

1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"Μελέτη ασθενών με μη-συνδρομικό αυτισμό με τη μέθοδο του συγκριτικού
γενομικού υβριδισμού aCGH"**



ΚΟΝΤΟΔΙΟΥ ΜΑΡΙΑ Α.Μ.225315

Βιολόγος

ΕΠΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Λωρέττα Θωμαΐδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναπτυξιακής Παιδιατρικής, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"Μελέτη ασθενών με μη-συνδρομικό αυτισμό με τη μέθοδο του συγκριτικού
γενομικού υβριδισμού aCGH"**

ΚΟΝΤΟΔΙΟΥ ΜΑΡΙΑ (Α.Μ.225315)

Βιολόγος

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Κόλλια Παναγούλα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κόλλια Παναγούλα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Αλεπόρου – Μαρίνου Βασιλική

Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής, ΕΚΠΑ

Παπασιδέρη Σ. Ισιδώρα

Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας

ΑΘΗΝΑ 2017

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Μονάδα Αναπτυξιακής Παιδιατρικής της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

Λωρέττα Θωμάϊδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναπτυξιακής Παιδιατρικής,

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ATG Access To Genome IKE Εργαστήριο Γενετικών Αναλύσεων

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΕΝΤΡΟΥ ATG

Δρ. Μανωλάκος Εμμανουήλ, B.Sc., PhD. Specialist in Medical Genetics, ErCLG

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης του μεταπτυχιακού.

Αρχικά θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές του μεταπτυχιακού για την προσπάθεια που κάνουν, παρόλο τις αντίξοες συνθήκες που επικρατούν στη σημερινή εποχή, να φέρουν εις πέρας ένα λειτούργημα που είναι η γαλούχηση νέων επιστημόνων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Διευθύντρια του τμήματος Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη, στην επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παναγούλα Κόλλια και στην Καθηγήτρια Βασιλική Αλεπόρου.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τη Γραμματέα Δήμητρα Αναγνωστοπούλου που με την υπομονή της στάθηκε δίπλα μας καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού.

Πολλές ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Λωρέττα Θωμαΐδου καθώς επίσης και τα κορίτσια στη Μονάδα Αναπτυξιακής Παιδιατρικής της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Μανώλη Μανωλάκο, Διευθυντή του Κέντρου ATG, για την στήριξη και καθοδήγηση που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της εργασίας καθώς και τους συναδέλφους μου Έφη Παππά και Βασίλη Πασπαλιάρη για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος δεν υπάρχουν λόγια για να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τη μητέρα μου, τον αδελφό μου και ιδιαίτερα τον σύζυγο μου Αλέξανδρο, για την αμέριστη υποστήριξή τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Αθήνα

ΣΠΟΥΔΕΣ

2006 Απόφοιτος του Università degli studi di Napoli “Federico II” του τμήματος Βιολογικών Επιστημών, με ειδικότητα στη Μοριακή Βιολογία, με βαθμολογία 90 στα 110.

Κατά την διάρκεια των πτυχιακών μου σπουδών εκπόνησα την διπλωματική εργασία με θέμα “ Ο κίνδυνος του θορύβου στα μέσα μεταφοράς στη σιδηροτροχιά της πόλης της Νάπολι” στο Τμήμα Υγιεινής Περιβάλλοντος, του πανεπιστημίου της Napoli “Federico II”.

1994 Απόφοιτος του 2^{ου} Λυκείου Γλυφάδας

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ :

1/2015- έως σήμερα: ATG Υπεύθυνη Τμήματος Κυτταρογενετικής (Καλλιέργεια κυττάρων, ανάλυση καρυοτύπου χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε εμβρυικά κύτταρα 1.αμνιακό υγρό 2.χοριακές λάχνες 3.εμβρυϊκό αίμα, καθώς και στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών και σε προϊόντα αποβολών).

10/2008-12/2014: Eurogenetica SA Πρότυπο Κέντρο Ερευνών & Εφαρμογών Μοριακής Βιολογίας, **Τμήμα Κυτταρογενετικής** (Καλλιέργεια κυττάρων, ανάλυση καρυοτύπου χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε εμβρυικά κύτταρα 1.αμνιακό υγρό 2.χοριακές λάχνες 3.εμβρυϊκό αίμα, καθώς και στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών και σε προϊόντα αποβολών) και Τμήμα Μοριακής Βιολογίας (μέθοδος DNA extraction).

9/2007-9/2008 : Genomedica Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής **Τμήμα Κυτταρογενετικής** (Καλλιέργεια κυττάρων, ανάλυση καρυοτύπου χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε εμβρυικά κύτταρα 1.αμνιακό υγρό 2.χοριακές λάχνες 3.εμβρυϊκό αίμα, καθώς και στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών και σε προϊόντα αποβολών).

2/2007-8/2007: Εργάστηκα αμμισθή στο **Γενικό Νοσοκομείο Αλεξάνδρα**, στα τμήματα Βιοχημικό και Ενδοκρινολογικό

ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ :

MS-OFFICE (Word, Excel, Powerpoint, Outlook), Internet

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ :

Αγγλικά (Lower Certificate of English Cambridge)

Γαλλικά (Επίπεδο Certificate de Langue Français)

Ιταλικά Άριστη γνώση (προφορική, γραπτή)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ :

2015 Complex Rearrangement Involving Three Chromosomes, Four Breakpoints and a 2.7-Mb Deletion in the 18q Segment Observed in a Girl with Mild Learning Difficulties.

Kontodiou M, Daskalakis G, Vetro A, Paspaliaris V, Papaioannou G, Dagklis T, Tsakiridis I, Ziegler M, Liehr T, Thomaidis L, Papoulidis I, Manolakos E.

Cytogenet Genome Res. 2015;147(2-3):118-23. doi: 10.1159/000442583.

2014 A de novo 2.9 Mb interstitial deletion at 13q12.11 in a child with developmental delay accompanied by mild dysmorphic characteristics.

Lagou M, Papoulidis I, Orru S, Papadopoulos V, Daskalakis G, **Kontodiou** M, Anastasakis E, Petersen MB, Kitsos G, Thomaidis L, Manolakos E.

Mol Cytogenet. 2014 Dec 3;7(1):92. doi: 10.1186/s13039-014-0092-5.

2014 Prenatal detection of TAR syndrome in a fetus with compound inheritance of an RBM8A SNP and a 334-kb deletion: a case report.

Papoulidis I, Oikonomidou E, Orru S, Siomou E, Kontodiou M, Eleftheriades M, Bacoulas V, Cigudosa JC, Suela J, Thomaidis L, Manolakos E.

Mol Med Rep. 2014 Jan;9(1):163-5. doi: 10.3892/mmr.2013.1788.

2012 Dual testing with QF-PCR and karyotype analysis for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Evaluation of 13,500 cases with consideration of using QF-PCR as a stand-alone test according to referral indications.

Papoulidis I, Siomou E, Sotiriadis A, Efstathiou G, Psara A, Sevastopoulou E, Anastasakis E, Sifakis S, Tsiligianni T, Kontodiou M, Malamaki C, Tzimina M, Petersen MB, Manolakos E, Athanasiadis A.

Prenat Diagn. 2012 Jul;32(7):680-5. doi: 10.1002/pd.3888. Epub 2012 Apr 18.

2012 Tetrasomy 9p Mosaicism Associated with a Normal Phenotype in Two Cases. Papoulidis I, Kontodiou M, Tzimina M, Saitis I, Hamid AB, Klein E, Kosyakova N, Kordaß U, Kunz J, Siomou E, Nicolaides P, Orru S, Thomaidis L, Liehr T, Petersen MB, Manolakos E.

Cytogenet Genome Res. 2012;136(4):237-41

2012 Prenatal diagnosis of Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed by comparative genomic hybridization array: report of two cases and review of the literature

Stavros Sifakis, Emmanouil Manolakos, Annalisa Vetro, Dimitra Kappou, Panagiotis Peitsidis, Maria Kontodiou, Antonios Garas, Nikolaos Vrachnis, Anastasia Konstandinidou, Orsetta Zuffardi, Sandro Orru and Ioannis Papoulidis.

Mol Cytogenet. 2012; 5: 12. Published online 2012 February 28

2009 Characterization of a prenatally assessed de novo supernumerary minute ring chromosome 20 in a phenotypically normal male.

Kitsiou-Tzeli S, Manolakos E, Lagou M, Kontodiou M, Kosyakova N, Ewers E, Weise A, Garas A, Orru S, Liehr T, Metaxotou A.

Mol Cytogenet. 2009 Jan 7;2:1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Περιγραφή
2. Κλινικά Χαρακτηριστικά
3. Κληρονομικότητα
4. Γενετική ετερογένεια του Αυτισμού
5. Μοριακή Γενετική
6. Γενετικά και Μεταβολικά Σύνδρομα
7. Σκόπος

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

2. Μέθοδοι

- 2.1. Μοριακή Μελέτη με Συγκριτικό Γενωμικό Υβριδισμό με Μικροσυστοιχίες (aCGH)
 - 2.1.1 Μεθοδολογία
 - 2.1.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα σε θάλαμο Νηματικής Ροής (Biosefety Cabinet, Biobase, BSC1500IIA2-X)
 - 2.1.3 Πρακτικό μέρος
 - 2.1.4 Fluorescent Labeling of DNA
 - 2.1.5 Purification of labeled DNA
 - 2.1.6 Hybridization of Labeled DNA
 - 2.1.7 Microarray Wash
 - 2.1.8 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
 - 2.1.9 Εναλλακτικές μέθοδοι για ανίχνευση ανισοζυγιών
- 2.2. Κυταρογενετική και Μοριακή Κυταρογενετική Μελέτη
 - 2.2.1 Κλασσική κυταρογενετική ανάλυση – καρυότυπος
 - 2.2.2 Μοριακή κυταρογενετική ανάλυση με φθορίζοντα in situ Υβριδισμό (FISH)

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόλογος:

Ο αυτισμός αποτελεί ένα σύνολο διαταραχών νευρολογικής φύσεως, με ισχυρή γενετική βάση. Το φάσμα του περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

- Διάχυτη Αναπτυξιακή Διαταραχή Μη Προσδιορισμένη αλλιώς, η οποία περιλαμβάνει τον άτυπο αυτισμό
- Αυτισμός
- Σύνδρομο Asperger
- Σύνδρομο Rett
- Αποδιοργανωτική διαταραχή της παιδικής ηλικίας

Τελευταίες επιδημιολογικές μελέτες αναφέρουν ότι ο αυτισμός είναι μια συχνή διαταραχή η οποία παρατηρείται σε 1 παιδί ανά 500. (www.orpha.net/)

Γι' αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα να συσχετίσουν διάφορους γενετικούς τόπους με την αιτία του αυτισμού.

Μεθοδολογία:

Μετά την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος αναπτύχθηκε μια καινούργια τεχνική, ο Συγκριτικός Γενομικός Έλεγχος (Array-CGH) ή Μοριακός Καρυότυπος.

Με την μέθοδο αυτή οι μικροσυστοιχίες που θα χρησιμοποιηθούν επιτρέπουν τόσο τη διερεύνηση των αλλαγών του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιώματος, όσο και την αποκάλυψη χρωμοσωμικών περιοχών όπου παρατηρούνται φαινόμενα απώλειας ετεροζυγωτίας.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει ένα πρωτόκολλο τεσσάρων ημερών με επιμέρους βήματα. Συγκεκριμένα κατά την πρώτη ημέρα καθαρό γενομικό DNA πέπτεται με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων Nsp1 και Sty1. Για την απομόνωση του DNA τόσο από ολικό αίμα χρησιμοποιείται το Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega, USA) σε μηχανήμα Maxwell® 16 Instrument (Promega, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθεί σύνδεση των προϊόντων της πέψης με ειδικές αλληλουχίες και ενίσχυση του συνόλου του DNA με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών και χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τη δεύτερη μέρα τα προϊόντα που προέκυψαν καθαρίζονται και εν συνεχεία πέπτονται ενζυμικά σε μικρού μήκους αλληλουχίες, οι οποίες και σημαίνονται τελικώς και πάλι με τη βοήθεια ενζύμου. Την τρίτη ημέρα πραγματοποιείται ο υβριδισμός του δείγματος με την μικροσυστοιχία, ενώ την

τελευταία ημέρα λαμβάνει χώρα το ξέπλυμα, η χρώση και τέλος η σάρωση της μικροσυστοιχίας. Η ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν γίνεται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού.

Σκοπός:

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να πραγματοποιηθεί γενετικός έλεγχος εφαρμόζοντας μοριακές τεχνικές aCGH σε δείγματα διαγνωσμένων αυτιστικών παιδιών, στα οποία έχει προηγηθεί εργαστηριακός έλεγχος με αποκλεισμό κάποιου οργανικού νοσήματος και να γίνει συσχέτιση γονοτύπου -φαινοτύπου.

ABSTRACT

Introduction:

Autism is characterized by a broad range of neurological disruptions with a strong genetic basis.

The range includes the following categories:

- Pervasive Developmental Disorder not otherwise identified, comprising the atypical autism
- Autism
- Asperger Syndrome
- Rett Syndrome
- Disintegrative disorder of childhood

Recent epidemiological studies suggest that autism is a common disorder that occurs in 1 child per 500 (www.orpha.net/).

Therefore, nowadays there is an effort by the international scientific community to relate different loci on the cause of autism.

Methodology:

The deciphering of human genome promotes the development of molecular techniques. Array Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH) or Molecular karyotype is a high resolution and sensitive analysis. Array-CGH reveals the changes at the number of genomic copies and the disclosure of chromosomal regions which are observed heterozygosity loss phenomena. The experimental procedure includes a four-day protocol with individual steps. To isolate the DNA from both whole blood will be used commercial το Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega, USA) σε μηχανήμα Maxwell® 16 Instrument (Promega, USA), according to manufacturer's instructions. The extracted DNA will be digested by restriction enzymes (Nsp1, Sty1). Followed by ligation of the digestion products with specific sequences and amplification of total DNA using specific primers and the use of polymerase chain reaction method. On the second day the products obtained will be purified and then digested enzymatically into short sequences. Then the DNA will be labeled. On the third day hybridization of the sample with the microarray will be processed. Finally, the fluorescence will be detected by specific equipment. The analysis of the resulting data is made with the help of special software.

Aim:

The aim of this study is to perform genetic testing applying molecular techniques, aCGH, in samples from diagnosed autistic children- in which a prior laboratory analysis excludes an organic disease- and to correlate the phenotype- genotype characteristics.

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Περιγραφή

Ο αυτισμός είναι μια πολύπλοκη αναπτυξιακή διαταραχή και είναι συνήθως εμφανής από 3 ετών αν και πρόσφατη έρευνα μειώνει σημαντικά την ηλικία διάγνωσης, φτάνοντας στην ηλικία των 6 μηνών. Η συγκεκριμένη διαταραχή εμποδίζει ή δυσκολεύει την ανάπτυξη κοινωνικών δεξιοτήτων, κυρίως επικοινωνίας και συμπεριφοράς που είναι υψίστης σημασίας για την ορθή κοινωνική επάρκεια του ατόμου. Χαρακτηρίζεται από μια τριάδα χαρακτηριστικών, περιορισμένη ή απύσχα λεκτική επικοινωνία, έλλειψη αμοιβαίας κοινωνικής αλληλεπίδρασης ή ανταπόκρισης, και περιορισμένα ενδιαφέροντα με επαναλαμβανόμενη και στερεότυπη συμπεριφορά. (Bailey et al, 1996. Risch et al., 1999).

Ο αυτισμός προσδιορίστηκε πρώτη φορά το 1943 από τον Dr. Leo Kanner του νοσοκομείου John Hopkins. Ένα χρόνο μετά, ο Γερμανός επιστήμονας Dr. Hans Asperger, στοιχειοθέτησε μία ηπιότερη μορφή της διαταραχής που είναι γνωστή ως το Σύνδρομο Asperger το οποίο και καθιερώθηκε το 1981 από την Dr. Lorna Wing, μια Αγγλίδα ψυχίατρο. Η Dr. Wing δημοσίευσε ένα ακαδημαϊκό έγγραφο που λεγόταν Asperger's Syndrome: a Clinical Account, το οποίο επανάφερε την έρευνα που είχε κάνει ο Hans Asperger και καθιέρωσε έτσι την επωνυμία για την περιγραφή της συγκεκριμένης διαταραχής.

Η 'Διαταραχή του φάσματος του αυτισμού' (ΔΑΦ) που μερικές φορές αναφέρεται ως ASD (Autism Spectrum Disorder), είναι ένας ευρύτερος φαινότυπος που περιλαμβάνει και λιγότερο σοβαρές διαταραχές, όπως το Σύνδρομο Asperger (OMIM ASPG1 608638) και τη Διάχυτη Αναπτυξιακή Διαταραχή Μη Αλλιώς Προσδιοριζόμενη, ή αλλιώς Άτυπος Αυτισμός (PDD-NOS) (Pervasive Developmental Disorder-Not Otherwise Specified). Ο 'Ευρύς φαινότυπος του αυτισμού' περιλαμβάνει άτομα με κάποια συμπτώματα του αυτισμού τα οποία δεν πληρούν τα πλήρη κριτήρια του αυτισμού ή άλλων διαταραχών.

Περίπου στα δύο τρίτα των ατόμων με ΔΑΦ συνυπάρχει και νοητική υστέρηση, εκτός από το σύνδρομο Asperger που είναι εμφανώς απύσχα (Jones et al., 2008).

Η ομάδα του Levy το 2009 έκανε μια γενική επισκόπηση της διαταραχής του φάσματος του αυτισμού συμπεριλαμβανομένης της επιδημιολογίας, τα χαρακτηριστικά της διαταραχής, τη

διάγνωση, νευροβιολογικές υποθέσεις για τις αιτίες, της γενετικής και πιθανότητες θεραπείας (Levy et al., 2009).

Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν γίνει προσπάθειες διαχωρισμού του φάσματος του αυτισμού σε υποκατηγορίες, όπως αυτές του αποκαλούμενου ως "Υψηλής Λειτουργικότητας Αυτισμού", όπου τα άτομα έχουν υψηλές επιδόσεις χωρίς να εμφανίζουν αυτά καθαυτά τα συμπτώματα του Συνδρόμου Asperger ή του χαμηλά λειτουργικού αυτισμού, του συνδρομικού αυτισμού και του μη- συνδρομικού αυτισμού. Η έννοια μη- συνδρομικός αυτισμός χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια κλινική κατάσταση όπου ο Αυτισμός είναι η αρχική διάγνωση και όχι μέρος μιας πολύπλοκης αναπτυξιακής διαταραχής.

2. Κλινικά χαρακτηριστικά

Πολλές σχετιζόμενες διαταραχές έχουν ομαδοποιηθεί κάτω από τον όρο «Διάχυτες Αναπτυξιακές Διαταραχές» (P.D.D. στην Αγγλική), μια γενική κατηγορία διαταραχών που χαρακτηρίζονται από διάφορες και διάχυτες αναπηρίες σε διάφορες περιοχές της ανάπτυξης (Αμερικάνικος Ψυχιατρικός Σύλλογος 1994). Μια πηγή είναι το Diagnostic & Statistical Manual (DSM), ένα διαγνωστικό βιβλίο που βρίσκεται στην 4η έκδοσή του. Στο DSM-IV καταγράφονται κριτήρια που συναντώνται για μια εξειδικευμένη διάγνωση κάτω από την κατηγορία των «Διάχυτων Αναπτυξιακών Διαταραχών». Η διάγνωση τίθεται όταν εμφανίζεται ένας συγκεκριμένος αριθμός χαρακτηριστικών που αναφέρονται στο DSM-IV και στο ICD-10 (International Classification of Diseases) του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (WHO). Το πρώτο χρησιμοποιείται κυρίως στις ΗΠΑ ενώ το δεύτερο είναι διαδεδομένο στην Ευρώπη, όμως και τα δύο συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλάξ. Οι διαγνωστικές αξιολογήσεις βασίζονται στην παρουσία συγκεκριμένων συμπεριφορών που στηρίζονται στην παρατήρηση και μέσω των παρατηρήσεων της οικογένειας και πρέπει να τεθεί από εξειδικευμένη και υψηλά εκπαιδευόμενη ομάδα. Σε γενικές γραμμές, οι ασθενείς με αυτισμό παρουσιάζουν ποιοτικά μειωμένη κοινωνική αλληλεπίδραση, που εκδηλώνεται με δυσλειτουργία στη χρήση μη λεκτικής συμπεριφοράς, όπως τη βλεμματική επαφή, έκφραση του προσώπου, στάσεις του σώματος και χειρονομίες, με την αποτυχία να αναπτυχθούν οι κατάλληλες σχέσεις με τους συνομήλικους, και την έλλειψη του κοινωνικού καταμερισμού ή αμοιβαιότητας. Οι ασθενείς έχουν προβλήματα στην επικοινωνία, όπως καθυστέρηση, ή συνολική έλλειψη στην ανάπτυξη της προφορικής γλώσσας. Σε ασθενείς που αναπτύσσουν επαρκή ομιλία, εξακολουθεί να υπάρχει ποιοτικά μειωμένη ικανότητα να

ξεκινήσουν ή να διατηρήσουν μια συνομιλία, καθώς και στερεότυπη ή ιδιοσυγκρασιακή χρήση της γλώσσας. Οι ασθενείς επίσης εμφανίζουν περιορισμένη, επαναλαμβανόμενη και πρότυπα στερεότυπη συμπεριφοράς, ενδιαφερόντων και δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των μη φυσιολογικών ενασχολήσεων με ορισμένες δραστηριότητες και επίμονη εμμονή σε ρουτίνες ή τελετουργίες.

Τα άτομα που διαγιγνώσκονται κάτω από τον όρο των «διάχυτων αναπτυξιακών διαταραχών» στο DSM-IV παρουσιάζουν ομοιότητες στην επικοινωνία και κοινωνικοποίηση, αλλά διαφέρουν στα δεδομένα της ποικιλίας. Υπογραμμίζουμε κάποια βασικά πρώτιστα σημεία που μας βοηθούν να ξεχωρίσουμε τις διαφορές μεταξύ των εξειδικευμένων διαγνώσεων :

Αυτιστική Μη-Λεκτική Διαταραχή : Σοβαρές δυσλειτουργίες στην κοινωνική αλληλεπίδραση , τη λεκτική και το συμβολικό παιχνίδι, που εμφανίστηκαν πριν από την ηλικία των 3 ετών. Στερεοτυπική εκδήλωση συμπεριφορών, ενδιαφερόντων και δράσεων. Συνοδεύεται από ιδιαίτερες συμπεριφορές όπως στερεοτυπική και εμμονική ενασχόληση με αντικείμενα ενδιαφέροντα και πράξεις.

Διαταραχή Asperger : Χαρακτηρίζεται από μειονεξία στην κοινωνική δι-αντίδραση και την εμφάνιση περιορισμένων ενδιαφερόντων και δράσεων, χωρίς σημαντική κλινική καθυστέρηση λόγου και μέση ή ανώτερη φυσιολογική νοημοσύνη.

Διάχυτη Αναπτυξιακή Διαταραχή, Μη Αλλιώς Προσδιοριζόμενη (Pdd-Nos) (Συχνά Αναφερόμενη Ως Άτυπος Αυτισμός) : Η διάγνωση αυτή μπορεί να τεθεί όταν το παιδί δεν απαντά στα κριτήρια για εξειδικευμένη διάγνωση, αλλά υπάρχει ποικιλία και διάχυτη αναπηρία σε ειδικές συμπεριφορές.

