



ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

Τίτλος:

«Διαταραχές McCune-Albright-Mazabraud και γενετική ανάλυση του γονιδίου *GNAS*»

Title:

‘McCune Albright-Mazabraud disorders and genetic analysis of *GNAS* gene’

Εκπόνηση: Φραντζελά Ελευθερία του Μάριου

A.M. : 01955

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέποντας: Σπελέτας Ματθαίος

Συνεπιβλέπουσα: Παπουτσοπούλου Σταματία

Τρίτο μέλος: Καλαλά Φωτεινή

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εν λόγω πτυχιακή διεξήχθη στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας στο τμήμα Ιατρικής στο εργαστήριο της Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας και ένα μέρος των πειραμάτων έλαβαν χώρα σε συνεργασία με την εταιρεία Cemia (Μακρυγιάννη 31, Λάρισα). Στο σημείο αυτό, θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, Κύριο Σπελέτα Ματθαίο, για την αμέριστη υποστήριξή του, την πολύτιμη βοήθειά του, τις συμβουλές του, την ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα διεξαγωγής της εν λόγω πτυχιακής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία, καθηγήτρια Ανοσολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και την κυρία Καλαλά Φωτεινή, καθηγήτρια Ανοσολογίας στο τμήμα της Ιατρικής, που αφιέρωσαν χρόνο για την διόρθωση της πτυχιακής και την εξέτασή μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω επίσης την σημαντική βοήθεια όλης της ομάδας του εργαστηρίου και συγκεκριμένα στον υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γαλανόπουλο. Τέλος για όλη αυτή την προσπάθεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κοντινούς μου ανθρώπους για την στήριξή τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
<u>I.</u> Μεταλλάξεις σωματικής και βλαστικής προέλευσης.....	6
Iα. Εισαγωγή στις μεταλλάξεις.....	6
Iβ. Προέλευση μεταλλάξεων	6
Iγ. Προέλευση μεταλλάξεων από βλαστική σειρά.....	7
Iδ. Προέλευση μεταλλάξεων από σωματικά κύτταρα.....	7
<u>II.</u> Υποδοχέας GPCR και γονίδιο <i>GNAS</i>.....	8
IIα. Δομή και έκφραση γονιδίου <i>GNAS</i>	8
IIβ. Δομή και φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων.....	9
IIγ. Λειτουργία της υπομονάδας Gas	10
<u>III.</u> Διαταραχές McCune Albright- Mazabraud.....	11
IIIα. Γενικά για τη νόσο.....	11
IIIβ. Επίδραση μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>GNAS</i>	13
2. Αντικείμενο μελέτης.....	14
3. Υλικά και μέθοδοι	15
I.Ομάδα μελέτης.....	15
II.Μοριακές τεχνικές.....	15
III.Βιοπληροφορικά εργαλεία.....	20
4. Αποτελέσματα.....	21
5. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	27
6. Βιβλιογραφία.....	29

Περίληψη

Οι νόσοι McCune Albright-Mazabraud είναι σπάνιες διαταραχές συνοδευόμενες από δυσπλασίες και ενδομυϊκά μυξώματα με κύριους προσβεβλημένους ιστούς τους μύες, τα οστά, το δέρμα και με υπερλειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Οι νόσοι πιθανότατα συνδέονται με γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο *GNAS*, κάτι το οποίο επιφέρει διαταραχές στο σηματοδοτικό μονοπάτι της Gas υπομόναδας των υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (G protein-coupled receptors, GPCRs) οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης της αδενυλικής κυκλάσης (adenylyl cyclase, AC) στους προσβεβλημένους ιστούς. Πεδίο διερεύνησης αποτελεί το αν οι διαταραχές αυτές σχετίζονται με μεταλλάξεις σε βλαστικά κύτταρα ή μεταλλάξεις της σωματικής σειράς. Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η αναζήτηση γενετικών παραλλαγών στο γονίδιο *GNAS* και η διερεύνησή τους σε σχέση με τις διαταραχές McCune Albright-Mazabraud. Χρησιμοποιήθηκε τόσο δείγμα βιοψίας ιστού παραφίνης από ασθενή διαγνωσμένη με τις εν λόγω διαταραχές όσο και δείγμα αίματος με σκοπό την γενετική ανάλυση του γονιδίου *GNAS* και την αναζήτηση πιθανών μεταλλάξεων. Μέσω μεθοδολογίας PCR-Αλληλούχισης κατά Sanger πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εξονίων του γονιδίου *GNAS* και ανιχνεύθηκε η γενετική παραλλαγή *GNAS:c.602G>A| p.Arg201His* τόσο στον παθολογικό ιστό όσο και στο περιφερικό αίμα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση σύμφωνα με τα ACMG κριτήρια. Πρόκειται για παθογόνο μετάλλαξη που στη βιβλιογραφία συσχετίζεται άμεσα με τις διαταραχές McCune Albright-Mazabraud. Μέσω της συγκεκριμένης εργασίας αναδεικνύεται ο ρόλος της γενετικής ανάλυσης στην διάγνωση σπάνιων γενετικών νοσημάτων. Τέλος, υπογραμμίζεται η σπουδαιότητα των βιοπληροφορικών εργαλείων και της αλληλούχισης στην γενετική ανάλυση γονιδίων και κατ' επέκταση στην έρευνα του γενετικού υποβάθρου μιας νόσου.

Abstract

McCune Albright-Mazabraud diseases are rare disorders characterized by dysplasia and intramuscular myxomas, primarily affecting muscles, bones, and skin and the hyper-functioning of the endocrinal system. These diseases are likely linked to genetic variations in the GNAS gene, which cause disruptions in the signaling pathway of the Gas subunit of G protein-coupled receptors (GPCRs), leading to elevated levels of adenylate cyclase (AC) in the affected tissues. A subject of investigation is whether these disorders are related to mutations in stem cells or somatic cell line mutations. The aim of this study is to identify genetic variations in the GNAS gene and investigate their connection to McCune Albright-Mazabraud disorders. Both a paraffin tissue biopsy sample from a patient diagnosed with these disorders and a blood sample were used for the genetic analysis of the GNAS gene to search for potential mutations. Using the PCR-Sanger Sequencing methodology, analysis of the GNAS gene exons was performed, and the genetic variation GNAS:c.602G>A | p.Arg201His was detected in both the pathological tissue and peripheral blood. Subsequently, genetic analysis was carried out according to ACMG criteria. This is a pathogenic mutation that, according to the literature, is directly associated with McCune Albright-Mazabraud disorders. This study highlights the role of genetic analysis in the diagnosis of rare genetic diseases. Finally, it emphasizes the importance of bioinformatics tools and sequencing in genetic gene analysis and, by extension, in researching the genetic background of a disease.

1. Εισαγωγή

I. Μεταλλάξεις Βλαστικής και Σωματικής προέλευσης

Iα. Εισαγωγή στις μεταλλάξεις

Με τον όρο μεταλλάξεις εννοούμε οποιαδήποτε παραλλαγή στο DNA (απαλοιφές, αντικαταστάσεις, προσθήκη βάσεων, αναστροφή τμημάτων του DNA) η οποία οφείλεται σε ανεπαρκή επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Γενετικές παραλλαγές στο DNA προκύπτουν είτε από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA είτε από την επίδραση μεταλλαξιγόνων παραγόντων (ref.1).

