



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ**  
**ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
**&**  
**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΥΠΡΟΥ**  
**ΤΜΗΜΑ ΝΕΥΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΧΡΥΣΑ ΝΤΑΪΟΥ**  
Βιολόγος

**ΜΑΖΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ  
ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ**

**ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ  
"FRIEDREICH'S ATAXIA"**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

(Η έναρξή της εγκρίθηκε από την Γ.Σ. του Ιατρικού Τμήματος - 2ης/14-01-2004)

ΛΑΡΙΣΑ 2011

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ****Γεώργιος Χατζηγεωργίου**

Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Αλέξανδρος Παπαδημητρίου**  
*Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.*
2. **Αναστάσιος Γερμενής**  
*Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Π.Θ.*
3. **Γεώργιος Χατζηγεωργίου**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.*

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Αλέξανδρος Παπαδημητρίου**  
*Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.*
2. **Αναστάσιος Γερμενής**  
*Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Π.Θ.*
3. **Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**  
*Καθηγητής Πνευμονολογίας Π.Θ.*
4. **Γεώργιος Χατζηγεωργίου**  
*Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας Π.Θ.*
5. **Ματθαίος Σπελέτας**  
*Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας Π.Θ.*
6. **Κωνσταντίνος Φουντάς**  
*Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής Π.Θ.*
7. **Κυπρούλα Χριστοδούλου**  
*Διευθύντρια του Τμήματος Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου*

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»  
(Νόμος 5343/32, άρθρο 202 παρ. 2)

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>5</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>7</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>10</b>
<b>ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΕΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΕΣ ΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΕΣ ΑΤΑΞΙΕΣ</b>	<b>10</b>
<b>ΑΤΑΞΙΑ FRIEDREICH (FRDA)</b>	<b>11</b>
Κλινικά χαρακτηριστικά της FRDA	11
Συσχετισμός του αριθμού επαναλήψεων και της κλινικής εικόνας	14
Μοριακή βάση της FRDA	16
Βιοχημικά χαρακτηριστικά της FRDA	22
Θεραπεία της FRDA	24
Προγεννητικός έλεγχος της FRDA	26
<b>ΟΠΤΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΠΡΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ 1 (ΑΟΑ1)</b>	<b>27</b>
Κλινικά χαρακτηριστικά της ΑΟΑ1	27
Μοριακή βάση της ΑΟΑ1	32
Βαρύτητα μεταλλάξεων της ΑΟΑ1	34
Βιοχημικά χαρακτηριστικά της ΑΟΑ1	35
Επιδιόρθωση θραυσμάτων στο μόριο του DNA	36
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>39</b>
Έλεγχος συχνότητας φορέων FRDA στον ευρύτερο χώρο της Θεσσαλίας	39
Έλεγχος μεταλλάξεων του γονιδίου APTX σε ασθενείς με κλινική εικόνα FRDA	50
Έλεγχος για σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο FXN	53
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>55</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>65</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>78</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς τον επιβλέπων της διδακτορικής διατριβής Αναπληρωτή Καθηγητή Νευρολογίας κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο και να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής, καθώς και για την συνεχή καθοδήγησή του και το θερμό ενδιαφέρον του για την ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω θερμά τους Καθηγητές κ. Παπαδημητρίου Αλέξανδρο και κ. Γερμενή Αναστάσιο, οι οποίοι συμμετείχαν στην τριμελή επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής Καθηγητή κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο, Επίκουρο Καθηγητή κ. Φούντα Κωνσταντίνο και τη Διευθύντρια Εργαστηρίου Νευρογενετικής στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου κ. Χριστοδούλου Κυπρούλα.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του μαζικού ελέγχου της συχνότητας του υπεύθυνου γονιδίου για την αταξία Friedreich προήλθε από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ισοσυμβατότητας του Καθηγητή κ. Γερμενή Αναστάσιου του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Πάνα Μάριο, ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσω δείγματα ασθενών με υπολειπόμενη αυτοσωμική παρεγκεφαλιδική αταξία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίο και στην Διευθύντρια Εργαστηρίου Νευρογενετικής Κύπρου κ. Χριστοδούλου Κυπρούλα για τον καθοριστικό ρόλο που διαδραμάτισαν στην πραγματοποίηση της διατριβής μου με την ενεργό, πρόθυμη και ακούραστη συμβολή, καθοδήγηση και υποστήριξή τους.

Ακόμη ευχαριστώ θερμά την φίλη μου κ. Ξηρομερίσιου Γεωργία, Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον αδερφό μου κ. Ντάιο Γεώργιο, Λέκτορα Παθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τέλος τους φίλους μου κ. Νικολάου Πασχάλη και κ. Κουτσού Λίνα, Βιολόγοι του Εργαστηρίου Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, για την ουσιαστική βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης και συγγραφής αυτής της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη που μου έχουν δείξει όλα αυτά τα χρόνια και να τους αφιερώσω τη διατριβή αυτή ως μια ελάχιστη ένδειξη αναγνώρισης των προσπαθειών τους.

**Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής  
δημοσιεύθηκαν το 2010**

Daiou C, Christodoulou K, Xiromerisiou G, Panas M, Dardiotis E, Kladi A, Speletas M, Ntaios G, Papadimitriou A, Germenis A, Hadjigeorgiou GM. **Absence of aprataxin gene mutations in a Greek cohort with sporadic early onset ataxia and normal GAA triplets in frataxin gene.** *Neurol Sci.* 2010 Jun;31(3):393-7

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ARCA είναι νευρολογικές παθήσεις, χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό ή ανώμαλη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και του νωτιαίου μυελού, αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομία και έναρξη <20 ετών.

Η αταξία του Friedreich (FRDA) είναι η συχνότερη ARCA. Η συχνότερη μετάλλαξη FRDA (98%) είναι η υπερεπέκταση των επαναλήψεων της τριπλέτας GAA του γονιδίου *FXN*. Το 2% των ασθενών με FRDA είναι ταυτόχρονα φορείς της επέκτασης των GAA και σημειακών μεταλλάξεων.

Πρόσφατα, αναγνωρίστηκε μια υποκατηγορία των ARCA οι οποίες σχετίζονται με οπτικοκινητική απραξία (AOA). Μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης (*APTX*) προκαλούν οπτικοκινητική απραξία (AOA1).

Στην **πρώτη φάση** της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η συχνότητα της συχνότερης μετάλλαξης *FXN* στον Ελλαδικό χώρο, η οποία ανέρχεται σε ποσοστό 1.22%. Επίσης, έγινε επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με την τεχνική της αλληλούχησης .

Στη **δεύτερη φάση** μελετήθηκαν 14 ασθενείς με νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία. Διερευνήθηκαν για τη μετάλλαξη του γονιδίου *FXN*. Δεκατρείς ασθενείς έφεραν φυσιολογικά αλληλόμορφα, ενώ ένας από αυτούς ήταν φορέας. Στη συνέχεια μελετήσαμε το γονίδιο *APTX* με την μέθοδο της αλληλούχησης. Δεν διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις για το γονίδιο *APTX*.

Στη **τρίτη φάση**, έγινε έλεγχος του γονιδίου *FXN* στον ασθενή που ήταν ετερόζυγος για την επέκταση GAA, ώστε να μελετηθεί η παρουσία σημειακών μεταλλάξεων. Η ανάλυση έγινε με την τεχνική της αλληλούχησης και κατέδειξε ένα γνωστό πολυμορφισμό (refSNP ID: rs2481598).

Συνοπτικά, στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα η συχνότητα της GAA υπερεπέκτασης του γονιδίου *FXN*. Παράλληλα αναλύθηκαν ασθενείς με

νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία για μεταλλάξεις στο γονίδιο APTX. Τα αποτελέσματα της διατριβής δεν επιβεβαιώνουν τα διεθνή δεδομένα.



# ABSTRACT

Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias (ARCA) encompass a large number of rare neurological disorders characterized by early onset, cerebellar ataxia and autosomal recessive inheritance.

The commonest ARCA is Friedreich ataxia (FRDA). Homozygosity for an abnormal GAA repeat expansion (98%) and compound heterozygosity for the expansion and a point mutation of the frataxin gene (2%) have been identified.

Recently, another subgroup of ARCA associated with oculomotor apraxia (AOA) has been distinguished. Oculomotor apraxia I (AOA1) is caused by mutation of the aprataxin gene.

Firstly, we studied the frequency of the FRDA mutation in Thessaly. We found that the frequency is similar with other European reports (1.22%).

In the second part, we studied 14 patients with sporadic cerebellar ataxia. Analysis of the 14 patients for the *FXN* gene GAA expansion revealed that all but one had normal allele sizes. One of them was heterozygous for the expansion. Based on previous studies, these 14 patients were further examined for *APTX* gene mutations.

In the third part, we further examined GAA expansion carrier for point mutation in the *FXN* gene using sequencing analysis for the *FXN* gene. This patient carried a single nucleotide polymorphism (refSNP ID: rs2481598).

In conclusion, the present thesis studied the frequency of the FRDA mutation for the first time in Greece. Moreover, we investigated 14 patients with sporadic cerebellar ataxia at the *APTX* gene based on previous studies. Our results do not confirm the previous studies.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΕΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΕΣ ΠΑΡΕΓΚΕΦΑΛΙΔΙΚΕΣ ΑΤΑΞΙΕΣ

Οι αυτοσωμικές υπολειπόμενες παρεγκεφαλιδικές αταξίες (autosomal recessive cerebellar ataxias-ARCA) ανήκουν σε μια ευρύτερη ομάδα γνωστή ως κληρονομικές αταξίες. Οι ARCA είναι νευρολογικές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό ή ανώμαλη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και του νωτιαίου μυελού, αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα και στις περισσότερες περιπτώσεις εκδήλωση των αρχικών συμπτωμάτων σε νεαρή ηλικία (<20 έτη)<sup>1</sup>.

Πρόσφατα, προτάθηκε από τους Palau και Espinos<sup>1</sup> η κάτωθι κατηγοριοποίηση των ARCA:

1. συγγενείς ή αναπτυξιακές αταξίες, όπως το σύνδρομο Joubert και η αταξία Cayman,
2. μεταβολικές αταξίες, που περιλαμβάνει και τις αταξίες που προκαλούνται από ενζυματικές ανεπάρκειες, όπως η αταξία με ανεπάρκεια βιταμίνης E και η αβηταλιποπρωτεΐναιμία,
3. αταξίες που οφείλονται σε προβλήματα επιδιόρθωσης του DNA, όπως η τηλαγγειεκτασία και η αταξία με οπτικοκινητική απραξία τύπου I και II,
4. εκφυλιστικές ή προοδευτικές αταξικές ανωμαλίες που περιλαμβάνουν αταξίες με γνωστή αιτία ή παθογένεση, όπως η αταξία Friedreich

## ΑΤΑΞΙΑ ΤΟΥ FRIEDREICH (Friedreich ataxia, FRDA)

### Κλινικά χαρακτηριστικά

Στην ευρύτερη οικογένεια των ARCA ανήκει η αταξία του Friedreich (Friedreich ataxia, FRDA) η οποία αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1860 από το Γερμανό *Nikolaus Friedreich* και έκτοτε φέρει το όνομα του.

Η FRDA είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νευροεκφυλιστική νόσος με συχνότητα 1:29.000-1:50.000<sup>2, 14-16</sup>. Το ποσοστό είναι μικρότερο στους Ασιάτες και σε πληθυσμούς αφρικανικής καταγωγής<sup>15</sup>. Το ποσοστό των φορέων παγκοσμίως υπολογίζεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 1:60-1:120<sup>2, 9, 17, 18</sup>.

Το 1863, ο Nikolaus Friedreich, καθηγητής Ιατρικής στην Χαϊδελβέργη, έγραψε τρία άρθρα περιγράφοντας μια «εκφυλιστική ατροφία των οπίσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού» προκαλώντας προοδευτική αταξία, υπαισθησία και μυϊκή αδυναμία. Η αιτία της αταξίας που περιέγραφε ο Friedreich, παρέμεινε ένα μυστήριο για περισσότερο από 130 χρόνια. Για πολλά χρόνια, ο προσδιορισμός της ταυτότητας και η κληρονόμησή της ήταν ασαφή λόγω ομοιοτήτων με διαφορετικές κληρονομικές αταξίες και νευροπάθειες. Τις τελευταίες δεκαετίες πραγματοποιήθηκαν σημαντικές μελέτες οι οποίες ανέδειξαν τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο μηχανισμό κληρονομικότητας και καθόρισαν σαφή διαγνωστικά κριτήρια<sup>19, 20</sup>. Αυτές οι μελέτες επέτρεψαν τη συλλογή κλινικά ομοιογενών οικογενειών, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε βιοχημικές μελέτες και μελέτες μοριακής γενετικής. Τελικά, το 1996 ανακαλύφθηκε το γονίδιο *FXN* της FRDA και η μετάλλαξή του, δηλαδή η επέκταση ιντρονικού τρινουκλεοτιδίου GAA<sup>2, 21</sup>.

Τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά για τη διάγνωση της FRDA καθορίστηκαν το 1976 από τους Geoffroy et al<sup>19</sup> και την Harding το 1981<sup>20</sup>. Η προοδευτική αταξία είναι το σημαντικότερο γνώρισμα της νόσου. Συνήθως η έναρξη της νόσου εκδηλώνεται με αδεξιότητα στο βηματισμό κατά την εφηβεία.

Σύμφωνα με την Harding<sup>20</sup> τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά είναι:

1. αυτοσωμική-υπολειπόμενη κληρονομικότητα
2. έναρξη των συμπτωμάτων πριν από το 25<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας
3. προοδευτική αταξία
4. απουσία τενόντιων αντανακλαστικών στα κάτω άκρα
5. ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα αξονικού τύπου αισθητικής νευροπάθειας (μέσα στα πρώτα 5 χρόνια από την έναρξη των συμπτωμάτων)
6. δυσαρθρία
7. απουσία αντανακλαστικών και στα τέσσερα άκρα
8. απώλεια αίσθησης της θέσης στο χώρο και της αίσθησης δόνησης των άκρων
9. σημείο Babinski
10. πυραμιδική σημειολογία στα κάτω άκρα

Η αδυναμία βάδισης εμφανίζεται περίπου 15 χρόνια πριν από την αρχική εκδήλωση της νόσου. Οι καρδιομυοπάθειες αποτελούν τη συχνότερη αιτία θανάτου. Οι ασθενείς που εμφανίζουν όλα τα κλινικά χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν παραπάνω, θεωρούνται ότι έχουν την “τυπική” ή “κλασική” μορφή της ασθένειας<sup>18</sup>.

Αναλυτικότερα, το καθοριστικό σύμπτωμα της FRDA είναι η προοδευτική αταξία, η οποία συνοδεύεται από δυσαρθρία, αξονική νευροπάθεια και παρατεταμένους χρόνους αγωγής στα προκλητά κινητικά δυναμικά. Η δυσαρθρία μπορεί να αναπτυχθεί προοδευτικά σε διάστημα ετών. Δεν είναι σπάνια η εμφάνιση σε νεαρή ηλικία (πριν τα 25 έτη) χαρακτηριστικών όπως το σημείο Babinski, η απουσία αντανακλαστικών και η μειωμένη αίσθηση δόνησης ή αίσθησης της θέσης στο χώρο των κάτω άκρων, αλλά σε καμία περίπτωση δεν αποτελούν καθοριστικά συμπτώματα της νόσου. Αντιθέτως, η παρουσία σπαστικότητας σε βαριά μορφή δεν αποκλείει την FRDA σε κλινικό επίπεδο. Η μη αποφρακτική υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια δεν αποτελεί απαραίτητο στοιχείο διάγνωσης, παρότι είναι συχνό εύρημα. Η παθογένεσή της δεν είναι γνωστή, αλλά φαίνεται

να σχετίζεται με τον βαθμό των επεκτάσεων τριπλετών καθώς το γονίδιο *FXN* εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στον καρδιακό ιστό<sup>2</sup>. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τουλάχιστον κάποιες μορφές καρδιομυοπάθειας μπορεί να προκαλούνται λόγω διαταραχής του αποπτωτικού μηχανισμού των μυοκαρδιακών κυττάρων<sup>22, 23</sup>.

---

#### **Κλινικά χαρακτηριστικά της FRDA**

---

Ηλικία έναρξης της ασθένειας πριν το 25<sup>ο</sup> έτος ηλικίας  
 Αταξία βάδισης  
 Νυσταγμός  
 Αδυναμία εστίασης του βλέμματος  
 Διαταραχή των συζυγών κινήσεων παρακολούθησης - δυσμετρία των σακκαδικών κινήσεων  
 Μυϊκή αδυναμία  
 Ατροφία μυών  
 Pes cavus  
 Κατάργηση τενοντίων αντανακλαστικών  
 Εκτατικά πελματιαία αντανακλαστικά (σημείο Babinski)  
 Αισθητικού τύπου νευροπάθεια  
 Απώλεια ακοής/κώφωση  
 Καρδιομυοπάθεια  
 Σακχαρώδης διαβήτης  
 Σκολίωση  
 Αξονικού τύπου αισθητική νευροπάθεια  
 Διαταραχή της εν τω βάθει αισθητικότητας  
 Δυσαρθρία  
 Μειωμένη οπτική οξύτητα  
 Δυσδιαδοχοκινησία  
 Δυσκαταποσία  
 Σφιγκτηριακή δυσλειτουργία  
 Ατροφία αυχενικής μοίρας στο MRI (μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου)  
 Ατροφία παρεγκεφαλίδας στο MRI (μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου)

#### **Ηλεκτροκαρδιογραφικές και υπερηχοκαρδιογραφικές διαταραχές**

Αναστροφή T κύματος  
 Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια

#### **Νευροφυσιολογικός έλεγχος**

Αισθητική αξονοπάθεια  
 Μειωμένες κινητικές ταχύτητες αγωγής

---

Πίνακας 1: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με FRDA.

