



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

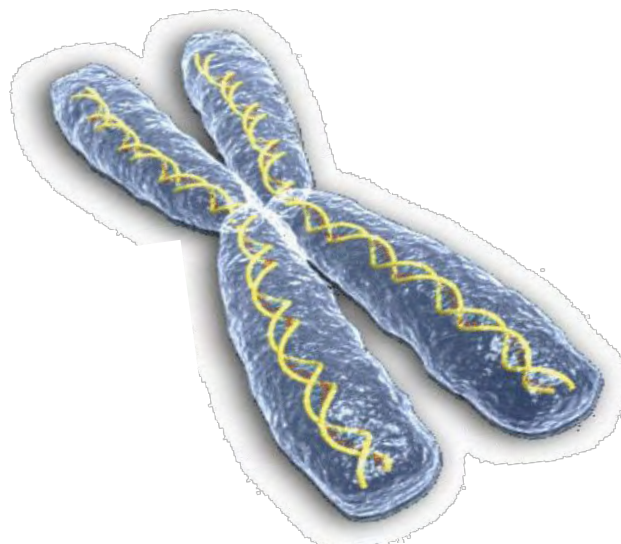
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *SPINK5* σε ασθενή
με σύνδρομο Netherton**

Σαρρή Κωνσταντίνα



Λάρισα 2013

**Διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *SPINK5* σε ασθενή
με σύνδρομο Netherton**

***SPINK5* mutation screen in a patient with Netherton
syndrome**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σαραφίδου Θεολογία

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Λέκτορα Σαραφίδου Θεολογίας, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και τη συνεχή καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφερε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και την κ. Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για την βοήθεια και την υποστήριξη που μου προσέφεραν, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο Netherton (Netherton Syndrome, NS) είναι μία πάθηση του δέρματος, η οποία χαρακτηρίζεται από συγγενή ιχθυόμορφο ερυθρόδερμα και σοβαρής μορφής ατοπικές εκδηλώσεις. Το NS κληρονομείται με αυτοσωμικό υποτελή τρόπο. Η εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό είναι 1 στις 200.000 γεννήσεις. Το υπεύθυνο γονίδιο χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική περιοχή 5q32 και ονομάζεται *SPINK5* (serine protease inhibitor Kazal-type 5). Το *SPINK5* αποτελείται από 33 εξόνια και κωδικοποιεί τη LEKTI (lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor), έναν λεμφοεπιθηλιακό αναστολέα. Η LEKTI συμμετέχει στη ρύθμιση της απολέπισης του δέρματος ενώ θεωρείται πως διαθέτει και αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακό ρόλο. Περισσότερες από 50 μεταλλάξεις στο *SPINK5* έχουν αναγνωρισθεί σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton, οι οποίες εντοπίζονται τόσο σε εξόνια όσο και σε ινρόνια. Οι περισσότερες από αυτές διαφέρουν σε συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των πληθυσμών. Παρόλα αυτά όμως, δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση μεταξύ του γονοτύπου και του φαινοτύπου των ασθενών, ούτε και με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων που εμφανίζουν.

Σε αυτή την εργασία, μία γυναίκα ασθενής από την Ελλάδα ελέγχθηκε για μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPINK5*. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR όλων των εξονίων καθώς και τμημάτων των ιντρονίων. Η ασθενής βρέθηκε πως ήταν είναι ετερόζυγη για τη μετάλλαξη 2468delA στο εξόνιο 26 η οποία προκαλεί πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Η ανάλυση DNA της μητέρας αποκάλυψε τη μητρική προέλευση αυτής της μετάλλαξης. Η μετάλλαξη 2468delA αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Η ασθενής βρέθηκε επίσης πως είναι ομοζυγη για τον πολυμορφισμό G1258A ο οποίος δημιουργεί μια παραλλαγή της LEKTI (E420K) που έχει δείξει πως τροποποιεί τη διαδικασία ενεργοποίησής της, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη επιδερμική ενεργότητα πρωτεάσης. Επιπλέον, η ασθενής βρέθηκε πως είναι ετερόζυγη για δύο παραλλαγές στα εξόνια 5 και 13 καθώς και για οκτώ παραλλαγές σε ιντρονικές περιοχές, όλες πατρικής προέλευσης. Κάποια από τις παραλλαγές αυτές θα μπορούσε συνδυαστικά με την 2468delA να ευθύνεται για το σύνδρομο. Η ζητούμενη παραλλαγή δεν μπορεί να είναι η E420K, επειδή η ομοζυγωτία της σε συνδυασμό με την 2468delA ταυτοποιήθηκαν και στη μητέρα της ασθενούς. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις ιντρονιακές περιοχές, παρόλο που δεν επηρεάζουν της υψηλά συντηρημένες θέσεις splicing, ενδέχεται να ενεργοποιούν κρυπτικές θέσεις οι οποίες να εμφανίζουν μεγαλύτερη ισχύ από τις υπάρχουσες, τροποποιώντας το splicing του mRNA, όπως έχει ήδη δείξει για ιντρονιακές μεταλλάξεις του *SPINK5*. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης πρέπει να εξεταστούν τα μετάγραφα του γονιδίου *SPINK5* της ασθενούς μέσω λήψης κερατινοκυττάρων και εφαρμογής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής από RNA κερατινοκυττάρων (RT-PCR).

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σπάνιες Παθήσεις	1
Σύνδρομο Netherton	2
Διάγνωση του συνδρόμου Netherton	3
Σύνδρομο Netherton: Χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου	4
Το γονίδιο SPINK5	5
Οι μεταλλάξεις του γονιδίου SPINK5	7
Ανευρμηνεύσιμες Μεταλλάξεις	8
Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου	14
Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το Splicing	22
Άλλες κατηγορίες μεταλλάξεων	29
Η πρωτεΐνη LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type-related Inhibitor)	30
Πρωτεόλυση και ενεργοποίηση της LEKTI	32
Κεράτινη στοιβάδα	34
Η LEKTI, ως ρυθμιστής της απολέπισης του δέρματος	35
Η απολέπιση στο σύνδρομο Netherton	36
Φλεγμονή και αλλεργίες σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton	37
Συσχέτιση της LEKTI με την καθυστέρηση της ανάπτυξη σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton	40
Σκοπός της εργασίας	41

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενούς	43
Απομόνωση γενωμικού DNA	43
Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του DNA	45
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών	50

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

<i>Ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου SPINK5 με PCR</i>	51
<i>Πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις σε κωδικές περιοχές του SPINK5</i>	52
<i>Πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις σε μη κωδικές περιοχές του SPINK5</i>	56
<i>Προσδιορισμός απλοτύπου ασθενούς</i>	58
<i>Διερεύνηση μεταλλάξεων στα γονίδια SPINK6 και SPINK9</i>	59
<i>Μελλοντικοί στόχοι</i>	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σπάνιες Παθήσεις

Οι γενετικές σπάνιες παθήσεις είναι ασθένειες που απειλούν τη ζωή ή επιφέρουν χρόνια αναπηρία. Χαρακτηρίζονται από μικρή συχνότητα εμφάνισης και μεγάλη ετερογένεια και περιλαμβάνουν συγγενείς δυσπλασίες, σπάνιες μορφές παιδικού καρκίνου, αιματολογικά, αυτοάνοσα, δερματολογικά, ενδοκρινολογικά, καρδιολογικά, αναπνευστικά, γαστρεντερικά, μεταβολικά, νευρολογικά και νευρομυϊκά, ορθοπεδικά και οφθαλμολογικά νοσήματα. Τα σπάνια νοσήματα συγκαταλέγονται πλέον ανάμεσα στις προτεραιότητες του κοινοτικού προγράμματος για τη Δημόσια Υγεία για την περίοδο 2003 - 2008. Στο πλαίσιο του προγράμματος αυτού, μια νόσος είναι σπάνια εφόσον προσβάλλει λιγότερα από 5 ανά 10.000 άτομα. Η αναλογία των 5 ανά 10.000 ατόμων μπορεί να φαίνεται χαμηλή, παρ' όλα αυτά αντιστοιχεί σε περίπου 246.000 άτομα ανά νόσημα στην Ε.Ε. των 27 κρατών-μελών. Σύμφωνα με τις υφιστάμενες επιστημονικές γνώσεις, 8.000 διαφορετικές σπάνιες ασθένειες προσβάλλουν έως και 6% του συνολικού πληθυσμού της Ε.Ε. σε κάποια στιγμή της ζωής τους. Δηλαδή, περίπου 15 εκατομμύρια άνθρωποι στην Ε.Ε. και 880.000 Έλληνες προσβάλλονται ή πρόκειται να προσβληθούν από ένα σπάνιο νόσημα (<http://www.orpha.net>).

Παρόλα αυτά, τα σπάνια νοσήματα με συχνότητα εμφάνισης κοντά στο όριο των 5 ανά 10.000 ατόμων είναι λιγότερα από 100. Πρόκειται για νοσήματα όπως η μεσογειακή αναιμία, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αιμορροφιλία, η κυστική ίνωση, η νόσος Fabry-Gaucher, το σκληρόδερμα ή ελλείμματα (διαμαρτίες σύγκλισης) του νωτιαίου σωλήνα. Οι περισσότερες σπάνιες ασθένειες, όπως το σάρκωμα του Ewing, η μυϊκή δυστροφία Duchenne ή η νόσος Von Hippel-Lindau, είναι πολύ σπάνιες και προσβάλλουν 1 ή και λιγότερα στα 100.000 άτομα (<http://www.orpha.net>).

Οι σπάνιες παθήσεις παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση στην ηλικία στην οποία εκδηλώνονται τα πρώτα συμπτώματα: οι μισές σπάνιες ασθένειες εκδηλώνονται συνήθως κατά τη γέννηση ή την παιδική ηλικία (όπως το σύνδρομο Prader-Willi και το ρετινοβλάστωμα). Οι υπόλοιπες εκδηλώνονται κατά την ενήλικη ζωή (όπως η νόσος Huntington, η νόσος Kreutzfeld Jacob) (<http://www.orpha.net>).

Οι σπάνιες ασθένειες παρουσιάζουν επίσης ετερογένεια σε ό,τι αφορά στη σοβαρότητα και στην εκδήλωσή τους. Το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με σπάνιες ασθένειες είναι σημαντικά μειωμένο. Πολλές από τις ασθένειες αυτές είναι πολύπλοκες, εκφυλιστικές και επιφέρουν χρόνιες αναπηρίες, ενώ άλλες επιτρέπουν μια φυσιολογική ζωή –εφόσον διαγνωστούν εγκαίρως και εφαρμοστεί κατάλληλη διαχείριση και θεραπευτική αντιμετώπιση. Προσβάλλουν τη σωματική και τη νοητική ικανότητα, τη συμπεριφορά και την αισθητηριακή ικανότητα και επιφέρουν αναπηρίες (<http://www.orpha.net>). Στο πλαίσιο της ευρωπαϊκής συνεργασίας για την προώθηση της έρευνας και την ανταλλαγή γνώσεων και εμπειρίας στον τομέα των σπάνιων παθήσεων, η Ελλάδα συμμετέχει στην Επιτροπή Εμπειρογνομών της Ευρωπαϊκής

Σύνδρομο Netherton

Κλινικά χαρακτηριστικά

Το σύνδρομο Netherton (Netherton syndrome (NS), OMIM #256500) είναι μία διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και εμφανίζεται με συχνότητα 1:200.000 γεννήσεις. Πρωτοπεριγράφηκε από τον Netherton το 1958, ο οποίος περιέγραψε τη συσχέτιση μεταξύ της συγγενούς ιχθυασόμορφης ερυθροδερμίας και των ανωμαλιών στο στέλεχος της τρίκας σε ένα κοριτσάκι. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από συγγενή ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (CIE), μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (ichthyosis linearis circumflexa, ILC), 'τρίχες μπαμπού' trichorrhexis invaginata και αλλεργική διάθεση με αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (Chao *et al*, 2005) (Εικ 1). Μεταξύ αυτών των ανωμαλιών, η trichorrhexis invaginata αποτελεί παθognωμικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου (Sprecher *et al*, 2004).

Πιο συγκεκριμένα, τα κλινικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου περιλαμβάνουν γενικευμένη ερυθροδερμία ποικίλης έντασης, η οποία εμφανίζεται είτε κατά τη γέννηση είτε αμέσως μετά. Συχνές επιπλοκές κατά τη νεογνική και νηπιακή ηλικία είναι η ανισορροπία των ηλεκτρολυτών, λοιμώξεις εντοπισμένες στο δέρμα ή συστηματικές καθώς και υπερνατρίαζια. Μία σπάνια όψιμη επιπλοκή είναι η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Κατά την παιδική ηλικία, σχεδόν το 50% των ασθενών αναπτύσσουν μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (ILC) στον κορμό και τα άκρα. Μία τυπική κάκωση ILC συνίσταται σε μία επίπεδη πλάκα με ελλειπώς αναπτυσσόμενα άκρα φωλιδωτής απολέπισης, η οποία συνοδεύεται είτε με ερυθρηματώδη είτε με φωλιδωτή απολέπιση. Η πλάκα αυτή μπορεί να αναπτύσσεται είτε δακτυλιδοειδώς είτε πολυκυκλικά. Μεταξύ οξέων επιθετικών εμφανίσεων των συμπτωμάτων, το δέρμα των ασθενών φαίνεται φυσιολογικό, αν και πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν περιτοματικό ερύθημα και απολέπιση. Οι τρίχες του τριχωτού της κεφαλής, των φρυδιών, των βλεφαρίδων και του σώματος είναι αραιές και αναπτύσσονται με πολύ αργούς ρυθμούς. Η χρόνια βρεφαρίτιδα και η εκτροφή συχνά οδηγούν σε κερατίτιδα. Οι ανωμαλίες του τριχώματος περιλαμβάνουν τις trichorrhexis invaginata, trichorrhexis nodosa και pili torti (Söreide *et al*, 2005). Η trichorrhexis invaginata, που είναι η χαρακτηριστικότερη ανωμαλία στην τρίχα που συναντάται στο σύνδρομο Netherton, είναι μία οξώδης επέκταση του στελέχους της τρίκας, η οποία φαίνεται σαν τη σύνδεση 'μπάλας-θήκης'. Η trichorrhexis nodosa περιγράφει την πάχυνση ή τη λέπτυνση σημείων της τρίκας, τα οποία σχηματίζουν εύθραυστους κόμβους. Η pili torti χαρακτηρίζεται από κοντές και εύθραυστες τρίχες, οι οποίες υπό μικροσκοπική εξέταση φαίνονται συστρεμμένες και πεπλατυσμένες. Παρόλο που ο μηχανισμός δημιουργίας αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμα κατανοητός, φαίνεται πως η ανώμαλη κερατινοποίηση οδηγεί το πιο σκληρό άπω τμήμα να ολισθαίνει προς τα πίσω πάνω από το μαλακότερο εγγύς τμήμα της τρίκας. Τέλος, πολύ συχνά σε ασθενείς με Netherton παρατηρούνται

γαστροεντεροπάθειες, νεφρική ανεπάρκεια και καθυστερημένη ανάπτυξη (Sprecher *et al*, 2004).



Εικόνα 1. Κλινική εικόνα ασθενών με σύνδρομο Netherton. Α) μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (ILC) (Sprecher *et al*, 2001), Β) Trichorrhexis invaginata (http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v81n6/en_a08fig2.gif), Γ) Συγγενής ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (http://dermaamin.com/site/images/clinical-pic/c/congenital_ichthyosiform_erythroderma/congenital_ichthyosiform_erythroderma16.jpg)

Διάγνωση του συνδρόμου Netherton

Η διάγνωση του συνδρόμου συνήθως δεν πραγματοποιείται πριν το τέλος του πρώτου χρόνου ζωής του ασθενούς συνήθως λόγω έλλειψης της χαρακτηριστικής μη πομφολυγώδης ιχθυασόμορφης ερυθροδερμίας. Κατά τη νηπιακή ηλικία, η διάγνωση του συνδρόμου Netherton αποτελεί μία πρόκληση λόγω του μεγάλου αριθμού αιτιολογιών για την εμφάνιση νεογνικής ερυθροδερμίας. Διαφορικές διαγνώσεις περιλαμβάνουν σημηματοροϊκή δερματίτιδα, ερυθροδερμική ψωρίαση, μη πομφολυγώδη και πομφολυγώδη συγγενή ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, σύνδρομο του σταφυλόκοκκου, σοβαρή ατοπική δερματίτιδα, σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας όπως το σύνδρομο Omenn, μεταβολικές διαταραχές (ανεπάρκεια της συνθεσίας της ολοκαρβοξυλάσης, ιδιοπαθής ανεπάρκεια λιπαρών οξέων) καθώς και αντίδραση σε φαρμακευτικές ουσίες. Σε πολλούς ασθενείς, η ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία αντικαθίσταται από μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία σε μεγαλύτερη ηλικία. Παρόλα αυτά, σε σοβαρές μορφές του συνδρόμου, η γενικευμένη ερυθροδερμία και η απολέπιση παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ασθενούς. Στη νεογνική ηλικία, η προκαλούμενη από υπερνατρίαζια αφυδάτωση μπορεί να αποβεί μοιραία ή να προκαλέσει ενδοκρανιακή αιμορραγία και επακόλουθα νευρολογικά προβλήματα. Στη νεογνική νοσηρότητα περιλαμβάνονται, επίσης, η υποθερμία, η απώλεια βάρους και η σήψη (Macknet *et al*, 2008).

Η βιοψία δέρματος και η μικροσκοπική εξέταση του στελέχους της τρίχας αποτελούν διαγνωστικά εργαλεία του συνδρόμου Netherton. Συχνά όμως, οι προσεγγίσεις αυτές δίνουν μη ειδικά αποτελέσματα, με αποτέλεσμα να γίνεται απαραίτητη τόσο η εξέταση πολλαπλών στελεχών του τριχώματος όσο και η επαναλαμβανόμενη κατά τακτά χρονικά διαστήματα βιοψία δέρματος (Macknet *et al*, 2008).

Σύνδρομο Netherton: Χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου

Η παθογένεια του συνδρόμου Netherton εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της κλινικής εικόνας των ασθενών, η οποία συνδυάζει ανωμαλίες στην επιδερμίδα, το τριχώμα και το ανοσοποιητικό σύστημα στα πλαίσια μιας μονογονιδιακής διαταραχής.

Αρχικά, ιστολογικές αναλύσεις σε βιοψίες δέρματος ασθενών με NS έδειξαν ανεπαρκή κερατινοποίηση της επιδερμίδας υποδεικνύοντας ως πιθανούς υποψήφιους υπεύθυνους γενετικούς τόπους, βάσει λειτουργίας, το σύμπλεγμα γονιδίων διαφοροποίησης της επιδερμίδας (EDC, epidermal differentiation complex) που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 1q21 και το γονίδιο της τρανογλουταμινάσης 3 (συμμετέχει στη διαφοροποίηση και σταθερότητα της κεράτινης στοιβάδας) στην 20p13. Επιπλέον, η ατοπία, τα υψηλά επίπεδα IgE και η υπερηωσινοφιλία, που χαρακτηρίζουν το NS, υπέδειξαν σαν υποψήφιους γενετικούς τόπους το σύμπλεγμα των γονιδίων της κυτταροκίνης που ελέγχουν τα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (5q31), το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα του υποδοχέα IgE υψηλής συγγένειας (11q13) και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 4 (16q12) (Chavanas *et al*. 2000a).

Για τη χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου για το NS, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενετικής σύνδεσης σε 26 ασθενείς με Netherton από 20 οικογένειες και 58 μη προσβεβλημένους συγγενείς (Chavanas *et al*. 2000a). Στις μισές οικογένειες που μελετήθηκαν, οι γονείς των ασθενών ήταν συγγενείς (ομομιξία). Οι οικογένειες προέρχονταν από διάφορες περιοχές όπως Δυτική Ευρώπη, Τουρκία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Μαρόκο και Αλγερία. Η μελέτη αυτή οδήγησε στη χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου για το NS στη χρωμοσωμική περιοχή 5q32, παρουσιάζοντας ισχυρές ενδείξεις σύνδεσης μεταξύ των δεικτών D5S2017 και D5S413 με LOD score 10,11, χωρίς ένδειξη ετερογένειας γενετικού τόπου. Περαιτέρω, η ανάλυση απλοτύπων τοποθέτησε τον υπεύθυνο γενετικό τόπο μεταξύ των δεικτών D5S463 και D5S2013 σε γενετική απόσταση 3,5cM (Chavanas *et al*. 2000a).

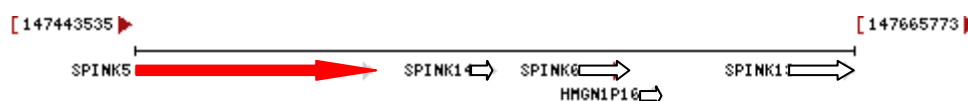
Σε αυτήν τη χρωμοσωματική περιοχή είχε ήδη χαρτογραφηθεί το γονίδιο *SPIKN5* (serine protease inhibitor Kazal-type 5) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη LEKTI (lymphoepithelial Kazal-type-related inhibitor), έναν λεμφοεπιθηλιακό αναστολέα πρωτεασών σερίνης που εκφράζεται στο θύμο, το κοιλιακό επιθήλιο, το βλεννογόνο του στόματος, τις αμυγδαλές, τους αδένες Bartholin και τους παραθυρεοειδείς αδένες, υποδεικνύοντας έναν πιθανό αντιφλεγμονώδη και/ή αντιμικροβιακό ρόλο στα επιθήλια των βλεννογόνων (Mägger *et al*. 1999). Έτσι, βάσει του προτύπου έκφρασης του *SPINK5* και της συμμετοχής ορισμένων πρωτεασών σερίνης στο προφλεγμονώδες μονοπάτι του NF-κB, η LEKTI θεωρήθηκε εύλογη επιλογή για να ελεγχθεί η συσχέτισή της με το σύνδρομο Netherton. Ο

έλεγχος αρχικά πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Northern σε ένα δείγμα υγιούς ατόμου και 5 δείγματα ασθενών. Η ανάλυση έδειξε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, υποδεικνύοντας πιθανό μηχανισμό αποικοδόμησης του RNA λόγω ύπαρξης πρώιμων κωδικονίων λήξης (nonsense-mediated RNA decay). Αυτού του είδους οι μεταλλάξεις συναντώνται πολύ συχνά σε νοσήματα που ακολουθούν υπολειπόμενο τρόπο κληρονομιάς (Chavanas *et al.* 2000b). Έτσι, το γονίδιο *SPIKN5* που κωδικοποιεί τη LEKTI ήταν το πρώτο που συσχετίστηκε με την εμφάνιση του συνδρόμου Netherton.

Το γονίδιο *SPIKN5*

Το *SPIKN5* (Gene ID: 11005) ανήκει σε ένα σύμπλεγμα γονιδίων *SPINK* που χαρτογραφούνται στη χρωμοσωματική περιοχή 5q32 και κωδικοποιούν αναστολές πρωτεασών σερίνης. Από αυτά, στην επιδερμίδα εκφράζονται τα *SPIKN5*, *SPIKN6* και *SPIKN9* (Εικ. 2).