Οι εν λόγω μεταλλάξεις επιφέρουν διάφορες επιπτώσεις στο γονιδίωμα οδηγώντας σε (ref.2) :

- σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations) όπου αφορούν το 90% των μεταλλάξεων και δεν επηρεάζουν την έκφραση του γονιδιακού προϊόντος,
- συνώνυμες μεταλλάξεις (synonymous mutations) δηλαδή παραγωγή του ίδιου γονιδιακού προϊόντος,
- μη συνώνυμες μεταλλάξεις (non-synonymous or missense) όπου έχουμε διαφορετικό γονιδιακό προϊόν από το φυσιολογικό,
- τερματικές μεταλλάξεις (non sense mutations) που επιφέρουν πρόωρη λήξη της μεταγραφής και συνεπώς μικρότερο προϊόν,
- μεταλλάξεις αναγνωστικής διέλευσης (readthrough mutations) κατά τις οποίες ένα κωδικόνιο λήξης μετατρέπεται σε κωδικόνιο αμινοξέος επεκτείνοντας το γονιδιακό προϊόν,

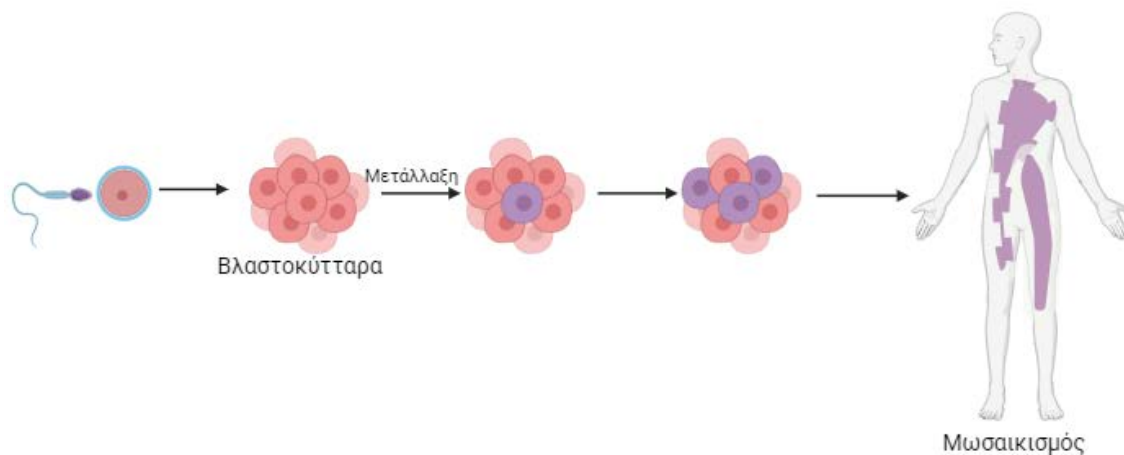
Στους πολυκύτταρους οργανισμούς οι μεταλλάξεις επιφέρουν είτε απώλεια λειτουργίας όπου στους διπλοειδείς οργανισμούς είναι υπολειπόμενες λόγω της ύπαρξης διπλού αντιγράφου είτε κέρδος λειτουργίας, που είναι πιο σπάνιες και αφορούν κυρίως ρυθμιστικές περιοχές (ref.3).

Iβ. Προέλευση μεταλλάξεων

Οι μεταλλάξεις ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης στο οποίο συμβαίνουν κατηγοριοποιούνται ως εξής: μεταλλάξεις βλαστικής σειράς και σωματικές μεταλλάξεις (ref.4) .

Ιγ. Μεταλλάξεις Βλαστικής σειράς

Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στη βλαστική σειρά του εμβρύου ονομάζονται μεταλλάξεις βλαστικής προέλευσης (germline mutations) και οδηγούν σε ένα μωσαϊκό μοτίβο κατανομής των δύο γονοτύπων, του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις είτε κληρονομούνται από τους γονείς κατά τη σύλληψη, είτε δημιουργούνται μετά τη σύλληψη από λάθη στην διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ως εκ τούτου, οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται σε όλα τα μέρη του σώματος και κατ' επέκταση δύναται να ανιχνευθούν και στο περιφερικό αίμα (ref.4) δημιουργώντας το φαινόμενο του μωσαικισμού (Εικόνα 1). Επιπρόσθετα, όσο πιο πρώιμο το αναπτυξιακό στάδιο των βλαστοκυττάρων στο οποίο συμβαίνει η μετάλλαξη, τόσο μεγαλύτερη κατανομή έχει ο φαινότυπος καθώς τα κύτταρα που προέρχονται από ένα ιδρυτικό κύτταρο φέρουν όλα τη μετάλλαξή του. Συνήθως οι μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς είναι κληρονομήσιμες στις επόμενες γενιές (ref.4).



Εικόνα 1: Μεταλλαξιγένεση στα Βλαστοκύτταρα και δημιουργία μωσαικισμού

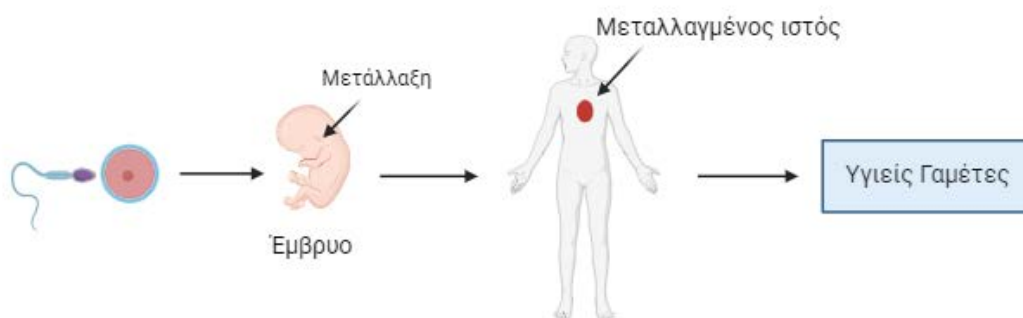
Ιδ. Μεταλλάξεις Σωματικής Προέλευσης

Οι μεταλλάξεις σωματικής προέλευσης (somatic mutations) συμβαίνουν μετέπειτα στην ανάπτυξη του εμβρύου και αφορούν έναν συγκεκριμένο ιστό χωρίς να επηρεάζουν τα υπόλοιπα μέρη του σώματος (εικόνα 2). Μπορούν να συμβούν σε οποιοδήποτε από τα κύτταρα του σώματος εκτός από τα γαμετικά, καθιστώντας αδύνατη την κληρονόμησή τους σε επόμενες γενιές. (ref.5).

Εδώ κύριοι παράγοντες αποτελούν ενδογενείς παράγοντες όπως σφάλματα κατά την κυτταρική αντιγραφή, ανεπάρκεια στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA και η έκθεση σε ROS (αντιδραστικά είδη οξυγόνου όπως η ρίζα υδροξυλίου, τα

υπεροξειδία) που σχηματίζονται κατά τις μεταβολικές διεργασίες. Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό σωματικών μεταλλάξεων διαδραματίζουν και χημικοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες που βλάπτουν ή αλλάζουν τη δομή του DNA. Έτσι, σχηματίζονται διμερή πυριμιδίνης ή αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία(ref.5).

Ακόμη, στις σωματικές μεταλλάξεις συμμετέχουν και φυσικά μεταλλαξιογόνα, δηλαδή ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας όπως ακτίνες Χ, ακτίνες UV σπάζοντας νουκλεοτιδικούς δεσμούς ή αλλάζοντας αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, ενώ οι κυτταρικοί στρεσογόνοι παράγοντες προκαλούν διακυμάνσεις στο κύτταρο ή εξωκυτταρικές μεταβολικές λειτουργίες που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες που είναι επιβλαβείς για το DNA (ref.5).