Διαταραχή Rett : Μια προϊούσα διαταραχή η οποία ως τώρα έχει εμφανιστεί μόνο σε κορίτσια. Αναφέρεται περίοδος φυσιολογικής ανάπτυξης και μετά απώλεια προγενέστερων ικανοτήτων που είχε αποκτήσει, απώλεια της σκόπιμης χρήσης των χεριών που αντικαθίστανται με επαναλαμβανόμενες κινήσεις των χεριών ξεκινώντας στην ηλικία των 1-4 ετών.

Παιδική Αποδιοργανωτική Διαταραχή : Χαρακτηριζόμενη από φυσιολογική ανάπτυξη μέχρι το λιγότερο τα πρώτα 2 έτη, έκδηλη απώλεια προγενέστερων αποκτημένων ικανοτήτων.

Ο αυτισμός είναι μια φασματική διαταραχή. Με άλλα λόγια, τα συμπτώματα και χαρακτηριστικά του αυτισμού μπορεί να εμφανιστούν με μεγάλη ποικιλία συνδυασμών, από ελαφριά έως ποικίλα. Παρότι ο αυτισμός διασαφηνίζεται από συγκεκριμένο σετ συμπεριφορών, τα παιδιά και οι ενήλικες μπορεί να εμφανίσουν οποιοδήποτε συνδυασμό των συμπεριφορών σε οποιοδήποτε

βαθμό ποικιλίας. Δύο παιδιά με την ίδια διάγνωση μπορεί να αντιδρούν πολύ διαφορετικά και να ποικίλλουν οι δράσεις τους.

Μια πρωτοπόρος περιγραφή του παιδικού αυτισμού από τον Kanner ορίζει τη διαταραχή ως «μια έμφυτη αδυναμία να αναπτύξουν τη συνήθη, βιολογικά καθορισμένη, συναισθηματική επαφή με τους ανθρώπους." Σημείωσε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η συμπεριφορά του παιδιού ήταν ανώμαλη από την πρώιμη παιδική ηλικία, και πρότεινε την παρουσία ενός εκ γενετής, προφανώς γενετικού, ελαττώματος (Kanner, 1943) .

Ο Smalley ανέφερε ότι νοητική υστέρηση είναι παρούσα περίπου στο 75% των περιπτώσεων του αυτισμού, οι επιληπτικές κρίσεις σε ποσοστό 15 έως 30% των περιπτώσεων, και οι ηλεκτροεγκεφαλογραφικές ανωμαλίες στο 20 έως 50% των περιπτώσεων (Smalley, 1997).

Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό των ατόμων που εμφανίζουν ΔΑΦ συνοδεύεται με μεγαλοκεφαλία [περίμετρος κεφαλής (ΠΚ)>97η εκατοστιαία θέση (ΕΘ)] και απαντάται στο 15-35% των παιδιών με αυτισμό και αντιστοιχεί σε πρώιμη αύξηση του μεγέθους του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, παθολογοανατομικές μελέτες έχουν αναδείξει ακόμη και 80% μεγαλύτερο αριθμό νευρώνων στο προμετωπιαίο φλοιό παιδιών με αυτισμό (Williams et al, 2008; Courchesne et al, 2011).

Η διαταραχή του φάσματος του αυτισμού είναι πιο συχνή στα αγόρια σε σύγκριση με τα κορίτσια σε αναλογία 4-10:1 και δεν έχει επιλεκτικότητα σε φυλές, εθνικότητες και κοινωνικές ομάδες.

Σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου Διαταραχών και Πρόληψης υπάρχει αύξηση των ποσοστών αναλογίας του αυτισμού και υπολογίζεται ότι εμφανίζεται σε ποσοστό 1: 68 των γεννήσεων στις ΗΠΑ και σχεδόν 1: 54 στους άρρενες (ADDM autism prevalence report αναφορά του 2014) από 1: 125 που ανερχόταν το 2004.

Η ομάδα του Lainhart, ανέφερε ότι περίπου το 20% των παιδιών με αυτισμό φαίνεται να έχουν σχετικά φυσιολογική ανάπτυξη κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 έως 24 μηνών της ζωής τους. Αυτή η περίοδος της σχετικής ομαλότητας σταδιακά ή ξαφνικά τελειώνει και ακολουθείται από μια περίοδο υποχώρησης, που χαρακτηρίζεται κυρίως από σημαντική απώλεια των γλωσσικών δεξιοτήτων, μετά την οποία το σύνδρομο πλήρους αυτισμού γίνεται εμφανές,(Lainhart et al., 2002).

Σπάνια, τα παιδιά με αυτισμό μπορεί να εμφανίζουν υπερλεξία (hyperlexia), ή πρώιμη ανάγνωση (238350), εντούτοις μεταξύ μιας ομάδας 66 παιδιών με διάχυτη αναπτυξιακή διαταραχή, η ομάδα του Burd προσδιόρισε 4 με υπερλεξία (hyperlexia) (Burd et al., 1985).

Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί και η 5η Έκδοση του Διαγνωστικού και Στατιστικού Εγχειριδίου Ψυχικών Διαταραχών (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5, DSM-5) της Αμερικάνικης Ψυχιατρικής Ένωσης (American Psychiatric Association, APA) [APA, 2013]. Τα διαγνωστικά κριτήρια του DSM-V δημοσιεύτηκαν το Μάιο του 2013 αντικαθιστώντας τα προγενέστερα, της 4ης έκδοσης του Διαγνωστικού και Στατιστικού Εγχειριδίου Ψυχικών Διαταραχών (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, DSM-IV) [APA, 1994], που ίσχυαν επί περίπου 20 χρόνια. Η δημοσίευση του DSM-V έφερε σημαντικές αλλαγές, όχι μόνο στη διάγνωση, αλλά και στην αντίληψη της έννοιας του αυτισμού.

Η πρώτη σημαντική αλλαγή είναι ότι οι ΔΑΦ περιλαμβάνουν στον αυτισμό, τις διαταραχές Rett και Asperger, την παιδική αποδιοργανωτική διαταραχή και τη Διάχυτη Αναπτυξιακή Διαταραχή Μη Αλλιώς Καθοριζόμενη [APA, 1994]. Στο DSM-V καταργήθηκαν οι υποδιαγνώσεις του συνδρόμου Asperger, της Παιδικής Αποδιοργανωτικής Διαταραχής και της Διάχυτης Αναπτυξιακής Διαταραχής Μη Αλλιώς Καθοριζόμενης, οι οποίες πλέον εντάσσονται στο φάσμα του αυτισμού (εφόσον, φυσικά, οι ασθενείς πληρούν τα νέα κριτήρια). Επιπλέον, από το φάσμα αφαιρέθηκε το σύνδρομο Rett.

Η δεύτερη σημαντική αλλαγή αφορά στη γνωστή τριάδα του αυτισμού, που περιλαμβάνει τις διαταραχές της κοινωνικής αλληλεπίδρασης, της επικοινωνίας και της φαντασίας. Ενώ τα κριτήρια στο DSM-IV βασίζονται εξολοκλήρου στην τριάδα, τα κριτήρια του DSM-V ταξινομήθηκαν σε δύο κατηγορίες: της κοινωνικής επικοινωνίας/αλληλεπίδρασης και της φαντασίας (επαναλαμβανόμενες, στερεοτυπικές συμπεριφορές) (Wing & Gould, 1979). Επιπλέον, στη δεύτερη κατηγορία κριτηρίων προστέθηκαν οι αισθητηριακές διαταραχές, είτε αυτές εμφανίζονται ως υπερ- ή ως υποαπαντητικότητα στα αισθητηριακά ερεθίσματα.

Η τρίτη, και τελευταία, διαφορά αφορά στην προσθήκη κλίμακας βαρύτητας για καθένα από τα δύο πεδία διαταραχών. Σε αντίθεση με το DSM-IV (που δεν αναφερόταν στη βαρύτητα των ΔΑΦ), το DSM-V καθορίζει τη βαρύτητα, σύμφωνα με την ανάγκη του ατόμου για στήριξη ξεχωριστά στον τομέα της κοινωνικής επαφής και στον τομέα των στερεοτυπικών συμπεριφορών.

Το DSM-V επικρίθηκε αρκετά πριν και μετά την επίσημη έκδοσή του. Οι κυριότεροι προβληματισμοί σχετίζονται με την κατάργηση της διάγνωσης του συνδρόμου Asperger, του συνδρόμου Rett και στη μη χρήση της κλασικής τριάδας.

3. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε δίδυμα αδέρφια, μονοζυγωτικά και διζυγωτικά, στην προσπάθεια να καθορίσουν την κληρονομικότητα της ΔΑΦ η οποία υπολογίστηκε γύρω στο 85-92%.

Για πρώτη φορά το 1977, διεξήχθη η πρώτη μελέτη συννοσηρότητας διδύμων από τους Folstein & Rutter στη Μ. Βρετανία, (Folstein & Rutter, 1977). Οι Folstein και Rutter μελετώντας 21 δίδυμα ζευγάρια του ίδιου φύλου, 11 μονοζυγωτικά (MZ) και 10 διζυγωτικά (DZ), στα οποία τουλάχιστον το ένα παιδί είχε παιδικό αυτισμό, βρήκαν ποσοστό 36% αντιστοιχίας για ΔΑΦ μεταξύ των MZ και καμία αντιστοιχία μεταξύ των DZ. Η αντιστοιχία για τις γνωστικές διαταραχές ήταν 82% για τα ζευγάρια MZ και 10% για τα ζευγάρια DZ. Σε 12 από τα 17 δίδυμα μη αντιστοιχίας για τον αυτισμό, εντοπίστηκε ένα βιολογικός κίνδυνος αιτία που ενδέχεται να προκάλεσε την βλάβη στον εγκέφαλο. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το εγκεφαλικό τραύμα στη νηπιακή ηλικία μπορεί να οδηγήσει σε αυτισμό μόνο του ή σε συνδυασμό με γενετική προδιάθεση.

Στη συνέχεια ακολούθησαν πολλαπλές μελέτες με ποσοστά 36-96% για μονοζυγωτικούς και 0-24% για διζυγωτικούς διδύμους. Η σημαντική διακύμανση οφείλεται σε μεθοδολογικές διαφορές μεταξύ των μελετών, κυρίως αναφορικά με τα κριτήρια διάγνωσης, που ποικίλλαν από αυστηρά μέχρι ιδιαίτερος διευρυσμένα (Ronald & Hoekstra, 2011). Μάλιστα, δύο μελέτες της τελευταίας δετίας ανέφεραν ακόμη υψηλότερα ποσοστά (συνολικά για τις ΔΑΦ) που άγγιζαν το 88-95% για τους μονοζυγωτικούς και το 31% για τους διζυγωτικούς διδύμους (Tanai et al, 2008; Rosenberg et al, 2009).

Σε άλλη έρευνα που περιελάβανε 40 ζεύγη διδύμων, η ομάδα του Ritvo βρήκαν ένα ποσοστό αντιστοιχίας για τον αυτισμό της τάξης του 23,5% στα διζυγωτικά δίδυμα (4 από 17 ζεύγη) και 95,7% σε μονοζυγωτικά δίδυμα (22 ή 23 ζεύγη) το οποίο διαπιστώθηκε και σε έρευνα με 46 οικογένειες με 2(δίδυμα) και 3(τρίδυμα) αδέρφια με αυτισμό. Ακόμα και εν απουσία μιας βασικής γενετικής διάγνωσης η πιθανότητα εμφάνισης της διαταραχής του αυτισμού σε επόμενη εγκυμοσύνη αυξάνεται με τον αριθμό των νοσούντων αδελφών, (Ritvo et al., 1985) .

Η ομάδα του Jorde χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Utah Genealogical Database, προσδιόρισε τη συγγένεια για όλα τα δυνατά ζεύγη των αυτιστικών ατόμων. Ο μέσος συντελεστής συγγένειας για τα αυτιστικά άτομα και οι έλεγχοι έδειξαν μια ισχυρή τάση του αυτισμού να συγκεντρώνεται σε οικογένειες. Ωστόσο, η οικογενειακή συνάθροιση περιοριζόταν αποκλειστικά

σε συγγενή ζεύγη και δεν επεκτείνεται σε πιο μακρινούς συγγενείς. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ευρήματα απέκλεισαν υπολειπόμενη κληρονομικότητα, αφού το αυτοσωματικό υπολειπόμενο δεν μπορούσε να προβλέψει αρκετά ζεύγη πρώτων ξαδέρφων, εκ των οποίων δεν βρέθηκε κανένας. Το ρίσκο για τον κίνδυνο διάγνωσης αυτισμού σε συγγενείς, καθώς και για αδέρφια είναι 4,5%, σύμφωνα με πολυπαραγοντικές αιτίες (Jorde et al., 1990).

Με την ανάλυση 99 εξεταζομένων αυτιστικών προγόνων και των οικογενειών τους, η ομάδα του Bolton βρήκαν αυξημένο κίνδυνο οικογενούς τόσο για τον αυτισμό όσο και μια πιο ευρεία έννοια, διάχυτων αναπτυξιακών διαταραχών σε αδέρφια, 2,9% και 2,9%, αντίστοιχα, ο οποίος είναι περίπου 75 φορές υψηλότερος από τον κίνδυνο στο γενικό πληθυσμό (Bolton et al., 1994).

Σε 27 ζευγάρια του ίδιου φύλου των μονοζυγωτικών διδύμων και 20 διζυγωτικά δίδυμα, η ομάδα του Bailey, βρήκαν ότι το 60% των μονοζυγωτικών διδύμων συμφωνούσαν για αυτισμό σε σύγκριση με 0% των διζυγωτικών διδύμων. Όταν θεωρείται ένα ευρύτερο φάσμα των συναφών γνωστικών ή κοινωνικών ανωμαλιών, το 92% των μονοζυγωτικών διδύμων συμφωνούσαν σε σύγκριση με το 10% των διζυγωτικών διδύμων. Η υψηλή αντιστοιχία μονοζυγωτικών έδειξε υψηλό βαθμό γενετικού ελέγχου, και ραγδαία πτώση στα ποσοστά της αντιστοιχίας σε διζυγωτικά σύμφωνα με το μοντέλο που παρουσιάστηκε από την ομάδα. Στα μονοζυγωτικά ζεύγη διδύμων τα οποία δεν τοποθετήθηκαν στο ίδιο εύρος φάσματος του αυτισμού, υπήρχε μια σημαντικά υψηλότερη συχνότητα των μαιευτικών επιπλοκών, που οι συγγραφείς απέδωσαν σε προγεννητικές αναπτυξιακές ανωμαλίες, όπως αποδεικνύεται από την πολύ υψηλή συχνότητα εμφάνισης ήσσονος συγγενών ανωμαλιών στα προσβεβλημένα δίδυμα. Ανέφεραν, επίσης, μια συσχέτιση του αυτισμού με αυξημένη περίμετρο κεφαλής, (Bailey et al., 1995).

Σε ένα δείγμα οικογενειών που επιλέχθηκαν, επειδή καθεμία είχε ακριβώς 2 προσβεβλημένα αδέρφια, η ομάδα του Greenberg παρατήρησε ένα εντυπωσιακά υψηλό ποσοστό των προσβεβλημένων διδύμων, τόσο MZ όσο και DZ. Από 166 προσβεβλημένα δίδυμα, 30 (12 MZ, 17 DZ, και 1 άγνωστης ζυγωτίας) ήταν δίδυμα ζεύγη. Η απόκλιση από τις αναμενόμενες τιμές ήταν στατιστικά σημαντική, σε παρόμοιο εξακριβωθεί δείγμα των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (222.100), δεν υπήρχε απόκλιση από τις αναμενόμενες τιμές, η ομάδα σημείωσε ότι για να αποδώσουν την περίσσεια των διδύμων με αυτισμό αποκλειστικά για την διαπίστωση θα απαιτούνταν πολύ περισσότεροι διαπιστομένοι παράγοντες, π.χ., σε προσβεβλημένα δίδυμα θα πρέπει να είναι περίπου 10 φορές πιο πιθανό να διαπιστωθεί από ότι σε προσβεβλημένα μη δίδυμα αδέρφια (Greenberg et al., 2001). Στην ακραία περίπτωση της 'πλήρης διακοπής' μια μορφή

‘μεροληψίας’ στην οποία οι γονείς σταματούν να αποκτούν παιδιά μετά τη γέννηση του πρώτου πάσχοντος παιδιού τους, οι μόνες οικογένειες που έχουν πιθανότητες στη απόκτηση 2 προσβεβλημένων παιδιών είναι εκείνες που έχουν προσβεβλημένα δίδυμα ή προσβεβλημένα τρίδυμα. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την κυοφορία διδύμων ή την ανάπτυξη του εμβρύου ή με άλλους γενετικούς ή μη γενετικούς παράγοντες που εμφανίζονται σε ένα ζευγάρι μπορούν να συμβάλλουν με τον αυτισμό. Η ομάδα του Hallmayer παρουσίασαν πληροφορίες αντικρούοντας τον ισχυρισμό ότι η ίδια η διαδικασία της κυοφορίας διδύμων είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του αυτισμού (Hallmayer et al., 2002) .

Η ομάδα του Silverman ανέλυσε 3 τομείς αυτιστικών συμπτωμάτων, την κοινωνική αλληλεπίδραση, την επικοινωνία και επαναλαμβανόμενες συμπεριφορές, και την μεταβλητότητα στην παρουσία και εμφάνιση χρήσιμων φράσεων της ομιλίας, σε 212 συγγενείς εξ αίματος με αυτισμό επηρεάζεται πολλαπλώς. Βρήκαν ότι η διακύμανση εντός κύκλων σε συγγενείς εξ αίματος μειώθηκε για τον τομέα επαναλαμβανόμενης συμπεριφοράς και για καθυστερήσεις στην παρουσία χρήσιμων φράσεων ομιλίας (Silverman et al., 2002) .

Μία άλλη μελέτη έγινε ειδικά για τα χαρακτηριστικά του αυτισμού για μειωμένη διακύμανση σε 16 οικογένειες μονοζυγωτικών διδύμων που συμφωνούν για αυτισμό. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση παλινδρόμησης, επέδειξαν σημαντική συσσωμάτωση των συμπτωμάτων σε μονοζυγωτικούς διδύμους για 2 τομείς αυτιστικών συμπτωμάτων: δυσλειτουργία στην επικοινωνία και στην κοινωνική αλληλεπίδραση. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η επιλογή εξεταζομένων σύμφωνα με τα ειδικά χαρακτηριστικά που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν μειωμένη διακύμανση εντός των οικογενειών μπορεί να παρέχει πιο ομοιογενή δείγματα για γενετική ανάλυση (Kolevzon et al., 2004) .

Η ομάδα του Awadalla το 2010 υπέθεσε ότι επιβλαβή de novo μεταλλάξεις μπορεί να παίζουν ρόλο σε περιπτώσεις ASD και σχιζοφρένεια (181,500), 2 αιτιολογικά ετερογενής διαταραχές με σημαντικά μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα. Η ομάδα παρουσίασε ένα άμεσο μέτρο της de novo ρυθμού μετάλλαξης (μ) και επιλεκτικές πιέσεις από de novo μεταλλάξεις εκτιμάται από μια βαθιά επανέυρεση της αλληλουχίας του συνόλου δεδομένων που παράγονται από μια μεγάλη ομάδα των ΔΑΦ και, σε περιπτώσεις σχιζοφρένειας ($n = 285$) και, σε άτομα από τον έλεγχο του πληθυσμού ($n = 285$) με διαθέσιμο γονικό DNA. Μια έρευνα που εξέτασε περίπου 430 Mb του DNA από 401 γονίδια που εκφράζονται στην συναπτική δημιουργία σε όλες τις περιπτώσεις και

25 Mb του DNA από άτομα μάρτυρες αποκάλυψε 15 υποψήφιες de novo μεταλλάξεις. Οι συγγραφείς υπολόγισαν ένα άμεσο ποσοστό ουδέτερης μετάλλαξης ($1,36 \times 10^{-8}$) η οποία ήταν παρόμοια με τις προηγούμενες έμμεσες εκτιμήσεις, αλλά παρατήρησαν μία σημαντική περίσσεια δυνητικά επιβλαβή de novo μετάλλαξη σε ΔΑΦ και άτομα με σχιζοφρένεια. Awadalla et al. (2010) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματά τους τόνισαν τη σημασία της de novo μετάλλαξης σαν γενετικούς μηχανισμούς σε ΔΑΦ και σχιζοφρένεια και τους περιορισμούς της χρήσης DNA από αρχειοθετημένες κυτταρικές σειρές για τον εντοπισμό λειτουργικών παραλλαγών (Awadalla et al., 2010).

Μία άλλη ομάδα, εξέτασε τον οικογενή κίνδυνο αυτισμού σε έναν πληθυσμό που βασίζεται σε μια ομάδα των 2.049.973 παιδιών από την Σουηδία που γεννήθηκαν από το 1982 έως το 2006. εντοπίστηκαν 37.570 δίδυμα ζεύγη, 2.642.064 ζεύγη πλήρους συγγενών, 432.281 ζεύγη ετεροθαλή αδελφών από την μητέρα, 445.531 ζεύγη ετεροθαλή αδελφών από τον πατέρα και 5.799.875 ζεύγη ξαδέλφων. Εξακριβώθηκαν διαγνώσεις ΔΑΦ έως 31η Δεκεμβρίου 2009. Η έκθεση αναφέρεται στην παρουσία ή απουσία του αυτισμού σε ένα αδελφό. Στο δείγμα, 14.516 παιδιών που είχαν διαγνωστεί με ΔΑΦ, από τα οποία 5.689 είχαν φάσμα αυτιστικής διαταραχής. Ο σχετικός κίνδυνος υποτροπής (RRR) και το ποσοστό ανά 100.000 άτομα-έτη για ΔΑΦ μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων εκτιμάται ότι είναι 153,0 για διζυγωτικά δίδυμα, 8,2, για τα αδέρφια από τους ίδιους γονείς, 10,3, για τα ετεροθαλή αδέρφια από την πλευρά της μητέρας, 3,3, για ετεροθαλή αδέρφια από την πλευρά του πατέρα, 2,9 και για τα ξαδέλφια, 2,0. Το σχέδιο RRR ήταν παρόμοιο για την αυτιστική διαταραχή, αλλά σε ελαφρώς υψηλότερα μεγέθη. Οι συγγραφείς βρήκαν δεδομένα για την αιτιολογία της νόσου, συμπεριλαμβανομένων μόνο αθροιστικές γενετικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις που επιδρούν διαφορετικά στο κάθε άτομο. Η κληρονομικότητα ΔΑΦ εκτιμήθηκε ότι ήταν 0,50 και το φάσμα αυτιστικής κληρονομικής διαταραχής εκτιμάται σε 0,54, οπότε κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μεταξύ των παιδιών στη Σουηδία, ο ατομικός κίνδυνος της ΔΑΦ και του φάσματος αυτιστικής διαταραχής αυξάνεται με την αύξηση της γενετικής συγγένειας, (Sandin et al., 2014).

Επιπλέον, περίπου 15 με 37% των περιπτώσεων του αυτισμού έχουν συννοσηρή ή διπλή διαγνωστική ιατρική κατάσταση, συμπεριλαμβανομένης στο 5 έως 14% γνωστής γενετικής διαταραχής ή χρωμοσωμικής ανωμαλίας. Οι 4 πιο κοινές διπλές διαγνώσεις περιλαμβάνουν το σύνδρομο εύθραυστου X (300624), την οζώδη σκλήρυνση (191100), τον διπλασιασμό στην

περιοχή 15q (AUTS4, 608636) η οποία εμπλέκεται στα σύνδρομα Prader-Willi (PWS; OMIM 176270) και Angelman (AS; OMIM 105830), και η αθεράπευτη φαινυλκετονουρία (PKU 26100). Οι Cohen et al. (2005) ανέφεραν αρκετές γενετικές διαταραχές που συνδέονται σταθερά με αυτισμό, συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου εύθραυστου X, της οζώδους σκλήρυνσης, το σύνδρομο Angelman (OMIM 105830), το σύνδρομο Down (OMIM 190685), το σύνδρομο Sanfilippo (252900), το σύνδρομο Rett (312750) και άλλες διαταραχές σχετιζόμενες με το MECP2, η φαινυλκετονουρία, το σύνδρομο Smith-Magenis (SMS, 182290), το σύνδρομο του ελλείμματος 22q13 (606232), το σύνδρομο Cohen (COH1, 216550), η ανεπάρκεια της Αδενυλοηλεκτρικής λυάσης (ADSL) (103050) και τέλος το σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz (SLOS, 270400).