Ένα ιδιαίτερο γνώρισμα της FRDA είναι η μεγάλη κλινική ετερογένεια. Παρατηρούνται σημαντικές διακυμάνσεις σε διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά όπως στην ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων, στην πορεία και στη βαρύτητα της νόσου<sup>24</sup>. Οι ασθενείς

είναι πιθανό να καθηλωθούν σε αναπηρικό καρότσι από την εφηβεία τους ή αντίθετα, μπορεί να διατηρήσουν καλή κινητικότητα μέχρι και τα τριάντα τους<sup>25</sup>. Οι καρδιακές επιπλοκές μπορεί να είναι αρκετά σοβαρές ώστε να προκαλέσουν θάνατο σε νεαρή ηλικία ή αντίθετα, μπορεί να είναι ελάχιστες ή και απύσες. Η καρδιομυοπάθεια παρατηρείται στα 2/3 των ασθενών με FRDA και είναι κυρίως συμμετρική, συγκεντρική υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, αν και μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν ασύμμετρη διαφραγματική υπερτροφία. Άλλα νευρολογικά χαρακτηριστικά με διακυμάνσεις στην εκδήλωσή τους είναι διάφορες οφθαλμικές διαταραχές [νυσταγμός, οπτική ατροφία (25%)] και η νευροαισθητηριακή διαταραχή ακοής (20%)<sup>15</sup>. Η συνηθέστερη οφθαλμοκινητική ανωμαλία είναι η αδυναμία σταθεροποίησης των οφθαλμών<sup>26</sup>. Αντίθετα, δεν παρατηρείται οφθαλμοπληγία. Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς εμφανίζουν εξελισσόμενη σκολίωση και σχεδόν οι μισοί εμφανίζουν κοιλοποδία<sup>20</sup>. Περίπου 10% των ασθενών είναι διαβητικοί και οι περισσότεροι από αυτούς χρειάζονται θεραπεία με ινσουλίνη<sup>18, 24</sup>.

Πολλοί ασθενείς με άτυπα χαρακτηριστικά FRDA (όπως οπτική ατροφία) έχουν μεταλλάξεις στο υπεύθυνο γονίδιο<sup>27</sup>, ενώ αντίθετως, αρκετά από τα τυπικά χαρακτηριστικά των FRDA ασθενών μπορεί να απουσιάζουν<sup>28</sup>. Επιπλέον, είναι πιθανό ασθενείς με FRDA να διατηρήσουν τα τενόντια αντανακλαστικά τους και να εμφανίσουν τα συμπτώματά τους σε ηλικία μεγαλύτερη από την αναμενόμενη<sup>29, 30</sup>. Σε σπάνιες περιπτώσεις είναι δυνατόν να εμφανιστούν συμπτώματα όπως διάχυτη χορεία, σπαστική παραπάρεση και αισθητικού τύπου νευροπάθεια<sup>31, 32</sup>.

### **Συσχετισμός του αριθμού των επαναλήψεων (GAA)<sub>n</sub> και της κλινικής εικόνας των ασθενών**

Ο κλινικός φαινότυπος της FRDA καθορίζεται μόνο εν μέρει από το μέγεθος της επέκτασης των (GAA)<sub>n</sub> (υπερεπέκταση των επαναλήψεων της τριπλέτας GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου της φραταξίνης), η οποία αποτελεί τη συχνότερη μετάλλαξη που

προκαλεί την FRDA (98%). Με βάση τους Sharma et al<sup>33</sup> άτομα που φέρουν  $\leq 37$  τριπλέτες είναι σχεδόν απίθανο να αναπτύξουν κλινική εικόνα FRDA, ενώ άτομα με  $>66$  τριπλέτες είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα αναπτύξουν τη νόσο. Σε ενδιάμεσες καταστάσεις μεταξύ 38 και 65 τριπλετών, τα γονίδια βρίσκονται σε κατάσταση προ-μεταλλαγής και μπορούν σε επόμενες γενιές να επεκταθούν στα παθολογικά όρια<sup>33</sup>.

Ο αριθμός των επαναλήψεων παίζει ουσιαστικό ρόλο στη κλινική ετερογένεια της FRDA και επηρεάζει την ηλικία εκδήλωσης της νόσου, την ηλικία εμφάνισης της δυσαρθρίας και των κινητικών διαταραχών, και την ταχύτητα εξέλιξης της νόσου. Η παρουσία της καρδιομυοπάθειας συνδέεται με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων, αλλά δεν είναι απαραίτητο ότι όλοι οι ασθενείς με μεγάλο αριθμό επαναλήψεων θα παρουσιάσουν καρδιομυοπάθεια<sup>34</sup>. Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με  $<500$  GAA επαναλήψεις είναι σε σημαντικό βαθμό διαφορετικά σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων. Επιπλέον, φαίνεται ότι πέρα από το όριο των 500 GAA επαναλήψεων, η έκφραση της πρωτεΐνης φραταξίνης είναι αρκετά περιορισμένη οπότε δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διακυμάνσεις στην κλινική εικόνα των ασθενών<sup>23</sup>.

Αν και υπάρχει σαφής συσχετισμός του αριθμού των επαναλήψεων και του φαινότυπου, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ακόμη και σε ασθενείς με παραπλήσιο αριθμό επαναλήψεων. Επομένως, ο αριθμός των επαναλήψεων δεν μπορεί να προβλέψει με αξιοπιστία την εξέλιξη της ασθένειας για κλινικούς σκοπούς ή γενετική συμβουλευτική<sup>23</sup>.

Επίσης, ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να διαφέρει στα λευκοκύτταρα σε σχέση με άλλους ιστούς λόγω σωματικού μωσαϊκισμού. Αναλυτικότερα, κάποια άτομα μπορεί να φέρουν διαφορετικό γονότυπο (συνεπώς διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων σχετικά με την FRDA) σε διαφορετικούς ιστούς του σώματός τους, λόγω επέκτασης ή μείωσης του αριθμού των επαναλήψεων σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξης του εμβρύου. Το στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου και ο τύπος των κυττάρων στα οποία θα γίνει η αλλαγή θα καθορίσουν τον ιστό ή τους ιστούς οι οποίοι θα διαφοροποιηθούν ως προς τον αριθμό των

επαναλήψεων. Αυτό μπορεί να εξηγήσει μερικώς την φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρατηρείται ανεξάρτητα από τον αριθμό των επαναλήψεων που ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα<sup>23</sup>. Επίσης, το φαινόμενο του μωσαϊκισμού σε διαφορετικούς ιστούς δείχνει ότι η συμβατική μέθοδος ανάλυσης του DNA δεν είναι πάντα επαρκής για την ακριβή πρόβλεψη του φαινοτύπου σε ασθενείς με παθολογικά αλληλόμορφα<sup>33</sup>. Έχει προταθεί ότι πέρα από το μωσαϊκισμό, άλλοι παράγοντες όπως παραλλαγές στο γονίδιο της φραταξίνης, γονίδια τροποποιητές και περιβαλλοντικοί παράγοντες πιθανώς να επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου<sup>21</sup>.

## Μοριακή βάση της FRDA

Το γονίδιο της FRDA (*FXN*, με βάση το Ανθρώπινο Γονιδιωματικό Σύστημα Ονοματολογίας) βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9, στη θέση 9q13 (MIM#229300) ακριβώς κάτω από την περικεντρομερική ετεροχρωματινική περιοχή. Αποτελείται από 7 εξόνια που βρίσκονται εντός περιοχής 95 Kb γονιδιωματικού DNA. Το μεγαλύτερο και πιθανώς μοναδικό λειτουργικό mRNA έχει μέγεθος 1.3 Kb και σχετίζεται με τα πρώτα 5 εξόνια 1-5α. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη περιέχει 210 αμινοξέα και ονομάζεται φραταξίνη. Το γονίδιο εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, αλλά σε διαφορετικό βαθμό στους διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης<sup>2, 35, 36</sup>. Στους ενήλικες, το mRNA της φραταξίνης απαντά κυρίως στα μυοκαρδιακά κύτταρα και στο νωτιαίο μυελό, και αμέσως μετά στο ήπαρ, τους σκελετικούς μύες και το πάγκρεας. Γενικότερα, η φραταξίνη εκφράζεται περισσότερο σε κύτταρα πλούσια σε μιτοχόνδρια, όπως τα μυοκαρδιακά κύτταρα και οι νευρώνες.

Η συχνότερη μετάλλαξη που προκαλεί την αταξία FRDA (98%) είναι η υπερ-επέκταση των επαναλήψεων της τριπλέτας GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου της φραταξίνης<sup>2</sup>. Επαναλήψεις που σχετίζονται με τη νόσο αποτελούνται από περίπου 70 έως >1000 τριπλέτες, ενώ συνήθως είναι 600-900. Εξαιτίας της υπολειπόμενης φύσης της



νόσου, οι ασθενείς έχουν επέκταση και στα 2 ομόλογα χρωμοσώματα 9, ενώ τα ετερόζυγα άτομα δεν έχουν κλινική συμπτωματολογία. Όπως και άλλες παθήσεις που οφείλονται σε επεκτάσεις τριπλετών, η κληρονόμηση αυτών είναι ασταθής κατά τη μεταφορά από τον γονέα στο παιδί<sup>5, 25, 37, 38</sup>. Η μετάδοση από τον πατέρα συνήθως συνοδεύεται με μείωση του αριθμού των επαναλήψεων. Στους άντρες παρατηρείται μικρότερος αριθμός επαναλήψεων στο σπέρμα από ότι στα λευκοκύτταρα<sup>37</sup>. Κατά την μετάδοση από την μητέρα η πιθανότητα της επέκτασης του αριθμού των επαναλήψεων είναι ίδια με την πιθανότητα μείωσης αυτών<sup>37, 39</sup>. Αστάθεια επίσης εμφανίζεται κατά τη διαίρεση σωματικών κυττάρων, οδηγώντας σε ένα βαθμό σωματικού μωσαϊκισμού ως προς το μέγεθος της επέκτασης, που έχει παρατηρηθεί σε λευκοκύτταρα, ινοβλάστες και εγκεφαλικό ιστό ασθενών με FRDA<sup>25, 38</sup>.

Η επέκταση των επαναλήψεων της τριπλέτας GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου της φραταξίνης είναι η πιο διαδεδομένη αιτία νόσου με επέκταση επαναλήψεων τρινουκλεοτιδίου. Στην Ευρώπη υπολογίστηκε ότι ένας στους 90 κατοίκους είναι φορέας<sup>40</sup>. Σε φυσιολογικά χρωμοσώματα διακρίνονται δύο τύποι αλληλομόρφων: τα φυσιολογικά αλληλόμορφα που περιέχουν 6-10 τριπλέτες GAA (83% των Καυκάσιων φέρουν τα αλληλόμορφα αυτά), και τα φυσιολογικά αλληλόμορφα με >12 τριπλέτες (17% Καυκάσιων είναι φορείς αυτών)<sup>5, 41</sup>. Τα αλληλόμορφα της δεύτερης κατηγορίας φέρουν το ρίσκο της επέκτασης των επαναλήψεων στις επόμενες γενιές μέσα στα παθολογικά όρια. Η επέκταση των τριπλετών έχει παρατηρηθεί σε άτομα με καταγωγή από Ευρώπη, Βόρεια Αφρική, Μέση ανατολή και Ινδία. Πιστεύεται πως η αταξία του Friedreich πιθανόν να μην υπάρχει σε υποσαχάριους Αφρικανούς, Ινδιάνους, Κινέζους, Ιάπωνες και νοτιοανατολικο-Ασιάτες<sup>42</sup>.

Το 2% περίπου των ασθενών με FRDA φέρουν παρερμηνεύσιμες, ανερμηνεύσιμες ή αλλαγής αναγνωστικού πλαισίου μεταλλάξεις (πίνακας 2), οι οποίες τελικά επηρεάζουν την κωδικοποιούσα αλληλουχία της φραταξίνης<sup>2-4</sup>. Όλοι οι ασθενείς που έχουν ανιχνευτεί με σημειακή μετάλλαξη έως τώρα, είναι ετερόζυγοι για την επέκταση του τρινουκλεοτιδίου GAA στο ομόλογο χρωμόσωμα 9. Το γεγονός ότι δεν έχουν βρεθεί έως τώρα ομοζυγώτες για

σημειακή μετάλλαξη οφείλεται πιθανώς στο ότι οι σημειακές μεταλλάξεις είναι σπάνιες, αλλά είναι πιθανότερο ότι η ομοζυγωτία θα προκαλούσε μη βιώσιμο φαινότυπο όπως έχει διαφανεί σε πειράματα με ποντίκια<sup>21, 43</sup>.

Οι ασθενείς με FRDA που φέρουν τη μετάλλαξη της επέκτασης των GAA επαναλαμβανόμενων τριπλετών και στα δύο αλληλόμορφα, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα φραταξίνης και υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση του αριθμού των GAA επαναλήψεων και της ποσότητας της φραταξίνης, λόγω της μειωμένης παραγωγής του mRNA της πρωτεΐνης<sup>55</sup>.

Πιστεύεται πως ο μηχανισμός παρεμπόδισης της μεταγραφής της φραταξίνης στους ασθενείς με FRDA στηρίζεται σε δύο πιθανά μοντέλα: 1) στη δημιουργία μη-B DNA διαμορφώσεων (διαμορφώσεις της τρισδιάστατης δίκλωνης δομής του DNA οι οποίες διαφέρουν από τη μορφή B-DNA που περιέγραψαν οι Watson και Crick, η οποία θεωρείται και η επικρατέστερη φυσική μορφή του DNA στα ζωντανά κύτταρα) και RNA-DNA υβριδίων και 2) στη δημιουργία ετεροχρωματίνης (περιοχές των χρωμοσωμάτων στις οποίες το DNA είναι ισχυρά περιελιγμένο και ο βαθμός συμπύκνωσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, διατηρώντας το DNA της ετεροχρωματίνης σε ανενεργή μορφή)<sup>55-58</sup>.

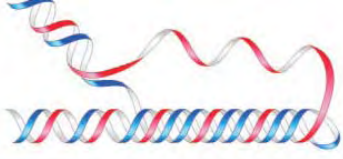

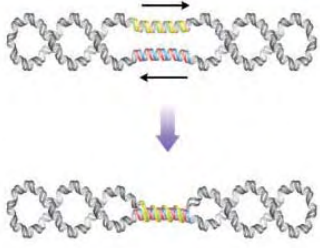
Αναλυτικότερα, πιστεύεται ότι οι δευτεροταγείς δομές όπως τριπλοειδείς σχηματισμοί (triplexes) και υπεσυμπυκνωμένο DNA (sticky DNA), προκαλούν σημαντικά εμπόδια στην αντιγραφή<sup>56</sup>.

