. G., PATEL, S., PENTCHEV, P. G. & STRAUSS, J. F., 3RD 2000. Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions, posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res*, 259, 247-56.
- WELFORD, R. W., GARZOTTI, M., MARQUES LOURENCO, C., MENGEL, E., MARQUARDT, T., REUNERT, J., AMRAOUI, Y., KOLB, S. A., MORAND, O. & GROENEN, P. 2014. Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PLoS One*, 9, e114669.
- WIJBURG, F. A., SEDEL, F., PINEDA, M., HENDRIKSZ, C. J., FAHEY, M., WALTERFANG, M., PATTERSON, M. C., WRAITH, J. E. & KOLB, S. A. 2012. Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Neurology*, 78, 1560-7.
- WORTMANN, S. B., VAZ, F. M., GARDEITCHIK, T., VISSERS, L. E., RENKEMA, G. H., SCHUURS-HOEIJMAKERS, J. H., KULIK, W., LAMMENS, M., CHRISTIN, C., KLUIJTMANS, L. A., RODENBURG, R. J., NIJTMANS, L. G., GRUNEWALD, A., KLEIN, C., GERHOLD, J. M., KOZICZ, T., VAN HASSELT, P. M., HARAKALOVA, M., KLOOSTERMAN, W., BARIC, I., PRONICKA, E., UCAR, S. K., NAESS, K., SINGHAL, K. K., KRUMINA, Z., GILISSEN, C., VAN BOKHOVEN, H., VELTMAN, J. A., SMEITINK, J. A., LEFEBER, D. J., SPELBRINK, J. N., WEVERS, R. A., MORAVA, E. & DE BROUWER, A. P. 2012. Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nat Genet*, 44, 797-802.
- WRAITH, J. E., BAUMGARTNER, M. R., BEMBI, B., COVANIS, A., LEVADE, T., MENGEL, E., PINEDA, M., SEDEL, F., TOPCU, M., VANIER, M. T., WIDNER, H., WIJBURG, F. A. & PATTERSON, M. C. 2009. Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol Genet Metab*, 98, 152-65.
- WRAITH, J. E., SEDEL, F., PINEDA, M., WIJBURG, F. A., HENDRIKSZ, C. J., FAHEY, M., WALTERFANG, M., PATTERSON, M. C., CHADHA-BOREHAM, H. & KOLB, S. A. 2014. Niemann-Pick type C Suspicion Index tool: analyses by age and association of manifestations. *J Inherit Metab Dis*, 37, 93-101.
- XIE, C., BURNS, D. K., TURLEY, S. D. & DIETSCHY, J. M. 2000. Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 1106-17.
- XIE, C., LI, N., CHEN, Z. J., LI, B. L. & SONG, B. L. 2011. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner. *J Biol Chem*, 286, 35933-42.

- XIE, C., TURLEY, S. D. & DIETSCHY, J. M. 1999. Cholesterol accumulation in tissues of the Niemann-pick type C mouse is determined by the rate of lipoprotein-cholesterol uptake through the coated-pit pathway in each organ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11992-7.
- YAMAMOTO, T., FENG, J. H., HIGAKI, K., TANIGUCHI, M., NANBA, E., NINOMIYA, H. & OHNO, K. 2004. Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain Dev*, 26, 245-50.
- YAMAMOTO, T., NANBA, E., NINOMIYA, H., HIGAKI, K., TANIGUCHI, M., ZHANG, H., AKABOSHI, S., WATANABE, Y., TAKESHIMA, T., INUI, K., OKADA, S., TANAKA, A., SAKURAGAWA, N., MILLAT, G., VANIER, M. T., MORRIS, J. A., PENTCHEV, P. G. & OHNO, K. 1999. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet*, 105, 10-6.
- YAMAMOTO, T., NINOMIYA, H., MATSUMOTO, M., OHTA, Y., NANBA, E., TSUTSUMI, Y., YAMAKAWA, K., MILLAT, G., VANIER, M. T., PENTCHEV, P. G. & OHNO, K. 2000. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet*, 37, 707-12.
- YANG, C. C., SU, Y. N., CHIOU, P. C., FIETZ, M. J., YU, C. L., HWU, W. L. & LEE, M. J. 2005. Six novel NPC1 mutations in Chinese patients with Niemann-Pick disease type C. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 592-5.
- YANJANIN, N. M., VELEZ, J. I., GROPMAN, A., KING, K., BIANCONI, S. E., CONLEY, S. K., BREWER, C. C., SOLOMON, B., PAVAN, W. J., ARCOS-BURGOS, M., PATTERSON, M. C. & PORTER, F. D. 2010. Linear clinical progression, independent of age of onset, in Niemann-Pick disease, type C. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B, 132-40.
- YASMINA AMRAOUI, E. M., MICHAEL BECK 2013. Clinical variability in five pairs of siblings with Niemann-Pick disease type C. *Mol Genet Metab*, 108, S19-S20.
- YERUSHALMI, B., SOKOL, R. J., NARKEWICZ, M. R., SMITH, D., ASHMEAD, J. W. & WENGER, D. A. 2002. Niemann-pick disease type C in neonatal cholestasis at a North American Center. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 35, 44-50.
- YU, T. & LIEBERMAN, A. P. 2013. Npc1 acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin. *PLoS Genet*, 9, e1003462.
- YU, X. H., JIANG, N., YAO, P. B., ZHENG, X. L., CAYABYAB, F. S. & TANG, C. K. 2014. NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 429, 69-75.
- ZAMPIERI, S., BEMBI, B., ROSSO, N., FILOCAMO, M. & DARDIS, A. 2012. Treatment of Human Fibroblasts Carrying NPC1 Missense Mutations with MG132 Leads to an Improvement of Intracellular Cholesterol Trafficking. *JIMD Rep*, 2, 59-69.
- ZAMPIERI, S., MELLON, S. H., BUTTERS, T. D., NEVYJEL, M., COVEY, D. F., BEMBI, B. & DARDIS, A. 2009. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J Cell Mol Med*, 13, 3786-96.
- ZECH, M., NUBLING, G., CASTROP, F., JOCHIM, A., SCHULTE, E. C., MOLLENHAUER, B., LICHTNER, P., PETERS, A., GIEGER, C., MARQUARDT, T., VANIER, M. T., LATOUR, P., KLUNEMANN, H., TRENKWALDER, C., DIEHL-SCHMID, J., PERNECZKY, R., MEITINGER, T., OEXLE, K., HASLINGER, B., LORENZL, S. & WINKELMANN, J. 2013. Niemann-Pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders. *PLoS One*, 8, e82879.
- ZERVAS, M., DOBRENIS, K. & WALKLEY, S. U. 2001a. Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60, 49-64.
- ZERVAS, M., SOMERS, K. L., THRALL, M. A. & WALKLEY, S. U. 2001b. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Curr Biol*, 11, 1283-7.
- ZHANG, H., WANG, Y., LIN, N., YANG, R., QIU, W., HAN, L., YE, J. & GU, X. 2014. Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by NPC1/NPC2 gene mutation confirmation in Chinese patients. *Orphanet J Rare Dis*, 9, 82.

- ZHANG, J. R., COLEMAN, T., LANGMADE, S. J., SCHERRER, D. E., LANE, L., LANIER, M. H., FENG, C., SANDS, M. S., SCHAFFER, J. E., SEMENKOVICH, C. F. & ORY, D. S. 2008. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. *J Clin Invest*, 118, 2281-90.
- ZHANG, K., SUN, F. & ZHAO, H. 2005. HAPLORE: a program for haplotype reconstruction in general pedigrees without recombination. *Bioinformatics*, 21, 90-103.
- ZHANG, M., DWYER, N. K., NEUFELD, E. B., LOVE, D. C., COONEY, A., COMLY, M., PATEL, S., WATARI, H., STRAUSS, J. F., 3RD, PENTCHEV, P. G., HANOVER, J. A. & BLANCHETTE-MACKIE, E. J. 2001. Sterol-modulated glycolipid sorting occurs in niemann-pick C1 late endosomes. *J Biol Chem*, 276, 3417-25.

Παράρτημα

A. Ερωτηματολόγια.....	162
Σε νεογνά και βρέφη με ιδιοπαθή χολοστατικό ίκτερο ή υγιή άτομα με μεμονωμένη σπληνομεγαλία (SG-1)	
Σε παιδιά και εφήβους με νευρολογική συμπτωματολογία και σπλαχνική ή ψυχιατρική συμπτωματολογία (SG-2)	
Σε εφήβους και ενήλικες με ψυχιατρική και νευρολογική ή σπλαχνική συμπτωματολογία (SG-3)	
B. Ερωτηματολόγιο για τους συγγενείς των ασθενών με τη νόσο Niemann-Pick τύπου C.....	173
Γ. Οδηγίες φύλαξης και αποστολής δειγμάτων.....	175
Δ. Αλληλουχία βάσεων των εξονίων και των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων <i>NPC1</i> και <i>NPC2</i>.....	176
Ε. Δημοσιευμένο άρθρο διατριβής.....	181

ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΕΝΤΥΠΟ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ NIEMANN-PICK ΤΥΠΟΥ C

ΣΕ ΝΕΟΓΝΑ ΚΑΙ ΒΡΕΦΗ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΧΟΛΟΣΤΑΤΙΚΟ ΙΚΤΕΡΟ

Ή ΥΓΙΗ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗ ΣΠΛΗΝΟΜΕΓΑΛΙΑ

Όνοματεπώνυμο ιατρού: _____ Ειδικότητα: _____

τηλ. επικοινωνίας: _____ Ημερομηνία λήψης δείγματος: _____

Τηλ. Επικοινωνίας γονέων: _____

Σε γονιδιακό έλεγχο για διάγνωση του NPC θα υπόκεινται οι ασθενείς που πληρούν μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις.