Αν και οι μελέτες διδύμων αποδεικνύουν περίτρανα το ισχυρό γενετικό υπόβαθρο του αυτισμού, παρ'ολ'αυτά, αδυνατούν να «ερμηνεύσουν» πλήρως την εμφάνιση της διαταραχής. Άλλωστε, καμία μελέτη δεν έχει εντοπίσει ποσοστό συνοσηρότητας 100% για τους μονοζυγωτικούς διδύμους, οι οποίοι μοιράζονται πανομοιότυπο γενετικό υλικό. Αυτό αποδόθηκε πρόσφατα σε επιγενετικές διαφορές των διδύμων, δηλαδή σε μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA και, συγκεκριμένα, περιοχών που σχετίζονται με αυτισμό και αυτιστικά χαρακτηριστικά [Wong et al, 2014].

4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΑΥΤΙΣΜΟΥ

Ο αυτισμός θεωρείται μια σύνθετη πολυπαραγοντική διαταραχή στην οποία εμπλέκονται πολλοί γενετικοί τόποι. Οι γενετικοί τόποι αυτοί έχουν ταυτοποιηθεί, τόσο στα αυτοσωμικά όσο και στα φυλοσύνδετα χρωμοσώματα, μερικοί από τους οποίους ή όλοι μαζί μπορούν να συμβάλουν στον φαινότυπο του αυτισμού. Οι τόποι παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 1. Γενετικοί τόποι και τοποθεσία χαρτογράφησης τους στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα	
<i>Γενετικοί τόποι και ονομασία σύμφωνα με OMIM</i>	<i>Κυτταρογενετική τοποθεσία και οι σχετιζόμενες γενετικές διαταραχές</i>
AUTS1 (209850)	7q22 (έλλειμα)
AUTS3 (608049)	13q14.2-q14.1 (έλλειμα)
AUTS4 (608636)	15q11-q13 (διπλασιασμός)
AUTS5 (606053)	2q (μεταλλάξεις σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS6 (609378)	17q11 (μεταλλάξεις σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS7 (610676)	17q21 (μεταλλάξεις σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS8 (607373)	3q25-q27 (μεταλλάξεις σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS9 (611015)	7q31 (μεταλλαγές σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS10 (611016)	7q36 (μεταλλαγές σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS11 (610836)	1q41-q42 (μεταλλαγές σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS12 (610838)	21p13-q11 (μεταλλαγές σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS13 (610908)	12q14.2 (μεταλλαγές σε γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στη περιοχή)
AUTS14A (611913)	16p11.2 (έλλειμα)
AUTS14B (614671)	16p11.2 (διπλασιασμός)
AUTS15 (612100)	7q35-q36 (μετάλλαξη στο γονίδιο CNTNAP2)
AUTS16 (613410)	3q24 (μετάλλαξη στο γονίδιο SLC9A9)
AUTS17 (613436)	11q13 (μετάλλαξη στο γονίδιο SHANK (603290)
AUTS18 (615032)	14q11.2 (μετάλλαξη στο γονίδιο CHD8 (610528)
AUTS2 (607270)	7q11.22 (μετάλλαξη στο γονίδιο KIAA0442 (607270)

Πίνακας 2. Γενετικοί τύποι και τοποθεσία χαρτογράφησης τους στα φυλοσύνδετα χρωμοσώματα	
<i>Γενετικοί τύποι και ονομασία σύμφωνα με OMIM</i>	<i>Κυτταρογενετική τοποθεσία και οι σχετιζόμενες γενετικές διαταραχές</i>
AUTSX1 (300425)	μετάλλαξη στο γονίδιο NLGN3 (300336)
AUTSX2 (300495)	μετάλλαξη στο γονίδιο NLGN4 (300427)
AUTSX3 (300496)	μετάλλαξη στο γονίδιο MECP2 (300005)
AUTSX4 (300830)	Xp22.11 (μετάλλαξη και έλλειμα στο γονίδιο PTCHD1 (300828))
AUTSX5 (300847)	μετάλλαξη στο γονίδιο RPL10 (312173)
AUTSX6 (300872)	μετάλλαξη στο γονίδιο TMLHE (300777)

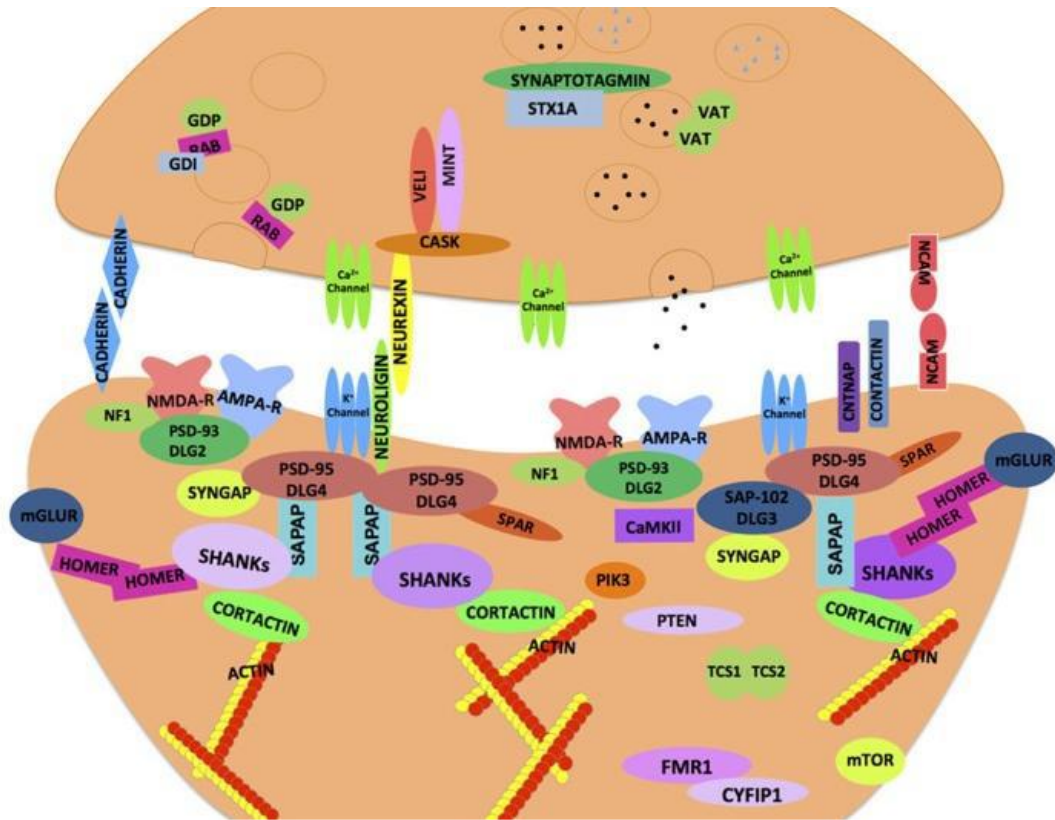
5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Το γενετικό υπόβαθρο των ΔΑΦ εμπλέκει μία σειρά διαφορετικών παραγόντων (όπως αναφέρθηκε παραπάνω). Οι παράγοντες αυτοί συμπεριλαμβάνουν, τις γονιδιακές μεταλλάξεις, τους πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), πολυμορφισμούς επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Copy Number Variations, CNVs) και τις επιγενετικές αλλαγές.

Όσον αφορά τις μεταλλάξεις γονιδίων, πρόκειται κυρίως για γονίδια που εμπλέκονται στη συναπτική λειτουργία, στην υποδοχή/μεταφορά νευροδιαβιβαστών και ως διάλυτοι ιόντων, στη διάπλαση και ανάπτυξη του εγκεφάλου, καθώς και με σηματοδοτικά μονοπάτια [όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι mechanistic target of rapamycin (mTor)] (Kelleher and Bear, 2008; Bourgeron, 2009; Zafeiriou et al., 2013; Banerjee et al., 2014).

Τα γονίδια που συμμετέχουν στη συναπτική λειτουργία και σχετίζονται με την εμφάνιση ΔΑΦ, περιγράφονται στον Πίνακα 3 και παρουσιάζονται στην Εικ. 1 σύμφωνα με τους Banerjee et al. (2014).

Πίνακας 3. Γονίδια που σχετίζονται με τη συναπτική λειτουργία και η λειτουργία τους	
<i>Γονίδιο</i>	<i>Λειτουργική ιδιότητα</i>
NRXN1	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NRXN2	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NRXN3	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NLGN1	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NLGN3	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NLGN4	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
CNTN3	Μόριο προσκόλλησης
CNTN4	Μόριο προσκόλλησης
CNTNAP2	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
NrCAM	Μόριο προσκόλλησης
CDH9/10	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
CDH18	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
PCDH9	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
PCDH10	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
PCDH19	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη
SHANK1	Πρωτεΐνη κριώματος
SHANK2	Πρωτεΐνη κριώματος
SHANK3	Πρωτεΐνη κριώματος
DLG4	Πρωτεΐνη κριώματος
HOMER1	Πρωτεΐνη κριώματος
EN2	Μεταγραφικός παράγοντας



Εικ. 1. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συναπτική λειτουργία και σχετίζονται με την ανάπτυξη ΔΑΦ και άλλων αναπτυξιακών διαταραχών [Banerjee et al, 2014].

Τα γονίδια που συμμετέχουν στην υποδοχή/μεταφορά νευροδιαβιβαστών και σχετίζονται με την εμφάνιση ΔΑΦ, περιγράφονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Γονίδια που σχετίζονται με την υποδοχή/μεταφορά νευροδιαβιβαστών και η λειτουργία τους

<i>Γονίδιο</i>	<i>Λειτουργική ιδιότητα</i>
AGTR2	T υποδοχέας αγγειοτενσίνης
ADRB2	T υποδοχέας αργινίνης-βαζοπρεσίνης
DRD3	T υποδοχέας ντοπαμίνης
ESRRB	T υποδοχέας β σχετιζόμενος με οιστρογόνα
GABRB3	GABAA υποδοχέας
GABR4/GABRB1	GABAA υποδοχέας
GRIP1	Πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τους γλουταμινεργικούς υποδοχείς
GRIK2	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GRIN2A	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GRIN2B	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GRID1	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GRID2	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
GRM5	T υποδοχέας γλουταμινικού οξέος
OXTR	T υποδοχέας οξυτοκίνης
SL6A4	Μεταφορέας σεροτονίνης
SLC25A13	Μεταφορέας ασπαρτικού-γλουταμινικού οξέος
CACNA1C	Δίαυλος ασβεστίου
SCN1A/SCN2A	Δίαυλος νατρίου
KCNJ10	Δίαυλος καλίου
AGTR2	T υποδοχέας αγγειοτενσίνης
ADRB2	T υποδοχέας αργινίνης-βαζοπρεσίνης

Τα γονίδια που συμμετέχουν με την ανάπτυξη και διάπλαση του εγκεφάλου και σχετίζονται με την εμφάνιση ΔΑΦ, περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και διάπλαση του εγκεφάλου και η λειτουργία τους	
<i>Γονίδιο</i>	<i>Λειτουργική ιδιότητα</i>
HOXA1	Μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη διάπλαση του εγκεφαλικού στελέχους
HOXB1	Μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη διάπλαση του εγκεφαλικού στελέχους
RELN	Πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου που εμπλέκεται στη μετανάστευση των νευρώνων

Τέλος, τα γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR, και σχετίζονται με την ανάπτυξη ΔΑΦ, αναλύονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Γονίδια που σχετίζονται με την σηματοδοτικό μονοπάτι mTor και η λειτουργία τους	
<i>Γονίδιο</i>	<i>Λειτουργική ιδιότητα</i>
NF1	Ενεργότητα GTPάσης
PTEN	Ενεργότητα φωσφατάσης
TSC1/TSC2	Ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης

Η διαταραχή των παραπάνω γονιδίων-είτε πρόκειται για μετάλλαξη εντός του γονιδίου, είτε για CNV που εμπεριέχει το γονίδιο- εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με την εμφάνιση αυτισμού. Μεταλλάξεις εκατοντάδων άλλων γονιδίων έχουν, επίσης, εντοπιστεί επανειλημμένως σε άτομα με αυτισμό, ενώ η παγκόσμια βάση SFARI gene (<https://gene.sfari.org/>), που ανήκει στη ΜΚΟ Simons Foundation Autism Research Initiative, περιελάμβανε περίπου 280 γονίδια στις αρχές του 2014.

Όσον αφορά τους πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) αποτελούν γενετικούς δείκτες, που χρησιμοποιούνται στη μελέτη γονιδίων εμπλεκόμενων σε πολυπαραγοντικά νοσήματα. Μια πληθώρα SNPs στα χρωμοσώματα 2, 3, 4, 6, 7, 10, 15, 17, X και Ψ συνδέθηκαν με αυξημένη συχνότητα σε άτομα με ΔΑΦ. Παρόλο που η σημασία αυτών των πολυμορφισμών δεν είναι ξεκάθαρη με τη παθολογία του αυτισμού, ορισμένα SNPs έχουν ήδη συσχετιστεί με την κλινική

εικόνα του αυτισμού και, μάλιστα, με τη βαρύτητα συγκεκριμένων αυτιστικών χαρακτηριστικών (Jiao et al, 2012).

Οι επιγενετικές μεταβολές έχουν συσχετιστεί επίσης με την ανάπτυξη της ΔΑΦ. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν κληρονομήσιμες αλλαγές της λειτουργίας του γονιδιώματος, που συντελούνται χωρίς τροποποίηση της αλληλουχίας του DNA. Είναι κληρονομήσιμες αλλά, σε αντίθεση με τις γενετικές πληροφορίες, είναι αναστρέψιμες (επιγενετική πλαστικότητα) και τροποποιούνται από ερεθίσματα ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή, οι ενδοκρινικές διαταράξεις ή τα στρεσογόνα ερεθίσματα. Περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και τη λειτουργία των μη κωδικοποιούμενων RNAs (ncRNAs) (Καραβιτάκης, 2010).

Οι επιγενετικές διαταραχές του χρωμοσώματος 15 (περιοχή 15q11-13) περιλαμβάνονται στις συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες ασθενών με ΔΑΦ. Αποτελούν διαταραχές της γονιδιακής αποτύπωσης, η οποία ρυθμίζεται από τον επιγενετικό μηχανισμό μεθυλίωσης των βάσεων κυτοσίνης των CpG νησίδων. Η μεθυλίωση οδηγεί σε αναστολή έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου, ενώ το αλληλόμορφο του γονιδίου, που εκφράζει, τελικά, τη γενετική πληροφορία, εξαρτάται από τη γονεϊκή του προέλευση. Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποτύπωσης είναι αναστρέψιμος, ενώ διατηρείται σταθερός μετά τη γονιμοποίηση. Τα αποτυπωμένα γονίδια αντιπροσωπεύουν ποσοστό περίπου 1% των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος και έχουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση, ανάπτυξη και βιωσιμότητα του οργανισμού. Σα σύνδρομα Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann και Silver-Russell περιλαμβάνονται στις συχνότερες διαταραχές γονιδιακής αποτύπωσης, ενώ χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα αυξημένη συχνότητα ΔΑΦ (Καραβιτάκης, 2010). Πιο συγκεκριμένα, ποσοστό 19-36.5% των ατόμων με σύνδρομο Prader-Willi και 50-65% των ατόμων με σύνδρομο Angelman εμφανίζει αυτιστικό φαινότυπο (Zafeiriou et al, 2013). Η μελέτη αποκωδικοποίησης των επιγενετικών μηχανισμών (Human Epigenome Project, <http://www.epigenome.org/>) ξεκίνησε μετά τη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και στοχεύει στην αναγνώριση του προτύπου μεθυλίωσης του γονιδιώματος σε όλους τους ιστούς. Σε ένα ποσοστό 5-10% των ασθενών με ΔΑΦ συνυπάρχουν γενετικές διαταραχές, χρωμοσωμικές ή μονογονιδιακές, καθώς και διαταραχές μικροδιπλασιασμών/μικροελλείψεων ή γενετικής αποτύπωσης (genetic imprinting)

6. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Σε ένα ποσοστό 5-10% των ασθενών με ΔΑΦ συνυπάρχουν γενετικές διαταραχές, χρωμοσωμικές ή μονογονιδιακές, καθώς και διαταραχές μικροδιπλασιασμών/μικροελλείψεων ή γενετικής αποτύπωσης (genetic imprinting) (Γ. Χίτογλου-Χατζή, 2000). Τα συχνότερα σύνδρομα, καθώς και τα αντίστοιχα γονίδια που πιθανώς σχετίζονται με την εμφάνιση αυτιστικών χαρακτηριστικών παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω Πίνακα 7 σύμφωνα με τους Zafeiriou et al. (2013).

Πίνακας 7. Γενετικά σύνδρομα και η συσχέτισή τους με γονίδια	
<i>Σύνδρομο</i>	<i>Γονίδια σχετιζόμενα με ΔΑΦ</i>
Σύνδρομο μικροελλείματος 2q37	HDAC4, GBX2, NMUR1
Σύνδρομο Angelman	UBE3A
Σύνδρομο Bannayan-Ruvalkaba- Riley	PTEN
Σύνδρομο CHARGE	CHD7
Σύνδρομο Cohern	COH1
Σύνδρομο Cornelia de Lange	SMC1A, SMC3
Σύνδρομο Cowden	PTEN
Σύνδρομο DiGeorge	COMT
Σύνδρομο Down	DYRK1A, RCAN1, synaptojanin 1
Μυϊκή δυστροφία Duchenne/Becker	DMD
Μυοτονική Δυστροφία Τύπου I	DMPK
Σύνδρομο FraX	FMR1
Σύνδρομο Klinefelter	NLGN3, NLGN4X
Νευροϊνωμάτωση Τύπου I	NF1
Σύνδρομο Lujan-Fryns	MED12
Οζώδης σκλήρυνση	TSC1/TSC2
Σύνδρομο Phelan-McDermid	SHANK3
Σύνδρομο Potocki-Lupski	RA1
Σύνδρομο Prader-Willi	SNORD116
Σύνδρομο Proteus	PTEN
Σύνδρομο Smith-Lemli-Opitz	DHCR7
Σύνδρομο Smith-Magenis	RA1
Σύνδρομο Sotos	NSD1

Εν κατακλείδι, πάνω από 800 γενετικοί τόποι και γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί ως εμπλεκόμενα στον ΔΑΦ. Μόνο σε μερικές περιπτώσεις οι γενετικές αλλαγές εμφανίζουν υψηλή διεισδυτικότητα, δηλαδή να παρουσιάζουν αυτισμό όλα τα άτομα που φέρουν τη γενετική αλλαγή, αντιθέτως συνήθως εμφανίζεται η ατελής διεισδυτικότητα κατά την οποία άτομα που φέρουν την ίδια γενετική αλλαγή δεν εμφανίζουν τα ίδια κλινικά χαρακτηριστικά ή εκφραστικότητα όπου ενώ δύο άτομα φέρουν την ίδια γενετική αλλαγή, την εκδηλώνουν με διαφορετική βαρύτητα ακόμα και σε μέλη της ίδιας οικογένειας.

Επιπλέον, πολλές γενετικές παραλλαγές και copy number variants (CNVs) που προδιαθέτουν για τον ΔΑΦ προδιαθέτουν και για άλλες νευρολογικές ασθένειες, κατά το φαινόμενο πλειοτροπίας κατά το οποίο ένα και μόνο γονίδιο, επηρεάζει φαινοτυπικά, αρκετά χαρακτηριστικά (περισσότερα του ενός).

Έχουν αναφερθεί μητρικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες, περιλαμβανομένων μητρικών μολύνσεων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, σε έκθεση διαφόρων φαρμάκων in utero και έκθεση σε βαρέα μέταλλα σε παιδική ηλικία, που αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης αυτισμού. Τα CNVs παίζουν σημαντικό ρόλο στις νευροψυχιατρικές διαταραχές. Άτομα με αυτισμό φέρουν τριπλάσια με πενταπλάσια ποσοστά de novo CNVs συγκρινόμενα με υγιή μέλη της οικογένειας τους ή με άτομα μάρτυρες. Πολλά CNVs εμπλέκονται στην ΔΑΦ, αλλά κάθε CNV συμβάλλει σε λιγότερο από 1% των περιπτώσεων με ΔΑΦ. Ο συμβατικός ή κλασσικός καρυότυπος ήταν η συνηθισμένη μεθοδολογία για την ταυτοποίηση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε ασθενείς με διάφορου βαθμού νοητική ή αναπτυξιακή υστέρηση και πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες, ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον Μοριακό Καρυότυπο ή μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH) λόγω της υψηλότερης ανάλυσης του που είναι χαμηλότερη από τις 5 Mb.

7. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να πραγματοποιηθεί γενετικός έλεγχος εφαρμόζοντας μοριακές τεχνικές με aCGH σε δείγματα διαγνωσμένων αυτιστικών παιδιών, στα οποία έχει προηγηθεί εργαστηριακός έλεγχος με αποκλεισμό κάποιου οργανικού νοσήματος και να γίνει συσχέτιση γονοτύπου –φαινοτύπου.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Υλικά

A) Δείγματα περιφερικού αίματος 62 ασθενών διαγνωσμένων με ΔΑΦ αγνώστου αιτιολογίας που παραπέμφθηκαν για μοριακό καρυότυπο, εκ των οποίων 50 αγόρια και 12 κορίτσια με αναλογία περίπου 4:1 και ηλικίες από 2 έως 13 έτη.

B) Δείγματα περιφερικού αίματος 16 αμφοτέρων των γονέων στις περιπτώσεις που χρειάστηκε για να μελετηθεί η κληρονομικότητα των ευρημάτων.

Τα δείγματα συντηρούνται σε ψυγείο στους 4-8 βαθμούς κελσίου.

Όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν από παιδίατρο-αναπτυξιολόγο και διαγνώστηκαν με ΔΑΦ σύμφωνα με τα κριτήρια συμπεριφοράς που καταγράφεται από το ICD-10 (που προαναφέρθηκε στην εισαγωγή).

Η πραγματοποίηση της μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Νοσοκομείου Παίδων 'Π&Α Κυριακού', σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι του 2008.

Όλες οι οικογένειες που συμμετείχαν στην μελέτη ενημερώθηκαν για το σκοπό της ερευνητικής προσπάθειας και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους.

2. Μέθοδοι

2.1. Μοριακή Μελέτη Με Συγκριτικό Γενομικό Υβριδισμό Με Μικροσυστοιχίες (aCGH)

2.1.1 Μεθοδολογία

Η εισαγωγή του συγκριτικού γενομικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες (array Comparative Genome Hybridization-cgh) ευρέως γνωστού με το όνομα 'μοριακός καρυότυπος', ως εργαστηριακού διαγνωστικού ελέγχου πρώτης γραμμής σε άτομα που παρουσιάζουν αναπτυξιακά προβλήματα και συγγενείς διαταραχές, επιτρέπει τη 'μικρο-ανάλυση' του ανθρώπινου γονιδιώματος σε 100-1000 φορές μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε σχέση με τον κλασσικό καρυότυπο (ανάλογα με τη 'πλατφόρμα' που χρησιμοποιείται), για την αποκάλυψη περιοχών DNA που

λείπουν (ελλείψεις –deletions), ή περιοχών που έχουν διπλασιαστεί (διπλασιασμοί-duplications) (Miller et al., 2010).