Chromosome 5 - NC_000005.9



Εικόνα 2. Τμήμα της χρωμοσωμικής περιοχής 5q32. Φαίνονται οι θέσεις των γονιδίων *SPINK5*, *SPINK6*, *SPINK13* και *SPINK14*. Η φορά του βέλους υποδεικνύει την κατεύθυνση της μεταγραφής (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Το *SPIKN5* καλύπτει γενωμική αλληλουχία 73391bp, αποτελείται από 33 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 1064 αμινοξέων. Το γονίδιο *SPINK5* είναι συντηρημένο στο χιμπατζή, τον πίθηκο ρέζους, το σκύλο, την αγελάδα, το ποντίκι, τον αρουραίο και την όρνιθα. Οι περισσότερες ορθόλογες πρωτεΐνες έχουν παρόμοιο μήκος με την LEKTI του ανθρώπου. Στον άνθρωπο, το *SPIKN5* υφίσταται εναλλακτικό splicing και παράγει τρία εναλλακτικά μετάγραφα. Αυτά, μεταφράζονται σε τρεις ισομορφές της LEKTI, που διαφέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Όλα τα μετάγραφα διαθέτουν την ίδια θέση έναρξης της μετάφρασης και η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή τους (5' UTR) έχει μήκος 73 bp. Επιπρόσθετα, και τα τρία μετάγραφα φέρουν τα πρώτα 28 εξώνια. Το μάτισμα μεταξύ των εξωνίων 28 και 29 παράγει το μετάγραφο *SPINK5f-1* που αποτελείται από 33 εξώνια και έχει μήκος κωδικής περιοχής 3192 bp. Το δεύτερο μετάγραφο, *SPINK5sh*, χρησιμοποιεί μέρος του ιντρονίου 28, όπου και σχηματίζεται ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης με αποτέλεσμα το συνολικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης να είναι 2,748 bp. Τέλος, παράγεται και ένα τρίτο μετάγραφο μεγαλύτερου μήκους που κωδικοποιείται από 34 εξώνια. Το *SPINK5l* διαθέτει ένα επιπλέον εναλλακτικό εξώνιο 90 bp, το οποίο εδράζεται μέσα στο ιντρόνιο 28 και ονομάζεται εξώνιο 28a (Εικ. 3) (Tartaglia-Polcini *et al.*, 2006).

a

```

GATCGAGAAGCTAATGAAAGAAAAAGAAAGATGAAGAGAAATCAAGTAGCAAGCCCTCAAATAATGCAAAGGATGAG
890-915 D R E A N E R K K K D E E K S S S K P S N N A K D E
TGCAGTGAATTTGAAACTATATAAGGAACAATGAACTCATCTGCCCTAGAGAGAATGACCCAGTGCACGGTGTCTGAT
916-941 C S E F R N Y I R N N E L I C P R E N D P V H G A D
GGAAAGTTCTATACAAACAAGTGCTACATGTGCAGAGCTGTCTT
942-955 G K F Y T N K C Y M C R A V

```

b

```

GATCGAGAAGCTAATGAAAGAAAAAGAAAGATGAAGAGAAATCAAGTAGCAAGCCCTCAAATAATGCAAAGGTTATT
890-915 D R E A N E R K K K D E E K S S S K P S N N A K V I
TATTAAaggataccaaaataaccattttacttttcaccttcagaattttgcattcttctccagctttgggaataataa
916 Y * _ _
atatattaatatcttaact

```

c

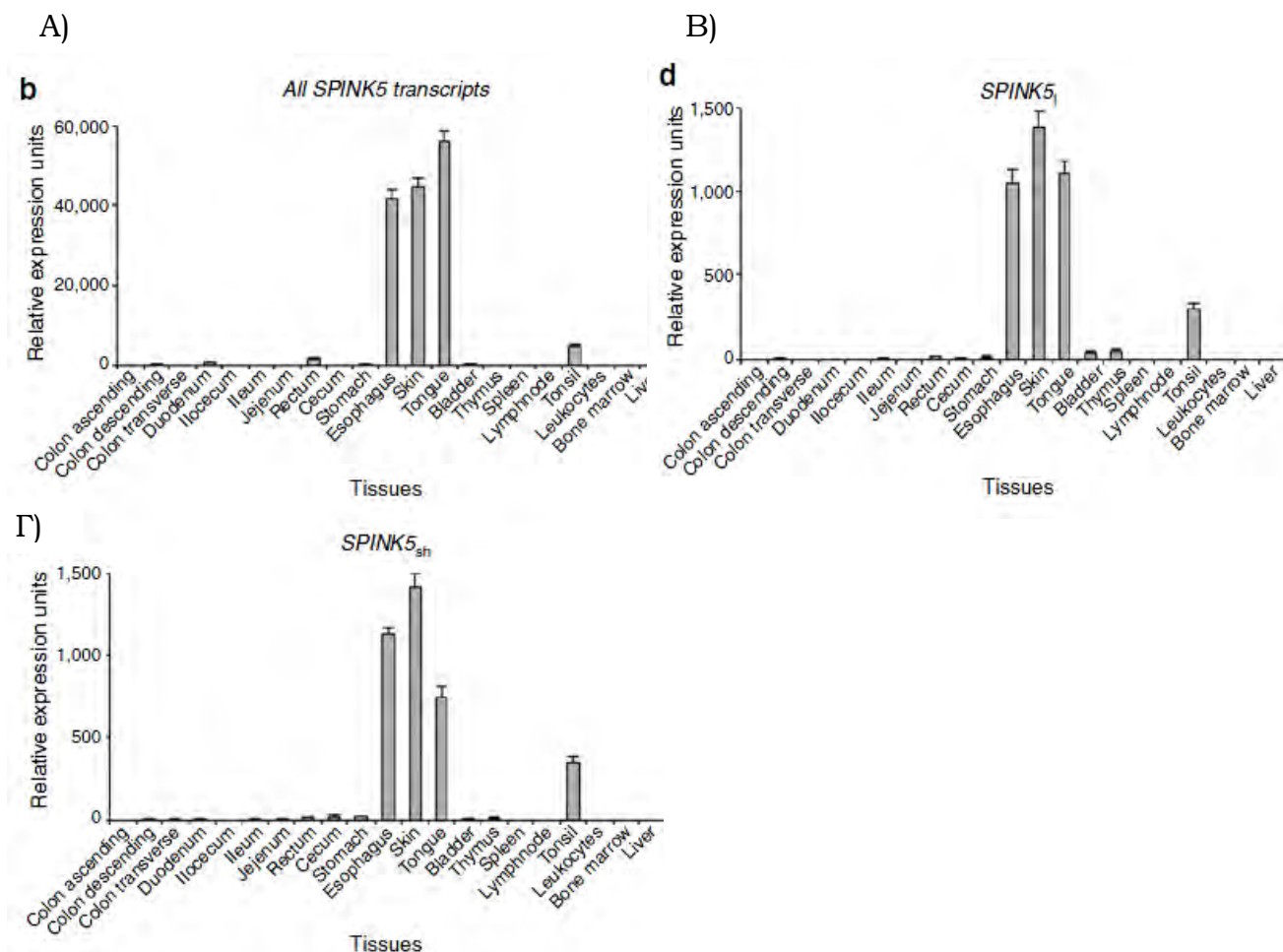
```

GATCGAGAAGCTAATGAAAGAAAAAGAAAGATGAAGAGAAATCAAGTAGCAAGCCCTCAAATAATGCAAAGGACCAG
890-915 D R E A N E R K K K D E E K S S S K P S N N A K D Q
TGCAGACAGGTTTCAAGTGAAGCAGAGGATGCAAAATTTAGACAACCTGGGCGTTCCTTGGCCTCTGTTGCCAGGATG
916-941 C R Q V Q N E A E D A K F R Q P G R S L A S V A R M
AGTACAGATGAGTGCAGTGAATTTGAAACTATATAAGGAACAATGAACTCATCTGCCCTAGAGAGAATGACCCAGTG
942-967 S T D E C S E F R N Y I R N N E L I C P R E N D P V
CACGGTGTCTGATGAAAGTTCTATACAAACAAGTGCTACATGTGCAGAGCTGTCTT
968-985 H G A D G K F Y T N K C Y M C R A V

```

Εικόνα 3. Τα εναλλακτικά μετάγραφα του *SPINK5*. Απεικονίζονται τμήματα των cDNAs των εναλλακτικών μεταγράφων, τα οποία απομονώθηκαν από ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, και οι αντίστοιχες προβλεπόμενες αλληλουχίες των ισομορφών της LEKTI. (a) το μετάγραφο *SPINK5f-1*, (b) το μετάγραφο *SPINK5sh* και (c) το μετάγραφο *SPINK5l*. Η κοινή αλληλουχία όλων των μεταγράφων-ισομορφών παρουσιάζεται με πράσινο, η κοινή αλληλουχία των ισομορφών *SPINK5f-1* και *SPINK5l*, που όμως δεν υπάρχει στο *SPINK5sh*, παρουσιάζεται με μπλε και με ροζ φαίνεται η ένθεση των 90bp στο εναλλακτικό μετάγραφο *SPINK5l*. Με κίτρινο φαίνονται τα νέα κωδικόνια που προκύπτουν στο μετάγραφο *SPINK5sh* και με έντονα γράμματα η κρυπτική θέση πολυαδενυλίωσης (Tartaglia-Polcini et al, 2006).

Το *SPINK5* εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο δέρμα, τη γλώσσα και τον οισοφάγο. Επιπλέον, μετάγραφα του *SPINK5* εντοπίζονται στις αμυγδαλές, το δωδεκαδάκτυλο, την ουροδόχο κύστη, το ορθό, το στομάχι, το κόλον και το θύμο καθώς και, σε μικρότερο βαθμό, στην νήσιδα και τον ειλέο. Αντίθετα, μετάγραφα δεν έχουν ανιχνευθεί στο μυελό των οστών, στους λεμφαδένες, σε λευκά αιμοσφαίρια, στο σπλήνα και στο ήπαρ. Τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα *SPINK5f-1*, *SPINK5sh* και *SPINK5l* παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στους ιστούς, υποδεικνύοντας κοινό πρότυπο εναλλακτικού ματίσματος (Tartaglia-Polcini et al, 2006) (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Τα επίπεδα έκφρασης των τριών εναλλακτικών μεταγράφων του *SPINK5* σε διάφορους ιστούς. α) όλα τα μεταγράφα του *SPINK5*, β) μεταγράφο *SPINK5l* και γ) μεταγράφο *SPINK5sh*. Τα επίπεδα έκφρασης του *SPINK5f-1* συνάγονται από το άθροισμα των *SPINK5l* και *SPINK5sh* σε σχέση με τα επίπεδα όλων των εναλλακτικών μεταγράφων. Τα τρία μεταγράφα παρουσιάζουν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στους ιστούς ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *SPINK5f-1* είναι περίπου 40πλάσια από αυτά των *SPINK5l* και *SPINK5sh* (Tartaglia-Polcini et al, 2006).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *SPINK5*

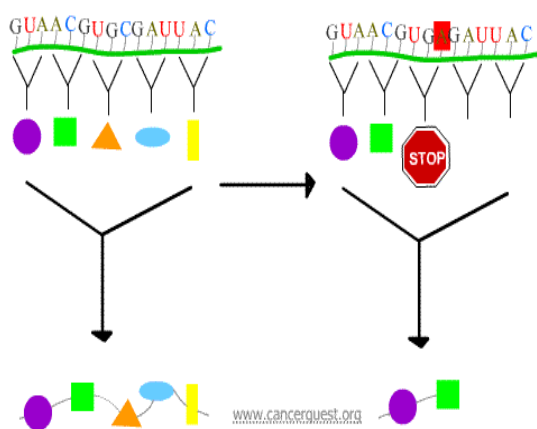
Η αρχική ταυτοποίηση του υπεύθυνου γονιδίου για το σύνδρομο Netherton βασίστηκε στον εντοπισμό των μεταγράφων του γονιδίου *SPINK5* σε επιδερμικά κύτταρα ασθενών. Η ελαττωμένη έκφρασή του σε σχέση με την έκφραση του *SPINK5* στο δείγμα ελέγχου οδήγησε στη μετέπειτα διερεύνηση της αλληλουχίας του γονιδίου *SPINK5* για την ανεύρεση μεταλλάξεων που προκαλούν τον παθολογικό φαινότυπο.

Στη βιβλιογραφία, έχουν αναφερθεί έως τώρα περισσότερες από 60 μεταλλάξεις, κατανομημένες τόσο σε εξώνια όσο και σε ιντρονιακές περιοχές. Αυτές οι μεταλλάξεις συναντώνται από το εξώνιο 1 έως το εξώνιο 27 και σχεδόν όλες οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης με συνέπεια την παραγωγή μικρότερου μήκους πρωτεΐνης. Επιπλέον,

φαίνεται πως δεν υπάρχουν μεταλλάξεις που συναντώνται μόνο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Παρόλη τη μελέτη των μεταλλάξεων που φέρουν οι ασθενείς και του κλινικού τους φαινοτύπου, δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμα η συσχέτιση μεταξύ φαινοτύπου-γονοτύπου και ούτε και μεταξύ της κάθε μετάλλαξης και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων που θα εμφανίσει ο κάθε ασθενής.

Στη συνέχεια αναλύονται όλες οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί έως τώρα, κατηγοριοποιημένες βάσει του αποτελέσματός τους στο προϊόν του γονιδίου καθώς και ο αντίστοιχος φαινότυπος των ασθενών (Εικ. 22). Η αρίθμηση που αναφέρεται στις μεταλλάξεις, αφορά είτε το cDNA του *SPINK5*, θεωρώντας ως +1 την αδενίνη του κωδικόνιου έναρξης της μετάφρασης ATG, είτε την πρωτεΐνη LEKTI.

Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις



Ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη ονομάζεται η σημειακή μετάλλαξη που οδηγεί στην εμφάνιση πρόωρου κωδικονίου λήξης με αποτέλεσμα την παραγωγή μίας πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους από το φυσιολογικό (Εικ. 5).

Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση μίας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης (<http://www.genetics-dj.com/vb/showthread.php?t=1867>).

1. Q46X

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 3

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 238insG (εξώνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 5 ετών, εμφάνιζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας σώματος μεγαλύτερο του 30%, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), μετεμβρυϊκή αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία και αλλεργικές αντιδράσεις (Sprecher *et al*, 2001).

2. G103X

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2017del19 (εξώνιο 22)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής ήταν 16 ετών (Γερμανο-Ιρλανδός) και εμφάνιζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας σώματος μικρότερο του 30%, ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίκας, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), μετεμβρυϊκή

υπερνατρίαζα προκαλούμενη από αφυδάτωση και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

3. C628T

Εναλλακτική ονομασία: R210X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 8

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. C628T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 3

Ο πρώτος, 12 ετών, έπασχε από ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και παρουσίαζε trichorrhexis invaginata και υψηλά επίπεδα ανοσοαφαιρίνης E (IgE) (Di *et al*, 2009). Ο δεύτερος ασθενής, 8 ετών από το Πακιστάν, είχε εξανθήματα σαν έκζεμα και επίμονο κνησμό. Επίσης, έπασχε από μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και trichorrhexis invaginata (Bitoun *et al*, 2002). Ο τρίτος ασθενής, 17 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, υψηλά επίπεδα ανοσοαφαιρίνης E (IgE) και πολλαπλές αλλεργίες (Ong *et al*, 2004).

4. C649T

Εναλλακτική ονομασία: R217X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 8

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 691delC (εξώνιο 9)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Εβραίος Ασκενάζι) παρουσίαζε μεγάλες ερυθρηματώδεις πλάκες, trichorrhexis invaginata και υψηλά επίπεδα ανοσοαφαιρίνης E (IgE) (Sprecher *et al*, 2004).

B. 957_960dup-TGGT (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 12 ετών, είχε παρουσιάσει γενικευμένο ερύθημα κατά τη βρεφική ηλικία, το οποίο στη συνέχεια υποχώρησε. Στη συνέχεια εμφάνισε αμινοξυουρία, ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, υψηλά επίπεδα ανοσοαφαιρίνης E (IgE), ένα αλλεργικό επεισόδιο και μερική ανεπάρκεια βιοτίνης (Alpigiani *et al*, 2012).

Γ. 238insG (εξώνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 15 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, ατοπική δερματίτιδα, υψηλά επίπεδα ανοσοαφαιρίνης E (IgE), επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002).

5. R218X

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 8

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 2240+1 G>A (ιντρόνιο 23)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Βορειο-Ευρωπαίος), 13 ετών, παρουσίαζε γενικευμένο ερύθημα με απολέπιση και έκζεμα, σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και μετεμβρυϊκή αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία. Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, αδυναμία ανάπτυξης κατά τη βρεφική ηλικία και καθυστερημένη ανάπτυξη, εντεροπάθειες και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

6. 997C>T

Εναλλακτική ονομασία: Gln333X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 11

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 997C>T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 8

Οι ασθενείς (Τούρκοι) προέρχονταν από γονείς που είχαν συγγένεια μεταξύ τους. Ο ένας ασθενής εκ των οχτώ απεβίωσε. Οι υπόλοιποι ασθενείς έπασχαν από σοβαρή ατοπική δερματίτιδα, ερυθρηματώδεις και ερπητικές πλάκες καθώς και μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία. Επιπρόσθετα, εμφάνιζαν trichorrhexis invaginata (Fong *et al*, 2011).

7. R350X

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 12

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. R350X (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής προερχόταν από γονείς με συγγένεια μεταξύ τους. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κλινική εικόνα του ασθενούς (Macknet *et al*, 2008).

8. 1111C>T

Εναλλακτική ονομασία: R371X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 13

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 81 + 2T>A (ιντρόνιο 2)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Άγγλος), 37 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αλλεργική ρινίτιδα, επίμονο κνησμό, αγγειο-οίδημα και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Bitoun *et al*, 2002).

B. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο ένας ασθενής (Γάλλος), 10 ετών, εμφάνιζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), αγγειο-οίδημα και άσθμα. Ο δεύτερος ασθενής (Γάλλος), 2ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata,

εξανθήματα σαν έκζεμα, τροφικές αλλεργίες και άσθμα (Lacroix *et al*, 2012).

Γ. 1036insG(A)4 (εξώνιο 12)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Αγγλος), 8 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα, αγγειο-οίδημα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αδυναμία ανάπτυξης στη νεογνική ηλικία και μετέπειτα καθυστέρηση στην ανάπτυξη, εντεροπάθειες και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Bitoun *et al*, 2002).

Δ. 2041delAG (εξώνιο 22)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 8 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα, αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και ηπερηωσινοφιλία. Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επίμονο κνησμό και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Bitoun *et al*, 2002).

9. 1621G>T

Εναλλακτική ονομασία: E541X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 18

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 375delAT (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 2

Οι ασθενείς (Ιάπωνες), 17 και 18 ετών (αδέρφια) γεννήθηκαν με σοβαρή ερυθροδερμία και υπέφεραν από ανισορροπία στη θερμοκρασία του σώματος, αφυδάτωση και δερματικές μολύνσεις. Στη συνέχεια, παρουσίασαν, γενικευμένο ερύθημα με απολέπιση, trichorrhexis invaginata και αλλεργικές αντιδράσεις (Komatsu *et al*, 2002).

10. R578X

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 19

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Γερμανός), 55 ετών, εμφάνιζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας σώματος μεγαλύτερο του 30%, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίκας και αλλεργίες (Bitoun *et al*, 2002).

11. 1732C>T

Εναλλακτική ονομασία: Arg578X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 19

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 1732C>T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Καυκάσιος), 13 ετών, παρουσίαζε μέτριας σοβαρότητας δερματικό φαινότυπο και trichorrhexis invaginata (Hachem *et al*, 2006).

12. 2098G>T

Εναλλακτική ονομασία: G700X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 22

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 410+1G>A (ιντρόνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 1 έτους, έπασχε από συγγενή ιχθύωση και εμφάνιζε trichorrhexis invaginata, έκζεμα, και τροφικές αλλεργίες. Ο ασθενής παρουσίαζε καθυστέρηση στην ανάπτυξη κατά τη νεογνική ηλικία και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Renner *et al*, 2009).

13. 2137C>T

Εναλλακτική ονομασία: Q713X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 23

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. C2368T (εξώνιο 25)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο ένας ασθενής (Ιάπωνας), 2 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, η οποία στη συνέχεια εξελίχθηκε σε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και ακάνθωση με αποκόλληση της παρακερατώδους κεράτινης στοιβάδας. Ο δεύτερος ασθενής (Ιάπωνας), 2 μηνών, παρουσίαζε ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, με νησίδες φυσιολογικού δέρματος. Οι τρίχες της κεφαλής του ήταν αραιές, δεν παρουσίαζαν όμως trichorrhexis invaginata (Shimomura *et al*, 2005).

14. 2260A>T

Εναλλακτική ονομασία: K754X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 24

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 2260A>T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο πρώτος ασθενής (Ταϊβανός), 41 ημερών, εμφάνιζε γενικευμένες ερυθρηματώδεις κηλίδες σε ολόκληρο το σώμα, αλλεργικές αντιδράσεις, πνευμονία και βρογχοπνευμονία, ιγμορίτιδα, επιπεφυκίτιδα, ωτίτιδα και μολυσματικό κηρίο. Επίσης, ήταν αυξημένα τα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) του στον ορό και είχε trichorrhexis invaginata. Ο δεύτερος ασθενής (Ταϊβανός), παρουσίαζε γενικευμένη ερυθροδερμία με απολέπιση, trichorrhexis invaginata, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Chao *et al*, 2005).

B. 2468delA (εξώνιο 26)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής εμφάνιζε trichorrhexis invaginata και έπασχε από συγγενή ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (Chao *et al*, 2003).

15. C2368T

Εναλλακτική ονομασία: R790X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 25

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. C2368T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 5

Για τον πρώτο ασθενή δεν διατίθεται κάποια πληροφορία σχετικά με τον κλινικό του φαινότυπο (Komatsu *et al*, 2008) ενώ για το δεύτερο είναι γνωστή μόνο η εμφάνιση ήπιου δερματικού φαινότυπου (Komatsu *et al*, 2008). Ο τρίτος ασθενής, 7 ετών, παρουσίαζε λεικηνοποίηση στις αρθρώσεις, υπερηωσινοφιλία, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και περιστασιακά ερυθροδερμία (Chavanas *et al*, 2000b). Οι άλλοι δύο ασθενείς (Ιάπωνες), 29 και 24 ετών, εμφάνιζαν ερυθροδερμία και μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία σε όλο τους το σώμα, trichorhexis invaginata και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Ο 24χρονος ασθενής παρουσίαζε και γλαύκωμα (Hosomi *et al*, 2008).

B. C2423T (εξώνιο 25)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ταϊβανός), 8 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και trichorhexis invaginata ενώ υπέφερε από ωτίτιδες και σημηγματόρροια (Lin *et al*, 2007).

Γ. 1220+1G>C (ιντρόνιο 13)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιάπωνας), 6 μηνών, παρουσίαζε γενικευμένη ερυθροδερμία κατά τη γέννηση και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) ενώ στη συνέχεια εμφάνισε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία εντοπισμένη στις παλάμες και τις πατούσες του, trichorhexis invaginata, αμινοξυουρία και αλλεργίες (Mizuno *et al*, 2005).

Δ. 398delTG (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 2

Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την κλινική τους εικόνα (Raghunath *et al*, 2004).

E. 377delAT (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο ασθενής (Ιάπωνας), 4 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, επίμονο κνησμό, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία και καθυστέρηση στην ανάπτυξη κατά τη νεογνική ηλικία (Bitoun *et al*, 2002). Ο ασθενής (Ιάπωνας), 17 ετών, εμφάνιζε γενικευμένη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorhexis nodosa, καθυστέρηση στην ανάπτυξη και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (Ishida-Yamamoto *et al*, 2005).

16. 2557C>T

Εναλλακτική ονομασία: Arg853X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 27

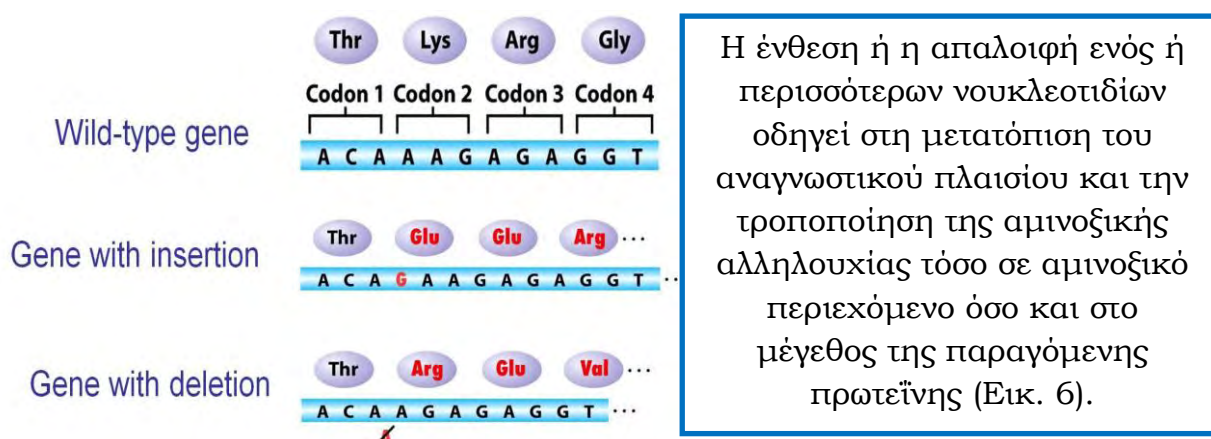
Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 13 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), ηπερρωσινοφιλία, εξανθήματα σαν έκζεμα, αγγειο-οίδημα και άσθμα (Lacroix *et al*, 2012).

Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση μεταλλάξεων που προκαλούν τροποποίηση του αναγνωστικού πλαισίου (<http://www.studyblue.com/notes/note/n/bio-340-exam-3-prep/deck/761340>)

1. 153delT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 3

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 153delT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 11

Τρεις ασθενείς ταυτοποιήθηκαν σε 3 οικογένειες από την Τουρκία. Οι γονείς ήταν συγγενείς μεταξύ τους. Και οι 3 οικογένειες είχαν από ένα παιδί που απεβίωσε σε χρόνο που κυμαινόταν από 11 ημέρες έως το αργότερο 3 μήνες από τη γέννησή του. Τα παιδιά απεβίωσαν είτε από σήψη προκαλούμενη από μόλυνση με το μύκητα *Candida albicans* (3 μηνών) είτε από υπερνατρίαζία και μεταβολική οξέωση (11 ημερών) είτε από σηπτικό σοκ (2 μηνών) (Bitoun *et al*, 2002).

Για δύο από τους ασθενείς δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κλινική τους εικόνα (Chavanas *et al*, 2000b). Επίσης, έχουν αναφερθεί άλλοι 4 ομόζυγοι ασθενείς από την Τουρκία. Οι 3 από αυτούς απεβίωσαν κατά τη νεογνική ηλικία είτε λόγω αφυδάτωσης είτε λόγω σήψης. Ο τέταρτος, ένα αγοράκι 11 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, ατοπική δερματίτιδα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και ηπερρωσινοφιλία. Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από

επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη κατά τη βρεφική ηλικία και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Bitoun *et al*, 2002). Ένας άλλος ασθενής, εμφάνιζε αποφολιδωτική ερυθροδερμία με θανατηφόρα έκβαση σε ηλικία 4 μηνών (Müller *et al*, 2002). Τέλος, ο ενδέκατος ασθενής, 7 ετών, εμφάνιζε ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, έκζεμα, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και πολλαπλές αλλεργίες (Ong *et al*, 2004).

B. 81 + 2T>A (ιντρόνιο 2)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Κοσοβάρος), 12 ετών, εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE), αλλεργική ρινίτιδα και αγγειο-οίδημα. Επιπλέον, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία, επίμονο κνησμό και καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Τέλος, ο ασθενής έπασχε και από εντεροπάθειες.

Γ. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο πρώτος ασθενής (Κοσοβάρος), 26 ετών, εμφάνιζε trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και εξανθήματα σαν έκζεμα. Ο δεύτερος ασθενής (Κοσοβάρος), 10 μηνών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, έκζεμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), υπερηωσινοφιλία και αλλεργίες σε τρόφιμα (Lacroix *et al*, 2012).

2. 238insG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 4

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 238insG (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 5

Για τον έναν ασθενή δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την κλινική του εικόνα (Chavanas *et al*, 2000b). Δύο άλλοι ασθενείς απεβίωσαν κατά τους πρώτους μήνες ζωής. Ένας ασθενής (Πορτορικανός), 8 ετών, παρουσίαζε γενικευμένο ερύθημα με απολέπιση και έκζεμα και σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίκας. Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη και εντεροπάθειες. Ο τελευταίος ασθενής (Ιρανός), 3 ετών, έπασχε από μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίκας, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) αδυναμία ανάπτυξης κατά τη βρεφική ηλικία αλλεργικές αντιδράσεις (Bingol *et al*, 2011).

B. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Γάλλος), 12 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα, ατοπική δερματίτιδα, αγγειο-οίδημα, αλλεργική ρινίτιδα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και υπερηωσινοφιλία. Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, καθυστέρηση της ανάπτυξης, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία, επίμονο κνησμό και εντεροπάθειες (Bitoun *et al*, 2002).

Γ. C649T (εξώνιο 8)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιταλός), 15 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, ατοπική δερματίτιδα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002).

Δ. Q46X (εξώνιο 3)

Αριθμός ασθενών: 1

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς περιγράφονται στη μετάλλαξη Q46X, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

E. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 3

Ο πρώτος ασθενής (Ελληνας), 5 ετών, εμφάνιζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, έκζεμα και αλλεργίες σε τρόφιμα. Ο δεύτερος ασθενής (Ελληνας), 9 μηνών, έπασχε από μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, έκζεμα, αλλεργικές αντιδράσεις σε τρόφιμα και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Ο τρίτος ασθενής (Ελληνας), 12 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, έκζεμα, αλλεργίες σε τρόφιμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), επίμονο κνησμό, αγγειόδερμα και άσθμα (Lacroix *et al*, 2012).

3. 316_317delAG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 2240+1G>A (ιντρόνιο 23)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Καυκάσιος), 7 ετών, παρουσίαζε μέτριας σοβαρότητας δερματικό φαινότυπο (Hachem *et al*, 2006).

3. 354_357delTTGT

Εναλλακτική ονομασία: C119AfsX25

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 1431-12G>A (ιντρόνιο 15)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 6 μηνών, έπασχε από εκ γενετής ιχθύωση, trichorrhexis invaginata, τροφικές αλλεργίες, έκζεμα, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατρίαζια και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Renner *et al*, 2009).

4. 375delAT

Εναλλακτική ονομασία: Y126X

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 375delAT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Τούρκος) εμφάνιζε αποφολιδωτική ερυθροδερμία με θανατηφόρα έκβαση σε ηλικία 4 μηνών (Müller *et al*, 2002).

B. 966insC (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιάπωνας), 6 ημερών, εμφάνιζε trichorrhexis invaginata. ερυθροδερμία κατά τη γέννηση και μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (Mizuno *et al*, 2006).

Γ. 1621G>T (εξώνιο 18)

Αριθμός ασθενών: 2

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στη μετάλλαξη 1621G>T, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

Δ. C2368T (εξώνιο 25)

Αριθμός ασθενών: 2

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στη μετάλλαξη C2368T, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

Ε. 2473-4delGA

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 2,5 ετών, έπασχε από εκ γενετής ιχθύωση, trichorrhexis invaginata, έκζεμα, τροφικές αλλεργίες, λοιμώξεις, σήψη και αδυναμία ανάπτυξης (Renner *et al*, 2009).

5. 391insCGTG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 391insCGTG (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Δομίνικος), 18 ετών, παρουσίαζε συγγενή ιχθυόμορφη ερυθροδερμία, σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστερημένη ανάπτυξη, εντεροπάθειες και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

6. 392insGTG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 2264insA (εξώνιο 24)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Αφροαμερικάνος), 17 ετών, παρουσίαζε συγγενή ιχθυόμορφη ερυθροδερμία, σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επιπλέον, υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστερημένη ανάπτυξη και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

7. 398delTG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 5

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. C2368T (εξώνιο 25)

Αριθμός ασθενών: 2

Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την κλινική τους εικόνα (Raghunath *et al*, 2004).

8. 462insGT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 5*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 462insGT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Καυκάσιος), 38 ετών, παρουσίαζε σοβαρό δερματικό φαινότυπο και trichorrhexis invaginata (Hachem *et al*, 2006).

9. 581_82delGT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 7*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 581_82delGT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 2

Οι ασθενείς, δίδυμα αδέρφια, είχαν υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σοβαρές τροφικές αλλεργίες και trichorrhexis invaginata. Επίσης, εμφάνιζαν γενικευμένο ερύθημα με ανθεκτικές εκζεματώδεις αλλοιώσεις (Kilic *et al*, 2006).

10. 691delC

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 9*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. C649T (εξώνιο 8)

Αριθμός ασθενών: 1

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς περιγράφονται στη μετάλλαξη C649T, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

11. 715insT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 9*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 715insT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Raghunath *et al*, 2004).

12. 720insT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 9*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 720insT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000b).

13. 966insC

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 11*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 375delAT (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί παραπάνω, στη μετάλλαξη 375delAT, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

14. 1024ins5

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 11

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 81+2 A>T (ιντρόνιο 2)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Βορειο-Ευρωπαίος), 13 ετών, παρουσίαζε γενικευμένο ερύθημα με απολέπιση και έκζεμα, ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και μετεμβρυϊκή νατριαιμία προκαλούμενη από αφυδάτωση. Επίσης, υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, εντεροπάθειες και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

15. 1036insG(A)4

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 12

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 1111C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Αγγλος), 8 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα, αγγειο-οίδημα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, εντεροπάθειες και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Bitoun *et al*, 2002).

16. 1086delAT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 12

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 1086delAT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κλινική εικόνα του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000b).

17. 1346_1352insT

Εναλλακτική ονομασία: C451LfsX5

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 15

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 1346_1352insT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 3 ετών, παρουσίαζε έκζεμα και καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Επιπλέον, έπασχε από πνευμονία, σήψη και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Renner *et al*, 2009).

18. 2041delAG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 22

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 1111C>T (εξώνιο 13)

Αριθμός ασθενών: 1

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς περιγράφονται στη μετάλλαξη 1111C>T, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

19. 2258insG

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 24

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 81G>A (εξώνιο 2)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000).

20. 2264insA

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 24

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 392insGTG (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί παραπάνω, στη μετάλλαξη 392insGTG, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

B. 475-2 A>G (ιντρόνιο 6)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Βορειο-Ευρωπαίος), 5 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας του σώματός του, μεγαλύτερο του 30% καθώς και ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίκας. Βρέθηκε να έχει σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), αλλεργικές αντιδράσεις και συστηματικές μολύνσεις. Τέλος, αντιμετώπιζε μετεμβρυϊκή αναπτυξιακή καθυστέρηση (Bitoun *et al*, 2002).

21. 2468insA

Εναλλακτική ονομασία: 2458insA

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 26

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 2468insA (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 9

Για επτά από τους ασθενείς δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο (Chavanas *et al*, 2000b, Raghunath *et al*, 2004 και Ishida-Yamamoto *et al*, 2005). Ο ένας ασθενής (Πακιστανός), 2 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata και υπερνατριαιμική αφυδάτωση. Τέλος, ο ασθενής υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, εντεροπάθειες και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002). Ο δεύτερος ασθενής, 5 ετών, εμφάνιζε trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), και πολλαπλές αλλεργίες (Ong *et al*, 2004).

B. 283-2A>T (ιντρόνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000b).

Γ. 1432-13 G>A (ιντρόνιο 15)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Raghunath *et al*, 2004).

22. 2468delA

Εναλλακτική ονομασία: 2458delA

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 26

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 2468delA (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 2

Ο ένας ασθενής, 6 ετών, παρουσίαζε εκ γενετής ιχθύωση, trichorrhexis invaginata, έκζεμα, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αλλεργική ρινίτιδα, άσθμα και τροφικές αλλεργίες. Επίσης, έπασχε από πνευμονία, λοιμώξεις και καθυστέρηση της ανάπτυξης. Ο δεύτερος ασθενής, 7 ετών, εμφάνιζε εκ γενετής ιχθύωση, trichorrhexis invaginata και λοιμώξεις (Renner *et al*, 2009).

B. 2260A>T (εξώνιο 24)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ταϊβανός), 7 ετών, εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata και μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία (Chao *et al*, 2003).

Γ. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 2

Ο ασθενής, 7 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επιπλέον, έπασχε από υψηλό πυρετό, λοιμώξεις, κνίδωση, αδυναμία ανάπτυξης κατά τη νεογνική ηλικία και μετέπειτα καθυστέρηση της ανάπτυξης. Ο δεύτερος ασθενής εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE), υψηλό πυρετό, υπερηωσινοφιλία, άσθμα και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002).

Δ. 1608-1G>A (ιντρόνιο 17)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 8 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, επίμονο κνησμό, καθυστέρηση της ανάπτυξης και εντεροπάθειες (Bitoun *et al*, 2002).

23. 2473-4delGA

Εναλλακτική ονομασία: E825GfsX1

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 26

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 375delAT (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 375delAT, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

24. 2579del9

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 27*

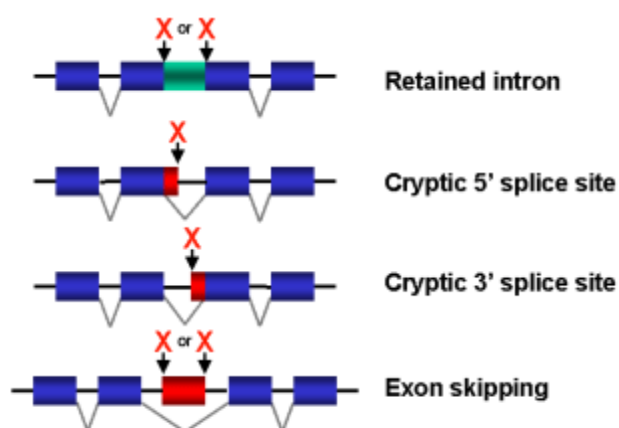
Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 1888-1G>A (ιντρώνιο 20)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Αγγλο-Ιταλός) παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας σώματος μεγαλύτερο του 30%, σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας, σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), συστηματικές λοιμώξεις και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το Splicing



Μεταλλάξεις που συμβαίνουν είτε στις συντηρημένες θέσεις splicing είτε σε συντηρημένα μοτίβα σε ιντρονιακές περιοχές μπορούν να οδηγήσουν στη διατήρηση όλου ή τμήματος του ιντρονίου ή ακόμα και να οδηγήσουν στην παράληψη ενός εξωνίου κατά το splicing (Εικ. 7).

X - mutation in 5' or 3' splice site

Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση μεταλλάξεων που τροποποιούν το splicing (<http://www.scri.ac.uk/research/genetics/Genesanddevelopment/geneexpression/plantpre-mRNAsplicing/exondefinition>).

1. 56G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 1*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Κινέζος), 4 ετών, εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από

επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002).

2. 81G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Εξώνιο 2

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2258insG (εξώνιο 24)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000b).

3. 81 + 2T>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Ιντρόνιο 2

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 81 + 2T>A (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Βορειο-Ευρωπαίος), 12 ετών, εμφάνιζε γενικευμένο ερύθημα με απολέπιση ή έκζεμα, σοβαρές ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και μετεμβρυϊκή υπερνατριαιμική αφυδάτωση. Τέλος, ο ασθενής υπέφερε από συστηματικές λοιμώξεις, καθυστέρηση της ανάπτυξης, εντεροπάθειες και αλλεργικές αντιδράσεις (Bitoun *et al*, 2002).

B. 1111C>T (εξώνιο 13)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Άγγλος), 37 ετών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, εξανθήματα σαν έκζεμα και υψηλή συγκέντρωση ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αλλεργική ρινίτιδα, επίμονο κνησμό, αγγειο-οίδημα και καθυστέρηση της ανάπτυξης (Bitoun *et al*, 2002).

Γ. 153delT (εξώνιο 3)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 153delT, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

Δ. 1024ins5 (εξώνιο 12)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 1024ins5, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

4. 81 + 5G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Ιντρόνιο 2

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2240 + 1G>A (ιντρόνιο 23)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Γάλλος), 4 ετών, εμφάνιζε εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα και

υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατρίαζια και επίμονο κνησμό (Bitoun *et al*, 2002).

5. 209+1G>T

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 3*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 1302+4A>T (ιντρόνιο 14)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Καυκάσιος), 16 ετών, εμφάνιζε ήπιες σοβαρότητας δερματικό φαινότυπο (Hachem *et al*, 2006).

6. 282+1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 4*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 603+1G>A (ιντρόνιο 8)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 7 ετών, παρουσίαζε ιχθύωση εκ γενετής, trichorrhexis invaginata, ρινίτιδα, αλλεργικές αντιδράσεις σε τρόφιμα και πνευμονία (Renner *et al*, 2009).

7. 283-12T>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 4*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2468insA (εξώνιο 26)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ελληνας), 16 μηνών, έπασχε από φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), ηπερηωσινοφιλία και έκζεμα (Lacroix *et al*, 2012).

8. 283-2A>T

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 4*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2468insA (εξώνιο 26)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000b).

9. 410+1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 5*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ελληνας), έπασχε από εξανθήματα σαν έκζεμα, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata και αλλεργίες σε τρόφιμα (Lacroix *et al*, 2012).

B. 2098G>T (εξώνιο 22)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 1 έτους, έπασχε από συγγενή ιχθύωση. Επίσης, εμφάνιζε trichorrhexis invaginata, έκζεμα, και τροφικές αλλεργίες. Ο ασθενής παρουσίαζε καθυστέρηση της ανάπτυξης κατά τη νεογνική ηλικία και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία (Renner *et al*, 2009).

10. 475-2 A>G

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 6*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 2264insA (εξώνιο 24)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Βορειο-Ευρωπαίος), 5 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας του σώματός του, μεγαλύτερο του 30% καθώς και ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας. Επίσης είχε σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE), αλλεργικές αντιδράσεις και συστηματικές μολύνσεις. Τέλος, κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο παρουσίαζε καθυστέρηση της ανάπτυξης (Bitoun *et al*, 2002).

11. 603+1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 8*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 282+1G>A (ιντρόνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 282+1G>A, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Επηρεάζουν το Splicing*.

12. 882+1_882+3del

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 10*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Καυκάσιος), 39 ετών, εμφάνιζε σοβαρό δερματικό φαινότυπο και trichorrhexis invaginata (Hachem *et al*, 2006).

13. 891C>T

Εναλλακτική ονομασία: Cys297Cys

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 11*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 891C>T (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Σικελός), 3 ετών, παρουσίαζε ερυθρηματώδεις αλλοιώσεις, trichorrhexis invaginata, κνίδωση, αλλεργική ρινίτιδα, άσθμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Fortugno *et al*, 2012).

B. 153delT (εξώνιο 3)

Αριθμός ασθενών: 2

Η κλινική εικόνα των ασθενών έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 153delT, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

Γ. 238insG (εξώνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 3

Η κλινική εικόνα των ασθενών έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 238insG, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

Δ. 283-12T>A (ιντρόνιο 4)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Έλληνας), 16μηνών, εμφάνιζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και trichorrhexis invaginata (Lacroix *et al*, 2012).

Ε. 410+1G>A (ιντρόνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Έλληνας), 2 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα και τροφικές αλλεργίες (Lacroix *et al*, 2012).

ΣΤ. 1111C>T (εξώνιο 13)

Αριθμός ασθενών: 2

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στη μετάλλαξη 1111C>T, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

Z. 1820+53G>A (ιντρόνιο 19)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ολλανδός), 38 ετών παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και κνίδωση. Επιπλέον, έπασχε από αγγειο-οίδημα και άσθμα (Lacroix *et al*, 2012).

14. 1220+1 G>C

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Ιντρόνιο 13

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. C2368T (εξώνιο 25)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Ιάπωνας), 6 μηνών, παρουσίαζε γενικευμένη ερυθροδερμία κατά τη γέννηση και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) ενώ στη συνέχεια εμφάνισε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία εντοπισμένη στις παλάμες και τα πέλματα, trichorrhexis invaginata, αμινοξυουρία και αλλεργίες (Mizuno *et al*, 2005).

15. 1302+4A>T

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: Ιντρόνιο 14

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 209+1G>T (ιντρόνιο 3)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 209+1G>T, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Επηρεάζουν το Splicing*.

16. 1430+2T>G

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 15*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 1430+2T>G (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Κινέζος) παρουσίαζε πολλαπλές μορφές ανωμαλιών στην τρίχα καθώς και ερύθημα συνοδευόμενο από απολέπιση (Zhao *et al*, 2007).

17. 1431-12G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 15*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 1431-12G>A (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 5

Για τους δύο ομόζυγους ασθενείς δεν υπάρχουν πληροφορίες για το φαινότυπο (Raghunath *et al*, 2004) ενώ οι άλλοι τρεις απεβίωσαν. Η κλινική τους εικόνα περιελάμβανε αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατρίαζια, ανισορροπία σε ηλεκτρολύτες, επαναλαμβανόμενες ή σοβαρές λοιμώξεις και αδυναμία ανάπτυξης (Capri *et al*, 2011).

B. 354_357delTTGT (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 354_357delTTGT, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Επηρεάζουν το Splicing*.

Γ. 2468insA (εξώνιο 26)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Raghunath *et al*, 2004).

Δ. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής, 9 ετών, έπασχε από συγγενή ιχθύωση, trichorrhexis invaginata, ρινίτιδα, τροφικές αλλεργίες, αγγειο-οίδημα, έκζεμα, άσθμα και αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατρίαζια (Renner *et al*, 2009).

18. 1608-1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 17*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 2468delA (εξώνιο 26)

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Γάλλος), 8 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα, αλλεργική ρινίτιδα και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Επίσης, ο ασθενής υπέφερε από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις, εντεροπάθειες, επίμονο κνησμό και καθυστέρηση της ανάπτυξης (Bitoun *et al*, 2002).

19. 1820+53G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 19*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυσμό με:

A. 891C>T (εξώνιο 11)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 891C>T, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Επηρεάζουν το Splicing*.

20. 1888-1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 20*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. 1888-1G>A (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 2

Για τον έναν ασθενή δεν υπάρχουν πληροφορίες για την κλινική του εικόνα (Chavanas *et al*, 2000). Ο δεύτερος ασθενής (Ιταλός), 8 ετών, παρουσίαζε φολιδωτή ερυθροδερμία κατά τη γέννηση, trichorrhexis invaginata, εξανθήματα σαν έκζεμα, υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) και υπερηωσινοφιλία. Ο ασθενής υπέφερε από επίμονο κνησμό και παρουσίαζε καθυστέρηση της ανάπτυξης (Bitoun *et al*, 2002).

B. 2579del9 (εξώνιο 27)

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 2579del9, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

21. 2017del9

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 22*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. G103X (εξώνιο 5)

Αριθμός ασθενών: 1

Τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς περιγράφονται στη μετάλλαξη G103X, στην ενότητα *Ανερμηνεύσιμες Μεταλλάξεις*.

22. 2212+1 G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 22*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Ο ασθενής (Αργεντινός), 12 ετών, παρουσίαζε μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία και έκζεμα σε ποσοστό επιφάνειας σώματος μικρότερο του 30%, ήπιες ανωμαλίες στο στέλεχος της τρίχας και σχετικά υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE). Ο ασθενής υπέφερε από αφυδάτωση προκαλούμενη από υπερνατριαιμία μετά τη γέννηση, μετεμβρυϊκή καθυστέρηση της ανάπτυξης, συστηματικές λοιμώξεις και αλλεργίες (Bitoun *et al*, 2002).

23. 2240 + 1G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 23*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυασμό με:

A. δεν ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Άγγλος) (Bitoun *et al*, 2002).

B. 81 + 5G>A

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 81 + 5G>A, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Επηρεάζουν το Splicing*.

Γ. 316_317delAG

Αριθμός ασθενών: 1

Η κλινική εικόνα του ασθενούς έχει περιγραφεί νωρίτερα, στη μετάλλαξη 316_317delAG, στην ενότητα *Μεταλλάξεις που Προκαλούν Τροποποίηση του Αναγνωστικού Πλαισίου*.

24. 2313G>A

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Εξώνιο 24*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2313G>A (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 1

Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τον κλινικό φαινότυπο του ασθενούς (Chavanas *et al*, 2000).

25. 2441+3delGAGT

Εναλλακτική ονομασία: -

Θέση στο γονίδιο: *Ιντρόνιο 25*

Έχει ταυτοποιηθεί σε συνδυισμό με:

A. 2441+3delGAGT (δηλ. σε ομοζυγωτία)

Αριθμός ασθενών: 2

Οι ασθενείς (Τούρκοι) ήταν 6,5 και 1 ετών αντίστοιχα. Εμφάνιζαν trichorrhesis invaginata, μη πομφολυγώδη ιχθυασόμορφη ερυθροδερμία στον κορμό, διάχυτη απολέπιση στο τριχωτό της κεφαλής και υψηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (Tüysüz *et al*, 2010).