Εικόνα 2: Σωματική μετάλλαξη

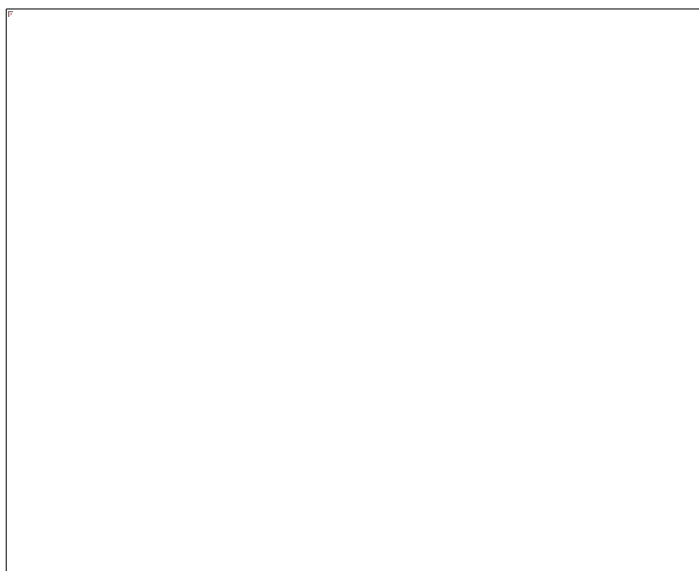
II. Υποδοχέας GPCR και γονίδιο GNAS

IIα. Δομή και έκφραση γονιδίου GNAS

Το γονίδιο *GNAS* αποτελείται από 13 εξώνια και χωροοθετείται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 20 (ref.6). Φυσιολογικά κωδικοποιεί την διεγερτική υπομονάδα G_α του υποδοχέα GPCR ($G_{\alpha s}$) και κατ'επέκταση συμβάλει στην ρύθμιση της έκφρασης της αδενυλικής κυκλάσης σε διάφορους ιστούς και στην παραγωγή cAMP (Cyclic adenosine monophosphate). Κατ'επέκταση, μεταλλάξεις στο γονίδιο δημιουργούν συστατική ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και σε αυξημένα επίπεδα cAMP οδηγώντας σε δυσλειτουργία των προσβεβλημένων ιστών (ref.7).

IIβ. Δομή και λειτουργία των υποδοχέων GPCR

Οι GPCRs είναι υποδοχείς στους οποίους συνδέονται G πρωτεΐνες. Πρόκειται για μεμβρανικούς, κυρίως αισθητήριους, χημειουποδοχείς με σημαντικό ρόλο στην όραση, στην όσφρηση, στη συμπεριφορά, στη ρύθμιση του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος και του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής και στη ρύθμιση της ομοιόστασης. Όσον αφορά την δομή των υποδοχέων, αποτελούνται από γλυκοπρωτεΐνες που σχηματίζουν 7 α-έλικες και συνδέονται με ετεροτριμερείς πρωτεΐνες Gαβγ, συνδεδεμένες με GDP (ref.8). Διαβιβαστές προσδέτες (αγωνιστές) στον υποδοχέα αποτελούν αισθητήρια ερεθίσματα, ιόντα, νευροδιαβιβαστές, χημειοκίνες και ορμόνες. Με την πρόσδεση του προσδέτη, αλλάζει η διαμόρφωση του υποδοχέα, ωθώντας την Gα υπομονάδα να ανταλλάξει το GDP με GTP και να αποχωριστεί από τις υπομονάδες Gβγ (ref.8, Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Δομή και ενεργοποίηση του μεμβρανικού υποδοχέα GPCR

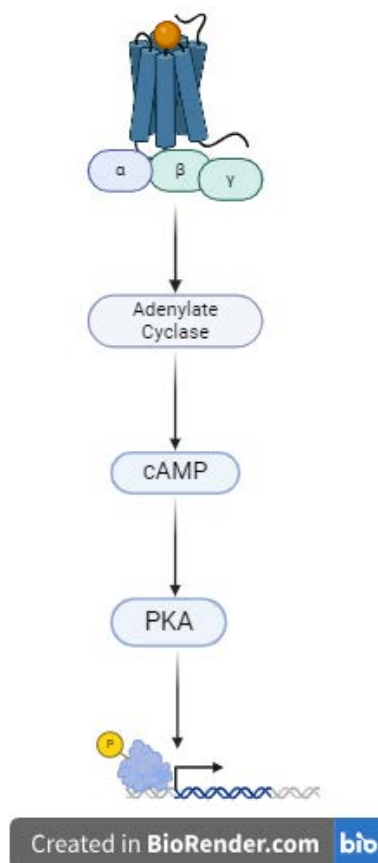
Έτσι, ενεργοποιείται ένα σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω της ενεργοποίησης ενός πλήθους τελεστών όπως αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση Cβ, κανάλια ιόντων και κινάσες (ref.10).

IIγ. Λειτουργία της υπομονάδας Gas

Οι υπομονάδες Ga χωρίζονται σε 4 υποοικογένειες Gas, Gai, Gaq/11, Ga12/13.

Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο που μας αφορά GNAS κωδικοποιεί την υπομονάδα Gas, η οποία είναι και η κύρια υπομονάδα ενδιαφέροντος (ref.11).

Η υπομονάδα Gas προκαλεί την αυξημένη ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC, ένζυμο που καταλύει το σχηματισμό του cAMP από ATP) η οποία με την σειρά της προκαλεί την υδρόλυση του ATP και την μετατροπή του σε cAMP. Το cAMP με τη σειρά του προκαλεί την ενεργοποίηση της Πρωτεϊνικής Κινάσας A (PKA), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί πλήθος πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι συμβάλλουν στην έκφραση πρωτεϊνών σχετιζόμενες με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την ρύθμιση της λειτουργίας και της έκκρισης στους ενδοκρινείς ιστούς, την καρδιακή συστολή, τη διαμορφωση και ρύθμιση λειτουργίας σκελετικού μυός (Εικόνα 4). Επίσης, το cAMP προκαλεί οξείες αλλαγές εντός των μυοϊνών κατά τη διάρκεια της άσκησης και συμβάλλει επίσης μακροπρόθεσμα στο μέγεθος των μυοϊνών (ref.11).



Εικόνα 4: Σηματοδοτικό μονοπάτι Gas υπομονάδας

III. Διαταραχές McCune Albright- Mazabraud

IIIa. Γενικά για τις νόσους

Όσον αφορά τις διαταραχές McCune Albright- Mazabraud, πρόκειται για δυο παρεμφερείς, σπάνιες διαταραχές, οι οποίες τις περισσότερες φορές εμφανίζονται παράλληλα σε έναν ασθενή. Παρακάτω αναλύονται η συμπτωματολογία και το γενετικό υπόβαθρο για τις δύο αυτές νόσους (ref12-13).

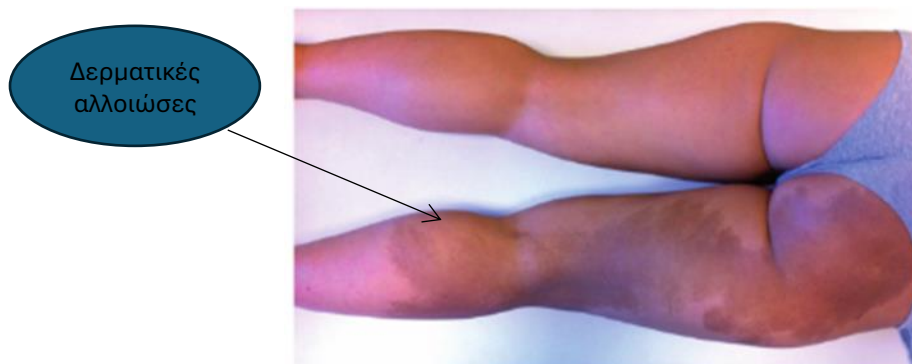
Mazabraud

Η διαταραχή Mazabraud, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινώδους δυσπλασίας με σχετιζόμενα ενδομυϊκά μυξώματα. Τα δεδομένα είναι λιγοστά σχετικά με τον

επιπολασμό. Συνήθως τα συμπτώματα εμφανίζονται από τη βρεφική ηλικία και συνοδεύονται από ενδοκρινικές δυσλειτουργίες και οστικές κακοήθειες (ref.12).