ΠΑΡΕΡΜΗΝΕΥΣΙΜΕΣ/ΑΝΕΡΜΗΝΕΥΣΙΜΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ				
Αλλαγή κωδικονίου	Αλλαγή αμινοξέος	Αριθμός κωδικονίου	Αναφορά	
ATG-ACG	Met-Thr	1	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
ATG-ATA	Met-Ile	1	Potter (2000) Pediatr Neurol 22, 413 <sup>44</sup>	
ATG-ATT	Met-Ile	1	Cossee (1997a) Nat Genet 15, 337 <sup>40</sup>	
cATG-ATT	Met-Leu	1	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
cATG-TTG	Met-Leu	1	Schwan (2004) Hum Genet 115, 347	
cCGT-TGT	Arg-Cys	40	Van Driest (2005) Mol Genet Metab 85, 280 <sup>45</sup>	
TTA-TCA	Leu-Ser	106	Bartolo (1998) Am J Med Genet 79, 396 <sup>46</sup>	
TTA-TGA	Leu-Term	106	Campuzano (1996) Science 271, 1423 <sup>2</sup>	
gGAC-TAC	Asp-Tyr	122	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
GGT-GTT	Gly-Val	130	Bidichandani (1997) Am J Hum Genet 60, 1251 <sup>3</sup>	
AACa-AAG	Asn-Lys	146	Zuhke (2004) Eur J Hum Genet 12, 979 <sup>17</sup>	
ϑATC-TTC	Ile-Phe	154	Campuzano (1996) Science 271, 1423 <sup>2</sup>	
cTGG-CGG	Trp-Arg	155	Labuda (1999) Hum Mutat 13, 506 <sup>42</sup>	
TGG-TAG	Trp-Term	155	de Castro (2000) Hum Genet 106, 86 <sup>48</sup>	
CTA-CCA	Leu-Pro	156	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4, 49</sup>	
CGT-CCT	Arg-Pro	165	De Michele (2000) Neurology 54, 496 <sup>49</sup>	
gCGT-TGT	Arg-Cys	165	Forrest (1998) Neurogenetics 1, 253 <sup>50</sup>	
cTGG-GGG	Trp-Gly	173	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
cCTC-TTC	Leu-Phe	182	Forrest (1998) Neurogenetics 1, 253 <sup>50</sup>	
CTC-CAC	Leu-His	182	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
CAT-CGT	His-Arg	183	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
CTG-CGG	Leu-Arg	186	Zuhke (2004) Eur J Hum Genet 12, 979 <sup>17</sup>	
CTG-CGG	Leu-Arg	198	Al-Mahdawi (2000) Hum Mutat 16, 95 <sup>51</sup>	
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ				
IVS(υπερόνιο)	Donor/Acceptor(αποδέκτης/χορηγός)	Σημείο	Αντικατάσταση	Αναφορά
1	ds	5	G-C	McCormack (2000) J Neurol Neurosurg Psychiatry 68, 661 <sup>27</sup>
3	ds	1	G-A	Doudney (1997) Hum Mutat 11, 415
3	as	-2	A-G	Campuzano (1996) Science 271, 1423 <sup>2</sup>
4	ds	2	T-G	Forrest (1998) Neurogenetics 1, 253 <sup>51</sup>
ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ				
Έλλειψη	Κωδικόνιο	Αναφορά		
CGGAGCAGC_5'UTR E1_ATG^TGGACTCTC	2	Zhu (2002) Mov Disord 17, 585 <sup>52</sup>		
ATGTGG^ACTctcGGGCGCCGCG	3	Spacey (2004) Can J Neurol Sci 31, 383 <sup>53</sup>		
CTGCGGC^CGCcGTGGCCTGCG	39	de Castro (2000) Hum Genet 106, 86 <sup>48</sup>		
CCTGC^ACGCCcCGCCGCGCA E111_G	51	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>		
CTGGAC^TCTTITAGCAGAGTT	105	Pook (2000) J Med Genet 37, e38 <sup>54</sup>		
TGAAGAC^CTTgcaagacaagccatACACGTTTGA	113	Pook (2000) J Med Genet 37, e38 <sup>54</sup>		
CCA^TCCAG_E414_GTaTGTAGGTATG	160	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>		
ΜΙΚΡΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΕΣ				
Προσθήκη	Κωδικόνιο	Νουκλεοτίδιο	Αναφορά	
CCTGC^ACGCCcCGCCGCGCA	51	158	Cossee (1999) Ann Neurol 45, 200 <sup>4</sup>	
AAAGA^CTAGCtAGAGGAAACG	98	296	de Castro (2000) Hum Genet 106, 86 <sup>48</sup>	
ΜΙΚΡΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ				
Έλλειψη	Προσθήκη	Κωδικόνιο	Αναφορά	
GATTTGG^AATgtcaAAAAGCAGAG	tig	67	Pook (2000) J Med Genet 37, e38 <sup>54</sup>	
ΜΕΓΑΛΕΣ ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ				
Περιγραφή	Αναφορά			
2776 bp incl. ex. 5a	Zuhke (2004) Eur J Hum Genet 12, 979 <sup>17</sup>			

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μεταλλάξεις του γονιδίου της φραταξίνης.

Οι επαναλαμβανόμενες τριπλέτες (triplet repeat sequences, TRS) GAA.TTC σχηματίζουν τριπλοειδείς σχηματισμούς (triplexes) τόσο ενδομοριακά όσο και διαμοριακά (εικόνα 1)<sup>57-60</sup>. Αναλυτικότερα, μακριές δομές από πουρίνες και πυριμιδίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως καθρέφτης επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μπορούν να σχηματίσουν ένα τριπλό σχηματισμό όπου το δίκλωνο DNA ζευγαρώνει με μια τρίτη αλυσίδα κατά το Hoogsteen ζευγάρισμα, με τις πουρίνες της διπλής έλικας<sup>61</sup>. Ενδομοριακοί τριπλοειδείς σχηματισμοί σχηματίζονται από μηχανισμό γυρίσματος της αλυσίδας του DNA προς τα πίσω και συμπύκνωση της δομής<sup>62</sup>.

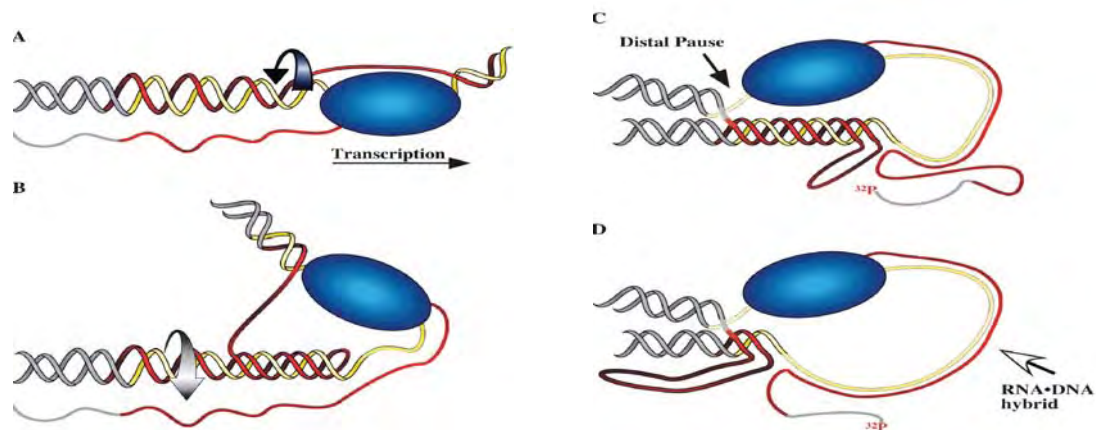
Το υπεσυμπυκνωμένο DNA (sticky DNA) (εικόνα 1) ανακαλύφθηκε το 1999 από τους Sakamoto et al<sup>62</sup>. Η δομή αυτή δημιουργείται μόνο ενδομοριακά και ο διαχωρισμός της είναι ιδιαίτερα δύσκολος, ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως 80 °C για 60 λεπτά<sup>63</sup>. Η δομή αυτή σχηματίζεται από 2 μακρά τμήματα επαναλαμβανόμενων GAA.TTC μέσα στο ίδιο DNA μόριο,, όπου αναπτύσσονται ζευγαρωμένες βάσεις κατά Watson-Crick και κατά αντίστροφο Hoogsteen, και τελικά η δομή υπερσυμπυκνώνεται<sup>56, 64</sup>.

<b>Triplex</b>		<b>(R•Y)<sub>n</sub> Mirror Repeats</b>	
<b>Sticky DNA</b>		<b>2 G-A rich Tracts Direct Repeats</b>	<b>GAAGAAGAA CTTCTTCTT</b>

Εικόνα 1: Μη B-DNA δομές (triplexes and sticky DNA)<sup>56</sup>

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πέρα από τις διαμορφώσεις των μη-B DNA δομών σε μακριές αλυσίδες επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA.TTC, παρατηρείται και η

δημιουργία RNA-DNA υβριδίων σε σημεία όπου μπλοκάρεται η RNA πολυμεράση και αναστέλλεται η διαδικασία της μεταγραφής (εικόνα 2)<sup>65</sup>.



Εικόνα 2: Δημιουργία RNA-DNA υβριδίων<sup>65</sup>.

Το δεύτερο μοντέλο που προτείνεται για την μειωμένη μεταγραφή της φραταξίνης σε FRDA ασθενείς είναι η δημιουργία ετεροχρωματικών δομών. Χαρακτηριστικά, στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου FXN κατά την απουσία των παθολογικών GAA επαναλήψεων, η διατήρηση της χρωματίνης ελέγχεται από δύο τύπους ενζύμων, τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HATs) και τις δυακετυλάσες ιστόνης (HDACs). Σε ασθενείς με παθολογική επέκταση των επαναλήψεων των τριπλετών GAA παρατηρούνται μη-B DNA δομές οι οποίες ενισχύουν τη δράση των ενζύμων HDACs μειώνοντας τα επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών. Επιπρόσθετα, σε μη-B DNA δομές ενισχύεται και η δράση των ενζύμων-μεθυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HMTs), οι οποίες προκαλούν μεθυλίωση των ιστονών, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο τη δομή της ετεροχρωματίνης. Αυτή η ταυτόχρονη υπο-ακετυλίωση και υπερ-μεθυλίωση της χρωματίνης οδηγεί στη δημιουργία της ετεροχρωματίνης, η οποία εμποδίζει την έκφραση της φραταξίνης. Με βάση αυτά τα δεδομένα, η ανάπτυξη αναστολέων των ενζύμων HDACs θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της ακετυλίωσης συγκεκριμένων ιστονών και την αποκατάσταση της χρωματίνης, αυξάνοντας τη γονιδιακή έκφραση του FXN γονιδίου<sup>66-71</sup>.

## Βιοχημικά χαρακτηριστικά της FRDA

Η φραταξίνη εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συγκεκριμένα στην πλευρά του στρώματος του μιτοχονδρίου<sup>72</sup>, αν και πρόσφατα παρατηρήθηκε δράση της πρωτεΐνης φραταξίνης και εκτός των μιτοχονδρίων<sup>73,74</sup>.

Η φραταξίνη είναι μια πρωτεΐνη που ανιχνεύεται σε όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, αλλά σε διαφορετικό επίπεδο έκφρασης. Το mRNA της εντοπίζεται κυρίως σε ιστούς με υψηλό μεταβολικό ρυθμό όπως οι νευρώνες, η καρδιά, ο νεφρός και το ήπαρ<sup>36</sup>.

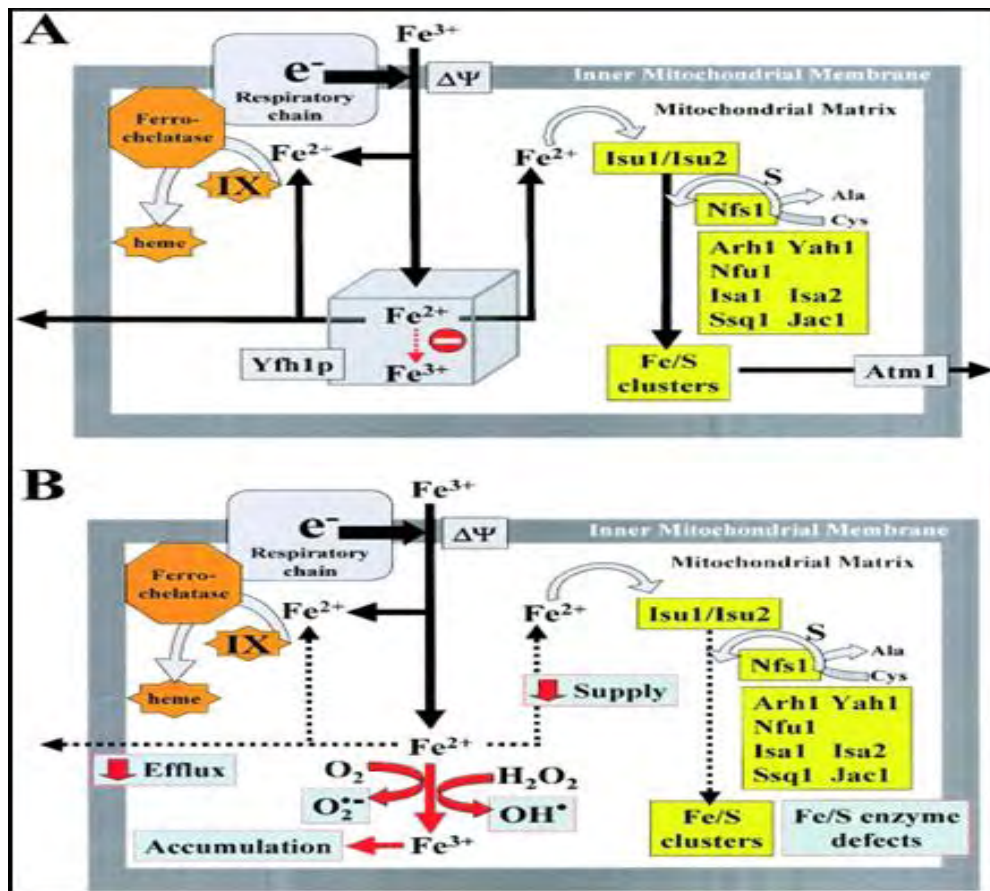
Η φραταξίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση σιδηροθειούχων (Fe/S) συμπλόκων και αίμης, στη σύνδεση και απομάκρυνση του ελεύθερου σιδήρου και στην αντίδραση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες<sup>75</sup> (εικόνα 3).

Αναλυτικότερα, η φραταξίνη συνδέεται με τη βιοσύνθεση πρωτεϊνικών συμπλόκων που περιέχουν σιδηροθειούχες πρωτεΐνες (Fe/S), όπως είναι τα ενζυμικά συμπλέγματα I, II και III, τα οποία συμμετέχουν στη δημιουργία της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου. Η μειωμένη βιοσύνθεση της φραταξίνης οδηγεί αντίστοιχα και στη μειωμένη βιοσύνθεση αυτών των πρωτεϊνικών συμπλόκων, με αποτέλεσμα την ελάττωση της ενεργειακής παραγωγής και την αύξηση των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες. Αυτή η αλληλεπίδραση σε συνδυασμό με αναστολή της ενεργειακής παραγωγής οδηγούν τελικά σε θάνατο των νευρώνων<sup>76</sup>.

Παράλληλα, η φραταξίνη συμμετέχει και στο τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης της αίμης, καθώς αλληλεπιδρά με την φεροχηλατάση παρέχοντας το σίδηρο που απαιτείται για τη συγκεκριμένη διαδικασία<sup>77-79</sup>.

Επιπλέον, πιστεύεται πως μια βασική λειτουργία της φραταξίνης είναι η δέσμευση του ελεύθερου σιδήρου και η διατήρησή του σε διαλυτή μορφή, διαθέσιμο για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες<sup>80</sup>. Ο ρόλος του σιδήρου είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς αποτελεί συστατικό των κυτοχρωμάτων, των οξυγονο-δεσμευτικών μορίων (αιμοσφαιρίνη,

μυοσφαιρίνη) και ενζύμων με σημαντική βιολογική δράση όπως η μεταφορά οξυγόνου ή η σύνθεση και αποκατάσταση του DNA. Παρόλα αυτά, ο ελεύθερος σίδηρος μπορεί να παράγει ιδιαίτερα τοξικές ρίζες υδροξυλίου, μέσω της αντίδρασης Fenton/Haber-Weiss. Οι ρίζες υδροξυλίου έχουν την ικανότητα να συνδέονται με διάφορα κυτταρικά συστατικά όπως αμινοξέα, βάσεις, DNA και λιπίδια των μεμβρανών του κυττάρου. Η αντίδραση των ριζών υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα ταχεία και δεν υπάρχει χρονικό περιθώριο αδρανοποίησης της, με αποτέλεσμα οι οξειδωτικές βλάβες να είναι αναπόφευκτες. Συμπερασματικά, μείωση της φραταξίνης οδηγεί σε μείωση του αποθηκευμένου τρισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{3+}$ ) και μη ειδική συσσώρευση ελεύθερου σιδήρου. Ο ελεύθερος σίδηρος μπορεί να συμμετέχει στην αντίδραση Fenton, κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), οι οποίες είναι ιδιαίτερα τοξικές προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες<sup>76</sup>.



Εικόνα 3: α) μεταβολισμός του Fe, β) Συνέπειες της μειωμένης παραγωγής της φραταξίνης<sup>81</sup>

## Θεραπεία της FRDA

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για την FRDA, εντούτοις η κατανόηση των βασικών γενετικών, μοριακών και βιοχημικών χαρακτηριστικών της έχουν οδηγήσει σε ορισμένες ενδιαφέρουσες προτάσεις θεραπείας.

Μια ενδιαφέρουσα και υποσχόμενη προσέγγιση είναι η προσπάθεια να αντιμετωπιστούν οι επιπτώσεις της συσσώρευσης του σιδήρου στα μιτοχόνδρια. Η πραγματική πρόκληση είναι να σχεδιαστούν μόρια με μεμβρανική διαπερατότητα ώστε να μπορούν να φτάσουν σε συγκεκριμένα τμήματα του εγκεφάλου και να ρυθμίσουν τοπικά την συγκέντρωση του σιδήρου, χωρίς όμως να μειώνουν τη απαραίτητη για τις διάφορες λειτουργίες διαθεσιμότητα του σιδήρου<sup>82</sup>. Γενικότερα, πιστεύεται πως τα μόρια-ρυθμιστές του μιτοχονδριακού σιδήρου μπορούν να βοηθήσουν τους ασθενείς με FRDA, αλλά πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στον τρόπο που ρυθμίζεται ο ενδοκυττάριος σίδηρος ώστε να μην επηρεαστεί ο φυσιολογικός ενδοκυττάριος μεταβολισμός του σιδήρου, προκαλώντας αναιμία<sup>70</sup>.

Η αντιοξειδωτική θεραπεία φαίνεται να είναι περισσότερο υποσχόμενη ως μια πιθανή θεραπεία σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες και την οξειδωτική βλάβη λόγω της μείωσης των επιπέδων της φραταξίνης. Δύο τέτοια αντιοξειδωτικά είναι η *idebenone* και η *mitoquinone* (MitoQ). Αυτοί οι παράγοντες δείχνουν να είναι αποτελεσματικοί στη μείωση του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η *idebenone* φαίνεται να μειώνει την καρδιακή υπερτροφία<sup>83, 84</sup>. Παρόλα αυτά, καμία κλινική δοκιμή με τη χρήση της *idebenone* ή και άλλης φαρμακευτικής αγωγής δεν έχει δώσει ακόμη σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με τα νευρολογικά συμπτώματα της FRDA<sup>85</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση *idebenone* για έξη μήνες δεν βελτίωσε την νευρολογική εικόνα των FRDA ασθενών<sup>86</sup>. Αντίθετα, φάνηκε να αυξάνει την μάζα της αριστερής κοιλίας της καρδιάς χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρη η κλινική σημασία αυτής της παρατήρησης<sup>87</sup>.



