



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ»**

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C9ORF72 ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΟΣΟ PARKINSON Ή ΑΤΥΠΑ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝΙΚΑ
ΣΥΝΔΡΟΜΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΓΕΩΡΓΙΑ ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ
(Α.Μ. 20190903)**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΡΑΔΗΜΑ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΣΤΕΦΑΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ-ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΤΣΙΛΙΕΡΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I) ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.2
II) ABSTRACT.....	σελ.4
III) ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	σελ.6
IV) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.7
1. ΝΟΣΟΣ PARKINSON.....	σελ.7
2. ΑΤΥΠΑ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....	σελ.12
3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>C9ORF72</i>	σελ.15
4. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>C9ORF72</i>	σελ.19
5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	σελ.23
V) ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	σελ.24
1. ΥΛΙΚΟ.....	σελ.24
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	σελ.25
a. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΚΕΛΟΣ.....	σελ.25
b. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	σελ.41
VI) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.42
VII) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ.46
VIII) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ.53

I) ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Το γονίδιο *C9ORF72* εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9p) και κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που εκφράζεται σε σημαντικό ποσοστό στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο ρόλος της οποίας όμως δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Η δυναμική μεταλλαγή (επέκταση του αριθμού επαναλήψεων της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας GGGGCC) του γονιδίου *C9ORF72*, έχει μελετηθεί σε εκτενέστερο βαθμό στη πλαγία μυατροφική σκλήρυνση, την μετωποκροταφική άνοια, καθώς και στα HD-like σύνδρομα, σε σύγκριση με πληθυσμούς με νόσο Parkinson και άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα. Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η περαιτέρω διερεύνηση της συχνότητας της μεταλλαγής του γονιδίου *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με νόσο Parkinson ή άτυπο παρκινσονισμό καθώς και η συσχέτιση της με τον κλινικό τους φαινότυπο.

Υλικό και Μεθοδολογία: Το υλικό της μελέτης αποτελούν 91 δείγματα DNA ασθενών με νόσο Parkinson ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο [75 ασθενών με νόσο Parkinson από βιοτράπεζα από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), και 18 ασθενών (2 με νόσο Parkinson, 15 με Φλοϊόβασικό Σύνδρομο και 1 με Άνοια με σωματία Lewy) από την Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, που συλλέχθηκαν προοπτικά κατά τη διάρκεια της μελέτης (Μάρτιος 2022-Μάρτιος 2023)]. Ο γενετικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε αρχικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε PCR προσαρμοσμένη και σχεδιασμένη ώστε να ανιχνεύει μεγάλο αριθμού επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (repeat primed – PCR, RP-PCR). Τα προϊόντα του RP-PCR αναλύθηκαν σε αυτόματο γενετικό αναλυτή και αξιολογήθηκαν με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα. Τέλος, οι στατιστικές αναλύσεις των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση R software version 3.5.0.

Αποτελέσματα: Σε σύνολο 91 ασθενών (75 με νόσο Parkinson, 15 με Φλοϊόβασικό Σύνδρομο και 1 με Άνοια με σωματία Lewy) δεν ανιχνεύθηκε η παθογόνος παραλλαγή (>30 επαναλήψεις) αλλά ούτε και ο ενδιάμεσος αριθμός επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72*. Από το σύνολο αυτών των δειγμάτων, η μέθοδος RP-PCR εφαρμόστηκε σε 26 δείγματα. Επίσης, υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών αλληλομόρφων της επανάληψης στο γονίδιο *C9ORF72* στα δείγματα των 91 ασθενών και το συχνότερο αλληλόμορφο που εντοπίστηκε έφερε 3 επαναλήψεις της

εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας (53%), ενώ το δεύτερο πιο συχνό έφερε 9 επαναλήψεις (14%).

Συζήτηση: Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, κατά την οποία η παθογόνος μεταλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με νόσο Parkinson ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο, φαίνεται να ανευρίσκεται από πολύ σπάνια έως καθόλου. Στα πλεονεκτήματα της μελέτης συμπεριλαμβάνεται η συμβολή στην ευρύτερη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *C9ORF72* στην συγκεκριμένη ομάδα ασθενών καθώς και στην αύξηση του αριθμού των Ελλήνων ασθενών με νόσο Parkinson και άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα που ελέγχθηκαν για την παθογόνο μεταλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*.

II) ABSTRACT

Introduction: The *C9ORF72* gene, located in the short arm of chromosome 9 (9p) encodes a protein, expressed in high percentage in the central nervous system, yet its function has not been clarified. A dynamic mutation (hexanucleotide GGGGCC repeat expansion) in the *C9ORF72* gene has been studied extensively in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Frontotemporal Dementia, as well as in HD-like syndromes, compared to patients with Parkinson's disease and atypical parkinsonism syndromes. The aim of this study is to further investigate the frequency of the *C9ORF72* gene mutations in Greek patients with Parkinson's disease or atypical parkinsonism and its association with their phenotypic profile.

Material and Methods: The study material included 91 DNA samples of patients with Parkinson's disease or atypical parkinsonism syndromes [75 patients with Parkinson's disease from a biobank from the Biomedical Research Foundation Academy of Athens (BRFAA), and 18 patients (2 with Parkinson's disease, 15 with Corticobasal Syndrome and 1 with Lewy Body Dementia) from the Neurogenetics Unit of the 1st Department of Neurology, "Eginition" Hospital, collected prospectively during the study (March 2022-March 2023)]. As a first step, genetic testing involved polymerase chain reaction (PCR), and the products were analyzed on agarose gel. The next step included repeat-primed PCR (RP-PCR), a technique designed to detect large numbers of repeat expansions. RP-PCR products were analyzed in an automated genetic analyzer and evaluated with appropriate software programs. Statistical analyses of the results were performed using R software version 3.5.0.

Results: In the study material of 91 patients (75 with Parkinson's disease, 15 with Corticobasal Syndrome and 1 with Lewy Body Dementia) no pathogenic or intermediate repeat expansion was detected in the *C9ORF72* gene. Of these samples, RP-PCR was applied to 26 samples. Additionally, analysis revealed that the allele detected with the highest frequency was the allele with 3 repeats of the hexanucleotide GGGGCC (53%), and the next most frequently detected allele was the one with 9 repeats (14%).

Discussion: The results of the present study agree with those of international literature, in which pathogenic expansion in the *C9ORF72* gene in patients with Parkinson's disease or atypical parkinsonism syndromes seems to be found very rarely or not at all. The

advantages of the study include the contribution to the broader investigation of the role of the *C9ORF72* gene in this group of patients as well as the increase of number of Greek patients with Parkinson's disease and atypical parkinsonism screened for pathogenic mutation in the *C9ORF72* gene.

III) ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής, του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από τον Μάρτιο του 2022 έως τον Μάρτιο του 2023, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιολογίας-Νευρογενετικής, κας Γεωργίας Καραδήμα. Καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης, είχα το προνόμιο να συνεργαστώ με αξιόλογους συναδέλφους, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνδρομή τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας, αλλά κυρίως για την στήριξη και την συμβολή τους να διευρύνω τον τρόπο σκέψης μου στον τομέα της έρευνας.

Η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Γεωργία Καραδήμα, συνυπεύθυνη της Μονάδας Νευρογενετικής και επιβλέπουσα της εργασίας, διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο σε όλη την πορεία της εκπαίδευσής μου, με την άρτια και ολοκληρωμένη επιστημονική της σκέψη και την πολύτιμη καθοδήγησή της για την ολοκλήρωση της εργασίας. Ο Καθηγητής και Διευθυντής της Α' Νευρολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, κος Λεωνίδας Στεφανής, αποτέλεσε μέντορας για την ενασχόλησή μου με τις Εξωπυραμιδικές διαταραχές τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο και τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή του. Ο Καθηγητής Πειραματικής Φυσιολογίας, κος Μιχαήλ Κουτσιλιέρης, καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος μας εμφύσησε το ενδιαφέρον για την έρευνα μέσα από τις εισηγήσεις του, συμβάλλοντας στην επιθυμία ενασχόλησης με αυτή. Ο Αναπληρωτής Καθηγητής κος Γεώργιος Κούτσης, συνυπεύθυνος της Μονάδας Νευρογενετικής, συνέβαλε σημαντικά με την ολοκληρωμένη προσέγγισή του από κλινικής και ερευνητικής πλευράς, με το μεθοδευμένο τρόπο σκέψης του και την καθοδήγησή του σε σημαντικά σημεία κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη βιολόγο και διδάκτορα κα Χρυσούλα Καρτάνου για τις συμβουλές και την στοχευμένη καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας.

IV) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΝΟΣΟΣ PARKINSON

Η ιδιοπαθής Νόσος Parkinson (PD) αφορά νευροεκφυλιστική νόσο με επιπολασμό πάνω από 1% σε ηλικίες >60 ετών και περίπου 4% σε ηλικίες >85 ετών, και η συχνότητα της αυξάνεται με την ηλικία.⁽¹⁾ Η PD ευθύνεται περίπου για το 75% των περιπτώσεων παρκινσονισμού. Το υπόλοιπο 25% προκύπτει από άλλες νευροεκφυλιστικές παθήσεις, αγγειακές εγκεφαλικές νόσους και φάρμακα. Σε ποσοστό 5-10% των περιπτώσεων ανευρίσκεται οικογενειακό ιστορικό PD. Κυριότεροι παράγοντες κινδύνου αποτελούν το θετικό οικογενειακό ιστορικό, το άρρεν φύλο, έκθεση σε εντομοκτόνα, ενώ με μειωμένη επίπτωση της νόσου έχουν συσχετισθεί η κατανάλωση καφέ και καπνού.⁽²⁾ Σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια MDS του 2015 για την κλινική διάγνωση της PD, απαιτείται κλινική εικόνα παρκινσονισμού με βραδυκινησία και τρόμο ή δυσκαμψία.⁽³⁾ Η βραδυκινησία αποτελεί σοβαρό κινητικό χαρακτηριστικό της νόσου, επηρεάζοντας καθημερινές δραστηριότητες του ατόμου, όπως η βάδιση, η έγερση από καθιστή στην όρθια θέση, το ντύσιμο αλλά και τις λεπτές κινήσεις, όπως μειωμένη επιδεξιότητα των χεριών και της γραφής (μικρογραφία), σιγανή ομιλία (υποφωνία), μειωμένο βλεφαρισμό και μειωμένες εκφράσεις προσώπου (υπομιμία). Το τρόμος είναι κυρίως τρόμος ηρεμίας με συχνότητα 4-6Hz, περιφερικά στα άνω άκρα, στα δάκτυλα και στους καρπούς και μπορεί να θυμίζει κινήσεις «καταμέτρησης κερμάτων». Ο τρόμος τυπικά είναι ετερόπλευρος στην αρχή της νόσου, ενώ με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εμφανισθεί και στην αντίθετη πλευρά. Η δυσκαμψία, η οποία είναι έκδηλη ως αντίσταση στην παθητική κίνηση μίας άρθρωσης καθ' όλη την έκτασή της δίνει μια «πλαστική» ποιότητα στην κίνηση. Δυστονία, που εκδηλώνεται με ακούσιες μυϊκές συσπάσεις, μπορεί να εμφανισθεί στα πρώτα στάδια της νόσου και ιδιαίτερα σε νεότερους ασθενείς. Βασικό χαρακτηριστικό της PD αποτελεί το «προωθητικό» βάδισμα, που προκύπτει από κάμψης του κορμού σε συνδυασμό με μικρά συρόμενα βήματα και απώλεια του αντανακλαστικού της όρθιας στάσης. Σε προχωρημένα στάδια της νόσου, παρατηρείται και το «πάγωμα» του βαδίσματος, που εμφανίζεται με δισταγμό στην έναρξη της κίνησης και κατά την αλλαγή διεύθυνσης ή κατά τη στροφή.⁽²⁾

Σημαντικό ρόλο στη PD έχουν και τα μη κινητικά συμπτώματα, τα οποία επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και συχνά μπορεί να προηγούνται των κινητικών συμπτωμάτων. Τα σημαντικότερα είναι η κατάθλιψη, υποσμία, δυσκοιλιότητα, διαταραχές του αυτονόμου, διαταραχές στην φάση REM του ύπνου (RBD) καθώς και ψυχιατρικές εκδηλώσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα ανήσυχα κάτω άκρα και η RBD

παρατηρείται σε σημαντικό αριθμό ασθενών, ακόμη και πριν την έναρξη των κινητικών συμπτωμάτων της νόσου. Ζηηρά όνειρα και παραισθήσεις που μπορεί να προκύψουν από την ντοπαμινεργική θεραπεία μπορεί να συμβάλουν στη διαταραχή του ύπνου. Η δυσλειτουργία του αυτόνομου μπορεί να εκδηλωθεί με ορθοστατική υπόταση, δυσκοιλιότητα, επιτακτικές ουρήσεις και συχνουρία.⁽²⁾ Στην PD, οι ψυχωσικές εκδηλώσεις απαντώνται περίπου στο 20-75% των ασθενών.⁽⁴⁾ Σύμφωνα με την ομάδα εργασίας NINDS-NIMH, τα ψυχωσικά συμπτώματα κατά τα αρχικά στάδια της νόσου περιλαμβάνουν ήπια φαινόμενα, όπως αίσθημα παρουσίας, παραισθήσεις, καθώς και οπτικές ψευδαισθήσεις ζώων, ανθρώπων ή αντικειμένων. Η συχνότητα των ήπιων αντιληπτικών φαινομένων υπολογίζεται περίπου στο 32%, ενώ οι οπτικές ψευδαισθήσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα, έως 60% κατά την εξέλιξη της νόσου. Στην πρώιμη περίοδο, διατηρείται η εναισθησία, ενώ στα πιο προχωρημένα στάδια, η εναισθησία χάνεται και τα άτομα μπορεί και να αλληλοεπιδρούν με τα αντιληπτικά φαινόμενα. Τέλος, όσον αφορά τις νοητικές λειτουργίες, η παρουσία νοητικών διαταραχών στη PD παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα. Στη πορεία της νόσου, ήπια νοητική διαταραχή εμφανίζεται στο 20% έως 60% των ασθενών, ενώ σε αυτούς του ασθενείς, η μετάπτωση σε άνοια είναι 6 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι στην ομάδα ελέγχου της ίδιας ηλικίας. Κατά την εξέλιξη της νόσου, άνοια αναπτύσσεται έως και στο 80% των ασθενών κυρίως στους ασθενείς με διάρκεια νόσου 15-20 χρόνια.⁽⁵⁾

Βασικό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό που απαντάται στην συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με PD είναι η παρουσία των σωματίων Lewy, που αποτελούν ενδοκυττάρια έγκλειστα με πάνω από 300 πρωτεΐνες, με την α-συνουκλεΐνη να είναι κυρίαρχη.⁽⁶⁾ Οι Braak et al. πρότειναν ένα διαδοχικό μοντέλο σχηματισμού σωματίων Lewy και επομένως εναπόθεσης της α-συνουκλεΐνης, σύμφωνα με το οποίο η έναρξη πιθανολογείται αρχικά στους πρόσθιους οσφρητικούς πυρήνες και στο κατώτερο τμήμα του στελέχους, με μια ανιούσα πορεία προς το στέλεχος, τον υπομέλαν τόπο, το συμπαγές τμήμα της μέλαινας ουσίας και κατόπιν τον θάλαμο και τον εγκεφαλικό φλοιό.⁽⁷⁾ Οι διαδικασίες με τις οποίες προκύπτει η παθολογία των σωματίων Lewy και ο ρόλος τους στη νευροεκφύλιση παραμένουν πεδίο συνεχούς έρευνας. Επικρατέστερη υπόθεση αποτελεί ότι η οδός της ενδοεγκεφαλικής συσσώρευσης της α-συνουκλεΐνης αρχίζει με τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων μονομερών, τα οποία σχηματίζουν πρώιμα αναδιπλωμένα ενδιάμεσα συσσωματώματα και σε μεταγενέστερα στάδια ολιγομερή, πρωτοϊνίδια και, τελικά, ώριμα ινίδια.⁽⁸⁾ Η συσσώρευση των ινιδιακών σχηματισμών στα σωματίνα Lewy φαίνεται να είναι

τοξική για το κύτταρο, διαταράσσοντας τη διαπερατότητα των μεμβρανών και παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της αυτοφαγίας και της μιτοχονδριακής λειτουργίας.⁽⁹⁾

Παθολογοανατομικά, διαπιστώνεται εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων με παρουσία σωματίων Lewy, κατά κύριο λόγο στο συμπαγές τμήμα της μέλαινας ουσίας (SNpc), καθώς και στους πυρήνες του στελέχους, στον μετωπιαίο φλοιό, στον έσω κροταφικό λοβό και στο μεταιχμιακό σύστημα. Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο SNpc έχει ως επακόλουθο τη σταδιακή απονεύρωση του ραβδωτού σώματος. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας καθώς και άλλων κυττάρων οδηγούνται σε απόπτωση λόγω συνδυασμού παραγόντων, όπως: γενετική ευπάθεια (π.χ. παθολογική αναδίπλωση α-συνουκλεΐνης), οξειδωτικό stress, δυσλειτουργία πρωτεασώματος, δυσλειτουργία κινασών, καθώς και λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων. Η έλλειψη ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα έχει ως κλινικό επακόλουθο τα κινητικά συμπτώματα της PD. Υποστηρίζεται ότι κατά την έναρξη των κινητικών συμπτωμάτων και της διάγνωσης της νόσου PD, οι νευρώνες ντοπαμίνης στο SNpc είναι ήδη μειωμένοι έως και 60%.⁽¹⁰⁾

Οι οικογενείς μορφές της PD αποτελούν περίπου το 5-10% των περιπτώσεων.⁽¹¹⁾ Πάνω από 20 γονίδια έχουν συσχετιστεί με τη νόσο και ακολουθούν αυτοσωματικό επικρατή ή αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο μεταβίβασης.