McCune-Albright

Συνεχίζοντας με την διαταραχή McCune-Albright, πρόκειται για μια σποραδική διαταραχή με συμπτώματα μία κλινική τριάδα αποτελούμενη από πολυοστικές ινώδεις δυσπλασίες, δερματικές αλλοιώσεις «café au lait» (εικόνα 5) και ενδοκρινική υπερλειτουργία λόγω αυτόνομης ορμονικής υπερπαραγωγής προκαλώντας πλήθος παθολογικών καταστάσεων όπως αδενώματα της υπόφυσης που εκκρίνουν αυξητική ορμόνη, υπερθυρεοειδείς βρογχοκήλες ή υπερπλασία των επινεφριδίων (ref13,24). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα είναι παρόντα στους προσβεβλημένους ενδοκρινικούς αδένες, το δέρμα και τα οστά των ασθενών. Άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά είναι η βραχυδακτυλία που συμβαίνουν με ή χωρίς ορμονική αντίσταση προς PTH ή άλλες ορμόνες όπως θυρεοειδικές ορμόνες ή γοναδοτροπίνες (ref.13).



Εικόνα 5: Ασθενής με δερματικές αλλοιώσεις café au lait. Πηγή (ref.12): Mazabraud syndrome associated with McCune-Albright syndrome Alessio Biazzo, Andrea Di Bernardo , Antonina Parafioriti, Norberto Confalonieri, Orthopaedic Department, Gaetano Pini-CTO, Milano; 2 Pathology Department, Gaetano Pini-CTO, Milano.

IIIβ. Επίδραση μεταλλάξεων στο γονίδιο *GNAS*

Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο *GNAS* κωδικοποιεί την Gas υπομονάδα των GPCR υποδοχέων, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και συνεπώς την παραγωγή cAMP. Με αυτό τον τρόπο ενεργοποιείται βιοχημικό μονοπάτι, το οποίο εμπλέκεται αφ' ενός σε μια σειρά από διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ρύθμιση της ενδοκρινικής και καρδιακής λειτουργίας, και αφ' εταίρου σε διεργασίες που εμπλέκονται με την μυϊκή δομή και λειτουργία αλλά και τον σχηματισμό των οστών (ref.11).

Έτσι, στις υπό διερεύνηση διαταραχές συχνά παρατηρείται συστατική ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *GNAS*. Ως εκ τούτου, προκαλείται αυξημένη παραγωγή cAMP και συνεπώς διαταραχή στο μονοπάτι που εμπλέκεται σε όλες τις προαναφερόμενες λειτουργίες (ref.12).

2. Σκοπός εργασίας

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η γενετική ανάλυση του γονιδίου *GNAS*, με σκοπό την εύρεση τυχόν γενετικών βλαβών που θα μπορούσαν πλαισιώσουν διαγνωστικά την κλινική εικόνα και να εξηγήσουν την μοριακή παθογένεση των διαταραχών McCune Albright-Mazabraud. Η συγκεκριμένη διερεύνηση έγινε σε χρωμοσωμικό DNA προερχόμενο τόσο από τον παθολογικό ιστό όσο και από περιφερικό αίμα με σκοπό να αποσαφηνιστεί, σε περίπτωση ανίχνευσης μετάλλαξης, αν είναι σωματικής ή βλαστικής σειράς.

Κατά την πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία βιοψίας από παθολογικό ιστό και περιφερικό αίμα από ασθενή διαγνωσμένη με διαταραχές McCune Albright-Mazabraud. Στη συνέχεια απομονώθηκε γενωμικό DNA (DNA extraction) και από τους δύο ιστούς. Ακολούθησε μοριακή ανάλυση του γονιδίου *GNAS* μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και επακολούθησε αλληλούχιση κατά Sanger προκειμένου να ανιχνευθούν τυχόν γενετικές βλάβες.

3. Πειραματική Διαδικασία

I. Δείγμα Μελέτης

Δείγμα μελέτης αποτέλεσε μία 49χρονη ασθενής διαγνωσμένη με τις διαταραχές McCune Albright-Mazabraud. Πιο συγκεκριμένα, έγινε λήψη βιοψίας από παθολογικό ιστό της ασθενούς (ιστός μizώματος) και από περιφερικό αίμα της ασθενούς προκειμένου να διερευνηθεί η προέλευση της μετάλλαξης.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε δείγμα αίματος από υγιή ασθενή προκειμένου να δούμε τη φυσιολογική αλληλουχία και να συγκρίνουμε τα χρωματογραφήματά τους.

Τα δείγματα όλα παραλήφθηκαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

II. Μοριακές τεχνικές

Απομόνωση DNA (DNA extraction)

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα αίματος αξιοποιήθηκε το εμπορικό πρωτόκολλο Extractme Genomic DNA Kit (Blirt, Gdansk, Poland) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Προσθήκη 200μl από δείγματος περιφερικού αίματος σε αποστειρωμένο tube.
- Προσθήκη 1ml lysis buffer για την λύση των κυττάρων του ιστού
- Επώαση στον πάγκο και φυγοκέντρηση στα 8600g για 4 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 375μl GL Buffer.
- Προσθήκη 10 μl της πρωτεϊνάσης K και επώαση σε υδατόλουτρο στους 55°C για 30 λεπτά.
- Αφαίρεση του διαλύματος και προσθήκη 4μl RNAase A.
- Επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 400μl GB Buffer.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε στήλη με φίλτρο.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 600μl WashBuffer 1.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.

- Απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη 500μl Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.
- Απόρριψη του διαλύματος του tube συλλογής και φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά.
- Απόρριψη του tube συλλογής και μεταφορά της στήλης στο τελικό tube.
- Προσθήκη 100μl Elution Buffer και επώαση στον πάγκο 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη της στήλης και αποθήκευση στους -20°C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Οι εξωνικές περιοχές του γονιδίου *GNAS* αναλύθηκαν μέσω PCR και αλληλούχισης κατά Sanger. Οι συνθήκες των PCR αντιδράσεων παρίστανται αναλυτικά στον Πίνακα 2.

Οι συνθήκες θερμοκρασίας καθώς και οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινήτων για κάθε αντίδραση παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συνθήκες PCR αντιδράσεων

Εξώνιο γονιδίου	Εκκινήτες	Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Προϊόν PCR
Exon 2	Forward	5'-GCAGGTAGACACTGAATTGGAC-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	432
	Reverse	5'-GACCCTAAAGAGCCCTTCCC-3'		
Exon 3	Forward	5'-TGGTTGAGGAATGTAGAGAGACTG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for	312

			30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	
	Reverse	5'-CTTTACTTGCTCCAAAATGTCAGG-3'		
Exon 4-5	Forward	5'-GTGTCCTCAGGGCACATTGG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	541
	Reverse	5'- CAGGGCTCGTCACTCATGTTCC- 3'		
Exon 6	Forward	5'-GTCGGTCACATAGGGAAGTCTG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	104
	Reverse	5'-GGGGTAACTGGTTGGCTTCTAAG-3'		
Exon 7-8	Forward	5'-CCGTTGAGCCTGACCTTGTAG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	494
	Reverse	5'-TCCACTTGCGGCGTTCATC-3'		