Παράλληλα, η χρήση αναστολέων των ενζύμων διακετυλίωσης ιστονών αποτελεί μια άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την αντιμετώπιση της FRDA. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 17 διαφορετικά ένζυμα διακετυλίωσης ιστονών τα οποία επιδρούν στα επίπεδα ακετυλίωσης ιστονών και χρωμοσωμικών πρωτεϊνικών μη-ιστονών, όπως και σε άλλους κυτταρικούς στόχους. Έχει αποδειχθεί πως η αλλαγή στη δράση των ακετυλοτρανσφερασών ιστόνης και των διακετυλασών ιστόνης συνδέονται με διάφορα νευρολογικά νοσήματα όπως και με τον καρκίνο<sup>88-91</sup>. Σήμερα, υπάρχουν διάφορα μόρια τα οποία αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων της διακετυλίωσης ιστονών. Τα μόρια αυτά μπορούν να αναστρέψουν την ετεροχρωματίνη σε δομή ενεργής χρωματίνης ώστε να αποκατασταθεί η φυσιολογική λειτουργία των γονιδίων που δεν μπορούν να εκφραστούν στις ασθένειες αυτές<sup>90</sup>. Στην FRDA η συγκεκριμένη προσέγγιση αποτελεί μια ενδιαφέρουσα επιλογή, καθώς παρατηρείται δημιουργία ετεροχρωματινικών δομών στο γονίδιο FXN. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί καλύτερα η ασφάλεια και η τοξικότητα των συγκεκριμένων αναστολέων<sup>55</sup>.

Πρόσφατα, η χρήση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης έχει δώσει ενθαρρυντικά στοιχεία μετά την πρώτη κλινική δοκιμή που έχει ήδη πραγματοποιηθεί<sup>92</sup>. Έχει διαπιστωθεί πως η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της φραταξίνης στα λεμφοκύτταρα ασθενών με FRDA, σε καλλιέργειες ανθρώπινων μυοκαρδιακών κυττάρων και καρδιακών ινοβλαστών, αλλά και σε νευρωνικά κύτταρα P19<sup>92, 93</sup>.

Επίσης η γονιδιακή θεραπεία είναι μια άλλη πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την FRDA. Ανασυνδυασμένοι φορείς κλωνοποίησης αδενοϊού και λεντιϊού που εκφράζουν cDNA της φραταξίνης έχει φανεί ότι διορθώνουν εν μέρει την ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες σε πρώιμους ινοβλάστες του FRDA. Δύο πρόσφατες μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα και ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι φορείς κλωνοποίησης ερπητοϊού που εκφράζουν

ολόκληρη την γονιδιακή περιοχή του *FXN*<sup>93</sup> ή cDNA της φραταξίνης<sup>94</sup> μπορεί να αναστρέψουν την παθολογική κλινική εικόνα σε φυσιολογικό φαινότυπο<sup>84</sup>.

## Προγεννητικός έλεγχος για την FRDA

Προγεννητικός έλεγχος για την FRDA απαιτείται στις περιπτώσεις που προηγούμενο παιδί στην οικογένεια είναι ασθενής. Συνήθως, σε αυτή την περίπτωση και οι 2 γονείς είναι φορείς της επέκτασης των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA. Εναλλακτικά, ο ένας γονέας είναι φορέας σημειακής μετάλλαξης του γονιδίου της φραταξίνης και ο άλλος της επέκτασης των GAA τριπλετών, οπότε πιθανοί απόγονοι ασθενείς, θα είναι ετερόζυγοι ως προς την επέκταση και τη σημειακή μετάλλαξη. Κατ'επέκταση προγεννητικός έλεγχος απαιτείται και για τις 2 περιπτώσεις<sup>95</sup>.

Σπανίως, η προέλευση του ενός αλληλομόρφου που εμφανίζει επέκταση των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA σε έναν ασθενή προέρχεται από την επέκταση των GAA επαναλήψεων του ενός γονέα με αριθμό επαναλήψεων 34-60 τριπλετών. Συνήθως, τα αλληλόμορφα αυτού του μεγέθους μεταφέρονται σταθερά από γενιά σε γενιά, οπότε η πιθανότητα επανεμφάνισης της επέκτασης σε επόμενο παιδί είναι μικρότερη σε σχέση με την περίπτωση που και οι δύο γονείς φέρουν αλληλόμορφα με αριθμό επαναλήψεων στα παθολογικά όρια. Παρόλα αυτά, μια τέτοια περίπτωση θα δικαιολογούσε την ανάγκη παροχής προγεννητικού ελέγχου.

Ο έλεγχος των φορέων της επέκτασης των GAA επαναλήψεων περιορίζεται σε συγγενείς ατόμων που νοσούν και στους συζύγους αυτών. Η συχνότητα των σημειακών μεταλλάξεων είναι σχεδόν 1/40 σε σχέση με τις επεκτάσεις των GAA επαναλήψεων, επομένως στην περίπτωση αποκλεισμού της επέκτασης, το ρίσκο να εντοπιστεί κάποιος φορέας σημειακής μετάλλαξης είναι περίπου 1/4000, αν και οι πιθανότητες αυτές ποικίλουν ανάλογα με τον πληθυσμό. Για παράδειγμα, η πιθανότητα προσεγγίζει το μηδέν

για τους Καναδούς, καθώς όλοι οι FRDA ασθενείς με αυτή τη καταγωγή εμφανίζουν επέκταση των GAA και των δύο αλληλομόρφων. Παρόλα αυτά, για τα άτομα που κατάγονται από τη Νάπολη (Ιταλία), η πιθανότητα είναι μεγαλύτερη καθώς η εμφάνιση της μετάλλαξης I154F είναι συχνή. Ο έλεγχος συγκεκριμένης σημειακής μετάλλαξης η οποία έχει συχνή εμφάνιση σε κάποιο πληθυσμό θα πρέπει να ελέγχεται σε συνδυασμό με τη μελέτη για επέκταση των GAA, όταν πραγματοποιείται έλεγχος για την ύπαρξη φορέων<sup>95</sup>.

## ΟΠΤΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΠΡΑΞΙΑ ΤΥΠΟΥ 1

### Κλινικά χαρακτηριστικά

Πρόσφατα, έχει περιγραφεί μια υποκατηγορία των ARCA, η οποία σχετίζεται με οπτικοκινητική απραξία (AOA-autosomal oculomotor apraxia)<sup>6</sup>. Στην υποκατηγορία αυτή ανήκουν δύο διαφορετικές ομάδες αταξιών, η οπτικοκινητική απραξία τύπου 1 και η οπτικοκινητική απραξία τύπου 2. Η αταξία οπτικοκινητικής απραξίας τύπου 1 (AOA1) (MIM 208920) περιγράφηκε αρχικά σε οικογένειες στην Ιαπωνία<sup>96</sup> και κατατάχθηκε ως ευδιάκριτο σύνδρομο το 1995 ως κληρονομική κινητική και αισθητική νευροπάθεια σχετιζόμενη με παρεγκεφαλιδική ατροφία<sup>97</sup>. Αποτελεί την πιο κοινή ARCA στην Ιαπωνία και τη δεύτερη (μετά την FRDA) στην Πορτογαλία<sup>6-8</sup>. Η αταξία οπτικοκινητικής απραξίας τύπου 2 (AOA2) παρατηρείται σε ένα ποσοστό 8% των ασθενών με νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Συχνά οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα γ-σφαιρίνης και κρεατινικής κινάσης και το υπεύθυνο γονίδιο για την συγκεκριμένη ασθένεια είναι το SETX, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σεναταξίνη<sup>1</sup>.

Ειδικότερα, τα κλινικά χαρακτηριστικά της AOA1 είναι: πρόωμη έναρξη της παρεγκεφαλιδικής αταξίας σε νεαρή ηλικία (2-6 ετών), οπτικοκινητική απραξία (OMA), χοραιοαθέτωση, δυσαρθρία, συμμετρική μυϊκή αδυναμία και ατροφία των άκρων, ήπια

πνευματική καθυστέρηση, περιφερική νευροπάθεια, υποαλβουμιναιμία και υπερχοληστεριναιμία. Εργαστηριακές εξετάσεις δείχνουν αξονικού τύπου αισθητική νευροπάθεια, ήπια έλλειψη ή μεγάλους εμμύελους άξονες και ατροφία στο σκώληκα της παρεγκεφαλίδας όπως διαπιστώνεται στην μαγνητική τομογραφία<sup>1,8</sup>.

Η AOA I, όπως και η FRDA χαρακτηρίζεται και αυτή από κλινική ετερογένεια. Συγκεκριμένα, οι Ferrarini et al<sup>8</sup> περιγράφουν την περίπτωση ασθενούς με μετάλλαξη στο γονίδιο της απραταξίνης, χωρίς όμως να εμφανίζει την τυπική κλινική εικόνα της AOA1. Συγκεκριμένα, ο ασθενής: α) δεν εμφάνιζε οπτικοκινητική απραξία με τυπική καθυστέρηση κεφαλιού-ματιών, β) εμφάνιζε μικρές-γρήγορες κινήσεις στα δάχτυλα, αλλά ήταν ικανός να τις ελέγχει, κάτι το οποίο αμφισβητεί τη χορειακή προέλευσή τους, γ) δεν παρουσίαζε έκδηλη νοητική υστέρηση ή διαταραχή αντίληψης, δ) είχε βλάβη των κινητικών δεματιών του ΚΝΣ με βάση τα παθολογικά πελματιαία αντανακλαστικά (σημείο Babinski) και τα αποτελέσματα του μαγνητικού διακρανιακού ερεθισμού, ε) η αδυναμία βάδισης εμφανίστηκε μετά από 20 χρόνια εξέλιξης της νόσου και όχι 11, όπως αναφέρουν ο Criscuolo et al<sup>7</sup>.

Το συγκεκριμένο άρθρο προτείνει τον έλεγχο του γονιδίου της απραταξίνης σε ασθενείς με σποραδική ή υπολειπόμενη εξελισσόμενη αταξία, μετά τον αποκλεισμό της FRDA. Επιπρόσθετα, αποδεικνύει πως είναι απαραίτητος ο έλεγχος της απραταξίνης ακόμη και σε ασθενείς με έλλειψη οπτικοκινητικής απραξίας ή χορείας (τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά της AOA I) και άτυπα χαρακτηριστικά όπως το σημείο Babinski<sup>8</sup>.

Σε μια άλλη έρευνα μελετήθηκαν 158 οικογένειες με μη-FRDA προσοδευτική ARCA<sup>6</sup>. Ανιχνεύθηκαν 14 ασθενείς (από 9 οικογένειες) με 5 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης. Οι ασθενείς αυτοί υποβλήθηκαν σε λεπτομερή νευρολογικό, νευροφυσιολογικό, νευροαπεικονιστικό και οφθαλμολογικό έλεγχο. Τα αρχικά συμπτώματα της νόσου εκδηλώθηκαν σε ηλικία  $6.8 \pm 4.8$  ετών. Παρεγκεφαλιδική αταξία με παρεγκεφαλιδική ατροφία στο MRI και σοβαρής μορφής αξονικού τύπου αισθητική

νευροπάθεια διαπιστώθηκε σε όλους τους ασθενείς. Αντιθέτως, οπτικοκινητική απραξία διαπιστώθηκε στο 86% των ασθενών, υποαλβουμιναιμία στο 83% και υπερχοληστερολαιμία στο 75%. Χορειακές κινήσεις ήταν συχνές σε ποσοστό 79%, και στις περισσότερες περιπτώσεις υποχωρούσαν με την εξέλιξη της νόσου. Με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας, προτείνεται η μελέτη των μεταλλάξεων της απραταξίνης σε υπολειπόμενα αυτοσωμικά περιστατικά παρεγκεφαλιδικής αταξίας, μετά από αποκλεισμό της FRDA και όταν η έναρξη της νόσου συμβαίνει σε ηλικία <25 ετών. Κατά την έναρξη της νόσου, συχνά απουσιάζουν τυπικά χαρακτηριστικά όπως οπτικοκινητική απραξία, αλλά η παρουσία χορειακών κινήσεων αποτελεί σημαντική ένδειξη για AOA1<sup>6</sup>.

Οι Tranchant et al<sup>10</sup> παρουσίασαν τρεις ασθενείς με μεταλλάξεις της απραταξίνης, όπου ο πρώτος ασθενής, είχε τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά της AOA1 ενώ οι δύο υπόλοιποι ασθενείς παρουσίαζαν άτυπη εικόνα με καθυστερημένη εμφάνιση των αρχικών συμπτωμάτων και χωρίς οπτικοκινητική απραξία. Επίσης δεν παρατηρήθηκε υποαλβουμιναιμία, κάτι το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από τη μικρή διάρκεια της νόσου. Οι 2 τελευταίες περιπτώσεις που παρουσιάζουν την άτυπη κλινική εικόνα της AOA 1, υπερτονίζουν την φαινοτυπική ετερογένεια της AOA1. Οι τρεις ασθενείς (ένα άτομο από την Ιταλία και 2 άτομα από τη Γαλλία) που αναφέρονται στο άρθρο, δείχνουν ότι μεταλλάξεις του γονιδίου της απραταξίνης εμφανίζονται και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες πέραν της Πορτογαλίας που είχαν αναφερθεί έως τότε, και υποστηρίζουν την ανάγκη έρευνας του γονιδίου της απραταξίνης σε πρώιμη εξελισσόμενη αταξία ακόμα και με απουσία οπτικοκινητικής απραξίας<sup>10</sup>.

Οι Amouri et al<sup>98</sup> περιγράφουν δύο οικογένειες με την ίδια μετάλλαξη της απραταξίνης: στην πρώτη παρουσιάζεται η τυπική κλινική εικόνα της AOA1, ενώ στη δεύτερη ο φαινότυπος δεν είναι τυπικός, καθώς δεν υπάρχει οπτικοκινητική απραξία, η οποία αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό κλινικό εύρημα σε ασθενείς με AOA1. Η εμφάνιση διαφορετικού φαινοτύπου σε δύο οικογένειες που φέρουν την ίδια μετάλλαξη, τονίζει τη

δυσκολία να υπάρξει απόλυτος συσχετισμός γονοτύπου-φαινοτύπου στην αυτοσωμική υπολειπόμενη AOA1.

Στο άρθρο των Criscuolo et al<sup>11</sup> περιγράφεται ασθενής με AOA1 και μετάλλαξη στην απραταξίνη, αλλά το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ότι η νόσος εκδηλώθηκε σε προχωρημένη ηλικία (40 έτη), σε αντίθεση με τον κανόνα της πρώιμης έναρξης της AOA1.

Όλες οι περιπτώσεις που έχουν δημοσιευτεί σχετικά με μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης (πίνακας 3), αναφέρουν πως οι αλλαγές αυτές γίνονται σε ομόζυγη κατάσταση, ή συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο δύο διαφορετικές ετερόζυγες μεταλλάξεις. Παρόλα αυτά, στην εργασία των Baba et al<sup>99</sup> περιγράφονται δύο περιπτώσεις ασθενών με μεμονωμένες ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης. Τα άτομα αυτά παρουσίασαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας σε σχετικά προχωρημένη ηλικία, ενώ απουσίαζαν κλασικά συμπτώματα της AOA1, και ειδικά η οπτικοκινητική απραξία. Συνεπώς, στο συγκεκριμένο άρθρο προτάθηκε ότι ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης πιθανώς να οδηγούν σε εκδήλωση ατελούς φαινοτύπου AOA1 σε ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό της νόσου.