Παρακαλώ σημειώστε σε ποία από τις ακόλουθες κατηγορίες ανήκει ο ασθενής σας:

- Χολοστατικός ίκτερος που παρά τον εργαστηριακό έλεγχο παραμένει αδιάγνωστος.
- Χολόσταση που επιμένει παρά την άρση του αρχικού αιτίου.
- Ιστορικό ιδιοπαθούς χολοστατικού ίκτερου, που υποχώρησε χωρίς όμως να τεθεί συγκεκριμένη διάγνωση.
- Νεογνό, βρέφος, παιδί ή και ενήλικας υγιής, που παρουσιάζει ανεξήγητη, μεμονωμένη και εμμένουσα σπληνομεγαλία.
- Άλλη περίπτωση υποψίας NPC (αναφέρετε τους λόγους υποψίας της νόσου):

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΕΠΩΝΥΜΟ: _____ ΟΝΟΜΑ: _____ ΦΥΛΟ: _____

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: _____

ΠΟΛΗ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ ΠΑΤΕΡΑ: _____ **ΜΗΤΕΡΑΣ:** _____

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

A. Υπάρχει κάποιου βαθμού συγγένεια εξ αίματος μεταξύ των γονέων;

OXI ΝΑΙ τι είδους; _____

B. Έχει ο ασθενής αδέρφια; OXI ΝΑΙ πόσα; _____

Είναι υγιή; ΝΑΙ ΟΧΙ

Αν όχι, από τι πάσχουν; _____

Γ. Υπάρχει ιστορικό κληρονομικών νοσημάτων ήπατος, NPC ή άλλων μεταβολικών νοσημάτων στη στενή και ευρύτερη οικογένεια;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποιο είναι το νόσημα και ποιοι από την οικογένεια πάσχουν:

Δ. Απεβίωσε κάποιο μέλος της οικογένειας σε νεογνική ή παιδική ηλικία;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποια ήταν η αιτία και τι είδους συγγένεια είχε με τον ασθενή;

3. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΥΗΣΗΣ – ΤΟΚΕΤΟΥ

Α. Παρατηρήθηκαν επιπλοκές στη μητέρα ή το έμβρυο κατά την κύηση;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποιες ήταν αυτές; _____

Β. Παρατηρήθηκαν επιπλοκές κατά τον τοκετό και την περιγεννητική περίοδο;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποιες ήταν αυτές; _____

Γ. Ποια ήταν η ηλικία κύησης κατά το τοκετό; _____ εβδομάδες _____

Δ. Παρακαλούμε συμπληρώστε τον ακόλουθο πίνακα:

	ΣΤΗ ΓΕΝΝΗΣΗ	ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΗΛΙΚΙΑ
ΒΑΡΟΣ		
ΜΗΚΟΣ /ΥΨΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ		
ΠΕΡΙΜ. ΚΕΦΑΛΗΣ		

4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΡΟΝΤΟΣ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

Εμφάνιση χολοστατικού ίκτερου σε ηλικία: _____

Είδος διατροφής:

Θηλασμός Μικτή Στερεά Παρεντερική διατροφή Άλλο: _____

A. Έχουν παρατηρηθεί τα παρακάτω κλινικά σημεία;

1. Ηπατομεγαλία; OXI NAI Βαθμού; _____

2. Σπληνομεγαλία; OXI NAI Βαθμού; _____

3. Συμπτώματα/ σημεία από το αναπνευστικό σύστημα;

OXI NAI Ποια είναι αυτά; _____

4. Παθολογικά σημεία κατά την νευρολογική εξέταση;

OXI NAI Ποια είναι αυτά; _____

B. Σημειώστε σε ποιες παρακλινικές εξετάσεις έχει υποβληθεί ο ασθενής κατά τη διερεύνηση του ίκτερου;
(Παρακαλούμε συμπληρώστε το πόρισμα ή αποστείλετε αντίγραφα των εξετάσεων)

1. U/S κοιλίας Πόρισμα: _____

2. Χολαγγειογραφία Πόρισμα: _____

3. Βιοψία ήπατος Πόρισμα: _____

4. Άλλες εξετάσεις Ποιες: _____

Πορίσματα _____

Γ. Σας παρακαλούμε συμπληρώστε τις ακόλουθες τιμές ή αποστείλετε αντίγραφα των εξετάσεων:

Χολερυθρίνη: ολική _____ mg/d, άμεση _____ mg/dl AST: _____ ALT: _____ γGT: _____ ALP: _____ HDL: _____

CHOL: _____ LDL: _____ TG: _____ Αιμοπετάλια: _____ Γλυκόζη: _____ Αλβουμίνη: _____

Δ. Παρακαλούμε σημειώστε οποιαδήποτε επιπλέον πληροφορία θεωρείτε σημαντική.

EYXAPICCTOYME

**ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΕΝΤΥΠΟ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ NIEMANN-PICK
ΤΥΠΟΥ C**

**ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΦΗΒΟΥΣ ΜΕ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ Ή
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ**

Παρακαλούμε το παρόν έντυπο να συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο ιατρό.

Όνοματεπώνυμο ιατρού: _____

Ειδικότητα: _____ τηλ. επικοινωνίας: _____

Ημερομηνία λήψης δείγματος κ συμπλήρωσης εντύπου: _____

Σε γονιδιακό έλεγχο για διάγνωση του NPC θα υπόκεινται οι ασθενείς με ισχυρή υποψία για τη νόσο.

1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΕΠΩΝΥΜΟ: _____ ΟΝΟΜΑ: _____

ΦΥΛΟ: _____ ΗΜΕΡ.ΓΕΝΝΗΣΗΣ: _____

ΠΟΛΗ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ ΠΑΤΕΡΑ: _____ **ΜΗΤΕΡΑΣ:** _____

Τηλ. Επικοινωνίας γονέων: _____

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

A. Υπάρχει κάποιου βαθμού συγγένεια εξ αίματος μεταξύ των γονέων;

OXI NAI τι είδους; _____

B. Έχει ο ασθενής αδέρφια; OXI NAI πόσα; _____

Είναι υγιή; NAI OXI

Αν όχι, από τι πάσχουν; _____

Γ. Υπάρχει ιστορικό NPC ή άλλων νευρογενετικών ή μεταβολικών

νοσημάτων στη στενή και ευρύτερη οικογένεια;

OXI NAI

Αν ναι, ποιο είναι το νόσημα και ποιοι από την οικογένεια πάσχουν;

Δ. Απεβίωσε κάποιο μέλος της οικογένειας σε εμβρυϊκή, νεογνική ή παιδική ηλικία;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποια ήταν η αιτία και τι είδους συγγένεια είχε με τον ασθενή;

3. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΥΗΣΗΣ – ΤΟΚΕΤΟΥ-ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥ

Α. Παρατηρήθηκαν επιπλοκές στη μητέρα ή το έμβρυο κατά την κύηση;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποιες ήταν αυτές και σε ποιο μήνα;

Β. Παρατηρήθηκαν επιπλοκές κατά τον τοκετό και την περιγεννητική περίοδο;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, ποιες ήταν αυτές;

Γ. Διάρκεια κύησης μητέρας:

<32 εβδομάδες 32-37 εβδομάδες 37-42εβδομάδες >42 εβδομάδες

Δ. Παρακαλούμε συμπληρώστε τον ακόλουθο πίνακα (Εφόσον αυτά είναι διαθέσιμα):

ΒΑΡΟΣ ΠΕΡΙΦ. ΚΕΦΑΛΗΣ	ΣΤΗ ΓΕΝΝΗΣΗ	ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΗΛΙΚΙΑ
-------------------------	-------------	---------------------

4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

1. Σε ποια ηλικία παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά νευρολογικά

συμπτώματα;

Ποια ήταν αυτά;

2. Γενικά πώς χαρακτηρίζετε την πορεία του ασθενούς;

- Βελτίωση και ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή
- Στάσιμη με ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή
- Στάσιμη χωρίς ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή
- Προϊούσα και επιδεινούμενη παρά τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής

3. Συμπτωματολογία από τις εγκεφαλικές συζυγίες.

OXI NAI Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε:

Διαταραχές οφθαλμοκινητικότητας:

- Κάθετη παράλυση βλέμματος
- Επιβράδυνση ταχύτητας ή καθυστέρηση έναρξης κάθετων σακκαδικών κινήσεων
- Άλλη: _____

Διαταραχές ακοής _____

Δυσφαγία _____

Δυσαρθρία _____

Άλλο: _____

4. Κινητικές Διαταραχές

OXI NAI Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε:

- Δυστονία _____
- Αταξία:
 - διαταραχές βάδισης
 - διαταραχές συντονισμού
 - διαταραχές ισορροπίας
- Δυσπραξία:
 - αδεξιότητα
 - συχνές πτώσεις
 - δυσκολία κατά την ανάβαση σκαλιών
 - άλλο: _____
- Σπαστικότητα
- Περιφερική νευροπάθεια

5. Αξιολόγηση μυϊκού τόνου

- Φυσιολογικός
- Παθολογικός εξηγήστε _____
- Μυόκλονος _____

6. Διανοητικές διαταραχές. Παρακαλώ διευκρινίστε:

- 2) Αναπτυξιακή καθυστέρηση _____
- 3) Διανοητική καθυστέρηση _____
- 4) Διαταραχές μνήμης _____
- 5) _____

7. Σχολική/επαγγελματική επίδοση:

Άριστη Καλή Μέτρια Φτωχή Δεν παρακολουθεί

Η επίδοση εμφανίζει προοδευτική επιδείνωση;

OXI ΝΑΙ

8. Επεισοδικά φαινόμενα:

OXI ΝΑΙ

5. Σπασμοί τι είδους και πότε: _____

6. Επιληψία τι είδους και πότε: _____

■ Ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή: _____

7. Καταπληξία

■ εγείρομενη από αστείο ερέθισμα;

■ ήπια, με συμμετοχή της κεφαλής;

■ ήπια, με πτώσεις

■ Άλλο: _____

9. Έχουν παρατηρηθεί ψυχιατρικές εκδηλώσεις στον ασθενή;

OXI ΝΑΙ

Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε: _____

10. Έχουν ποτέ παρατηρηθεί τα παρακάτω κλινικά σημεία;

■ Ηπατομεγαλία; OXI ΝΑΙ Βαθμού: _____

■ Σπληνομεγαλία; OXI ΝΑΙ Βαθμού: _____

■ Προβλήματα από το αναπνευστικό σύστημα:
OXI ΝΑΙ Τι είδους; _____

11. Υπάρχει ιστορικό νεογνικού χολοστατικού ίκτερου;

OXI ΝΑΙ Άγνωστο

Αν ναι, σε ποια ηλικία; _____ και τι διάρκειας; _____

Ποια ήταν η αιτία; _____

12. Παρακαλούμε σημειώστε οποιαδήποτε επιπλέον πληροφορία θεωρείτε σημαντική.

Ευχαριστούμε

**ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΕΝΤΥΠΟ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ NIEMANN-PICK
ΤΥΠΟΥ C**

**ΣΕ ΕΦΗΒΟΥΣ ΚΑΙ ΕΝΗΛΙΚΕΣ ΜΕ ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ Ή ΣΠΛΑΧΝΙΚΗ
ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ**

Παρακαλούμε το παρόν έντυπο να συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο ιατρό.

Όνοματεπώνυμο ιατρού: _____ Ειδικότητα: _____

τηλ. επικοινωνίας: _____ Ημερομηνία λήψης δείγματος κ συμπλήρωσης εντύπου: _____

Σε γονιδιακό έλεγχο για διάγνωση του NPC θα υπόκεινται οι ασθενείς με ισχυρή υποψία για τη νόσο.

A. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΕΠΩΝΥΜΟ: _____ ΟΝΟΜΑ: _____

ΦΥΛΟ: _____ ΗΜΕΡ.ΓΕΝΝΗΣΗΣ: _____

ΠΟΛΗ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ ΠΑΤΕΡΑ: _____ **ΜΗΤΕΡΑΣ:** _____

Τηλ. Επικοινωνίας γονέων: _____

B. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

1. Υπάρχει κάποιου βαθμού συγγένεια εξ αίματος μεταξύ των γονέων;

OXI NAI τι είδους; _____

2. Έχει ο ασθενής αδέρφια; OXI NAI πόσα; _____

Είναι υγιή; NAI OXI

Αν όχι, από τι πάσχουν; _____

3. Υπάρχει ιστορικό NPC ή άλλων νευρογενετικών ή μεταβολικών

νοσημάτων στη στενή και ευρύτερη οικογένεια;

OXI NAI

Αν ναι, ποιο είναι το νόσημα και ποιοι από την οικογένεια πάσχουν;

4. Απεβίωσε κάποιο μέλος της οικογένειας σε εμβρυϊκή, νεογνική ή παιδική ηλικία;

OXI NAI

Αν ναι, ποια ήταν η αιτία και τι είδους συγγένεια είχε με τον ασθενή;

Γ. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΙΣΤΟΡΙΚΟΥ

1. Έχει εμφανίσει ο ασθενής ψυχιατρικές διαταραχές;

OXI NAI

Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε το είδους:

Σε ποια ηλικία παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά; _____

Αυτές συνυπάρχουν με:

- Οπτικές ψευδαισθήσεις
- Κατατονία
- Αμβλυνση γνωστικών λειτουργιών
- Νευρολογικές εκδηλώσεις
- Δεν συνυπάρχουν με άλλη διαταραχή
- Άλλο _____

2. Έχει παρατηρηθεί στον ασθενή νευρολογική συμπτωματολογία;

OXI NAI

Αν ναι, σε ποια ηλικία παρατηρήθηκε για πρώτη φορά _____

Τι είδους; _____

3. Γενικά πώς χαρακτηρίζετε την πορεία του ασθενούς;

- Βελτίωση και ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή

- Στάσιμη με ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή
- Στάσιμη χωρίς ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή
- Προϊούσα και επιδεινούμενη παρά τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής

4. Συμπτωματολογία από τις εγκεφαλικές συζυγίες.