Άλλες κατηγορίες μεταλλάξεων

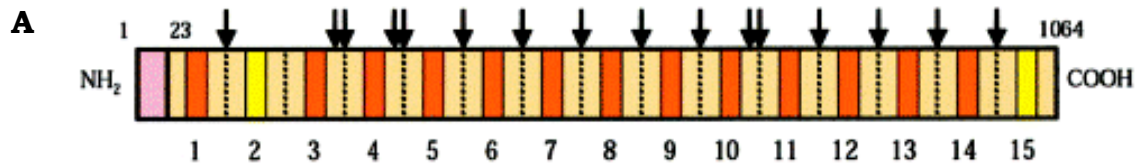
Σε έναν ασθενή 7 ετών, με μέτριας σοβαρότητας δερματικό φαινότυπο αναφέρθηκε η μετάλλαξη -19C>T, στην οποία μία κυτοσίνη αντικαθίσταται από μία θυμίνη 19 νουκλεοτίδια πριν το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (ATG), στην 5' μη-μεταφραζόμενη περιοχή. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν η -19C>T αποτελεί όντως μετάλλαξη ή πολυμορφισμό χωρίς λειτουργική επίπτωση (Hachem *et al*, 2006). Ωστόσο, η παραλλαγή T, που στην SNP database ονομάζεται ως -19G>A δεν έχει ταυτοποιηθεί σε ομοζυγωτία σε περισσότερα από 800 άτομα (rs12522603) γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της μετάλλαξης. Η γονοτύπωση του γονιδίου *SPINK5* στον ασθενή αυτό δεν αποκάλυψε μετάλλαξη στο άλλο αλληλόμορφο (Hachem *et al*, 2006).

Η πρωτεΐνη LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type-related Inhibitor)

Η LEKTI ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων πρωτεασών σερίνης τύπου Kazal. Η οικογένεια αυτή αριθμεί πολλά μέλη, που τα περισσότερα φέρουν 3 έως 7 διαδοχικές επικράτειες Kazal. Η LEKTI περιέχει ένα πεπτιδιο-σήμα έκκρισης και περιλαμβάνει 15 προβλεπόμενες επικράτειες με δράση αναστολής πρωτεασών σερίνης (D1-D15), οι οποίες διαχωρίζονται από 14 συνδετικά τμήματα. Σε αυτά τα τμήματα εντοπίζονται αρκετά κατάλοιπα, τα οποία πιθανώς είναι ευαίσθητα στη διάσπαση από κονβερτάσες του τύπου της σουμπτιλισίνης. Από τις 15 επικράτειες, μόνο οι D2 και η D15 φέρουν την αυστηρά συντηρημένη ακολουθία που χαρακτηρίζει έναν τυπικό αναστολέα πρωτεασών σερίνης τύπου Kazal, [C-(X)*n*-C-(X)7-C-(X)10-C-(X)2/3-C-(X)*m*-C], με το χαρακτηριστικό πρότυπο των έξι καταλοίπων κυστεΐνης (Εικ. 8). Οι άλλες 13 επικράτειες, παρόλο που εμφανίζουν υψηλή ομολογία με αυτή την τάξη αναστολέων, στερούνται μία από τις τρεις συντηρημένες δισουλφιδικές γέφυρες. Παρόλα αυτά, οι ακολουθίες αυτές έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν δομή φουρκέτας, δημιουργώντας έτσι μια ανασταλτική θηλιά πρόσδεσης (Deraison *et al*, 2007).

Η LEKTI εκφράζεται στις πιο διαφοροποιημένες στοιβάδες των στρωματοποιημένων επιθηλιακών ιστών και στα σωματίδια Hassal του θύμου αδένου. Στην επιδερμίδα, η LEKTI εντοπίζεται κυρίως στην κοκκιώδη στοιβάδα, όπου λαμβάνουν χώρα οι κρίσιμες βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές που οδηγούν στο σχηματισμό της κερατινής στοιβάδας (Deraison *et al*, 2007).

Σε φυσιολογικά ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, η LEKTI εκφράζεται σε τρεις πρόδρομες μορφές, οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό splicing που υφίσταται το πρόδρομο mRNA του *SPINK5* (βλ. παράγραφο *Το γονίδιο SPIKN5*). Η μία ισομορφή (145 kDa) περιέχει 15 επικράτειες, η δεύτερη ισομορφή (125 kDa) περιλαμβάνει τις πρώτες 13 επικράτειες και η τρίτη ισομορφή, μεγαλύτερου μοριακού βάρους (148 kDa), φέρει μία ένθεση 30 αμινοξικών καταλοίπων μεταξύ των ανασταλτικών επικρατειών 13 και 14 (Deraison *et al*, 2007) (Εικ. 9).



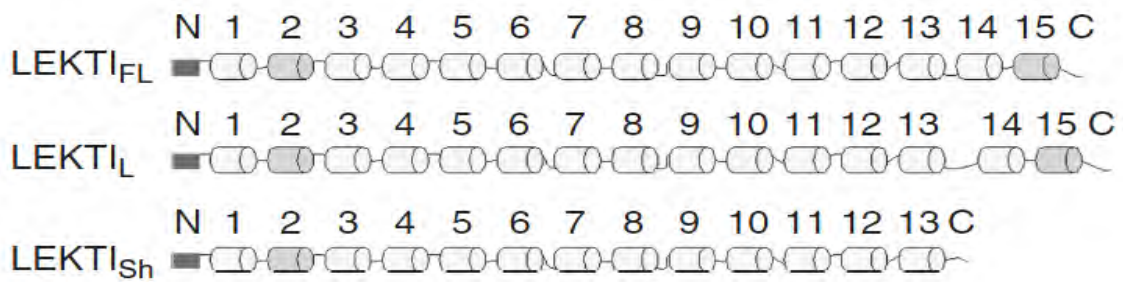
■ ; Kazal-type serine protease inhibitory domains
 LNCDDFFKKGERDGDPICPDYVEAVCGTDGKTYDNRCALCAENAKTGSQIGVKSEGE**C** (domain 2)
 XXCXXXXXXXXXXXXXXXXXXCXXXXXXXXXXCXXXXXXYXXXCXXCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX**C**

■ ; non Kazal-type serine protease inhibitory domains
 DT**C**DEFRRSQMKNGKLI**C**TRESDPVRGPDGKTHGNK**CTMCKEKL** (domain 12)
 XXCXXXXXXXXXXXXXXXXXXCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCXXCXXXX

B

		exon	
1	1	MKIATVSVLLPLALCLTQDAAS	22
1	23	KNEDQ	3 EKEAKSQKR
2	80	ARHLARAPKATAPTE	5-6 KSSNP
3	157	EQ	7 LKEAENAKR EGETRIRR
4	219	NAEK	9 KR RFSEENSKTDQNLGKAEETKVKR
5	292	EIV	11 QAENEKKAERARFNKR
6	356	ESGKATSYA	13 QAEEEEKKKCEGESRNKR
7	426	QSKSTASFE	15 QQERARAKAKR
8	490	EAAK	17 KLEEEKKNDEKKGKVEAEKVKR
9	561	EAVQ	19 QQEAKKERAEPRAKVKR
10	626	EAEK	21 QKENEER KR
11	682	KEEDQRNAAGHGSSGGGGNTQ	23 EREAERKNEYSR
12	760	SRSNGTGSSESGK	25 EREAEEKKKEDEDK
13	830	SNTGERSNTGERSNDKE	27 DREANER
14	897	KQDEEKSSSKPSNAK	29 LTEALERAQLQEKPSHVR
15	975	ASQEEDSPDSFSSLDS	31-2 EESSTPGTTAASMPPSDE

Εικόνα 8. Α) Οι 15 επικράτειες τύπου Kazal της LEKTI. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι συντηρημένες επικράτειες τύπου Kazal και με πορτοκαλί οι επικράτειες που διαφοροποιούνται. Φαίνονται δύο παραδείγματα της αμινοξικής ακολουθίας μιας επικράτειας τύπου Kazal και μίας που αποκλίνει από την αυστηρά συντηρημένη ακολουθία (non-Kazal). Στην επικράτεια τύπου Kazal υπάρχουν 6 κυστεΐνες που θα σχηματίσουν τις τρεις δισουλφιδικές γέφυρες ενώ στην επικράτεια non-Kazal υπάρχουν μόνο 4 κυστεΐνες, για το σχηματισμό των δύο δισουλφιδικών γεφυρών. Β) Αντιστοιχία των εξονίων του *SPINK5* (κέντρο) με τις επικράτειες της LEKTI που κωδικοποιούν (αριστερά) (Komatsu *et al*, 2002).



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών που περιέχονται σε κάθε ισομορφή της LEKTI (Fortugno *et al*, 2011).

Πρωτεόλυση και ενεργοποίηση της LEKTI

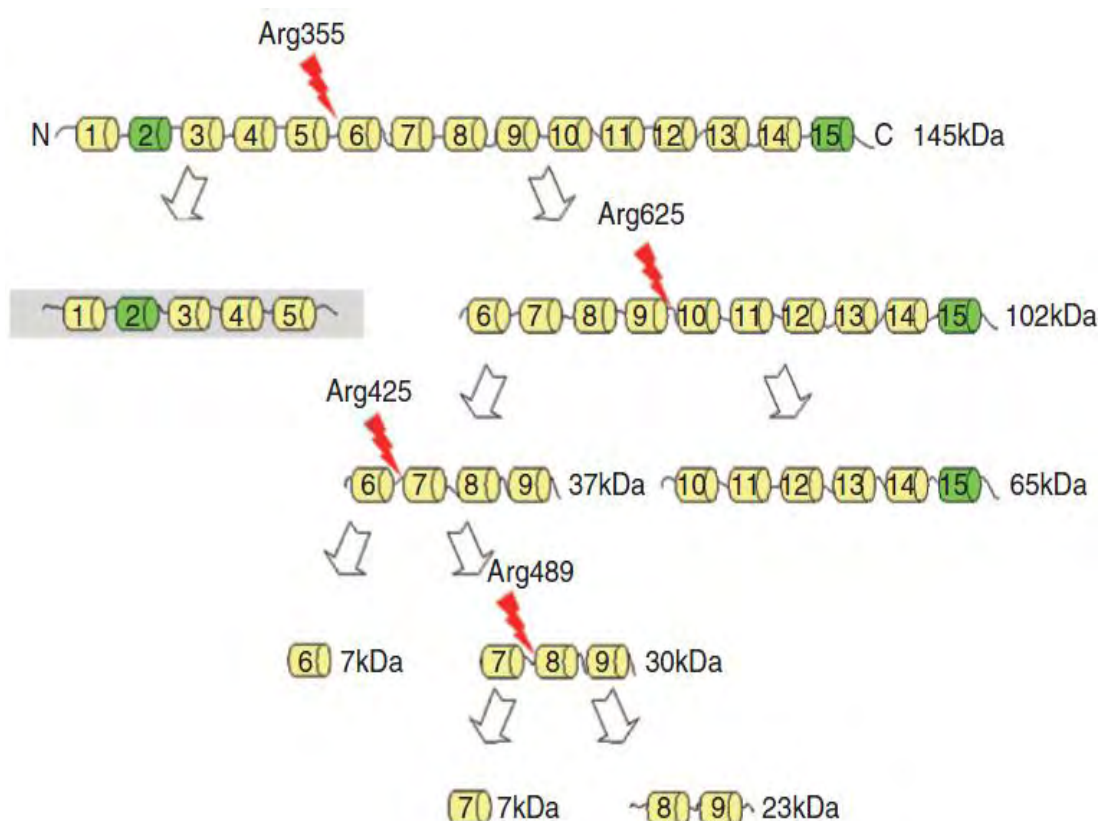
Η LEKTI αρχικά συντίθεται ως πρόδρομη πρωτεΐνη από διαφοροποιούμενα κερατινοκύτταρα των ακανθωτών ή κοκκιωδών στοιβάδων. Στη συνέχεια η LEKTI πρωτεολύεται από τη φουρίνη, παράγοντας πολυπεπτίδια που διαθέτουν είτε μία είτε περισσότερες επικράτειες. Τα πολυπεπτίδια αυτά, μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο, μεταξύ των κοκκιωδών και των κερατινοποιημένων κυττάρων, όπου αποτρέπουν την πρόωρη αποικοδόμηση των κορνεοδεσμοσωμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής πρωτεασών σερίνης, που εμπλέκονται στην απολέπιση του δέρματος, όπως είναι οι καλλικρεΐνες. Η προοδευτική μείωση του pH στην κεράτινη στοιβάδα, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενεργών καλλικρεϊνών από τα πολυπεπτίδια της LEKTI, επιτρέποντας τη φυσιολογική απολέπιση των εξωτερικών στρωμάτων της κεράτινης στοιβάδας.

Η φουρίνη, που πρωτεολύει και ενεργοποιεί τη LEKTI, ανήκει στην οικογένεια των κονβερτασών του τύπου της σουμπιλισίνης (Subtilisin-like proprotein convertases, SPCs), οι οποίες συμμετέχουν στην επεξεργασία μεγάλου αριθμού πρόδρομων πρωτεϊνών (Bitoun *et al*, 2003) και εμφανίζουν εξειδίκευση στην κατανομή τους τόσο σε επίπεδο ιστού όσο και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους (Komatsu *et al*, 2002).

Οι SPCs διασπούν τις πρόδρομες πρωτεΐνες αναγνωρίζοντας το μοτίβο Lys/Arg (K/R)-X_n-Lys/Arg (K/R) ↓ (n = 0, 2, 4, and 6), και πιο συγκεκριμένα το μοτίβο Lys-Arg ↓ ή Arg-Arg ↓. Μετά τη διάσπαση από τις SPCs, τα βασικά κατάλοιπα που εκτίθενται στα νέο-απελευθερωμένα αμινοξυτελικά πεπτίδια απομακρύνονται από καρβοξυπεπτιδάσες και οι πρόδρομες πρωτεΐνες μετατρέπονται σε βιοδραστικά μόρια (Komatsu *et al*, 2002).

Η αναγνώριση των θραυσμάτων της LEKTI, κατέστησε εφικτή την κατανόηση και το σχεδιασμό του μοντέλου του καταρράκτη ενεργοποίησης της LEKTI_f-1. Η πρώτη διάσπαση λαμβάνει χώρα μεταξύ των επικρατειών D5 και D6, δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο καρβοξυτελικό θραύσμα 102kDa, που περιλαμβάνει τις επικράτειες D6-D15. Έπειτα, η διάσπαση μεταξύ των επικρατειών D9 και D10, δημιουργεί δύο θραύσματα. Το πρώτο (37kDa) περιλαμβάνει τις επικράτειες D6-D9. Το δεύτερο, με μοριακό βάρος 65kDa, συνιστά ένα πολυπεπτίδιο με τις επικράτειες D10-D15. Η ακολουθία αυτού του πολυπεπτιδίου εξαρτάται από το εναλλακτικό μετάγραφο από το οποίο προέρχεται έχοντας ανάλογο

μοριακό βάρος και σύσταση σε επικράτειες. Το πολυπεπτίδιο D6-D9 διασπάται στην Arg425, εντός της συνδεδειγμένης περιοχής μεταξύ των επικρατειών D6 και D7. Αποτέλεσμα αυτής της θραύσης είναι ο σχηματισμός ενός θραύσματος 30kDa, που αποτελείται από τις επικράτειες D7-D9. Τέλος, το πεπτίδιο αυτό διασπάται στην Arg489, παράγοντας ένα θραύσμα με μία μόνο επικράτεια, τη D7, και ένα δεύτερο πολυπεπτίδιο 23kDa, με τις επικράτειες D8-D9 (Εικ. 10). Τα θραύσματα που προκύπτουν εκτός από διαφορετική δομή έχουν και ευδιάκριτο ρόλο (Fortugno *et al*, 2011). Ειδικότερα, έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μελέτες που αφορούν την ανασταλτική ικανότητα διαφορετικών μορφών της LEKTI. Έχει δειχθεί ότι η πλήρους μήκους ανασυνδυασμένη LEKTI αναστέλλει τη θρυψίνη, τη σουμπιλισίνη A, την πλασμίνη, την καθεψίνη G και την ουδετερόφιλη ελαστάση, όχι όμως τη χυμοθρυψίνη. Μία ανασυνδυασμένη μορφή της LEKTI, που περιλαμβάνει τις επικράτειες 6 έως 9, αναστέλλει τη θρυψίνη, τη σουμπιλισίνη A, τη χυμοθρυψίνη, την καλλικρεΐνη 5 (KLK5), το θρυπτικό ένζυμο της κεράτινης στοιβάδας (SCTE) και την καλλικρεΐνη 7 (KLK7) αλλά όχι την πλασμίνη, την καθεψίνη G και την ελαστάση. Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η επικράτεια D6 είναι πιθανός αναστολέας της θρυψίνης και της καλλικρεΐνης 5 και 7. Αντίθετα, η επικράτεια D15 δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι των δύο αυτών καλλικρεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν πως κάθε μορφή της LEKTI παρουσιάζει εξειδίκευση όσον αφορά τους στόχους που αναστέλλει (Deraison *et al*, 2007).



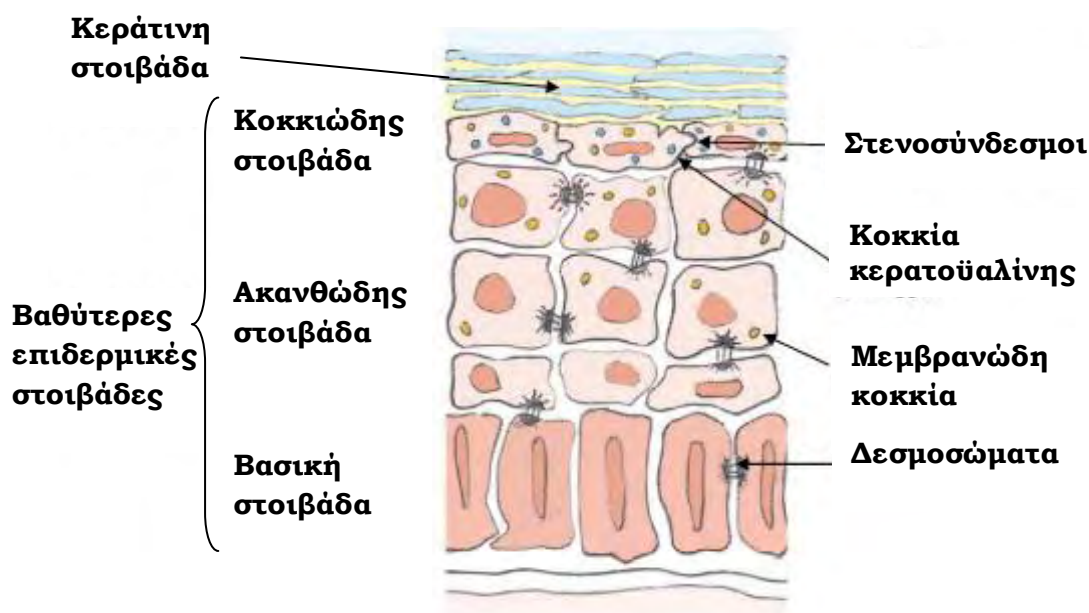
Εικόνα 10. Μοντέλο του καταρράκτη της ενεργοποίησης της LEKTI. Η πρόδρομη πρωτεΐνη διασπάται αρχικά στην Arg355, παράγοντας τα θραύσματα D1-D5 και D6-D15. Το θραύσμα 102kDa διασπάται στην Arg625, παράγοντας δύο θραύσματα, 37kDa και 65kDa, που αποτελούνται από τις επικράτειες D6-D9 και D10-D15 αντίστοιχα. Το θραύσμα D6-D9 πρωτεολύεται περαιτέρω, παράγοντας τα θραύσματα D6 και D7-D9. Τέλος, το θραύσμα D7-D9 διασπάται στα θραύσματα D7 (7kDa) και D8-D9 (23kDa) (Fortugno *et al*, 2011).

Κεράτινη στοιβάδα

Η επιδερμίδα είναι ένα στρωματοποιημένο επιθήλιο (Εικ. 11), το οποίο παρέχει μία πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους κινδύνους που ενέχει το εξωτερικό περιβάλλον για τον οργανισμό. Επιπλέον, το δέρμα διατηρεί την ακεραιότητα του σώματος μέσω της απομόνωσης του εσωτερικού περιβάλλοντος, περιορίζει τη διείσδυση αεροαλλεργιογόνων, παθογόνων μικροοργανισμών και τοξικών ουσιών ενώ παράλληλα παρεμποδίζει τη διαδερμική απώλεια νερού, μέσω του σχηματισμού ενός στεγανού φραγμού.

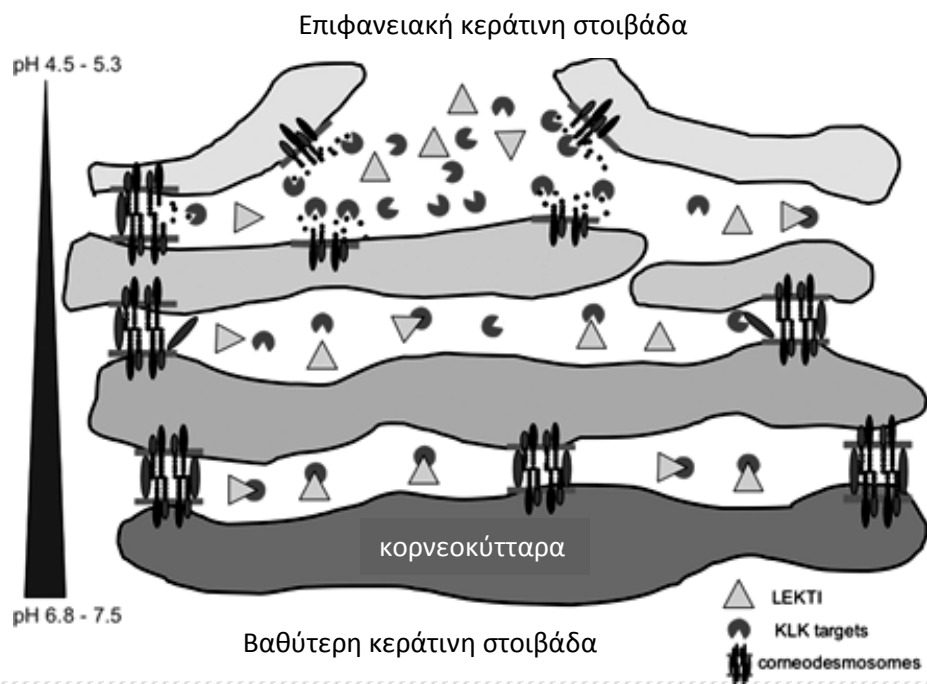
Αυτός ο προστατευτικός φραγμός που παρέχεται από το εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας οφείλεται στην κεράτινη στοιβάδα. Η κεράτινη στοιβάδα προκύπτει από μία διαδικασία τελικής διαφοροποίησης της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας προς τα κοκκιώδη στρώματα, μέσω ενός ακανθώδου διαμερίσματος.

Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από νεκρά κύτταρα και κύτταρα που περιέχουν κερατίνη, τα κερατώδη κύτταρα. Τα κερατώδη κύτταρα προσκολλώνται μεταξύ τους μέσω κερατινοποιημένων δεσμοσωμάτων και είναι ενσωματωμένα σε μία λιπιδιακή μήτρα. Η πρωτεολυτική αποικοδόμηση των κερατινοποιημένων δεσμοσωμάτων από επιδερμικές πρωτεάσες οδηγεί στην αποβολή των πιο επιφανειακών κερατωδών κυττάρων (Εικ. 12). Μέσω αυτής της διαδικασίας απολέπισης, ρυθμίζεται το πάχος του δέρματος.



Εικόνα 11. Δομή της επιδερμίδας (<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0009898106006905-gr6a.jpg>).

Διαταραχές των διαδικασιών αυτών, που προκύπτουν και από μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό της κεράτινης στοιβάδας, μπορούν να οδηγήσουν σε ανώμαλη στρωματοποίηση και κερατινοποίηση της επιδερμίδας, όπως παρατηρείται στις ιχθυώσεις (Anaïs Briot *et al*, 2009).