Exon 9-10	Forward	5'-CTTCGCTGCCGTGTCCTG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	581
	Reverse	5'-GCCGTGTGAATGCTTGGG-3'		
Exon 11	Forward	5'-TCTTCAAGAGCATCTGGAACAAC-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	409
	Reverse	5'-AGATCCTTTATGGTTTGGTGGTG-3'		
Exon 12	Forward	5'-TCCCACCACCAAACCATAAAGG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	366
	Reverse	5'-CTGGATGTGCGTGAACATAAAC-3'		
Exon 13	Forward	5'-GGTTTTAGTTCACGCACATCCAG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final	467

			elongation at 72°C for 5 min	
	Reverse	5'-GGGTTTCGCAAAATCACTCG-3'		

Για όλες τις αντιδράσεις PCR, ενισχύθηκαν συνολικά από 100 έως 200 ng γενωμικού DNA σε τελικό όγκο αντίδρασης 30 μ L χρησιμοποιώντας τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) 62,5 mM, 500 pmoles από κάθε εκκινητή, $MgCl_2$ 1,5 mM και DNA πολυμεράση DFS-Taq (Bioron GmbH, Romerberg, Germany) 0,8 U σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Τα προϊόντα της PCR για κάθε αντίδραση ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3% (w/v) ώστε να ελεγχθεί η στοχευμένη ενίσχυση των περιοχών ενδιαφέροντος, η παρουσία επιμόλυνσης ή/και παραπροϊόντων. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων PCR (PCR purification) με χρήση κιτ καθαρισμού PCR σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και αλληλουχήθηκαν απευθείας με χρήση γενετικού αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Το πρωτόκολλο καθαρισμού των προϊόντων PCR παρίσταται παρακάτω:

Καθαρισμός PCR προϊόντων (Purification)

- Μεταφορά του PCR προϊόντος σε Eppendorf 1,5 ml. Προσθήκη 5X του όγκου του προϊόντος από το Gel Solubilization Solution και ακόλουθη ανακίνηση με vortex. Στη συγκεκριμένη περίπτωση προστέθηκαν για 25 μ l προϊόντος 125 μ l Gel Solubilization Solution
- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη
- Φυγοκέντρηση στα 15000g για 30 δευτερόλεπτα
- Απόρριψη του διαλύματος
- Προσθήκη 600 μ l Wash Buffer 2 και επώαση του διαλύματος στον πάγκο για 1 λεπτό.
- Φυγοκέντρηση στα 15000g για 3 λεπτά
- Μεταφορά της στήλης στο τελικό tube, προσθήκη 30 μ l Elution Buffer και επώαση στον πάγκο για 2 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 15000g για 2 λεπτά
- Αποθήκευση στους -20°C

Αξιολόγηση αποτελεσμάτων αλληλούχισης κατά Sanger και γενετική ανάλυση

Έπειτα της αλληλούχισης κατά Sanger τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν διαβάστηκαν μέσω του λογισμικού SnapGeneViewer και πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την παρουσία γενετικών παραλλαγών στις εξονικές περιοχές του γονιδίου *GNAS*. Ακολούθως οι ανιχνευθείσες γενετικές παραλλαγές αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας πληροφορία από βάσεις δεδομένων ιατρικής γενετικής (Franklin genoox, ClinVar), βιοπληροφορικά εργαλεία διερεύνησης παθογονικότητας (SIFT, Polyphen2 και Mutation Taster) και πληροφορία πληθυσμιακής γενετικής. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο διερεύνησης παθογονικότητας VEP (Variant Effect Predictor, Ensembl).

III.Βιοπληροφορικά εργαλεία

Για την γενετική ανάλυση του επί μελέτη γονιδίου αξιοποιήθηκαν τα βιοπληροφοριακά εργαλεία SIFT Polyphen2 όπου που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της επίδρασης των αμινοξικών αλλαγών (μεταλλάξεων) στην πρωτεΐνη. Και τα δύο εργαλεία βοηθούν στην εκτίμηση του κατά πόσο μια μετάλλαξη μπορεί να είναι επιβλαβής ή να επηρεάσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης, βασισμένα σε διαφορετικά κριτήρια (ref.16). Το SIFT προβλέπει αν μια μετάλλαξη στο επίπεδο του DNA που οδηγεί σε αλλαγή ενός αμινοξέος (non-synonymous SNP) μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Βασίζεται στην εξελικτική διατήρηση των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Εάν ένα αμινοξύ είναι διατηρημένο σε πολλαπλά είδη, αυτό σημαίνει ότι είναι πιθανό να είναι σημαντικό για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Αν η αλλαγή σε αυτό το αμινοξύ είναι ανεκτή ή όχι, καθορίζεται με βάση τα εξελικτικά δεδομένα. Το SIFT δίνει μια βαθμολογία από 0 έως 1. Μεταλλάξεις με βαθμολογία <0.05 θεωρούνται πιθανότατα επιβλαβείς (deleterious), ενώ αυτές με βαθμολογία >0.05 θεωρούνται ανεκτές (tolerated) (ref.21).

Το PolyPhen προβλέπει την πιθανή επίδραση των αμινοξικών αλλαγών στη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιεί διάφορα κριτήρια, όπως η εξελικτική διατήρηση των αμινοξέων, η θέση της μετάλλαξης στη δομή της πρωτεΐνης, και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νέου αμινοξέος σε σχέση με το φυσιολογικό. Επίσης λαμβάνει υπόψη τη γνωστή τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, αν είναι διαθέσιμη. Το PolyPhen κατηγοριοποιεί τις μεταλλάξεις ως καλοήθειες (δεν επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης), πιθανόν επιβλαβείς (μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης), πιθανότατα επιβλαβείς (είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα επηρεάσουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης)(ref.21).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο MutationTester για τη σύνδεση των ανιχνευμένων γνωστών μεταλλάξεων μιας νόσου με τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (ref.17) καθώς και το ClinVal είναι ένα ελεύθερα διαθέσιμο, δημόσιο αρχείο ανθρώπινων γενετικών παραλλαγών και ερμηνειών της σημασίας τους για τις ασθένειες, που διατηρείται στα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας. Οι ερμηνείες της κλινικής σημασίας των παραλλαγών υποβάλλονται από εργαστήρια κλινικών δοκιμών, ερευνητικά εργαστήρια, ομάδες εμπειρογνομόνων και άλλες ομάδες και το ClinVar συγκεντρώνει δεδομένα ανά ζεύγη παραλλαγών-ασθενειών και ανά παραλλαγή (ref.18).

Ένα ακόμα χρήσιμο εργαλείο είναι η *ensembl*, χρήσιμο για την οργάνωση βιολογικών πληροφοριών γύρω από τις ακολουθίες μεγάλων γονιδιωμάτων. Είναι μια ολοκληρωμένη πηγή αυτόματου σχολιασμού των μεμονωμένων γονιδιωμάτων και των σχέσεων σύνθεσης και ορθολογίας μεταξύ τους καθώς και ένα πλαίσιο για την ενσωμάτωση των βιολογικών δεδομένων που μπορούν να χαρτογραφηθούν με βάση τη γονιδιωματική ακολουθία (ref.19).

Τέλος ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή του βιοπληροφοριακού εργαλείου *Franklin*. Το *Franklin* αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση γενετικών παραλλαγών, βοηθώντας στη βελτίωση της διάγνωσης και στη λήψη κλινικών αποφάσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις σπάνιων ή κληρονομικών ασθενειών. Βασίζεται σε μια προηγμένη μηχανή ερμηνείας που χρησιμοποιεί τεχνητή νοημοσύνη (AI) και προσφέρει μια αυτοματοποιημένη ροή εργασίας από ακατέργαστα δεδομένα αλληλούχισης (FASTQ/VCF) μέχρι μια λίστα υποψήφιων παραλλαγών για την τελική κλινική αναφορά. Η μηχανή ερμηνείας υποστηρίζει πολλαπλές γενετικές εφαρμογές, όπως οι σπάνιες ασθένειες, η ογκολογία, ο κληρονομικός καρκίνος και ο προληπτικός έλεγχος φορέων γενετικών μεταλλάξεων. Παρέχει εκτενή στοιχεία για τις παραλλαγές, αποδεικτικά από τη βιβλιογραφία και την εξόρυξη κειμένων, αυτοματοποιημένη ταξινόμηση βάσει των κριτηρίων του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής (ACMG) για μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές και αριθμητικές μεταβολές αντιγράφων, καθώς και πλήθος από αναλύσεις και εργαλεία αξιολόγησης (ref.20).