Το ποσοστό των διαγνωστικών ευρημάτων σε περιπτώσεις ατόμων με ανεξήγητη αναπτυξιακή διαταραχή ή συγγενείς ανωμαλίες ανέρχεται σε 15-25%, ενώ το αντίστοιχο του συμβατικού καρυοτύπου είναι περίπου 3%, αν εξαιρεθεί το σύνδρομο Down (Manolakos et al. 2010; Tzetzis et al. 2012).

Με την μέθοδο αυτή οι μικροσυστοιχίες που θα χρησιμοποιηθούν επιτρέπουν τόσο τη διερεύνηση των αλλαγών του αριθμού των αντιγράφων του γονιδιώματος, όσο και την αποκάλυψη χρωμοσωμικών περιοχών όπου παρατηρούνται φαινόμενα απώλειας ετεροζυγωτίας.

Με την εφαρμογή του μοριακού καρυοτύπου ελέγχονται ταυτόχρονα χαρακτηρισμένες και μη χαρακτηρισμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων όπου η παρουσία CNVs μπορεί να υποδεικνύει:

A) γνωστά σύνδρομα (Pathogenic CNVs)

B) πολυμορφισμούς χωρίς κλινική σημασία (Benign CNVs),

Γ) ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας (VOUS), διότι δεν έχουν καταγραφεί ακόμη στη διεθνή βιβλιογραφία και τις βάσεις δεδομένων. Σε αυτές τις περιπτώσεις η συσχέτιση με κλινικό φαινότυπο μπορεί να γίνει με βάση την περιεκτικότητα σε λειτουργικές περιοχές του DNA καθώς επίσης και με έλεγχο των γονέων για τον καθορισμό της κληρονομούμενης φύσεως του ευρήματος, συνήθως όμως αποτελεί σύνθετη διαδικασία και δεν οδηγεί σε σαφή διάγνωση.

Η τεχνική array-CGH απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και εργαστηριακό πρωτόκολλο και περιλαμβάνει αρχικά απομόνωση γενωμικού DNA από βιολογικό δείγμα και στη συνέχεια σήμανση των γενωμικών DNA δειγμάτων με φθοριοσημασμένα νουκλεοτίδια, με διαφορετική φθοροευαίσθητη φθορίζουσα χρωστική από το δείγμα αναφοράς (SureRef της Illumina). Ακολουθεί ανάμιξη των 2 δειγμάτων DNA, τα οποία υβριδίζονται ανταγωνιστικά για 24 ώρες με το περιεχόμενο των μικροσυστοιχιών (60μερή ολιγονουκλεοτίδια), για τον πλήρη έλεγχο του γονιδιώματος. Η υβριδοποίηση ακολουθείται από άμεσο σκανάρισμα των πλακιδίων με χρήση λογισμικού μεγάλης υπολογιστικής ισχύος. Τα δεδομένα συλλέγονται με την μορφή εικόνας επιτρέποντας την μέτρηση των αλλαγών του DNA. Τα δεδομένα επεξεργάζονται κατόπιν συλλογής πληροφοριών από βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο, όπου γίνεται σύγκριση των δεδομένων με υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές για καταγεγραμμένα γενετικά σύνδρομα.

Η συγκεκριμένη πλατφόρμα είναι σχεδιασμένη ώστε να ανιχνεύει ανισοζυγίες (ελλείμματα/διπλασιασμούς) μεγέθους ~200 kb σε ολόκληρο το γονιδίωμα και ~30 kb σε ~450

γενετικές περιοχές γνωστής κλινικής σημασίας. Στον έλεγχο αυτό περιλαμβάνονται όλες οι αριθμητικές ανωμαλίες (όπως τρισωμίες 21, 18, 13), όλα τα γνωστά μικροελλειπτικά σύνδρομα, σύνδρομα μικροδιπλασιασμών καθώς και οποιεσδήποτε μη ισοζυγισμένες δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων στο επίπεδο της ανάλυσης της μεθόδου.

Ο έλεγχος με τη μέθοδο του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες πραγματοποιείται σε απομονωμένο DNA:

Πραγματοποιείται απομόνωση DNA στα υπό εξέταση δείγματα. Τα δείγματα αυτά είναι:

- Περιφερικό αίμα σε EDTA του ασθενούς (3 ml)
- Περιφερικό αίμα σε EDTA στην περίπτωση ελέγχου γονέων (3 ml)

Κριτήρια αποδοχής δειγμάτων

Απαιτείται τουλάχιστον 1 ml αίματος σε EDTA. Στο φιαλίδιο πρέπει να αναγράφεται το όνομα του εξεταζόμενου και η ημερομηνία λήψης.

2.1.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα σε θάλαμο Νηματοτικής Ροής (Biosefety Cabinet, Biobase, BSC1500IIA2-X)

Απομόνωση από περιφερικό αίμα σε EDTA αντιπηκτικό:

Το DNA από περιφερικό αίμα απομονώνεται αυτόματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega, USA) σε μηχανήμα Maxwell® 16 Instrument (Promega, USA) από 300μl αρχικό δείγμα ολικού αίματος σε Vacutainer με EDTA αντιπηκτικό. Η αυτόματη απομόνωση πραγματοποιείται με παραμαγνητικά σωματίδια και δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης επεξεργασίας μέχρι και 16 δειγμάτων. Η διαδικασία διαρκεί 40 λεπτά και ο τελικός όγκος DNA για κάθε δείγμα είναι 200μl. Για κάθε δείγμα κρατείται stock ολικού αίματος στην κατάψυξη (-20°C).

2.1.3 Πρακτικό μέρος

Για κάθε διαδικασία υβριδισμού απαιτούνται ιδανικά ~400ng DNA δείγματος.

Σχεδιάζεται ο τρόπος σήμανσης και υπολογίζονται οι ποσότητες των δειγμάτων, προκειμένου να είναι ισομοριακές. Ο τελικός όγκος που απαιτείται είναι 13 μl και όπου χρειάζεται προστίθεται nuclease free water.

2.1.4 Fluorescent Labeling of DNA

Μεταφορά των αναλώσιμων για το Fluorescent Labeling of DNA σε θερμοκρασία δωματίου.

Ταχεία φυγοκέντρηση αυτών και ελαφριά ανάδευση

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g
- Κωδικοποίηση 0,2 ml PCR tubes, σύμφωνα με τους κωδικούς των δειγμάτων
- Μεταφορά ποσότητας δειγμάτων DNA στα 0,2 ml PCR tubes και προσθήκη Nuclease-Free Water ώστε η τελική συγκέντρωση των δειγμάτων να φτάσει τα 400 ng/mol (όταν είναι εφικτό) και ο τελικός όγκος τα 13 µl
- Spin τους primers. Προσθήκη 2,5 µl Random Primer σε κάθε reaction tube.
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων
- Μεταφορά των δειγμάτων σε υδατόλουτρο ή θερμικό κυκλοποιητή για 10 λεπτά στους 98°C
- Διατήρηση δειγμάτων για 5 λεπτά στον πάγο ώστε να σταθεροποιηθεί η αποδιάταξη
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g
- Προετοιμασία Labeling Master Μιχμίγματος (8 rxns) σε 0,5 µl PCR tubes σύμφωνα με τον Πίνακα 8.

Component	Per Reaction	X8rxns (µl) (Including excess)
5x Reaction Buffer	5.0	42.5
10x dNTPS	2.5	21.25
Cyanine 3-d UTP or Cyanine 5-d UTP	1.5	12.75
Exo (-) Klenow	0.5	4.25
Τελικός όγκος	9,5	80,75

Πίνακας 8

- Ελαφριά ανάδευση με το χέρι και spin του Labeling Master Mix
- Προσθήκη 9,5 μl από το Labeling Master Mix σε κάθε δείγμα και spin
- Επώαση των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή για 2 ώρες στους 37°C και 10 λεπτά στους 65 °C
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g

2.1.5 Purification of labeled DNA

- Προετοιμασία και ονομασία 8 στηλών καθαρισμού του DNA για τα δείγματα (Παρέχονται με το kit). Αντίστοιχη ονομασία 0,5 ml PCR για κάθε δείγμα
- Μεταφορά σημασμένων δειγμάτων DNA σε 0,5 ml PCR tubes και προσθήκη 430 μl TE Buffer pH 8.0 ανά δείγμα (TE Buffer, pH 8.0, Invitrogen AM9849)
- Για κάθε δείγμα τοποθετείται μια στήλη σε 2 ml collection tube. Μεταφορά δείγματος και TE Buffer σε αυτό
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14000g σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση της στήλης στο collection tube
- Προσθήκη 480 μl TE Buffer σε κάθε στήλη και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στα 14000g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναστροφή και μεταφορά της στήλης σε νέο collection tube 2 ml. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 1000 g με ανοιχτό το καπάκι του collection tube
- Ο όγκος κάθε δείγματος μετά την έκλουση θα είναι 20-32 μl
- Παραμονή των δειγμάτων στους 45°C έως ότου ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος να φτάσει τα 9,5 μl μέσω εξάτμισης
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g

2.1.6 Hybridization of Labeled DNA

- Κωδικοποίηση 8 0,2 ml PCR tubes.

- Μεταφορά και συνδυασμός των ζευγών των δειγμάτων. Ανάμιξη 8μL από κάθε δείγμα έχουν σημειωθεί με τη χρωστική CY5 και CY3 αντίστοιχα στα 0,2 ml PCR tubes ανάλογα με το σχεδιασμό του εγγράφου με κωδικό OPR-17
- Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g
- Προετοιμασία Hybridization Master Mix σε 1,5 μl PCR tubes σύμφωνα με τον Πίνακα 9

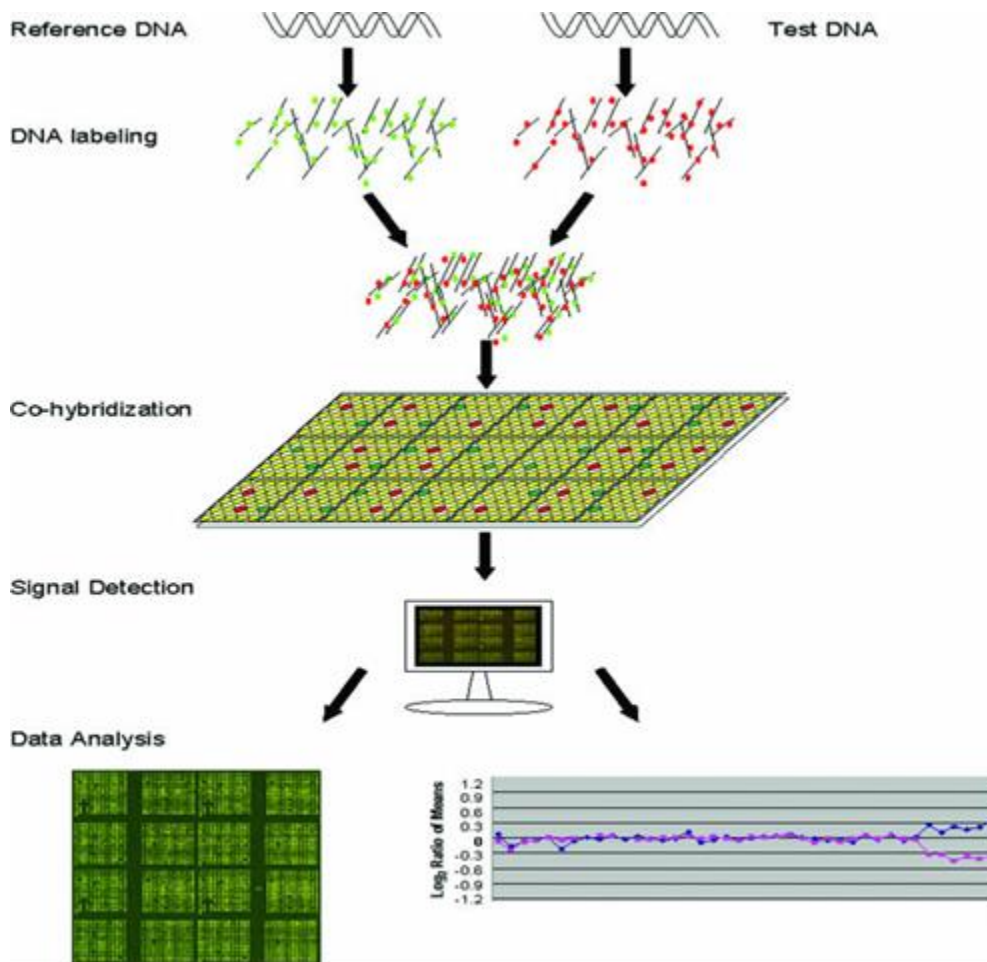
Component	Per Reaction	X8rxns (μl) (Including excess)
Cot-1 DNA (1.0 mg/ml)	2.0	20
10x aCGH Blocking Agent	4.5	45
2x HI-RPM Hybridization Buffer	22.5	225
Τελικός όγκος	29	290

Πίνακας 9

- Προσθήκη 29 μl από το διάλυμα σε κάθε tube που περιέχει τα δυο συνδυασμένα DNA και ελαφριά ανάδευση με την πιπέτα.
- Φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 1 λεπτό στα 6000g
- Μεταφορά των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή για 3 λεπτά στους 98°C και 30°C λεπτά στους 37°C
- Τα δείγματα είναι έτοιμα να υβριδιστούν.
- Τοποθέτηση του gasket slide στη βάση του Agilent SureHyb chamber με την επιφάνεια που περιέχει τα ειδικά διαχωριστικά προς τα πάνω.
- Εναποθέτηση 40 μl του υβριδισμένου DNA στο κέντρο του gasket well.
- Απόλυτα ευθυγραμμισμένα και με συγχρονισμένες κινήσεις αφήνεται το microarray slide με την πλευρά που αναγράφει τον κωδικό του πλακιδίου να κοιτάει προς τα πάνω.
- Τοποθέτηση του πάνω τμήματος του Agilent SureHyb chamber και επώαση του Agilent SureHyb chamber σε κλίβανο σε θερμοκρασία 67°C για 24 ώρες.

2.1.7 Microarray Wash

- Μεταφορά του Agilent SureHyb chamber από τον κλίβανο στο πάγκο εργασίας, αποσυναρμολόγησή του και τοποθέτηση του πλακιδίου σε δοχείο που περιέχει Wash Buffer 1. Ξέπλυμα και απομάκρυνση του gasket slide από το πλακίδιο. Το gasket slide παραμένει στον πάτο του δοχείου.
 - Μεταφορά του πλακιδίου σε νέο δοχείο, το οποίο βρίσκεται πάνω σε μαγνητικό αναδεκτή, και περιέχει Wash Buffer 1 για 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα που βρίσκεται στον πυθμένα του δοχείου
 - Πριν την λήξη της 5λεπτης πλύσης το Wash Buffer 2 μεταφέρεται από το υδατόλουτρο και αποχύνεται στο ειδικό σκεύος. Wash Buffer και σκεύος πρέπει να βρίσκονται στους 37°C
 - Πλύση για 1 λεπτό στο Wash Buffer και απομάκρυνση πλακιδίου με αργές και σταθερές κινήσεις εντός 10 δευτερολέπτων. Άμεση μεταφορά του πλακιδίου απευθείας πλύση με το Wash Buffer για 1 λεπτό
 - Τοποθέτηση του πλακιδίου Scanner με την πλευρά που αναγράφει Agilent προς τα πάνω
 - Ρύθμιση 20 λεπτά νωρίτερα των παραμέτρων στο Scanner (InnoScan 710) ως εξής
 - Ανατρέχω στο Marix Software
 - Επιλογή Automatic scrolling
 - Επιλογή Barcode reading
 - Ρύθμιση 3.0 Pixel size και 10 Speed
 - Επιλογή Simultaneous for Acquisition Mode.
- Στο Manual Mode έλεγχος ότι το Low Laser Power είναι στο 100% detection με τις εξής παραμέτρους 635 532.
- Επιλογή Labeled slide και ρυθμίζω στα 10mm το ύψος της ετικέτας.
- Επιλογή Play για έναρξη σκαναρίσματος.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της μεθόδου Array-cgh.

2.1.8 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται με τη χρήση του Agilent Cytogenomics 3.0.4.1 Software. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι Database of Genomic Variants (DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>) για τον αποκλεισμό

των κοινών CNVs ή αλλιώς Copy Number Polymorphisms (CNPs), University of California Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM), International Standard Cytogenomic Array (ISCA) (<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>), European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) (<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) καθώς και χρήση της διεθνούς βιβλιογραφίας (PUBMED).

Επίσης, λόγω των ασθενών ASD χρησιμοποιήθηκαν το Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) (<https://sfari.org/>), Autism DataBase (AUTDB) (<http://autism.mindspec.org/autdb/>) και τέλος το Autism Chromosome Rearrangement Database (ACRD) (<http://projects.tcag.ca/autism/>). Τα ευρήματα χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες:

A) πολυμορφισμούς χωρίς κλινική σημασία (Benign CNVs) καταγεγραμμένα στη βάση δεδομένων DGV

B) Παθογόνα (Pathogenic CNVs)

Γ) ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας (VOUS) που δεν έχουν καταγραφεί ακόμη στη διεθνή βιβλιογραφία και τις βάσεις δεδομένων.

Παθογόνα θεωρούνται τα CNVs που επικαλύπτουνε περιοχές καλά χαρακτηρισμένων συνδρόμων διπλασιασμών /ελλειμμάτων όπως αναφέρονται στις βάσεις δεδομένων ISCA, DECIPHER και Autism Databases ή που αναφέρονται ως παθογόνα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Στο αποτέλεσμα δεν θεωρούνται παθολογικές εκείνες οι ελλείψεις ή οι διπλασιασμοί που αναφέρονται σαν πολυμορφίες στο “Database of Genomic Variants” (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Η συγκεκριμένη εξέταση δεν δείχνει μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις που εμφανίζονται σε χαμηλό μωσαϊκισμό (20-25%) και σημειακές μεταλλάξεις .

2.1.9 Εναλλακτικές μέθοδοι για ανίχνευση ανισοζυγιών

- Η Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) αποτελεί μέθοδο επαλήθευσης ευρήματος καθώς επίσης παρέχει δομικές πληροφορίες για τις χρωμοσωματικές ανωμαλίες

- Ο συμβατικός καρυότυπος αποτελεί μέθοδο επιβεβαίωσης όταν πρόκειται για ανισοζυγίες που είναι μεγαλύτερες από 10Mb, καθώς επίσης παρέχει και δομικές πληροφορίες καθώς απεικονίζονται τα χρωμοσώματα. Επίσης αποτελεί μέθοδο επικύρωσης στην περίπτωση που προκύπτει πρότυπο το οποίο παραπέμπει στην παρουσία μωσαϊκισμού.

2.2. Κυταρογενετική και Μοριακή Κυταρογενετική Μελέτη

Η κυταρογενετική ανάλυση πραγματοποιείται μετά από καλλιέργεια του περιφερικού αίματος των ασθενών. Η ζώνωση των χρωμοσωμάτων επιτυγχάνεται με τη μέθοδο G - ζωνοποίησης GTG (Trypsin Leishman). Ως πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος θεωρείται η ανάλυση τουλάχιστον 16 μεταφάσεων. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2016).

Η μοριακή κυταρογενετική ανάλυση με την εφαρμογή της τεχνολογίας του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH) πραγματοποιείται σε μονιμοποιημένα κύτταρα μετά από την καλλιέργεια. Στα περιστατικά στα οποία ο μοριακός καρυότυπος παρουσιάζει έλλειμμα ή διπλασιασμό συγκεκριμένων περιοχών, πραγματοποιείται μεταφασικό FISH χρησιμοποιώντας ειδικούς ιχνηθέτες (Liehr et al, 1995).

2.2.1 Κλασσική κυταρογενετική ανάλυση – καρυότυπος

Η κυταρογενετική ανάλυση πραγματοποιείται μετά από λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος. Για κάθε δείγμα γίνονται δύο καλλιέργειες σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η ζώνωση των χρωμοσωμάτων επιτυγχάνεται με τη μέθοδο G - ζωνοποίησης GTG (Trypsin Leishman).

Ως πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος θεωρείται η ανάλυση τουλάχιστον 16 μεταφάσεων. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2016).

Αντιδραστήρια για τα δείγματα περιφερικού αίματος:

- Καλλιεργητικό υλικό: 100 ml RPMI-1640, 20ml fetal calf serum, 1ml Penicilline streptomycin, 1 ml L-Glutamine, 200μl PHA
- Κολχικίνη (2,5 mg/ml)
- Υπότονο διάλυμα KCl: 5ml KCl/δείγμα

- Water for injection
- Μονιμοποιητικό διάλυμα μεθανόλης/οξικού (3:1)
- Θυμιδίνη 100μl/δείγμα
- Θρυψίνη 1:250 5ml/100ml Pbs
- DPbs Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
- Leishman's stain 1gr/500ml methanol
- Methanol
- Dpx mountant

Στάδια:

- Σε κάθε σωληνάριο προστίθεται 0.6 ml αίματος και καλλιεργητικού υλικού, ώστε ο τελικός όγκος της κάθε καλλιέργειας να είναι 5 ml και ακολουθεί επώαση για 72 ώρες σε κλίβανο στους 37° C.
- Στις 48 ώρες προσθήκη θυμιδίνης.
- Στις 71 ώρες προσθήκη 0.1 ml κολχικίνης.
- Μετά από 72 ώρες γίνεται φυγοκέντρηση στις 1700 rpm για 7', απόριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml υπότονου διαλύματος KCl θερμοκρασίας 37° C.
- Επώαση στους 37° C για 10'-15', φυγοκέντρηση στις 1700 rpm για 7', απόριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5ml μονιμοποιητικού διαλύματος.
- Επανάληψη των πλύσεων με το μονιμοποιητικό διάλυμα μέχρι να παραμείνει καθαρό ίζημα.

Προετοιμασία των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση

Μέρος του υλικού επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Η επίστρωση του χρωμοσωματικού υλικού γίνεται με 1-2 σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων πάνω σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Η ποιότητα των πλακακίων ελέγχεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης και οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα που προορίζεται για κυτταρογενετική ανάλυση επιστρώνονται τουλάχιστον δύο αντικειμενοφόροι πλάκες από κάθε καλλιέργεια. Για λόγους τήρησης του απορρήτου, τα δείγματα είναι κωδικοποιημένα και καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παραμένουν αυστηρώς ανώνυμα. Σε κάθε πλακάκι αναγράφεται μόνο ο εργαστηριακός κωδικός, η ημερομηνία παραλαβής του δείγματος και ο αύξων αριθμός του πλακακίου. Τέλος, τα πλακάκια επωάζονται στους 90 °C για 2h, προκειμένου να επιτευχθεί η παλαιώση των χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων.

Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG

Για τον προσδιορισμό των χρωμοσωμάτων και την ανάλυση της δομής τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ζωνοποίησης GTG. Η ζώνωση G αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο ζωνοποίησης και χρώσης. Περιλαμβάνει κατεργασία των χρωμοσωμάτων με θρυψίνη για να μετουσιωθούν οι χρωμοσωματικές πρωτεΐνες, και χρώση με Leishman.

Τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Τα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα θρυψίνης 0.05% για 30 sec περίπου και κατόπιν το ένζυμο απομακρύνεται με απόπλυση σε φυσιολογικό ορό με προσθήκη 4 σταγόνων fetal calf serum .
2. Ακολουθεί χρώση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα Leishman για 1 min.
3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση με νερό βρύσης.
4. Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν, προστίθενται 2 σταγόνες Dpx mountant ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετείται υάλινη καλυπτρίδα (24x50).

Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων

Τα ζωνοποιημένα και χρωσμένα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα μελετώνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeiss-AX 10) εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου και με λογισμικό σύστημα ψηφιακής εικόνας IKAROS, της εταιρίας Metasystems (Metasystems, Germany). Με αντικειμενικό φακό 10x, σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανιχνεύονται οι περιοχές που φέρουν μεταφάσεις με σχετικά καλή μορφολογία και διάταξη χρωμοσωμάτων, καθώς και με ικανοποιητικό για την ανάλυση αριθμό αλληλεπικαλυπτόμενων χρωμοσωμάτων. Με τη χρήση του καταδυτικού φακού 100x μεγεθύνεται η εικόνα της μετάφασης, η οποία και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονική μορφή.

Για κάθε δείγμα, πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος θεωρείται η ανάλυση 16 μεταφάσεων. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το ισχύον σύστημα κυτταρογενετικής ονοματολογίας ανθρώπου ISCN 2016.

2.2.2 Μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση με φθορίζοντα *in situ* Υβριδισμό (FISH)

Η μοριακή κυτταρογενετική ανάλυση με την εφαρμογή της τεχνολογίας του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) πραγματοποιείται σε μονιμοποιημένα κύτταρα μετά από την καλλιέργεια. Ο Φθορίζων *in situ* Υβριδισμός (FISH) επιτρέπει την ανίχνευση αλληλουχιών του DNA σε μεταφασικά χρωμοσώματα ή σε μεσοφασικούς πυρήνες κυτταρογενετικών μονιμοποιημένων δειγμάτων, μετά από καλλιέργεια. Η τεχνική χρησιμοποιεί DNA ανιχνευτές που έχουν δυνατότητα υβριδισμού με ολόκληρο το χρωμόσωμα ή μέρος αυτού και αποτελεί ένα βασικό εργαλείο συμπληρώνοντας τις κλασσικές κυτταρογενετικές τεχνικές. Το DNA στόχος, μετά από μονιμοποίηση, διαχωρίζεται με την βοήθεια της θερμοκρασίας παρουσία φορμαμίδης με αποτέλεσμα να είναι έτοιμο για υβριδισμό με τη μονή έλικα του DNA ανιχνευτή που έχει συμπληρωματική αλληλουχία και είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα. Μετά τον υβριδισμό ακολουθεί σειρά ξεπλυμάτων για τον καθαρισμό του δείγματος από ανιχνευτές DNA που δεν προσδέθηκαν ή προσδέθηκαν με μη ειδικό τρόπο και στη συνέχεια ολόκληρο το δείγμα σημαίνεται με χρώση αντιθέτου φάσεως. Στη συνέχεια το δείγμα είναι έτοιμο να αναλυθεί σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η ανάλυση συνήθως αφορά αρχικά την κεντρομεριδιακή περιοχή και στη συνέχεια

την υπομετακεντρική περιοχή ή ολόκληρο το χρωμόσωμα εάν χρησιμοποιηθούν ανιχνευτές βαφής των χρωμοσωμάτων (Whole Chromosome Painting-WCP). Για την ανάλυση FISH χρησιμοποιείται οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss AxioPlan 2, με κάμερα CCD (Meta System) και με σύστημα ανάλυσης εικόνων Isis (Meta System).

Προετοιμασία κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων

1. Για κάθε δείγμα, επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικρή ποσότητα (~20-30μl) μονομοποιημένων κυττάρων και η ποιότητα των παρασκευασμάτων (πυκνότητα κυττάρων, ανάπτυξη μεταφάσεων) ελέγχεται με οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης.
2. Τα πλακίδια επωάζονται σε θερμική πλάκα, στους 60 °C για 60 min, προκειμένου να επέλθει παλαίωση (ageing).
3. Ακολουθεί έκπλυση σε SSC (2x), σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.
4. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται εκπλύσεις 3 min των αντικειμενοφόρων πλακών, σε θερμοκρασία δωματίου, σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 70%, 90% και 100% με ανακίνηση, προκειμένου να γίνει αφυδάτωση των δειγμάτων και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν σε όρθια θέση.

Υβριδισμός του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή στόχο

1. 10 μl του διαλύματος του μοριακού ιχνηθέτη προστίθενται στο κέντρο της αντικειμενοφόρου πλάκας, σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού.
2. Η περιοχή καλύπτεται με αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22x22 και στεγανοποιείται με την τοποθέτηση ειδικής κόλλας στην περιφέρεια της καλυπτρίδας.
3. Τα πλακίδια τοποθετούνται σε ειδική επωαστική συσκευή Thermobrite, σε περιβάλλον υγρασίας, για την αποδιάταξη της χρωματίνης και τον υβριδισμό του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή – στόχο.
4. Το πρόγραμμα αποδιάταξης – υβριδισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:
Φάση αποδιάταξης: 75°C, για 1 min
Φάση υβριδισμού: 45°C, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

Εκπλύσεις και ανίχνευση σήματος υβριδισμού

1. Στα 2 υάλινα δοχεία, τύπου corlin jar, τοποθετείται διάλυμα έκπλυσης σε θερμοκρασία δωματίου [SolA(1), SolA(2)]. Το ένα από αυτά προθερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 73°C, ενώ το άλλο παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Αφαιρείται με λεπτή λαβίδα η κόλλα ελαστικού και απομακρύνεται η καλυπτρίδα, ενώ σημειώνονται με μολύβι τα όρια των περιοχών υβριδισμού.
3. Έκπλυση στο διάλυμα SolA(1), για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό κυκλική ανακίνηση και σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού.
4. Έκπλυση στο διάλυμα SolA(2) για 1 min (+/- 30 sec), στους 73°C (+/-1°C).
5. Έκπλυση υπό κυκλική ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου στο διάλυμα SolA(1) για 2 min.
6. Αφυδάτωση σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 70%, 90% και 100% για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση (εκτός της 100% EtOH). Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα, σε σκοτεινό περιβάλλον και σε όρθια θέση.
7. Έκπλυση διάρκειας 15 min σε PBS (3 επαναλήψεις).
8. Επώαση με αντίσωμα Anti-BrdU-fluoresceine (30μg/ml) για 1 h στους 37°C.
9. Έκπλυση διάρκειας 15 min σε PBS (3 επαναλήψεις).
10. Σε κάθε πλακάκι προστίθενται 10 μL μίγματος αντίχρωσης DAPI (Mountant/Counterstain), στην περιοχή υβριδισμού και η περιοχή – στόχος καλύπτεται με γιάλυνη αποστειρωμένη καλυπτρίδα 24x50 mm.
11. Πριν από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε σκοτεινό περιβάλλον, σε ειδικές χάρτινες θήκες.

Μικροσκοπική παρατήρηση, ανάλυση και αξιολόγηση χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων

Τα παρασκευάσματα μελετώνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeis Axioplan 2 microscope system), χρησιμοποιώντας τα ενδεδειγμένα φίλτρα φθορισμού και το λογισμικό σύστημα ψηφιακής εικόνας ISIS (Metasystem, Germany), σε περιβάλλον μειωμένου φωτισμού. Με αντικειμενικό φακό 20 \times , σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανιχνεύονται οι βέλτιστες περιοχές υβριδισμού (καλή κατανομή πυρήνων, φωτεινά και ευκρινή σήματα). Στη συνέχεια, με τη χρήση αντικειμενικό 100 \times , σαρώνεται η περιοχή και καταμετράται ο αριθμός των σημάτων κάθε μετάφασης. Η διαδικασία καταμέτρησης επαναλαμβάνεται για 100 μεταφάσεις. Τέλος εφόσον είναι εφικτό, πραγματοποιείται και αξιολόγηση 10 μεταφάσεων.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βρέθηκαν 16 CNV και VOUS στο σύνολο των 62 Ασθενών με ASD, τα οποία δεν περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων DGV (Database of genetic variants) οπότε δεν ανήκουν στην κατηγορία των CNPs (Copy Number Polymorphisms) ή αλλιώς κοινών πολυμορφισμών προσδίδοντας ένα ποσοστό των CNV της τάξης των 25%.

Σε 8 από τις 62 περιπτώσεις ασθενών εξετάστηκαν και οι γονείς προκειμένου να διαπιστωθεί η κληρονομικότητα του ευρήματος αποκαλύπτοντας από τα 16 CNVs, τα 2 CNVs να είναι de novo, τα 4 CNVs να είναι de novo αλλά λόγω κάποιας αναδιάταξης στον γονέα και τα 5 κληρονομούμενα, εκ των οποίων, 4 CNVs πατρικής προελεύσεως και 1 CNVs μητρικής προελεύσεως. Από το σύνολο των CNVs και VOUS που μελετήθηκαν περιλαμβάνονται, 10 ελλείματα και 6 διπλασιασμοί.

Ανάμεσα στους 12 ασθενείς με CNV, υπήρχαν 3 κορίτσια και 9 αγόρια προσδίδοντας μία αναλογία 4:1 και οι ηλικίες κυμαίνονταν από 2 έως 13 ετών.

Από τα 16 CNV που βρέθηκαν 5 είχαν κλινική σημασία προσδίδοντας ένα ποσοστό γύρω στο 30% επί του συνόλου των ευρημάτων (CNV και VOUS). Οι ασθενείς με CNV κλινικής σημασίας ήταν 4 αγόρια και 1 κορίτσι.

11 αγνώστου κλινικής σημασίας CNVs (VOUS) ανευρέθηκαν σε 9 ασθενείς σε ποσοστό 15%, σε σχέση με το σύνολο των ασθενών.

Η αναφορά της παθογένειας των CNV όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων, βασίστηκε στη διεθνή βιβλιογραφία και στις αναφορές παρόμοιων ιδιοτυπιών σε ασθενείς με ASD στη βάση δεδομένων DECIPHER, ISCA, SFARI και AUTDB όπως επίσης σύμφωνα με τα γονίδια που περιλαμβάνονται μέσα στις περιοχές ιδιοτυπίας.

Το μεγαλύτερο σε μέγεθος CNV και VOUS ήταν 19,9Mb ενώ το μικρότερο ήταν 22kb. Τα 13 εκ των οποίων ήταν μικρότερα από 5Mb δηλαδή γύρω στο 81%, τα οποία δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τον κλασσικό καρυότυπο λόγω της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου(>5Mb). Τα 10 εκ των 13 ήταν μικρότερα της 1Mb.

Από τα 16 CNVs και VOUS, τα 15 ήταν αυτοσωμικά [2p22.3p22.2, 2q14.1q21.3, 2q31.2q31.3, 3p26.3, 3p14.1, 6p21.2, 7q36.1, 10p11.21, 10q11.22, 15q11.2(x2), 17p12, 17q25.3, 22q13.1, 22q13.1q13.2] ενώ το 1 ήταν X-φυλοσύνδετο [Xp22.32].

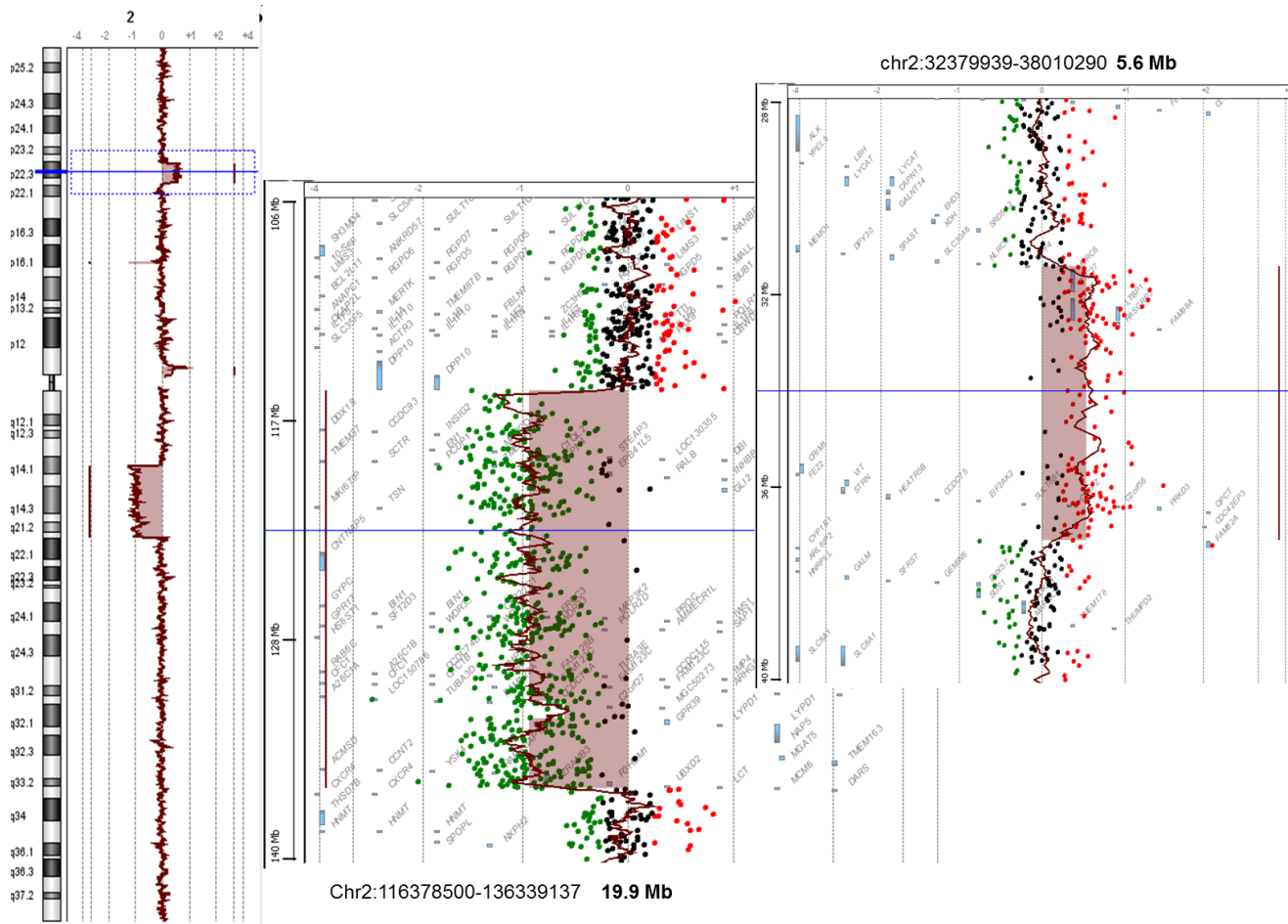
Από τους 12 ασθενείς με CNVs και VOUS, είχαμε έναν ασθενή με επαναλαμβανόμενη νευροπάθεια με παράλυση πολυνευροπάθεια με επιρρέπεια σε πιεστικές βλάβες (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies – HNPP) και έλλειμμα στο 17q25.3, έναν με Σύνδρομο Waardenburg και έλλειμμα στο χρωμόσωμα 22q13.1, μία ασθενή με Σύνδρομο Currarino και έλλειμμα στο 7q36.1q36.3 και 2 αδέλφια με Σύνδρομο Angelman και έλλειμμα στην περιοχή 15q11.2.

Σε 9 ασθενείς βρέθηκε 1 CNV και VOUS, σε 2 ασθενείς βρέθηκαν 2 CNV και VOUS και σε 1 ασθενή βρέθηκαν 3 CNV και VOUS. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι ασθενείς, τα κλινικά στοιχεία τους και τα CNVs που βρέθηκαν. Στην συνέχεια ακολουθούν οι εικόνες ων αποτελεσμάτων των ασθενών.

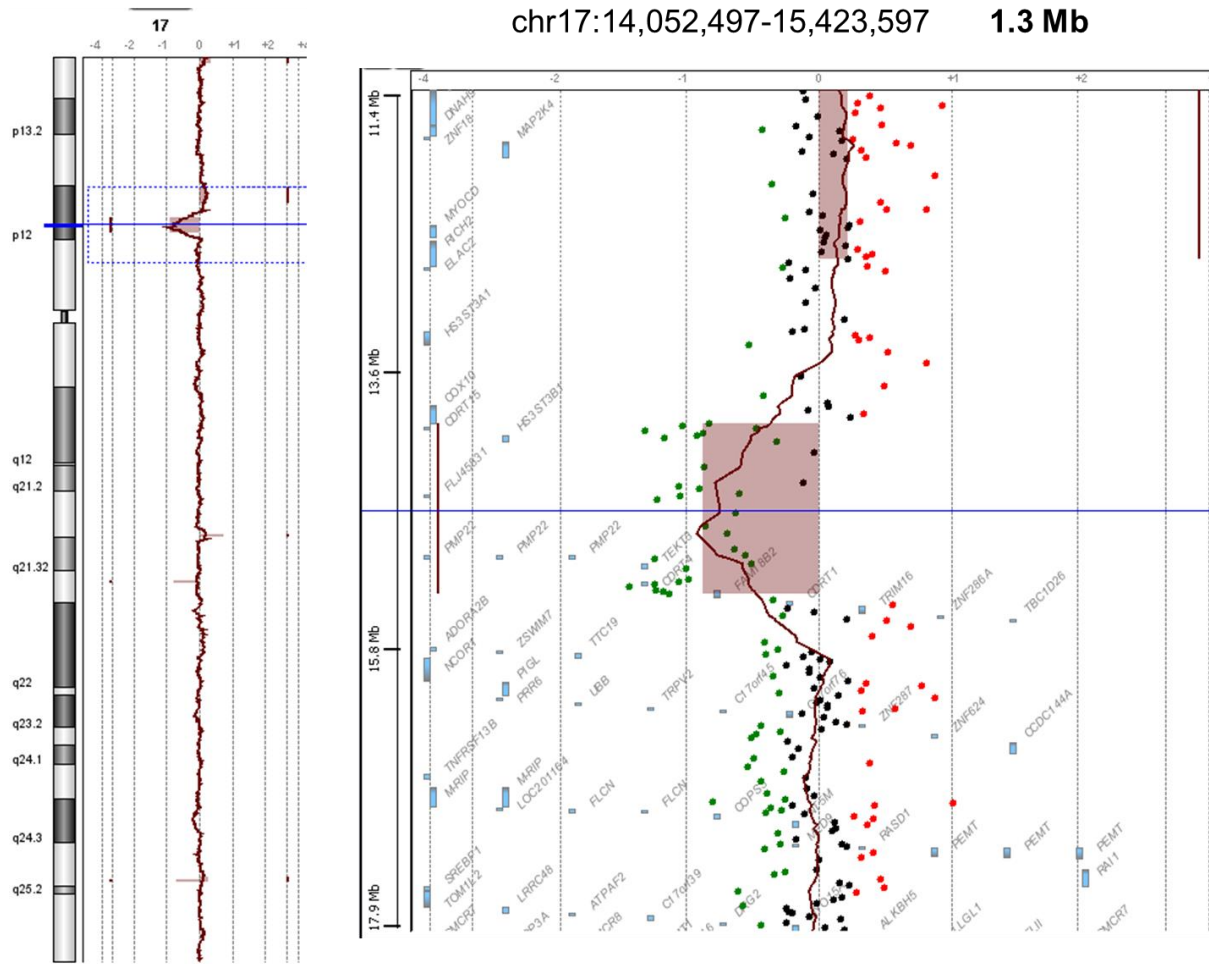
ΑΣΘΕΝΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ(ΕΤΗ)/ ΦΥΛΟ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΚΑΗΡΟΝΟ ΜΙΚΟΤΗΤΑ	ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
1	2, αγόρι	σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, θρομβοφιλία, υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και δυσμορφα χαρακτηριστικά προσώπου, άκρων και σώματος	2p22.3p22.2(32,397,939- 38,010,290)x3 2q14.1q21.3(116,378,500-136,326,137)x1 17p12(14,052,497-15,235,597)x1	5.6 Mb 19.9 Mb 1.3 Mb	de novo (paternally inherited) pat	CRM1, PMP22	VOUS VOUS CNV
2	3, κορίτσι	υποτονία, ήπιες δυσμορφίες, μικροκεφαλία, υπερτελορισμός, καθίζηση ριζορρινίου, βλεφαρικές σχισμές, μικρό πηγούνι	2q31.2q31.3(178,393,185-182,296,336)x1	3.9 Mb	de novo	CCDC141, CWC22, PDE11A, ZNF385B	VOUS
3	11, αγόρι	ήπια νοητική μειονεξία, ιδιότυπα χαρακτηριστικά, υπερτρίχωση, κοντό ανάστημα	3p26.3(2,354,154-2,376,834)x1	22 kb	N/A	CNTN4	VOUS
4	12, αγόρι	βαριά αναπτυξιακή καθυστέρηση, βαριά κινητική καθυστέρηση(τετραπληγία), δυσμορφίες προσώπου, επίκανθος, επίπεδο φίλτρο, μακριές βλεφαρίδες	3p14.1(65,912 Mb-66,462 Mb)x3 22q13.1q13.2(38,255 Mb- 39,383 Mb)x3	1.1 Mb 550 kb	mat pat	MAGL2, DNAL4, KCLN4, NPTXR, PICK1, PLAG2G6, SUN2, SOX10	VOUS VOUS
5	6, αγόρι	βαριά νοητική υστέρηση, κύστη κωναρίου (συγγενείς δυσπλασίες), υπερτονία, μικροκεφαλία)	6p21.2(38,420,709-38,554,812)x1	135 kb	pat	BTBD9	VOUS
6	10, κορίτσι	πολλαπλές συγγενείς διαμαρτίες, μικροκεφαλία, νεφρική δυσπλασία, υδρόνέφρωση, διασχιδής ράχη, αναπτυξιακή διαταραχή, νοητική μειονεξία	7q36.1q36.3(152,116,972-159,088,577)x1	7 Mb	N/A	DPP6, EN2, SHH MNX1	CNV
7	3, αγόρι	διαταραχή επικοινωνίας και λόγου, υπερτονία, μικρό φίλτρο, υπερόρα γοθικού τύπου, υποπλασία άνω γνάθου, αμυγδαλωτά μάτια	10p11.21(34,626,197-34,790,541)x3 10q11.22(47,011,584-47,148,546)x1	164kb 137kb	N/A	PARD3, PPYR1	VOUS
8	5.5, αγόρι	βαριά νοητική μειονεξία, κινητική καθυστέρηση, διαταρακτική συμπεριφορά, εκρήξεις θυμού, στερεοτυπία, μακρογλωσσία, προεξέχων μέτωπο, επίκανθος, μακριές βλεφαρίδες, βολβώδης μύτη, φλεγμονώδεις αλλοιώσεις των παραρρινίων κόλπων και των μαστοειδών κυψελών	15q11.2(25,298,779-25,596,976)x1	300Kb	de novo (maternally inherited)	IPW , PWAR1, SNORD115-1, UBE3A, SNHG14	CNV
9	4.5, αγόρι	Νοητική μειονεξία	15q11.2(25,298,779-25,596,976)x1	300Kb	de novo (maternally inherited)	IPW , PWAR1, SNORD115-1, UBE3A, SNHG14	CNV
10	6, αγόρι	Νοητική μειονεξία	17q25.3(76,005,453-76,793,927)x3	800kb	N/A	KANENA ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ	VOUS
11	13, αγόρι	υποτονία, ελαφρύ τρέμουλο, δυσκολία στην κατάποση, κόφωση, νοητική μειονεξία, ψυχοκινητική αναπτυξιακή καθυστέρηση, αμφοτερόπλευρη κρυφοργία, εξοδοντία, χρωστικές διαταραχές του δέρματος	22q13.1(38,202,740-38,927,438)x1	725kb	de novo	NPTXR, PICK1, PLA2G6, SOX10	CNV
12	9, κορίτσι	υπερκινητικότητα, ιδιότυπα χαρακτηριστικά, βαριά νοητική μειονεξία, διάσπαση προσοχής	Xp22.32(4,774,096-5,161,995)x3	388Kb	pat	KANENA ΓΟΝΙΔΙΟ	VOUS