Εικόνα 12. Μοντέλο απολέπισης. Το pH ελέγχει την ενεργότητα των KLKs, ρυθμίζοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με τη LEKTI. Στα πιο βαθιά στρώματα της κεράτινης στοιβάδας, το ουδέτερο pH επιτρέπει την ύπαρξη ισχυρών ανασταλτικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της LEKTI και των KLKs-στόχων της στον ενδιάμεσο χώρο των κερατινοκυττάρων. Συνεπώς, η διάσπαση των κορνεοδεσμωσώματων παρεμποδίζεται. Καθώς το pH γίνεται πιο όξινο κατά μήκος της κεράτινης στοιβάδας, η LEKTI και οι KLKs διαχωρίζονται, επιτρέποντας τη σταδιακή διάσπαση των κορνεοδεσμωσώματων. Στα πιο επιφανειακά στρώματα της κεράτινης στοιβάδας, το pH είναι αρκετά όξινο με αποτέλεσμα την αναστολή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της LEKTI και των KLKs. Η απελευθέρωση των KLKs οδηγεί στην πλήρη αποικοδόμηση των κορνεοδεσμωσώματων, με αποτέλεσμα την αποκόλληση των πιο επιφανειακών κερατινοκυττάρων από το δέρμα (Deraison *et al*, 2007).

Η LEKTI, ως ρυθμιστής της απολέπισης του δέρματος

Τα κερατώδη δεσμωσώματα διατηρούν τη συνοχή του ιστού και την πρόσφυση των κυττάρων μέσω ασβεστιοεξαρτώμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο οικογενειών δεσμωσωμικών καδερινών, των δεσμογλεινών (DSG1–4) και των δεσμοκολλινών 1–3. Οι καδερίνες που συναντώνται σε αφθονία στην κεράτινη στοιβάδα είναι η DSG1, η DSG4 και η δεσμοκολλίνη-1. Επιπλέον, τα κερατώδη δεσμωσώματα περιέχουν μία μοναδική γλυκοπρωτεΐνη, την κορνεοδεσμοσίνη.

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής απολέπισης της κεράτινης στοιβάδας, τα πιο επιφανειακά κερατινοκύτταρα, αποκολλώνται από την επιφάνεια του δέρματος. Αυτή η διαδικασία προϋποθέτει την πρωτεόλυση των μορίων που συμμετέχουν στη δημιουργία των κερατώδων δεσμωσώματων, της DSG1, της δεσμοκολλίνης-1 και της κορνεοδεσμοσίνης, η οποία πραγματοποιείται από πρωτεάσες σερίνης παρόμοιες με τη θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη. Η δράση των πρωτεασών σερίνης στην κεράτινη στοιβάδα αποδίδεται στις καλλικρεΐνες (kallikreins, KLKs), μια οικογένεια 15 εκκρινόμενων πρωτεασών σερίνης,

που παρουσιάζουν εξειδίκευση όμοια με αυτήν της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης και ειδικότερα στις καλλικρεΐνες KLK5 και KLK7, οι οποίες αρχικά ονομάστηκαν θρυπτικό ένζυμο κεράτινης στοιβάδας (stratum corneum tryptic enzyme, SCTE) και χυμοθρυπτικό ένζυμο κεράτινης στοιβάδας (stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE) αντίστοιχα. Και τα δύο αυτά ένζυμα εκφράζονται στην κοκκιώδη στοιβάδα και μεταφέρονται στην κεράτινη στοιβάδα. Εκεί, ξεκινάει ένας καταρράκτης πρωτεόλυσης, κατά τον οποίο η KLK5 αυτοενεργοποιείται και ενεργοποιεί και την KLK7. Μόλις ενεργοποιηθούν τα δύο ένζυμα, όπως έχει δείχθει *in vitro*, πρωτεολύουν τη DSG1, τη δεσμοκολλίνη-1 και την κορνεοδεσμοσίνη (Εικ. 13) (Borgoño et al, 2007).

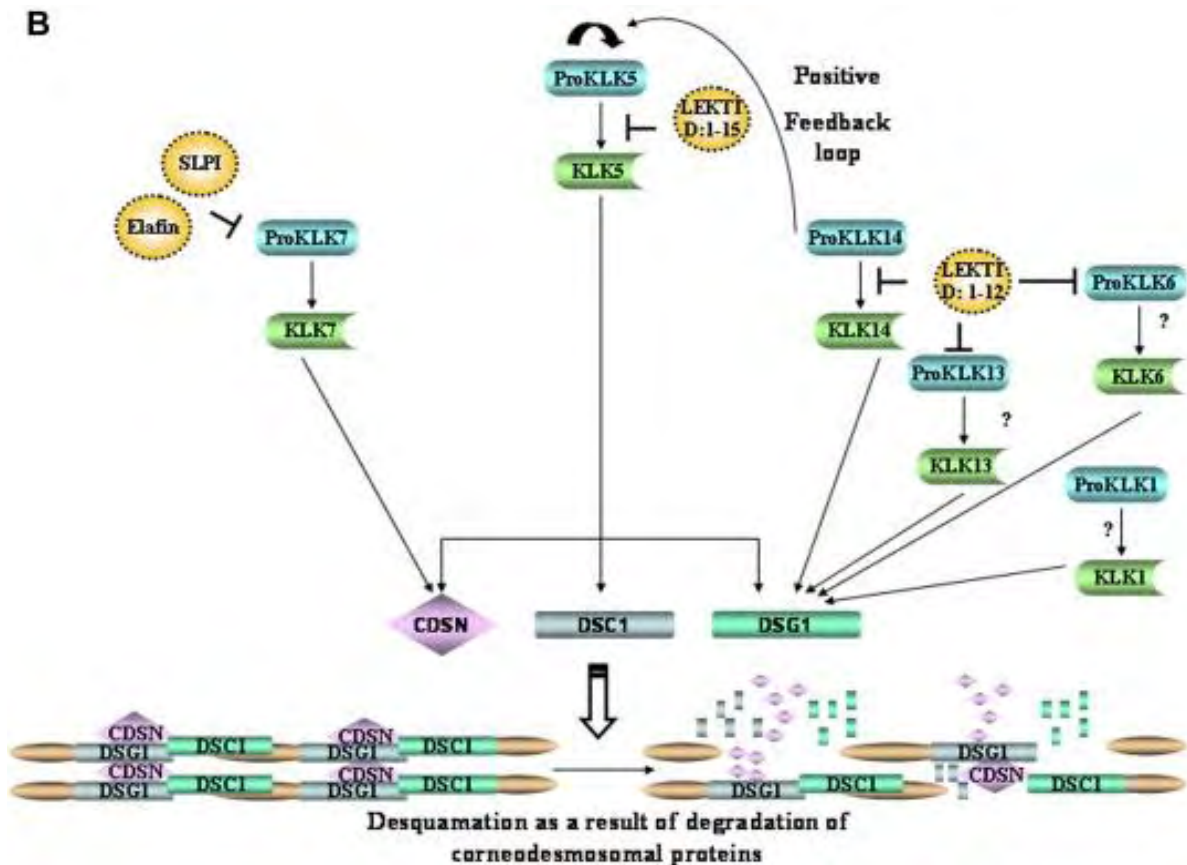
Πρόσφατα, δείχθηκε πως η KLK14 είναι υπεύθυνη για το 50% της ολικής ενεργότητας πρωτεάσης σερίνης, που παρατηρείται στην κεράτινη στοιβάδα. Επιπλέον, η KLK14 μπορεί να ενεργοποιηθεί αλλά και να ενεργοποιηθεί από την KLK5, γεγονός που την τοποθετεί πιθανώς στον καταρράκτη πρωτεόλυσης (Εικ. 13) (Borgoño et al, 2007).

Επιπρόσθετα, διάφορες μελέτες υποδεικνύουν τη συμμετοχή και άλλων καλλικρεΐνών στον καταρράκτη απολέπισης, τόσο βάσει του επιδερμικού τους εντοπισμού όσο και της εξειδίκευσης που παρουσιάζουν στα υποστρώματά τους (Εικ. 13). Παραδείγματος χάριν, τα μετάγραφα ή οι πρωτεΐνες των καλλικρεΐνών 1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, και 14 έχουν εντοπιστεί στα κοκκιώδη στρώματα, ενώ οι καλλικρεΐνες 6, 8, 10, 11, 13, και 14 έχουν εντοπιστεί στην κεράτινη στοιβάδα (Borgoño et al, 2007).

Συνεπώς, η απολέπιση είναι μία διαδικασία που εξαρτάται από πρωτεάσες σερίνης και η ρύθμισή της πραγματοποιείται από αναστολείς πρωτεασών σερίνης (serine protease inhibitors, SPIs). Έτσι, η LEKTI, λόγω του συνεντοπισμού της με τις καλλικρεΐνες στα κοκκιώδη στρώματα και την κεράτινη στοιβάδα και της ανασταλτικής της δράσης ενάντια στις KLK5 και KLK7 *in vitro*, πιθανότατα στοχεύει και αναστέλλει καλλικρεΐνες και *in vivo* (Borgoño et al, 2007).

Η απολέπιση στο σύνδρομο Netherton

Οι περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *SPINK5* σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton, προκαλούν τον πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης ή τροποποιούν το πλαίσιο ανάγνωσης. Αποτέλεσμα αυτών, είναι η παραγωγή μίας πρωτεΐνης μικρότερου μήκους, όπως έχει δείχθει τουλάχιστον για ορισμένες μεταλλάξεις τέτοιου τύπου. Το γεγονός αυτό, συνεπάγεται την παραγωγή μίας πρωτεΐνης με λιγότερες επικράτειες αναστολής πρωτεασών σερίνης. Στους ασθενείς με NS, η ισορροπία μεταξύ των πρωτεασών σερίνης και των αναστολέων τους είναι διαταραγμένη, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη και αναποτελεσματική ρύθμιση της διαδικασίας της απολέπισης του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα, η μειωμένη αναστολή που υφίστανται οι καλλικρεΐνες, οδηγεί στην αυξημένη πρωτεόλυση της DSG1, της δεσμοκολλίνης-1 και της κορνεοδεσμοσίνης. Ως αποτέλεσμα, η απολέπιση πραγματοποιείται με μεγαλύτερο ρυθμό από το φυσιολογικό και το πάχος του δέρματος μειώνεται (Εικ. 14).

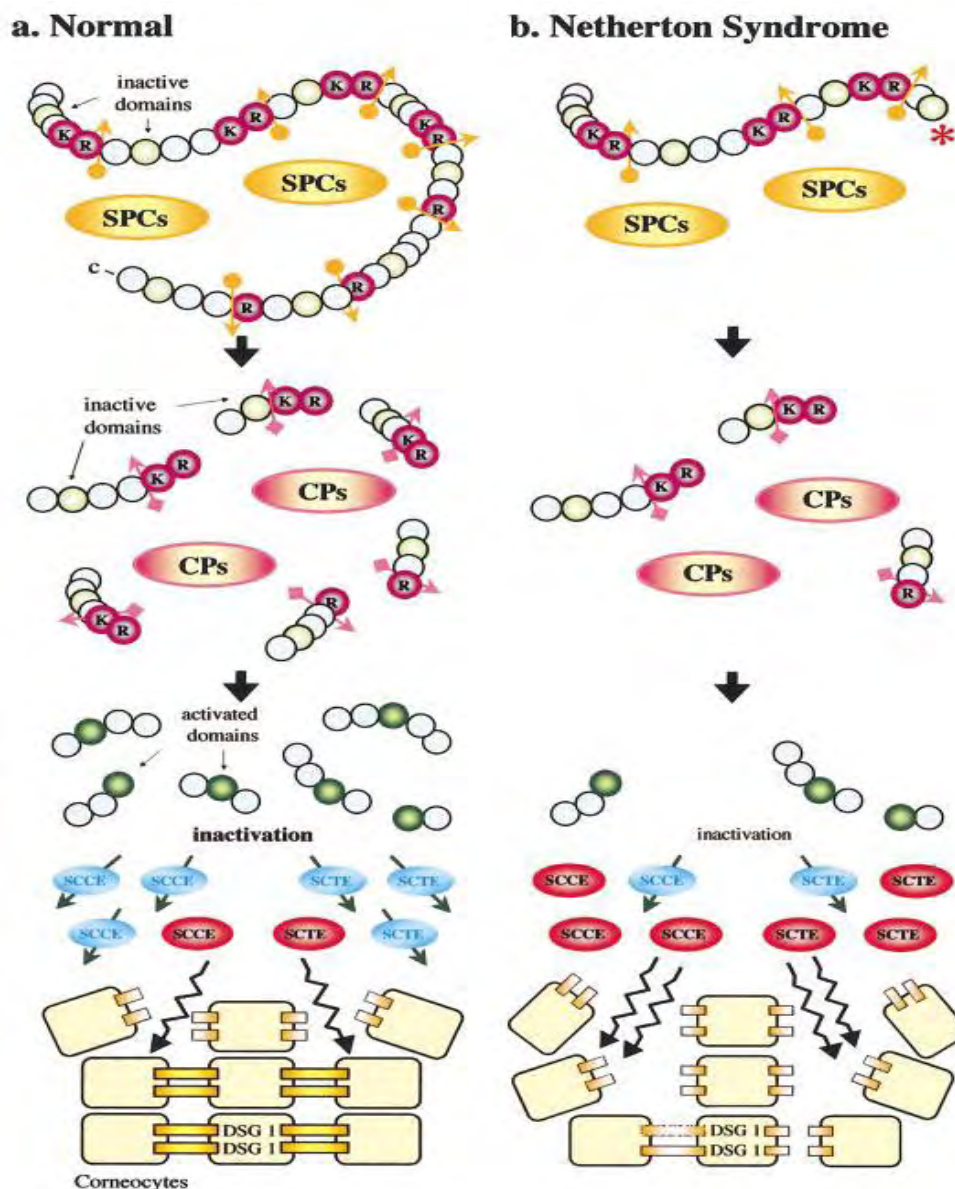


Εικόνα 13. Ο καταρράκτης των καλλικρεϊνών στην απολέπιση του δέρματος. Η KLK5 αυτοενεργοποιείται και ενεργοποιεί τις KLK14 και KLK7, οι οποίες μαζί με τις KLK1, 6 και 13 συμμετέχουν στην απολέπιση του δέρματος μέσω της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών των κερατωδών δεσμοσωμάτων, όπως είναι η δεσμογλεΐνη1 (DSG1), η δεσμοκολλίνη 1 (DSC1) και η κορνεοδεσμοσίνη (CDSN). Ο καταρράκτης των KLKs ελέγχεται από ποικίλους αναστολείς πρωτεασών όπως η LEKTI, η SLPI και η ελαφίνη (Emami και Diamandis, 2007).

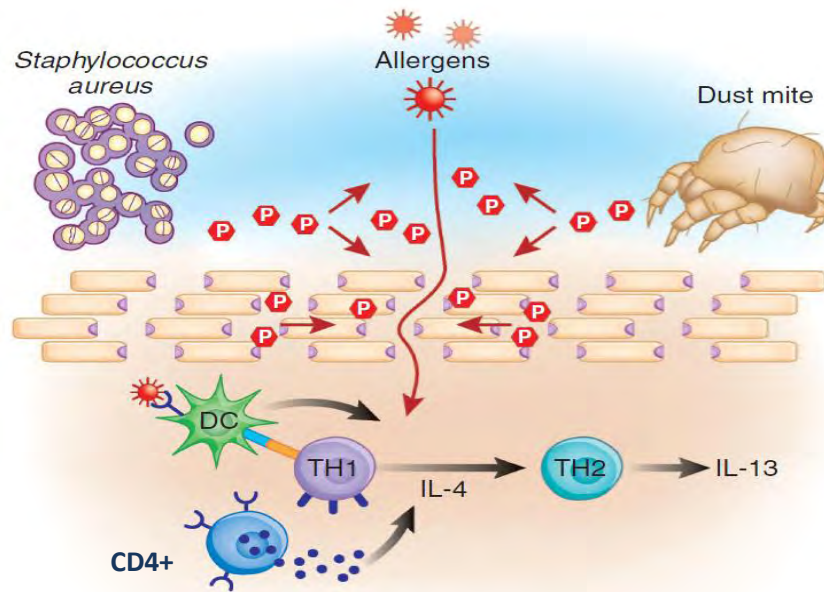
Φλεγμονή και αλλεργίες σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton

Οι ασθενείς με σύνδρομο Netherton, παρουσιάζουν έντονη πρωτεολυτική δραστηριότητα στην επιδερμίδα, με αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό απολέπισης και τη μείωση του επιδερμικού πάχους. Η επίδραση εξωγενών πρωτεασών που προέρχονται παραδείγματος χάριν από ακάρεα που βρίσκονται στη σκόνη ή από βακτήρια, επιδεινώνει τη διάσπαση των συνδέσμων μεταξύ των κερατωδών δεσμοσωμάτων της κερατίνης στοιβάδας (Εικ. 15). Η διάσπαση του επιδερμικού στρώματος έχει ως συνέπεια τη διείσδυση αλλεργιογόνων στον οργανισμό. Αυτά με τη σειρά τους, αναγνωρίζονται από τα δενδριτικά κύτταρα που εντοπίζονται στην επιδερμίδα και παρουσιάζονται στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα στρατολογούν τα Τ λεμφοκύτταρα CD4+. Η έκκριση ιντερλευκίνης 4 (interleukin 4, IL-4) από τα CD4+ οδηγεί στην διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων Τ λεμφοκυττάρων (Th0) σε βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 2 (Th2), τα οποία παράγουν περισσότερη IL-4 (Εικ. 15). Η IL-4 επάγει τη μεταστροφή της κλάσης των Β-λεμφοκυττάρων σε ανοσοσφαιρίνη Ε (IgE) με αποτέλεσμα την αύξηση

των επιπέδων της IgE στον ορό. Η αύξηση αυτή παρατηρείται στην πλειοψηφία των ασθενών με σύνδρομο Netherton. Η υπερέκφραση της ιντερλευκίνης 4 έχει συνδεθεί με ατοπία και άσθμα.



Εικόνα 14. Μοντέλο ρύθμισης της απολέπισης, που ελέγχεται από την LEKTI, σε μη προσβεβλημένα άτομα και σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton. Α) Σε μη προσβεβλημένα άτομα, η πρώτη διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης πραγματοποιείται στα κερατινοκύτταρα από SPCs. Τα θραύσματα που προκύπτουν πρωτεολύονται περαιτέρω από καρβοξυπεπτιδάσες (CPs). Τα προκύπτοντα πεπτιδία είναι αναστολείς πρωτεασών της κερατίνης στοιβάδας όπως οι SCCE και SCCE. Οι πρωτεάσες αυτές πρωτεολύουν τη δεσμογλεΐνη-1, με αποτέλεσμα την αποκόλληση των επιφανειακών κερατινοκυττάρων. Β) Στους ασθενείς με NS, οι μεταλλάξεις που προκαλούν πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης οδηγούν στην παραγωγή μίας πρωτεΐνης με λιγότερες ανασταλτικές επικράτειες. Συνέπεια αυτού είναι η υπερενεργοποίηση των πρωτεασών της κερατίνης στοιβάδας, η υπερ-αποικοδόμηση της δεσμογλεΐνης-1 και τέλος η υπερ-απολέπιση του δέρματος (Komatsu *et al*, 2002).

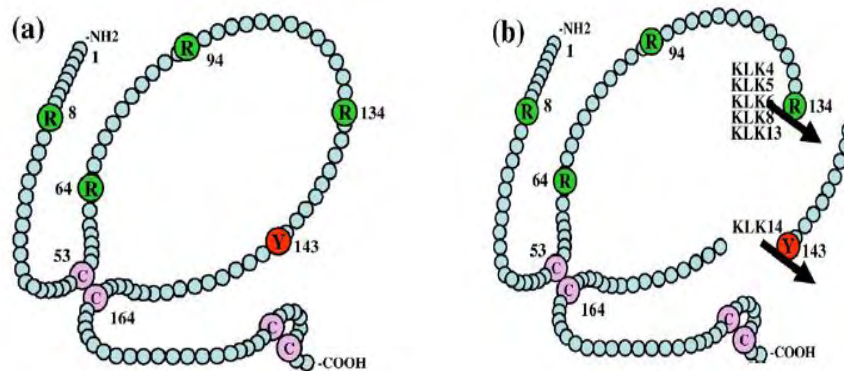


Εικόνα 15. Έντονη πρωτεολυτική δραστηριότητα στην επιδερμίδα ασθενών με σύνδρομο Netherton. Η επίδραση εξωγενών πρωτεασών (P) (από ακάρεα, βακτήρια) επιδεινώνει την πρωτεόλυση των δεσμοσωμάτων της κερατίνης στοιβάδας, με συνέπεια τη διείσδυση αλλεργιογόνων στον οργανισμό. Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) αναγνωρίζουν τα αλλεργιογόνα και τα παρουσιάζουν στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (TH1), που με τη σειρά τους στρατολογούν T λεμφοκύτταρα CD4+. Η έκκριση ιντερλευκίνης 4 (IL-4) από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα οδηγεί στην διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων T λεμφοκυττάρων (Th0) σε βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 2 (Th2), τα οποία παράγουν περισσότερη IL-4 (Cork *et al*, 2009).

Επιπλέον, έχει δείξει πως η υπερέκφραση της KLK5 πυροδοτεί την έκφραση προφλεγμονωδών (tumor necrosis factor α , TNF α , intercellular adhesion molecule 1, ICAM1 και interleukin 8, IL8) και προαλλεργικών (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) μορίων, μέσω ενός υποδοχέα που ενεργοποιείται από τις ενεργοποιημένες πρωτεάσες, τον PAR2 (proteinase-activated receptor 2) (Briot *et al*, 2010). Παράλληλα, η αυξημένη απολέπιση οδηγεί στην έκκριση ιντερλευκίνης 1 β (IL-1 β), ιντερλευκίνης 8 (IL8) και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF- α) από τα στρεσαρισμένα κερατινοκύτταρα. Οι μεσολαβητές της προφλεγμονής πυροδοτούν τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων και των ιστιοκυττάρων. Η θυμική στρωματική λεμφοποιητίνη (TSLP) ρυθμίζει την έκκριση χημειοκινών, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, εκτός των άλλων επάγουν τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων T λεμφοκυττάρων (Th0) σε Th2 κύτταρα. Η TSLP είναι απαραίτητη και ικανή να επάγει εκζεματώδεις αλλοιώσεις και συστηματική απόκριση των Th2, ακόμα και απουσία εξωγενών αλλεργιογόνων (Briot *et al*, 2010). Οι συνθήκες αυτές λοιπόν, ευνοούν τις φλεγμονώδεις παθήσεις στο δέρμα όπως η ατοπική δερματίτιδα, οι οποίες απαντώνται συχνά σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton.

Συσχέτιση της LEKTI με την καθυστέρηση της ανάπτυξης σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton

Η αυξητική ορμόνη (human growth hormone, hGH) υπάρχει σε διάφορες μορφές στον οργανισμό του ανθρώπου. Στην περιφέρεια, το 70-75% της hGH υπάρχει στη μορφή μοριακού βάρους 22 kDa, η οποία αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 191 αμινοξέων. Στη μορφή αυτή, η hGH μπορεί να υποστεί πρωτεολυτική διάσπαση από τις KLKs, τόσο στην υπόφυση όσο και στο πλάσμα. Η περιοχή γύρω από τα κατάλοιπα 134-150 περιέχει πιθανές θέσεις διάσπασης από ποικίλες πρωτεάσες όπως τη θρομβίνη, την πλασμίνη την κολλαγενάση, τη σουμπιλισίνη και άλλες πρωτεάσες παρόμοιες με τη χυμοθρυψίνη. Αυτές οι τροποποιήσεις μετατρέπουν την hGH μίας αλυσίδας, σε μία μορφή δύο αλυσίδων συνδεδεμένων με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Στη μορφή αυτή, ο ρυθμός μεταβολισμού της hGH στην κυκλοφορία μειώνεται σημαντικά. Εκτός της μορφής των 22 kDa, έχουν ανιχνευθεί θραύσματα των 17 ή 16, 12 και 5 kDa (Εικ. 16).