Τα κυριότερα γονίδια που κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό επικρατή τρόπο μεταβίβασης είναι:

1. το γονίδιο *SNCA*, που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη, την πρωτεΐνη που ανιχνεύεται σε αφθονία στα σωματίνα Lewy. Οι παραλλαγές στο γονίδιο *SNCA* οδηγούν σε μη φυσιολογική έκφραση της α-συνουκλεΐνης και ενδοκυττάρια συσσώρευση αυτής με τοξικό αποτέλεσμα για το κύτταρο κυρίως σε συναπτικό επίπεδο και σε επίπεδο λυσοσωμικής/ενδοσωμικής μεταφοράς.^(12,13) Οι παθογόνες αυτές παραλλαγές είναι συνήθως σημειακές αλλά έχουν αναφερθεί και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων όπως διπλασιασμός ή τριπλασιασμός ολόκληρου του γονιδίου.⁽¹¹⁾ Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη δύο ιδρυτικών παραλλαγών του γονιδίου *SNCA* στον ελληνικό πληθυσμό. Η πρώτη αφορά σημειακή παραλλαγή p.A53T στο εξόνιο 4 του γονιδίου, η οποία χαρακτηρίζεται από πρόωμη έναρξη της νόσου (<60 έτη), παρουσία άνοιας, μεγάλη διεισδυτικότητα και κλινική ετερογένεια και αποτελεί την πιο συχνή γενετική αιτία της PD στην Ελλάδα.⁽¹⁴⁾ Η δεύτερη αφορά στη σημειακή παραλλαγή p.A30G και φαίνεται να αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία οικογενούς PD στη χώρα μας. Η

τελευταία χαρακτηρίζεται από μειωμένη διεισδυτικότητα, οι ασθενείς παρουσιάζουν ποικίλη ηλικία έναρξης, γνωσιακή έκπτωση, RBD και ψυχιατρικές διαταραχές.⁽¹⁵⁾

2. το γονίδιο *LRK2* (Leucine rich repeat kinase-2), που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δαρδαρίνη, μια κυτοσολική κινάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες αυτοφαγίας. Η πιο συχνή σημειακή παραλλαγή του γονιδίου είναι η p.Gly2019Ser στο εξόνιο 41. Η συχνότητα της σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό είναι 1%-7% στον Ευρωπαϊκό, 30% στον Εβραϊκό (Ashkenazi) και 40% στον Αραβικό πληθυσμό (Berbers). Παρουσιάζει περιορισμένη διεισδυτικότητα και κλινικά εμφανίζεται ως όψιμης έναρξης PD.⁽¹⁶⁾
3. το γονίδιο *GBA1*, που κωδικοποιεί το λυσοσωμικό ένζυμο γλυκοσερεμπροσιδάση (GCase). Οι ομόζυγες παραλλαγές στο *GBA1* προκαλούν τη νόσο Gaucher (GD), μια σπάνια αυτοσωματική υπολειπόμενη νόσο, που χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση σφιγγολιπιδίων σε όργανα-στόχους. Άτομα που είναι ετεροζυγότες για παθολογικό παραλλαγή στο *GBA1*, θεωρείται ότι έχουν γενετικό παράγοντα κινδύνου (προδιάθεση) για εμφάνιση PD 5-30 φορές μεγαλύτερη από τον φυσιολογικό πληθυσμό, ανάλογα με την ηλικία και την εθνικότητα. ⁽¹⁴⁾

Τα κυριότερα γονίδια που κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο είναι:

1. το γονίδιο *Parkin*, που κωδικοποιεί την παρκίνη, η οποία δρα ως E3 λιγάση προσθέτοντας αλυσίδες ουβικουΐνης σε κυτταρικές πρωτεΐνες προετοιμάζοντας έτσι τη διάσπαση του από το σύστημα πρωτεασώματος ουβικουΐνης. Το *Parkin* είναι το δεύτερο μεγαλύτερο γονίδιο (1,53 Mb) και έχουν ανιχνευθεί σε αυτό πάνω από 800 παραλλαγές. Πιο συχνή παραλλαγή αποτελεί η έλλειψη του εξονίου 3. Παραλλαγές του γονιδίου *PRKN*, αποτελούν την πιο συχνή αιτία (50%) της υπολειπόμενης μορφής της PD, η οποία χαρακτηρίζεται από πρώιμη έναρξη με βραδεία εξέλιξη. Παθολογοανατομικά χαρακτηρίζεται από απουσία σωματίων Lewy. ⁽¹⁴⁾
2. το γονίδιο *PINK1* [(PTEN)-induced putative kinase 1] που κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή κινάση. Έχουν ανιχνευθεί >60 παραλλαγές στο γονίδιο *PINK1* με πιο συχνή παραλλαγή να αναφέρεται η p.Leu347Pro. Παραλλαγές στο γονίδιο *PINK1* συναντώνται σε ποσοστό 1%-7% σε ασθενείς με υπολειπόμενη μορφή της PD. Η πρωτεϊνική κινάση του *PINK1* φαίνεται ότι δρα συνεργικά με την παρκίνη σε

μονοπάτι που σχετίζεται με την αποδόμηση των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων. Οι ασθενείς παρουσιάζουν πρώιμη έναρξη κινητικών συμπτωμάτων με βραδεία εξέλιξη.⁽¹⁴⁾

3. το γονίδιο *ATP13A2*, που κωδικοποιεί μια λυσοσωμική ATPάση. Μεταλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο επηρεάζουν τον μεταβολισμό της α-συνουκλείνης με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευση αυτής με τοξικό αποτέλεσμα για το κύτταρο κυρίως σε επίπεδο λυσοσωμικής/ενδοσωμικής μεταφοράς. Κλινικά εκδηλώνεται με την εμφάνιση νεανικού παρκινσονισμού (όπως στο σύνδρομο Kufor-Rabek), καθώς επίσης και με σπαστικότητα, νοητική έκπτωση αλλά και υπερπυρηνική οφθαλμική παράλυση. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλαγές στο γονίδιο *ATP13A2* έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση της νευροεκφυλιστικής διαταραχής κερουιδούς λιποφουσκίνωσης, σε ασθενείς με παρκινσονισμό.⁽¹⁷⁾ Από τις πρώτες παραλλαγές που έχουν ανιχνευτεί στο συγκεκριμένο γονίδιο περιλαμβάνουν τη c.1306+5G>A στο εξόνιο 13, και τη 3057delC/1019GfsX1021 στο εξόνιο 26.⁽¹⁸⁾ Σε σποραδικές μορφές πρώιμης έναρξης PD, έχουν ανιχνευτεί οι παραλλαγές p.Gly504Arg (σε ασθενή από τη Βραζιλία), καθώς και οι p.Thr12Met και p.Gly533Arg (σε ασθενείς από την Ιταλία).⁽¹⁹⁾
4. το γονίδιο *DJ-1*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DJ-1, μια κινάση των μιτοχονδρίων. Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη συναντάται στα μιτοχόνδρια και φαίνεται ότι δρα προστατευτικά σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, ενισχύοντας την πιθανή σχέση μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και PD. Παραλλαγές στο γονίδιο *DJ-1* συναντώνται σε ποσοστό 1% σε ασθενείς με υπολειπόμενη μορφή της PD. Έως και σήμερα έχουν ανιχνευτεί >10 παραλλαγές. Οι ασθενείς παρουσιάζουν παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με την *PINK1*.⁽¹⁴⁾

2. ΑΤΥΠΑ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Πρόκειται για νευροεκφυλιστικά νοσήματα, στα οποία εμφανίζεται παρκινονισμός σε συνδυασμό με άλλες νευρολογικές εκδηλώσεις που υποδηλώνουν την πιο εκτεταμένη προσβολή του νευρικού συστήματος. Τα νοσήματα αυτά δεν έχουν ικανοποιητική ανταπόκριση στην θεραπεία υποκατάστασης με ντοπαμινομιμητικά φάρμακα και δεν έχουν καλή πρόγνωση. Άλλες ονομασίες για τα σύνδρομα αυτά είναι «Επταυξημένα Παρκινσονικά Σύνδρομα», ή «Parkinson-plus». Οι επιμέρους κλινικές οντότητες είναι η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (MSA), η Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση (PSP), το Φλοϊοβασικό Σύνδρομο (CBS) και η Άνοια με σωματία Lewy (DLB).⁽²⁰⁾

1. Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (MSA)

Πρόκειται για μια σποραδική νευροεκφυλιστική πάθηση, η οποία χαρακτηρίζεται από παρκινονισμό και δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας και του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Η μέση ηλικία έναρξης είναι περίπου τα 50 έτη, μικρότερη από την αντίστοιχη του PD. Ο κλινικός φαινότυπος μπορεί να ταξινομηθεί δύο ευρείες κατηγορίες : την ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων με έκδηλο παρκινονισμό κατά την έναρξη (MSA-P) και την ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων με έκδηλη παρεγκεφαλιδική σημειολογία κατά την έναρξη (MSA-C). Παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό της είναι η παρουσία εγκλείστων με θετική χρώση για α-συνουκλείνη σε ποικίλες περιοχές του εγκεφάλου (σωμάτια Lewy). Το κλινικό φάσμα της νόσου εξαρτάται από την εντόπιση και την συγκέντρωση των σωματίων Lewy στην μέλαινα ουσία, στο κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα, στο στέλεχος και στην παρεγκεφαλίδα.⁽²⁰⁾

Οι οικογενείς μορφές της MSA είναι σπάνιες και στη βιβλιογραφία περιγράφονται παραλλαγές σε γονίδια όπως *SNCA*, *LRRK2*, *GBA1*, *COQ2*, *MAPT* και *C9ORF72*.⁽²¹⁾

2. Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση (PSP)

Πρόκειται για σποραδική νευροεκφυλιστική νόσο που εκδηλώνεται σε άτομα ηλικίας 60-70 ετών και έχει ταχύτερη εξέλιξη συγκριτικά με την PD. Κλινικά χαρακτηρίζεται από ακινητική-δύσκαμπτη μορφή παρκινονισμού, έντονη κορμική αστάθεια με συχνές πτώσεις, ψευδοπρομηκική δυσαρθρία, και διαταραχές στην οφθαλμοκινητικότητα με περιορισμό αρχικά της προς τα κάτω στροφής των

οφθαλμών, στη συνέχεια και της προς τα άνω και στην πορεία και της οριζόντιας στροφής, ενώ συχνά παρατηρούνται νοητικές διαταραχές και άνοια. Παθολογοανατομικά, χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση παθολογικής πρωτεΐνης tau (που χαρακτηρίζεται από 4 επαναλαμβανόμενες περιοχές – 4R) και συνοδό εκφύλιση του στελέχους, των βασικών γαγγλίων και της παρεγκεφαλίδας.⁽²⁰⁾

Πάνω από 10 γονίδια έχουν αναφερθεί ότι πιθανά συσχετίζονται με σποραδικές ή οικογενείς μορφές PSP. Από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study-GWAS) έχει αποδειχθεί ότι παραλλαγές στο γονίδιο *MAPT* σχετίζονται σημαντικά με σποραδικές μορφές PSP. Στις οικογενείς μορφές PSP, η συχνότερη γενετική αιτία είναι μεταλλαγές στο γονίδιο *MAPT*, και πιο σπάνια στα γονίδια *LRRK2* και *DCTN1*. Τέλος, παραλλαγές ή πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με PSP-φαινότυπο αφορούν τα γονίδια *NPC1*, *C9ORF72*, *Parkin*, *TARDBP*, *GRN* και *TBK1*.⁽²²⁾

3. Φλοιόβασικό Σύνδρομο (CBS)

Πρόκειται για μια σποραδική νευροεκφυλιστική νόσο που εκδηλώνεται σε άτομα ηλικίας 60-70 ετών. Κλινικά χαρακτηρίζεται, σε άλλοτε διαφορετικό βαθμό, από ασύμμετρη προοδευτική απραξία, δυσκαμψία, δυστονία, βραδυκινησία, μυοκλονίες και φλοιώδους τύπου διαταραχή αισθητικότητας. Χαρακτηριστικό είναι το φαινόμενο «ξένου άκρου», κατά το οποίο παρατηρούνται ακούσιες κινήσεις του άνω άκρου. Όσον αφορά την υποκείμενη παθολογία, σημαντικός αριθμός ασθενών εμφανίζει μετωποκροταφική άνοια ή προϊούσα αφασία. Το φλοιόβασικό σύνδρομο αποτελεί μια εστιακή εκφυλιστική διεργασία με ασύμμετρη παθολογοανατομική εικόνα και μειωμένο όγκο εγκεφάλου στις βρεγματικές και μετωπιαίες περιοχές. Παθολογοανατομικά, πρόκειται για μια tau-πάθεια, με εναπόθεση νευροϊνιδιακών δικτύων και συνοδό εκφύλιση των προαναφερόμενων περιοχών.⁽²⁰⁾

Το 2021, οι Arienti et al. κάνοντας μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με γενετικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις CBS, κατέληξαν ότι συνολικά έχουν περιγραφεί 58 περιπτώσεις CBS, με παραλλαγές που αφορούσαν στην πλειοψηφία το *GRN* γονίδιο (28 στις 58 περιπτώσεις), και σε μικρότερο ποσοστό τα γονίδια *MAPT*, *C9ORF72*, και *PRNP*. Ασθενείς με CBS που οφείλονται σε παραλλαγές στο γονίδιο *GRN*, παρουσίαζαν σε σημαντικό βαθμό οπτικοχωρικές διαταραχές, διαταραχές συμπεριφοράς, αφασία και διαταραχές λόγου.⁽²³⁾

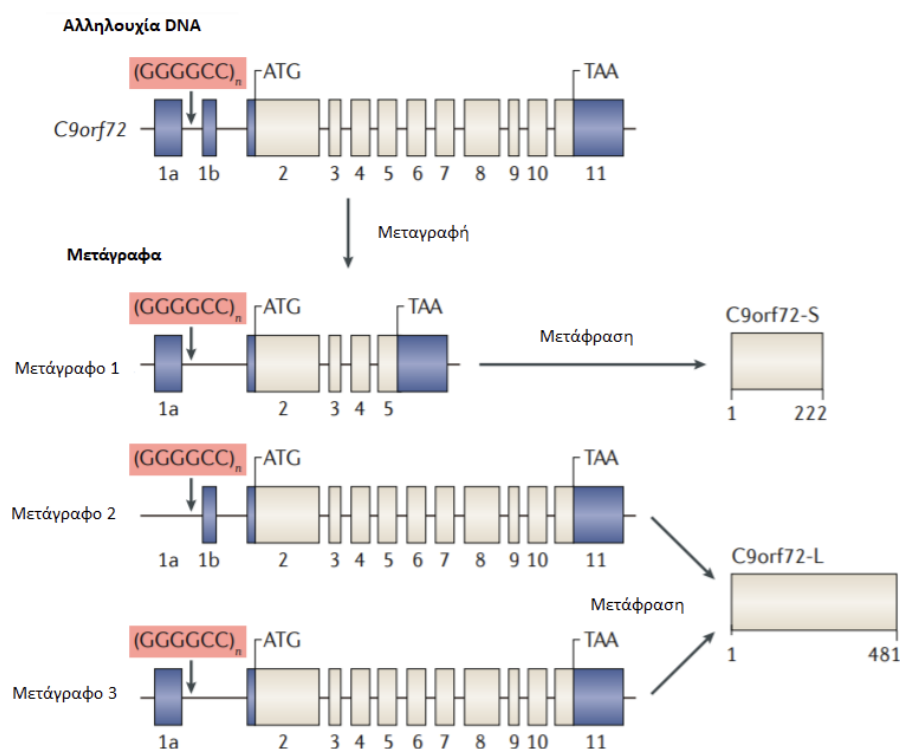
4. Άνοια με σωματίδια Lewy (DLB)

Η άνοια με σωματίδια Lewy (DLB) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση παθολογικών πρωτεϊνικών εναποθέσεων, των σωματίων Lewy, στον εγκέφαλο. Τα σωματίδια Lewy, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελούνται κυρίως από α-συνουκλεΐνη και εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου του φλοιού, της μέλαινας ουσίας και του μεταιχμιακού συστήματος. Η DLB παρουσιάζει ένα κλινικό φάσμα συμπτωμάτων που περιλαμβάνει γνωστικές, κινητικές και ψυχιατρικές διαταραχές, καθιστώντας συχνά δύσκολη τη διάγνωση. Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της DLB είναι τα κυμαινόμενα γνωστικά συμπτώματα, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν διαταραχές της προσοχής, της εκτελεστικής λειτουργίας και των οπτικοχωρικών ικανοτήτων. Οι ασθενείς μπορεί να βιώνουν περιόδους σχετικής διαύγειας που διαδέχονται επεισόδια σύγχυσης και αποπροσανατολισμού. Επιπλέον, οι οπτικές ψευδαισθήσεις αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της LBD και μπορεί να προηγούνται της γνωστικής έκπτωσης. Τα κινητικά συμπτώματα στην DLB μοιάζουν με εκείνα που παρατηρούνται στη PD, συμπεριλαμβανομένης της βραδυκινησίας, της ακαμψίας και του τρόμου. Ωστόσο, στην DLB, τα συμπτώματα αυτά μπορεί να ανταποκρίνονται λιγότερο στη ντοπαμινεργική θεραπεία. Επιπλέον, οι ασθενείς με DLB εμφανίζουν συχνά διαταραχή της συμπεριφοράς στη φάση REM του ύπνου (RBD), η οποία μπορεί να προηγείται της εμφάνισης άλλων συμπτωμάτων της DLB κατά αρκετά έτη.⁽²⁴⁾

Τα κυριότερο γονίδιο που εμπλέκεται στην εμφάνιση DLB είναι το γονίδιο *SNCA* και οι σημειακές παραλλαγές, p.Ala53Thr και p.Glu46Lys ήταν οι πρώτες που περιγράφηκαν σε οικογένειες με κλινικό φαινότυπο DLB. Επίσης, το αλληλόμορφο *ε4* που προκύπτει από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) στο γονίδιο *APOE* είναι τεκμηριωμένο ότι εκτός του ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου Alzheimer, αποτελεί και παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη DLB. Τέλος, παραλλαγές στο γονίδιο *GBA1*, και ιδιαίτερα η p.Glu365Lys, θεωρείται ότι αποτελούν γενετικό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση DLB, και τα άτομα που τις φέρουν έχουν 8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης DLB από τον φυσιολογικό πληθυσμό.⁽²⁵⁾