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΗΛΙΚΙΑ(ΕΤΗ)/ ΦΥΛΟ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΚΑΗΡΟΝΟ ΜΙΚΟΤΗΤΑ	ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ
1	2, αγόρι	σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, θρομβοφιλία, υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και δυσμορφα χαρακτηριστικά προσώπου, άκρον και σώματος	2p22.3p22.2(32,397,939- 38,010,290)x3 2q14.1q21.3(116,378,500-136,326,137)x1 17p12(14,052,497-15,235,597)x1	5.6 Mb 19.9 Mb 1.3 Mb	de novo (paternally inherited) pat	CRM1, PMP22	VOUS VOUS CNV
2	3, κορίτσι	υποτονία, ήπιες δυσμορφίες, μικροκεφαλία, υπερτελορισμός, καθίζηση ριζορρινίου, βλεφαρικές σχισμές, μικρό πηγούνι	2q31.2q31.3(178,393,185-182,296,336)x1	3.9 Mb	de novo	CCDC141, CWC22, PDE11A, DRB1, ZNF385B	VOUS
3	11, αγόρι	ήπια νοητική μειονεξία, ιδιότυπα χαρακτηριστικά, υπερτρίχωση, κοντό ανάστημα	3p26.3(2,354,154-2,376,834)x1	22 kb	N/A	CNTN4	VOUS
4	12, αγόρι	βαριά αναπτυξιακή καθυστέρηση, βαριά κινητική καθυστέρηση(τετραπληγία), δυσμορφίες προσώπου, επίκανθος, επίπεδο φίλτρο, μακριές βλεφαρίδες	3p14.1(65,912 Mb-66,462 Mb)x3 22q13.1q13.2(38,255 Mb- 39,383 Mb)x3	1.1 Mb 550 kb	mat pat	MAGL2, DNAL4, KCLN4, NPTXR, PICK1, PLAG2G6, SUN2, SOX10	VOUS VOUS
5	6, αγόρι	βαριά νοητική υστέρηση, κύστη καναριού (συγγενείς δυσπλασίες), υπερτονία, μικροκεφαλία)	6p21.2(38,420,709-38,554,812)x1	135 kb	pat	BTBD9	VOUS
6	10, κορίτσι	πολλαπλές συγγενείς διαμαρτίες, μικροκεφαλία, νεφρική δυσπλασία, υδρόνέφρωση, διαχιδή ράχη, αναπτυξιακή διαταραχή, νοητική μειονεξία	7q36.1q36.3(152,116,972-159,088,577)x1	7 Mb	N/A	DPP6, EN2, SHH MNX1	CNV
7	3, αγόρι	διαταραχή επικοινωνίας και λόγου, υπερτονία, μικρό φίλτρο, υπερία γοθικού τύπου, υποπλασία άνω γνάθου, αμυγδαλωτά μάτια	10p11.21 (34,626,197-34,790,541)x3 10q11.22 (47,011,584-47,148,546)x1	164kb 137kb	N/A	PAR3, PPYR1	VOUS
8	5.5, αγόρι	βαριά νοητική μειονεξία, κινητική καθυστέρηση, διαταρακτική συμπεριφορά, εκρήξεις θυμού, στερεοτυπία, μακρογλωσσία, προεξέχων μέτωπο, επίκανθος, μακριές βλεφαρίδες, βολβώδης μύτη, φλεγμονώδεις αλλοιώσεις των παραρρινίων κόλπων και των μαστοειδών κυψελών	15q11.2 (25,298,779-25,596,976)x1	300Kb	de novo (maternally inherited)	IPW , PWAR1, SNORD115-1, UBE3A, SNHG14	CNV
9	4.5, αγόρι	Νοητική μειονεξία	15q11.2 (25,298,779-25,596,976)x1	300Kb	de novo (maternally inherited)	IPW , PWAR1, SNORD115-1, UBE3A, SNHG14	CNV
10	6, αγόρι	Νοητική μειονεξία	17q25.3(76,005,453-76,793,927)x3	800kb	N/A	KANENA ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ	VOUS
11	13, αγόρι	υποτονία, ελαφρύ τρέμουλο, δυσκολία στην κατάποση, κόφωση, νοητική μειονεξία, ψυχοκινητική αναπτυξιακή καθυστέρηση, αμφοτερόπλευρη κρυφοργία, εξοδαχτυλία, χρωστικές διαταραχές του δέρματος	22q13.1(38,202,740-38,927,438)x1	725kb	de novo	NPTXR, PICK1, PLA2G6, SOX10	CNV
12	9, κορίτσι	υπερκνητικότητα, ιδιότυπα χαρακτηριστικά, βαριά νοητική μειονεξία, διάσπαση προσοχής	Xp22.32(4,774,096-5,161,995)x3	388Kb	pat	KANENA ΓΟΝΙΔΙΟ	VOUS

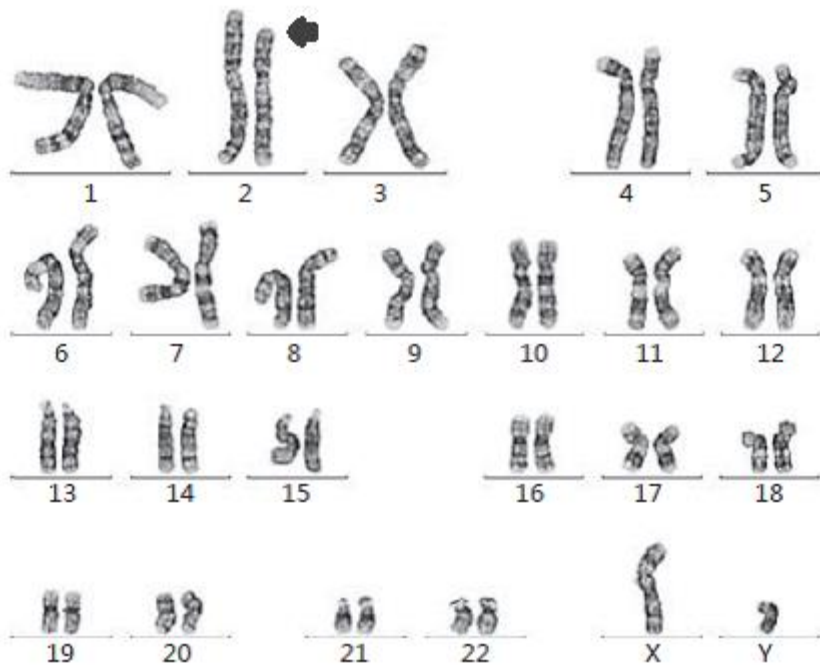
Πίνακας 10. Στον πίνακα παρατίθενται οι ασθενείς, τα κλινικά στοιχεία, τα αποτελέσματα των array-cgh και τα γονίδια.



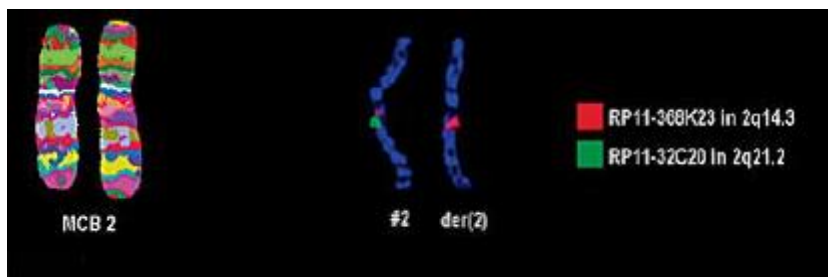
Εικόνα 3. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 1 όπου παρουσιάζεται ο διπλασιασμός και το έλλειμμα στο χρωμόσωμα 2



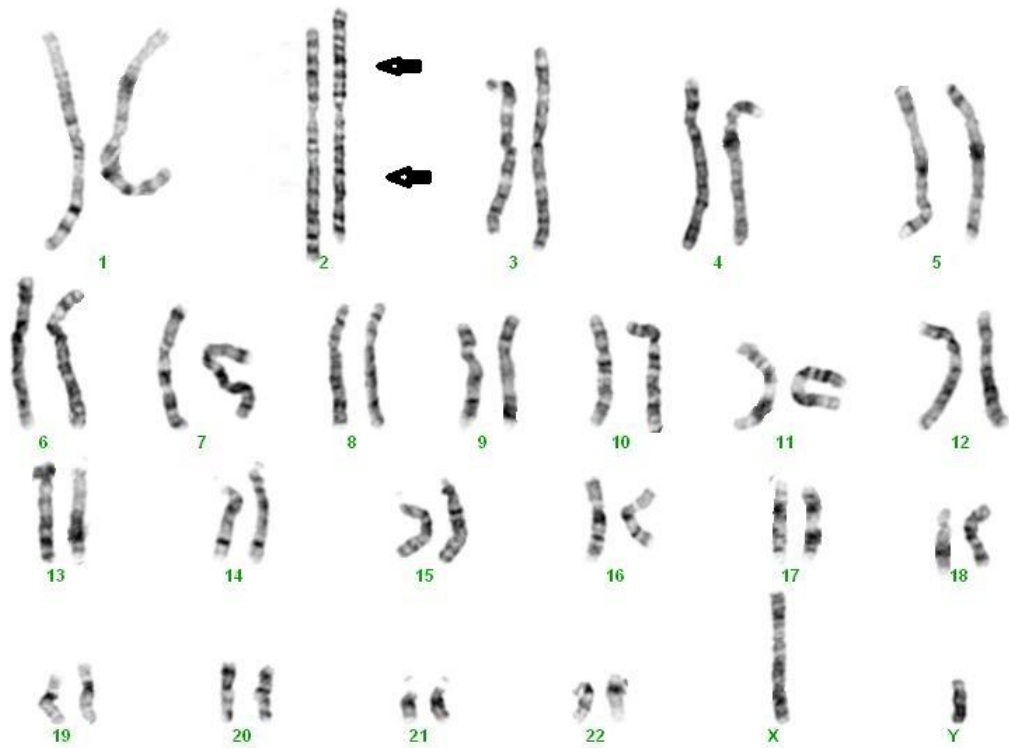
Εικόνα 4. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 1 όπου παρουσιάζεται το έλλειμμα στο χρωμόσωμα 17.



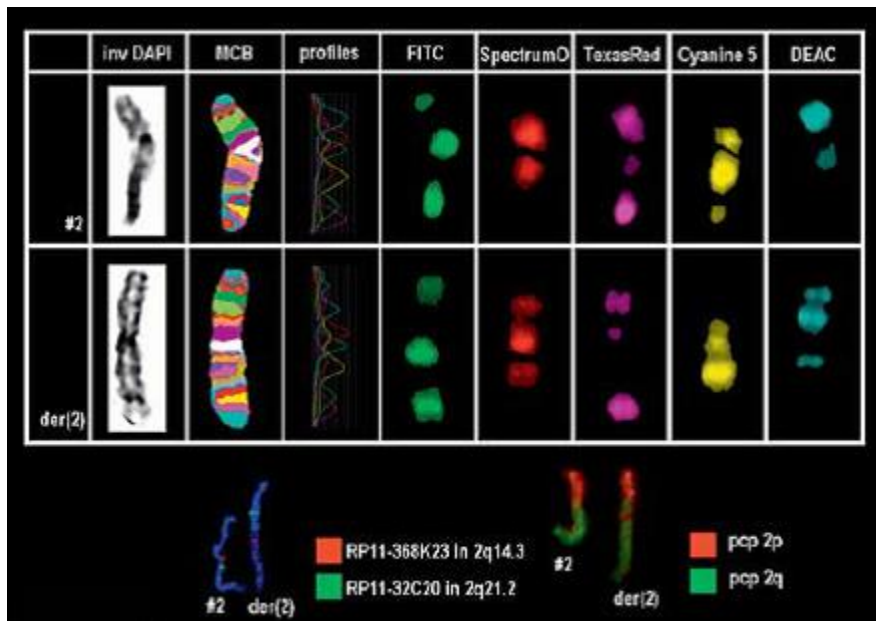
Εικόνα 5. Ανάλυση καρυοτύπου του ασθενή 1 όπου φαίνεται μόνο το έλλειμμα στο χρωμόσωμα 2.



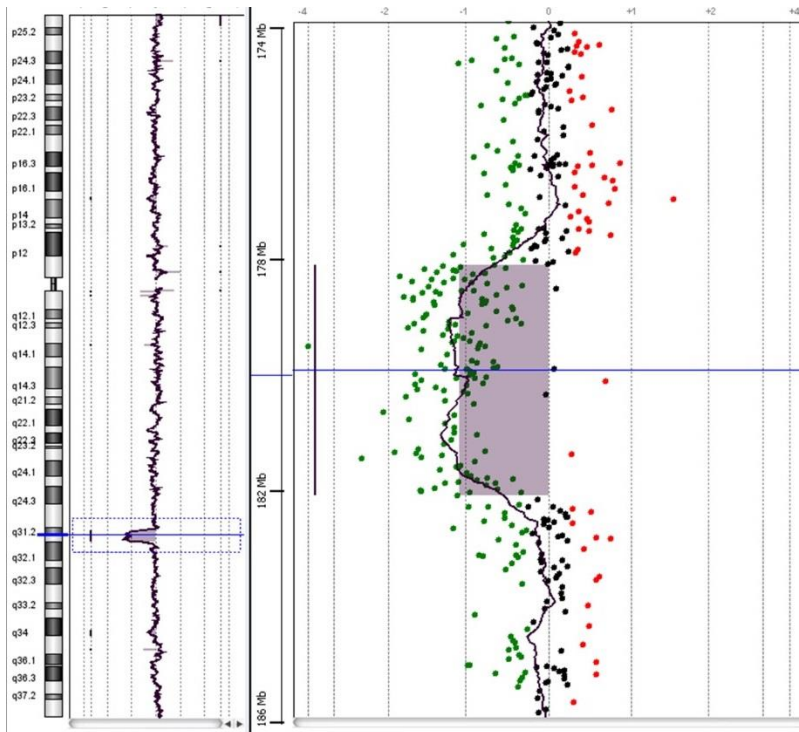
Εικόνα 6. Ανάλυση με τη μέθοδο της FISH του ασθενή 1, όπου φαίνεται η αναδιάταξη στο χρωμόσωμα 2.



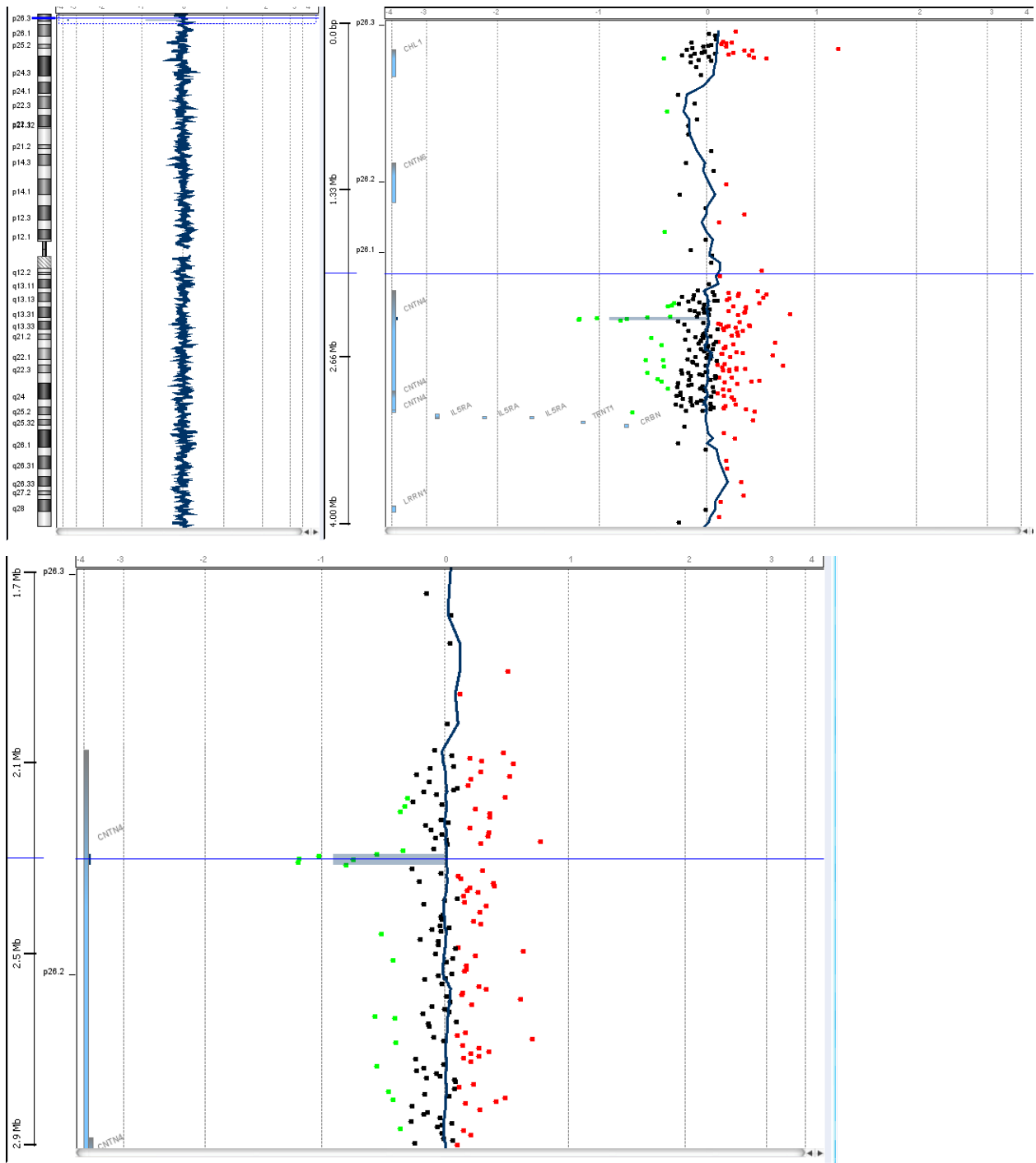
Εικόνα 7. Ανάλυση καρυοτύπου του πατέρα του ασθενή 1 με την αναστροφή στο χρωμόσωμα 2.



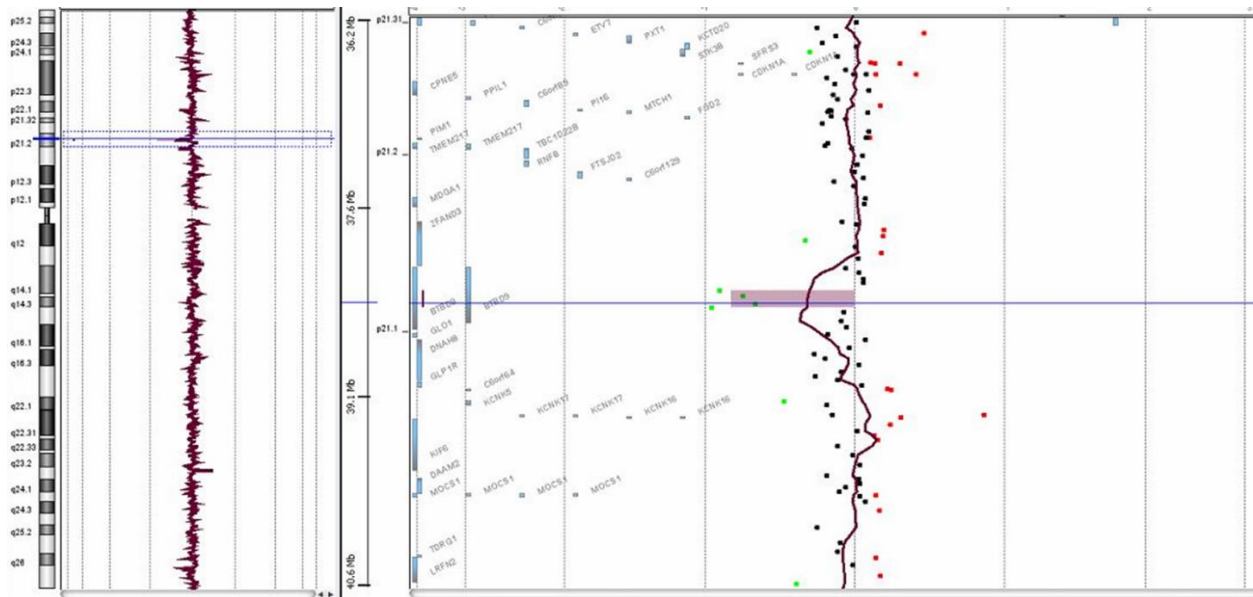
Εικόνα 8. Ανάλυση με τη μέθοδο FISH του πατέρα του ασθενή 1 με αναστροφή στο χρωμόσωμα 2.



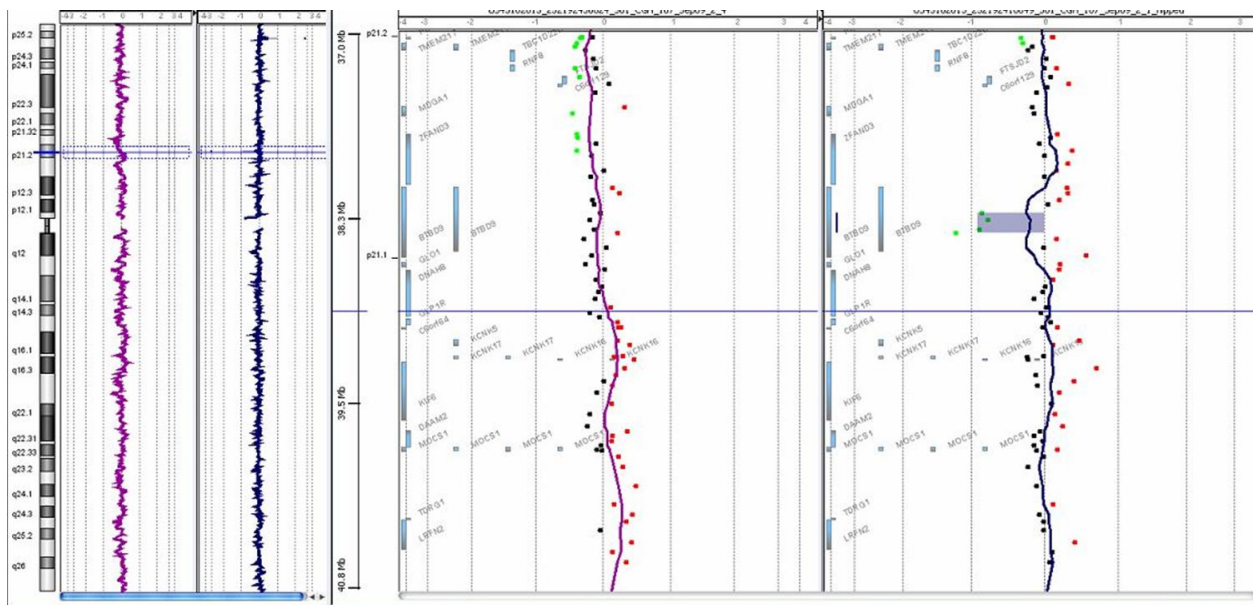
Εικόνα 9. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 2 με έλλειμμα στο χρωμόσωμα 2q31.2q31.3.