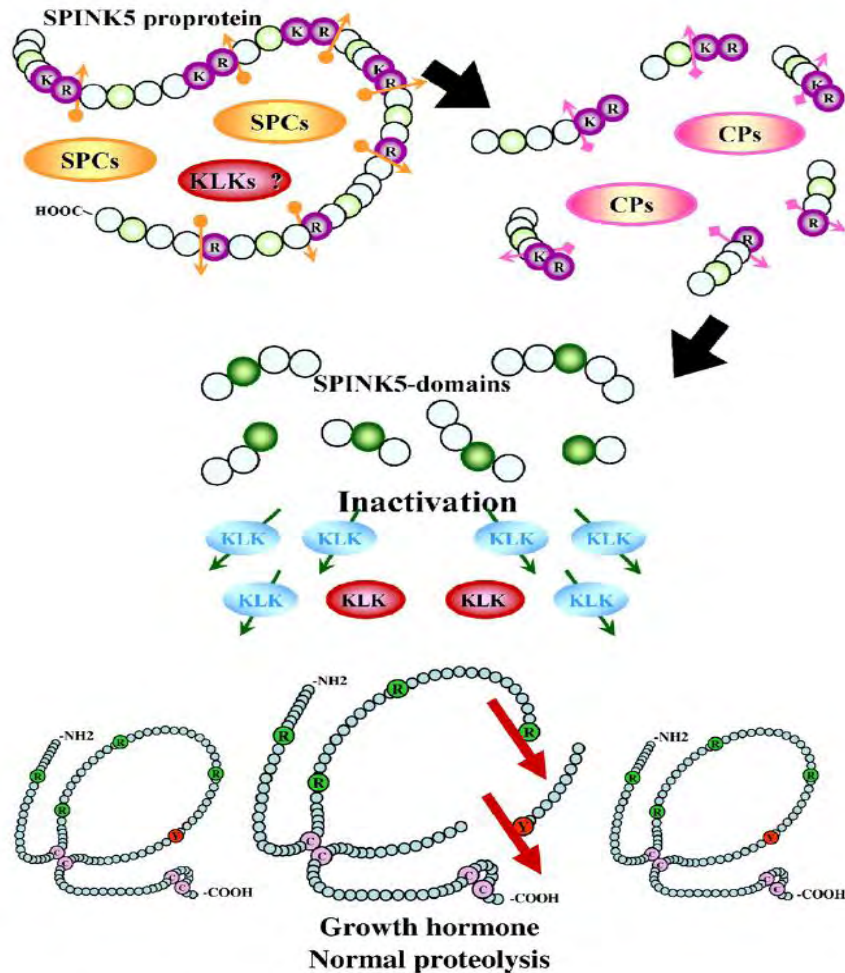


Εικόνα 16. Μοντέλο της πρωτεόλυσης της αυξητικής ορμόνης (hGH) από τις KLKs. Α) Η hGH σε μορφή μίας αλυσίδας. Οι Cys53 και Cys164 σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό. Β) Η Arg134/Thr135 αποτελεί συνήθως τη θέση διάσπασης από τις KLKs 4–6, 8 και 13. Η KLK14 πρωτεολύει την hGH στη θέση Tyr143/Ser144. Μετά την πρωτεόλυση, η hGH μονής αλυσίδας μετατρέπεται στη μορφή των δύο αλυσίδων (Komatsu *et al*, 2007).

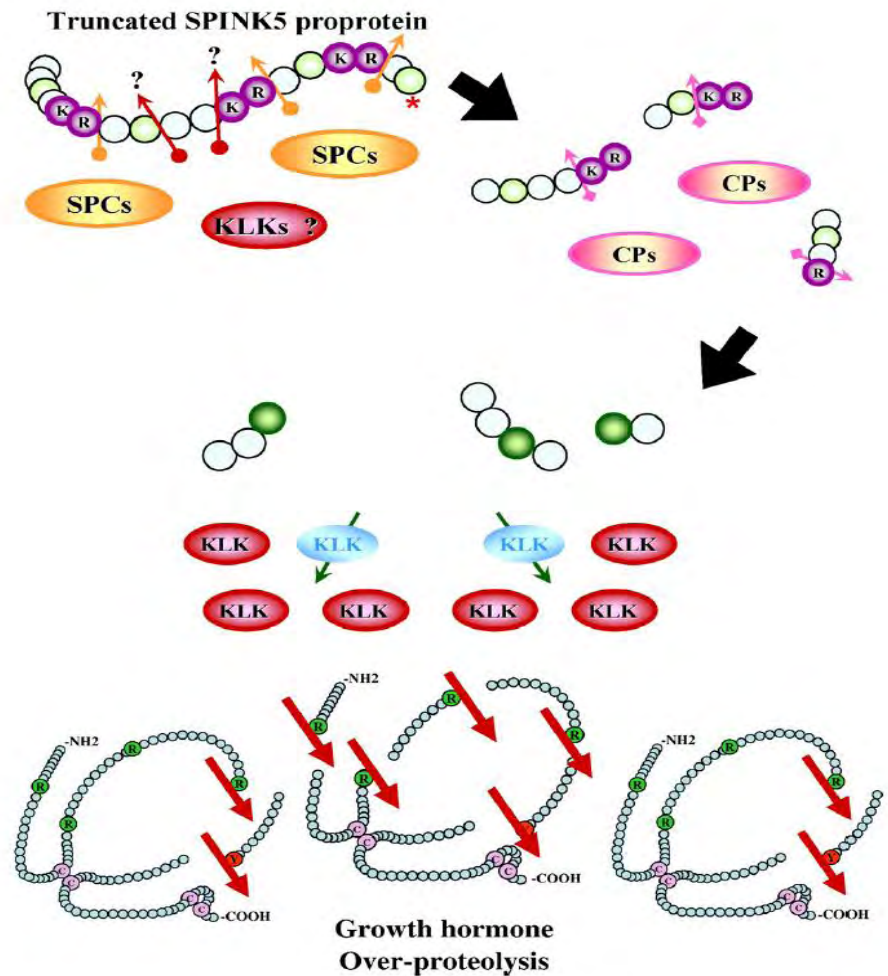
Μελέτες έχουν δείξει πως κατά την αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού και το σχηματισμό της μορφής των δύο αλυσίδων, το παραγόμενο αμινοτελικό θραύσμα 16 kDa της hGH αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση. Η αναλογία των κυκλοφορούντων ισομορφών της hGH (εκτός της μορφής των 22 kDa) και ειδικά της μορφής των δύο αλυσίδων, εμφανίζεται αυξημένη σε αρκετά παιδιά με καθυστέρηση στην ανάπτυξη, χωρίς όμως παράλληλη μείωση των επιπέδων της ολικής hGH (Komatsu *et al*, 2007).

Πολλές καλλικρεΐνες εκφράζονται φυσιολογικά στην υπόφυση του εγκεφάλου και έχουν την ικανότητα σχηματισμού ποικίλων ισομορφών της hGH, όπως η ισομορφή διπλής αλυσίδας 22 kDa και τα θραύσματα 15, 14, 6, 5 και 3 kDa (Komatsu *et al*, 2007).

Normal



Netherton syndrome



Εικόνα 17. Μοντέλο ρύθμισης της πρωτεόλυσης της αυξητικής ορμόνης σε μη προσβεβλημένα άτομα και σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton. Α) Σε μη προσβεβλημένα άτομα, η πρόδρομη πρωτεΐνη LEKTI πρωτεολύεται σε τουλάχιστον 14 επικράτειες από κονβεργτάδες του τύπου της σουμπιλισίνης (SPCs). Στη συνέχεια, τα θραύσματα που προκύπτουν πρωτεολύονται περαιτέρω από καρβοξυπεπτιδάσες (CPs) (πάνω). Τα προκύπτοντα θραύσματα είναι αυτά που αναστέλλουν τη δράση των πρωτεασών (KLKs). Οι ανεργές KLKs φαίνονται με μπλε χρώμα και οι ενεργές με κόκκινο (μέση). Οι KLKs συμμετέχουν στην πρωτεόλυση της αυξητικής ορμόνης, παράγοντας την μορφή των δύο αλυσίδων τόσο στην περιφέρεια όσο και στην υπόφυση. Β) Στους ασθενείς με NS, οι περισσότερες μεταλλάξεις οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης με συνέπεια την παραγωγή πρωτεΐνης μικρότερου μήκους. Συνεπώς, η LEKTI που παράγεται διαθέτει λιγότερες ανασταλτικές επικράτειες. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η αυξημένη ενεργότητα των KLKs και κατά συνέπεια η αυξημένη πρωτεόλυση της GH (Komatsu et al, 2007).

Ο πρωτεολυτικός καταρράκτης των καλλικρεϊνών και της πρωτεΐνης LEKTI που λαμβάνει χώρα στο δέρμα, φαίνεται πως λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο και στην υπόφυση, ρυθμίζοντας την hGH και ίσως και άλλες ορμόνες σε αυτόν τον ιστό. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρόδρομη πρωτεΐνη LEKTI πρωτεολύεται και ενεργοποιείται από τις κονβερτάσες πρόδρομων πρωτεϊνών, που προσομοιάζουν με τη σουμπτιλισίνη (SPCs). Τα θραύσματα που προκύπτουν τροποποιούνται περαιτέρω από τις καρβοξυπεπτιδάσες (CPs) και μετατρέπονται σε βιοδραστικά μόρια. Τα μόρια αυτά αναστέλλουν την πρωτεολυτική δράση των καλλικρεϊνών. Παρόλα αυτά, ένζυμα KLK που 'ξεφεύγουν' από τις επικράτειες της LEKTI, συνεισφέρουν στην πρωτεόλυση της hGH, σχηματίζοντας την ισομορφή των δύο αλυσίδων (Εικ. 17) (Komatsu et al, 2007).

Όπως αναφέρθηκε προωτέρα, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *SPINK5* που έχουν αναγνωριστεί σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton οδηγούν συχνά σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης και συνεπώς σε μία μικρότερου μήκους πρωτεΐνη. Οι ασθενείς με NS διαθέτουν λιγότερες ανασταλτικές επικράτειες ενάντια στις πρωτεάσες σερίνης, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη ενζυματική ενεργότητα των καλλικρεϊνών. Αυτό με τη σειρά του συνεπάγεται την αυξημένη πρωτεόλυση της αυξητικής ορμόνης και πιθανώς τη μετατροπή της σε βιολογικά ανενεργή μορφή. Αυτός είναι πιθανώς ο λόγος, που πολύ συχνά, ασθενείς με NS παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Komatsu et al, 2007).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *SPINK5*, που έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση του συνδρόμου Netherton, σε μία ασθενή. Έως τώρα, μόνο 6 ασθενείς από την Ελλάδα, που όλοι ήταν ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη Cys297Cys, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Επίσης, με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά όλων των ασθενών που έχουν αναφερθεί έως τώρα (148 άτομα) γίνεται μία προσπάθεια συσχέτισης γονοτύπου-φαινοτύπου για το σύνδρομο αυτό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενούς

Η ασθενής με σύνδρομο Netherton, που παρακολουθείται από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, παρουσιάζει ένα εκτεταμένο ερυθρηματολεπιδώδες εξάνθημα προσώπου, τριχωτού κεφαλής, κορμού και άκρων συνοδευόμενο από αίσθημα νυγμών, κνησμού και καύσου, λόγω της έντονης ξηρότητας. Λόγω της ερυθρότητας (δερματική υπεραίμια) και της έκτασης του εξανθήματος, η ασθενής αισθάνεται ρίγος χωρίς όμως να έχει πυρετό. Το εξάνθημα ξεκίνησε από λίγες ερυθρές συρρέουσες βλατίδες στην πρόσθια επιφάνεια του κορμού με αποτέλεσμα την συρροή και επέκταση του εξανθήματος στην περιφέρεια (Εικ. 18). Οι τρίχες, στο τριχωτό της κεφαλής κατά την ψηλάφηση, ήταν λεπτές και εύθραυστες (trichorrhexis invaginata).



Εικόνα 18. Η ασθενής με σύνδρομο Netherton.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

Διαλύματα

- CH_3COONa 0,5M
- Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 0,5 ml αίματος και ακολουθήθηκαν οι εξής πειραματικές διαδικασίες:

1. Η ποσότητα του αίματος τοποθετήθηκε σε σωλήνα erpendorf των 2 ml και προστέθηκε 1 ml SSC 1%. Έντονη ανάδευση των δειγμάτων.
2. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min στους 4°C.
3. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
4. Επανάληψη των βημάτων 1-3.
5. Προσθήκη 0,5 ml CH₃COONa 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάσης K 10 mg/ml.
6. Επώαση των δειγμάτων υπό ανάδευση στους 55°C για μια ώρα.
7. Εκχύλιση με 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Έντονη ανάδευση των δειγμάτων.
8. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 10 min στους 4°C.
9. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης. Έντονη ανάδευση των δειγμάτων.
10. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
11. Μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα erpendorf και προσθήκη 1 ml παγωμένης ισοπροπανόλης. Ήπια ανάδευση των δειγμάτων.
12. Διατήρηση των δειγμάτων στους -20°C για 30 min.
13. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 min στους 4°C.
14. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
15. Προσθήκη 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Ήπια ανάδευση των δειγμάτων.
16. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 min στους 4°C.
17. Απομάκρυνση του υπερκείμενου, διατηρώντας ανέπαφο το ίζημα.
18. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37° C, ώστε να ξηρανθεί το ίζημα.
19. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl ddH₂O και διατήρηση των δειγμάτων στους -20°C.

Το διάλυμα οξικού νατρίου χρησιμοποιείται για την λύση των κυττάρων ρυθμίζοντας την ωσμωτική πίεση του κυττάρου προκαλώντας διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό και συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης ενώ παράλληλα αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, προστατεύοντας το DNA από τις νουκλεάσες. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, προστατεύοντας το DNA από τη δράση νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης (pH=7) που χρησιμοποιείται προκαλεί την κατανομή του DNA στην υπερκείμενη υδατινή φάση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου έχει σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγάλης πυκνότητας. Συμβάλλει επίσης στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδατινή φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 70%.

Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του DNA

Η συνολική ποσότητα του DNA ελέγχεται είτε με φωτομέτρηση του δείγματος είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2% w/v.

Η φωτομέτρηση βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm. Οι προκύπτουσες τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 1,8 σε δείγματα υψηλής καθαρότητας, κατάλληλα για χρήση.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτική αгарόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοικτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αгарόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωσης που φθορίζει υπό υπεριώδες φως.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι διαλύματα:

- TAE 50x

Tris Base 2 M

Οξικό οξύ 7,7%

EDTA 0,05 M

- Loading buffer 6x

Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v

TBE 1X (Tris Base 0,05 M, Βορικό οξύ 0,004 M, EDTA 0,002 M)

Γλυκερόλη 8,7%

Για την προετοιμασία της πηκτής η αгарόζη διαλύθηκε με θέρμανση σε TAE 1X και προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml. Η συγκέντρωση της πηκτής αгарόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτική τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση και να αποκτήσουν τα δείγματα μεγαλύτερη πυκνότητα.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του γενωμικού DNA και τον έλεγχο των προϊόντων της PCR. Τέλος, γίνεται παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων υπό υπεριώδες φως.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Τα τρία στάδια του κάθε κύκλου της PCR είναι τα ακόλουθα:

Αποδιάταξη: το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο, μέσω της θέρμανσής του σε υψηλή θερμοκρασία (94°-95°C).

Υβριδοποίηση εκκινητών: οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία και το μήκος των εκκινητών (50°-65°C).

Επέκταση των εκκινητών (πολυμερισμός): σύνθεση DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση.

Η PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου SPINK5 με υπόστρωμα γενωμικό DNA που απομονώθηκε από την ασθενή και τη μητέρα της. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συστατικά PCR.

Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
DNA εκμαγείο	~ 200 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X	5 µl
MgCl₂ (100mM)	1 µl
dNTPs (10mM συνολικά)	1 µl
Εκκινητής Forward (50pmol/µl)	1 µl
Εκκινητής Reverse (50pmol/µl)	1 µl
Taq DNA πολυμεράση (5U/µl) MyTaq DNA polymerase, BIOLINE	0,2 µl
ddH₂O	έως τα 50 µl

Σε όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν υπήρχε πάντα αντίδραση αρνητικού ελέγχου για τον διασφάλιση της αξιοπιστίας των προϊόντων PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου SPINK5 καθώς και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες

υβριδοποίησης τους φαίνονται στον Πίνακα 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων *SPINK6* και *SPINK9* φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου *SPINK5*.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Tm εκκινητή (°C)
Exon 1 FW*	CAATGCATGGAGTGGACCTGTA	62
Exon 1 RV*	AGACATTTTCAGGATTATACATGC	58
Exon 2 FW*	GTGCCCTTCTTTTATTTGCCATG	61
Exon 2 RV*	AAAGCTATTAGTACCTACCAG	55
Exon 3 FW*	TATCTACTATGTATCAGGCATTC	58
Exon 3 RV*	ATTTACCAGTTCAGAGACTAGC	58
Exon 4 FW*	ATCTGGGGTCTGTGTCCAC	60
Exon 4 RV*	CAGGTATGACCTAGTAATTAAG	57
Exon 5 FW*	TATTAGCTCAATGTAGCCTTC	55
Exon 5 RV*	TGTAGGGAAAATTGTGTCATG	55
Exon 6 FW* ^	TAAAGGAGAATGACAATGCAATG	58
Exon 7 RV* ^	TTATCTCTCTGCTGAGTGATTC	58
Exon 8 FW*	TTCAGCAATTCGTAGCAGAGG	59
Exon 8 RV*	TCAAAGGTTTAGGCATACAT	52
Exon 9 FW*	GGAAGGATCTCTGAGCCTAG	60
Exon 9 RV*	GCTTCCTTTCAAAGTTATTTTAC	57
Exon 10 FW*	ATCGGAAGCATCTCTACTCA	56
Exon 10 RV*	TTCATAAAAATAATAACTAGAACT	52
Exon 11 FW*	GAAAACAGAACTATATCTCAACT	56
Exon 11 RV*	CTGTCTTGAGCCACAGTCTC	60
Exon 12 FW*	GCAGTGATAAAGGGACAAAA	54
Exon 12 RV*	CCCAGATTGAAGAGTTAAGA	54
Exon 13 FW*	GAGATGTAACATTAGTTTCTGC	57
Exon 13 RV*	ATGTCTCCAATCAGACAGTTTCTC	62

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Tm εκκινητή (°C)
Exon 14 FW* ^	TGCAATTGTGAGGATTTACAG	58
Exon 15 RV* ^	CCAAGACTGAATGCTACTG	59
Exon 16 FW*	TGAGGCAGGAGAATTGCTTG	58
Exon 16 RV*	AATTGGTACTCTGGACACTTC	58
Exon 17 FW*	CTGATTGATGACGGAAGCTTTG	60
Exon 17 RV*	CTCACGGTCTATACTCTAC	55
Exon 18 FW*	CAAAGCACCTCTCAGACTAG	59
Exon 18 RV*	AGTACTCTTGATATATGGGGATC	58
Exon 19 FW* ^	TTCCAAATGTGTGACCTAGTTC	58
Exon 20 RV* ^	TGAACCCCTAGTCCCTCAC	60
Exon 21 FW*	GAAATACAGCCACCTTCTTAAG	58
Exon 21 RV*	AATACATATTATTTGCCTGGCTC	58
Exon 22 FW*	AGAGAAGGCCTGCAGCATAG	60
Exon 22 RV*	AGCACTGCCTTTACCATAGAC	59
Exon 23 FW*	ACTTCTCTTACTCAGACTGTTA	51,7
Exon 23 RV*	TTAGACATGCCTGTTGAGAGA	55,9
Exon 24 FW*	GTGCCAGAATCCTAGGAAGAC	61
Exon 24 RV*	CTAGCTTGATCATGTTGACACC	60
Exon 25 FW* ^	ATTATTTTGCCTATCACAGCAAG	58
Exon 26 RV* ^	GGGACAGAGTCAGCATTTCAC	61
Exon 27 FW*	TCTGTTTTTTTTCCTGTGTTATGAGT	59
Exon 27 RV*	GTGTGATGCCAAGTATCTTAGG	60
Exon 28 FW*	CCAACAATCAGAACTGATTAGC	58
Exon 28 RV*	CAAAGTGACAAGACAAGAAAAATC	60
Exon 28a FW	GGAAGGATGGATGAACGGG	58,8
Exon 28a RV	GTCCTCTCTTAGCTCTGAG	58,8
Exon 29 FW*	GGCCTCTGTTGCCAGGATG	62
Exon 29 RV*	TATACAACTTATTCAAGCAGCAG	58
Exon 30 FW*	TGCTGGGGTTACAGGCGTG	62
Exon 30 RV*	CAAACCTCAGACCCTTCTATG	58

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Tm εκκινητή (°C)
Exon 31 FW*	GTGCAAAATCAATCTTTGAGTTTG	58
Exon 31 RV*	TTATATCAGTGCATTACTATG	52
Exon 32 FW*	GACACCTGGATGATACCTAC	58
Exon 32 RV*	CCAGATAAATGTCCATTACTCAG	59
Exon 33 FW*	GCAGGATCTATGGATTTCTTTG	58
Exon 33 RV*	ACTTTTATTGAACAGGCAGTTG	57

Πίνακας 3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξωνίων των γονιδίων *SPINK6* και *SPINK9*.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Tm εκκινητή (°C)
Spink6_exon1_Fw	A GGATGTATTG GTTGTTAGG	53,2
Spink6_exon1_Rv	CTACTCATCATATCCAGTTC	53,2
Spink6_exon2_Fw	GTACATCAATGAATTACAGTG	52
Spink6_exon2_Rv	GCCAG GAA GATCAAGCC	55,2
Spink6_exon3_Fw	TGCACTGATGTCAATGTCAC	55,3
Spink6_exon3_Rv	GCAAGGGTCAGCTTTGATG	56,7
Spink6_exon4_Fw	GGTGAGTACTTA CGATATTGC	55,9
Spink6_exon4_Rv	CAGGCAGAGTAGGTATGTCT	57,3
Spink9_exon1_Fw	CCTACATC TGACTGCCTTG	56,7
Spink9_exon1_Rv	GAC TGCATGAGCTATTAGTAC	55,9
Spink9_exon2_Fw	GACAG GCTGAAAGCTAAAGC	57,3
Spink9_exon2_Rv	CCACCTTGTTCTACTCTCTC	57,3
Spink9_exon3_Fw	ACATGCATTG AGAGCCCTC	56,7
Spink9_exon3_Rv	CTG TTT GTT AGA GAC AGT ATG	54
Spink9_exon4_Fw	GGCTCAGCATTCTCATTG	55,3
Spink9_exon4_Rv	GGCTCAGCATTCTCATTG	56,7

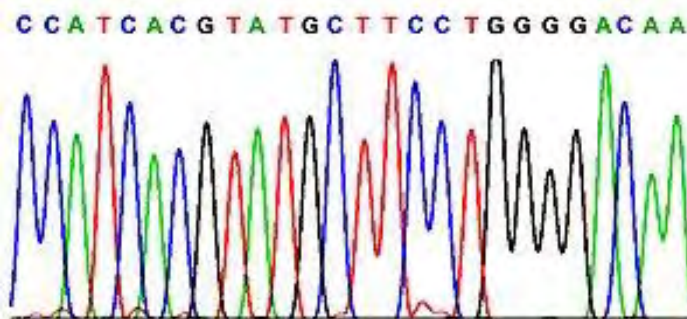
* Αυτοί οι εκκινητές προέρχονται από το άρθρο των Bitoun *et al* (2002) ενώ οι υπόλοιποι σχεδιάστηκαν εκ νέου βάσει της γενωμικής αλληλουχίας, Όλοι οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι να υβριδοποιούνται σε ιντρονιακές αλληλουχίες.

^ Τα εξόνια 6-7, 14-15, 19-20 και 25-26 ενισχύθηκαν σε ένα προϊόν PCR

Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Taq πολυμεράση κ.τ.λ. και στη συνέχεια αποστάλθηκαν στην εταιρεία CEMIA για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου αξιολογείται και εξάγεται η αλληλουχία.