<b>ΠΑΡΕΡΜΗΝΕΥΣΙΜΕΣ/ΑΝΕΡΜΗΝΕΥΣΙΜΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ</b>				
<b>Αλλαγή κωδικονίου</b>	<b>Αλλαγή αμινοξέος</b>	<b>Αριθμός κωδικονίου</b>	<b>Αναφορά</b>	
GCC-GTC	Ala-Val	198	Le Ber (2003) Brain 126, 2761 <sup>6</sup>	
CGT-CAT	Arg-His	199	Moreira (2001a) Nat Genet 29, 189 <sup>100</sup>	
CCG-CTG	Pro-Leu	206	Moreira (2001a) Nat Genet 29, 189 <sup>100</sup>	
GTG-GGG	Val-Gly	263	Date (2001) Nat Genet 29, 184 <sup>13</sup>	
GAT-GGT	Asp-Gly	267	Le Ber (2003) Brain 126, 2761 <sup>6</sup>	
TGGa-TGA	Trp-Term	279	Moreira (2001a) Nat Genet 29, 189 <sup>100</sup>	
tTGG-CGG	Trp-Arg	279	Le Ber (2003) Brain 126, 2761 <sup>6</sup>	
<b>ΜΙΚΡΕΣ ΠΡΟΣΘΗΚΕΣ</b>				
<b>Προσθήκη</b>	<b>Κωδικόνιο</b>	<b>Νουκλεοτίδιο</b>	<b>Αναφορά</b>	
TGCAC <sup>^</sup> ACTGTGGGGGAAAAG	229	689	Moreira (2001a) Nat Genet 29, 189 <sup>100</sup>	
<b>ΜΙΚΡΟΕΛΛΕΙΨΕΙΣ</b>				
<b>Έλλειψη</b>	<b>Κωδικόνιο</b>	<b>Αναφορά</b>		
ACATTGG <sup>^</sup> AAT <sup>^</sup> CTTTCAATAC	280	Date (2001) Nat Genet 29, 184 <sup>13</sup>		
<b>ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ</b>				
<b>IVS(ιντρόνιο)</b>	<b>Donor/Acceptor(αποδέκτης/χορηγός)</b>	<b>Σημείο</b>	<b>Αντικατάσταση</b>	<b>Αναφορά</b>
5	ds	1	G-A	Le Ber (2003) Brain 126, 2761 <sup>6</sup>
6	as	-1	G-A	Amouri (2004) Neurology 63, 928 <sup>98</sup>
<b>ΜΕΓΑΛΕΣ ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ</b>				
<b>Περιγραφή</b>	<b>Αναφορά</b>			
Ολόκληρο το γονίδιο	Amouri (2004) Neurology 63, 928 <sup>98</sup>			

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Μεταλλάξεις του γονιδίου της απραταξίνης.

## Μοριακή βάση της ΑΟΑ1

Το γονίδιο της απραταξίνης (*APTΧ*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 και συγκεκριμένα στη θέση 9p13.3 και αποτελείται από 7 εξόνια τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη της απραταξίνης<sup>101</sup>. Εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 3 οδηγεί στη δημιουργία δύο διαφορετικών ισομορφών, οι οποίες κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες 342 και 147 αμινοξέων αντίστοιχα<sup>1</sup>.

Οι Moreira et al εντόπισαν το γονίδιο *APTΧ* στο χρωμόσωμα 9p13.3 (MIM#208920) σε μελέτη των απλοτύπων ασθενών με ΑΟΑ1 από την Πορτογαλία και την Ιαπωνία. Επιπλέον, πρωτοαναφέρθηκαν 4 μεταλλάξεις οι οποίες σε ομόζυγη ή συνδυασμένη ετερόζυγη κατάσταση, συσχετίστηκαν με την κλινική εικόνα των ασθενών με ΑΟΑ1. Ειδικότερα, ανιχνεύθηκαν οι μεταλλάξεις, 596G→A (R199H), 617C→T (P206L), 837G→A (W279X) και 689insT<sup>99</sup>.

Οι Date et al<sup>13</sup> μελέτησαν 7 οικογένειες διαφόρων περιοχών της Ιαπωνίας και περιέγραψαν τη μετάλλαξη αντικατάστασης 263T→G (Val→Gly) και την έλλειψη 318delT που οδηγεί σε αλλαγή αναγνωστικού πλαισίου και σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης. Οι μεταλλάξεις αυτές βρέθηκαν σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις που είχαν ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες.

Στο άρθρο των Le Ber et al<sup>6</sup> έγινε επιλογή ασθενών με προοδευτική παρεγκεφαλιδική αταξία και χωρίς οικογενειακό ιστορικό, όπου μετά τον αποκλεισμό της αταξίας FRDA (με βάση τη μοριακή ανάλυση), έγινε μελέτη των ατόμων ως προς το γονίδιο *APTΧ*. Τέσσερις νέες μεταλλάξεις αναφέρθηκαν σε αυτό το άρθρο και συγκεκριμένα οι A198V, D267G, W279R και IVS5+1, οι οποίες εντοπίστηκαν στα εξόνια 5 και 6 του γονιδίου της απραταξίνης. Επίσης αναφέρθηκε η μετάλλαξη 837G→A (εξόνιο 6) η οποία είχε ήδη περιγραφεί παλαιότερα<sup>101</sup>. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε ομόζυγη ή συνδυασμένη ετερόζυγη κατάσταση.



Σε άλλη μελέτη 13 ασθενών από 3 οικογένειες της Τυνησίας με εμφάνιση παρεγκεφαλιδικής αταξίας σε νεαρή ηλικία και οπτικοκινητική απραξία, διαπιστώθηκαν δύο μεταλλάξεις<sup>98</sup>. Η πρώτη ανιχνεύθηκε σε 2 ασθενείς της ίδιας οικογένειας και πρόκειται για έλλειψη και των 7 εξονίων της απραταξίνης. Η δεύτερη εντοπίστηκε σε 2 διαφορετικές οικογένειες και πρόκειται για τη μετάλλαξη (875-1G>A), η οποία επηρεάζει την συντηρητική περιοχή πριν την έναρξη του εξονίου 7, με αποτέλεσμα να προκαλεί αλλαγή στο μάτισμα,, κατά την οποία δεν μεταγράφεται το εξόνιο 7.

Πρόσφατα περιγράφηκε μια νέα μετάλλαξη (Val230Gly) της απραταξίνης<sup>8</sup>. Ο ασθενής εμφάνιζε ομόζυγη μετάλλαξη αντικατάστασης T σε G (εξόνιο 5) η οποία προκαλεί μια παρερμηνεύσιμη αλλαγή βαλίνης σε γλυκίνη στο κωδικόνιο 230 στην HIT περιοχή της πρωτεΐνης. Ανάλυση με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους στους ινοβλάστες του ασθενή με την μετάλλαξη Val230Gly έδειξε μείωση των επιπέδων της απραταξίνης κατά 75% σε σχέση με τους ινοβλάστες του φυσιολογικού μάρτυρα.

Σε άλλο άρθρο, περιγράφηκε ασθενής με παρεγκεφαλιδική ατροφία, ο οποίος εμφάνισε συμπτώματα της νόσου σε προχωρημένη ηλικία (40 ετών)<sup>11</sup>. Διαπιστώθηκε μια νέα ομόζυγη μετάλλαξη T→C στο εξόνιο 5 που οδηγεί στην αντικατάσταση της λευκίνης από προλίνη στο κωδικόνιο 223 (L223P).

Σε άλλη έρευνα, μελετήθηκαν 6 ασθενείς από 4 οικογένειες Ιαπώνων με αταξία σε νεαρή ηλικία, οπτικοκινητική απραξία και υποαλβουμιναιμία<sup>12</sup>. Τα μοριακά ευρήματα έδειξαν αρχικά ότι όλοι οι ασθενείς είχαν φυσιολογικό αριθμό επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA του ιντρονίου 1 της φραταξίνης. Στο άρθρο αυτό διαπιστώθηκε μια νέα ανερμηνεύσιμη ομόζυγη μετάλλαξη αντικατάστασης A→G η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση ιστιδίνης από αργινίνη στο αμινοξύ 27 (H27R).

Ασθενείς της νότιας Ιταλίας που εμφάνιζαν προοδευτική αταξία και περιφερική νευροπάθεια, ανιχνεύθηκαν θετικοί για μετάλλαξη στο γονίδιο της απραταξίνης. Ένας από τους ασθενείς παρουσίασε μια νέα ομόζυγη μετάλλαξη αντικατάστασης T→A, η οποία

οδηγεί σε αντικατάσταση της ιστιδίνης σε γλουταμίνη στο αμινοξύ 201 (H201Q). Η μετάλλαξη H201Q οδήγησε σε ήπια κλινικά εικόνα<sup>7</sup>.

## Βαρύτητα μεταλλάξεων

Οι ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις φαίνεται ότι προκαλούν σοβαρότερες επιπτώσεις στο φαινότυπο του ασθενούς σε σχέση με τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις<sup>8, 10, 100, 102</sup>. Επίσης μεταλλάξεις προσθήκης ή έλλειψης οδηγούν σε βαριάς μορφής φαινότυπο με εκδήλωση της νόσου σε παιδική ηλικία, σε αντίθεση με τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που προκαλούν ηπιότερη κλινική εικόνα με εκδήλωση της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία<sup>13</sup>. Επιπλέον, η έλλειψη των 7 εξονίων της απραταξίνης που εντοπίστηκε σε μια οικογένεια προκάλεσε τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου AOA1 με ήπιο φαινότυπο<sup>98</sup>. Αντιθέτως, σε άλλο άρθρο περιγράφεται ασθενής με ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της απραταξίνης και βαριά κλινική εικόνα, και προτείνεται ότι η έλλειψη του γονιδίου προκαλεί βαρύτερη συμπτωματολογία σε σχέση με τις σημειακές μεταλλάξεις<sup>103</sup>.

Όλες οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις της απραταξίνης που οδηγούν σε οπτικοκινητική απραξία AOA1, εντοπίζονται είτε σε ομόζυγη, είτε σε συνδυασμένη ετερόζυγη κατάσταση.

Σε άλλο άρθρο, περιγράφονται δύο ασθενείς με παρεγκεφαλιδική αταξία, χωρίς όμως οπτικοκινητική αταξία ή υποαλβουμιναιμία<sup>99</sup>. Και οι 2 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι για μεταλλάξεις του γονιδίου της απραταξίνης. Συγκεκριμένα, στον πρώτο ασθενή παρατηρήθηκε μια ετερόζυγη αλλαγή G→A στο νουκλεοτίδιο 725, οδηγώντας σε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη S242N στο εξόνιο 5. Στο δεύτερο ασθενή διαπιστώθηκε ετερόζυγη αλλαγή A→G στο νουκλεοτίδιο στη θέση 457, προκαλώντας την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη K153E στο εξόνιο 3. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης έρευνας οδηγούν στην υπόθεση πως ασθενείς με ετερόζυγες γονιδιακές μεταλλάξεις της απραταξίνης είναι πιθανό

να προκαλούν έναν ατελή φαινότυπο της νόσου AOA1. Εντούτοις, στη συγκεκριμένη έρευνα διατηρείται μια επιφύλαξη για την ύπαρξη ετερόζυγων μεταλλάξεων, καθώς η τεχνική της αλληλούχησης του γονιδίου που ακολουθήθηκε αδυνατεί να εντοπίσει την πιθανή ετερόζυγη έλλειψη κάποιου εξονίου ή και ολόκληρου του γονιδίου. Επομένως, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο εάν στους συγκεκριμένους ασθενείς ο φαινότυπος είναι αποτέλεσμα μόνο των ετερόζυγων μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν ή μιας πιθανής ετερόζυγης συνύπαρξης σημειακής μετάλλαξης και έλλειψης εξονίου ή και γονιδίου.

## Βιοχημικά χαρακτηριστικά της AOA1

Η απραταξίνη (APTX) είναι μια πρωτεΐνη με 342 αμινοξέα η οποία εντοπίζεται στο πυρήνα και στο πυρηνίσκο<sup>13, 100, 104-106</sup>. Αποτελείται από 2 ισομορφές, την μακρά (APTX-L) και τη βραχεία (APTX-S) η οποία οδηγεί σε εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 3. Η APTX-L αποτελεί την επικρατέστερη ισομορφή στους περισσότερους ιστούς περιλαμβάνοντας τον εγκεφαλικό φλοιό και την παρεγκεφαλίδα. Το άμινο-τελικό άκρο της απραταξίνης περιέχει μια περιοχή FHA (N-terminal forkhead-associated domain) που είναι ομόλογη με την FHA περιοχή της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης 3'-φωσφατάσης (PNKP) και αλληλεπιδρά με φωσφοροπρωτεΐνες επιδιόρθωσης σε θραύσματα των αλυσίδων του DNA. Ως στόχοι της PNKP έχουν αναγνωρισθεί οι υπομονάδες XRCC1 και XRCC4 του συμπλόκου της DNA λιγάσης που προωθούν την επιδιόρθωση των θραυσμάτων στη μία ή και στις δύο έλικες του DNA<sup>107-109</sup>. Η απραταξίνη επίσης αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες XRCC1 και XRCC4<sup>104, 110</sup>. Το ενδιάμεσο τμήμα της απραταξίνης έχει μια περιοχή τριάδας ιστοιδίνης (histidine-triad domain, HIT). Η περιοχή αυτή έχει μια χαρακτηριστική δομή η οποία αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από υδρόφοβα αμινοξέα (Brenner, 2002). Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το καταλυτικό ρόλο της HIT περιοχής της απραταξίνης. Οι περισσότερες μεταλλάξεις των ασθενών με AOA1 έχουν εντοπιστεί στην περιοχή αυτή<sup>111, 112</sup>. Το καρβόξυ-

τελικό άκρο της απραταξίνης περιέχει μια περιοχή DNA-σύνδεσης C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (zinc-finger domain, ZF). Πιστεύεται πως οι HIT και ZnF περιοχές δημιουργούν ένα υψηλής συγγένειας σύμπλοκο που κλειδώνει το ένζυμο μέσα σε βλάβες του DNA<sup>8, 13, 100, 113</sup>.

Ο Caldecott<sup>114</sup> προτείνει πως υπάρχουν 2 ευδιάκριτα σύμπλοκα που σχετίζονται με το μηχανισμό επιδιόρθωσης των θραυσμάτων στη μία έλικα του DNA: το XRCC1/DNAIlgaseIII/APTX και το XRCC1/DNAIlgase III/PNKP. Το συγκεκριμένο άρθρο καταδεικνύει την παράλληλη συμμετοχή της απραταξίνης και της PNKP πρωτεΐνης στον πολυπρωτεϊνικό μηχανισμό επιδιόρθωσης των θραυσμάτων στη μία έλικα DNA<sup>114</sup>. Επιπρόσθετα, με βάση τα άρθρα των Clements et al<sup>103</sup> και Burma et al.<sup>115</sup>, η απραταξίνη συνδέεται επίσης και με την υπομονάδα XRCC4 μέσω της FHA περιοχής της, δημιουργώντας το σύμπλοκο XRCC4/DNA IlgaseIV/ APTX, συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση θραυσμάτων και στις δύο έλικες του DNA<sup>104, 115</sup>.

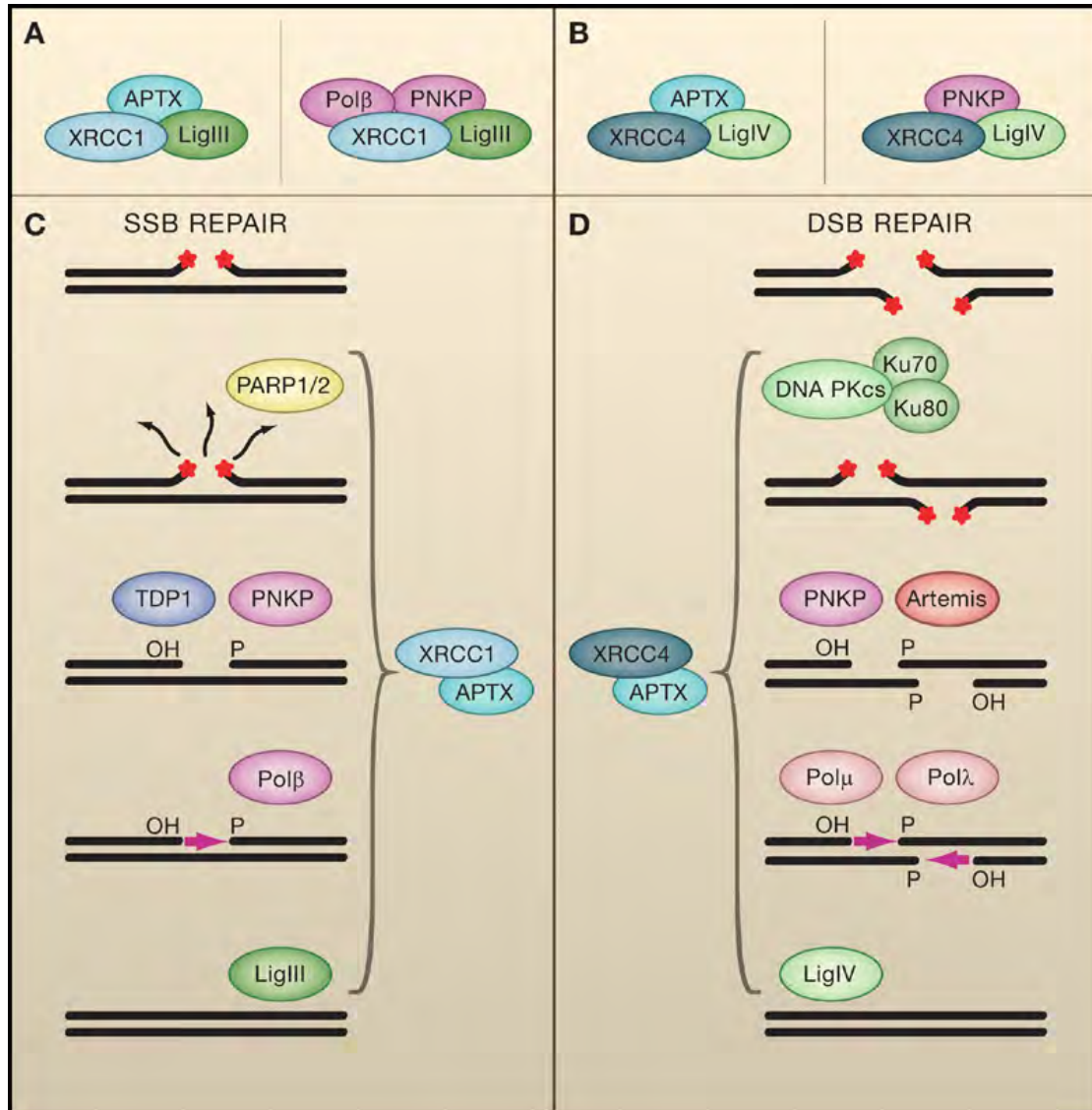
#### **Επιδιόρθωση θραυσμάτων στο μόριο του DNA (εικόνα 4)**

Οι διαδικασίες επιδιόρθωσης των θραυσμάτων στη μία έλικα ή και στις δύο έλικες του DNA συνοψίζονται στην εικόνα 4.