3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ C9ORF72

Το γονίδιο *C9ORF72* εδράζεται στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9 (9p) και συγκεκριμένα στη θέση 21.2 και αποτελείται από 11 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν 3 μετάγραφα και 2 πρωτεϊνικές ισομορφές (Εικόνα 1). Στο γονίδιο *C9ORF72*, η εξανουκλεοτιδική επανάληψη GGGGCC εντοπίζεται μεταξύ των εξονίων 1a και 1b, και κατά τη φάση της μεταγραφής η εξανουκλεοτιδική επανάληψη GGGGCC εντοπίζεται μεταξύ των εξονίων 1a και 1b στα μετάγραφα 1 και 3 και στη θέση του υποκινητή στο μετάγραφο 2. Κατά την μετάφραση, από το μετάγραφο 1 προκύπτει η βραχεία πρωτεϊνική ισομορφή C9ORF72-S (222 αμινοξέα), και από τα μετάγραφα 2 και 3 η μακρύτερη πρωτεϊνική ισομορφή C9ORF72-L (481 αμινοξέα).⁽²⁶⁾

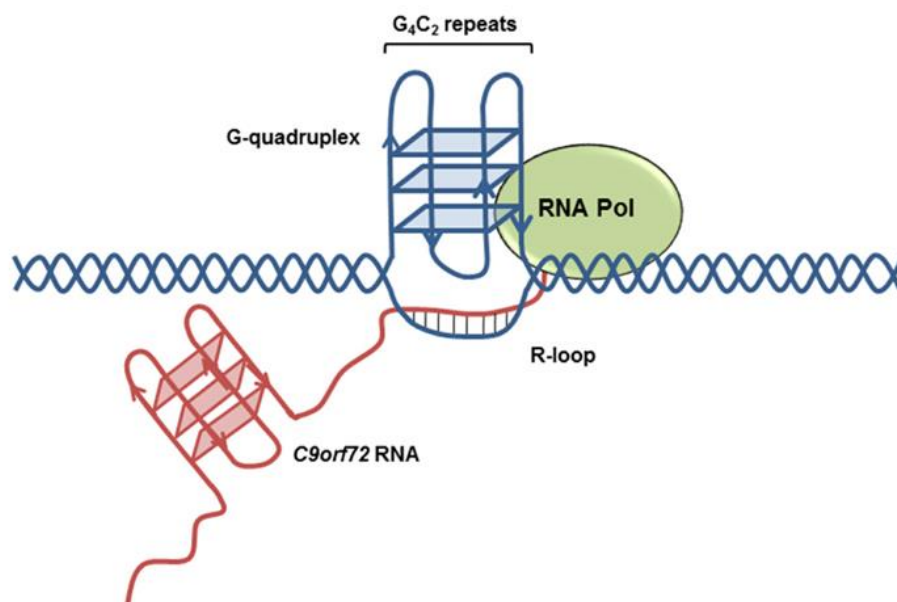


Εικόνα 1: Τοπολογία γονιδίου C9ORF72 (Πηγή: Balendra and Isaacs 2018)

Και οι δύο πρωτεϊνικές ισομορφές εκφράζονται σε διάφορα όργανα (όπως πνεύμονες, καρδιά, ήπαρ) καθώς και σε μεγάλες ποσότητες στον εγκέφαλο, στον οποίο βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στις συνάψεις των νευρώνων. Ο βιολογικός ρόλος του πρωτεϊνικού προϊόντος του γονιδίου δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.⁽²⁷⁾ Μία από τις κυριότερες υποθέσεις όσον αφορά τη λειτουργία του είναι ότι συμμετέχει σε διαδικασίες ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης (μέσω του Rab πρωτεϊνικού συστήματος) καθώς και σε διαδικασίες αυτοφαγίας.⁽²⁸⁾

Έχει αποδειχθεί ότι τα τετραμερή γουανίνης στις επαναλήψεις του γονιδίου *C9ORF72* σχηματίζουν σταθερές δευτεροταγείς δομές (G-quadruplex), μέσω δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των βάσεων. Η επίδραση αυτών των τετραμερών γουανίνης σε διάφορες διεργασίες των κυττάρων αφορά το εναλλακτικό μάτισμα (splicing), τη μετάφραση και την αποδόμηση του RNA καθώς και τη σταθερότητα των τελομερών.⁽²⁹⁾ Επιπρόσθετα, το γονίδιο *C9ORF72*, κατά τη φάση της μεταγραφής του μπορεί να δημιουργήσει και μια άλλη επίσης πολύ σταθερή δευτεροταγή δομή, τις R-loops. Οι R-loops είναι αποτέλεσμα υβριδοποίησης του μορίου RNA με μία από τις έλικες του DNA, με την οποία είναι συμπληρωματικό. Οι R-loops εμποδίζουν την μεταγραφή του γονιδίου και κατ' επέκταση την μετάφρασή του. Στην εικόνα 2 απεικονίζονται σχηματικά οι παραπάνω δομές.^(30,31)

Αυτές οι δομές μπορούν είτε να προσελκύσουν πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA και ευνοούν την μετάφρασή του (RNA gain of function) ή/και να προκαλούν εμπόδιο στην έκφραση του γονιδίου (loss of function), μηχανισμοί που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια των νοσημάτων που προκύπτουν από μεταλλαγή του *C9ORF72* γονιδίου.⁽³²⁾



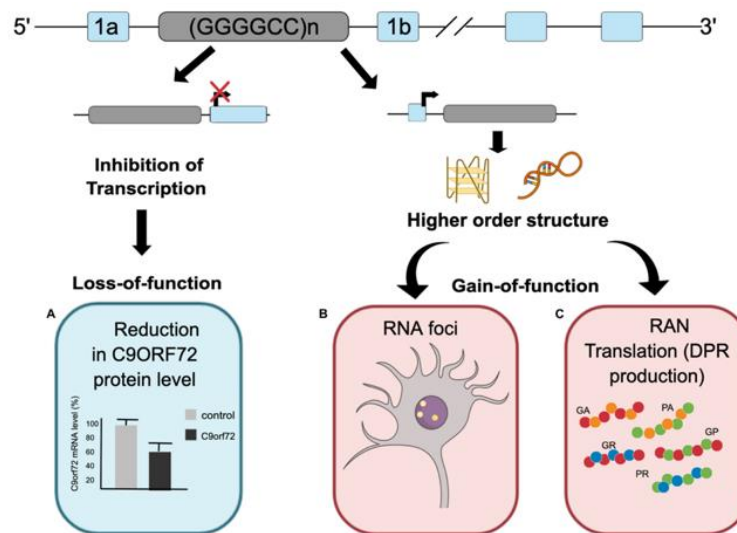
Εικόνα 2: Μετάγραφο του γονιδίου *C9ORF72* – Δευτεροταγείς δομές
(Πηγή: Holly V. Barker, 2017)

Ο αριθμός των επαναλήψεων της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας GGGGCC στο γονίδιο *C9ORF72* στον φυσιολογικό πληθυσμό κυμαίνεται από 2 έως 23 επαναλήψεις. Τα νοσήματα που προκύπτουν από παραλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο ανήκουν στην κατηγορία των δυναμικών παραλλαγών, που αφορούν επέκταση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, οι οποίες όταν ξεπεράσουν ένα κατώφλι, καθίστανται νοσογόνες για το άτομο που τις φέρει. Για το γονίδιο *C9ORF72*, παθολογικός θεωρείται ο αριθμός επαναλήψεων >30 ή >60 σύμφωνα με νεότερες μελέτες.⁽³³⁾ Ο αριθμός των ενδιάμεσων επαναλήψεων (γκρίζα ζώνη) ανευρίσκεται σπάνια στον γενικό πληθυσμό και έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης παρκινσονισμού.⁽³⁴⁾

Γενικά, στις δυναμικές παραλλαγές, η επέκταση δημιουργείται όταν κατά την αντιγραφή ή κυρίως κατά την επιδιόρθωση του DNA, προκύπτουν δομές τύπου φουρκέτας ή λούπας (looped intermediates), που σταθεροποιούνται καθώς δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ αντιπαραβαλλόμενων συμπληρωματικών βάσεων. Λόγω αυτής της σταθεροποίησης, δεν μπορούν να αποκοπούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA. Το αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η μία από τις αλυσίδες του μητρικού DNA στην οποία έχει δημιουργηθεί αυτή η λούπα, που περιέχει την νουκλεοτιδική επανάληψη, να έχει μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων σε σχέση με την άλλη αλυσίδα, κι έτσι στον επόμενο κύκλο αντιγραφής, η πρώτη αλυσίδα θα λειτουργήσει ως μητρική για τη δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων σε σχέση με την άλλη αλυσίδα.

Η επέκταση των δυναμικών παραλλαγών πραγματοποιείται τόσο στα γαμετικά όσο και στα σωματικά κύτταρα. Η επέκταση στα γαμετικά κύτταρα οδηγεί σε μεταβίβαση στην επόμενη γενιά και στο φαινόμενο της επίσπευσης, που χαρακτηρίζεται από εμφάνιση της νόσου στους απογόνους σε μικρότερη ηλικία και με βαρύτερη κλινική εικόνα.⁽³⁵⁾ Η επέκταση στα σωματικά κύτταρα οδηγεί σε μωσαϊκισμό, δηλαδή διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων στα διάφορα κύτταρα του ατόμου. Ο σωματικός μωσαϊκισμός ενδέχεται να εξηγήσει τη φαινοτυπική ετερογένεια σε άτομα με τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων.⁽³³⁾

Παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72* μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση νόσου μέσω δύο μηχανισμών: 1) απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) και 2) νέας τοξικής λειτουργίας σε επίπεδο RNA ή πρωτεΐνης (RNA or protein gain-of-function) (Εικόνα 3)⁽³⁶⁾



Εικόνα 3: Παθογενετικοί μηχανισμοί του γονιδίου *C9ORF72* (Πηγή: Schmitz A et al., 2021)

Στην πρώτη περίπτωση, έχουμε μείωση της έκφρασης του γονιδίου, λόγω παρεμπόδισης στην μεταγραφή του γονιδίου (φαινόμενο απλοδιπλοειδίας). Έχει βρεθεί ότι η παρεμπόδιση μπορεί να οφείλεται σε μεθυλίωση του DNA στην περιοχή της εξανουκλεοτιδικής επανάληψης.^(33, 37,38) Επιπρόσθετα, τα τετραμερή γουανίνης σε επίπεδο DNA και οι R-loops, που έχουν αναφερθεί παραπάνω, μπορεί να καθιστούν δυσπρόσιτο το γονίδιο για τη μεταγραφή του. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων RNA στο εσωτερικό του κυττάρου. Η δημιουργία εστιών RNA (RNA foci) ενδοκυττάρια είναι τοξική για το κύτταρο, παρεμποδίζοντας ζωτικές βιολογικές λειτουργίες του. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η παθολογική επέκταση του *C9ORF72* μειώνει την έκφραση του μεταγράψου 2.⁽³⁹⁾ Σε επίπεδο πρωτεΐνης, μπορεί να έχουμε συσσώρευση πρωτεϊνικών διπεπτιδίων ενδοκυττάρια. Στην περίπτωση της εξανουκλεοτιδικής επανάληψη στο γονίδιο *C9ORF72* έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές προκύπτουν μέσω RAN μετάφρασης (Repeat-Associated Non-ATG translation). Η RAN μετάφραση, πραγματοποιείται σε περιοχές χωρίς κωδικόνιο έναρξης, όπως στην συγκεκριμένη περίπτωση που η εξανουκλεοτιδική επανάληψη βρίσκεται σε εσόνιο. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση των πρωτεϊνών αυτών στο εσωτερικό του κυττάρου, προκαλώντας τοξικότητα.⁽⁴⁰⁾

4. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *C9ORF72*

Τα νοσήματα που προκύπτουν από την επέκταση του γονιδίου *C9ORF72* χαρακτηρίζονται από αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας, με σημαντική κλινική ετερογένεια, ατελή διεισδυτικότητα καθώς και φαινόμενο επίσπευσης, σε μικρότερο βαθμό όμως σε σχέση με άλλες δυναμικές μεταλλαγές.⁽³³⁾ Παρακάτω αναλύονται νευροεκφυλιστικές παθήσεις, οι οποίες οφείλονται σε επέκταση της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο γονίδιο *C9ORF72*.

1. Πλαγία μυατροφική σκλήρυνση (ALS)

Η Πλαγία μυατροφική σκλήρυνση (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από εκφύλιση των περιφερικών κινητικών νευρώνων (τα κύτταρα των προσθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού και των κυττάρων του εγκεφαλικού στελέχους που νευρώνουν τους προμηκικούς μύες) αλλά και των φλοιονωτιαίων κινητικών νευρώνων (που βρίσκονται στην στιβάδα 5 του κινητικού φλοιού και μέσω της πυραμιδικής οδού συνάπτονται με τους περιφερικούς κινητικούς νευρώνες). Η απώλεια των περιφερικών κινητικών νευρώνων του στελέχους και του νωτιαίου μυελού οδηγεί σε απονεύρωση (κλινικά εκδηλώνεται με δεσμιδώσεις) και ατροφία των μυών αυτών, ενώ η απώλεια των φλοιϊκών κινητικών νευρώνων οδηγεί σε εκφύλιση του φλοιονωτιαίου δερματίου και προκαλεί εικόνα σπαστικότητας, με μυϊκή αδυναμία, αυξημένα εν τω βάθει τενόντια αντανακλαστικά και αυξημένο μυϊκό τόνο. Στην πλειοψηφία των ασθενών, η νόσος παρουσιάζει ταχεία εξέλιξη, και στα τελικά στάδια έχουμε προσβολή τόσο του ανώτερου όσο και του κατώτερου κινητικού νευρώνα. Παθολογοανατομικά, παρατηρείται συσσώρευση της πρωτεΐνης TDP-43 στο κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων νευρώνων.⁽⁴¹⁾

Περίπου το 90% των περιπτώσεων αφορούν σποραδικές μορφές (sporadic ALS, sALS), ενώ περίπου μόνο 5-10% έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό (familial ALS, fALS).⁽⁴²⁾ Σχετικά με τις οικογενείς μορφές ALS, περίπου στο 30% σχετίζονται με παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72*, στο 20% με παραλλαγές στο γονίδιο *SOD1* και πιο σπάνια (4-5%) με παραλλαγές στα γονίδια *TARDBP* και *FUS*. Πιο συγκεκριμένα για την Ελλάδα, σε μελέτη της Μονάδας Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, εντοπίστηκε μεταλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* σε 50% των οικογενών και σε 8% των σποραδικών μορφών

ALS. ^(43,44) Όσον αφορά τον φαινότυπο, ασθενείς με ALS και παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72* έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν την προμηκική μορφή της νόσου, παρουσιάζουν πρώιμη έναρξη και ταχύτερη εξέλιξη της νόσου, μπορεί να εκδηλώσουν πιο συχνά ψυχιατρικά συμπτώματα ή συμπτώματα μετωποκροταφικής άνοιας ή να έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό για μετωποκροταφική άνοια.⁽⁴⁵⁾

2. Μετωποκροταφική άνοια (FTD)

Η Μετωποκροταφική Άνοια (Frontotemporal Dementia, FTD) αποτελεί τη συχνότερη αιτία άνοιας σε ασθενείς ηλικίας <60 ετών. Αποτελεί έναν όρο «ομπρέλα», περιγράφοντας νευροεκφυλιστικές διαταραχές με κύρια κλινικά χαρακτηριστικά την νοητική έκπτωση, την μεταβολή συμπεριφοράς/προσωπικότητας και τις διαταραχές του λόγου, που οφείλονται σε ατροφία του μετωπιαίου και κροταφικού λοβού του εγκεφάλου. Ο όρος FTD περιλαμβάνει: 1) τη συμπεριφορική παραλλαγή FTD (behavioral variant, bvFTD), στην οποία οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχή συμπεριφοράς, όπως απάθεια, απόσυρση, άρση αναστολών, στερεοτυπική συμπεριφορά (mannerism), έλλειψη εναισθησίας, ενώ παρουσιάζουν ήπιες διαταραχές λόγου, όπως ηχολαλία, 2) την προοδευτική μη-ρέουσα αφασία (Progressive non-fluent aphasia, PNFA), στην οποία ο ασθενής παρουσιάζει αγραμματισμό, παραφασίες, δυσκολία στις σύνταξη, επηρεασμένη ροή λόγου και απραξία λόγου, 3) τη σημασιολογική άνοια (Semantic dementia, SD), στην οποία ο ασθενής παρουσιάζει απώλεια της σημασίας των λέξεων και των εννοιών, δυσκολία στην εύρεση λέξεων και στην κατονομασία, ενώ παρατηρούνται σημασιολογικές παραφασίες. Κινητικά σύνδρομα που μπορεί να συνυπάρχουν είναι η ALS, η προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση (Progressive supranuclear palsy, PSP) και το φλοϊοβασικό σύνδρομο (Corticobasal syndrome, CBS). Παθολογοανατομικά, στην PNFA παρατηρούνται έγκλειστα με παθολογική πρωτεΐνη tau, στην SD παρατηρούνται έγκλειστα με θετική χρώση για TDP-43, ενώ στην bvFTD παρατηρούνται έγκλειστα με παθολογική πρωτεΐνη tau, TDP-43 ή FUS.^(46,47)

Οι οικογενείς μορφές αφορούν κυρίως τη bvFTD, στην οποία ανευρίσκεται θετικό οικογενειακό ιστορικό στο 30-50% των περιπτώσεων. Περίπου το 50% των οικογενών μορφών της νόσου και 3-6% των σποραδικών μορφών οφείλονται: 1) στο γονίδιο της προγκρανουλίνης- *GRN*, το οποίο κληρονομείται με τον

αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο και παρουσιάζει ποικίλη διεισδυτικότητα, 2) στο γονίδιο *MAPT*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tau, το οποίο κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα τρόπο και παρουσιάζει διεισδυτικότητα έως και 95% και 3) στο γονίδιο *C9ORF72*, το οποίο είναι η πιο συχνή γενετική αιτία στην FTD, με συχνότητα 20% στις οικογενείς μορφές FTD και 6% στις σποραδικές μορφές.⁽⁴⁸⁾ Όσον αφορά τον φαινότυπο, ασθενείς με FTD και μεταλλάξεις στο γονίδιο *C9ORF72* παρουσιάζουν πρωιμότερη ηλικία έναρξης συμπτωμάτων καθώς και ψυχιατρικά συμπτώματα, ενώ ο τύπος FTD που συνδέεται συχνότερα με την παραλλαγή είναι ο bvFTD (ποσοστό 50%). Επίσης, παθολογική επέκταση στο γονίδιο *C9ORF72* έχει παρατηρηθεί στο 45% των ασθενών με διάγνωση FTD-ALS.⁽³⁴⁾ Πιο σπάνια, εντοπίζονται τα γονίδια *VCP*, *TARDBP* και *FUS*. Στην Ελλάδα, μελέτη της Μονάδας Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινήτιου Νοσοκομείου, εντόπισε τη παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* σε 8,1% των ασθενών με FTD, εκ των οποίων 25% ήταν οικογενείς και 4% σποραδικές μορφές.⁽⁴⁹⁾

3. Σύνδρομο HD-like

Η νόσος του Huntington (HD) είναι μια νευροεκφυλιστική πάθηση, που κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατικό τρόπο και οφείλεται σε επανάληψη του τρινουκλεοτιδίου CAG στο γονίδιο HTT του χρωμοσώματος 4, ενώ κλινικά χαρακτηρίζεται από την τριάδα: χορεία, άνοια και ψυχιατρικές εκδηλώσεις.⁽⁵⁰⁾ Ο όρος HD-like αναφέρεται σε περιπτώσεις όπου οι ασθενείς έχουν την παραπάνω κλινική εικόνα χωρίς να ανευρίσκεται η συγκεκριμένη επανάληψη.