Η τεχνική της αλληλούχησης σήμερα βασίζεται σε μια παραλλαγή της μεθόδου Sanger. Η αλληλούχηση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, οπότε και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά λαμβάνεται η αλληλουχία, με τη μορφή χρωματογραφήματος (ενδεικτικά, εικ 19).



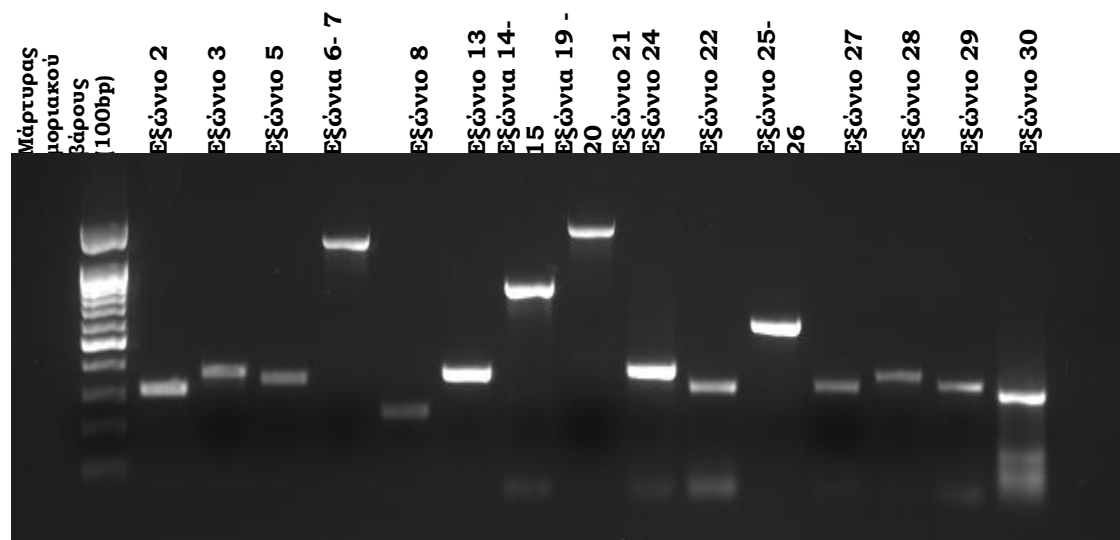
Εικόνα 19. Αλληλουχία με τη μορφή χρωματογραφήματος.

Για τη διασφάλιση μεγαλύτερης αξιοπιστίας όσον αφορά τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, χρησιμοποιήθηκαν και οι δυο εκκινητές για το κάθε εξόνιο στην αντίδραση αλληλούχησης. Τα δυο χρωματογραφήματα που ελήφθησαν για κάθε δείγμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit, οι αλληλουχίες στοιχίστηκαν με το πρόγραμμα ClustalX και τελικά προέκυψε η τελική αλληλουχία του κάθε δείγματος. Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίθηκαν με μία πρότυπη αλληλουχία (NCBI Reference Sequence: NC_000005.9) από τη βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Η σύγκριση μεταξύ των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο BLAST (b12seq, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ενίσχυση των εξωνίων του γονιδίου *SPINK5* με PCR

Τα προϊόντα της PCR των εξωνίων του γονιδίου *SPINK5* ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 2% (Εικ. 20). Τα ακριβή μεγέθη των προϊόντων PCR φαίνονται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 20. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται το/τα εξώνιο/-α που έχουν ενισχυθεί.

Πίνακας 4. Μεγέθη προϊόντων PCR.

Εξώνιο	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Εξώνιο	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
1	221	18	374
2	316	19-20	1447
3	367	21	429
4	324	22	338
5	345	23	377
6-7	1254	24	329
8	240	25-26	604
9	370	27	331
10	289	28	391
11	271	28a	194
12	308	29	342
13	366	30	324
14-15	829	31	368
16	373	32	354
17	378	33	373

Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR αλληλουχήθηκαν και οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με μία πρότυπη αλληλουχία (NCBI Reference Sequence: NC_000005.9).

Η παράθεση των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στις κωδικές περιοχές του γονιδίου και σε μικρά τμήματα ιντρονιακών αλληλουχιών εκατέρωθεν των εξονίων, με την πρότυπη αλληλουχία, αποκάλυψε 11 ετερόζυγες παραλλαγές-μεταλλάξεις τόσο σε εξώνια όσο και σε ορισμένες ιντρονιακές περιοχές. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν δύο πολυμορφισμοί (SNPs) σε ομοζυγωτία.

Πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις σε κωδικές περιοχές του *SPINK5*

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις κωδικές περιοχές, εντοπίστηκαν 3 μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία σε τρία εξώνια του γονιδίου *SPINK5*:

- Στο εξώνιο 5, στο νουκλεοτίδιο 22467 της γενωμικής αλληλουχίας (NCBI Reference Sequence: NC_000005.9, θεωρώντας ως πρώτο νουκλεοτίδιο την αδενίνη του κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, ATG), η ασθενής φέρει την ετεροζυγωτία A/G. Η αδενίνη οδηγεί στην αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος από ασπαραγίνη στη θέση 106 της πρωτεΐνης LEKTI (D106N).
- Στο εξώνιο 13, στη θέση 36546 εντοπίστηκε η ετεροζυγωτία A/G. Και σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία της αδενίνης σε αυτή τη θέση, οδηγεί στην αντικατάσταση ενός ασπαρτικού οξέος από μία ασπαραγίνη στη θέση 386 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (D386N).

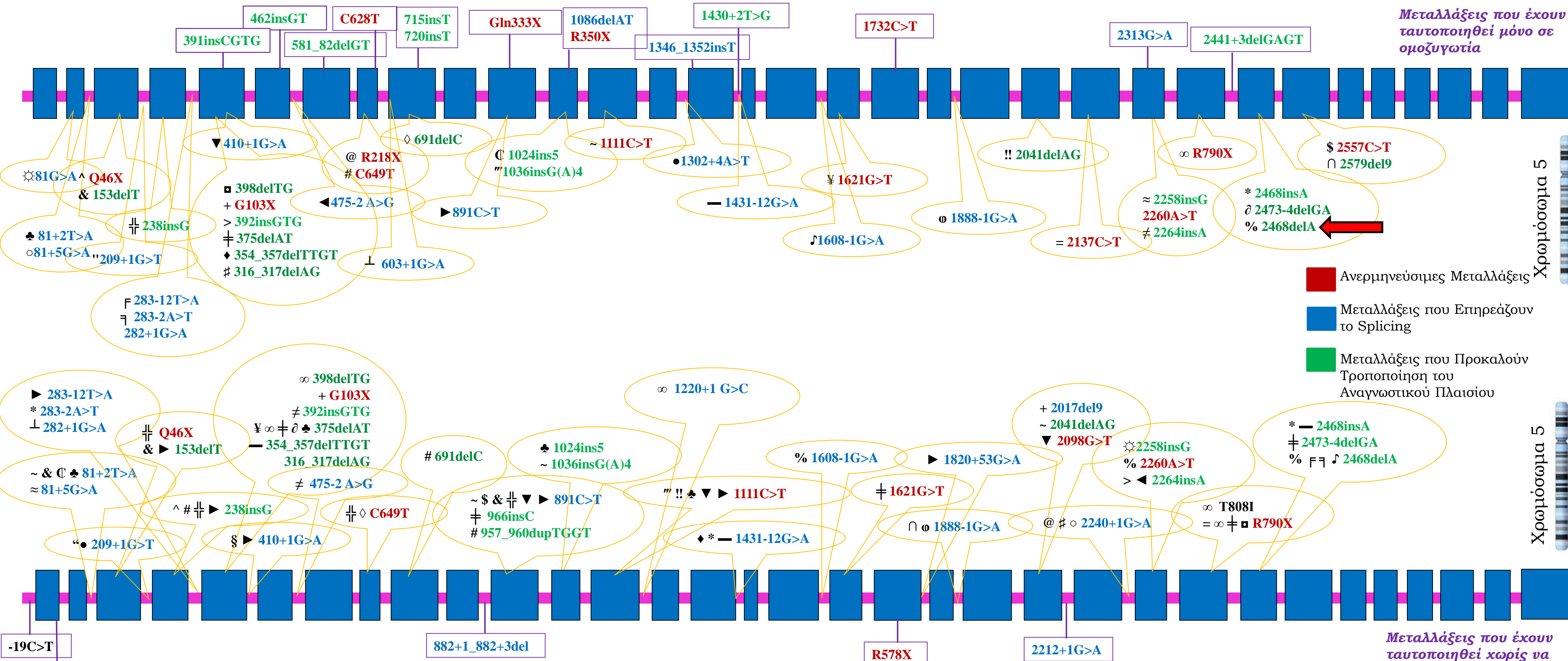
Οι παραλλαγές που εντοπίστηκαν στα εξώνια 5 και 13 έχουν αναφερθεί στη SNP Database ως πολυμορφισμοί και επειδή έχουν ταυτοποιηθεί και σε ομοζυγωτία δεν μπορούν να συσχετιστούν με το σύνδρομο. Ειδικότερα, ο πολυμορφισμός D106N (rs17860502) έχει βρεθεί σε ομοζυγωτία σε 13 άτομα βάσει μίας μελέτης 662 ατόμων από την Ευρώπη (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Ο πολυμορφισμός D386N (rs2303064) ταυτοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Χαρτογράφησης Απλοτύπων (HarMap Project) σε διάφορους πληθυσμούς και με διαφορετικές συχνότητες. Και ο πολυμορφισμός αυτός έχει ταυτοποιηθεί σε ομοζυγωτία με συχνότητα που κυμαίνεται από 1,7% έως 31,9% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, εικ. 23) και συνεπώς δεν μπορεί να συσχετισθεί με τον παθολογικό φαινότυπο. Ωστόσο, αυτά τα δύο SNPs, καθώς επίσης και τα rs17718511, rs60978485, rs17718737 και rs1422985 όπως και ο απλότυπος TAA στο γονίδιο *SPINK5*, που περιλαμβάνει τους πολυμορφισμούς rs60978485, rs6892205 και rs2303064, έχουν συσχετισθεί με ατοπική δερματίτιδα (Hubiche *et al* 2007, Namkung *et al* 2010). Επιπλέον, στην ίδια μελέτη φάνηκε πως

τέσσερις από αυτούς τους πολυμορφισμούς (rs17718511, rs17860502, rs60978485, rs17718737) και ο απλότυπος TAA εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με την ανάπτυξη του αλλεργικού τύπου της ατοπικής δερματίτιδας (Namkung *et al.*, 2010). Η ατοπική δερματίτιδα είναι ένα πολύ συχνό σύμπτωμα του συνδρόμου Netherton.

- Στο εξώνιο 26 ταυτοποιήθηκε σε ετεροζυγωτία η **απαλοιφή** μίας αδενίνης στη θέση 56341–56350 της γενωμικής αλληλουχίας (Εικ. 21, 22). Στην περιοχή αυτή φυσιολογικά υπάρχουν δέκα συνεχόμενες αδενίνες, γεγονός που πιθανώς την καθιστά επιρρεπή σε προσθήκη ή απαλοιφή μιας βάσης κατά την αντιγραφή. Η απαλοιφή της αδενίνης οδηγεί σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και εμφάνιση κωδικονίου λήξης 26 αμινοξέα από τη θέση της μετάλλαξης.

Η μετάλλαξη αυτή, που αναφέρεται ως 2458delA ή 2468delA στη βιβλιογραφία, έχει αναγνωριστεί σε ομοζυγωτία σε δύο ασθενείς (Renner *et al.*, 2009). Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί σε ετεροζυγωτία με τις μεταλλάξεις 2260A>T (στο εξώνιο 24, Chao *et al.*, 2003) και 1608-1G>A (στο ιντρόνιο 17, Bitoun *et al.*, 2002) ενώ έχει ταυτοποιηθεί σε ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με σύνδρομο Netherton, χωρίς να έχει βρεθεί κάποια άλλη μετάλλαξη (Bitoun *et al.*, 2002). Η επίπτωση αυτής της μετάλλαξης στο πρωτεϊνικό προϊόν, δηλαδή αν οδηγεί σε παραγωγή πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους ή αν δεν παράγεται καθόλου πρωτεΐνη λόγω αποικοδόμησης του RNA, το οποίο περιλαμβάνει πρώιμο κωδικόνιο τερματισμού της μετάφρασης (nonsense-mediated RNA decay), δεν έχει προσδιοριστεί. Ωστόσο, η μετάλλαξη 2458insA, που εντοπίζεται ακριβώς στην ίδια θέση αλλά αφορά σε προσθήκη και όχι σε απαλοιφή μίας αδενίνης, έχει ως συνέπεια την αποικοδόμηση του RNA που παράγεται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (Bitoun *et al.* 2002). Στην περίπτωση της μετάλλαξης 2458insA, η μετάφραση λήγει 4 αμινοξέα μετά τη θέση ένθεσης ενώ στην 2458delA, το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης συνεχίζεται για άλλα 26 αμινοξέα. Συνεπώς, είναι πιθανόν και η 2458delA να οδηγεί σε αποικοδόμηση του RNA, γεγονός που συνάδει με τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης του συνδρόμου.

- Στο εξώνιο 10 στη θέση 31852 της γενωμικής αλληλουχίας εντοπίστηκε σε ομοζυγωτία η αντικατάσταση μίας γουανίνης από μία αδενίνη (rs6892205), η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της γλουταμίνης στη θέση 267 από μία αργινίνη (R267Q)

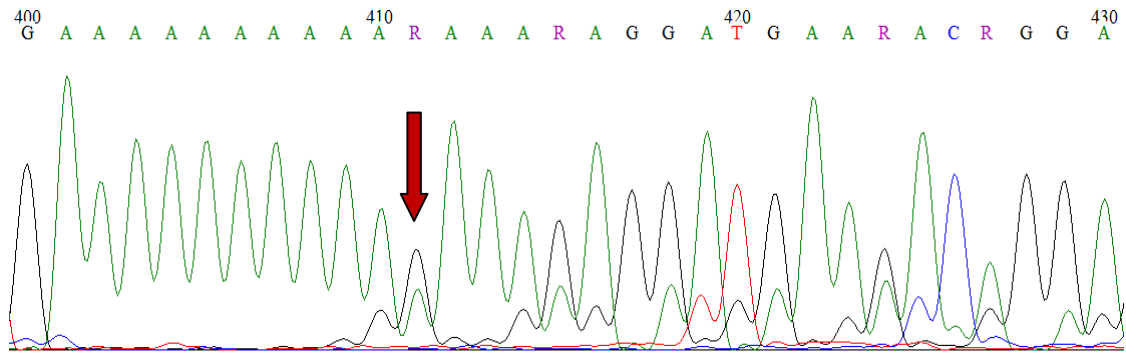


Εικόνα 22. Όλες οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο SPINK5 σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton. Φαίνονται και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου. Οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν μόνο σε ομοζυγωτία και αυτές, οι οποίες δε συνδυάζονται με κάποια άλλη, φαίνονται εκατέρωθεν του σχήματος (πάνω και κάτω αντίστοιχα). Τα σύμβολα που συνοδεύουν τις μεταλλάξεις δείχνουν τους σύνθετους ετεροζυγώτες (μέση). Το βέλος υποδεικνύει τη μετάλλαξη που ταυτοποιήθηκε στην ασθενή.

Ο πολυμορφισμός rs6892205 έχει βρεθεί σε ομοζυγωτία σε έναν ασθενή με σύνδρομο Netherton από την Ταϊβάν (Lin et al 2007) χωρίς όμως να συνυπάρχει κάποια άλλη μετάλλαξη. Επίσης η παρουσία της γουανίνης (G) έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μη ατοπικής δερματίτιδας εντοπισμένης στα χέρια (Lan et al., 2011). Ωστόσο, αυτός ο πολυμορφισμός αναγνωρίστηκε σε ομοζυγωτία στα πλαίσια του HarMap Project σε διάφορους πληθυσμούς (1137 άτομα) με συχνότητα που κυμαίνεται από 12,2% έως 39% και συνεπώς δεν μπορεί να συσχετισθεί από μόνος του με την εκδήλωση του συνδρόμου.

- Στο εξώνιο 14, στη θέση 37421 της γενωμικής αλληλουχίας, εντοπίστηκε σε ομοζυγωτία αντικατάσταση μίας γουανίνης από μία αδενίνη (rs2303067) η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση του γλουταμικού οξέως στη θέση 420 από μία λυσίνη (E420K).

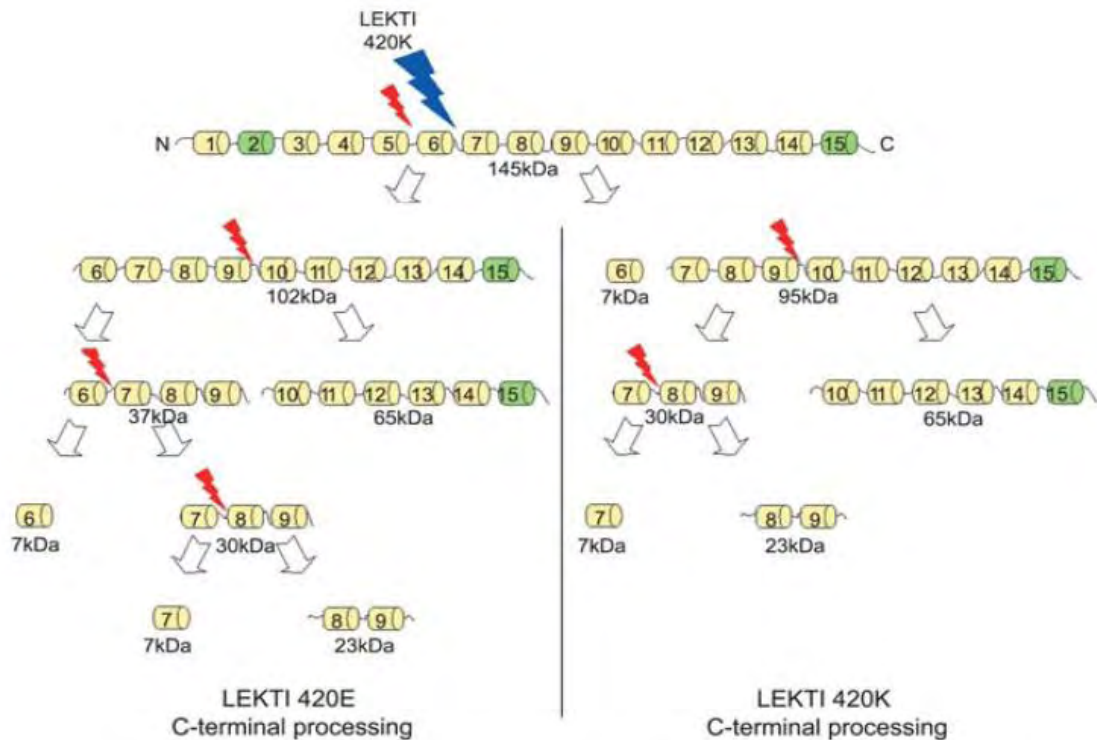
Ο πολυμορφισμός E420K επιταχύνει την πρωτεόλυση της συνδευτικής περιοχής των επικρατειών D6 και D7 από τη φουρίνη με αποτέλεσμα την απουσία του θραύσματος 37 kDa D6-D9 και την ακόλουθη συσσώρευση των υποπροϊόντων D7-D9 (30 kDa) και D8-D9 (23 kDa) (Fortugno et al., 2012). Η αυξημένη πρωτεόλυση επηρεάζει και τις τρεις ισομορφές της LEKTI, οι οποίες διαφέρουν μόνο στο καρβοξυτελικό τους τμήμα. Αυτό το βήμα προηγείται της καθορισμένης διάσπασης μεταξύ των επικρατειών D9 και D10 και οδηγεί στη δημιουργία ενός νέου ενδιάμεσου θραύσματος 95 kDa που περιέχει τις επικράτειες D7-D15 και όχι τις D6-D15 (Εικ. 24). Συνεπώς, η παραλλαγή 420K οδηγεί τόσο σε έλλειψη του βιοδραστικού θραύσματος D7-D9 όσο και σε αύξηση της ποσότητας του θραύσματος D8-D9 (Fortugno et al., 2012). Η έλλειψη του θραύσματος των 37 kDa της LEKTI που περιλαμβάνει τις επικράτειες D6-D9, διαταράσσει τη ρύθμιση της KLK5 οδηγώντας στην υπερλειτουργία της. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η ενίσχυση της αποικοδόμησης της δεσμογλεΐνης 1 και της προφίλαγγρίνης και κατ' επέκταση η αλλοίωση του δερματικού φραγμού. Επίσης είναι πιθανό, πως η τροποποίηση της πρωτεόλυσης της LEKTI επηρεάζει την ανασταλτική της ικανότητα ενάντια σε εξωγενείς πρωτεάσες που προέρχονται από αλλεργιογόνα και τον *Staphylococcus aureus*, καθώς και τη δράση της στο μονοπάτι της φλεγμονής που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα PAR-2 (Fortugno et al., 2012). Η ανεξέλεγκτη δράση της KLK5 οδηγεί στις αλλεργικές εκδηλώσεις που παρατηρούνται στο σύνδρομο Netherton, μέσω του προ-αλλεργικού μονοπατιού KLK5-PAR2-TSLP (βλ. παράγραφο *Φλεγμονή και αλλεργίες σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton*). Παρόλα αυτά, όμως, ο πολυμορφισμός E420K αναγνωρίστηκε σε ομοζυγωτία στα πλαίσια του HarMap Project σε διάφορους πληθυσμούς (~1200 άτομα), με συχνότητα εμφάνισης από 14% έως 68,1%. Συνεπώς δεν μπορεί να συσχετισθεί από μόνος του με την εκδήλωση του συνδρόμου.



Εικόνα 21. Τμήμα της αλληλουχίας του εξωνίου 26 με μορφή χρωματογραφήματος. Το βέλος δείχνει τη θέση της ετεροζυγωτίας. Το γράμμα R συμβολίζει τη συνύπαρξη μίας αδενίνης και μίας γουανίνης. Κάτω από το βασικό χρωματογράφημα φαίνεται ένα δεύτερο μετατοπισμένο κατά μία βάση από το προηγούμενο. Αυτό οφείλεται στην απαλοιφή της αδενίνης.

Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Genotype Detail					Alleles	
		A	A/A	A/G	G/G	HWP	A	G
European	120	0.017	0.150	0.833	0.479	0.092	0.908	
Asian	90	0.200	0.511	0.289	1.000	0.456	0.544	
Asian	90	0.133	0.578	0.289	0.251	0.422	0.578	
Sub-Saharan African	120	0.283	0.550	0.167	0.403	0.558	0.442	
European	226	0.018	0.168	0.814	0.403	0.102	0.898	
Asian	86	0.186	0.512	0.302	1.000	0.442	0.558	
Asian	172	0.105	0.593	0.302	0.050	0.401	0.599	
Sub-Saharan African	226	0.319	0.513	0.168	0.655	0.575	0.425	
	98	0.265	0.469	0.265	0.752	0.500	0.500	
Asian	82	0.244	0.488	0.268	1.000	0.488	0.512	
	170	0.212	0.459	0.329	0.527	0.441	0.559	
	176	0.125	0.489	0.386	0.655	0.369	0.631	
	180	0.222	0.489	0.289	1.000	0.467	0.533	
	100	0.060	0.160	0.780	0.020	0.140	0.860	
	286	0.161	0.497	0.343	0.752	0.409	0.591	
	174	0.011	0.322	0.667	0.251	0.172	0.828	

Εικόνα 23. Ενδεικτική απεικόνιση από την SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) των συχνοτήτων εμφάνισης γονοτύπων και αλληλομόρφων ενός πολυμορφισμού που προσδιορίστηκαν σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες στο πλαίσιο του HarMap Project. Σε αυτήν την περίπτωση, οι πληροφορίες αφορούν τον πολυμορφισμό rs17860502 (D386N).