OXI ΝΑΙ Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε:

3. Διαταραχές οφθαλμοκινητικότητας:

- Κάθετη παράλυση βλέμματος
- Επιβράδυνση ταχύτητας ή καθυστέρηση έναρξης κάθετων σακκαδικών κινήσεων
- Άλλη: _____
- Διαταραχές ακοής _____
- Δυσφαγία _____
- Δυσαρθρία _____
- Άλλο: _____

5. Κινητικές Διαταραχές

OXI ΝΑΙ Αν ναι, παρακαλώ διευκρινίστε:

- Δυστονία _____
- Αταξία:
 - διαταραχές βάδισης
 - διαταραχές συντονισμού
 - διαταραχές ισορροπίας
- Δυσπραξία:
 - αδεξιότητα
 - συχνές πτώσεις
 - δυσκολία κατά την ανάβαση σκαλιών
 - άλλο: _____
- Σπαστικότητα
- Περιφερική νευροπάθεια

6. Αξιολόγηση μυϊκού τόνου

- Φυσιολογικός
- Παθολογικός εξηγήστε _____
- Μυόκλονος _____

7. Γνωστικές λειτουργίες. Παρακαλώ διευκρινίστε:

- Διαταραχές μνήμης _____
- Άνοια πρώιμης έναρξης _____
- Διανοητική καθυστέρηση _____
- Άλλο _____

8. Επεισοδικά φαινόμενα:

OXI NAI

8. Σπασμοί τι είδους και πότε: _____

9. Επιληψία τι είδους και πότε: _____

➤ Ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή: _____

10. Καταπληξία

▪ εγειρόμενη από αστέιο ερέθισμα;

▪ ήπια, με συμμετοχή της κεφαλής;

▪ ήπια, με πτώσεις

▪ Άλλο: _____

9. Σχολική/ Επαγγελματική επίδοση

Άριστη Καλή Μέτρια Φτωχή Δεν παρακολουθεί

Η επίδοση εμφανίζει προοδευτική επιδείνωση ή αδυναμία μάθησης νέων δεξιοτήτων;

OXI NAI

10. Έχουν ποτέ παρατηρηθεί τα παρακάτω κλινικά σημεία;

▪ Ηπατομεγαλία; OXI NAI Βαθμού: _____

▪ Σπληνομεγαλία; OXI NAI Βαθμού: _____

11. Υπάρχει ιστορικό νεογνικού χολοστατικού ίκτερου;

OXI NAI

Αν ναι, σε ποια ηλικία και τι διάρκειας; _____

Ποια ήταν η αιτία; _____

11. Παρακαλούμε σημειώστε οποιαδήποτε επιπλέον πληροφορία θεωρείτε σημαντική.

Ευχαριστούμε

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ NIEMANN-PICK TYPE C

Κωδικός: _____

1. Δημογραφικά στοιχεία:

Επώνυμο: _____ ΓΕΝΟΣ: _____

Όνομα: _____

Ημερομηνία γέννησης: _____

Τόπος καταγωγής πατέρα: _____ μητέρας _____

Τηλέφωνα επικοινωνίας: _____

Συμπληρώνετε τη διεύθυνση σας εφόσον επιθυμείτε να ενημερωθείτε για το αποτέλεσμα.

Διεύθυνση

Οδός: _____ αριθμός: _____ πόλη: _____

Τ.Κ. _____

2. Βαθμός συγγένειας: _____ Θέση στο γενεαλογικό δέντρο _____

3. Οικογενειακή κατάσταση:

Παντρεμένος/η: ΝΑΙ ΟΧΙ Κωδικός συζύγου/γονέων: _____

Όνοματεπώνυμο συζύγου: _____

Χρονολογία γέννησης: _____ τόπος καταγωγής _____

4. Ιστορικό αποβολής κυήματος ή τερματισμός εγκυμοσύνης για ιατρικούς λόγους; Αν ναι, ποιος ο λόγος;

Παιδιά: ΝΑΙ ΟΧΙ Κωδικός παιδιών: _____

Αριθμός: _____

Όνόματα παιδιών και χρονολογία γέννησης αντίστοιχα:

5. Ύπαρξη κληρονομικών νοσημάτων στην οικογένεια με νευρολογική ή ψυχιατρική συμπτωματολογία:

ΝΑΙ ΟΧΙ

6. Έχει παρατηρηθεί σε εσάς ανεξήγητη διόγκωση ήπατος ή σπληνός (ηπατο/σπληνο-μεγαλία);

ΝΑΙ ΟΧΙ

7. Έχουν παρατηρηθεί σε εσάς νευρολογικά συμπτώματα;

ΝΑΙ ΟΧΙ

8. Έχουν παρατηρηθεί σε εσάς ψυχιατρικά συμπτώματα;

ΝΑΙ ΟΧΙ

9. Υποφέρετε από διαταραχές μνήμης;

ΝΑΙ ΟΧΙ

10. Λαμβάνεται κάποια φαρμακευτική αγωγή;

ΝΑΙ ΟΧΙ

Αν ναι, για ποιο λόγο;

11. Απεβίωσε κάποιο μέλος της οικογένειας σε εμβρυϊκή, νεογνική

παιδική ηλικία;

Ευχαριστούμε

Σημειώσεις ερευνητή: _____

ΟΔΗΓΙΕΣ ΑΠΟΣΤΟΛΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ NPC-1

Για το μοριακό έλεγχο του γονιδίου NPC-1, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Λαμβάνεται δείγμα περιφερικού αίματος σε σωληνάριο γενικής αίματος:
5ml για παιδιά ή ενήλικες

3ml για νεογνά
2. Φυγοκέντριση περιφερικού αίματος σε σωληνάριο βιοχημικού ελέγχου και λήψη του ορού (προαιρετικά)
3. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C (κοινή ψύξη) μέχρι την αποστολή του (μέγιστος χρόνος παραμονής του δείγματος στην ψύξη 2 ημέρες).
4. Συνεννόηση με τη Γραμματεία ή το Ερευνητικό Εργαστήριο της Γ' Παιδιατρικής Κλινικής.
Τηλ. 6936409648, 2105832228, 2105831296, 2105831227, 2105831269. Υπεύθυνοι: Αννα Παπαδοπούλου,
Ευαγγελία Μπουντουβή, Γεωργία Νύκταρη, Αργύρης Ντινόπουλος.

Email: pedatt@med.uoa.gr
5. Αποστολή του δείγματος (σε πάγο) και του σύντομου ιστορικού που στοιχειοθετεί τη μελέτη του γονιδίου NPC-1.

Αποστολή στη διεύθυνση:

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο “Αττικόν”

Γ' Παιδιατρική Κλινική

Ερευνητικό Εργαστήριο (Β' όροφος)

Ρίμινι 1, 12464 Χαϊδάρι

Τα δείγματα θα παραδίδονται στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Κλινικής.

Αλληλουχία βάσεων των εξονίων και των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου NPC-1

acgccttctcctctgaccggcgcgcgagcct

Exon 1

GCTGCCGCGGTCAGCGCCTGCTCCTGCTCCTCCGCTCCTCCTGCGCGGGGTGCTGAAACAGCCCGGGGAAGT
AGAGCCGCCTCCGGGGAGCCCAACCAGCCGAACGCCCGCGGTCAGCAGCCTTGC GCGGCCACAGCATG
ACCGCTCGCGGCCTGGCCCTTGGCCTCCTCCTGCTGCTACTGTGTCCAGCGCAG

gtgagcggctgccggccaccgggacgccctgtggggacgtggcgggccgagagccggggaaggcgacgggcccagcagggctcagggccgggtcctggggaagt
ggtctggcgatggagagctcggaggttcctcactgtctgttctgtctccggccacgctctcttctgtgctggaagagggtggcagtggggcttgggtgacctgtctga
gcttgttccatctgtgg

caaaatgttaagtgcctgtgtgttactaattttgcaggtagcattggaagttctgtgattgacttgatgggcacttctgtgaaatfaccattgagacctggtaa
cactgaagtttggttgactttctgtag

Exon 2

GTGTTTTACAGTCCTGTGTTTGGTATGGAGAGTGTGGAATTGCATATGGGGACAAGAGGTACAATT
CGGAATATTCGGCCACCAAAACCATTGCCAAAGGATGGATATGACTTAGTGCAG

gtaagttcattatcttaggcactgggaacacaaaaatgctgacacaagaatcctctgtaattattccttaaatgtattgcagggtggaggtggagatgagactaacaggcttaagtctt
atcccggactcctaaa

tactgaggaatgttgaccttacttaactgttgctactcccgtgtctgtctctttcacctgaaag

Exon 3

GAACTCTGTCCAGGATTCTTCTTTGGCAATGTCAGTCTCTGTTGTGATGTTCCGGCAGCTTCAGACACT
AAAAGACAACCTGCAGCTGCCTCTACAGTTTCTGTCCAG

gtaggtctgtcgggaaacagaacaactgggctgtagatacttgtgaactggtaatgctcagc

gttctcttgtaattgtcactttacagtaagttaaaatattcttctgtctatttaaatcgttctgtcggccctattatgtgtgagatcatgcagaatataaattactttccttta
g

Exon 4

ATGTCCATCCTGTTTTTATAACCTACTGAACCTGTTTTGTGAGCTGACATGTAGCCCTCGACAGAGTC
AGTTTTTGAATGTTACAGCTACTGAAGATTATGTTGATCCTGTTACAAACCAGACGAAAACAAATGTG
AAAGAGTTACAATACTACGTCGGACAGAGTTTTGCCAATG

gtaagtaaacctttaaatttctcttttacagctggcatcaggacagcagagcaaatgttctttagttgtcctgtcaactctggaaaatcacaatttcagttccattggccagga
aataagagttgttcttctgtatcctaggacttgaactgcaacgaatataaaaaatctccttaagcgttcttggag

ttcgtgtttccctcaagagccctttgtaagatctgcctcgtgaattacagcaagcatctgtctccttttcttgggttctctctag

Exon 5

CAATGTACAATGCCTGCCGGGATGTGGAGGCCCCCTCAAGTAATGACAAGGCCCTGGGACTCCTGTG
TGGGAAGGACGCTGACGCCTGTAATGCCACCAACTGGATTGAATACATGTTCAATAAGGACAATGGA
CAGGCACCTTTTACCATCACTCCTGTGTTTTTCTAG