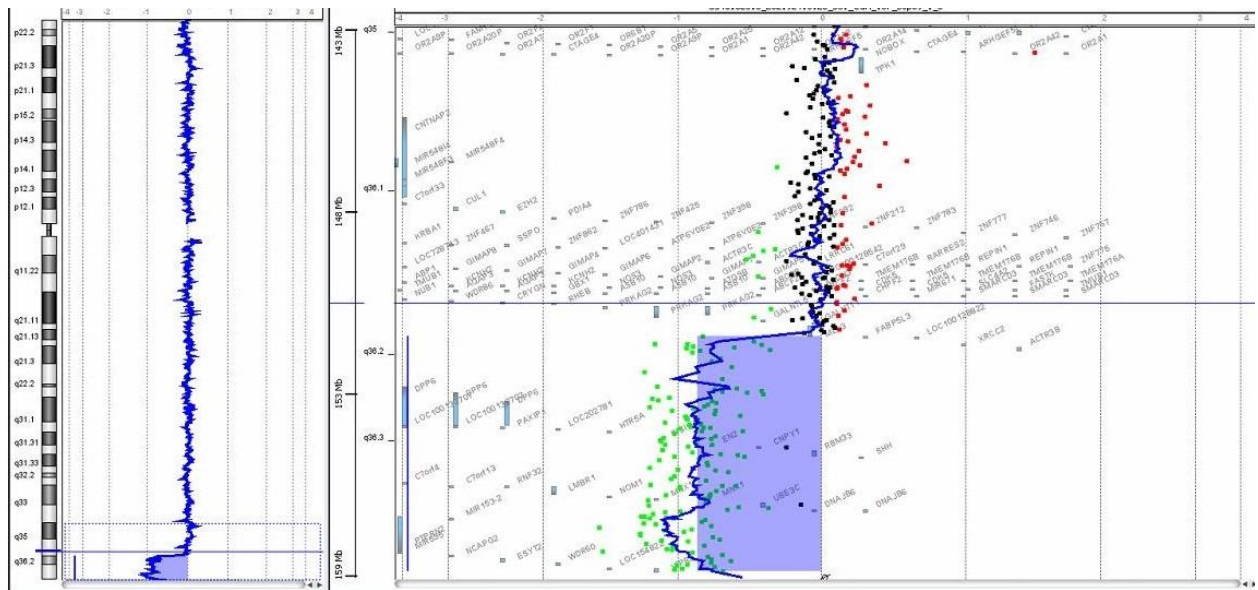
Εικόνα 10 & 11. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 3 με έλλειμμα στο χρωμόσωμα 3p26.3.



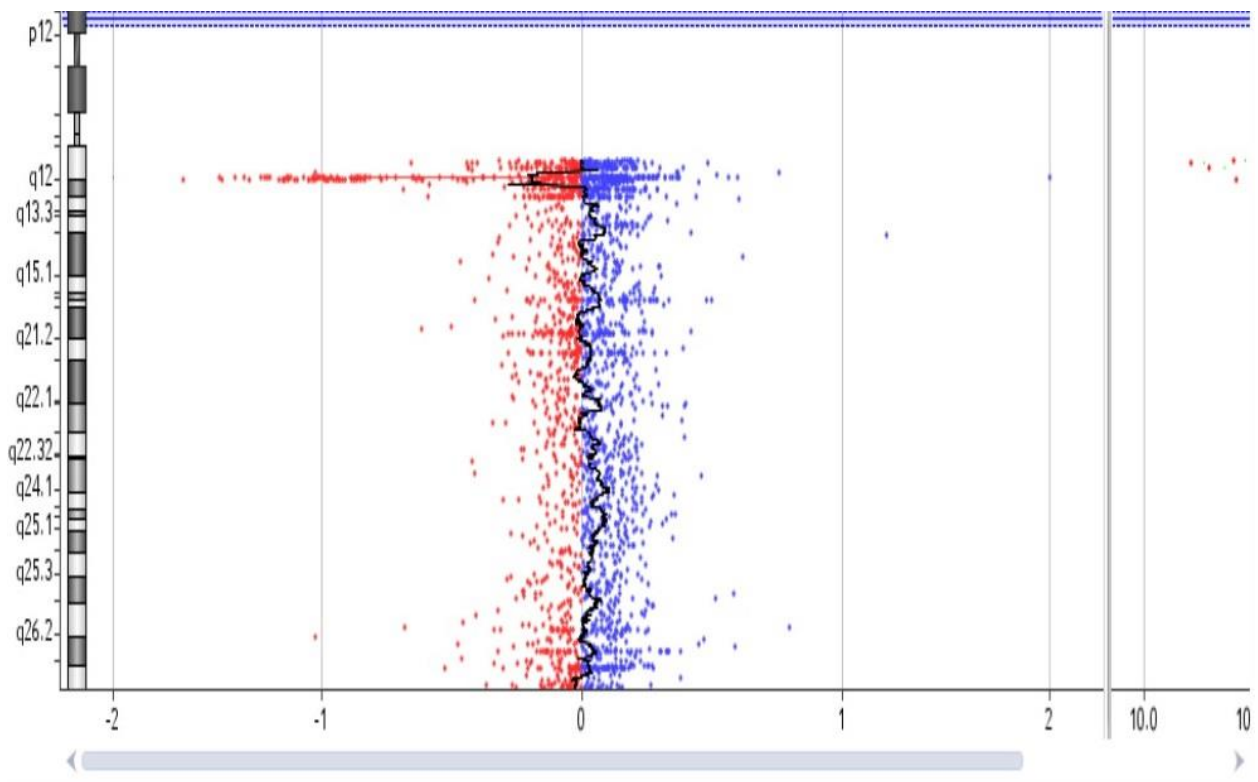
Εικόνα 12. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 5 με έλλειμμα στο 6p21.2.



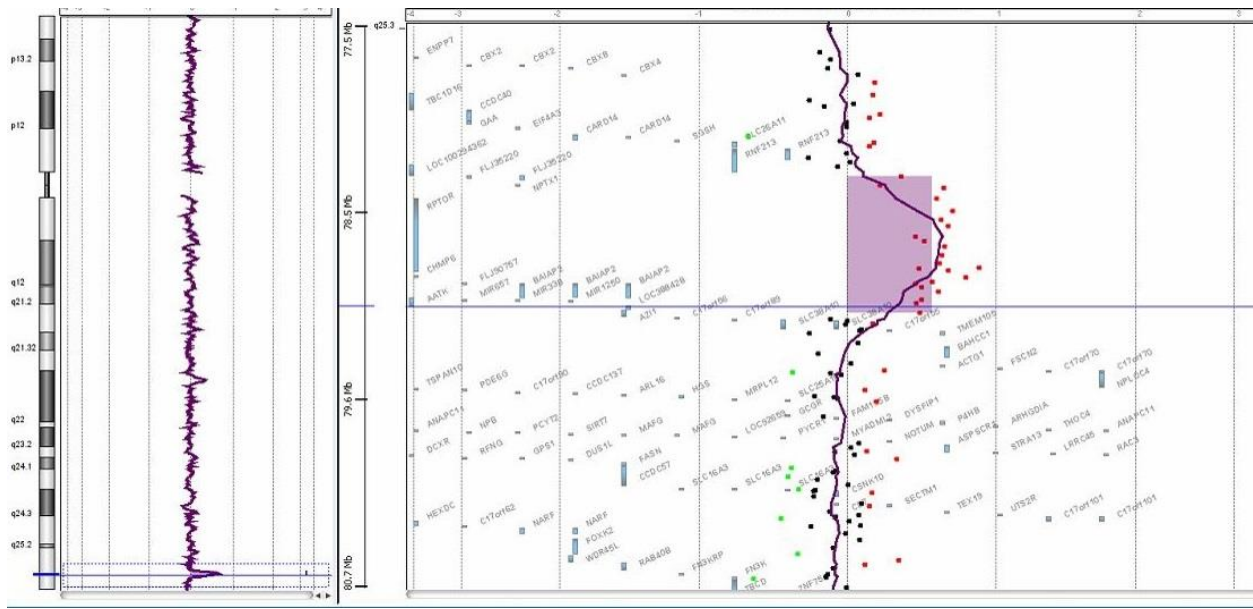
Εικόνα 13. Array-cgh ανάλυση των γονέων του ασθενούς 5 όπου φαίνεται ότι το ίδιο έλλειμμα φέρει και ο πατέρας στο 6p21.2.



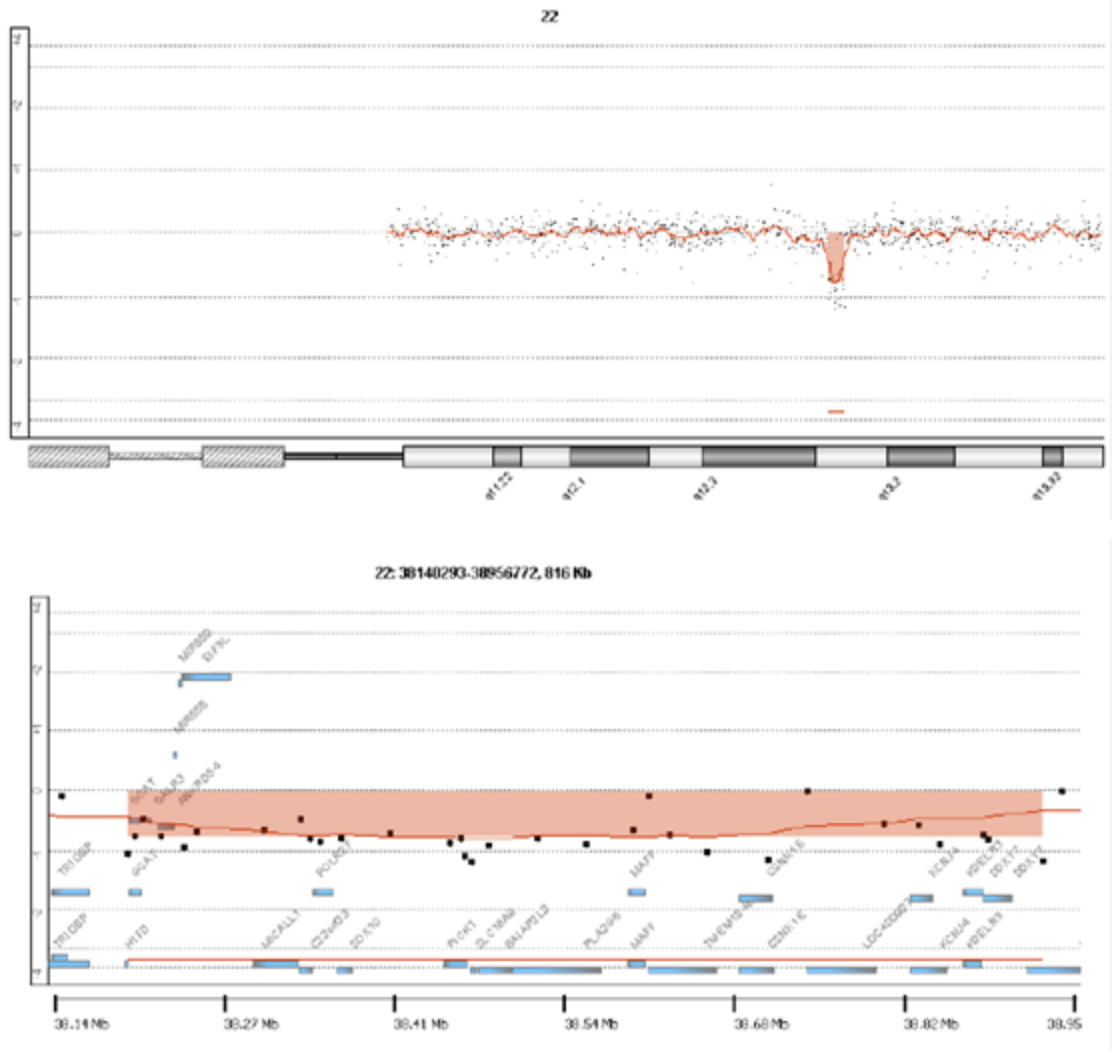
Εικόνα 14. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 6 όπου βρέθηκε έλλειμμα στο 7q36.1q36.3.



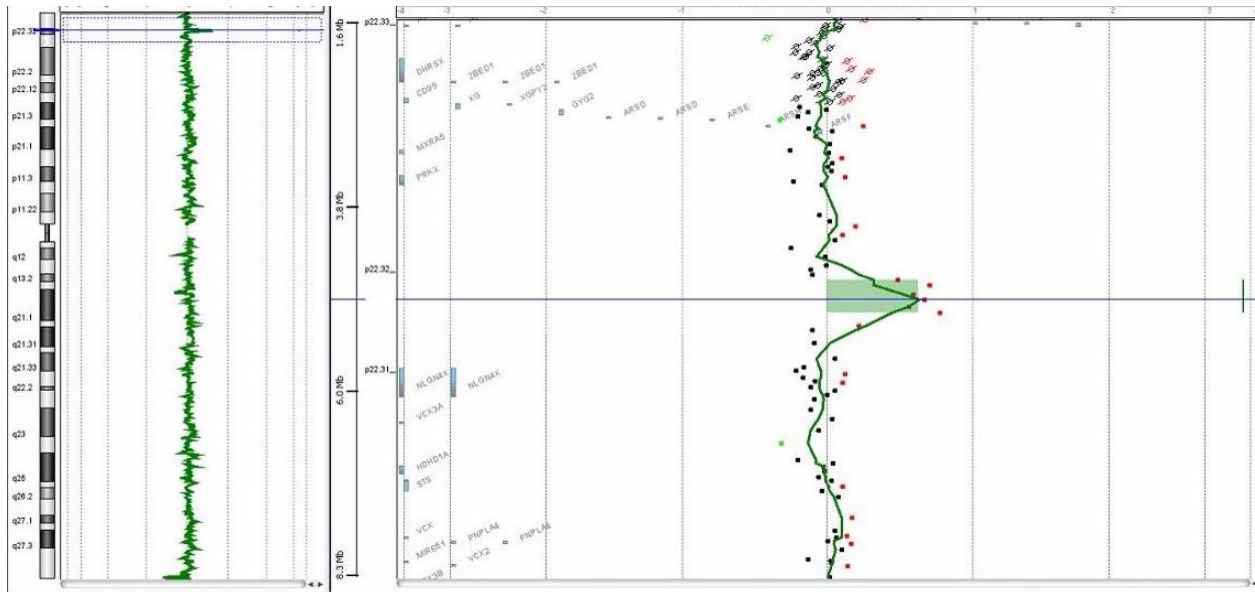
Εικόνα 15. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 8 & 9 με έλλειμμα στο 15q11.2.



Εικόνα 16. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 10 διπλασιασμό στο 17q25.3.



Εικόνα 17& 18 Array-cgh ανάλυση του ασθενή 11 με έλλειμμα στο 22q13.1



Εικόνα 19. Array-cgh ανάλυση του ασθενή 12 με διπλασιασμό στο Xp22.32

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με τη χρήση της μεθόδου του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού με μικροσυστοιχίες (a-CGH) ή αλλιώς μοριακού καρυότυπου για τη διάγνωση ασθενών με διαταραχές του φάσματος του αυτισμού, ανιχνεύοντας μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμούς, προσέδωσε ένα 20% επιπλέον ευρημάτων σε σχέση με το συμβατικό καρυότυπο.

Ο ασθενής 1, σε ηλικία 2,5 ετών διαγνώστηκε με σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, θρομβοφιλία, υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και δύσμορφα χαρακτηριστικά προσώπου, άκρων και σώματος. Η ανάλυση με μοριακό καρυότυπο αποκάλυψε πολύπλοκη αναδιάταξη που περιλαμβάνει, ένα διπλασιασμό στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 2p22.3p22.2 μεγέθους 5,6 μεγαβάσεων, ένα έλλειμμα στο μεγάλο βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος 2q14.1q21.3 μεγέθους 20 μεγαβάσεων και έλλειμμα στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17p12 μεγέθους 1,3 μεγαβάσης. Έπειτα από έλεγχο με μοριακό καρυότυπο που έγινε στους γονείς έδειξε ότι το ίδιο έλλειμμα στην περιοχή 17p12 το φέρει και ο πατέρας όπως επίσης και ότι οι μη ισοζυγισμένες αναδιατάξεις στο χρωμόσωμα 2 οφείλονται σε κάποια αναδιάταξη στο χρωμόσωμα 2 του πατέρα. Πράγματι πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος του πατέρα με τη μέθοδο του καρυότυπου όπου έδειξε παρακεντρική αναστροφή στο χρωμόσωμα 2 στην περιοχή 2p13p23 και περαιτέρω έλεγχος με τη μέθοδο της FISH όπου έδειξε και ένθεση, ενός τμήματος από το μεγάλο βραχίονα του ίδιου χρωμοσώματος (2q14.1q21.2), στο μικρό βραχίονα στο τμήμα 2p22.3. Ο πατέρας ήταν φαινοτυπικά υγιής (βλεφαρόπτωση).

Η πρώτη περιοχή περιλαμβάνει 15 γονίδια OMIM, η δεύτερη περιλαμβάνει 49 γονίδια και η τρίτη 13.

Στην διπλασιασμένη περιοχή 2p22.3p22.2 περιλαμβάνεται ένα γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος, το CRIM1, το οποίο μπορεί να αλληλεπιδρά με αυξητικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στην διαφοροποίηση και επιβίωση των κινητικών νευρώνων (Kolle et al., 2000).

Η διαγραμμένη περιοχή στο 17p12 περιλαμβάνει το PMP22 γονίδιο που παίζει σημαντικό ρόλο στη μυελίνωση των περιφερικών νευρώνων, εκφραζόμενο από τα κύτταρα Schwann (Spreyer et al. 1991). Η έλλειψη του συγκεκριμένου γονιδίου φαίνεται ότι εμπλέκεται στην επαναλαμβανόμενη νευροπάθεια με παράλυση πολυνευροπάθεια με επιρρέπεια σε πιεστικές βλάβες (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies - HNPP OMIM 162500). Είναι μια σχετικά ήπια

νευροπάθεια στην οποία ήπια πίεση ή κάποιο τραύμα σε ένα νεύρο οδηγεί σε επεισόδια ή περιόδους με μούδιασμα κι αδυναμία.

Όσον αφορά τις δύο πρώτες αναδιατάξεις που αφορούν το χρωμόσωμα 2, έχουν καταγραφεί πάνω από 15 περιστατικά διαγνωσμένα με ΔΑΦ στη βάση δεδομένων του Decipher και ISCA, με επικάλυψη των περιοχών αυτών.

Στην 2η ασθενή, ένα κορίτσι 3 ετών, βρέθηκε *de novo* έλλειμμα στο χρωμόσωμα 2 στην περιοχή q31.2q31.3, μεγέθους 3.9 μεγαβάσεων. Η διαγραμμένη περιοχή περιλαμβάνει 13 γονίδια εκ των οποίων το CCDC141, το CWC22, το PDE11A, DRB1 και το ZNF385B.

Σύμφωνα με την ομάδα του Fukuda, το γονίδιο CCDC141 παίζει ρόλο στην τοποθέτηση και μετακίνηση του κεντροσώματος κατά τη διάρκεια της νευρωνικής μετανάστευσης στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα. Η ανάλυση με Western blot έδειξε ισχυρή έκφραση της πρωτεΐνης CAMDI σε εμβρυικό εγκέφαλο ποντικού αλλά καθόλου έκφραση στον ενήλικο εγκέφαλο. *In situ* υβριδοποίηση κατέγραψε μικρή έκφραση της πρωτεΐνης σε κύτταρα του ενήλικου, εγκεφάλου, του υπόκαμπου, της υπόφυσης σε ποντίκια (Fukuda et al., 2010).

Επίσης το γονίδιο CWC22 είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του exon junction complex (EJC) το οποίο εμπλέκεται στη διαδικασία του ματίσματος (Barbosa et al., 2012). Ανιχνεύθηκε ισχυρή έκφραση του CWC22 σε όλες τις εξεταζόμενες περιοχές του ενήλικου εγκέφαλου, με υψηλότερη έκφραση στην περιοχή του μεσολοβίου και στην αμυγδαλή (Nagase et al., 2000).

Όσον αφορά το τρίτο γονίδιο πειράματα σε ποντίκια που πραγματοποιήθηκαν αποκάλυψαν την έκφραση του γονιδίου PDE11A σε διάφορες περιοχές του υπόκαμπου. Knockout ποντίκια για το PDE11A έδειξαν διαταρακτική συμπεριφορά όπως υπερκινητικότητα, διαταραχή της κοινωνικότητας, και αντικοινωνικότητα. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι το γονίδιο PDE11A παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκέφαλο με πιθανό ρόλο στις ψυχιατρικές διαταραχές (Kelly et al., 2010). Έκφραση του γονιδίου DRB1 βρέθηκε σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο ποντικών, η οποία ήταν δυναμικά ρυθμιζόμενη κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, ελάττωμα ή έλλειψη του οποίου μπορεί να παίζει ρόλο σε αυτή (Tamada et al., 2002).

Το γονίδιο το ZNF385B εκφράζεται στον εγκέφαλο, υποθέτοντας ότι παίζει ρόλο στην ωρίμανση του RNA, στη σταθερότητα ή την ρύθμιση της μεταγραφής (Monford et al., 2008).

Το μικρότερο έλλειμμα βρέθηκε στον 3^ο ασθενή ένα αγόρι 11 ετών, μεγέθους μόλις 22kb στο χρωμόσωμα 3p26.3 το οποίο περιλαμβάνει 1 γονίδιο το CNTN4 που ανήκει στην οικογένεια των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης των αντισωμάτων(Ig) που ρυθμίζουν, την έναρξη των επαφών, το σχηματισμό των συνάψεων, την ωρίμανση των συνάψεων και την λειτουργική τους πλαστικότητα. Η ομάδα του Roohi εντόπισαν ένα πολυμορφισμό επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (CNV) στο χρωμόσωμα 3 που διακόπτει το γονίδιο CNTN4 σε 3 από τους 92 ασθενείς που μελετήθηκαν με ΔΑΦ, 2 αδέρφια είχαν έλλειμμα ενώ ένας άλλος ασθενής είχε διπλασιασμό και τα δύο αυτά ευρήματα ήταν πατρικής προελεύσεως (ο γονέας ήταν φυσιολογικός) (Roohi et al., 2009). Σε άλλη δημοσίευση αναφέρεται άλλος ένας ασθενής με ΔΑΦ με έλλειψη του γονιδίου CNTN4 (Cottrell et al., 2011). Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα πιθανής εμπλοκής του γονιδίου στον φαινότυπο της ΔΑΦ.

Ο τέταρτος ασθενής παραπέμφθηκε σε ηλικία 12 ετών λόγω βαριάς αναπτυξιακής καθυστέρησης, βαριάς κινητικής καθυστέρησης (τετραπληγία) για μοριακό καρυότυπο ο οποίος αποκάλυψε δύο διαφορετικά ευρήματα, ένα διπλασιασμό στο χρωμόσωμα 3p14.1 μεγέθους 1.1 μεγαβάσης και ένα διπλασιασμό στην περιοχή 22q13.1q13.2 μεγέθους 550 κιλοβάσεων. Το πρώτο εύρημα έχει κληρονομηθεί από τη μητέρα και περιλαμβάνει 3 γονίδια σημαντικότερο εκ των οποίων είναι το MAGI1. Το MAGI1(Membrane associated granulate kinase 1 ανήκει στην οικογένεια των μεμβρανικών πρωτεϊνών με ιδιότητα κινάσης που φωσφορυλιώνει το GMP, οι οποίες σχηματίζουν πολυμοριακά σύμπλοκα στο εσωτερικό της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων με πολικότητα και των νευρώνων (Laura et al., 2002).

Ενώ το δεύτερο εύρημα έχει κληρονομηθεί από τον πατέρα και περιλαμβάνει 19 γονίδια, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι το DNAL4, το KCLNJ4, το NPTXR, το PICK1, το PLA2G6, το SOX10 και τέλος το SUN2.