Τα θραύσματα μονής έλικας αναγνωρίζονται από τα ένζυμα PARP1 και PARP2. Η σύνδεση της PARP στο σπάσιμο στέλνει σήμα σε άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA όπως τις πρωτεΐνες XRCC1, APTX και PNKP με σκοπό την επιδιόρθωση των άκρων του θραύσματος της έλικας. Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση β καταλύει τη σύνθεση του DNA στο σημείο του ρήγματος και η σύνδεσή του ολοκληρώνεται από την DNA λιγάση III.

Η επιδιόρθωση των θραυσμάτων στις δύο έλικες του DNA αρχίζει από την DNA-εξαρτημένη πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK), που αποτελείται από το ετεροδιμερές Ku70/80 και την DNA-PK καταλυτική υπομονάδα (DNA-PK cs). Επιπλέον, πρωτεΐνες όπως PNKP, XRCC4, Artemis και APTX συμβάλλουν στην επιδιόρθωση των άκρων των θραυσμάτων της διπλής έλικας. Οι DNA πολυμεράσες μ και λ συμμετέχουν στην πλήρωση των κενών και

τελικά η DNA λιγάση IV ολοκληρώνει την τελική σύνδεση του DNA στο σημείο των θραυσμάτων<sup>106</sup>.



Εικόνα 4: Συμμετοχή της απραταξίνης σε θραύσματα στη μία ή και στις δύο έλικες του μορίου του DNA<sup>106</sup>

Συμπερασματικά, η απραταξίνη συμμετέχει στην επιδιόρθωση των θραυσμάτων του DNA και πιστεύεται πως η συσσώρευση τέτοιων θραυσμάτων με ταυτόχρονη απουσία της απραταξίνης αποτελεί τη βάση της νευροεκφυλιστικής νόσου AOA1. Τίθεται όμως το

ερώτημα, αφού το ένζυμο αυτό δεν περιορίζεται στο νευρικό σύστημα, γιατί το πρόβλημα σχετικά με τις συγκεκριμένες βλάβες του DNA εντοπίζεται στους νευρώνες;

Η απάντηση πιθανότατα να δίνεται με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του νευρικού ιστού, ο οποίος έχει αυξημένη ανάγκη της λειτουργίας της απραταξίνης. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

1. Οι νευρώνες είναι μη διαιρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα σταδιακά να συσσωρεύονται βλάβες του DNA, καθώς δεν γίνεται αντιγραφή του DNA.
2. Έρευνες έχουν δείξει ότι η διαδικασία της μετάφρασης είναι μια ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία στους νευρώνες σε σχέση με άλλους κυτταρικούς τύπους, κατ' επέκταση, η συσσώρευση βλαβών στους νευρώνες θα έχει αντίστοιχα σοβαρές επιπτώσεις στη διαδικασία αυτή<sup>116</sup>.
3. Οι νευρώνες είναι εκτεθειμένοι σε υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες καθώς ο εγκέφαλος καταναλώνει μια δυσανάλογα υψηλή ποσότητα οξυγόνου σε σύγκριση με άλλους ιστούς. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε θραύσματα του DNA, κατά συνέπεια υπάρχει σημαντική εξάρτηση του νευρικού συστήματος από την απραταξίνη για την αποκατάσταση του θραυσμάτων του DNA.
4. Το νευρικό σύστημα έχει περιορισμένη ικανότητα για αναγέννηση. Η κυτταρική απώλεια δεν μπορεί να αναπληρωθεί από νέο ιστό και επομένως οδηγεί σε προοδευτική απώλεια των φυσιολογικών λειτουργιών<sup>105</sup>.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## A. ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ ΦΟΡΕΩΝ ΑΤΑΞΙΑΣ FRIEDREICH ΣΤΟΝ ΕΥΡΥΤΕΡΟ ΧΩΡΟ ΤΗΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Η μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για το 98% των περιπτώσεων ασθενών με FRDA είναι η επέκταση των τριπλετών GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *FXN*, το οποίο σε ομόζυγη κατάσταση οδηγεί σε κλινική εκδήλωση της ασθένειας, ενώ οι φορείς είναι απόλυτα φυσιολογικοί. Αυτή είναι η πιο διαδεδομένη αιτία ασθένειας με επέκταση επαναλήψεων τρινουκλεοτιδίου, όπου 1/90 στην Ευρώπη είναι φορείς<sup>21, 40</sup>.

Κατά τη διάρκεια της πρώτης φάσης της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης του υπεύθυνου αλληλομόρφου για την ασθένεια της FRDA στον Ελλαδικό χώρο. Συγκεκριμένα, η πραγματοποίηση του γενετικού ελέγχου έγινε στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και πιο ειδικά, σε διαφορετικές ομάδες του πληθυσμού στο χώρο αυτό. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν 265 άτομα Θεσσαλών, 56 άτομα Καραγκούνηδων, 74 άτομα Σαρακατσάνων και 94 άτομα Αθίγγανων. Συνολικά, 489 άτομα από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό του ποσοστού των φορέων της μετάλλαξης του *FXN*.

Σαν πρώτο βήμα μετά την ολοκλήρωση συλλογής των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η εξαγωγή του DNA αυτών.

## Εξαγωγή DNA

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης γενωμικού DNA. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως το είδος και η ποσότητα των διαθέσιμων κυττάρων, το είδος και η ποιότητα του DNA που θέλουμε να απομονώσουμε. Στο συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται 10ml αίματος που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

–Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων  
Διάλυμα διάσπασης I:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (155mM),  $\text{KHCO}_3$  (10mM),  
EDTA (1mM), pH=7.4  
Διάλυμα διάσπασης II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na  
EDTA (2mM), pH=8.2  
–Διάλυμα πρωτεϊνάσης K (10mg/ml)  
–Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate:  
δωδεκακυλοθειικό νάτριο)  
–Κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M)  
–Απόλυτη αιθανόλη  
– $\text{CH}_3\text{COONa}$  (3M)  
–Πηκτή αραρόζης 1%



Τα στάδια που ακολουθούνται για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης παρουσιάζονται παρακάτω:

### 1η μέρα

1. Τοποθετούμε το αίμα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12ml με ddH<sub>2</sub>O (δισ απεσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).
2. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).
3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH<sub>2</sub>O έως 12ml και ανακινούμε σε αναδευτήρα.
4. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα διάσπασης I μέχρι τα 12ml.
6. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
7. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 5 και 6 με διάλυμα διάσπασης I.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα διάσπασης II μέχρι τα 6ml (τα λυτικά διαλύματα I και II διευκολύνουν τη διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, περιέχουν EDTA που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) που θεωρούνται απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται, γεγονός που εξυπηρετεί στην αποφυγή της διάσπασης του DNA). Ανακινούμε ισχυρά και επωάζουμε για 15-30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Προσθέτουμε 750μl SDS (10% w/v) και 100μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεΐνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).
10. Επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 16-18 ώρες.

### 2η μέρα

Προσθέτουμε 2ml 6M κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15 δευτερόλεπτα (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).

1. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
2. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο και απορρίπτουμε το ίζημα. Αναδεύουμε ισχυρά.
3. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
4. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απορρίπτουμε το ίζημα.
5. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH<sub>3</sub>COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. Σε περίπτωση που η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε CH<sub>3</sub>COONa
6. Επώαση στους -20<sup>0</sup>C O/N.

### 3η μέρα

1. Φυγοκεντρούμε για 50 λεπτά στις 3500 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο των 2 ml (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).
3. Φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά στις 12000 στροφές/λεπτό, στους 4<sup>0</sup>C.
4. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20 λεπτά .
5. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).
6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.
7. Το DNA φυλάσσεται στους 4<sup>0</sup>C (για συχνή χρήση) ή στους -20<sup>0</sup>C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

## Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA

### A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

Με μικρή ποσότητα DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποιότητας του DNA.

### B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του με

φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα.

Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο  $OD_{260}/OD_{280}$ . Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 50 \times \text{τιμή } OD_{260}$$

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

## Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-(PCR)

Μετά την ολοκλήρωση της εξαγωγής του DNA, ακολούθησε η μελέτη των δειγμάτων αυτών με την τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (primers) της αλληλουχίας των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *FXN*<sup>9</sup> και με βάση το πρωτόκολλο που δίνεται στο kit της Roche-Expand Long Template PCR System (Lot. No. 10938023).

## Γονιδιακή περιοχή στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη:

Παρακάτω δίνεται η αλληλουχία του DNA που ενισχύεται στα πειράματά μας (με την τεχνική της PCR) με σκοπό την ανίχνευση της μετάλλαξης που ευθύνεται για την FRDA. Δίνονται οι περιοχές των εκκινητών (forward and reverse) και η βασική περιοχή μετάλλαξης των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA. (NT 023935)

```

      →      FORWARD ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ      ←
ctttaaggctt aaacttccca cacgtgttat ttggcccaca ttgtgtttga
agaaactttg ggattggttg ccagtgcctta aaagttagga cttagaaaat
ggatttcctg gcaggacgcg gtggctcatg ccataatct cagcactttg
ggaggcctag gaaggtggat cacctgaggt ccggagttca agactaacct
ggccaacatg gtgaaacca gtatctacta aaaaatacaa aaaaaaaaaa
      →      GAA ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ      ←
aaaagaagaa gaagaagaag aaaataaaga aaagttagcc gggcgtggtg
tcgcgcgctt gtaatcccag ctactccaga ggctgcggca ggagaatcgc
ttgagcccgg gaggcagagg ttgcattaag ccaagatcgc ccaatgcact
ccggcctggg cgacagagca agactccgtc tcaaaaaata ataataataa
ataaaaaata aaaataaaat ggatttccca gcatctctgg aaaaataggc
→      REVERSE ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ      ←
aagtgtggcc atgatgggtcc ttagatctcc tctaggaaag
  
```

Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε δίνεται στη συνέχεια:

### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

	1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
H <sub>2</sub> O	22.35 µl
Δεοξυνουκλεοτίδια(10 mM)	1 µl
Εκκινητής-Forward (50 pm/µl)	0.6 µl
Εκκινητής-Reverse (50 pm/µl)	0.6 µl
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer1 10x) με 17.5mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Μείγμα ενζύμου	0.45 µl

**(+) 2  $\mu$ l DNA**

Οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR είναι:

*Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:*

1. 94°C-5 λεπτά (αποδιάταξη του DNA)
2. 94°C-10 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη του DNA )
3. 62°C-30 δευτερόλεπτα. (προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο)
4. 68°C-3 λεπτά (επιμήκυνση)
5. 9 φορές στο στάδιο 2 (κύκλοι)
6. 94°C-10 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη του DNA)
7. 62°C-30 δευτερόλεπτα. (προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο)
8. 68°C-3 λεπτά+20 δευτερόλεπτα/κύκλο (επιμήκυνση)
9. 16 φορές στο στάδιο 6 (κύκλοι)
10. 68°C-6 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
11. 4°C (συντήρηση)

Τα δείγματα μετά την αντίδραση της PCR, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5% όπου και ανιχνεύεται η ύπαρξη ή μη ετερόζυγων ατόμων ως προς την FRDA. Επέκταση της αλληλουχίας των τριπλετών GAA σε ένα από τα 2 αλληλόμορφα γονίδια, μαρτυρά την ύπαρξη φορέα, ενώ επέκταση αυτής και στα 2 αλληλόμορφα είναι απόδειξη ασθένειας.

**Ανάλυση με τη μέθοδο της αλληλούχησης (sequencing):**

Μετά την ανίχνευση των ετερόζυγων ατόμων με την μέθοδο της PCR, ακολουθεί ως επόμενο στάδιο η ανάλυση των ετεροζυγωτών με τη μέθοδο της αλληλούχησης με σκοπό την επιβεβαίωση της επέκτασης της τριπλέτας GAA και την εύρεση του ακριβή αριθμού των επαναλήψεων της τριπλέτας GAA.

Αρχικά πραγματοποιείται εξαγωγή της μπάντας του αλληλόμορφου γονιδίου που φέρει την επέκταση των τριπλετών GAA με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κιτ της εταιρείας NucleoSpin Extract II, όπως αναλύεται παρακάτω:

1. Κόβεται με καθαρό νυστέρι το κομμάτι της πηκτής αγαρόζης που φέρει την μπάντα
2. Για κάθε 100mg αγαρόζης προστίθενται 200 μl *buffer NT* και το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 50<sup>o</sup> C, μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
3. Τοποθετείται μια κολώνα *NucleoSpin II Extract* σε έναν υποδοχέα *Nucleospin collecting* και τοποθετείται το δείγμα στη κολώνα
4. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000xg
5. Αφαιρείται το υγρό από τον υποδοχέα και στη συνέχεια προστίθεται 600 μl *buffer NT3*. Φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 11,000xg
6. Αφαιρείται το υγρό από τον υποδοχέα και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11,000xg, ώστε να αφαιρεθούν υπολείματα του *buffer NT3* από το φίλτρο της κολώνας
7. Η κολώνα τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι 1.5ml και προστίθενται 40 μl *elution buffer*. Γίνεται επώαση για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11,000xg

Στη συνέχεια τα δείγματα που απομονώθηκαν με τη διαδικασία εξαγωγής γενετικού υλικού από αγαρόζη, επεξεργάζονται από στήλες καθαρισμού με τη χρήση του *kit-QIAquick PCR purification Kit protocol* της εταιρείας *Qiagen*. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη *buffer PB* σε αναλογία 5/1 σε σχέση με την ποσότητα του δείγματος
2. Τοποθετείται κολώνα σε σωληνάκι συλλογής των 2ml
3. Προστίθεται το δείγμα μέσα στη κολώνα και φυγοκεντρείται για 60 sec σε 13.000rpm
4. Αφαιρείται το υποκείμενο υγρό, προστίθενται 750 μl *buffer PE* στην κολώνα και φυγοκεντρείται το δείγμα για 60 sec σε 13.000rpm
5. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για καλύτερο καθαρισμό της κολώνας

6. Τοποθετείται η κολώνα σε καθαρό σωληνάκι 1.5ml

7. Προστίθενται 40 µl *buffer EB* στην κολώνα, επωάζεται το δείγμα για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 60 sec σε 13.000rpm

Ακολούθως, τα δείγματα ελέγχονται για τον επιτυχή καθαρισμό τους, με τη φόρτωση μικρής ποσότητας (5µl) των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5%.

Για την περαιτέρω ανάλυση της αλληλούχησης των εξονίων του γονιδίου *FXN*, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανάλυσης της Beckman Coulter (CEQ 2000). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της αλληλούχησης με βάση το πρωτόκολλο και τις συνθήκες που δίνονται από την εταιρεία, όπως αναλύονται παρακάτω:

*Πρωτόκολλο:*

CEQ	1 αντίδραση
H <sub>2</sub> O	12.5 µl
PCR προϊόν	3 µl
Διάλυμα (Ready mix)	4 µl
Εκκινητής F ή R	0.5 µl

\* Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις και με τους 2 εκκινητές για κάθε εξόνιο (forward and reverse) σε όλους τους ασθενείς, με σκοπό την επιβεβαίωση αλλαγών που πιθανώς θα εντοπιστούν στο τέλος της διαδικασίας

*Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:*

1. 96°C-20 δευτερόλεπτα. (αποδιάταξη του DNA)
2. 50°C-20 δευτερόλεπτα. (προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο)
3. 60°C-4 λεπτά (επιμήκυνση)
4. 30 φορές στο στάδιο 1 (κύκλοι)
5. 4°C (συντήρηση)



Στο επόμενο στάδιο ακολουθείται η διαδικασία κατακρίμνησης με αιθανόλη των δειγμάτων του προηγούμενου σταδίου, με βάση τα βήματα που προτείνονται από την εταιρεία της Beckman Coulter και αναφέρονται παρακάτω:

1. Ετοιμάζονται για κάθε δείγμα, νέα μικροσωληνάρια των 0.5 mL
2. Σε κάθε σωληνάριο, προστίθενται 4μL *stop solution* ( 1.5 M NaOAc+ 50 mM EDTA), 1μL *γλυκογόνου* και όλη η ποσότητα του αντίστοιχου δείγματος που προέκυψε από την αντίδραση πρωτοδιάταξης του DNA
3. Προστίθενται 60 μL αιθανόλης (95%) σε κάθε δείγμα και μετά από ανακίνηση φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά στους 4°C και στις 14.000 στροφές (rpm). Απορρίπτεται το υπερκείμενο
4. Προστίθενται 180 μL αιθανόλης (70%). Φυγοκεντρώνται τα δείγματα στις 14.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά στους 4°C και ακολούθως αφαιρείται το υπερκείμενο
5. Στεγνώνει το ίζημα για 10 λεπτά σε κενό αέρος
6. Διαλύονται τα δείγματα σε 40 μL μίγματος φόρτωσης (το οποίο παρέχεται από το kit)
7. Τα μίγματα στη συνέχεια μεταφέρονται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω σε πιατάκι πολυπροπυλενίου (παρέχεται από το kit)
8. Καλύπτονται τα δείγματα από 1 σταγόνα λαδιού (παρέχεται από το kit)
9. Το πιατάκι τοποθετείται στην κατάλληλη θέση του μηχανήματος CEQ 2000, και ξεκινάει η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων από το σύστημα

Μετά το τέλος της διαδικασίας ανάλυσης των δειγμάτων από το σύστημα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των αποτελεσμάτων σχετικά με την επέκταση των επαναλαμβανόμενων GAA επεκτάσεων στους φορείς που αναλύθηκαν.