Gtaggtataaagattccaagtttggtgtgttatgatattgtttaaagccaaggaactggcgccacagtggtcaccagtgcttggggagactgaggcaagagaattgcttaa
gaccaggagtcc

gttttatgtatttcagtggtcttcttctgtgatttaagtataatacaaaaatttgatgttttaattgagattgtactcaacacaattccttctgtag

Exon 6

ATTTTCCAGTCCATGGGATGGAGCCCATGAACAATGCCACCAAGGCTGTGACGAGTCTGTGGATGA
GGTCACAGCACCATGTAGCTGCCAAGACTGCTCTATTGTCTGTGGCCCCAAGCCCCAGCCCCACCT
CCTCCTGCTCCCTGGACGATCCTTGGCTTGGACGCCATGTATGTCATCATGTGGATCACCTACATGGC
GTTTTTGTGTTTTTTGGAGCATTTTTTGCAGTGTGGTGCTACAGcattgcagtaagcagttttgttctatccaggcca

aaaagagcaaaattgccactggcactttgactttcattgtcagagctgtgttacttaggacaagaaacaaatctcctcatgaatac

caggaggaggaagaagcatttcatgggattacaggaatgtccaaaaacaacctactgtgatgaagccactaatgctatttctcacttctgttttcag

Exon 7

AAAACGGTATTTTGTCTCCGAGTACACTCCCATCGATAGCAATATAGCTTTTTCTGTTAATGCAAGTG
ACAAAG

gtaggcataattgtccatgaataaaagggttcagatgatgctgtctgtcatgagagcattcgtttctcagtggggttcagcagtgagggtgaggtggtg

ctcatatgtgtcccagggtggccttgattctgcatgagatagcaactaatgctttccctgtccgactttcaggaacggcttggtcttaacctccacctccctctct
cccgttctccag

Exon 8

GAGAGGCGTCTGCTGTGACCCTGTCAGCGCAGCATTGAGGGCTGCTTGAGGGCGGCTGTTACACAG
CTGGGGGTCTTTCTGCGTCCGAAACCCTGGCTGTGTCATTTCTTCTCGCTGGTCTTCACTACTGCGT
GTTCTGTCAGGCCTGGTGTGTTGTCCGGGTCACAACCAATCCAGTTGACCTCTGGTCAGCCCCCAGCAG
CCAGGCTCGCCTGGAAAAAGAGTACTTTGACCAGCACTTTGGGCCTTTCTTCCGGACGGAGCAGCTC
ATCATCCGGGCCCTCTCACTGACAAACACA
TTTACCAGCCATACCCTTCGGGAGCTGATGTACCCTTTGGACCTCCGCTTGACATACAGATACTGCAC
CAG

gtaacctgctgttgaagaataagtcactctagatgacctgtggttctgctgctttacatgttgactactgtagatggggttggggctgaatgct

cctcagggaatgctgattaatcaagatctgagagaaatgtgacgtgttctgggttgcttattttaaaatcttcttcag

Exon 9

GTTCTTGACTTACAAATAGCCATCGAAAACATTACTGCCTCTTATGACAATGAGACTGTGACACTTCA
AGACATCTGCTTGGCCCCCTTTTACCCTGATAACACGAAGTGCACCATTTTGTGAGTGTGTTAAATTACT
TCCAGAACAGCCATTCCGTGCTGGACCACAAGAAAGGGGACGACTTCTTTGTGTATGCCGATTACCA
CACGCACTTTCTGTACTGCGTACG

gtaagtgcaagagacaatcattgtgtagacaccattctgggtctgacttagggtacatgggcaaaagctgtttatgagcataaccagaggtgagcaaaaca

caaaggtgagtgctgagctgtattactcaactgagaaacctcagggccatgtgtccttagaatacagccagcctcatcaaatgttactgtgtaaatgttaggtcc
ctgatgtcttgaggcccttctaactgggaggtgtttctaacttttgagcag

Exon 10

GGTCCTGCCTCTCTGAATGATACAAGTTTGCTCCATGACCCTTGCTGCGGTACGTTTGGTGGACCAG
TGTTCCCGTGGCTTGTGTTGGGAGGCTATGATG

gtaagtaagagaagcttcttcttttagataaagtcctcgggttctgacttagcatcaagtgtaattatgaagattcataaattgggcagtttgtaatttcttactct
tgaatccaga

agagcccagagatacagtcctagctccagtgagaaatctgtgtgattttccctggatgtgtctaatcttctgcatgcttgaatctgcttttgatgtcacattttc
ctttctag

Exon 11

ATCAAAACTACAATAACGCCACTGCCCTTGATGATTACCTTCCCTGTCAATAATTACTATAATGATACA
GAGAAGCTCCAGAGGGCCCAGGCCTGGGAAAAAGA

gtgagtcactcatgggtgtgagcagactgtccttgcattgtgggaagctagacactgcccgaagcacttaacttcttttaaatcaaccaatggcagatctgagt

aaaacgtggcctttgatcgtgaaagtagggagaagttcttacttagctgtcagtagtttaactaaaaataaacattttgcttaccttttag

Exon 12

GTTTATTAATTTTGTGAAAACTACAAGAATCCCAATCTGACCATTTCCCTCACTGCTGAACGAAGTA
TTGAAGATGAACTAAATCGTGAAAGTGACAGTGATGTCTTACCCTTGTAAATTAGCTATGCCATCATG
TTTCTATATATTCCCTAGCCTTGGGGCACATGAAAAGCTGTGCGCAGGCTTCTG

gtaagccgggggggggtggtgtagttctagaggttaacagcagtgacagctgtaacgtcatatcttttgcctctt

tctaggtttaatacagccctgtaaagttaaaaggagaccttttagtaacaagtgggacagacaacctgtaactaattggtgattgtgtctgcctctctcag

Exon 13

GTGGATTCTGAAGTCTCACTAGGCATCGCGGGCATCTTGATCGTGCTGAGCTCGGTGGCTTGCTCCT
TGGGTGTCTTACAGCTACATTGGGTTGCCCTTGACCCTCATTGTGATTGAAGTCATCCCCTGCTGGT
CTGGCTGTTGGAGTGGACAACATCTTCATTCTGGTGCAGGCCTACCAG
gtatacttccatattctcacagggtcagcatctgttcaagttcaggactgtgaatggctcctgggctccgcattcgtgagtgtgactg

tcgttactaatcatttatttttacccttgagtaacacaaggcagcaagaaatggcgtgtattgagaaatataatgctgcataatTTTTTTTTTTTTTTTaa

Exon 14

AGAGATGAACGTCTTCAAGGGGAAACCCTGGATCAGCAGCTGGGCAGGGTCTAGGAGAAGTGGCT
CCCAGTATGTTCTGTCATCCTTTTTCTGAGACTGTAGCATTTTTTCTTAG
gaattatgctttcaatcctaccagctctgtagctgctgagcctggagaaagaaggagctggctacctgaacatgc

ctgtgctggctcctgtatctgfacatgacatgaacataagacctgcagagagccccggctgtaaacagaagtgcagcagagccctctctccccgacag

Exon 15

GAGCATTGTCCGTGATGCCAGCCGTGCACACCTTCTCTCTTTGCGGGATTGGCAGTCTTCATTGAC
TTTCTTCTGCAGATTACCTGTTTCGTGAGTCTTTGGGGTTAGACATTAACGTCAAGAG
gtaagttggtgccaggattatagctatftaatttgagctagaatctagaggaagcagctagcgggtataaccttggttccctctgcccctcag

Exon 16

AAAAATCGGCTAGACATCTTTTGCTGTGTCAGAGGTGCTGAAGATGGAACAAGCGTCCAGGCCTCAG
AGAGCTGTTTGTTCGCTTCTCAAAAACCTCTATTCTCCACTTCTGCTAAAGGACTGGATGAGACCA
ATTGTG
gtatgctcttatctgtggttttctcttctcctcactgaaacagattatcacatgccttctaagaagccagacagcctgggaaggagat

aatttgactcctggctgtgtggtctcaccactgccctgtactccctattagcctgtcattfaagctttccattttaaaaaatcctgcttttgtgtgtgcttaagatttatt
ctggtcgtagcttattactaagcagctctctgtcttatgattcatttgggttccag

Exon 17

ATAGCAATATTTGTGGGTGTTCTGTCATTACAGCATCGCAGTCCTGAACAAAGTAGATATTGGATTGGA
TCAGTCTCTTTCGATGCCAGATgtaagatgacttcttttttttttaactcttttagctgatgatgaatacattttcaaaacatgcacgtaggtgtttcaagc
aagtgcctgcttctaactgcaaatggtagcagggtttccag

ctggcaccctcttattctccatgatcctcgccttgcttagtactatcagagtgtcacactctcctattctttatctttctttcag

Exon 18

GACTCCTACATGGTGGATTATTTCAAATCCATCAGTCAGTACCTGCATGCGGGTCCGCCTGTGTA
TGTCTGGAGGAAGGGCAGACTACACTTCTTCCAAGGGGCAGAACATGGTGTGCGGGCGGCATGGG
CTGCAACAATGATTCCCTGGTGCAGCAGATTTAACGCGGCGCAGCTGGACA
gtcagtagcaccctgtctgtactcagaagcagcggaggaggtctcagccagcagctcagcctcaggcctgaaatgtctcactgaaaatagactttctggaaaagttgtttt
tatgc

aagtgtcatgtagttttcttttactgttagcagtataaaacgtagaaaaggaagttaggttttaagaaaaagactgaaactaaagacttctcctgtggagcagg
tcagtaaccctgtctgcctctctag

Exon 19

TACCCGAATAGGCTTCGCCCCCTCGTCTGGATCGACGATTATTTGACTGGGTGAAGCCACAGTCCG
TCTTGCTGTCGAGTGGACAATATCACTGACCAGTTCTGCAATGCTTACG
gtacctctctttcaaaaatcttctgttttctgtaaaaatftcaaaatattcaaaaaatcatttgcacgtgctcagttatacctattgtatataaagctgggtctcctgtgt

tgacatgtggctgaagcttttagataaggggaaagattatcctcactagtaaggaaagtaatcgatagagaagaaagtaatgccctcactgtcagattttaaat
gtttcaaaaaatctggagacctattcttaacagctcctccctgcatgtctccgacag

Exon 20

TGGTTGACCCTGCCTGCGTTCGCTGCAGGCCTCTGACTCCGGAAGGCAAACAGAGGCCTCAGGGGG
GAGACTTCATGAGATTCTGCCCATGTTCTTTTCGGATAACCCTAACCCTAAGTGTGGCAAAGG

gtaagtgtctgctgccattgcagataagcatccactgcaactttaattgtagtaaaaactaggagaggactgggctaagacagttgcatgggaacgtctct

cttatctggggccttcttcatccctgaaatgtacagctgggtctgacctctgagtcagggtcaggtgatttgccttagcctcaagtgtcagattctgctgatatttgc
gacctggactctcttgacacccaggattcttctcag