4. Αποτελέσματα

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας αναλύθηκαν δείγματα γενωμικού DNA προερχόμενα από βιοψία παθολογικού ιστού και από περιφερικό αίμα ασθενούς με διαταραχές McCune Albright-Mazabraud. Στους πίνακες 2 και 3 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά για το wild type και τα κλινικά χαρακτηριστικά της ασθενούς.

Πίνακας 2: Κλινικά Χαρακτηριστικά Υγιούς Ασθενούς

Γυναίκα	Αρνητική για θρομβοφιλία	Ιστορικό καθέξιν αποβολών
	Ήπια υπογαμμασφαιριναιμία	

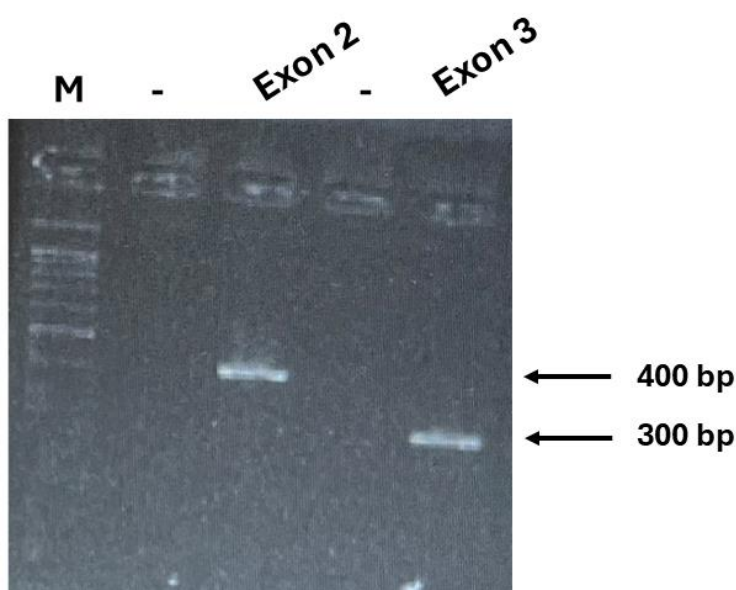
Πίνακας 3: Κλινικά Χαρακτηριστικά ασθενούς

Τοποθεσία μιξωμάτων	Ιστορικό	Άλλοι παράγοντες	Ενδοκρινοπάθειες	Οικογενειακό ιστορικό	Άλλα κλινικά χαρακτηριστικά	Ιστορικό θεραπειών
Αριστερός ώμος	Έναρξη εμφάνισης μιξωμάτων στα 30 έτη, συχνά παρουσία ζαν ραγδαία αύξηση	Θήλωμα αριστερού μαστού, μαστεκτομή, διόγκωση στον άλλο μαστό μεγάλης διάστασης	Όχι θυρεοειδίτιδα	Πατέρας με Charaut-Marie-Tooth(εμφάνιση στα 81)	Κνησμός χεριών και τοπικά στο σημείο των μιξωμάτων	Λυεπρόλιν για ινομύωμα
Δεξί βραχίονα	Παλαιότερα μιξώματα δεξί μηρού, γλουτών,	Ινομύωμα μητρας	Πρόωρη ήβη (2,5 ετών)	3 αδερφές από πατέρα με θυροειδοπάθεια	Ήπια ΧΑΠ υπό παρακολούθηση, ελαφρία πνευμονοπάθεια λόγω	Noergesic, Mesulid

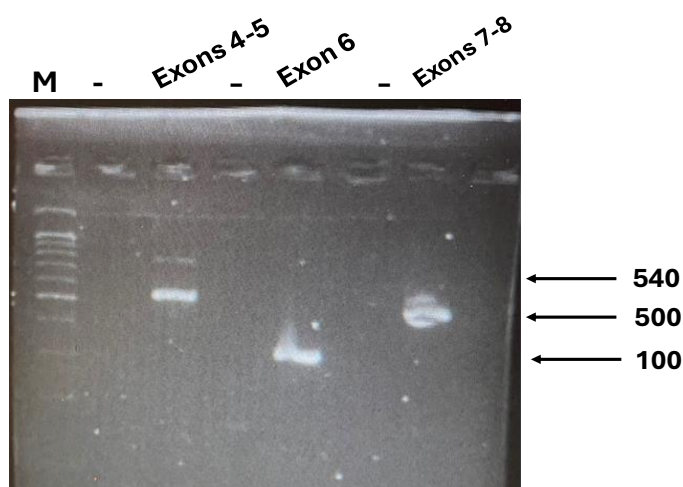
	υπογενεΐδιο				μικρής διαμέτρου του πνεύμονα	
Αριστερό κάτω άκρο	Μικρές διογκώσεις κατά μήκους της σπονδυλικής στήλης με αυτόματη ύφεση-επανεμφάνιση	Αφαίρεση χοληδόχου κύστης λόγω εμφάνισης ασυμπτωματικών πολυπόδων		Αδερφή 2 έτων μεγαλύτερη υγιής, 3 παιδιά υγιή	Ήπια εποχική αλλεργία, 3-4 λοιμώξεις του αναπνευστικού ανά έτος, συχνά λήψη αντιβίωσης	Lyrice σε μεγάλες δόσεις
					Κάπνισμα ½ πακέτο /ημέρα	
					Αρθραλγίες	

Πιο συγκεκριμένα, στοχεύθηκαν και μελετήθηκαν εξονικές περιοχές του γονιδίου *GNAS* με PCR και επακόλουθη αλληλούχιση κατά Sanger.

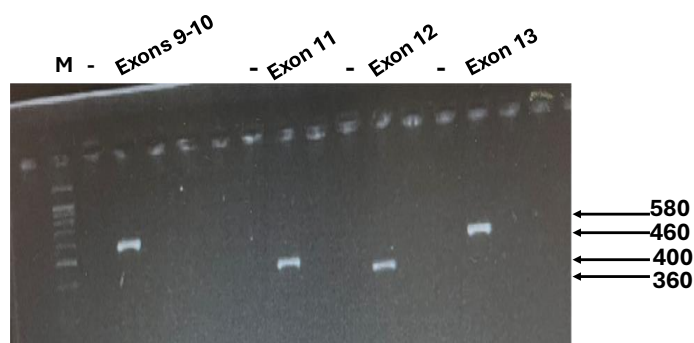
Παρακάτω στις εικόνες 6,7,8 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση της PCR σε εξονικές περιοχές του γονιδίου *GNAS* από το δείγμα βιοψίας σε ιστό παραφίνης :



Εικόνα 6: Ενίσχυση των εξωνίων 2 (περίπου στις 400bp) και 3 (περίπου στις 300bp) στο δείγμα της ασθενούς. Η σειρά της ηλεκτροφόρησης είναι ladder, blank, exon 2, blank, exon 3.



Εικόνα 7: Ενίσχυση των εξωνίων 4-5 (περίπου στις 540 bp), 6 (περίπου στις 100bp) και 7-8 (περίπου στις 500bp) στο δείγμα της ασθενούς. Η σειρά της ηλεκτροφόρησης είναι ladder, blank, exons 4-5, blank, exon 6, blank, exons 7-8.