## B. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ARX* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ FRDA ΑΛΛΑ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΗΣ ΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

Στη δεύτερη φάση της διατριβής μελετήθηκαν 14 άτομα με νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία και ετερογένεια στα κλινικά τους χαρακτηριστικά. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να μελετηθεί η γενετική βάση των συγκεκριμένων ασθενών. Τα κλινικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4:

Κλινικά χαρακτηριστικά	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Ηλικία έναρξης της ασθένειας	15	15	28	7	19	14	22	5	12	30	15	14	19	17
Αταξία βαδίσσεως	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Νυσταγμός	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Αδυναμία εστίασεως του βλέμματος	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Διαταραχή των συζυγών κινήσεων παρακολούθησης	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Κινητική αδυναμία	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Ατροφία μυών	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pes cavus</i>	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Κατάργηση τενόντιων αντανακλαστικών	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Σημείο Babinski	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Αισθητικού τύπου νευροπάθεια	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Απώλεια ακοής	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Καρδιομυοπάθεια	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Σακχαρώδης διαβήτης	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Σκολίωση	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Αξονικού τύπου αισθητική νευροπάθεια	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Διαταραχή της εν τω βάθει αισθητικότητας	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Δυσαρθρία	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Οπτική ατροφία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Μειωμένη οπτική οξύτητα	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δυσδιαδοχοκινήσια	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Δυσκαταποσία	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ατροφία παρεγκεφαλίδας στο MRI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Υπερχοληστερολαμία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Οπτικοκινητική απραξία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Υποαλβουμιναμία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 4: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με νωτιοπαρεγκεφαλιδική αταξία

Με βάση την κλινική εικόνα των ασθενών που αναφέρονται στον πίνακα 4, η αρχική σκέψη ήταν να γίνει διερεύνηση των ατόμων αυτών για την μετάλλαξη του γονιδίου *FXN* (επέκταση των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου), ως την επικρατέστερη γενετική βάση ατόμων με αντίστοιχους φαινοτύπους.

Για το πρώτο κομμάτι της έρευνας, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο εξαγωγής DNA και ανάλυσης PCR, όπως αναλύθηκε προηγουμένως στη μελέτη της συχνότητας φορέων στην περιοχή της Θεσσαλίας. Τα 13 άτομα ήταν φυσιολογικά ως προς τη μετάλλαξη επέκτασης των GAA και στα 2 αλληλόμορφα γονίδια, ενώ 1 άτομο ήταν ετερόζυγο ως προς αυτήν.

Μετά τα συγκεκριμένα ευρήματα και με βάση προηγούμενες μελέτες<sup>6, 8, 10-13</sup> η επόμενη σκέψη ήταν να γίνει περαιτέρω γονιδιακή ανάλυση των ατόμων αυτών σχετικά με το γονίδιο *APTX*, όπου μεταλλάξεις τους έχουν αναφερθεί σε άτομα με κλινική παρουσίαση αταξίας Friedreich αλλά με έλλειψη της μετάλλαξης του γονιδίου *FXN*.

### Μέθοδος ανάλυσης ασθενών:

Η μελέτη των ασθενών έγινε με την μέθοδο της αλληλούχησης (sequencing) για το γονίδιο *APTX*. Αναλύθηκαν 8 γονιδιακοί τόποι του γονιδίου, χρησιμοποιώντας 8 διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών, στη προσπάθεια να ενισχυθούν οι κωδικοποιούσες περιοχές και των 2 ισομόρφων.

Παρακάτω δίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών (forward and reverse) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων της απραταξίνης με την τεχνική της PCR.

ΕΞΟΝΙΟ	ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ-F	ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ-R
1	5'-TCC GTT AGA GAG GTG CTG GT-3'	5'-CGT CAT TCA AGG CAC ATC AC-3'
2	5'-ATG ATT CAG GCA GGG AGG TA-3'	5'-TCC ATC AAG AT ACC CAG AA-3'
3	5'-TAG GGA AGA TAG GAG CAA G-3'	5'-CCA TAC ATG ACA GAG AAG-3'
4	5'-AGG TGC TGT TGC TAT TAT T-3'	5'-CAT CAT CTA CCA ATC ACA C-3'
5	5'-CAC ACA GTA TTA ACT GTT GCC AAA-3'	5'-GAC CTC TGT GGA GTG GTC ATT-3'
6	5'-GCA CAA GAC TGT GGG AAT TAA G-3'	5'-CAA GCC CAG GCT GAA TCT A-3'
7	5'-TGT CAT TTT GAT TAA GCC ATA GTT G-3'	5'-TCA GGG AAA CAA CCA AAT CA-3'
8	5'-TTG GTA TCT CAT ATT GGT TTT CCA-3'	5'-CCA GAA TAG GTG CCA GCA GT-3'

Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε δίνεται στη συνέχεια<sup>99</sup>:

#### ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

	1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
H <sub>2</sub> O	21.68 μl
ΔΕΟΞΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (2.5 mM)	3 μl
Εκκινητής-F για κάθε εξόνιο (10 pm/μl)	0.6 μl
Εκκινητής-R για κάθε εξόνιο (10 pm/μl)	0.6 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) με 15 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl
DNA πολυμεράση	0.12 μl

**(+) 2 μl DNA**

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για τα εξόνια του γονιδίου *APTχ* δίνονται παρακάτω:

*Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:*

1. 94°C-5 λεπτά (αποδιάταξη του DNA)
2. 94°C-45 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη του DNA)
3. 57°C για τα εξόνια 2/5/8 and 52°C για τα εξόνια 1/3/4/6/7-45 δευτερόλεπτα (προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο)
4. 72°C-45 min (επιμήκυνση)
5. 29 φορές στο στάδιο 2 (κύκλοι)
6. 72°C-5 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
7. 4°C (συντήρηση)

Τα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης της PCR, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5%, για έλεγχο της ενίσχυσης των εξονίων του γονιδίου *APTχ*.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί στο Α' μέρος του κεφαλαίου 'υλικά και μέθοδοι', με σκοπό την αλληλούχηση όλων των εξονίων του γονιδίου *APTX* για τους 14 ασθενείς.

## Γ. ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΦΡΑΤΑΞΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΑΣΘΕΝΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ FRDA ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ ΤΗΣ ΤΥΠΙΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ FRDA

Στο τελευταίο κομμάτι της έρευνας, έγινε έλεγχος του γονιδίου *FXN* για τον ασθενή που ανιχνεύτηκε ετερόζυγος ως προς τη μετάλλαξη επέκτασης των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου. Με βάση τις έρευνες των Campuzano et al<sup>2</sup> και Cossee et al<sup>4</sup> 98% των τυπικών ασθενών με FRDA είναι ομόζυγοι για την επέκταση των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1, ενώ 2% αυτών είναι ταυτόχρονα ετερόζυγοι ως προς της επέκταση GAA και ως προς σημειακή μετάλλαξη μέσα στη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου *FXN*.

Στην τελευταία μελέτη γίνεται ανάλυση της κωδικοποιούσας περιοχής της φραταξίνης, με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής παρουσίας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *FXN*, μια και ένα τέτοιο εύρημα σε συνδυασμό με την ετεροζυγωτία της επέκτασης των GAA τριπλετών, θα δικαιολογούσε την κλινική εικόνα του συγκεκριμένου ασθενούς.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου της φραταξίνης, όπου οι ακολουθίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται παρακάτω:

ΕΞΟΝΙΑ	ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ-F	ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ-R
1	5'-AGC ACC CAG CGC TGG AGG-3'	5'-CCG CGG CTG TTC CCG G-3'
2	5'-AGT AAC GTA CTT CTT AAC TTT GGC-3'	5'-AGA GGA AGA TAC CTA TGA CGT G-3'
3	5'-AAA ATG GAA GCA TTT GGT AAT CA-3'	5'-AGT GAA CTA AAA TTC TTA GAG GG-3'
4	5'-AAG CAA TGA TGA CAA AGT GCT AAC-3'	5'-TGG TCC ACA ATG TCA CAT TTC GG-3'
5A	5'-CTG AAG GGC TGT GCT GTG GA-3'	5'-TGT CCT TAA AAC GGG GCT-3'
5B	5'-CCC ATG CTC AAG ACA TAC TCC-3'	5'-ACA GTA AGG AAA AAA CAA ACA GCC-3'

Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε δίνεται στη συνέχεια

*ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ*

	<b>1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	21.68 μl
<b>Δεοξυνουκλεοτίδια (2.5 mM)</b>	3 μl
<b>Εκκινητής-F για κάθε εξόνιο (10 pm/μl)</b>	0.6 μl
<b>Εκκινητής-R για κάθε εξόνιο (10 pm/μl)</b>	0.6 μl
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) με 15mM MgCl<sub>2</sub></b>	3 μl
<b>DNA πολυμεράση</b>	0.12 μl

**(+) 2 μl DNA**

Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για τα εξόνια του γονιδίου της φραταξίνης δίνονται παρακάτω:

*Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:*

1. 94°C-5 λεπτά (αποδιάταξη του DNA)
2. 94°C-45 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη του DNA)
3. 52°C για τα εξόνια 1/3/4/6/7 and 59°C για τα εξόνια 2/5A/5B/-45 δευτερόλεπτα. (προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο)
4. 72°C-45 λεπτά (επιμήκυνση)
5. 29 φορές στο στάδιο 2 (κύκλοι)
6. 72°C-5 λεπτά (τελική επιμήκυνση)
7. 4°C (συντήρηση)

Τα δείγματα μετά το τέλος της αντίδρασης της PCR, αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5%, για έλεγχο της ενίσχυσης των εξονίων της φραταξίνης και στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία αλληλούχησης αυτών, όπως ήδη περιγράφηκε στο Α' μέρος του κεφαλαίου 'υλικά και μέθοδοι'. Στο τέλος της διαδικασίας, έγινε έλεγχος των αποτελεσμάτων του συστήματος Beckman Coulter, με σκοπό την ανίχνευση πιθανής σημειακής μετάλλαξης, η οποία θα δικαιολογούσε την κλινική εικόνα του ασθενούς που μελετήθηκε.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) Στο πρώτο μέρος της διατριβής έγινε μελέτη του ποσοστού των φορέων ως προς τη μετάλλαξη επέκτασης των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FXN*, στη περιοχή της Θεσσαλίας και σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες. Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5):

Πληθυσμιακές ομάδες	Αριθμός ατόμων	Ετερόζυγα άτομα	Αναλογία	Ποσοστό
ΘΕΣΣΑΛΟΙ	265	4	4 από 265	1.5%
ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗΔΕΣ	56	0	0 από 56	0%
ΣΑΡΑΚΑΤΣΑΝΟΙ	74	1	1 από 74	1.35%
ΑΘΙΓΓΑΝΟΙ	94	1	1 από 94	1.06%
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>489</b>	<b>6</b>	<b>6 από 489</b>	<b>1.22%</b>

Πίνακας 5: Αποτελέσματα της επιδημιολογικής μελέτης φορέων της μετάλλαξης FRDA

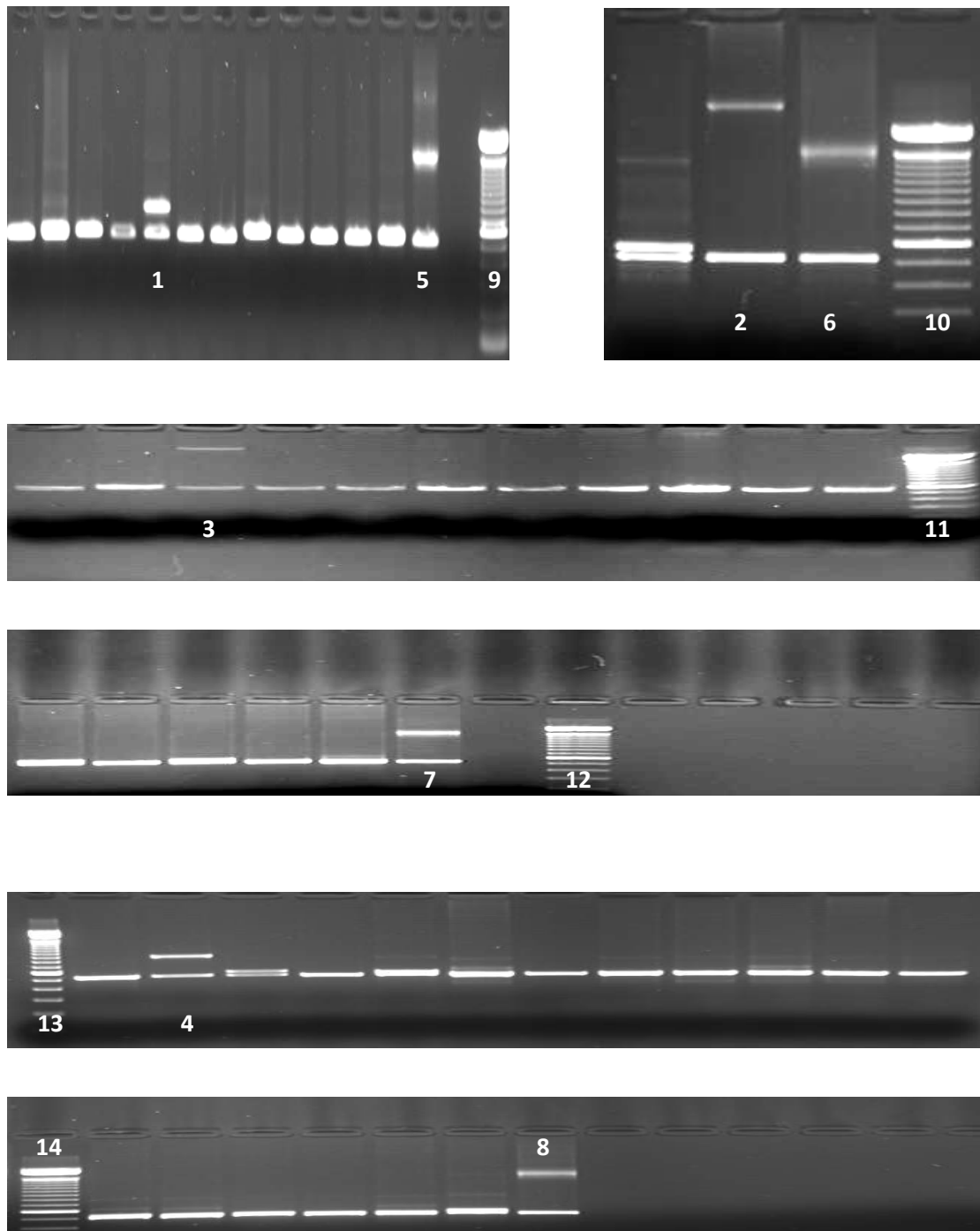
Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

- 265 άτομα **αμιγώς Θεσσαλών**. Ανάμεσά τους εντοπίστηκαν 4 ετερόζυγα άτομα ενώ οι υπόλοιποι ήταν φυσιολογικοί και ως προς τα 2 αλληλόμορφα. Ποσοστό **1.5%**
- 56 άτομα **Καραγκούνηδων**. Όλοι ήταν φυσιολογικοί. Ποσοστό **0%**
- 74 άτομα **Σαρακατσάνων**. Ένα άτομο ετερόζυγο και τα υπόλοιπα φυσιολογικά. Ποσοστό **1.35%**
- 94 άτομα **Αθίγγανων**. Ένα άτομο ετερόζυγο και τα υπόλοιπα φυσιολογικά. Ποσοστό **1.06%**

Συνολικά στα 489 άτομα από Θεσσαλία, εντοπίστηκαν 6 άτομα ετερόζυγα για τη μετάλλαξη FRDA, ποσοστό **1.22%**.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων των πειραμάτων στα οποία ανιχνεύθηκαν τα ετερόζυγα άτομα της μελέτης μαζικού γενετικού ελέγχου ως προς την επέκταση GAA τριπλετών (εικόνες 5, 6, 7):

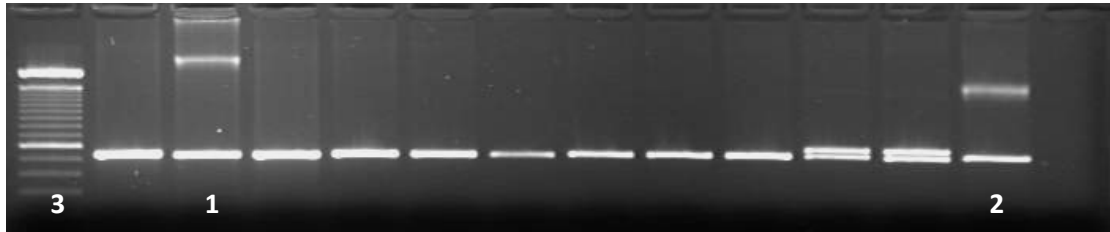
### Θεσσαλοί (εκόνα 5)