Η μεταλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* αποτελεί τη συχνότερη γενετική αιτία, και κλινικά οι ασθενείς που τη φέρουν έχουν πρωιμότερη ηλικία έναρξης και εμφανίζουν κινητικές διαταραχές, όπως δυστονία, δυσκαμψία, μυοκλονίες, τρόμος, καθώς και νοητική έκπτωση και ψυχιατρικά συμπτώματα.⁽⁵¹⁾

4. Νόσος Alzheimer (AD)

Η Νόσος Alzheimer (AD) είναι η πιο συχνή αιτία άνοιας στον πληθυσμό >65 ετών και χαρακτηρίζεται ως όψιμης έναρξης, ενώ η εμφάνιση της σε μικρότερες ηλικίες είναι πιο σπάνια (<5%) και χαρακτηρίζεται πρώιμης έναρξης. Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου αποτελούν η προχωρημένη ηλικία και το θετικό οικογενειακό

ιστορικό. Οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχή στη μνήμη, κυρίως της βραχυπρόθεσμης μνήμης, και στη συνέχεια παρουσιάζονται διαταραχή στην ομιλία και στην οπτικοχωρική ικανότητα, ενώ στα προχωρημένα στάδια είναι συχνές και οι παραληρητικές ιδέες. Σταδιακά τα συμπτώματα αρχίζουν να επηρεάζουν τις καθημερινές δραστηριότητες του ατόμου. Παρατηρείται ατροφία του φλοιού με διεύρυνση των αυλάκων και των πλαγίων κοιλιών του εγκεφάλου και ελάττωση του όγκου των ιπποκάμπων. Παθολογοανατομικά, στην AD παρατηρούνται εξωκυττάριας πλάκες β-αμυλοειδούς (Αβ) και ενδοκυτταρικά νευροϊνιδιακά δεμάτια φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau (p-tau) στον ιππόκαμπο, στον κροταφικό λοβό και στο βασικό πυρήνα του Meynert.⁽⁵²⁾

Η πρώιμης έναρξης AD κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατικό τρόπο και τα κυριότερα γενετικά αίτια είναι: 1) παραλλαγές στο γονίδιο *APP* (Amyloid Precursor Protein), το οποίο κωδικοποιεί την πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς και 2) παραλλαγές στα γονίδια *PSEN1* (Presenilin-1) και *PSEN2* (Presenilin-2), που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PSEN1 και PSEN2 που συμμετέχουν στην αποδόμηση του αμυλοειδούς. Όσον αφορά την σποραδική μορφή, παραλλαγές στο γονίδιο *APOE* έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *APOE4* αποτελεί παράγοντα κινδύνου.⁽⁵³⁾ Η συσχέτιση της AD με παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72* είναι υπό διερεύνηση. Υπάρχουν μελέτες^(48,49,50) σε ασθενείς με AD που δεν ανιχνεύθηκαν παραλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο και άλλες^(54,55,56) στις οποίες ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 0,34%-1%. Σε μελέτη στη Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, σε μικρό δείγμα ασθενών με AD, παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72* εντοπίστηκαν στο 2%.⁽⁵⁷⁾

5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως προαναφέρθηκε, τα νοσήματα που προκύπτουν από την επέκταση του γονιδίου *C9ORF72* χαρακτηρίζονται από αυτοσωματικό επικρατητικό τύπο κληρονομικότητας, με σημαντική κλινική ετερογένεια, ατελή διεισδυτικότητα καθώς και φαινόμενο επίσπευσης.⁽³³⁾

Η δυναμική παραλλαγή του γονιδίου *C9ORF72* έχει μελετηθεί σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στη πλαγία μυατροφική σκλήρυνση και την μετωποκροταφική άνοια, καθώς και στα HD-like σύνδρομα, σε σύγκριση με πληθυσμούς με PD και άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα. Για τους Έλληνες ασθενείς με PD, έχει πραγματοποιηθεί μόνο μία μελέτη, η οποία αναφέρει ότι η συχνότητα εμφάνισης της παραλλαγής του γονιδίου *C9ORF72* ανέρχεται σε 1,1%, ενώ στα άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα 0%.⁽⁵⁸⁾

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η περαιτέρω διερεύνηση της συχνότητας της παραλλαγής του γονιδίου *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με PD ή άτυπο παρκινσονισμό καθώς και η συσχέτιση της με το φαινοτυπικό τους προφίλ, προς επιβεβαίωση της βιβλιογραφίας και εμπάθυνσης των γνώσεων μας, με απώτερο σκοπό την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση καθώς και την ολοκληρωμένη γενετική συμβουλευτική.

V) ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης αποτελούν 91 δείγματα DNA ασθενών με PD ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε το DNA 73 ασθενών με PD από βιοτράπεζα από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Στο δείγμα αυτό προστέθηκαν και ασθενείς με PD ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο, και συγκεκριμένα 2 με PD, 15 με CBS και 1 με DLB, από την Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, που συλλέχθηκαν προοδευτικά κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι ασθενείς είχαν είτε ελεύθερο οικογενειακό ιστορικό είτε θετικό οικογενειακό ιστορικό για PD ή/και νοητική έκπτωση. Τα πλήρη κλινικά στοιχεία των ασθενών καταγράφηκαν σε ειδικό έγγραφο και συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Οι ασθενείς της μελέτης προέρχονται από όλα τα μέρη της Ελλάδας και είχαν ενημερωθεί και υπογράψει συγκατάθεση για τη διενέργεια του γενετικού ελέγχου.

	PD	CBS	DLB
Αριθμός ασθενών, n	75	15	1
Φύλο, n (%)			
Άρρεν	47 (63%)	4 (27%)	1 (100%)
Θήλυ	28 (37%)	11 (73%)	
Ηλικία, έτη (median, IQRs)	64 (58-69)	74 (66-76)	65
Ηλικία έναρξης, έτη (median, IQRs)	54 (48-60)	72 (62-73)	64
Νοητική έκπτωση, n (%)	38 (51%)	6 (40%)	1 (100%)
Κληρονομικό ιστορικό, n (%)	21 (28%)	9 (60%)	1 (100%)

Πίνακας 1: Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

a. Πειραματικό σκέλος

Η μεθοδολογία για την ανίχνευση της εξανουκλεοτιδικής (GGGGCC) επέκτασης στο γονίδιο C9ORF72 στους συγκεκριμένους ασθενείς περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια:

1. Απομόνωση και διατήρηση DNA
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Sizing PCR)
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης
4. Οπτικοποίηση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων πηκτώματος αγαρόζης
5. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς των προϊόντων του sizing PCR και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων
6. Μέθοδος RP-PCR
7. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς των προϊόντων του RP-PCR και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

1. Απομόνωση και διατήρηση DNA

Από περιφερικό αίμα του ασθενούς, το οποίο φυλάσσεται σε φιαλίδιο με αντιπηκτικό Na_2EDTA (10% w/v), γίνεται η απομόνωση του DNA από τα λευκοκύτταρα, με τη μέθοδο του Χλωριούχου Νατρίου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιοντική ισχύ του αιμολύματος που προκύπτει, καθώς στις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl το DNA παραμένει διαλυτό, ενώ οι πρωτεΐνες κατακερματίζονται και έτσι είναι εύκολη η απομάκρυνση τους. Στη συνέχεια προστίθεται αιθανόλη, στο διάλυμα της οποίας το DNA παραμένει αδιάλυτο και έτσι απομονώνεται καθαρό DNA χωρίς πρωτεϊνικές προσμίξεις.⁽⁵⁹⁾

Τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- Αντιπηκτικό διάλυμα Na_2EDTA (10% w/v)
- Διάλυμα Tris-EDTA (TE), pH=8.0, 0.5M
- Διάλυμα LYSIS I (16.6g NH_4Cl , 2.0g KHCO_3 , 0.74g EDTA- Na_2 και dH $_2\text{O}$ σε τελικό όγκο 2lt και pH=7.4)
- Διάλυμα LYSIS II (2.42g Tris HCl, 46.4g NaCl, 1.48g EDTA- Na_2 και dH $_2\text{O}$ σε τελικό όγκο 2lt και pH=8.2)
- Διάλυμα NaCl 6M

- Διάλυμα SDS 10%
- Πρωτεΐνάση K (10mg/dl)
- Απόλυτη αιθανόλη
- Αιθανόλη 70%

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το βήμα (διάρκειας 2 ημερών) είναι το ακόλουθο:

1. Λήψη 10ml από περιφερικό αίμα σε σωληνάριο με Na₂EDTA (αντιπηκτικό 2mg/ml αίματος)
2. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 40ml. Ήπια ανακίνηση και κατόπιν παραμονή στους 4°C (πάγος ή στο ψυκτικό θάλαμο) για 30 λεπτά
3. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4°C, για 15 λεπτά
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, και διατήρηση του ιζήματος που προκύπτει
5. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 30ml και ανακίνηση
6. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4°C, για 15 λεπτά
7. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
8. Προσθήκη διαλύματος LYSIS I έως τα 20ml και ανακίνηση
9. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4°C, για 15 λεπτά
10. Απομάκρυνση του υπερκείμενου
11. Προσθήκη διαλύματος LYSIS II έως τα 7,5ml, ανακίνηση και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
12. Προσθήκη 400μl SDS 10% και 200μl πρωτεΐνάσης K
13. Επώαση στους 55°C για όλη τη νύχτα (O/N) σε υδατόλουτρο.
14. Προσθήκη 2ml NaCl και ισχυρή ανακίνηση.
15. Φυγοκέντρηση στις 3600rpm, στους 4°C, για 15 λεπτά
16. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε πλαστικούς σωλήνες 10ml
17. Φυγοκέντρηση στις 8500rpm, στους 4°C, για 10 λεπτά
18. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε σωλήνες των 50ml
19. Προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης
20. Κατακρήμνιση και συλλογή DNA σε γυάλινη πιπέτα με κυκλοτερή κίνηση
21. Έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη (προαιρετικό)
22. Μεταφορά και επαναδιάλυση του DNA, σε σωληνάριο Eppendorf (1,5 ml) με 1ml TE (Tris-EDTA)
23. Ανακίνηση του DNA σε περιστροφικό ανακινητή για 24-48 ώρες

24. Αποθήκευση του DNA στους 4°C για ανάλυση αυθημερόν ή στους -20 °C για μεταγενέστερη ανάλυση

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Sizing PCR)

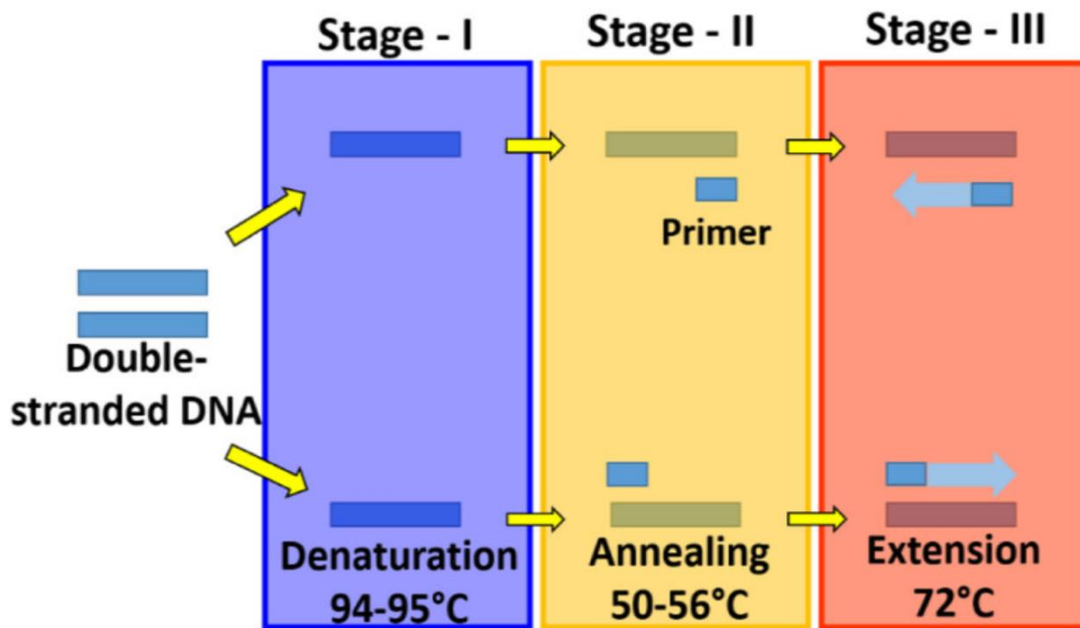
Η αλυσιδωτή αντίδραση DNA-πολυμεράσης (PCR) αποτελεί ενζυμική αντίδραση, στην οποία ενισχύεται μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA μέσω της χρήσης του ενζύμου Taq DNA-πολυμεράσης. Η Taq DNA-πολυμεράση είναι ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο με δραστικότητα πολυμερισμού 5' προς 3'. Το ένζυμο απαιτεί οι αλυσίδες DNA να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή και ένα ολιγονουκλεοτίδιο να χρησιμεύει ως εκκινήτης για την αντιγραφή. Για κάθε αλυσίδα DNA χρησιμοποιούνται μοναδικοί εκκινήτες, που διαθέτουν αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς το ένα άκρο του τμήματος του DNA-στόχου.⁽⁶⁰⁾

Έτσι, παρασκευάζεται ένα μίγμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, διάλυμα MgCl₂, ποσότητα DNA ως μήτρα αντιγραφής, δύο εκκινήτες, δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) για τη σύνθεση των νέων DNA αλυσίδων και DNA πολυμεράση. Το μίγμα τοποθετείται στον «θερμικό κυκλοποιητή», το οποίο είναι ένα μηχανήμα που μεταβάλλει προγραμματισμένα τη θερμοκρασία. Στον πίνακα 2 περιγράφονται τα στάδια για κάθε κύκλο PCR:

Στάδια	Φαινόμενο	Θερμοκρασία
Στάδιο 1	Αποδιάταξη αλυσίδων δίκλωνου DNA και δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων	94° C
Στάδιο 2	Υβριδισμός των εκκινήτων με τις συμπληρωματικές του αλληλουχίες πάνω στο DNA-μήτρα	Ελάττωση θερμοκρασίας (ανάλογα με σημείο τήξης των εκκινήτων)
Στάδιο 3	Πρόσδεση της πολυμεράσης στα σημεία υβριδισμού των εκκινήτων και έναρξη σύνθεσης νέων αλυσίδων DNA με 5' προς 3' πολυμερισμό	72° C

Πίνακας 2: Περιγραφή των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Ο κάθε κύκλος της PCR που αποτελείται από τα παραπάνω 3 στάδια επαναλαμβάνεται πολλές φορές, και έτσι στο τέλος η κύκλων έχουμε στο διάλυμα 2^η μόρια DNA, τα οποία είναι αντίγραφα της αλληλουχίας DNA-στόχου που ορίζουν οι εκκινητές. Συνήθως πραγματοποιούνται 25 με 40 κύκλοι αντιγραφής. στην Εικόνα 4 φαίνονται σχηματικά στα στάδια για κάθε κύκλο PCR.