Στην διπλασιασμένη περιοχή του 22 περιλαμβάνονται τα γονίδια PLA2G6, KCNJ4 και PICK1 που έχουν συνδεθεί με νευρολογικές βλάβες ή έχουν γνωστό νευρολογικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα PLA2G6 εμπλέκεται στην βρεφική νευροαξονική δυστροφία με συσσώρευση σιδήρου στον εγκέφαλο ή στα βασικά γάγγλια, η οποία είναι μια υπολειπόμενη νευρολογική βλάβη. Ένα άλλο υποψήφιο γονίδιο εντός της διαγραμμένης περιοχής είναι το KCNJ4, το οποίο κωδικοποιεί διάυλο ιόντων καλίου που επιτρέπει μεγαλύτερη εισροή K⁺ προς τα μέσα και βρίσκεται στην καρδιά και τον εγκέφαλο. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αυτοί οι διάυλοι είναι παρόντες σε νευρωνικά και

μη-νευρωνικά κύτταρα και συμμετέχουν στη διαδικασία ηλεκτρικής σηματοδότησης και επεξεργασίας πληροφοριών (F. Perier et al. 1994). Η ομάδα του Bufard ανέφερε ότι ο βασικός ρόλος των διύλων στη νευρωνική λειτουργία θεωρείται ότι εμπλέκεται στις νευρολογικές ασθένειες (Budarf et al., 1995). Το PICK1, είναι ένα άλλο γονίδιο που έχει ενεργά μελετηθεί αναφορικά με τη λειτουργία του στην συναπτική πλαστικότητα και τη νευρωνική διεγερσιμότητα (Xu et al., 2011 και Makuch et al., 2011). Παρ'όλα αυτά, οι μεταλλάξεις σχετιζόμενες με τη νόσο του PICK1 και KCNJ4 δεν έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους.

Μετάλλαξη στο γονίδιο DNAL4 (τμήμα του συγκροτήματος της δυνεΐνης) υποστηρίχθηκε ότι ευθύνεται για ανώμαλη ανάπτυξη των νευρώνων (Ahmed et al. 2014)

Όσον αφορά το γονίδιο NPTXR (NEURONAL PENTRAXIN RECEPTOR) πειράματα με Northern blot και In situ hybridization έδειξαν υψηλή έκφραση του γονιδίου, στον εγκέφαλο, στον υπόκαμπο και στην παργκεφαλίδα (Dodds et al., 1997).

Παρόλο που στην διπλασιασμένη περιοχή περιλαμβάνεται και το γονίδιο SOX10, πληροφορίες για το γονίδιο θα παρατεθούν στην επόμενη παράγραφο, ο ασθενής δεν έπασχε από Σύνδρομο Waardenburg.

Έλλειμμα 725 μεγαβάσεων που επικαλύπτει την ίδια περιοχή με τον τέταρτο ασθενή στο χρωμόσωμα 22q13.1, βρέθηκε και στον 11^ο ασθενή και περιλαμβάνει 14 κοινά γονίδια με πιο σημαντικά το NPTXR, το PICK1, το PLA2G6 και το SOX10. Ο ασθενής ηλικίας 13 ετών διαγνώστηκε με το σύνδρομο Waardenburg-Shah και εμφάνισε νοητική μειονεξία, υποτονία, κώφωση, σοβαρή ψυχοκινητική καθυστέρηση, αμφοτερόπλευρη κρυσορχία, δυσκολία στην κατάποση, εξαδακτυλία και χρωστικές διαταραχές του δέρματος.

Τα πρώτα 3 κοινά γονίδια αναλύθηκαν λεπτομερώς στον τέταρτο ασθενή.

Το γονίδιο SOX10 (SRY-BOX 10) το οποίο συνδέεται με το Σύνδρομο Waardenburg (χρωστικές διαταραχές του δέρματος και Νευροαισθητήρια βαρηκοΐα), μελέτες έδειξαν ότι έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νευρικής ακρολοφίας (Southard-Smith et al., 1999).

Ο 5^{ος} ασθενής ηλικίας 6 ετών ήρθε στη μονάδα λόγω βαριάς νοητικής μειονεξίας και παραπέμφθηκε για μοριακό καρυότυπο ο οποίος έδειξε έλλειμμα στο χρωμόσωμα 6 στην περιοχή p21.2 πατρικής προελεύσεως και περιλαμβάνει 1 γονίδιο το BTBD9. Ανισορροπία των συγκεντρώσεων του σιδήρου στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων της συσσώρευσης και της

έλλειψης συνδέονται με νευρολογικές διαταραχές και δυσλειτουργίες. Το γονίδιο BTBD9 συσχετίζεται με τις συγκεντρώσεις σιδήρου στο κοιλιακό μεσεγκέφαλο σύμφωνα με τους (Jellen et al. 2009).

Η 6η ασθενής ηλικίας 10 ετών, κορίτσι, διαγνώστηκε με πολλαπλές συγγενείς διαμαρτίες, μικροκεφαλία, νεφρική δυσπλασία, υδρονέφρωση, δισχιδής ράχη, αναπτυξιακή διαταραχή, νοητική μειονεξία, παρουσίασε έλλειμα ~7Mb της περιοχής 7q36.1q36.3 στην οποία περιλαμβάνονται γονίδια που παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και στην φυσιολογική ανάπτυξη των νευρικών συνάψεων. Τέτοια γονίδια είναι το DPP6, EN2, SHH καθώς επίσης και το γονίδιο MNX1. Υπολειπургικά αλληλόμορφα του DPP6 σχετίζονται με αυτοσωμική επικρατή μικροκεφαλία και διανοητική καθυστέρηση. Πιο συγκεκριμένα σίγηση του μεταγράφου 1 του DPP6 σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικρότερων εγκεφάλων σε σχέση με φυσιολογικά ποντίκια (Liao et al. 2013). Ο ρόλος του γονιδίου αυτού δεν είναι ξεκάθαρος, όμως η ομάδα του Nadal απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη DPP6 είναι μέρος των καναλιών κατιόντων καλίου στους νευρώνες (Nadal et al. 2003). Αυτά τα κανάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην διεγερσιμότητα και την πλαστικότητα των νευρώνων (Hoffman et al. 1997, Spruston et al. 2008). Το γονίδιο EN2 φαίνεται ότι επίσης ενέχεται στον αυτισμό. Εμπλέκεται στην ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Ποντίκια με γονότυπο EN2^{-/-} έχουν ίδιες συμπεριφορές με αυτιστικά άτομα, και ο εγκέφαλος αυτών των ποντικών έχουν ίδια νευροχημικά με αυτούς των αυτιστικών ατόμων (Cheh et al. 2006). Το τρίτο κατά σειρά γονίδιο, το SHH, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ελαττώματα στην πρωτεΐνη ή στο μοριακό μονοπάτι που ελέγχεται από την πρωτεΐνη έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ολοπροσεγκεφαλίας (reviewed in Roessel and Muenke).

Τέλος το γονίδιο MNX1(MOTOR NEURON AND PANCREAS HOMEODOMAIN 1) το οποίο περιλαμβάνεται στη διαγραμμένη περιοχή εμπλέκεται στην εκδήλωση του Συνδρόμου Currarino (αποτελείται από μια τριάδα χαρακτηριστικών, μερική αγενεσία του ιερού οστού, ορθοπρωκτική δυσπλασία).

Ο 7^{ος} ασθενής, ηλικίας 3, οποίος παραπέμφθηκε λόγω διαταραχής επικοινωνίας και λόγου και έπειτα από ανάλυση με μοριακό καρυότυπο βρέθηκαν 2 ανακατατάξεις σε διαφορετικές περιοχές του ιδίου χρωμοσώματος, ένα διπλασιασμό στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 10 και

συγκεκριμένα στην περιοχή p11.21 και ένα έλλειμμα στο μεγάλο βραχίονα στην περιοχή q11.22. Το πρώτο εύρημα είναι μεγέθους 164 κιλοβάσεων και περιλαμβάνει μόνο το γονίδιο PARD3, ενώ το δεύτερο εύρημα είναι μεγέθους 137 κιλοβάσεων και περιλαμβάνει το γονίδιο PPYR1. Παρόλο που τα συγκεκριμένα ευρήματα συναντώνται και σε υγιή άτομα για το ρόλο του γονιδίου PARD3 phosphatidylinositol 3-kinase) οι Shi et al. (2003) ανέφεραν ότι η επιλογή του μελοντικού άξονα ανάμεσα σε νευρίτες ιππόκαμπου αρουραίου, χρειάζεται το γονίδιο PARD3 (Shi et al., 2003). Έτσι κατέληξαν ότι η πόλωση των νευρώνων είναι πιθανό να ελέγχεται από σύμπλεγμα PAR3/PAR6/aPKC. Επίσης οι Zhang and Macara (2006) απέδειξαν ότι το γονίδιο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των δενδριτών (Zhang and Macara 2006). Όσον αφορά το δεύτερο γονίδιο, PPYR1, οι Sainsbury et al. (2002) ανέπτυξαν ποντίκια -/- Y4 εκ των οποίων οι άρρενες παρουσίασαν επιθετική συμπεριφορά (Sainsbury et al., 2002).

Ο 8^{ος} και 9^{ος} ασθενής, δύο αδέρφια, το πρώτο αγόρι 5,5 με βαριά νοητική μειονεξία, κινητική καθυστέρηση, διαταρακτική συμπεριφορά και το δεύτερο 4,5 ετών με ήπια νοητική υστέρηση, έπειτα από έλεγχο με μοριακό καρύτυπο βρέθηκε να έχουν το ίδιο έλλειμμα στο χρωμόσωμα 15 στην περιοχή που εμπλέκεται στα σύνδρομα Prader-Willi και Angelman, την p11.2. Σε αυτή την περιοχή περιλαμβάνονται γονίδια όπως τα IPW, PWAR1, SNORD115-1 και τμήμα του γονιδίου UBE3A. Κυρίως, το γονίδιο UBE3A εμπλέκεται στην εμφάνιση του συνδρόμου Angelman που σχετίζεται με τη γενετική αποτύπωση της κρίσιμης περιοχής q11-13 του χρωμοσώματος 15, κατά προτίμηση μητρικής έκφρασης στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στους νευρώνες (Dindot et al., 2008). Ο βιοχημικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA. Σε ένα φυσιολογικό άτομο, το μητρικό αλληλόμορφο του γονιδίου UBE3A, ή αλλιώς E6AP ubiquitin-protein ligase (E6AP) μέρος του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, εκφράζεται και το πατρικό αλληλόμορφο έχει ειδικά σιγήσει στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Στον ιππόκαμπο και παρεγκεφαλίδα, το μητρικό αλληλόμορφο είναι σχεδόν αποκλειστικά η ενεργό. Αν το μητρικό αλληλόμορφο χαθεί ή μεταλλαχθεί, το αποτέλεσμα είναι το Angelman σύνδρομο.

Ο 10^{ος} ασθενής, αγόρι 6 ετών με νοητική μειονεξία, βρέθηκε να έχει διπλασιασμό μεγέθους 800 κιλοβάσεων στο χρωμόσωμα 17(q25.3), η οποία περιλαμβάνει 11 γονίδια εκ των οποίων μέχρι στιγμής κανένα δεν έχει αποδειχθεί να εμπλέκεται στο φαινότυπο, ενώ έχει καταγραφεί 1 περιστατικό στη βάση δεδομένων του Decipher με διπλασιασμό στην ίδια περιοχή.

Στη 12η ασθενή, ένα κορίτσι 9 ετών, βρέθηκε διπλασιασμός στο φυλετικό χρωμόσωμα X, μεγέθους 388 κιλοβάσεων, στο μικρό βραχίονα στην περιοχή p22.32. Η ασθενής παρουσίαζε βαριά νοητική μειονεξία, ιδιότυπα χαρακτηριστικά, διάσπαση προσοχής και υπερκινητικότητα. Το εύρημα έχει κληρονομηθεί από τον πατέρα και δεν περιλαμβάνει κάποιο γονίδιο, ενώ έχουν καταγραφεί 6 περιστατικά στη βάση δεδομένων του Decipher και ISCA, διαγνωσμένα με ΔΑΦ, με επικάλυψη.

Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις όπου δεν βρέθηκε κάποιο γονίδιο το οποίο να ενέχεται στο φαινότυπο του ασθενή, υπάρχει πιθανότητα το εύρημα να είναι είτε τυχαίο, είτε να εμπλέκονται άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι δεν είναι γνωστοί μέχρι την παρούσα μελέτη δίνοντας το έδαφος για περαιτέρω έρευνα.

Στις περιπτώσεις που το εύρημα έχει κληρονομηθεί από υγιή γονέα υπάρχει η πιθανότητα ατελούς διεισδυτικότητας κατά την οποία το παθολογικό αλληλόμορφο μπορεί να μην εκφράζεται στον υγιή γονέα αλλά να κληρονομηθεί και να εκφραστεί στους απογόνους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Με την παρούσα μελέτη βασισμένη στην ανάλυση με τη μέθοδο του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού με μικροσυστοιχίες (array Comparative Genome Hybridization-cgh) έγινε μια προσπάθεια συσχέτισης φαινοτύπου-γονοτύπου, παρόλο τον περιορισμένο αριθμό ασθενών.

Η ανάπτυξη νέων και με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα μεθόδων, όπως το Next Generation Sequencing, δηλαδή η αλληλούχιση νέας γενιάς, θα μπορούν να οδηγήσουν στην εντόπιση νέων γενετικών τόπων ακόμα και σημειακών μεταλλάξεων, ώστε να διαλευκάνουν τα αίτια της ‘Διαταραχής του Φάσματος του Αυτισμού’.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmed, I., Mittal, K., Sheikh, T. I., Vasli, N., Rafiq, M. A., Mikhailov, A., Ohadi, M., Mahmood, H., Rouleau, G. A., Bhatti, A., Ayub, M., Srour, M., John, P., Vincent, J. B. Identification of a homozygous splice site mutation in the dynein axonemal light chain 4 gene on 22q13.1 in a large consanguineous family from Pakistan with congenital mirror movement disorder. *Hum. Genet.* 133: 1419-1429, 2014.

Awadalla, P., Gauthier, J., Myers, R. A., Casals, F., Hamdan, F. F., Griffing, A. R., Cote, M., Henrion, E., Spiegelman, D., Tarabeux, J., Piton, A., Yang, Y., and 22 others. Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am. J. Hum. Genet.* 87: 316-324, 2010.

Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., Rutter, M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.* 25: 63-77, 1995.

Banerjee S, Riordan M, Bhat MA. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:58.

Barbosa, I., Haque, N., Fiorini, F., Barrandon, C., Tomasetto, C., Blanchette, M., Le Hir, H. Human CWC22 escorts the helicase eIF4AIII to spliceosomes and promotes exon junction complex assembly. *Nature Struct. Biol.* 19: 983-990, 2012.

Bassem A. Bejjani et al. "Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics" *J Mol Diagn.* 2006 Nov; 8(5): 528–53

Bolton, P., Macdonald, H., Pickles, A., Rios, P., Goode, S., Crowson, M., Bailey, A., Rutter, M. A case-control family history study of autism. *J. Child Psychol. Psychiat.* 35: 877-900, 1994.

Budarf M. L., F. Perier, B.L. Barnoski, C.J. Bell, C.A. Vandenberg, Assignment of the human hippocampal inward rectifier potassium channel (HIR) gene to 22q13.1, *Genomics* 26 (1995) 625-629.

Burd L, Kerbeshian J, Fisher W. Inquiry into the incidence of hyperlexia in a statewide population of children with pervasive developmental disorder. *Psychol Rep.* 1985 Aug;57(1):236-8.

Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S, Wagner GC. En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res.* 2006 Oct 20;1116(1):166-76.

Cottrell CE, Bir N, Varga E, Alvarez CE, Bouyain S, Zernzach R, Thrush DL, Evans J, Trimarchi M, Butter EM, Cunningham D, Gastier-Foster JM, McBride KL, Herman GE. Contactin 4 as an autism susceptibility locus. *Autism Res.* 2011 Jun;4(3):189-99. doi: 10.1002/aur.184.

Courchesne EI, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, Barnes CC, Pierce K., Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011 Nov 9;306(18):2001-10. doi: 10.1001/jama.2011.1638.

Dindot, S. V., Antalffy, B. A., Bhattacharjee, M. B., Beaudet, A. L. The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum. Molec. Genet.* 17: 111-118, 2008.

Dodds, D. C., Omeis, I. A., Cushman, S. J., Helms, J. A., Perin, M. S. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J. Biol. Chem.* 272: 21488-21494, 1997.

Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 1977;18:297-321.

Fukuda, T., Sugita, S., Inatome, R., Yanagi, S. CAMDI, a novel disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)-binding protein, is required for radial migration. *J. Biol. Chem.* 285: 40554-40561, 2010.

Hoffman D.A., J.C. Magee, C.M. Colbert, D. Johnston, K_v channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons, *Nature* 387 (1997) 869e875.

Hallmayer, J., Glasson, E. J., Bower, C., Petterson, B., Croen, L., Grether, J., Risch, N. On the twin risk in autism. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 941-946, 2002.

Jellen LC1, Beard JL, Jones BC. Systems genetics analysis of iron regulation in the brain. *Biochimie.* 2009 Oct;91(10):1255-9. doi: 10.1016/j.biochi.2009.04.009. Epub 2009 Apr 22.

Jiao Y, Chen R, Ke X, Cheng L, Chu K, Lu Z, Herskovits EH. Single nucleotide polymorphisms predict symptom severity of autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2012;42(6):971-983.

Jorde, L. B., Mason-Brothers, A., Waldmann, R., Ritvo, E. R., Freeman, B. J., Pingree, C., McMahon, W. M., Petersen, B., Jenson, W. R., Mo, A. The UCLA--University of Utah epidemiologic survey of autism: genealogical analysis of familial aggregation. *Am. J. Med. Genet.* 36: 85-88, 1990.

Καραβιτάκης Ε. Επιγενετικοί μηχανισμοί και η σημασία τους στην παιδιατρική Ε. Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση 2010:177-184.

Kelleher RJ 3rd, Bear MF. The autistic neuron: troubled translation? *Cell* 2008;135:401-406.

Kelly, M. P., Logue, S. F., Brennan, J., Day, J. P., Lakkaraju, S., Jiang, L., Zhong, X., Tam, M., Sukoff Rizzo, S. J., Platt, B. J., Dwyer, J. M., Neal, S., and 9 others. Phosphodiesterase 11A in brain is enriched in ventral hippocampus and deletion causes psychiatric disease-related phenotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107: 8457-8462, 2010.

Kolevzon, A., Smith, C. J., Schmeidler, J., Buxbaum, J. D., Silverman, J. M. Familial symptom domains in monozygotic siblings with autism. *Am. J. Med. Genet.* 129B: 76-81, 2004.

Kolle, G., Georgas, K., Holmes, G. P., Little, M. H., Yamada, T. CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis. *Mech. Dev.* 90: 181-193, 2000.

Lainhart JE1, Ozonoff S, Coon H, Krasny L, Dinh E, Nice J, McMahon W., Autism, regression, and the broader autism phenotype., *Am J Med Genet.* 2002 Dec 1;113(3):231-7.

Laura, R. P., Ross, S., Koeppen, H., Lasky, L. A. MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein. *Exp. Cell Res.* 275: 155-170, 2002.

Liao C, Fu F, Li R, Yang WQ, Liao HY, Yan JR, Li J, Li SY, Yang X, Li DZ. Loss-of-function variation in the DPP6 gene is associated with autosomal dominant microcephaly and mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2013 Sep;56(9):484-9.

Makuch, L. Volk, V. Anggono et al., Regulation of AMPA Receptor Function by the Human Memory-Associated Gene KIBRA, *Neuron* 71 (2011) 1022-9.

Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, Rapti SM, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L. (2010). The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay. *Mol Cytogenet.* 2010 Nov 9;3:22

Monfort, S., Rosello, M., Orellana, C., Oltra, S., Blesa, D., Kok, K., Ferrer, I., Cigudosa, J. C., Martinez, F. Detection of known and novel genomic rearrangements by array based comparative genomic hybridisation: deletion of ZNF533 and duplication of CHARGE syndrome genes. *J. Med. Genet.* 45: 432-437, 2008.

Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron.* 2003 Feb 6;37(3):449-61.

Nagase, T., Kikuno, R., Nakayama, M., Hirosawa, M., Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 7: 273-281, 2000.

Perier F., C.M. Radeke, C.A. Vandenberg, Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91 (1994) 6240-6244.

Ritvo ER, Freeman BJ, Mason-Brothers A, Mo A, Ritvo AM. Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. *Am J Psychiatry* 1985;142:74-77.

Roessler E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010 Feb 15;154C(1):52-61.

Ronald A, Hoekstra RA. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011;156B:255-274.

Roohi, J., Montagna, C., Tegay, D. H., Palmer, L. E., DeVincent, C., Pomeroy, J. C., Christian, S. L., Nowak, N., Hatchwell, E. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J. Med. Genet.* 46: 176-182, 2009.

Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009;163:907-914.

Sainsbury, A., Schwarzer, C., Couzens, M., Jenkins, A., Oakes, S. R., Ormandy, C. J., Herzog, H. Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice. *Genes Dev.* 16: 1077-1088, 2002.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., Reichenberg, A. The familial risk of autism. *JAMA* 311: 1770-1777, 2014.

Silverman, J. M., Smith, C. J., Schmeidler, J., Hollander, E., Lawlor, B. A., Fitzgerald, M., Buxbaum, J. D., Delaney, K., Galvin, P., Autism Genetic Research Exchange Consortium. Symptom domains in autism and related conditions: evidence for familiarity. *Am. J. Med. Genet.* 114B: 64-73, 2002.

Shi, S.-H., Jan, L. Y., Jan, Y.-N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112: 63-75, 2003

Smalley SL., Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet.* 1997 Jun;60(6):1276-82.

Spreyer, P., Kuhn, G., Hanemann, C. O., Gillen, C., Schaal, H., Kuhn, R., Lemke, G., Muller, H. W. Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J.* 10: 3661-3668, 1991

Spruston N., Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration, *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 206e221.

Tamada, H., Sakashita, E., Shimazaki, K., Ueno, E., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Endo, H. cDNA cloning and characterization of Drb1, a new member of RRM-type neural RNA-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 96-104, 2002.

Taniai H, Nishiyama T, Miyachi T, Imaeda M, Sumi S. Genetic influences on the broad spectrum of autism: Study of proband ascertained twins. *Am J Med Genet Part B* 2008;147B:844-849.

Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, Xaidara A, Kanavakis E. (2012). The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. *Expert Rev Mol Diagn* 12:449-457

Williams CA¹, Dagi A, Battaglia A., Genetic disorders associated with macrocephaly. *Am J Med Genet A*. 2008 Aug 1;146A(15):2023-37. doi: 10.1002/ajmg.a.32434.

Wing L, Gould J., Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification., *J Autism Dev Disord*. 1979 Mar;9(1):11-29.

Χίτογλου Γ. - Χατζή Αυτισμός – Ελπίδα, 2η έκδ. - Θεσσαλονίκη : University Studio Press, 2000

Xu N.J., S. Sun, J.R. Gibson, M. Henkemeyer, A dual shaping mechanism for postsynaptic ephrin-B3 as a receptor that sculpts dendrites and synapses, *Nat. Neurosci*. 14 (2011) 1421-9.

Yu S, Bittel DC, Kibiryeveva N, Zwick DL, Cooley LD. Validation of the Agilent 244K oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization platform for clinical cytogenetic diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2009 Sep;132(3):349-60. doi: 10.1309/AJCP1BOUTWF6ERY5.

Zafeiriou DI, Ververi A, Dafoulis V, Kalyva E, Vargiami E. Autism spectrum disorders: the quest for genetic syndromes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013;162B:327-366.

Zhang, H., Macara, I. G. The polarity protein PAR-3 and TIAM1 cooperate in dendritic spine morphogenesis. *Nature Cell Biol*. 8: 227-237, 2006.