Exon 21

**GGGACATGCTGCCTATAGTTCTGCAGTTAACATCCTCCTTGGCCATGGCACCAGGGTCGGAGCCACG
TACTTCATGACCTACCACACCGTGTGCAGACCTCTGCTGACTTTATTGACGCTCTGAAGAAAGCCCG
ACTTATAGCCAGTAATGTCACCGAAACCATGGGCATTAACGGCAGTGCCTACCGAGTATTCCTTACA
G**

gtaaagcctgcccttttcaatggggtttaccagcaaggcctacactgggtgggagtgagggttcccttgccaagatgctgattttaggttgggtctggccctgctcc
attctgagcacag

tttctgcaagggatgttccaaaggagtctgaccacttggcagtggtgacaggatgaacacgcagtgctgggagtgagagcgagcttfaatgaggcctcccctctc
cctccag

Exon 22

**TGTGTTTTTATGTCTTCTACGAACAGTACCTGACCATCATTGACGACACTATCTTCAACCTCGGTGTGT
CCCTGGGCGCGATATTTCTGGTGACCATGGTCCCTCCTGGGCTGTGAGCTCTGGTCTGCAGTCATCAT
GTGTGCCACCATCGCCATGGTCTTGGTCAACATGTTTGGAGTTATGTGGCTCTGGGGCATCAGTCTG
AACGCTGTATCCTTGGTCAACCTGGTGATG**

gtgagtcctacacagtcctcagttgtccctagctcctgttcaacttgggggaattggctgtcttagatccatgtaaaccctaaagatggagtaagataccaagtctggcgttctct
tgccacacatggagaggcaggatgagtg

ggtgtgatggaggccttgtaagtccaatgggatgcttggcctcctctagcaccagggtgccctgggtaattagcaccatcctcagaacggggtggctgcctagg
gtcttcaacaggaagagagccatcctaaaggaagtgtttatttcag

exon 23

**AGCTGTGGCATCTCCGTGGAGTTCTGCAGCCACATAACCAGAGCGTTCACGGTGAGCATGAAAGGCA
GCCGCGTGGAGCGCGCGGAAGAGGCACTTGCCACATGGGCAGCTCC**

gtgagtacctgagcagggccacgccggcagagtcgcaccacaagtaatcctcctcagtgactgaagagcttgatcctgtactfacaaagcagcttcaaggattgcaagctt
tcaggcaattcatgaa

gtggcgtgcacctgttaatcccagctactcaggaggctggggcaggagaatcactgaacctgggagaaatcctgtaagggaagtgttttgtcaattacaggttgta
aaagtgtttctaacacagtatcttcttttag

Exon 24

**GTGTTCAAGTGAATCACACTTACAAAATTTGGAGGGATTGTGGTGTGGCTTTTGCCAAATCTCAAAT
TTTCCAGATATTCTACTTCAGGATGTATTTGGCCATGGTCTTACTGGGAGCCACTCACGGATTAATAT
TTCTCCCTGTCTTACTCAGTTACATAG**

gtaagagttctcatcttaaaagggtggcacaatagaaggacattactgaaagggaattctatcctgaggcattctttcaagatttgaactacataactaatggtcatttga

aggctggtctcaagcaattctcctgcctcagcttccaaagtgggattacaggcgtgagccactatgccagccaactagctccccttctcctgcagaaataagaaa
aagtctctctctcatag

Exon 25

**GGCCATCAGTAAATAAAGCCAAAAGTTGTGCCACTGAAGAGCGATACAAAGGAACAGAGCGCGAACG
GCTTCTAAATTTCTAGCCCTCTCGCAGGGCATCCTGACTGAACTGTGTCTAAGGGTTCGGTTCGTTTACCAC
TGGACGGGTGCTGCATCGGCAAGGCCAAGTTGAACACCGGATGGTGCCAACCATCGGTTGTTTGGCAGC
AGCTTGAACGTAGCGCCTGTGAACT**

Αλληλουχία βάσεων των εξονίων και των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου NPC-2

.....ttccggagccggggcgggcgggcgggcctcagctgtggtactggt

Exon 1

**GACAGGTCGCTGACTGGGCTCCTCCCCGGGCCCGCCCCGACAGGTTTGTCTTGTGACCG
CGGGCGGCCGCTGCTTCTTTCCCGAGCTTGGAACTTCGTTATCCGCGATGCGTTTCTGGCAGCTAC
ATTCTGCTCCTGGCGCTCAGCACCGCTGCCAGGCCGAACCGGTGCAGTTCA**

AGGACTGCGGtgtagcccccaggcccgcccaaggtcccgcgccctctgtggaagggcccgccggacccccgcgctgagaccctggggctgggctgggctggatccc
tcggcgggccaggctgagccttgaccctacctaactggaatgggctgggtcgggggagaagggcgccgctccatgaaacccgaccgcgcaactttgttc.....

.....atgatttagcagcaagatgaatcaagattctgacttcaattgggcattattcttaagattccatcctgggaacagtccaggagaatgagttgacctaaatgggagag
cagagcaccttcccattaggtggtggcagcctagctggctatttctcctcattctcattccaattcattttctttgag

Exon 2

**GTTCTGTGGATGGAGTTATAAAGGAAGTGAATGTGAGCCCATGCCCCACCCAACCCTGCCAGCTGAG
CAAAGGACAGTCTTACAGCGTCAATGTCACCTTCACCAGCA**

gtgcgtaaaagtggcttctaactcaaattcatgttacagcataacctaaatatcaaggttggaataagcatgggaatggaggggaggggaattggcagtcagatgaattttatgattctt
ttgacctcatgcaaaactaggttactgtgcccttgacaccttctcatgagggtccatggctcccagactccctt.....

.....tgctgattgttttttttttttttttttgcataattgtgttgagtgatgctgactgtgctagtaccaagcccactatcaagagaaatagaccctaggaatgctgtgcttg
ggattatttctgaatttttgatttagagttgaaaataggttatttctttgacctgattctctttttctcttag

Exon 3

**ATATTCAGTCTAAAAGCAGCAAGGCCGTGGTGCATGGCATCCTGATGGGCGTCCCAGTTCCCTTTCC
CATTCTGAGCCTGATGGTTGTAAGAGTGAATTAACCTGCCCTATCCAAAAAGACAAGACCTATAGCT
ACCTGAATAAACTACCAGTGAAGGCGAATATCCCTCT**

gtaagtatacattattgaggcacgggagccctgggactggattagattctgaggcagtgggcaagaagcagagatgggggtaaaagggcccttatctctatgatgaag
aagaagcccaggggaaaggagataggtgctgttaggcatcaggagtagggcaggtcttttctgtgtctctcattcttc.....

.....caaatcacaagtataactttgctactcttaaggctgtaagctgtgccacatgctaagcagccctcatgatttaagaaaaaagatgaggagtaggaagttgctact
gtacatctaggattcatagtaaacattatggatagaagtcaggtcctattttcattttctcaattattttctcttctccag

Exon 4

**ATAAACTGGTGGTGGAGTGGCAACTTCAGGATGACAAAAACCAAAGTCTCTTCTGCTGGGAAATCC
CAGTACAGATC**

gtaagtctatctgggggtgagagggcatgggtggaggggaaagagtgaggagaaatcagactgaaactaaatcagtgccataagataaaaggaattcaagactgctgtttat
gcctctaacctctaaaagcactctgagaccctatttctgagagctcagaactgtgctttgtaatatcctttgtaaaaaaa.....

.....aaagaagagagagtgtagactgtagagattgatttaactgtctcattggtttttctgtcggagtaaggaggtccagc
cagacaggacctgaaggaggtgcttaggaatgtctgataactgccctaggggtattgccctgacagtgaggagaaaggtccaaccactccactgagctgggacattacatcc
acag

Exon 5

**GTTTCTCATCTCTAAGTGCCTCATTGAGTTCGGTGCATCTGGCCAATGAGTCTGCTGAGACTCTTGAC
AGCACCTCCAGCTCTGCTGCTTCAACAACAGTGACTTGGCTCTCCAATGGTATCCAGTGATTCGTTGAA
GAGGAGGTGCTCTGTAGCAGAACTGAGCTCCGGGTGGCTGGTTCTCAGTGGTTGTCTCATGTCTCT
TTTTCTGTCTTAGGTGGTTTTATTAAATGCAGCACTTGGTTAGCAGATGTTAATTTTTTTTTTAAACAA
CATTAACTTGCCCTCTTCTACACCTGAAATTTACTCTTGAATAAATAAAACTCGTTTGTCTTGTCT
TTCTGC**

atgtggctgtggtctctctctccttccagggtacattctgctagaa.....

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Novel *NPC1* mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations

Evangelia Bountouvi^{1†}, Anna Papadopoulou^{1*†}, Marie T. Vanier², Georgia Nyktari¹, Spyridon Kanellakis³, Helen Michelakakis⁴ and Argyrios Dinopoulos¹

Abstract

Background: Niemann-Pick type C disease (NPC) is an autosomal recessive, neurovisceral, lysosomal storage disorder with protean and progressive clinical manifestations, resulting from mutations in either of the two genes, *NPC1* (~95% of families) and *NPC2*. Contrary to other populations, published evidence regarding NPC disease in Greece is sparse.

Methods: The study population consisted of two Greek NPC patients and their extended pedigree. Patients' clinical, biochemical, molecular profiles and the possible correlations are presented. Genotyping was performed by direct sequencing. Mutations' origin was investigated through selected exonic *NPC1* polymorphisms encountered more frequently in a group of 37 Greek patients with clinical suspicion of NPC disease and in a group of 90 healthy Greek individuals, by the use of Haplore software.

Results: Two novel *NPC1* mutations, [*IVS23 + 3insT* (*c.3591 + 3insT*) and p. K1057R (*c.3170A > C*)] were identified and each mutation was associated with a specific haplotype. One of the patients was entered to early treatment with miglustat and has presented no overt neurological impairment after 11.5 years.

Conclusions: The splicing mutation *IVS23 + 3insT* was associated in homozygosity with a severe biochemical and clinical phenotype. A possible founder effect for this mutation was demonstrated in the Greek Island, as well as a different origin for each novel mutation. Longitudinal follow-up may contribute to clarify the possible effect of early miglustat therapy on the patient compound heterozygous for the two novel mutations.

Keywords: Haplotype, Kindred, Miglustat, Niemann-Pick type C disease (NPC), Mutation, Polymorphisms, Therapy

Background

Niemann-Pick type C disease (NPC) (OMIM257220) is a rare lethal lysosomal storage disorder characterised by impaired lipid trafficking and subsequent intracellular accumulation of a wide spectrum of lipids, including unesterified cholesterol, several glycosphingolipids,

sphingomyelin, sphingosine and bis (monoacylglycerol) phosphate. A different pattern of stored lipids is identified in neuronal and nonneuronal tissues [1, 2]. The disease follows an autosomal recessive inheritance pattern with an estimated prevalence of 1:90.000–104.000 live births [1, 3, 4]. Clinical phenotype is highly protean with a constellation of non-specific or specific visceral, neurological and psychiatric symptoms, initiating at various ages from fetal to late adult life [5]. Visceral manifestations (neonatal cholestasis, hepatosplenomegaly) are frequent and usually mild early symptoms,

* Correspondence: anpapado@med.uoa.gr

†Equal contributors

¹Third Department of Pediatrics, Athens University Medical School, University General Hospital "Attikon", 1 Rimini Str, 12464 –Haidari Athens, Greece
Full list of author information is available at the end of the article



with declining prevalence pertaining to increasing age of inaugural neurological signs [6, 7]. Except in a small subset of patients with a severe systemic perinatal rapidly fatal form, clinical course and prognosis correlate with the age of entering neurological symptomatology. On this basis, and although a clinical continuum has been described, categorization of patients defined by the age of onset of neurological symptoms is particularly useful [1, 8]. Intriguingly, recent data derived from massively parallel sequencing projects suggest the existence of a mild late-onset NPC phenotype with potential incidence of 1/19,000–36,000 [4].