Εικόνα 4: Σχηματική περιγραφή των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
(Πηγή: Kulkarni et al., 2020)

Τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- ddH₂O
- kit 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix, KK2601, Kapa Biosystems, Roche, που περιλαμβάνει:
 - KAPA HiFi HotStart DNA polymerase
 - Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια dNTP's
 - MgCl₂ (2,5mM σε συγκέντρωση 1x)
 - Σταθεροποιητές
- Γενωμικό DNA (50-200ng/μl)
- Εκκινητές (πρόσθιος και ανάστροφος 10μM)
- Betaine (5M)

- Σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml
- Παραφινέλαιο
- Πιάτο (PCR plate) πολυκαρβονικό των 96 θέσεων

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το βήμα, με συνολικό όγκο αντίδρασης τα 20μl και κατά σειρά προσθήκης σε κάθε θέση του πιάτου, είναι το ακόλουθο:

1. 1μl γενωμικό DNA
2. 12,5μl διαλύματος 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix
3. 0,75μl πρόσθιος εκκινητής (10μM)
4. 0,75μl οπίσθιος εκκινητής (10μM)
5. 5μl Betaine (5M)
6. 5μl ddH₂O
7. 1 σταγόνα παραφινέλαιο σε κάθε δείγμα ώστε να αποφευχθεί η εξάχνωση

Στη συνέχεια, το πιάτο PCR τοποθετείται στη συσκευή του θερμικού κυκλοποιητή και γίνεται έναρξη συγκεκριμένου προγράμματος (Πίνακας 3):

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95° C	5min	1
98° C	20sec	35
60° C	15sec	
72° C	1min	
72° C	5min	1
4° C	Διατήρηση	1

Πίνακας 3: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για sizing-PCR

Οι εκκινητές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια και σχηματίζουν σταθερά υβρίδια με συμπληρωματικές αλληλουχίες σε συγκεκριμένη για κάθε εκκινητή θερμοκρασία υβριδισμού. Η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από την αλληλουχία του εκκινητή και συγκεκριμένα από την περιεκτικότητα του σε βάσεις A-T, G-C και υπολογίζεται με τον τύπο $T_m = [(A \text{ ή } T) \times 2 + (G \text{ ή } C) \times 4 - 5]$. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με αλληλουχίες εκατέρωθεν της *C9ORF72* επανάληψης, και ο ένας εξ

αυτών είναι σημασμένος με φθοριόχρωμα FAM, που διευκολύνει το επόμενο βήμα της ανάλυσης σε γενετικό αναλυτή. (Πίνακας 4)

Πρόσθιος εκκινητής (F)	5'-FAM -CAGGTGTGGGTTTAGGAGGT- 3'
Ανάστροφος εκκινητής (R)	5' -CCAGCTTCGGTCAGAGAAAT- 3'

Πίνακας 4: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο sizing PCR

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση, που παρέχει αδρά πληροφορία για τον αριθμό των επαναλήψεων κάθε δείγματος και στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται σε γενετικό αναλυτή για να προσδιοριστεί ο ακριβής αριθμός των επαναλήψεων.

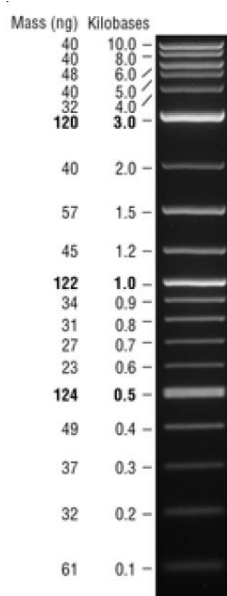
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμεύει ως το αρχικό μέσο διαχωρισμού των δειγμάτων. Με την τεχνική αυτή τα διάφορα τμήματα DNA διαχωρίζονται με βάση τα αντίστοιχα μεγέθη τους. Πιο συγκεκριμένα, η ταχύτητα κίνησης ενός τμήματος DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού του βάρους, ενώ για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA, χρησιμοποιείται μικρή συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα. Κατά την εφαρμογή σε ηλεκτρικό πεδίο, τα θραύσματα DNA, που φέρουν αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων, μεταναστεύουν μέσα στο πήκτωμα προς τον θετικό πόλο και ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται με διαφορά τάσης μέχρι 5volt/cm μήκος πηκτώματος. Μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο αποτελεί αρωματικό πολυκυκλικό υδρογονάνθρακα, που επιτρέπει την οπτική ανίχνευση του DNA μετά την ηλεκτροφόρηση, καθώς ενσωματώνεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του δίκλωνου DNA και φθορίζει στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- Σκόνη αγαρόζης (PCR agarose, Bio-RAD)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10xTAE (0,89 M Tris, 0,89 M βορικό οξύ, 0,02 M Na₂EDTA, pH=8.3)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (0.025g βρωμοφαινόλης, 2g Ficoll, 2ml 0.5M EDTA, pH=8 και ddH₂O έως τελικό όγκο 10ml)

- Δείκτης DNA 1kb Plus DNA Ladder (Εικόνα 5)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/ml)



Εικόνα 5: Δείκτης DNA 1kb Plus (NEB)

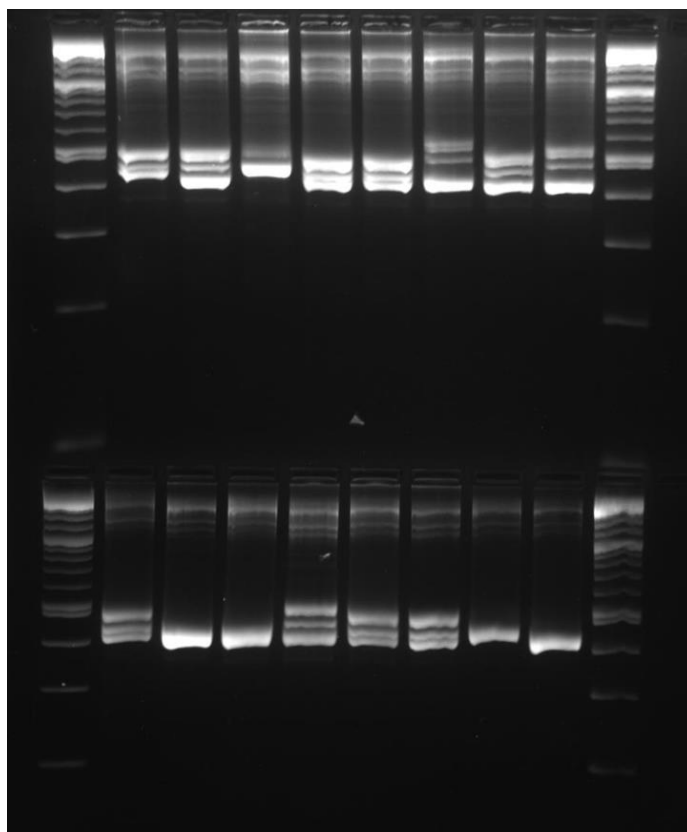
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το βήμα είναι το ακόλουθο:

1. Πήκτωμα αγαρόζης 4%
2. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
3. Σε θερμοκρασία 65° C προστίθεται στο διάλυμα 12μl (0.5μg/ml) βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), και κατόπιν άμεση ανακίνηση για την ομοιόμορφη κατανομή του βρωμιούχου αιθιδίου και επίστρωση του διαλύματος σε ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή
4. Θέσεις φόρτωσης δημιουργούνται αφού τοποθετηθεί χτένι κάθετα στο πήκτωμα και το διάλυμα αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 περίπου λεπτά και κατόπιν το χτένι αφαιρείται
5. Ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται 1x TAE το οποίο εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
6. Προσθήκη 4μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, με την οποία επιτυγχάνεται η «οπτικοποίηση» της πορείας της ηλεκτροφόρησης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η πυκνότητα των δειγμάτων. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε ξεχωριστές θέσεις ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος αγαρόζης.

7. Τέλος, τοποθέτηση δείκτη DNA (DNA marker). Συγκεκριμένα, ο δείκτης DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο DNA 1kb Plus DNA Ladder και τοποθετήθηκε εκατέρωθεν των δειγμάτων για διευκόλυνση της μέτρησης του μεγέθους τους
8. Ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση ρεύματος, 120Volts, για περίπου 2 ώρες.

4. Οπτικοποίηση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων πήκτωματος αγαρόζης

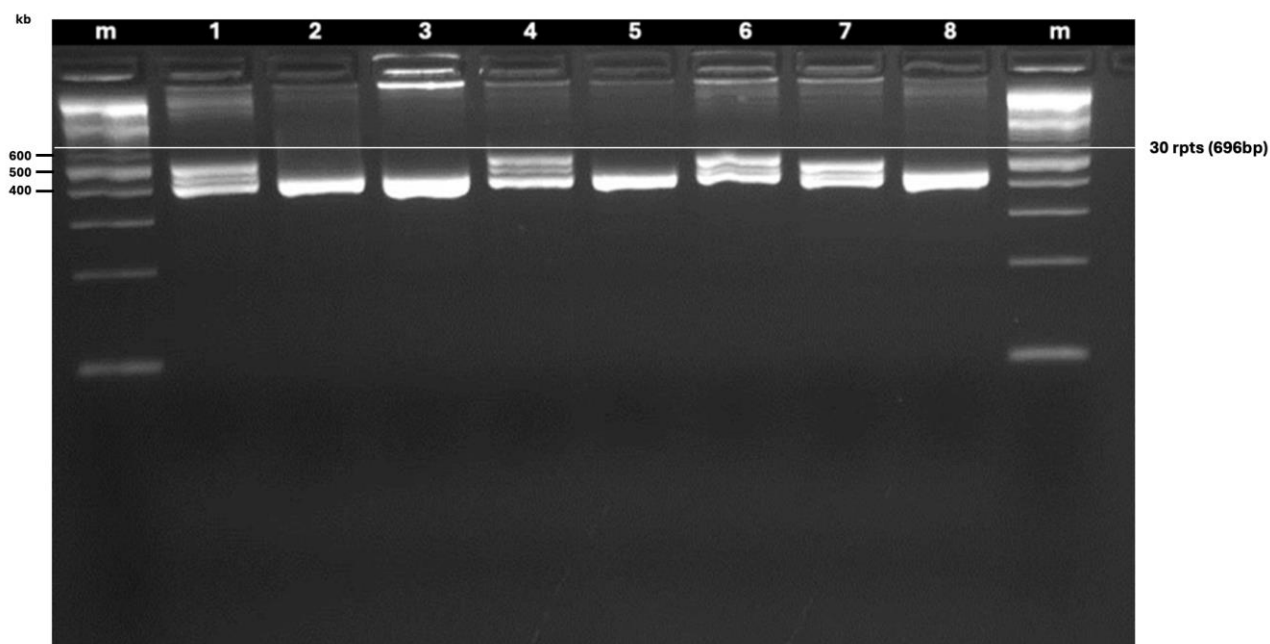
Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, είναι δυνατή η οπτικοποίηση των ζωνών των μορίων DNA. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302 nm, και στη συνέχεια αποτυπώνεται σε φωτογραφίες. Το βρωμιούχο αιθίδιο λειτουργεί απορροφώντας την υπεριώδη ακτινοβολία και εκπέμποντας μια πορτοκαλί απόχρωση σε μήκος κύματος 605 nm. Για τη φωτογράφιση των πήκτωμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα απεικόνισης και ανάλυσης ηλεκτροφόρησης GelDoc-It της UVP.(Εικόνα 6)



Εικόνα 6: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης μετά από έκθεση σε UV

Τα δείγματα που παρουσιάζουν δύο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης κάτω από το όριο των παθολογικών επαναλήψεων (όπως μας βοηθάει να το ορίσουμε ο δείκτης DNA- DNA marker, που έχουμε φορτώσει εκατέρωθεν των δειγμάτων υπό εξέταση) χαρακτηρίζονται ως φυσιολογικά. Αντίθετα, εκείνα που εμφανίζουν μία μονή ζώνη μπορεί είτε να αντιπροσωπεύουν φυσιολογικά ομόζυγα για την επανάληψη άτομα, είτε άτομα που διαθέτουν ένα δεύτερο αλληλόμορφο με παθολογικό αριθμό επέκτασης του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC που διαφεύγει της δυνατότητας ανίχνευσης μέσω της συμβατικής PCR, και απαιτείται περαιτέρω εξέταση μέσω RP-PCR για να επιβεβαιωθεί εάν υπάρχει η παθογόνος επανάληψη.

Το επεξεργασμένο αποτέλεσμα που παίρνουμε φαίνεται σε ένα παράδειγμα στην εικόνα 7.



Εικόνα 7: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά από αντιστοίχιση αριθμού βάσεων με εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις (με την οριζόντια άσπρη γραμμή σημειώνεται το όριο πάνω από το οποίο ορίζονται οι παθολογικές επαναλήψεις για το γονίδιο *C9ORF72*)

5. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς των προϊόντων του sizing PCR και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Στο επόμενο βήμα μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, τα δείγματα τοποθετούνται σε γενετικό αναλυτή για ηλεκτροφόρηση με χρήση τριχοειδούς, με σκοπό την επιβεβαίωση του αποτελέσματος που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση στην αγαρόζη, αλλά κυρίως την ακριβή εκτίμηση του αριθμού των επαναλήψεων της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *C9ORF72* στο κάθε αλλήλιο.

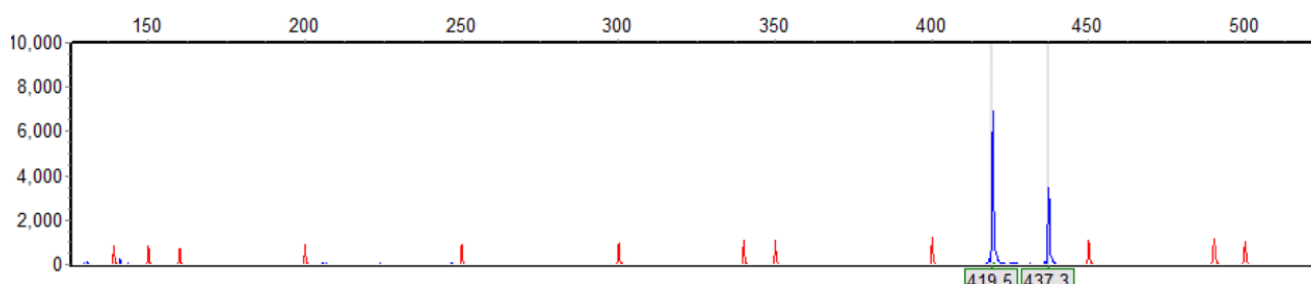
Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αποτελεί αυτοματοποιημένη και προηγμένη τεχνική ηλεκτροφόρησης με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα για τα δείγματα. Απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος και ελάχιστη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ενός τριχοειδούς σωλήνα 20-100μm από τηγμένο οξειδίο του πυριτίου (fused silica capillary) ως μέσο διαχωρισμού. Ο σωλήνας αυτός είναι είτε κενός είτε μπορεί να περιέχει ηλεκτροφορητικό υλικό (π.χ. πολυακρυλαμίδη) και τα άκρα του βρίσκονται σε δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια. Στη συνέχεια εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 20.000 έως 30.000 Volts με αποτέλεσμα την μετακίνηση των μορίων. Μέσα στον τριχοειδή σωλήνα, τα κλάσματα που έχουν διαχωριστεί ανιχνεύονται με οπτικό ανιχνευτή και μετά από ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή προκύπτει ένα διάγραμμα με κορυφές που περιέχουν τις πληροφορίες για τα δείγματα.

Τα δείγματα προετοιμάζονται για να φορτωθούν στον γενετικό αναλυτή, με την προσθήκη σε καθένα από αυτά ενός δείκτη που είναι σημασμένος με χρωστική. Στο τελικό αποτέλεσμα μετά την ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται η μέτρηση του μεγέθους του αλληλομόρφου σε σχέση με τα μεγέθη του δείκτη. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε ο ROX, που καλύπτει τμήματα DNA από 35 έως 500 ζεύγη βάσεων.

Τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- 1μL PCR προϊόν (αραιωμένο 1/5)
- 1μL ROX 500
- 11μL φορμαμίδιο
- Πιάτα για αναλυτή ABI 3500, Thermo Fisher Scientific

Μετά την παραπάνω προετοιμασία των δειγμάτων, τα δείγματα φορτώνονται στον γενετικό αναλυτή. Τα αποτελέσματα του γενετικού αναλυτή αναλύονται σε ειδικό πρόγραμμα λογισμικού. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε το GeneScan® Analysis Software. Τελικά, προκύπτει ένα διάγραμμα με κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στον αριθμό των βάσεων κάθε αλληλίου. (Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε γενετικό αναλυτή και επεξεργασία σε ειδικό λογισμικό πρόγραμμα

Από την παραπάνω εικόνα μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των βάσεων κάθε αλληλίου με τον ακόλουθο τύπο:

- Το μήκος της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζουμε και που αποτελεί και το προϊόν της PCR είναι 432bp.
- Σε ένα κομμάτι με 3 εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις, το κομμάτι αυτό είναι $6 \times 3 = 18\text{bp}$
- Το σταθερό κομμάτι (χωρίς επαναλήψεις) είναι $432 - 18 = 414\text{bp}$
- Υπολογίζουμε τον αριθμό των επαναλήψεων κάθε αλληλομόρφου αφαιρώντας το σταθερό κομμάτι της αλληλουχίας από το προϊόν της PCR και το αποτέλεσμα το διαιρούμε με τον αριθμό της νουκλεοτιδικής επανάληψης, οπότε και προκύπτει ο τύπος:

$$\frac{PCR_{pr} - 414}{6} = \text{Αρ. Επαναλήψεων } C9ORF72$$

Το αποτέλεσμα που προκύπτει στρογγυλοποιείται στον πλησιέστερο ακέραιο και διορθώνεται κατά +2 επαναλήψεις (η συγκεκριμένη διόρθωση έχει προκύψει από αλληλούχηση κατά Sanger πολλών δειγμάτων και σύγκριση του

αποτελέσματος με την τεχνική sizing PCR). Τα παραπάνω αποτελέσματα τα εισάγουμε στο πρόγραμμα Microsoft Office 365 Excel και υπολογίζεται ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε αλληλομόρφου. (Εικόνα 9)

Κωδικός Δείγματος	Τιμή Αναλυτή		Τύπος υπολογισμού επαναλήψεων No of repeats= (PCRpr - 414)/6		Στρογγυλοποίηση προς τα πάνω		Διόρθωση συν 2	
	Αλληλίο1 (bp)	Αλληλίο2 (bp)	Αλληλίο1 (rpts)	Αλληλίο2 (rpts)	Αλληλίο1	Αλληλίο2	Αλληλίο1	Αλληλίο2
A	428,6	451,6	2,43	6,27	3	7	5	9
B	417,4	434,9	0,57	3,48	1	4	3	6
C	417,5		0,58		1		3	
D	417,4	440,7	0,57	4,45	1	5	3	7

Εικόνα 9: Παράδειγμα από το πρόγραμμα Excel για την ανάλυση προϊόντων του sizing PCR

6. Μέθοδος Repeat-Primed PCR (RP-PCR)

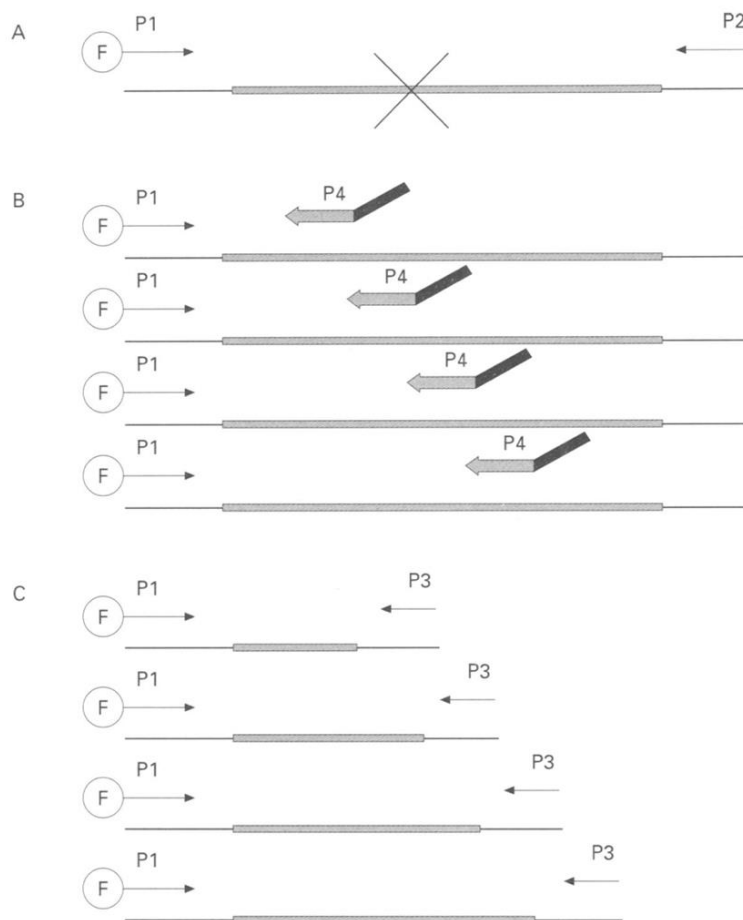
Η απλή PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να πολλαπλασιαστούν σχετικά μικρά τμήματα DNA από 0.1 έως 10 kb. Μεγαλύτερα τμήματα, όπως είναι η εξανουκλεοτιδική επανάληψη του *C9ORF72* αλληλομόρφου, δεν δύναται να πολλαπλασιαστούν με απλή PCR και δεν είναι ορατά στην αгарόζη, οπότε και πραγματοποιείται στα δείγματα αυτά η τεχνική RP-PCR.