Εικόνα 8: : Ενίσχυση των εξωνίων 9-10 (περίπου στις 580bp), 11 (περίπου στις 400bp), 12 (περίπου στις 360bp) και 13 (περίπου στις 460) στο δείγμα της ασθενούς. Η σειρά της ηλεκτροφόρησης είναι ladder, blank, exons 9-10, blank, exon 11, blank, exon 12, blank, exon 13).

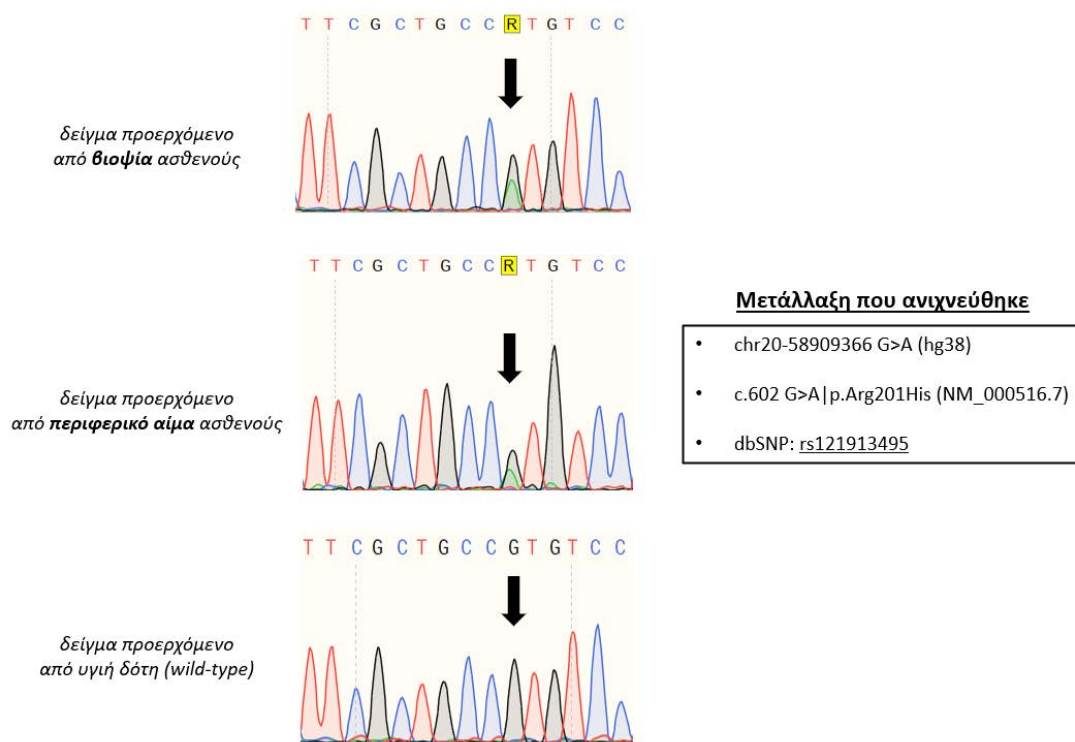


Εικόνα 9: Ενίσχυση των εξωνίων 7-8 (περίπου στις 500bp) στο δείγμα αίματος της ασθενούς

Στην εικόνα 9 παρατίθεται η ηλεκτροφόρηση απ το δείγμα αίματος της ασθενούς για το εξώνιο που βρέθηκε η μετάλλαξη στο υπό μελέτη γονίδιο.

Έπειτα από αλληλούχηση κατά Sanger, ανιχνεύθηκε παρανοηματική γενετική παραλλαγή (missense variant) στο γονίδιο *GNAS* τόσο σε γενωμικό DNA προερχόμενο από τον παθολογικό ιστό (μύξωμα) όσο και από περιφερικό αίμα (*GNAS*:c.602G>A|p.Arg201His|NM_000516.7|dbSNP: rs121913495). Η παρουσία της συγκεκριμένης γενετικής παραλλαγής αφορά ετεροζυγωτία όπως οπτικοποιείται μέσα από το χρωματογράφημα Sanger. Πρόκειται για παθογόνο μετάλλαξη (ACMG classification: Pathogenic) με συχνότητα αλληλίου στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό 0,0028% (σύμφωνα με την βάση δεδομένων gnomAD v4.1.0). Στην ClinVar υπάρχουν 22 καταχωρήσεις για την συγκεκριμένη μετάλλαξη εκ των οποίων οι 3 σχετίζονται με το σύνδρομο McCune Albright και χαρακτηρίζουν τη γενετική παραλλαγή ως παθογόνο.

Τα αποτελέσματα από το Sanger φαίνονται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10: Αποτελέσματα Sanger

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παθογονικότητας με βιοπληροφορικά εργαλεία απεικονίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης βάση βιοπληροφορικών εργαλείων

SIFT	0,02	Δηλητηριώδης, deleterious
Polyphen2	0.998	Πιθανώς επιβλαβής, probably damaging
Mutation Taster	1	Δηλητηριώδης, deleterious

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε η γενετική ανάλυση του γονιδίου *GNAS* σε δείγμα αίματος και βιοψίας ασθενούς διαγνωσμένη με τις νόσους McCune Albright-Mazabraud. Αυτές οι νόσοι είναι διαταραχές συνοδευόμενες από ινώδεις δυσπλασίες, ενδοκρινική υπερλειτουργία και μία σειρά συμπτωμάτων που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο προαναφερθέν γονίδιο. Το γονίδιο *GNAS* κωδικοποιεί την Gas υπομονάδα ενός GPCR υποδοχέα. Η υπομονάδα αυτή ενεργοποιεί την Αδενυλική Κυκλάση, ένα ένζυμο που προκαλεί τη σύνθεση του cAMP συμμετέχοντας σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η ρύθμιση έκκρισης σε ενδοκρινείς ιστούς και η ρύθμιση της έκκρισης αυξητικών και θυρεοειδικών ορμονών, η καρδιακή συστολή και η διαμόρφωση και ρύθμιση λειτουργίας σκελετικού μυός. Συνεπώς, μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Gas υπομονάδα προκαλεί την δυσλειτουργία και τη μη φυσιολογική ενεργοποίηση του παραπάνω σηματοδοτικού μονοπατιού. Σκοπός της εργασίας ήταν η εύρεση της μετάλλαξης στο γονίδιο *GNAS* καθώς και η εύρεση της προέλευσης της γενετικής παραλλαγής. Εάν η παραλλαγή ήταν παρούσα και στα δύο δείγματα, τότε αποδεικνύεται ότι επρόκειτο για μετάλλαξη βλαστικής προέλευσης (germline mutation), ενώ αν βρισκόταν μόνο στον παθολόγο ιστό τότε θα αποδεικνυόταν η σωματική προέλευση της μετάλλαξης (somatic mutation). Έπειτα από ανάλυση PCR και αλληλουχία SANGER σε 12 εξώνια του γονιδίου *GNAS*, αποδείχθηκε η παρουσία μετάλλαξης τόσο στον παθολόγο ιστό όσο και στο δείγμα αίματος κάτι που δηλώνει ότι οι νόσοι οφείλονται σε μεταλλάξεις στα βλαστικά κύτταρα της ασθενούς. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε παρανοηματική μετάλλαξη αντικατάστασης νουκλεοτιδικής βάσης στο εξόνιο 8 του γονιδίου *GNAS* που οδήγησε σε μετατροπή της τριπλέτας που κωδικοποιεί τη Αργινίνη στη θέση 201 στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το αμινοξύ Ιστιδίνη. Διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, απέδειξαν ότι μια μετα-ζυγωτική υποκατάσταση της αργινίνης από κυστεΐνη ή ιστιδίνη (R201C/H) στο κωδικόνιο 201 στο εξόνιο 8 του *GNAS* είναι υπεύθυνη για τις κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου στην πλειονότητα των περιπτώσεων (πάνω από 95%). Σπάνια, οι ασθενείς μπορεί να φέρουν μετάλλαξη στο κωδικόνιο 227 στο εξόνιο 9 (Q227R / L) (ref.23). Οι περισσότερες μελέτες ωστόσο, απέδειξαν την υποκατάσταση της Αργινίνης στη θέση 201 με Ιστιδίνη με διάφορες μεθόδους όπως PCR (ref.24) καθώς και με την τεχνική PNA (ref.13). Βιοχημικά, η Ιστιδίνη χαρακτηρίζεται από την παρουσία ιμιδαζολικού δακτυλίου, κάτι που οδηγεί σε μεγάλη τροποποίηση του πεπτιδίου που προκύπτει παρεμποδίζοντας σημαντικά την τριτοταγή δομή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης (ref.22), προκαλώντας μεγάλη παραλλαγή στη δομή της υπομονάδας Gas. Η παραλλαγή αυτή δημιουργεί τη συστατική ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων του cAMP, κάτι που συνεπάγεται την δυσλειτουργία της ανάπτυξης των μυών, του σκελετικού συστήματος και της λειτουργίας του ενδοκρινικού ιστού.