Εικόνα 24. Σύγκριση της πρωτεόλυσης που υφίστανται οι δύο παραλλαγές της LEKTI. Αριστερά, φαίνεται η παραγωγή των διάφορων θραυσμάτων που προκύπτουν στην παραλλαγή 420E και δεξιά φαίνονται τα αντίστοιχα θραύσματα που προκύπτουν στην παραλλαγή 420K. Παρουσία της 420K, δεν παράγεται το θραύσμα D6-D15 και κατ' επέκταση το θραύσμα D6D9 (Fortugno *et al*, 2012).

Πολυμορφισμοί/μεταλλάξεις σε μη κωδικές περιοχές του *SPINK5*

Όσον αφορά τις παραλλαγές που εντοπίστηκαν σε ιντρονιακές περιοχές, καμία από αυτές δεν επηρεάζει τις αυστηρά συντηρημένες θέσεις splicing στα όρια των ιντρονίων-εξωνίων. Οι οκτώ συνολικά μεταλλάξεις αφορούν τα ιντρόνια 2, 3, 6, 7, 14 και 19. Ειδικότερα:

- Στο ιντρόνιο 2 αναγνωρίστηκαν δύο ετερόζυγες παραλλαγές, εντοπισμένες σε απόσταση μεγαλύτερη των 50bp από την τελευταία βάση του εξωνίου 2 και μία παραλλαγή σε ετεροζυγωτία στο τέλος του ιντρονίου, 31 νουκλεοτίδια από την αρχή του εξωνίου 3. Η πρώτη μετάλλαξη αφορά την αντικατάσταση μιας γουανίνης από μία αδενίνη στη θέση 1455 της γενωμικής αλληλουχίας, η δεύτερη

μιας κυτοσίνης από μία γουανίνη στη θέση 1489 και η τρίτη μίας αδενίνης από μία γουανίνη στη θέση 6321.

- Στο ιντρόνιο 3 βρέθηκε μία παραλλαγή (αντικατάσταση μίας κυτοσίνης από μία θυμίνη) σε ετεροζυγωτία σε απόσταση 15 νουκλεοτιδίων από το τέλος του εξωνίου 3.
- Στο ιντρόνιο 6 βρέθηκαν δύο παραλλαγές σε ετεροζυγωτία στη θέση 24865-24875 και 25484 της γενωμικής αλληλουχίας. Η πρώτη αφορά την απαλοιφή μίας αδενίνης και απέχει περισσότερα από 50 νουκλεοτιδία από τα όρια του ιντρονίου. Στις θέσεις αυτές, φυσιολογικά υπάρχουν έντεκα αδενίνες στη σειρά, γεγονός που ευνοεί την προσθήκη ή την απαλοιφή μίας βάσης κατά την αντιγραφή. Η δεύτερη παραλλαγή βρίσκεται στο τέλος του ιντρονίου 6, 39 νουκλεοτιδία από την αρχή του εξωνίου 7, και αφορά την αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία γουανίνη.
- Στο ιντρόνιο 7 βρέθηκε μία παραλλαγή σε ετεροζυγωτία στη θέση 27145 της γενωμικής αλληλουχίας, η οποία αφορά την αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία θυμίνη.
- Στο ιντρόνιο 14 εντοπίστηκε μία παραλλαγή σε ετεροζυγωτία στη θέση 37551 της γενωμικής αλληλουχίας, σε απόσταση μεγαλύτερη των 50 νουκλεοτιδίων από το τέλος του εξωνίου 14, που αφορά την αντικατάσταση μίας αδενίνης από μία κυτοσίνη.
- Στο ιντρόνιο 19, στη θέση 47998 της γενωμικής αλληλουχίας, εντοπίστηκε σε ετεροζυγωτία η αντικατάσταση μίας θυμίνης από μία κυτοσίνη σε απόσταση μεγαλύτερη των 50 νουκλεοτιδίων από το τέλος του εξωνίου 19.

Οι μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν σε ιντρονιακές περιοχές, παρόλο που δεν επηρεάζουν τις αυστηρά συντηρημένες θέσεις splicing στα όρια ιντρονίων-εξονίων, ίσως δημιουργούν νέες θέσεις ή ενεργοποιούν κρυπτικές θέσεις, με αποτέλεσμα την τροποποίηση του splicing και κατ' επέκταση της κωδικής αλληλουχίας. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται σε μία μελέτη (Lacroix *et al*, 2012) στην οποία προσδιορίστηκε ότι οι μεταλλάξεις 283-12T>A (ιντρόνιο 4, 12 νουκλεοτιδία ανοδικά του ορίου του εξωνίου 5) και 1820+53G>A (ιντρόνιο 19, 53 νουκλεοτιδία καθοδικά του εξωνίου 19) στο γονίδιο SPINK5 σε ασθενείς με NS ενεργοποιούσαν κρυπτικές θέσεις splicing. Ειδικότερα, η πρώτη μετάλλαξη είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των 10 τελευταίων νουκλεοτιδίων του ιντρονίου 4 στο ώριμο μετάγραφο και η δεύτερη των 54 πρώτων νουκλεοτιδίων του ιντρονίου 19.

Στις μη μεταφραζόμενη περιοχή, και ειδικότερα στην 3' UTR, εντοπίστηκαν δύο παραλλαγές. Ειδικότερα:

- Οι παραλλαγές εντοπίζονται σε ομοζυγωτία στα νουκλεοτιδία 73064 και 73228 της γενωμικής αλληλουχίας. Η πρώτη +44T>C (το +44

υποδεικνύει το νουκλεοτίδιο που βρίσκεται 44 νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης ή rs4349706 έχει ταυτοποιηθεί σε ομοζυγωτία στο HarMap Project (~σε 1000 άτομα) με συχνότητα εμφάνισης που κυμαίνεται από 8% έως 54% και συνεπώς δεν είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του συνδρόμου. Για τη δεύτερη (+208C>G ή rs3088193) δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες στην SNP DataBase σχετικά με τη συχνότητα εμφάνισής της στον πληθυσμό. Έχουν μελετηθεί μόνο 7 άτομα και ο πολυμορφισμός ταυτοποιήθηκε σε ομοζυγωτία σε ένα μόνο από αυτά. Γενικά, οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην 3' UTR πιθανώς επηρεάζουν τη σταθερότητα του μεταγράφου οδηγώντας σε ταχύτερη αποικοδόμηση του mRNA και ελλατωμένη μετάφρασή του.

Προσδιορισμός απλοτύπου ασθενούς

Το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη 2458delA οδηγεί σε αλλαγή του αναγνωστικού πλαισίου στο εξώνιο 26, το οποίο φυσιολογικά κωδικοποιεί τη συνδετική περιοχή μεταξύ των επικρατειών D12 και D13. Το αποτέλεσμα αυτής της μετάλλαξης είτε είναι μία πρωτεΐνη μικρότερου μοριακού βάρους (που στερείται τις επικράτειες D13-D15) είτε η έλλειψη προϊόντος από αυτό το αλληλόμορφο λόγω αποικοδόμησης του RNA. Η απαλοιφή αυτής της αδενίνης θα μπορούσε πιθανώς να αιτιολογήσει τον παθολογικό φαινότυπο της ασθενούς εάν οι μεταλλάξεις, ή ορισμένες από αυτές, που έχουν εντοπιστεί σε ετεροζυγωτία τόσο σε εξωνιακές όσο και σε ιντρονιακές περιοχές ταυτοποιούνται σε διαφορετικό αλληλόμορφο. Για αυτόν τον λόγο, η μητέρα της ασθενούς ελέγχθηκε για τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στην ασθενή. Η αλληλούχηση υπέδειξε πως έφερε σε ετεροζυγωτία την 2458delA και σε ομοζυγωτία τον πολυμορφισμό E420K στο εξώνιο 14. Δε βρέθηκε να φέρει κάποια από τις άλλες παραλλαγές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως όλες οι παραλλαγές που ταυτοποιήθηκαν εντοπίζονται στο πατρικό αλληλόμορφο (δείγμα από τον πατέρα δεν ήταν διαθέσιμο για ανάλυση κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας). Ο πολυμορφισμός E420K έχει βρεθεί πως επηρεάζει την πρωτεόλυση της LEKTI και έχει ταυτοποιηθεί σε ομοζυγωτία σε έναν ασθενή με NS συνδυαστικά με τη 2458insA (σε ετεροζυγωτία), η οποία οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης, όπως και στο περιστατικό που μελετάται σε αυτή την εργασία. Παρόλα αυτά όμως, η μητέρα της ασθενούς φέρει επίσης σε ομοζυγωτία τον πολυμορφισμό αυτό συνδυαστικά με την 2458delA (παρόμοια με την ασθενή) χωρίς να είναι όμως προσβεβλημένη. Συνεπώς, φαίνεται πως αυτές οι δύο μεταλλάξεις/παραλλαγές δεν επαρκούν για την εμφάνιση του συνδρόμου

και πιθανώς κάποια άλλη από τις μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν συνεισφέρει στον φαινότυπο.

Διερεύνηση μεταλλάξεων στα γονίδια SPINK6 και SPINK9

Η αδυναμία ταυτοποίησης παθογόνων μεταλλάξεων και στα δύο αλληλόμορφα στην ασθενή, οδήγησε στη διερεύνηση μεταλλάξεων σε δύο άλλα γονίδια, τα *SPINK6* και *SPINK9*, που εντοπίζονται στην ίδια χρωμοσωματική θέση με το *SPINK5*. Η επιλογή τους βασίστηκε στο γεγονός ότι χαρτογραφούνται μέσα στα όρια της κρίσιμης περιοχής, που είχε προσδιοριστεί με ανάλυση γενετικής σύνδεσης, για το σύνδρομο Netherton, ανήκουν στην ίδια λειτουργική οικογένεια αναστολέων πρωτεασών σερίνης, όπως και το *SPINK5*, και εκφράζονται στο δέρμα. Ωστόσο, η αλληλούχηση των κωδικών περιοχών τους στην ασθενή δεν αποκάλυψε κάποια μετάλλαξη, συγκριτικά με την πρότυπη αλληλουχία (*SPINK6*, Gene ID: 404203, *SPINK9*, Gene ID: 643394) και με δύο άτομα ελέγχου.

Μελλοντικοί στόχοι

Συνοψίζοντας, η ασθενής με σύνδρομο Netherton που μελετήθηκε, βρέθηκε ετερόζυγη για τη μετάλλαξη 2468delA, που δημιουργεί ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης και συνεπώς μπορεί να θεωρηθεί παθογόνος. Η μετάλλαξη αυτή ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε ασθενή από την Ελλάδα. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν διάφορες παραλλαγές, τόσο σε ομοζυγωτία όσο και σε ετεροζυγωτία, που θα μπορούσαν πιθανώς να συνεισφέρουν στον παθολογικό φαινότυπο. Για κάποιες από αυτές υπάρχουν πληροφορίες, που αντλήθηκαν από SNP database, οι οποίες αναφέρουν ότι οι συγκεκριμένες παραλλαγές έχουν ταυτοποιηθεί σε ομοζυγωτία σε ορισμένους πληθυσμούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι, τουλάχιστον από μόνες τους, δεν ευθύνονται για την εμφάνιση του παθολογικού φαινοτύπου. Ωστόσο, κάποια από τις παραλλαγές αυτές, η οποία εντοπίζεται στο αλληλόμορφο πατρικής προέλευσης, όπως δείχθηκε με γονοτύπηση της μητέρας της ασθενούς, θα μπορούσε συνδυαστικά με την 2468delA να ευθύνεται για το σύνδρομο. Η ζητούμενη παραλλαγή δεν μπορεί να είναι η E420K, παρόλο που έχει δείχθει ότι οδηγεί σε αυξημένη πρωτεόλυση της LEKTI, επειδή η ομοζυγωτία της σε συνδυασμό με την 2468delA ταυτοποιήθηκαν και στη μητέρα της ασθενούς. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στις ιντρονιακές περιοχές, παρόλο που δεν επηρεάζουν της υψηλά συντηρημένες θέσεις splicing, ενδέχεται να ενεργοποιούν κρυπτικές θέσεις οι οποίες να εμφανίζουν μεγαλύτερη ισχύ

από τις υπάρχουσες, τροποποιώντας το splicing του mRNA, όπως έχει ήδη δειχθεί για ιντρονιακές μεταλλάξεις του *SPINK5*. Για την απόδειξη αυτής της θεωρίας πρέπει να εξεταστούν τα μετάγραφα του γονιδίου *SPINK5* της ασθενούς. Για την πραγματοποίηση αυτού, απαραίτητη είναι η λήψη κερατινοκυττάρων από την ασθενή και η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε προϊόν αντίστροφης μεταγραφής από RNA κερατινοκυττάρων (RT-PCR). Η λήψη δείγματος κερατινοκυττάρων δεν κατέστη δυνατή κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η διερεύνηση μεταλλάξεων σε ασθενείς με σύνδρομο Netherton από την Ελλάδα, δύναται να οδηγήσει σε πιο στοχευμένο έλεγχο σε προγεννητικό επίπεδο, όταν υφίσταται κίνδυνος γέννησης παιδιού που φέρει το σύνδρομο. Επίσης, η δημιουργία στοχευμένων γενετικών ελέγχων για την ταυτοποίηση του συνδρόμου Netherton, μπορεί να βοηθήσει στην ορθή διάγνωση του, κατά τους πρώτους μήνες ζωής του ασθενούς, όταν ακόμα τα συμπτώματα δεν είναι σαφή και η ύπαρξη του συνδρόμου Netherton δεν αναγνωρίζεται.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ Alpigliani MG, Salvati P, Schiaffino MC, Occella C, Castiglia D, Covaciu C, Lorini R. (2012). A new SPINK5 mutation in a patient with Netherton syndrome: a case report. *Pediatr Dermatol.* 29(4):521-2.
- ❖ ^aChavanas S, Garner C, Bodemer C, Ali M, Teillac DH, Wilkinson J, Bonafé JL, Paradisi M, Kelsell DP, Ansai Si, Mitsuhashi Y, Larrègue M, Leigh IM, Harper JI, Taïeb A, Prost Yd, Cardon LR, Hovnanian A. (2000). Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet.* 66(3):914-21.
- ❖ ^bChavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, Bonafé JL, Wilkinson J, Taïeb A, Barrandon Y, Harper JI, de Prost Y, Hovnanian A. (2000). Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet.* 25(2):141-2.
- ❖ Bingol B, Tasdemir S, Gunenc Z, Abike F, Esenkaya S, Tavukcuoglu S, Berkil H. (2011). Prenatal diagnosis of Comel-Netherton syndrome with PGD, case report and review article. *J Assist Reprod Genet.* 28(7):615-20. doi: 10.1007/s10815-011-9568-y. Epub 2011 May 4.
- ❖ Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lonie L, Bodemer C, Paradisi M, Hamel-Teillac D, Ansai S, Mitsuhashi Y, Taïeb A, de Prost Y, Zambruno G, Harper JI, Hovnanian A. (2002). Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol.* 118(2):352-61.
- ❖ Capri Y, Vanlieferinghen P, Boeuf B, Dechelotte P, Hovnanian A, Lecomte B. (2011). A lethal variant of Netherton syndrome in a large inbred family. *Arch Pediatr.* 18(3):294-8. doi: 10.1016/j.arcped.2010.12.005. Epub 2011 Jan 20.
- ❖ Chao SC, Richard G, Lee JY. (2005). Netherton syndrome: report of two Taiwanese siblings with staphylococcal scalded skin syndrome and mutation of SPINK5. *Br J Dermatol.* 152(1):159-65.
- ❖ Chao SC, Tsai YM, Lee JY. (2003). A compound heterozygous mutation of the SPINK5 gene in a Taiwanese boy with Netherton syndrome. *J Formos Med Assoc.* 102(6):418-23.
- ❖ Chao SC, Richard G, Lee JY. (2005). Netherton syndrome: report of two Taiwanese siblings with staphylococcal scalded skin syndrome and mutation of SPINK5. *Br J Dermatol.* 152(1):159-65.
- ❖ Comel-Netherton syndrome defined as primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 124(3):536-43.
- ❖ Di WL, Hennekam RC, Callard RE, Harper JI. (2009). A heterozygous null mutation combined with the G1258A polymorphism of SPINK5 causes impaired LEKTI function and abnormal expression of skin barrier proteins. *Br J Dermatol.* 161(2):404-12.
- ❖ Fong K, Akdeniz S, Isi H, Taskesen M, McGrath JA, Lai-Cheong JE. (2011). New homozygous SPINK5 mutation, p.Gln333X, in a Turkish pedigree with Netherton syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 36(4):412-5.

- ❖ Fortugno P, Grosso F, Zambruno G, Pastore S, Faletra F, Castiglia D. (2012). A synonymous mutation in SPINK5 exon 11 causes Netherton syndrome by altering exonic splicing regulatory elements. *J Hum Genet.* 57(5):311-5.
- ❖ Genetic analysis of a severe case of Netherton syndrome and application for prenatal testing. *Br J Dermatol.* 146(3):495-9.
- ❖ Hachem JP, Wagberg F, Schmuth M, Crumrine D, Lissens W, Jayakumar A, Houben E, Mauro TM, Leonardsson G, Brattsand M, Egelrud T, Roseeuw D, Clayman GL, Feingold KR, Williams ML, Elias PM. (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol.* 126(7):1609-21. Epub 2006 Apr 6.
- ❖ Hachem JP, Wagberg F, Schmuth M, Crumrine D, Lissens W, Jayakumar A, Houben E, Mauro TM, Leonardsson G, Brattsand M, Egelrud T, Roseeuw D, Clayman GL, Feingold KR, Williams ML, Elias PM. (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol.* 126(7):1609-21. Epub 2006 Apr 6.
- ❖ Hosomi N, Fukai K, Nakanishi T, Funaki S, Ishii M. (2008). Caspase-1 activity of stratum corneum and serum interleukin-18 level are increased in patients with Netherton syndrome. *Br J Dermatol.* 159(3):744-6.
- ❖ Hubiche T, Ged C, Benard A, Léauté-Labrèze C, McElreavey K, de Verneuil H, Taïeb A, Boralevi F. (2007). Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol.* 87(6):499-505.
- ❖ Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, Bitoun E, Robinson R, O'Brien TJ, Wakamatsu K, Ohtsubo S, Takahashi H, Hashimoto Y, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Iizuka H, Richard G, Hovnanian A. (2005). LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *J Invest Dermatol.* 124(2):360-6.
- ❖ Kilic G, Guler N, Ones U, Tamay Z, Guzel P. (2006). Netherton syndrome: report of identical twins presenting with severe atopic dermatitis. *Eur J Pediatr.* 165(9):594-7.
- ❖ Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, Saijoh K. (2002). Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *J Invest Dermatol.* 118(3):436-43.
- ❖ Lacroix M, Lacaze-Buzy L, Furio L, Tron E, Valari M, Van der Wier G, Bodemer C, Bygum A, Bursztejn AC, Gaitanis G, Paradisi M, Stratigos A, Weibel L, Deraison C, Hovnanian A. (2012). Clinical expression and new SPINK5 splicing defects in Netherton syndrome: unmasking a frequent founder synonymous mutation and unconventional intronic mutations. *J Invest Dermatol.* 132(3 Pt 1):575-82.
- ❖ Lin SP, Huang SY, Tu ME, Wu YH, Lin CY, Lin HY, Lee-Chen GJ. (2007). Netherton syndrome: mutation analysis of two Taiwanese families. *Arch Dermatol Res.* 299(3):145-50. Epub 2007 Apr 6.

- ❖ Lin SP, Huang SY, Tu ME, Wu YH, Lin CY, Lin HY, Lee-Chen GJ. (2007). Netherton syndrome: mutation analysis of two Taiwanese families. *Arch Dermatol Res.* 299(3):145-50.
- ❖ Macknet CA, Morkos A, Job L, Garberoglio MC, Clark RD, Macknet KD Jr, Peverini RL. (2008). An infant with Netherton syndrome and persistent pulmonary hypertension requiring extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr Dermatol.* 25(3):368-72.
- ❖ Mägert HJ, Ständker L, Kreutzmann P, Zucht HD, Reinecke M, Sommerhoff CP, Fritz H, Forssmann WG. (1999). LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 30;274(31):21499-502.
- ❖ Mizuno Y, Suga Y, Haruna K, Muramatsu S, Hasegawa T, Kohroh K, Shimizu T, Komatsu N, Ogawa H, Ikeda S. (2006). A case of a Japanese neonate with congenital ichthyosiform erythroderma diagnosed as Netherton syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 31(5):677-80.
- ❖ Mizuno Y, Suga Y, Muramatsu S, Hasegawa T, Shimizu T, Ogawa H. (2005). A Japanese infant with localized ichthyosis linearis circumflexa on the palms and soles harbouring a compound heterozygous mutation in the SPINK5 gene. *Br J Dermatol.* 153(3):661-3.
- ❖ Müller FB, Hausser I, Berg D, Casper C, Maiwald R, Jung A, Jung H, Korge BP. (2002).
- ❖ Ong C, O'Toole EA, Ghali L, Malone M, Smith VV, Callard R, Harper JI (2004). LEKTI demonstrable by immunohistochemistry of the skin: a potential diagnostic skin test for Netherton syndrome. *Br J Dermatol.* 151(6):1253-7.
- ❖ Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Aufenvenne K, Schürmeyer-Horst F, Jayakumar A, Ständer H, Smolle J, Clayman GL, Traupe H. (2004). SPINK5 and Netherton syndrome: novel mutations, demonstration of missing LEKTI, and differential expression of transglutaminases. *J Invest Dermatol.* 123(3):474-83.
- ❖ Renner ED, Hartl D, Rylaarsdam S, Young ML, Monaco-Shawver L, Kleiner G, Markert ML, Stiehm ER, Belohradsky BH, Upton MP, Torgerson TR, Orange JS, Ochs HD. (2009).
- ❖ Renner ED, Hartl D, Rylaarsdam S, Young ML, Monaco-Shawver L, Kleiner G, Markert ML, Stiehm ER, Belohradsky BH, Upton MP, Torgerson TR, Orange JS, Ochs HD. (2009). Comèl-Netherton syndrome defined as primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 124(3):536-43.
- ❖ Shimomura Y, Sato N, Kariya N, Takatsuka S, Ito M. (2005). Netherton syndrome in two Japanese siblings with a novel mutation in the SPINK5 gene: immunohistochemical studies of LEKTI and other epidermal molecules. *Br J Dermatol.* 153(5):1026-30.
- ❖ Söreide K, Söiland H, Körner H, Haga H, Söreide JA. (2005). Acute pancreatitis in a young girl with the Netherton syndrome. *J Pediatr Surg.* 40(11):e69-72.
- ❖ Sprecher E, Chavanas S, DiGiovanna JJ, Amin S, Nielsen K, Prendiville JS, Silverman R, Esterly NB, Spraker MK, Guelig E, de Luna ML, Williams ML, Buehler B, Siegfried EC, Van Maldergem L, Pfendner E, Bale SJ, Uitto J, Hovnanian A, Richard G. (2001).

- ❖ Sprecher E, Tesfaye-Kedjela A, Ratajczak P, Bergman R, Richard G. (2004). Deleterious mutations in SPINK5 in a patient with congenital ichthyosiform erythroderma: molecular testing as a helpful diagnostic tool for Netherton syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 29(5):513-7.
- ❖ Tartaglia-Polcini A, Bonnart C, Micheloni A, Cianfarani F, André A, Zambruno G, Hovnanian A, D'Alessio M. (2006). SPINK5, the defective gene in netherton syndrome, encodes multiple LEKTI isoforms derived from alternative pre-mRNA processing. *J Invest Dermatol.* 126(2):315-24.
- ❖ The spectrum of pathogenic mutations in SPINK5 in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol.* 117(2):179-87.
- ❖ Tüysüz B, Ojalvo D, Mat C, Zambruno G, Covaciu C, Castiglia D, D'Alessio M. (2010). A new SPINK5 donor splice site mutation in siblings with Netherton syndrome. *Acta Derm Venereol.* 90(1):95-6.
- ❖ Zhao Y, Ma ZH, Yang Y, Yang SX, Wu LS, Ding BL, Lin ZM, Wang AP, Bu DF, Tu P. (2007). SPINK5 gene mutation and decreased LEKTI activity in three Chinese patients with Netherton's syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 32(5):564-7.