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούμε 3 διαφορετικούς εκκινητές. (Πίνακας 5) Ο πρώτος εκκινητής (P1-FAM) σημαίνεται και υβριδοποιείται πριν από την επανάληψη. Ο δεύτερος εκκινητής (P4-anchor) διαθέτει ένα άκρο συμπληρωματικό ως προς την επανάληψη-στόχο, και στο άλλο άκρο μια αλληλουχία-ουρά (5'), με την οποία είναι συμπληρωματικός ο τρίτος εκκινητής (P3-tail). Όσον αφορά αυτή την αλληλουχία-ουρά, είναι ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που δεν παρουσιάζει αυτοσυμπληρωματικότητα, ούτε συμπληρωματικότητα ως προς την επανάληψη και δεν έχει αλληλουχία με άλλη γνωστή αλληλουχία στον άνθρωπο.

P1	MRX-F	5'-FAM-TGTA AACGACGGCCAGTCAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC-3'
P3	MRX-M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
P4	MRX-R1	5'-CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCCGACCACGCCCGGCCCGGCCCGG-3'

Πίνακας 5: Εκκινητές για RP-PCR

Κατά τη διάρκεια των αρχικών κύκλων, ο εκκινητής P4-anchor προσδένεται σε πολλαπλές θέσεις εντός της επανάληψης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι κλειδί αυτής της μεθόδου είναι η αναλογία των εκκινητών, η οποία είναι 10:1 των P3-tail και P1-FAM προς P4-anchor, που σημαίνει ότι ο P3-tail και ο P1-FAM έχουν συγκεντρώσεις δέκα φορές υψηλότερες από εκείνη του P4-anchor. Η εφαρμογή αυτής της αναλογίας εξασφαλίζει την εξάντληση της P4-anchor στους πρώτους κύκλους της ενίσχυσης, αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό νέων θέσεων υβριδισμού στα ήδη πολλαπλασιασμένα τμήματα με συνέπεια να μειωθεί το μέγεθος των προϊόντων. Στη συνέχεια, ο εκκινητής P3- tail επιμηκύνει προϊόντα από προηγούμενους κύκλους. Η περίοδος επιμήκυνσης είναι επαρκής για τον πολλαπλασιασμό των μεγαλύτερων επαναλήψεων. Το αποτέλεσμα είναι να προκύψουν τμήματα DNA αυξανόμενου μεγέθους, που διαφέρουν μεταξύ τους τόσο όσο το μέγεθος της επανάληψης. (π.χ. 6 νουκλεοτίδια για μια εξανουκλεοτιδική επανάληψη. (Εικόνα 10)⁽⁶¹⁾



Εικόνα 10: (Α) Αδυναμία πολλαπλασιασμού τμήματα DNA με μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, (Β) Πολλαπλασιασμός με την μέθοδο RP-PCR με (Γ) αποτέλεσμα να προκύπτουν τμήματα DNA αυξανόμενου μεγέθους

Τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- ddH₂O
- kit 2X KAPA Long Range HotStart PCR Kit, KK3501, Kapa Biosystems, Roche, που περιλαμβάνει:
 - KAPA HiFi HotStart DNA polymerase
 - Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια dNTP's
 - MgCl₂ (2,5mM)
 - Σταθεροποιητές
- Γενωμικό DNA (50-200ng/μl)
- Μίγμα εκκινητών 10/1
- Betaine (5M)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf χωρητικότητας 0.2ml
- Παραφινέλαιο
- Πιάτο (PCR plate) πολυκαρβονικό των 96 θέσεων

Σημειώνεται εδώ ότι για το μίγμα των εκκινητών (τελικός όγκος 400μl) με την αναλογία 10/1 ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. ddH₂O = 365,35 μl
2. MRX-F (100μM) = 16,5 μl
3. MRX-M13R (100μM) = 16,5 μl
4. MRX-R1 (100μM) = 1,65 μl

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτό το βήμα, με συνολικό όγκο αντίδρασης τα 25μl και κατά σειρά προσθήκης σε κάθε θέση του πιάτου, ήταν το ακόλουθο:

1. 1μl γενωμικό DNA
2. 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 5X KAPA LongRange Buffer
3. 2,25μl MgCl₂
4. 1,25μl μίγμα KAPA dNTPs Mix 10mM
5. 2μl μίγματος εκκινητών σε αναλογία 10/1
6. 0,25μl KAPA LongRange HotStart DNA Polymerase 2,5U/μl
7. 9,5μl betaine (5M)

8. 3,75μl ddH₂O
9. 1 σταγόνα παραφινέλαιο σε κάθε δείγμα ώστε να αποφευχθεί η εξάχνωση

Στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται στη συσκευή του θερμικού κυκλοποιητή και ακολουθείται το πρόγραμμα που απεικονίζεται στον Πίνακα 6:

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
98° C	10min	1
97° C	35sec	10
53° C	2min	
68° C	2min	
97° C	35sec	25
53° C	2min	
68° C	2min	
68° C	7min	1
4° C	Διατήρηση	

Πίνακας 6: Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για RP-PCR

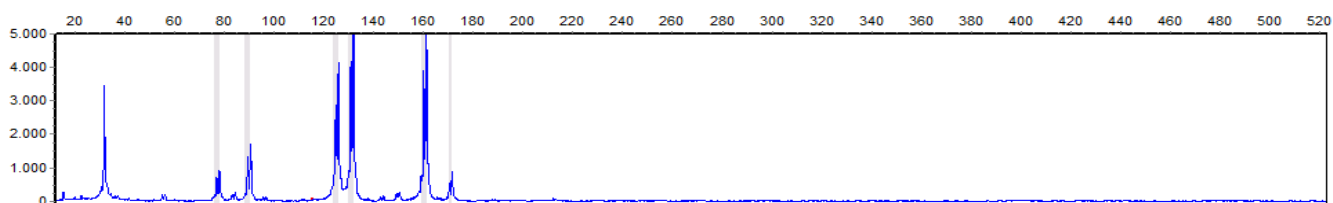
7. Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς των προϊόντων του RP-PCR και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τα δείγματα μετά την μέθοδο του RP-PCR ετοιμάζονται για να φορτωθούν στον γενετικό αναλυτή και αναλύονται με τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς, με προετοιμασία όπως στην περίπτωση της μεθόδου του sizing PCR. Οι διαφορές είναι στις διαφορετικές ποσότητες που χρησιμοποιούμε στα αντιδραστήρια (μικρότερη ποσότητα δείκτη ROX και φορμαμίδιου) και ότι το PCR προϊόν δεν αραιώνεται.

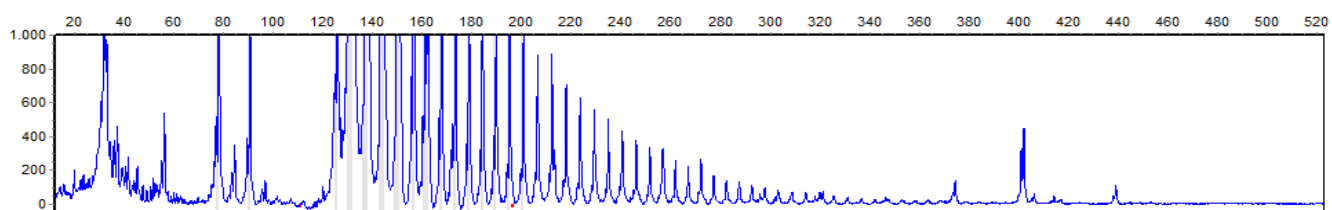
Τα πρωτόκολλο και τα αντιδραστήρια-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα σε αυτό το βήμα είναι τα ακόλουθα:

- 0,7μl PCR προϊόν
- 0,3 μl ROX
- 9μl φορμαμίδιο

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον γενετικό αναλυτή χρησιμοποιείται ειδικό λογισμικό, και στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο το GeneScan® Analysis Software. Το αποτέλεσμα που παίρνουμε από τη μέθοδο RP-PCR είναι μια ποιοτική εκτίμηση (θετικό ή αρνητικό δείγμα) και όχι ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των επαναλήψεων. Η εικόνα που παίρνουμε από ένα δείγμα που είναι αρνητικό για παθολογικό αριθμό επαναλήψεων και από ένα δείγμα που είναι θετικό για παθολογικό αριθμό επαναλήψεων φαίνονται στην Εικόνα 11 και Εικόνα 12, αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο θετικό δείγμα φαίνονται κορυφές με ένα χαρακτηριστικό «οδοντωτό» πρότυπο και με περιοδικότητα αντίστοιχη της εξανουκλεοτιδικής επανάληψης.



Εικόνα 11: Δείγμα που προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε γενετικό αναλυτή και είναι αρνητικό για παθολογικό αριθμό επαναλήψεων



Εικόνα 12: Δείγμα που προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε γενετικό αναλυτή και είναι θετικό για παθολογικό αριθμό επαναλήψεων

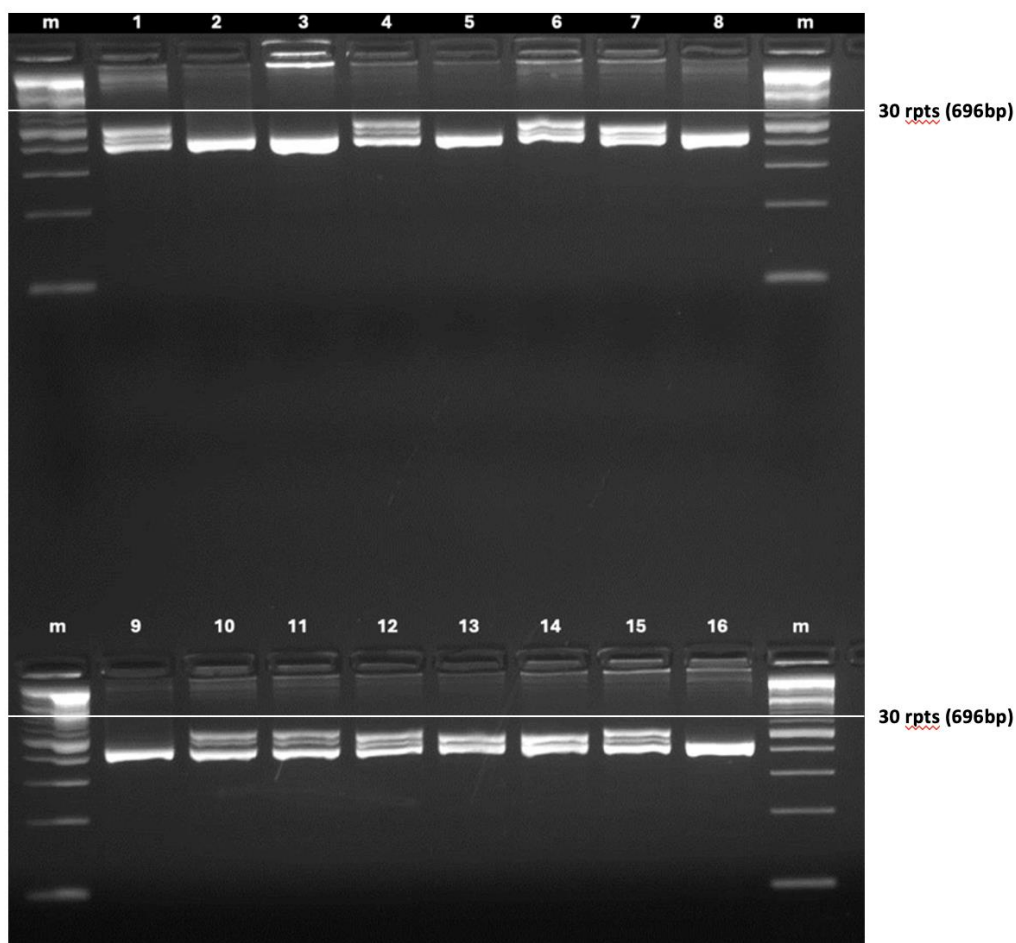
b. Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SD (κανονική κατανομή) και ως ενδιάμεσος τιμή με ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR, μη κανονική κατανομή). Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως αριθμός ασθενών και τα αντίστοιχα ποσοστά. Οι στατιστικές συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 ή, σε περίπτωση μικρών αναμενόμενων συχνοτήτων, της ακριβούς δοκιμασίας του Fischer. Η στατιστική σημαντικότητα ορίσθηκε για τιμή $p < 0,05$. Τέλος, οι στατιστικές αναλύσεις των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση R software version 3.5.0.

VI) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

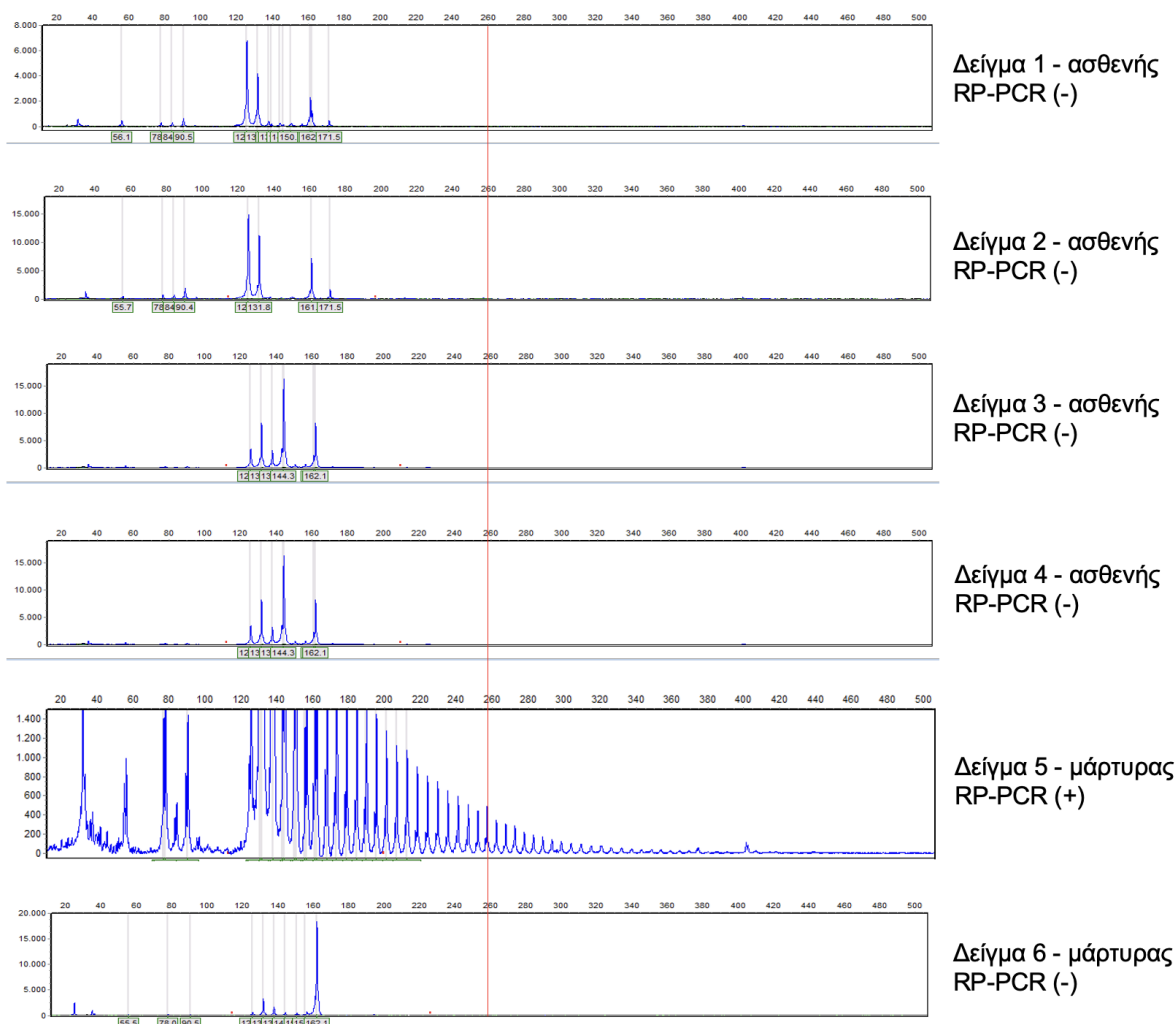
Στην παρούσα μελέτη, όπως προαναφέρθηκε, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία sizing PCR και RP-PCR για τον εντοπισμό παθογόνων επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72* σε Έλληνες ασθενείς με PD ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι σε σύνολο 91 ασθενών (75 με PD, 15 με CBS και 1 με DLB) δεν ανιχνεύθηκε η παθογόνος παραλλαγή (>30 επαναλήψεις) αλλά ούτε και ο ενδιάμεσος αριθμός επαναλήψεων (23-30) στο γονίδιο *C9ORF72*.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αρχικής PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, από το σύνολο των 91 δειγμάτων, 26 δείγματα (23 PD, 2 CBS, 1 DLB) παρουσίαζαν μία μόνο ζώνη, που όπως προαναφέρθηκε μπορεί είτε να αντιπροσωπεύουν φυσιολογικά ομόζυγα για την επανάληψη άτομα, είτε άτομα που διαθέτουν ένα δεύτερο αλληλόμορφο με παθολογικό αριθμό επέκτασης του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC που διαφεύγει της δυνατότητας ανίχνευσης μέσω της συμβατικής PCR. Στην εικόνα 13 παρουσιάζεται ενδεικτικά, η εικόνα της ηλεκτροφόρησης μετά από έκθεση σε UV σε 15 από τα 91 δείγματα. Στις θέσεις m έχει φορτωθεί ένας μάρτυρας (marker) τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους (DNA marker), που στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι ο δείκτης DNA 1kb Plus DNA Ladder, ο οποίος μας βοηθάει στην αξιολόγηση του μεγέθους των υπό εξέταση τμημάτων (ζωνών). Στη θέση 16 έχει φορτωθεί δείγμα από ασθενή με γνωστό αριθμό επαναλήψεων (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι ασθενής ομόζυγος για 3 επαναλήψεις της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας), που χρησιμεύει ως φυσιολογικός μάρτυρας ελέγχου (control). Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, τα δείγματα 1, 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14 και 15 έχουν δύο διακριτές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση και τα δείγματα 2, 3, 5, 8 και 9 έχουν μονή ζώνη. Σε αυτά με την μονή ζώνη προχωρήσαμε στην τεχνική RP-PCR για να διερευνηθεί περαιτέρω εάν είναι θετικά ή αρνητικά, αν δηλαδή έχουν ένα δεύτερο αλληλόμορφο με παθολογικό αριθμό επαναλήψεων ή φέρουν δυο όμοια αλληλόμορφα με φυσιολογικό αριθμό επαναλήψεων.