Συμπερασματικά, η πληθώρα των δυσλειτουργιών στις νόσους McCune Albright-Mazabraud οφείλονται σε παραλλαγή του γονιδίου *GNAS* που προκαλεί την αντικατάσταση του κωδικονίου της Αργινίνης στη θέση 201 με το αμινοξύ Ιστιδίνη δημιουργώντας επιπλοκές στη φυσιολογική δομή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης, δηλαδή της υπομονάδας Gas του GPCR

μεμβρανικού υποδοχέα. Με αυτό τον τρόπο επάγεται η συστατική ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και η υπερ- έκκριση του cAMP δημιουργώντας τα συμπτώματα της νόσου. Στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκαν και τα βιοπληροφοριακά εργαλεία Sift, Polyphen 2, Mutation Taster, ClinVal, Ensembl και το Franklin Genoox.

6. Βιβλιογραφία

1. Genetic Mutagenesis, Justin Durland, Hamid Ahmadian-Moghadam
2. NCBI, Genomes 2nd edition, Chapter 14 “Mutation, repair and recombination”
3. NIH, definition of mutations
4. Embryos in the Womb Can Get Gene Mutations That Lead to Cancer in Adulthood, April 28, 2022, by Nadia Jaber
5. Somatic Mutation- Definition, Causes, Outcomes, Diseases, Microbe Notes, August 3, 2023 by Nidhi Dewangan
6. USCS Genome Browser
7. Analysis of the GNAS1 Gene in Albright’s Hereditary Osteodystrophy W. AHRENS, O. HIORT, P. STAEDT, T. KIRSCHNER, C. MARSCHKE, AND K. KRUSE, Department of Pediatrics, Medical University of Lübeck, Lübeck, Germany
8. 2002 Nature Publishing Group Li, J. et al. The Molecule Pages database. Nature 420, 716-717 (2002)
9. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes, Daniel Hilger, Matthieu Masureel, Brian K Kobilka Epub 2018 Jan 8
10. 2005 Nature Publishing Group Leurs, R. et al. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. Nature Reviews Drug Discovery 4, 107-120 (2005).
11. Alterations of Phosphodiesterases in Adrenocortical Tumors, August 2016, Frontiers in Endocrinology
12. Prevalence and Clinical Features of Mazabraud Syndrome A Multicenter European Study Bas C.J. Majoor 2019, MD, PhD, Michiel A.J. van de Sande, MD, PhD, Natasha M. Appelman-Dijkstra, MD, PhD, Andreas Leithner, MD
13. A Highly Sensitive Polymerase Chain Reaction Method Detects Activating Mutations of the GNAS Gene in Peripheral Blood Cells in McCune-Albright Syndrome or Isolated Fibrous Dysplasia BY STEVEN A. LIETMAN, MD, CHANGLIN DING, MD, AND MICHAEL A. LEVINE, MD
14. Mazabraud syndrome associated with McCune-Albright syndrome Alessio Biazzo, Andrea Di Bernardo, Antonina Parafioriti, Norberto Confalonieri, Orthopaedic Department, Gaetano Pini-CTO, Milano; 2 Pathology Department, Gaetano Pini-CTO, Milano

15. Identification of a novel GNAS mutation in a case of pseudohypoparathyroidism type 1A with normocalcemia, Long et al. BMC Medical Genetics (2018)
16. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations Sarah E Flanagan¹, Ann-Marie Patch, Sian Ellard, Genet Test Mol Biomarkers. 2010 Oct;14(5):730
17. Nucleic Acids Res. 2021 Jul 2; 49(W1): W446–W451. MutationTaster2021 Robin Steinhaus, Sebastian Proft, Markus Schuelke, David N Cooper, Jana Marie Schwarz, and Dominik Seelow
18. Nucleic Acids Res 2018 Jan 4 ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence Melissa J Landrum , Jennifer M Lee , Mark Benson , Garth R Brown , Chen Chao , Shanmuga Chitipiralla , Baoshan Gu , Jennifer Hart , Douglas Hoffman , Wonhee Jang , Karen Karapetyan , Kenneth Katz¹ , Chunlei Liu¹ , Zenith Maddipatla¹ , Adriana Malheiro¹ , Kurt McDaniel¹ , Michael Ovetsky¹ , George Riley , George Zhou , J Bradley Holmes , Brandi L Kattman¹ , Donna R Maglott
19. Genome Res. 2004 May; 14(5): 925–928. An Overview of Ensembl Ewan Birney, T. Daniel Andrews, Paul Bevan, Mario Caccamo, Yuan Chen, Laura Clarke, Guy Coates, James Cuff, Val Curwen, Tim Cutts, Thomas Down, Eduardo Eyras
20. Variant-level matching for diagnosis and discovery: Challenges and opportunities, Eliete da S. Rodrigues, Sean Griffith, Renan Martin, Corina Antonescu, Jennifer E. Posey, Zeynep Coban-Akdemir, Shalini N. Jhangiani, Kimberly F. Doheny, James R. Lupski, David Valle, Michael J. Bamshad, Ada Hamosh, Assaf Sheffer, Jessica X. Chong, Yaron Einhorn, Miro Cupak, and Nara Sobreira · Hum Mutat. 2022 Jun; 43(6): 782–790
21. Ensembl Variation - Pathogenicity predictions
22. Published online 2013 Mar 1, The multiple roles of histidine in protein interactions Si-Ming Liao, Qi-Shi Du, Jian-Zong Meng, Zong-Wen Pang, and Ri-Bo Huang · Author information Article notes Copyright and License information PMC Disclaimer
23. McCune–Albright Syndrome: A Case Report and Review of Literature Nicolas C. Nicolaides, Maria Kontou, Ioannis-Anargyros Vasilakis, Maria Binou, Evangelia Lykopoulou, Farzad Pakdel, Academic Editor
24. Best practice management guidelines for fibrous dysplasia/McCune–Albright syndrome: a consensus statement from the FD/MAS international consortium Muhammad Kassim Javaid, Alison Boyce, Natasha Appelman-Dijkstra, Juling Ong, Patrizia Defabianis, Amaka Offiah, Paul Arunde, Nick Shaw, Valter Dal Pos, Ann Underhil, Deanna Portero, Lisa Heral, Anne-

Marie Heegaard, Laura Masi, Fergal Monsell, Robert Stanton, Pieter Durk Sander Dijkstra, Maria Luisa Brandi, Roland Chapurlat, Neveen Agnes Therese Hamdy, Michael Terrence Collins Orphanet J Rare Dis. 2019; 14: 139.