Currently, miglustat (*N*-butyl-deoxynojirimycin), an inhibitor of glycosphingolipid synthesis, is the only approved specific therapy -as soon as any neurological sign arises- in Europe (2009) and other countries [8], but not in the United States. Data from clinical trials and observational studies mainly suggest that miglustat treatment does not prevent, but can at least decelerate the progression of some neurological manifestations, particularly in juvenile and adult onset forms that received the treatment from the very beginning of neurological impairment [6, 9, 10]. A protective effect of miglustat therapy on cerebellar and subcortical structure and function in humans has been proposed [11]. Nevertheless, evidence on long-term efficacy is lacking. Moreover, miglustat does not exert a substantial impact on cholesterol homeostasis, which is of paramount importance in the pathogenesis of NPC. Extensive research in the field of NPC therapy has been conducted during the last years, aiming at different aspects of the disease. Two products, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (NCT01747135), which has shown significant promise in preclinical studies [12], and Arimoclomol (NCT02435030), a heat-shock protein 70/90 co-inducer in cells under stress [13], are currently on clinical trials.

Defects in either of the two distinct genes, *NPC1*, in most cases (~95%), and *NPC2* cause replicate clinical phenotypes, with a much higher frequency of early and severe pulmonary involvement in *NPC2* patients being the only remarkable difference. Although the exact function of *NPC1* & *NPC2* proteins remains elusive, it is supported that both interact in a convergent metabolic pathway regulating cholesterol and sphingolipid homeostasis and transport [2, 14].

The *NPC1* gene is highly polymorphic, with more than 400 disease-causing mutations reported so far (www.hgmd.cf.ac.uk) [3, 15]. Many NPC patients are compound heterozygotes, with a significant proportion of private mutations. However, some mutations are recurrent globally or among distinct populations: p. I1061T the most frequent one in the western world, p. P1007A (second most frequent) in German, p. R1186H in Czech Republic and p. G992W typically in

patients of Nova-Scotia ancestry [3, 16–23]. Numerous *NPC1* genetic variations have also been identified in multiple studies, scattered over the whole gene [4]. High frequency for some of them has been recorded. Among them, the exonic variations c.387 T > C (rs12970899), c.2793C > T (rs1140458), c.644A > G (rs1805081), c.1926G > C (rs1788799), c.2572A > G (rs1805082) and c.3797G > A (rs1805084) have been recurrently observed in various populations in Europe, USA and Japan [16, 18, 24, 25]. In Greece, only three NPC patients, originating from two Aegean Sea Islands, have been reported so far. One of them was a compound heterozygote [p. F284Lfs*26 (c.852delT) and a 432 kb chromosomal microdeletion at 18q11–q12] [26] and the others were homozygous for the p. A1132P (c.3394G > C) mutation [27].

In the present work, we describe the clinical, biochemical and molecular profiles of two Greek NPC patients; a 12-year old female (Patient 1) with two novel *NPC1* mutations (*IVS23 + 3insT* and p. K1057R), and her cousin (Patient 2), a boy homozygous for the *IVS23 + 3insT* mutation. Patient 2 died at 3.5 years of age from the early infantile neurological form of the disease. On the basis of the family history, patient 1 was entered to early treatment, the response to which is discussed in detail. Genetic analysis of the extended kindred revealed a significant number of carriers, a different segregation for each mutation and a possible founder effect. Mutations' origin was performed using the most frequent exonic polymorphisms of the *NPC1* gene, which occurred in a series of 37 Greek patients with clinical suspicion of NPC disease and 90 healthy Greek individuals.

Methods

Patients and Sampling

The study population consisted of two NPC patients and their relatives; 75 members of 3 pedigrees. The pedigrees were constructed based on oral information and questionnaires completed by the parents of each nuclear family of the extended kindred.

NPC Patients

Our proband (Patient 1) is a 12-year-old female, the first child of phenotypically healthy non-consanguineous parents, originating from a Greek island. She was born at 39 weeks gestation age, with a birth weight of 3.2 kg (47th percentile), via caesarean section. Both pregnancy and perinatal history were without complications. At 20 days of age the neonate was admitted to the Neonatal Unit for the evaluation of icterus and hepatosplenomegaly.

Initial laboratory investigation was suggestive of neonatal hepatitis with elevated serum transaminases (SGOT 270U/L, SGPT 69U/L), γ -GT (91U/L), ALP (722U/L) and total bilirubin (193.2 μ mol/L), with a conjugated fraction

of 77% (148.8 $\mu\text{mol/L}$). Further investigation of neonatal cholestasis and comprehensive metabolic work-up were negative, except for elevated chitotriosidase levels (390 nmoles/hr/ml; normal range 0–150 nmoles/ml/h). Bone marrow aspiration demonstrated storage cells compatible with NPC disease. Neurological evaluation revealed mild head lag, mild truncal hypotonia and mild upper limb hypertonia.

Niemann-Pick type C diagnosis was established at 4 months of age by biochemical and cytochemical studies on cultured skin fibroblasts. Filipin staining revealed a massive accumulation of unesterified cholesterol in perinuclear vesicles, and the early rate of Low Density Lipoprotein (LDL)-induced cholesterol esterification was almost nil (20 pmol/mg protein/4.5 h, normal values: 2950 ± 1200 pmol/mg/4.5 h) (classical biochemical subtype of the disease) [28].

At 7.5 months of age, substrate reduction therapy with miglustat was introduced, based on infant's mild hypotonia and mainly on the worrisome family history of a relative deceased from the severe infantile form of the disease (see below). Cholestatic jaundice subsided slowly at 6 months of age but hepatosplenomegaly persisted, albeit mild, with a waxing and wane course, consistent with the usual progress of visceral symptomatology. Hypotonia completely subsided at around 20 months of age and independent walking was acquired by 16 months of age. The rest of physical and psychomotor development evolved according to her chronological age. Findings of neurophysiologic, neuroradiologic and ophthalmological studies remain within normal range. All these years neurological examination has revealed no pathological findings, apart from slight clumsiness firstly noticed at the age of 20 months. This mild developmental coordination disorder, without overt neurological signs (reflexes, tandem gait, one leg stand and cerebellar tests are within normal range), is improving overtime and therefore, it could be considered as an innate trait rather than a manifestation of the disease. Generally, treatment with dose adjusted to body surface has been well tolerated, apart from occasional soft stools that could be overcome by a lactose-free diet. Currently, at the age of 12 years, her weight is 62 kg, her height 169.5 cm, she has normal menses (menarche at 10 years of age) and leads a common life, successfully attending normal school and extracurricular activities such as, drawing and exercising (ballet, swimming and volleyball).

As mentioned above, the early clinical and biochemical diagnosis of patient 1 was expedited owing to a previously diagnosed affected cousin who had died in 1990 at the age of 3.5 years. Patient 2, a male, had been born at term to phenotypically healthy parents sharing a common origin, after an uneventful pregnancy. He had been hospitalized after birth due to cholestatic jaundice,

which subsided. However, the patient progressively developed the severe early infantile neurological form of the disease with generalised hypotonia, profound developmental motor delay and rapid neurological deterioration. Diagnosis of NPC was established at 2 years of age by biochemical/cytochemical studies on cultured skin fibroblasts, showing the classical biochemical subtype of the disease [28]. The genetic defects of both patients were investigated later on.

Haplotype analysis-NPC1 gene variations

In lack of published evidence regarding the type and frequency of *NPC1* variations in Greek population, the study of mutations' origin was based on the data derived from the comparison of polymorphisms between 37 Greek patients with clinical suspicion of NPC disease (SG) and 90 healthy Greek individuals (CG), which had been collected in a 4-year period (May 2011 to May 2015). The five exonic variations encountered more frequently were further studied in the 75 relatives of NPC patients 1 and 2. Haplotype analysis was performed by the use of Haplore software [29].

Genotyping

Sequencing of *NPC1* and *NPC2* genes (exons 1–25 and 1–5, respectively, and intron-exon boundaries) was performed at the Research Laboratory of the Third Department of Pediatrics in Athens and at the Gillet-Merieux Laboratory in Lyon, France (patient 1). For studies performed in Greece, genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using the GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham, Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Investigation for genetic alterations was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct sequencing of PCR products in an ABI genetic analyzer (310 Applied Biosystems, UK), as previously described with minor modifications [30, 31]. Targeted detection of the index case/parental mutations and of the selected polymorphisms was performed in participants-members of the patients' pedigree and a control group of 90 Greek individuals.

Results

NPC Patients and Pedigree

Patient 1 was found a compound heterozygote for one missense p. K1057R (*c.3170A > C*), in exon 21, and one splicing mutation *IVS23 + 3insT* (*c.3591 + 3insT*) in exon 23 splice site. The splicing mutation leads to transcriptional splicing error and subsequent deletion of exon 23. Parental genetic testing revealed a maternal origin of the p. K1057R mutation and a paternal origin of the *IVS23 + 3insT* one. Molecular analysis on the parental *NPC1* genes of the deceased patient (Patient 2) revealed in

both the same splicing mutation (*IVS23 + 3insT*). Consequently, homozygosity for an *IVS23 + 3insT* mutation was indirectly disclosed to be Patient's 2 genetic cause of the NPC phenotype. Neither mutation was detected in 90 unaffected Greek individuals nor was reported to our knowledge.