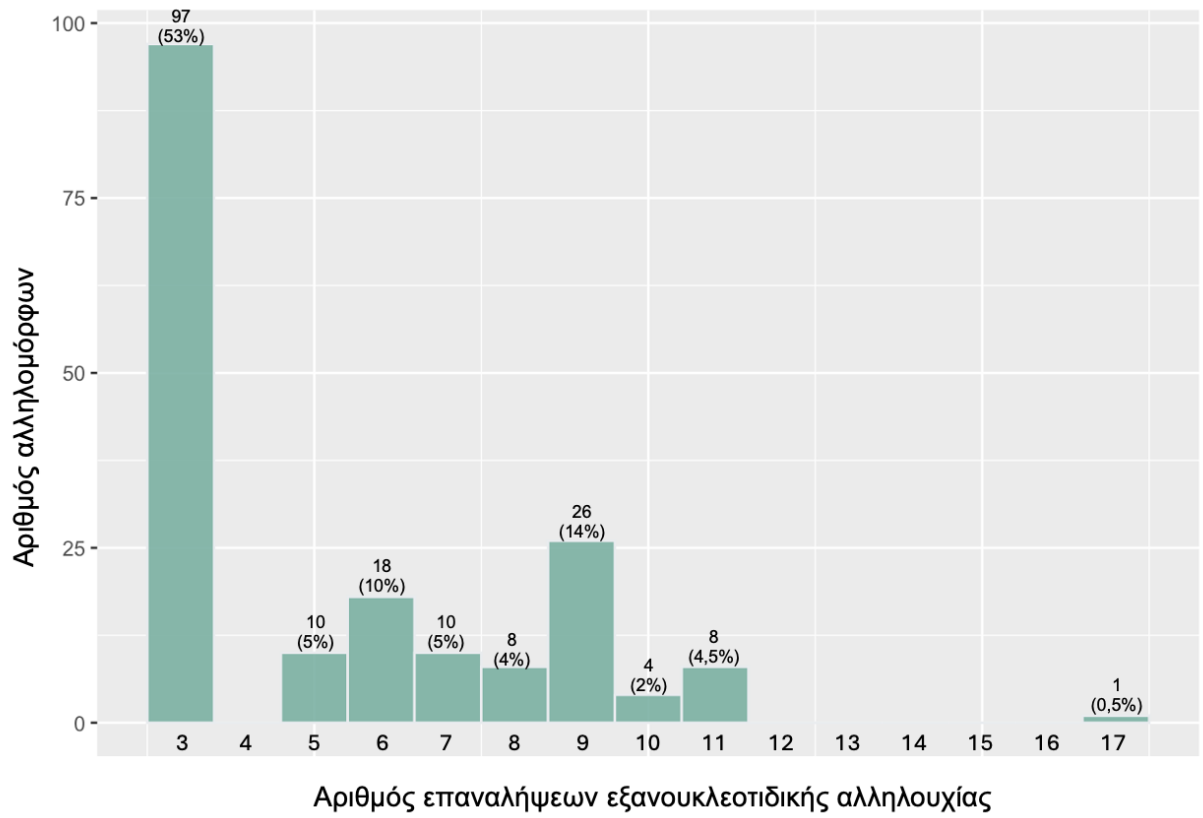
Εικόνα 13: Εικόνα ηλεκτροφόρησης μετά από έκθεση σε UV σε 15 ενδεικτικά δείγματα ασθενών της μελέτης [στη θέση m έχει φορτωθεί ο δείκτης DNA 1kb Plus DNA Ladder και στη θέση 16 δείγμα από ασθενή με γνωστό αριθμό επαναλήψεων (στη συγκεκριμένη περίπτωση 3 επαναλήψεις)]

Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, για τα 26 δείγματα από το σύνολο των 91 δειγμάτων, που παρουσίαζαν μονή ζώνη στην ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης, προχωρήσαμε σε περαιτέρω έλεγχο με την μέθοδο RP-PCR για να επιβεβαιωθεί εάν υπάρχει η παθογόνος παραλλαγή. Μετά την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς των προϊόντων του RP-PCR και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από τον γενετικό αναλυτή με το ειδικό λογισμικό, δεν προέκυψε θετικό αποτέλεσμα σε κανένα από αυτά τα δείγματα. Στην εικόνα 14, φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από 4 δείγματα (Δείγματα 1-4) ασθενών της μελέτης. Παράλληλα με τα υπό εξέταση δείγματα επεξεργάζονται και δύο δείγματα ελέγχου, ένα θετικό (Δείγμα 5) και ένα αρνητικό (Δείγμα 6) για την παθογόνο επέκταση του *C9ORF72*.



Εικόνα 14: Δείγματα που προκύπτουν μετά από ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε γενετικό αναλυτή (Δείγματα 1-4 είναι ασθενείς της μελέτης, Δείγμα 5 θετικός ασθενής μάρτυρας, Δείγμα 6 αρνητικός ασθενής μάρτυρας). Με την κόκκινη γραμμή φαίνεται ο ουδός των παθολογικών επαναλήψεων.

Τέλος, υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών αλληλομόρφων της επανάληψης στο γονίδιο *C9ORF72* στα δείγματα των 91 ασθενών (Εικόνα 15). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 14, το συχνότερο αλληλόμορφο που εντοπίστηκε έφερε 3 επαναλήψεις της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας (53%), και το δεύτερο πιο συχνό έφερε 9 επαναλήψεις (14%).



Εικόνα 15: Συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων στο γονίδιο *C9ORF72* στο δείγμα των ασθενών της μελέτης

VII. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε, στη διεθνή βιβλιογραφία, η παθογόνος επέκταση στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με PD, φαίνεται να ανευρίσκεται από πολύ σπάνια (< 1%) έως καθόλου. Μελέτες σε ασθενείς με PD από την Ευρώπη, την Αμερική και την Ασία δεν είχαν θετικά αποτελέσματα, υποστηρίζοντας ότι το γονίδιο *C9ORF72* δεν σχετίζεται με την PD. (Πίνακας 7)

Μελέτη	Συνολικός αριθμός ασθενών
Akimoto et al., 2013	135
Majounie et al., 2015	781
Dejesus-Hernandez et al., 2013	676
Harms et al., 2013	478
Daoud et al., 2013	285
Alavi et al., 2017	186
Yeh et al., 2013	71
Lin et al., 2014	310
Chen et al., 2016	619
Jiao et al., 2013	911
Nuytemans et al., 2013	396

Πίνακας 7: Μελέτες σε ασθενείς PD που δεν ταυτοποίησαν τη παθογόνο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*

Στη διεθνή βιβλιογραφία, συνολικά σε 5 ασθενείς με PD έχει ανευρεθεί η παθογόνος παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*. Πιο συγκεκριμένα, στο Γαλλικό πληθυσμό, το 2013 οι Lesage et al. ⁽⁶²⁾ εξετάζοντας συνολικά 1225 ασθενείς με PD, ανίχνευσαν παθογόνο επέκταση στο γονίδιο *C9ORF72* σε 3 ασθενείς (0,2%). Τα χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς είχαν οικογενειακό ιστορικό παρκινσονισμού, άνοιας ή ALS. Επιπρόσθετα, δύο στους τρεις ασθενείς παρουσίαζαν, εκτός από παρκινσονισμό, και δυστονία στην κλινική τους εικόνα. Επίσης, δύο στους τρεις ασθενείς παρουσίαζαν και νοητική έκπτωσηση.

Χαρακτηριστικά	Ασθενής 1	Ασθενής 2	Ασθενής 3
Φύλο	θήλυ	θήλυ	θήλυ
Ηλικία (έτη)	54	69	35
Ηλικία έναρξης (έτη)	48	64	29
Συμπτώματα έναρξης	Παρкинσονισμός	Παρкинσονισμός και Δυστονία	Παρкинσονισμός και Δυστονία
UPDRS (ON, OFF)	7/108, 20/108	13/108, na	9/108, 27/108
Hoehn and Yahr stage	4	3	2
Νοητική έκπτωση	+	+	-
MMSE	25/30	26/30	27/30
FAB	na	15/18	18/18
Άλλα συμπτώματα	Διαταραχές ύπνου	Κατάθλιψη Υπνική άπνοια	Αυξημένα εν τω βάθει τερόνια αντανακλαστικά
Οικογενειακό ιστορικό	Άνοια, PD	Κατάθλιψη, Παρкинσονισμός	Κατάθλιψη, Άνοια, Παρкинσονισμός, ALS

UPDRS: Unified Parkinson's disease rating scale, MMSE: Mini Mental State Examination, FAB: Frontal Assessment Battery, na: non available

Πίνακας 8: Συνοπτικά χαρακτηριστικά των 3 ασθενών με PD και παθογόνο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*, στην μελέτη των Lesage et al., 2013

Το 2012, οι Xi et al.⁽⁶³⁾ μελέτησαν συνολικά 289 ασθενείς με PD από Ευρώπη και Βόρεια Αμερική, ανιχνεύοντας παθογόνο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* σε 2 ασθενείς (0,7%). Οι ασθενείς αυτοί δεν είχαν κλινικά σημεία ALS, ούτε παρουσίαζαν εικόνα άνοιας, ενώ ο ένας εξ αυτών είχε θετικό οικογενειακό ιστορικό για PD. Στους δύο αυτούς ασθενείς ανιχνεύθηκαν 32 και 39 επαναλήψεις της εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας αντίστοιχα, και ο αριθμός αυτός των επαναλήψεων σχολιάστηκε από τους ερευνητές ως σχετικά χαμηλός και τους οδήγησε να εκφράσουν αμφισβητήσεις για τη συσχέτιση των παραλλαγών στο γονίδιο *C9ORF72* με τη PD, και να υπογραμμίσουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη ώστε να καθοριστεί ευκρινέστερα ο ρόλος για τον χαρακτηρισμό των παθολογικών επαναλήψεων.

Στη Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινητείου Νοσοκομείου, σε μελέτη που έγινε σε 175 ασθενείς με PD εντοπίστηκαν 2 ασθενείς με παθογόνο επέκταση στο γονίδιο *C9ORF72*, ηλικίας 68 και 61 ετών αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι το οικογενειακό ιστορικό ήταν θετικό στον πρώτο για παρκινσονισμό και στον δεύτερο για ALS. Στην πορεία της παρακολούθησής τους, και οι δύο παρουσίασαν νευροψυχιατρικά συμπτώματα και ο πρώτος επιπρόσθετα νοητική έκπτωση. ⁽⁵⁸⁾

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με τα αποτελέσματα μελετών σε ασθενείς με PD που ταυτοποίησαν την παθογόνο παραλλαγή, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 9)

Μελέτες	Συνολικός αριθμός ασθενών	Αριθμός (ποσοστό) ασθενών με παθογόνο παραλλαγή	p-value
Lesage et al., 2013	1225	3 (0,2%)	0,99
Xi et al., 2012	289	2 (0,7%)	0,99
Kartanou et al., 2020	175	2 (1,1%)	0,99
Παρούσα μελέτη	75	0	

Πίνακας 9: Σύγκριση αποτελεσμάτων παρούσας μελέτης με μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που ταυτοποίησαν την παθογόνο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με PD

Ο ενδιάμεσος αριθμός επαναλήψεων του γονιδίου *C9ORF72* (23-30), έχει βρεθεί ότι πιθανά αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης παρκινσονισμού, με αποτέλεσμα να θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση PD.⁽⁶⁴⁾ Στον Πίνακα 10 αναφέρονται μελέτες που ανίχνευσαν ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με PD.

Μελέτη	Συνολικός αριθμός ασθενών	Αριθμός (ποσοστό) ασθενών με ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων
Akimoto et al., 2013	135	3 (2,2%)
Daoud et al., 2013	285	1 (0,3%)
Lin et al., 2014	310	1 (0,3%)
Jiao et al., 2013	911	3 (0,3%)
Nuytemans et al., 2013	396	8 (2%)
Xi et al., 2012	289	4 (1,4%)

Πίνακας 10: Μελέτες σε ασθενείς PD που ταυτοποίησαν ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72*

Στη Μονάδα Νευρογενετικής της Α' Νευρολογικής Κλινικής του Αιγινήτειου Νοσοκομείου, στη μελέτη, που προαναφέρθηκε σε 175 ασθενείς με PD, δεν εντοπίστηκε κανένας ασθενής με ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων για το γονίδιο *C9ORF72*.⁽⁵⁸⁾

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με τα αποτελέσματα μελετών σε ασθενείς με PD που ταυτοποίησαν ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72*, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 11)

Μελέτη	Συνολικός αριθμός ασθενών	Αριθμός (ποσοστό) ασθενών με ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων	p-value
Akimoto et al., 2013	135	3 (2,2%)	0,55
Daoud et al., 2013	285	1 (0,3%)	0,99
Lin et al., 2014	310	1 (0,3%)	0,99
Jiao et al., 2013	911	3 (0,3%)	0,99
Nuytemans et al., 2013	396	8 (2%)	0,37
Xi et al., 2012	289	4 (1,4%)	0,58
Παρούσα μελέτη	75	0	

Πίνακας 11: Σύγκριση αποτελεσμάτων παρούσας μελέτης με μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που ταυτοποίησαν ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με PD

Στη βιβλιογραφία, για τα άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα, η πλειονότητα των εργασιών αφορά σε αρνητικά αποτελέσματα για τη συσχέτιση τους με παραλλαγές στο γονίδιο *C9ORF72* (Πίνακας 12).

ΜΕΛΕΤΕΣ	Συνολικός αριθμός ασθενών
CBS	
Galimberti et al., 2013	21
Yeh et al., 2013	13
Origone et al., 2013	27
Le Ber et al., 2013	14
PSP	
Schottlaender et al., 2014	22
Galimberti et al., 2013	31
Yeh et al., 2013	35
MSA	
Lesage et al., 2013	25
Chen et al., 2016	381
Sun et al., 2015	141
Hsiao et al., 2014	331
DLB	
Lesage et al., 2013	43

Πίνακας 12: Μελέτες σε ασθενείς με άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα που δεν ταυτοποίησαν παθολόγο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*

Μόνο σε ένα μικρό αριθμό μελετών στην βιβλιογραφία, αναφέρονται ασθενείς με άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα και παθολόγο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*. Ενδεικτικά, οι Lesage et al. ⁽⁶²⁾ σε 123 ασθενείς με PSP εντόπισαν έναν ασθενή (0,8%) με παθολογική επέκταση στο γονίδιο *C9ORF72* και σε 21 ασθενείς με CBS, επίσης έναν ασθενή (5%). Οι Snowden et al. ⁽⁶⁵⁾ σε σύνολο 102 ασθενών με DLB εντόπισαν 2 ασθενείς με παθολόγο παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*. Στον Πίνακα 13 συνοψίζονται οι μελέτες που

ταυτοποίησαν την παθολογική παραλλαγή σε ασθενείς με άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα.