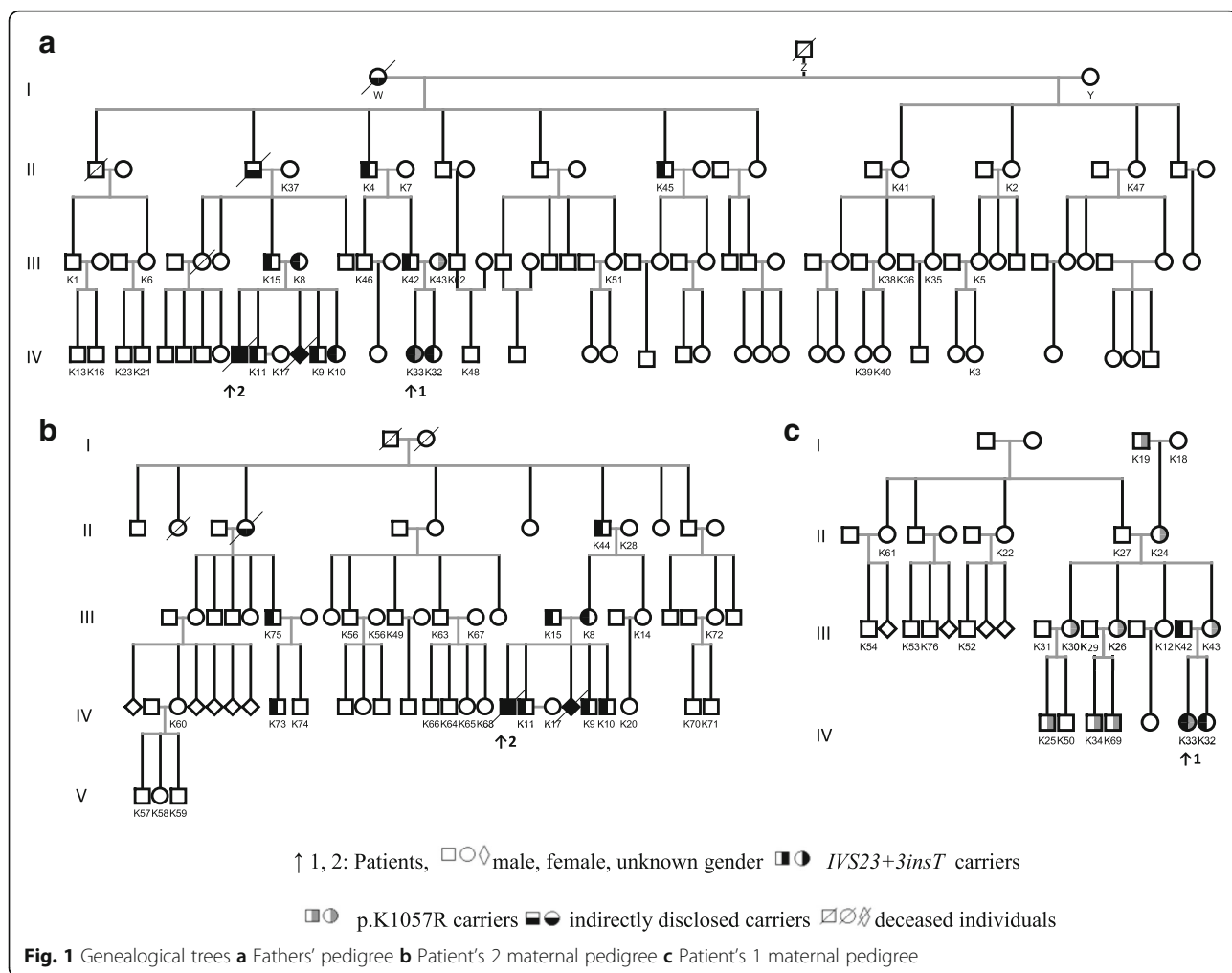
Patient 1 and 2 are related as depicted in Fig. 1a. Maternal pedigrees of Patient 2 (K8) and Patient 1 (K43) are illustrated on Fig. 1b and c, respectively. No consanguinity was reported between these three pedigrees. Among the 75 individuals screened, 40 were male (47.4%) and 36 female (52.6%). Among the 20 mutation carriers (26.7%), 12 harbored the *IVS23 + 3insT* mutant allele and 8 owned the *K1057R* mutation.

Overall, the *IVS23 + 3insT* mutation was identified in members of the fathers' and Patient's 2 mother's pedigrees (12/55, 21.8%). All individuals of these pedigrees (Fig. 1a and b) shared a common geographical origin from a region of Chania County on Crete Island. Patient 2 parents and his three siblings were all carriers of the above mutation, whereas one pregnancy was terminated

due to positive prenatal testing for NPC. Ancestor Z was married twice and we assume that subject W carried the *IVS23 + 3insT* mutant allele since no descendant of subject Y was found to own the mutation. *K1057R* mutation was detected only in members of the maternal pedigree of Patient 1 (8/21, 38.1%) (Fig. 1c) and was identified to descend from an ancestor with origin from Asia Minor. This pedigree could not be investigated in depth, as no other relatives resided on the island.

NPC1 Polymorphisms and Haplotype Analysis

Nine genetic variations classified as benign polymorphisms were identified in the exonic coding region and eleven in the intronic flanking regions of *NPC1* in the SG. Two synonymous variations c.387 T > C (rs12970899) and c.2793C > T (rs1140458) and four non-synonymous coding polymorphisms c.644A > G (rs1805081), c.1926G > C (rs1788799), c.2572A > G (rs1805082) and c.3797G > A (rs1805084) were the more frequent *NPC1* exonic polymorphisms in the SG and in the CG (unpublished data). These were further studied in Patient 1 and her pedigree.



The distribution of these genotypes and allelic frequencies in the members of the NPC pedigrees is presented in Table 1.

Haplotype analysis in the carriers of the two novel mutations revealed that each mutation was associated with a specific haplotype; *IVS23 + 3insT* with (+,-,+,-) haplotype and *c.3170A > C* mutant allele with (-,-,-,-) haplotype for the tested SNPs; rs12970899, rs1805081, rs1788799 and rs1140458 respectively. Polymorphisms rs1805082 and rs1805084 were excluded since Hardy-Weinberg equilibrium criterion was not met for the first one and the frequency of the second one was only 3.4% in this group.

Discussion

The genetic investigation of our NPC Greek patients revealed two novel *NPC1* mutations; the splicing mutation *IVS23 + 3insT* and the missense mutation p. K1057R. Patient 1 is a compound heterozygote for the above mutations and has displayed essentially no neurological symptomatology till the age of 12. Her cousin (Patient 2), with a homozygosity for the *IVS23 + 3insT* mutation, had suffered from the most severe neurological form of the disease and died early, at 3.5 years of age, indicating that this mutation is very deleterious. Mutations in the splice site of exon 23 affect the extracellular carboxy-terminal part of *NPC1* protein, a moiety possibly susceptible to deleterious alterations, since five different splicing mutations have been reported so far (*IVS23 + 5G > A*, *IVS23 + 1G > A* –recurrent in Portugal-, *IVS23 + 3G > C*, *IVS23 + 4delA* and *IVS23 + 4insG*) [16, 18, 20, 23]. Molecular studies on total RNA extracted from cultured skin fibroblasts of NPC patients, revealed the formation of rather identical abnormal spliced transcripts of different sizes with even complete skipping of exon 23 [16, 23], as in our case. In homozygous state,

the above mutations have been demonstrated to lead to functionally unstable proteins [16] and, including the novel mutation *IVS23 + 3insT* described herein, to correlate biochemically with severe impaired intracellular cholesterol trafficking (classical filipin pattern and very low LDL-induced exogenous cholesterol esterification rate) [16, 20, 23]. The clinical phenotype of three other previously reported patients with homozygous mutations at the same site [16, 23] was also very severe.

The second, missense mutation p. K1057R, consists of a point alteration at exon 21. This novel mutation resides in the cysteine-rich luminal loop L (aa 854–1098) between TM-8 and TM-9 of *NPC1* protein and is predicted to perturb its function. Indeed, integrity of loop L has been demonstrated to be essential for proper cholesterol trafficking, while its zinc-binding activity indicates involvement in unloading lysosomal cargo [32]. What is more, a high number of *NPC1* mutations (1/3 of the missense mutations) is clustered in this highly conserved among most *NPC1* orthologues loop [18, 33], indicating its functional significance [34]. The deleterious impact of this genetic alteration was further supported by its absence from the 90 Greek healthy subjects and also from the members of pedigrees 2a and 2b. Missense mutations in the cysteine-rich domain have been associated with both mild and severe alterations in cholesterol transport [18, 20, 35]. It has been proposed that in compound heterozygous patients one variant mutant allele is possibly sufficient for maintaining a variant biochemical phenotype [16, 18, 23, 34, 36]. The p. K1057R allele is likely associated with a classical biochemical pattern, as patient 1, carrier of *IVS23 + 3insT* and p. K1057R alleles, exhibits a classical biochemical profile.

Although striking intracellular cholesterol abnormalities are typically observed in the early infantile neurological form of the disease, whereas a “variant” biochemical

Table 1 Distribution of *NPC1* polymorphism genotype and allelic frequency among members of the extended pedigree ($N=76$)

Genetic variations	Genotypes detected by direct sequencing			Allelic frequency	
c.387 T > C (p. Y129Y)	TT	TC	CC	T	C
	29 (38.2)	39 (51.3)	8 (10.5)	97 (63.8)	55 (36.2)
c.644A > G (p. H215R)	AA	AG	GG	A	G
	44 (57.9)	29 (38.2)	3 (3.9)	117 (77.0)	35 (23.0)
c.1926G > C (p. M642I)	GG	GC	CC	G	C
	4 (5.3)	36 (47.4)	36 (47.4)	44 (28.9)	108 (71.1)
c.2572A > G (p. I858V)	AA	AG	GG	A	G
	2 (2.7)	65 (87.8)	7 (9.5)	69 (46.60)	79 (53.4)
c.2793C > T (p. N931N)	CC	CT	TT	C	T
	32 (35.2)	37 (48.7)	7 (9.2)	100 (65.8)	52 (34.2)
c.3797G > A (p. R1266Q)	GG	GA	AA	G	A
	69 (93.2)	5 (6.8)	0	143 (96.6)	5 (3.4)

Figures in parenthesis are percentages

phenotype is overrepresented in the adult form, clinical severity does not necessarily correspond to the degree of inhibition in intracellular LDL-cholesterol processing. Indeed, about half of the patients with an adult onset neurological form exhibit a typical filipin staining profile [36]. The missense mutation p. A1054T, adjacent to our p. K1057R mutation, has been correlated with early neurological disease and undetectable protein in immunoblotting studies [35]. But since the p. K1057R mutation has not been expressed and studied by immunocytochemistry, it is currently not feasible to predict a certain genotype/phenotype correlation for this allele. A number of published patients with an adolescence/adult neurological onset is compound heterozygotes for a null and a mild *NPC1* mutant allele. On the other hand, the two patients referred in literature being compound heterozygotes for *IVS23 + IG > A* (mutation at the same splice site) with A1035V [16] or I1061T, respectively [3], exhibited the severe infantile phenotype, despite that I1061T has been associated with a milder neurological course.

In patient 1, miglustat therapy was introduced soon after diagnosis, already at 7.5 months of age, considering mainly the natural history of the disease in her cousin and the presence of mild axial hypotonia. She has now been closely monitored for the last 11.5 years, showing good tolerance to miglustat regimen and at present, she manifests no overt neurological manifestations. The aforementioned patients with the same splicing mutation in compound heterozygosity [3, 16] had a very severe clinical course, much different from that in our Patient 1, suggesting that the early institution of substrate reduction therapy might have had an effect on our proband. However, since NPC disease presents broad heterogeneity, patient's 1 natural history of the disease cannot be accurately determined and evidence pertaining to neurologically asymptomatic patients entering substrate therapy is elusive and sporadic [3, 37, 38], it is difficult to extrapolate any definite conclusion.

The origin of our proband from a Greek Island in association with the presence of another deceased NPC patient in her broad family prompted the investigation of the extended kindred, which revealed high prevalence of NPC carriers. This was expected since most of the pedigrees' members are related or originate from a specific insular region. Indeed, the progenitors of the pedigrees 1a and 1b originated from two villages in close proximity and though no common ancestor could be identified, *IVS23 + 3insT* was associated with one specific haplotype. This fact strengthens the hypothesis of a founder effect, which could be further demonstrated by microsatellite analysis. On the other hand, the maternal mutation p. *K1057R* (1c pedigree) was associated with a different haplotype, which supports its different origin. Indeed, ancestors of patient 1's mother belonged to

"Diaspora" (Greeks of dispersion), who settled on the hellenic island in 1922.

A large number of *NPC1* gene variations has been identified so far [4]. The frequency and the type of the more common exonic polymorphisms observed in participants in this subgroup of Greek population are mainly in accordance with other European populations, especially Italians and Spaniards (www.ensembl.org). Of note the non-synonymous coding polymorphism rs1788799 has been associated with obesity and Alzheimer Disease/aging [39–41]. Furthermore, NPC1 protein has also been implied to be involved in the clinical entity of atheromatosis [42]. The impact of *NPC1* variations on human health has been proposed to be significant and given the limited number of functional studies in *NPC1* gene, it constitutes a promising field for further investigation [4].

Conclusions

The novel splicing mutation *IVS23 + 3insT* reported herein is associated in homogyzous state with a severe biochemical and clinical phenotype (severe infantile form) of NPC. The new missense mutation p. K1057R is likely also associated with a classical biochemical pattern. However, it is difficult to conclude on a clinical correlation of their combination since Patient 1, carrier of the two above mutations, has been on early miglustat therapy for the last 11.5 years. The long-term follow-up of our patient may contribute to clarify the situation. Haplotype analysis suggested a possible founder effect for *IVS23 + 3insT* in the Greek Island as well as a different origin for each mutation. Note: a study on NPC in Greece has been published while our manuscript was still under evaluation [43].

Abbreviations

CG: Control group; NPC: Niemann-Pick type C disease; PCR: Polymerase chain reaction; SG: Suspicion group

Acknowledgements

The authors thank Dr. Irene Mavridou for her contribution in the diagnostic procedure and are indebted to the patients and their families for collaboration with this study.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

All raw data generated or data analysed during this study are available from the corresponding author upon request.

Authors' contributions

E.B. and A.P. performed the molecular studies, contributed to the study design, the acquisition, the analysis, the interpretation of the data and wrote the manuscript. M.T.V. performed and H.M. contributed to the biochemical/cytochemical diagnosis of the two patients on cultured skin fibroblasts and the molecular diagnosis of patient 1. MTV also contributed significantly to the manuscript review. G.N. was involved in the clinical diagnosis and the longitudinal therapeutic management of the patient 1. S.K. contributed to the organization of the database and reviewed the manuscript. A.D. follows up the patient and made therapy interventions. He contributed to the design, the interpretation of the data and the manuscript review. All authors read and approved the final version of manuscript.

Competing interests

A.P., G.N., S.K. declare no conflict of interest. E.B. has received travel reimbursements from Actelion Pharmaceuticals. M.T.V. has received travel reimbursement and honoraria from Actelion Pharmaceuticals for speaking engagements and as a member of Advisory Boards. H.M. and A.D. have received travel reimbursement and honoraria from Actelion Pharmaceuticals for speaking engagements and laboratory diagnosis purposes.

Consent for publication

Consent for publication was obtained from patients' parents and from all individuals who participated in the study.

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from patients' parents and from all individuals who participated in the study. The study was approved by the Attikon University General Hospital Institutional review board and all procedures performed were in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Third Department of Pediatrics, Athens University Medical School, University General Hospital "Attikon", 1 Rimini Str, 12464 –Haidari Athens, Greece.

²Laboratoire Gillet-Mérieux, Groupe Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ³Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Kallithea, Athens, Greece. ⁴Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of Child Health, Athens, Greece.

Received: 12 July 2016 Accepted: 19 April 2017

Published online: 04 May 2017

References

- Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16.
- Vanier MT. Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J Inher Metab Dis.* 2015;38(1):187–99.
- Jahnova H, Dvorakova L, Vlaskova H, Hulkova H, Poupetova H, Hrebicek M, Jesina P. Observational, retrospective study of a large cohort of patients with Niemann-Pick disease type C in the Czech Republic: a surprisingly stable diagnostic rate spanning almost 40 years. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:140.
- Wassif CA, Cross JL, Iben J, Sanchez-Pulido L, Coughnoux A, Platt FM, Ory DS, Ponting CP, Bailey-Wilson JE, Biesecker LG, et al. High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genet Med.* 2015.
- Mengel E, Klunemann HH, Lourenco CM, Hendriks CJ, Sedel F, Walterfang M, Kolb SA. Niemann-Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:166.
- Heron B, Valayannopoulos V, Baruteau J, Chabrol B, Ogier H, Latour P, Dobbelaere D, Eyer D, Labarthe F, Maurey H, et al. Miglustat therapy in the French cohort of paediatric patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:36.
- Patterson MC, Mengel E, Wijburg FA, Muller A, Schwierin B, Drevon H, Vanier MT, Pineda M. Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:12.
- Patterson MC, Hendriks CJ, Walterfang M, Sedel F, Vanier MT, Wijburg F. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab.* 2012;106(3):330–44.
- Fecarotta S, Romano A, Della Casa R, Del Giudice E, Bruschini D, Mansi G, Bembì B, Dardis A, Fiumara A, Di Rocco M, et al. Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10(1):22.
- Patterson MC, Mengel E, Vanier MT, Schwierin B, Muller A, Cornelisse P, Pineda M. Stable or improved neurological manifestations during miglustat therapy in patients from the international disease registry for Niemann-Pick disease type C: an observational cohort study. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:65.
- Bowman EA, Walterfang M, Abel L, Desmond P, Fahey M, Velakoulis D. Longitudinal changes in cerebellar and subcortical volumes in adult-onset Niemann-Pick disease type C patients treated with miglustat. *J Neurol.* 2015; 262(9):2106–14.
- Vite CH, Bagel JH, Swain GP, Prociuk M, Sikora TU, Stein VM, O'Donnell P, Ruane T, Ward S, Crooks A, et al. Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Sci Transl Med.* 2015;7(276):276ra226.
- Ingemann L, Kirkegaard T. Lysosomal storage diseases and the heat shock response: convergences and therapeutic opportunities. *J Lipid Res.* 2014; 55(11):2198–210.
- Vance JE. Transfer of cholesterol by the NPC team. *Cell Metab.* 2010;12(2):105–6.
- McKay Bounford K, Gissen P. Genetic and laboratory diagnostic approach in Niemann Pick disease type C. *J Neurol.* 2014;261 Suppl 2:S569–575.
- Ribeiro I, Marcao A, Amaral O, Sa Miranda MC, Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum Genet.* 2001;109(1):24–32.
- Millat G, Bailo N, Molinero S, Rodriguez C, Chikh K, Vanier MT. Niemann-Pick C disease: use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families. *Mol Genet Metab.* 2005;86(1–2):220–32.
- Park WD, O'Brien JF, Lundquist PA, Kraft DL, Vockley CW, Karnes PS, Patterson MC, Snow K. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum Mutat.* 2003;22(4):313–25.
- Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, Ohno K, Wenger DA, Vanier MT. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1321–9.
- Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, O'Brien JF, Kraft DL, Lundquist PA, Patterson MC, Pagano RE, et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1361–72.
- Fancello T, Dardis A, Rosano C, Tarugi P, Tappino B, Zampieri S, Pinotti E, Corsolini F, Fecarotta S, D'Amico A, et al. Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics.* 2009;10(3):229–39.
- Greer WL, Riddell DC, Gillan TL, Girouard GS, Sparrow SM, Byers DM, Dobson MJ, Neumann PE. The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097→T transversion in NPC1. *Am J Hum Genet.* 1998;63(1):52–4.
- Macias-Vidal J, Rodriguez-Pascual L, Sanchez-Olle G, Lluich M, Vilageliu L, Grinberg D, Coll MJ. Molecular analysis of 30 Niemann-Pick type C patients from Spain. *Clin Genet.* 2011;80(1):39–49.
- Bauer P, Knoblich R, Bauer C, Finckh U, Hufen A, Kropp J, Braun S, Kustermann-Kuhn B, Schmidt D, Harzer K, et al. NPC1: Complete genomic sequence, mutation analysis, and characterization of haplotypes. *Hum Mutat.* 2002;19(1):30–8.
- Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Higaki K, Taniguchi M, Zhang H, Akaboshi S, Watanabe Y, Takeshima T, Inui K, et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet.* 1999; 105(1–2):10–6.
- Rodriguez-Pascual L, Toma C, Macias-Vidal J, Cozar M, Cormand B, Lykopoulos L, Coll MJ, Grinberg D, Vilageliu L. Characterisation of two deletions involving NPC1 and flanking genes in Niemann-Pick Type C disease patients. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):716–20.
- Mavridou I, Cozar M, Douzou S, Xaidara A, Lianou D, Vanier MT, Dimitriou E, Grinberg D, Vilageliu L, Michelakakis H. Niemann-Pick type C disease: a novel NPC1 mutation segregating in a Greek island. *Clin Genet.* 2014;85(6):543–7.
- Vanier MT, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R, Gazzah N, Juge MC, Pentchev PG, Revol A, Louisot P. Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1096(4):328–37.
- Zhang K, Sun F, Zhao H. HAPLORE: a program for haplotype reconstruction in general pedigrees without recombination. *Bioinformatics.* 2005;21(1):90–103.
- Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M, Ohta Y, Nanba E, Tsutsumi Y, Yamakawa K, Millat G, Vanier MT, Pentchev PG, et al. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet.* 2000;37(9):707–12.

31. Fernandez-Valero EM, Ballart A, Iturriaga C, Lluch M, Macias J, Vanier MT, Pineda M, Coll MJ. Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*. 2005;68(3):245–54.
32. Watari H, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Watari M, Burd CG, Patel S, Pentchev PG, Strauss 3rd JF. Determinants of NPC1 expression and action: key promoter regions, posttranscriptional control, and the importance of a "cysteine-rich" loop. *Exp Cell Res*. 2000;259(1):247–56.
33. Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Riddell DC, Neumann PE. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet*. 1999;65(5):1252–60.
34. Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, Ohno K, Vanier MT. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1373–85.
35. Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, Wenger DA, Ohno K, Vanier MT. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1373–85.
36. Vanier MT, Latour P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test. *Methods Cell Biol*. 2015;126:357–75.
37. Di Rocco M, Dardis A, Madeo A, Barone R, Fiumara A. Early miglustat therapy in infantile Niemann-Pick disease type C. *Pediatr Neurol*. 2012;47(1):40–3.
38. Di Rocco M, Barone R, Madeo A, Fiumara A. Miglustat Does Not Prevent Neurological Involvement in Niemann Pick C Disease. *Pediatr Neurol*. 2015;53(4), e15.
39. Meyre D, Delplanque J, Chevre JC, Lecoœur C, Lobbens S, Gallina S, Durand E, Vatin V, Degraeve F, Proenca C, et al. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet*. 2009;41(2):157–9.
40. Erickson RP, Larson-Thome K, Weberg L, Szybinska A, Mossakowska M, Styczynska M, Barcikowska M, Kuznicki J. Variation in NPC1, the gene encoding Niemann-Pick C1, a protein involved in intracellular cholesterol transport, is associated with Alzheimer disease and/or aging in the Polish population. *Neurosci Lett*. 2008;447(2–3):153–7.
41. Kresojevic N, Dobricic V, Svetel M, Kostic V. Mutations in Niemann Pick type C gene are risk factor for Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*. 2014;83(5):559–62.
42. Yu XH, Jiang N, Yao PB, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK. NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2014;429:69–75.
43. Mavridou I, Dimitriou E, Vanier MT, Vilageliu L, Grinberg D, Latour P, Xaidara A, Lycopoulou L, Bostantjopoulou S, Zafeiriou D, et al. The spectrum of Niemann-Pick Type C Disease in Greece. *JIMD Rep*. 2017.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