Μελέτες	Συνολικός αριθμός ασθενών	Αριθμός ασθενών παθολογική παραλλαγή
CBS		
Anor et al., 2015	39	1
Lesage et al., 2013	21	1
Schottlaender et al., 2014	37	3
PSP		
Lesage et al., 2013	123	1
Origone et al., 2013	12	1
Le Ber et al., 2013	17	1
MSA		
Goldman et al., 2014		
DLB		
Snowden et al., 2012	102	2

Πίνακας 13: Μελέτες σε ασθενείς με άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα που ταυτοποίησαν τη παθολογική παραλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, που συμπεριελάμβανε ασθενείς με CBS και DLB, με τα αποτελέσματα μελετών σε ασθενείς με αυτά τα άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα, που ταυτοποίησαν παθολογικό αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72*, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 14)

Μελέτες	Συνολικός αριθμός ασθενών	Αριθμός (ποσοστό) Ασθενών με παθολόγο παραλλαγή	p-value
CBS			
Anor et al., 2015	39	1 (2,6%)	0,99
Lesage et al., 2013	21	1 (4,8%)	0,99
Schottlaender et al., 2014	37	3 (8,1%)	0,55
Παρούσα μελέτη	15	0	
DLB			
Snowden et al., 2012	102	2 (1,9%)	0,99
Παρούσα μελέτη	1	0	

Πίνακας 14: Σύγκριση αποτελεσμάτων παρούσας μελέτης με μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που ταυτοποίησαν παθολογικό αριθμό επαναλήψεων στο γονίδιο *C9ORF72* σε ασθενείς με CBS και DLB.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία, ότι σε ασθενείς με PD ή άτυπο παρκινσονικό σύνδρομο, η ανίχνευση της παθολόγου νουκλεοτιδικής επανάληψης στο γονίδιο *C9ORF72* είναι πολύ σπάνια έως και καθόλου. Παρά το αρνητικό αποτέλεσμα της μελέτης, αξίζει να σημειωθεί ότι συμβάλει στην ευρύτερη διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *C9ORF72* στην συγκεκριμένη ομάδα ασθενών καθώς και στην αύξηση του αριθμού των Ελλήνων ασθενών με PD και άτυπα παρκινσονικά σύνδρομα που ελέγχθηκαν για παθολόγο μεταλλαγή στο γονίδιο *C9ORF72*.

VIII) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017 Aug;124(8):901-905. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150045.
2. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009 Jun 13;373(9680):2055-66. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60492-X. Erratum in: *Lancet*. 2009 Aug 29;374(9691):684. PMID: 19524782.
3. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015 Oct;30(12):1591-601. doi: 10.1002/mds.26424. PMID: 26474316.
4. Ffytche DH, Aarsland D. Psychosis in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol*. 2017;133:585-622. doi: 10.1016/bs.irn.2017.04.005. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28802934.
5. Goldman JG, Sieg E. Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson Disease. *Clin Geriatr Med*. 2020 May;36(2):365-377. doi: 10.1016/j.cger.2020.01.001. Epub 2020 Jan 23. PMID: 32222308.
6. Wakabayashi, K.; Tanji, K.; Odagiri, S.; Miki, Y.; Mori, F.; Takahashi, H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol*. 2013, 47, 495–508.
7. Braak, H.; Tredici, K.D.; Rüb, U.; de Vos, R.A.I.; Jansen Steur, E.N.H.; Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2003, 24, 197–211.
8. Ono, K. The Oligomer Hypothesis in α -Synucleinopathy. *Neurochem. Res*. 2017, 42, 3362–3371.
9. Alam, P.; Bousset, L.; Melki, R.; Otzen, D.E. α -Synuclein oligomers and fibrils: A spectrum of species, a spectrum of toxicities. *J. Neurochem*. 2019, 150, 522–534
10. Marsden CD. Parkinson's disease. *Lancet*. 1990 Apr 21;335(8695):948-52. doi: 10.1016/0140-6736(90)91006-v. PMID: 1691427.
11. Zhang PL, Chen Y, Zhang CH, Wang YX, Fernandez-Funez P. Genetics of Parkinson's disease and related disorders. *J Med Genet*. 2018

- Feb;55(2):73-80. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105047. Epub 2017 Nov 18. PMID: 29151060.
12. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Feb;2(2):a009399. doi: 10.1101/cshperspect.a009399. PMID: 22355802; PMCID: PMC3281589.
 13. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2011 Nov;10(11):1015-25. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70213-7. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2011 Dec;10(12):1041. PMID: 22014436.
 14. Koros C, Simitsi A, Stefanis L. Genetics of Parkinson's Disease: Genotype-Phenotype Correlations. *Int Rev Neurobiol.* 2017;132:197-231. doi: 10.1016/bs.irn.2017.01.009. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28554408.
 15. Liu H, Koros C, Strohäker T, Schulte C, Bozi M, Varvaresos S, Ibáñez de Opakua A, Simitsi AM, Bougea A, Voumvourakis K, Maniati M, Papageorgiou SG, Hauser AK, Becker S, Zweckstetter M, Stefanis L, Gasser T. A Novel SNCA A30G Mutation Causes Familial Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021 Jul;36(7):1624-1633. doi: 10.1002/mds.28534. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33617693.
 16. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):228-42. doi: 10.1177/0891988710383572. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20938043; PMCID: PMC3044594.
 17. J. Bras, A. Verloes, S. A. Schneider, S. E. Mole, and R. J. Guerreiro, "Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis," *Human Molecular Genetics*, vol. 21, no. 12, pp. 2646–2650, 2012.
 18. A. Ramirez, A. Heimbach, J. Gründemann et al., "Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase," *Nature Genetics*, vol. 38, no. 10, pp. 1184–1191, 2006

19. A. Di Fonzo, H. F. Chien, M. Socal et al., "ATP13A2 missense mutations in juvenile Parkinsonism and young onset Parkinson disease," *Neurology*, vol. 68, no. 19, pp. 1557–1562, 2007.
20. Levin J, Kurz A, Arzberger T, Giese A, Höglinger GU. The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int*. 2016 Feb 5;113(5):61-9. doi: 10.3238/arztebl.2016.0061. PMID: 26900156; PMCID: PMC4782269.
21. Tseng FS, Foo JQX, Mai AS, Tan EK. The genetic basis of multiple system atrophy. *J Transl Med*. 2023 Feb 10;21(1):104. doi: 10.1186/s12967-023-03905-1. PMID: 36765380; PMCID: PMC9912584.
22. Wen Y, Zhou Y, Jiao B, Shen L. Genetics of Progressive Supranuclear Palsy: A Review. *J Parkinsons Dis*. 2021;11(1):93-105. doi: 10.3233/JPD-202302. PMID: 33104043; PMCID: PMC7990399.
23. Arienti F, Lazzeri G, Vizziello M, Monfrini E, Bresolin N, Saetti MC, Picillo M, Franco G, Di Fonzo A. Unravelling Genetic Factors Underlying Corticobasal Syndrome: A Systematic Review. *Cells*. 2021 Jan 15;10(1):171. doi: 10.3390/cells10010171. PMID: 33467748; PMCID: PMC7830591.
24. Taylor JP, McKeith IG, Burn DJ, Boeve BF, Weintraub D, Bamford C, Allan LM, Thomas AJ, O'Brien JT. New evidence on the management of Lewy body dementia. *Lancet Neurol*. 2020 Feb;19(2):157-169. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30153-X. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31519472; PMCID: PMC7017451.
25. Orme T, Guerreiro R, Bras J. The Genetics of Dementia with Lewy Bodies: Current Understanding and Future Directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018 Aug 10;18(10):67. doi: 10.1007/s11910-018-0874-y. PMID: 30097731; PMCID: PMC6097049.
26. Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol*. 2018 Sep;14(9):544-558. doi: 10.1038/s41582-018-0047-2. PMID: 30120348; PMCID: PMC6417666.
27. Souza PV, Pinto WB, Oliveira AS. C9orf72-related disorders: expanding the clinical and genetic spectrum of neurodegenerative diseases. *Arq*

- Neuropsychiatr. 2015 Mar;73(3):246-56. doi: 10.1590/0004-282X20140229. PMID: 25807132.
28. Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics*. 2013 Feb 15;29(4):499-503. doi: 10.1093/bioinformatics/bts725. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23329412; PMCID: PMC3570213.
 29. Reddy K, Zamiri B, Stanley SYR, Macgregor RB Jr, Pearson CE. The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J Biol Chem*. 2013 Apr 5;288(14):9860-9866. doi: 10.1074/jbc.C113.452532. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23423380; PMCID: PMC3617286.
 30. Douglas AGL. Non-coding RNA in C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A perfect storm of dysfunction. *Noncoding RNA Res*. 2018 Sep 10;3(4):178-187. doi: 10.1016/j.ncrna.2018.09.001. Erratum in: *Noncoding RNA Res*. 2020 Nov 07;5(4):219. PMID: 30533567; PMCID: PMC6260478.
 31. Barker HV, Niblock M, Lee YB, Shaw CE, Gallo JM. RNA Misprocessing in C9orf72-Linked Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2017 Jul 11;11:195. doi: 10.3389/fncel.2017.00195. PMID: 28744202; PMCID: PMC5504096.
 32. Beck J, Poulter M, Hensman D, Rohrer JD, Mahoney CJ, Adamson G, Campbell T, Uphill J, Borg A, Fratta P, Orrell RW, Malaspina A, Rowe J, Brown J, Hodges J, Sidle K, Polke JM, Houlden H, Schott JM, Fox NC, Rossor MN, Tabrizi SJ, Isaacs AM, Hardy J, Warren JD, Collinge J, Mead S. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet*. 2013 Mar 7;92(3):345-53. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.01.011. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23434116; PMCID: PMC3591848.
 33. Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, Slegers K, Philtjens S, Kleinberger G, et al. A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-

- amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol.* 2012 Jan;11(1):54-65. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70261-7. Epub 2011 Dec 7. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2012 Feb;11(2):125. PMID: 22154785.
34. Liu Y, Yu JT, Zong Y, Zhou J, Tan L. C9ORF72 mutations in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2014 Feb;49(1):386-98. doi: 10.1007/s12035-013-8528-1. Epub 2013 Aug 10. PMID: 23934648.
35. Budworth H, McMurray CT. A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol.* 2013;1010:3-17. doi: 10.1007/978-1-62703-411-1_1. PMID: 23754215; PMCID: PMC3913379.
36. Schmitz A, Pinheiro Marques J, Oertig I, Maharjan N and Saxena S (2021) Emerging Perspectives on Dipeptide Repeat Proteins in C9ORF72 ALS/FTD. *Front. Cell. Neurosci.* 15:637548. doi: 10.3389/fncel.2021.637548
37. Babić Leko M, Župunski V, Kirincich J, Smilović D, Hortobágyi T, Hof PR, Šimić G. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration Related to *C9orf72* Hexanucleotide Repeat Expansion. *Behav Neurol.* 2019 Jan 15;2019:2909168. doi: 10.1155/2019/2909168. PMID: 30774737; PMCID: PMC6350563.
38. Xi Z, Zinman L, Moreno D, Schymick J, Liang Y, Sato C, Zheng Y, Ghani M, Dib S, Keith J, Robertson J, Rogaeva E. Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a *C9orf72* expansion. *Am J Hum Genet.* 2013 Jun 6;92(6):981-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.017. Epub 2013 May 23. PMID: 23731538; PMCID: PMC3675239.
39. Haeusler AR, Donnelly CJ, Rothstein JD. The expanding biology of the *C9orf72* nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Jun;17(6):383-95. doi: 10.1038/nrn.2016.38. Epub 2016 May 6. PMID: 27150398; PMCID: PMC7376590.
40. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, Margolis J, Peterson M, Markowski TW, Ingram MA, Nan Z, Forster C, Low WC, Schoser B, Somia NV, Clark HB, Schmechel S, Bitterman PB, Gourdon G, Swanson MS, Moseley M, Ranum LP. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A. 2011 Jan 4;108(1):260-5. doi: 10.1073/pnas.1013343108. Epub 2010 Dec 20. PMID: 21173221; PMCID: PMC3017129.
41. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):39-59. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.018. PMID: 17015226.
42. Alsultan AA, Waller R, Heath PR, Kirby J. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2016 May 13;6:49-64. doi: 10.2147/DNND.S84956. PMID: 30050368; PMCID: PMC6053097.
43. Kartanou, C, G. Koutsis, M. Panas, and G. Karadima. 2019. "The genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. An Update." *Archives of Hellenic Medicine*
44. Mok KY, Koutsis G, Schottlaender LV, Polke J, Panas M, Houlden H. High frequency of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat in familial and sporadic Greek ALS patients. *Neurobiol Aging*. 2012 Aug;33(8):1851.e1-5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.021. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22445326; PMCID: PMC3657168.
45. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jul;88(7):540-549. doi: 10.1136/jnnp-2016-315018. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28057713.
46. Olszewska DA, Lonergan R, Fallon EM, Lynch T. Genetics of Frontotemporal Dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016 Dec;16(12):107. doi: 10.1007/s11910-016-0707-9. PMID: 27878525.
47. Bahia VS, Takada LT, Deramecourt V. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: a review. *Dement Neuropsychol*. 2013 Jan-Mar;7(1):19-26. doi: 10.1590/S1980-57642013DN70100004. PMID: 29213815; PMCID: PMC5619540.
48. Van der Zee J, Gijssels I, Dillen L, et al. A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLN: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum Mutat*. 2013 Feb;34(2):363-73. doi: 10.1002/humu.22244. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23111906; PMCID: PMC3638346.

49. Kartanou C, Karadima G, Koutsis G, Breza M, Papageorgiou SG, Paraskevas GP, Kapaki E, Panas M. Screening for the C9ORF72 repeat expansion in a greek frontotemporal dementia cohort. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2018 Feb;19(1-2):152-154. doi: 10.1080/21678421.2017.1400070. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29166782.
50. Hensman Moss DJ, Poulter M, Beck J, Hehir J, Polke JM, Campbell T, et al. C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology.* 2014 Jan 28;82(4):292-9. doi: 10.1212/WNL.000000000000061. Epub 2013 Dec 20. Erratum in: *Neurology.* 2014 May 13;82(19):1753. PMID: 24363131; PMCID: PMC3929197.
51. Koutsis G, Karadima G, Kartanou C, Kladi A, Panas M. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions are a frequent cause of Huntington disease phenocopies in the Greek population. *Neurobiol Aging.* 2015 Jan;36(1):547.e13-6. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.020. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25248608.
52. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011 Mar 19;377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21371747.
53. Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med.* 2016 May;18(5):421-30. doi: 10.1038/gim.2015.117. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26312828; PMCID: PMC4857183.
54. Xi Z, Zinman L, Grinberg Y, Moreno D, Sato C, Bilbao JM, Ghani M, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Morón FJ, Lang AE, Marras C, Bruni A, Colao R, Maletta RG, Puccio G, Rainero I, Pinessi L, Galimberti D, Morrison KE, Moorby C, Stockton JD, Masellis M, Black SE, Hazrati LN, Liang Y, van Haersma de With J, Fornazzari L, Villagra R, Rojas-Garcia R, Clarimón J, Mayeux R, Robertson J, St George-Hyslop P, Rogaeva E. Investigation of c9orf72 in 4 neurodegenerative disorders. *Arch Neurol.* 2012 Dec;69(12):1583-90. doi: 10.1001/archneurol.2012.2016. PMID: 22964832; PMCID: PMC4005900.

55. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium; Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257-68. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944779; PMCID: PMC3200438.
56. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTL/FTL/ALS; ITALSGEN Consortium; Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012 Apr;11(4):323-30. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70043-1. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22406228; PMCID: PMC3322422.

57. Kartanou, Chrisoula & Karadima, Georgia & Koutsis, Georgios & Panas, M.. (2017). The role of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in neurodegenerative diseases. New data from the Greek population. *Archives of Hellenic Medicine*. 34. 460-466.
58. Kartanou C, Kontogeorgiou Z, Rentzos M, Potagas C, Aristeidou S, Kapaki E, Paraskevas GP, Constantinides VC, Stefanis L, Papageorgiou SG, Houlden H, Panas M, Koutsis G, Karadima G. Expanding the spectrum of C9ORF72-related neurodegenerative disorders in the Greek population. *J Neurol Sci*. 2022 Nov 15;442:120450. doi: 10.1016/j.jns.2022.120450. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36252286.
59. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215. PMID: 3344216; PMCID: PMC334765.
60. Kulkarni, Madhusudan & Goel, Sanket. (2020). Advances in continuous-flow based microfluidic PCR devices -A review. *Engineering Research Express*. 2. 1-22. 10.1088/2631-8695/abd287.
61. Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*. 1996 Dec;33(12):1022-6. doi: 10.1136/jmg.33.12.1022. PMID: 9004136; PMCID: PMC1050815.
62. Lesage S, Le Ber I, Condroyer C, Broussolle E, Gabelle A, Thobois S, Pasquier F, Mondon K, Dion PA, Rochefort D, Rouleau GA, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain*. 2013 Feb;136(Pt 2):385-91. doi: 10.1093/brain/aws357. PMID: 23413259; PMCID: PMC3984141.
63. Xi Z, Zinman L, Grinberg Y, Moreno D, Sato C, Bilbao JM, Ghani M, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Morón FJ, Lang AE, Marras C, Bruni A, Colao R, Maletta RG, Puccio G, Rainero I, Pinessi L, Galimberti D, Morrison KE, Moorby C, Stockton JD, Masellis M, Black SE, Hazrati LN, Liang Y, van Haersma de With J, Fornazzari L, Villagra R, Rojas-Garcia R, Clarimón J, Mayeux R, Robertson J, St George-Hyslop P, Rogaeva E. Investigation of c9orf72 in 4 neurodegenerative disorders. *Arch*

Neurol. 2012 Dec;69(12):1583-90. doi: 10.1001/archneurol.2012.2016. PMID: 22964832; PMCID: PMC4005900.

64. Cannas A, Solla P, Borghero G, Floris GL, Chio A, Mascia MM, Modugno N, Muroli A, Orofino G, Di Stefano F, Calvo A, Moglia C, Restagno G, Meloni M, Farris R, Ciaccio D, Puddu R, Vacca MI, Melis R, Murru MR, Tranquilli S, Corongiu D, Rolesu M, Cuccu S, Marrosu MG, Marrosu F. C9ORF72 intermediate repeat expansion in patients affected by atypical parkinsonian syndromes or Parkinson's disease complicated by psychosis or dementia in a Sardinian population. *J Neurol*. 2015 Nov;262(11):2498-503. doi: 10.1007/s00415-015-7873-6. Epub 2015 Aug 15. PMID: 26275564.
65. Snowden JS, Rollinson S, Lafon C, Harris J, Thompson J, Richardson AM, Jones M, Gerhard A, Neary D, Mann DM, Pickering-Brown S. Psychosis, C9ORF72 and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Oct;83(10):1031-2. doi: 10.1136/jnnp-2012-303032. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22832738.