Εικόνα 5: 1, 2, 3, 4-ετερόζυγα άτομα Θεσσαλών: η χαμηλή μπάντα (500bp) δείχνει το φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο, ενώ η υψηλότερη μπάντα δείχνει το αλληλόμορφο γονίδιο με επέκταση της τριπλέτας GAA , 5, 6, 7, 8-ετερόζυγα άτομα μάρτυρες, 9, 10, 11, 12, 13, 14- DNA μάρτυρας (100 bp): με βάση το DNA μάρτυρα γίνεται η εκτίμηση του αριθμού των επαναλήψεων των αλληλόμορφων γονιδίων με επέκταση της τριπλέτας GAA

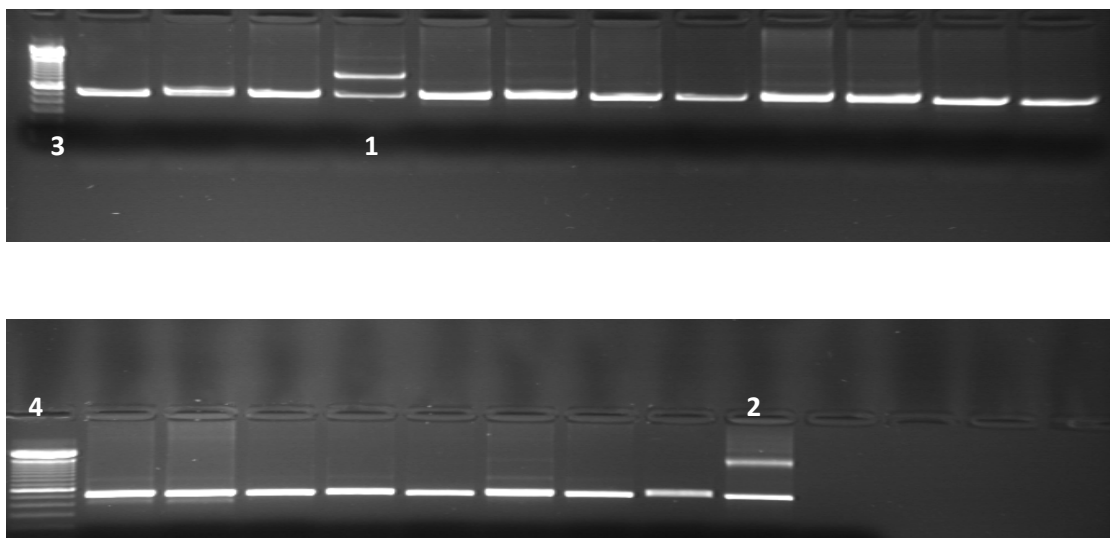


### Σαρακατσάνοι (εικόνα 6)



Εικόνα 6: 1-ετερόζυγο άτομο Σαρακατσάνος: η χαμηλή μπάντα (500bp) δείχνει το φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο, ενώ η υψηλότερη μπάντα δείχνει το αλληλόμορφο γονίδιο με επέκταση της τριπλέτας GAA, 2-ετερόζυγο άτομο μάρτυρας, 3- μάρτυρας 100 bp

### Αθίγγανοι (εικόνα 7)



Εικόνα 7: 1-ετερόζυγο άτομο Αθίγγανος: η χαμηλή μπάντα (500bp) δείχνει το φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο, ενώ η υψηλότερη μπάντα δείχνει το αλληλόμορφο γονίδιο με επέκταση της τριπλέτας GAA, 2-ετερόζυγο άτομο μάρτυρας, 3, 4 - μάρτυρας 100 bp

Με βάση τις προηγούμενες εικόνες και το μάρτυρα-100 bp μπορεί να γίνει μια πρόχειρη εκτίμηση για τον αριθμό επέκτασης των τριπλετών GAA στα θετικά δείγματα. Η μπάνα των φυσιολογικών αλληλομόρφων εντοπίζεται περίπου στο ύψος 500 bp, ενώ για τα ετερόζυγα άτομα, οι μπάνες των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων παρατηρούνται στα ακόλουθα σημεία:

- *Θεσσαλός (1)*- ~700 bp
- *Θεσσαλός (2)*- >2000 bp
- *Θεσσαλός (3)*- >2000bp
- *Θεσσαλός (4)*- ~900 bp
- *Σαρακατσάνος (1)*- >2000bp
- *Αθίγγανος (1)*- ~900 bp

Με βάση τα παραπάνω, εκτιμάται πως οι επαναλήψεις των τριπλετών για τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα σε κάθε περίπτωση είναι:

- *Θεσσαλός (1)*- ~67 επαναλήψεις
- *Θεσσαλός (2)*- >500 επαναλήψεις
- *Θεσσαλός (3)*- >500 επαναλήψεις
- *Θεσσαλός (4)*- ~134 επαναλήψεις
- *Σαρακατσάνος (1)*- >500 επαναλήψεις
- *Αθίγγανος (1)*- ~134 επαναλήψεις

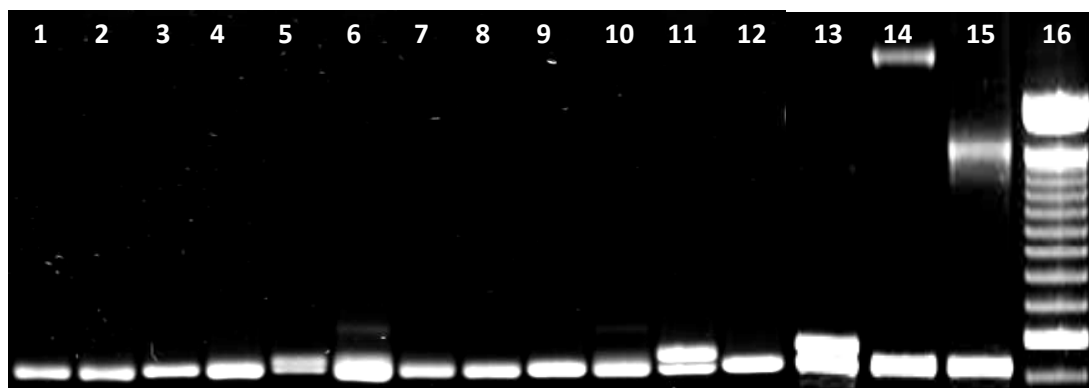
Στο τέλος της φάσης του μαζικού γενετικού ελέγχου, έγινε προσπάθεια να αναλυθούν τα αλληλόμορφα με επεκτάσεις των GAA, με τη μέθοδο αλληλούχησης γονιδίων, για επιβεβαίωση της επέκτασης και καθορισμό του ακριβή αριθμού επαναλήψεων. Εντούτοις, η μέθοδος αλληλούχησης αδυνατεί να διαβάσει μεγάλα κομμάτια όπως των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων της μελέτης μας (>900 bp), με εξαίρεση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου του ατόμου *Θεσσαλός (1)* (~700 bp). Παρακάτω δίνονται οι



Όπως φαίνεται από την προηγούμενη εικόνα, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (εικόνα 8β) εμφανίζει μια ιδιαιτερότητα, στο ότι περιέχει επαναλήψεις του εξαμερούς (GAAGGA.TCCTTC). Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως η περιοχή των επαναλαμβανόμενων τριπλετών ξεκινάει με 3 επαναλήψεις της τριπλέτας GAA.TTC, στη συνέχεια παρεμβάλλονται 33 μη διακοπτόμενες επαναλήψεις του εξαμερούς GAAGGA.TCCTTC και στο τέλος συνεχίζουν άλλες 7 επαναλήψεις της τριπλέτας GAA.TTC.

**B)** Στη δεύτερη φάση της διατριβής μελετήθηκαν 14 ασθενείς με νωτιοπαραγκεφαλική αταξία και ετερογένεια στα κλινικά τους χαρακτηριστικά, με σκοπό να εντοπιστεί η γενετική βάση των συγκεκριμένων ασθενών (πίνακας 2).

Αρχικά, έγινε διερεύνηση των ατόμων αυτών για την μετάλλαξη του γονιδίου *FXN* (επέκταση των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου) όπου μετά την ολοκλήρωση της εξαγωγής του DNA των ασθενών, ακολούθησε η μελέτη των δειγμάτων αυτών με την τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (primers) της αλληλουχίας των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA<sup>9</sup>, όπως ήδη αναφέρθηκε στη μελέτη της συχνότητας φορέων στην περιοχή της Θεσσαλίας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Πηγαδάκια 1 έως 13-φυσιολογικά άτομα ως προς τη μετάλλαξη FRDA. Πηγαδάκι 14-ετερόζυγο άτομο ως προς τη μετάλλαξη. Πηγαδάκι 15-μάρτυρας ετερόζυγος. Πηγαδάκι 16-μάρτυρας-100 bp

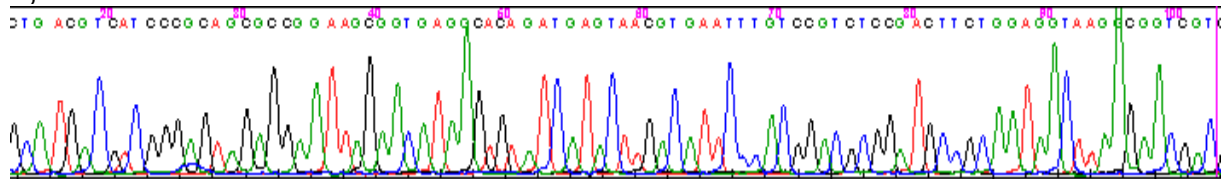
Δεκατρία άτομα είναι φυσιολογικά ως προς τις επαναλήψεις GAA των τριπλετών του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου *FXN*, ενώ ένα άτομο είναι ετερόζυγο ως προς τη μετάλλαξη.

Στη συνέχεια, στη προσπάθεια για περαιτέρω μελέτη της γενετικής βάσης των παραπάνω ασθενών (οι οποίοι εμφανίζουν κλινική εικόνα FRDA αλλά δεν φέρουν την τυπική μετάλλαξη επέκτασης των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FXN*), πραγματοποιήθηκε ανάλυση του γονιδίου της απραταξίνης.

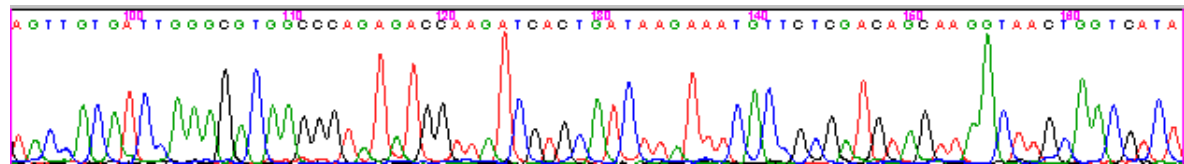
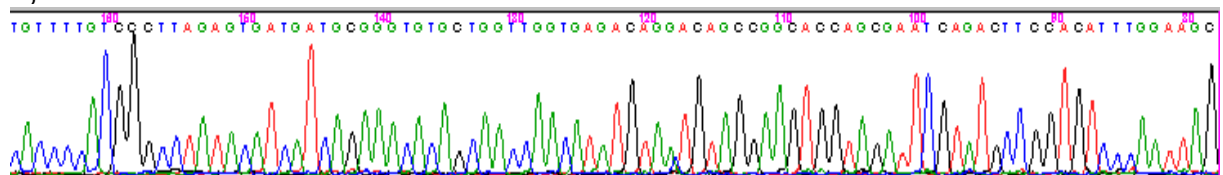
Τα αποτελέσματα από την τεχνική της αλληλούχησης για το γονίδιο της απραταξίνης δεν έδειξαν αλλαγές ως προς τις αλληλουχίες των εξονίων της απραταξίνης.

Εικόνες της αλληλουχίας των εξονίων της απραταξίνης παρουσιάζονται στη συνέχεια:

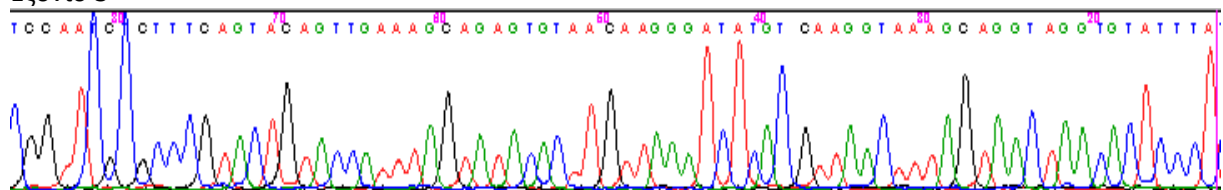
#### Εξόνιο 1



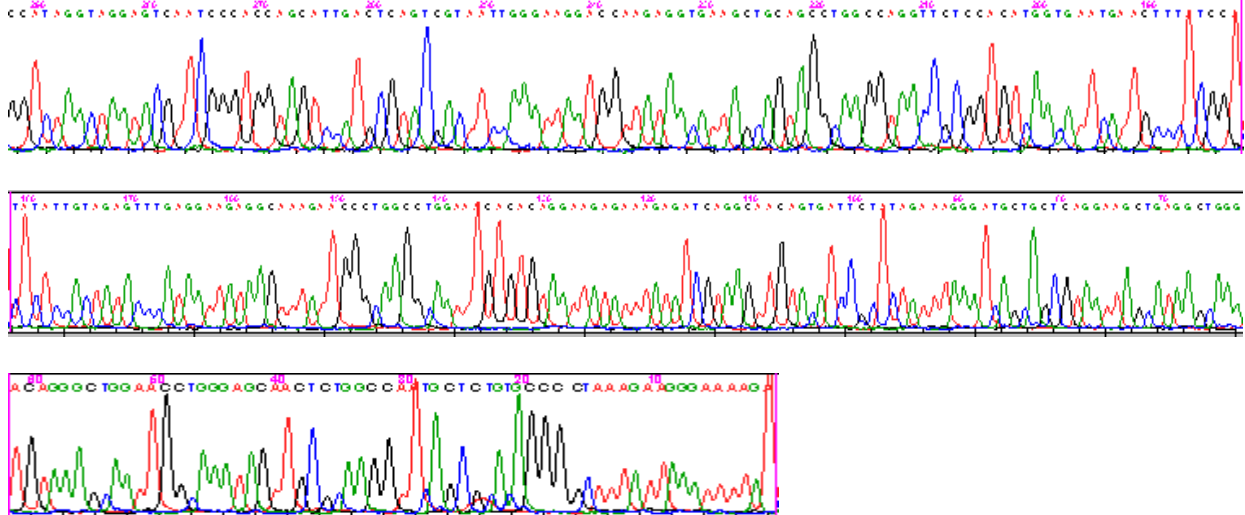
#### Εξόνιο 2



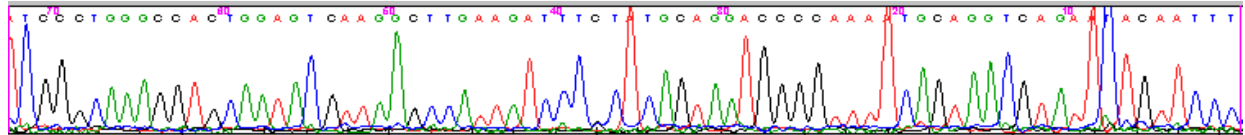
#### Εξόνιο 3



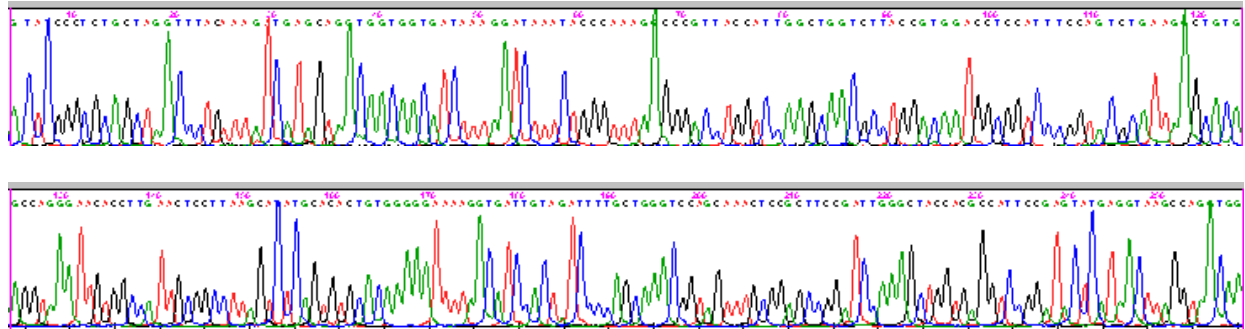
Εξόνιο 4



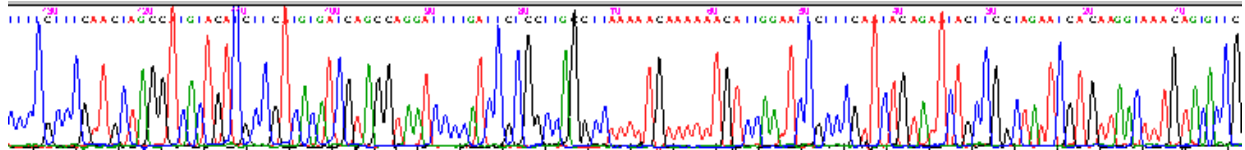
Εξόνιο 5



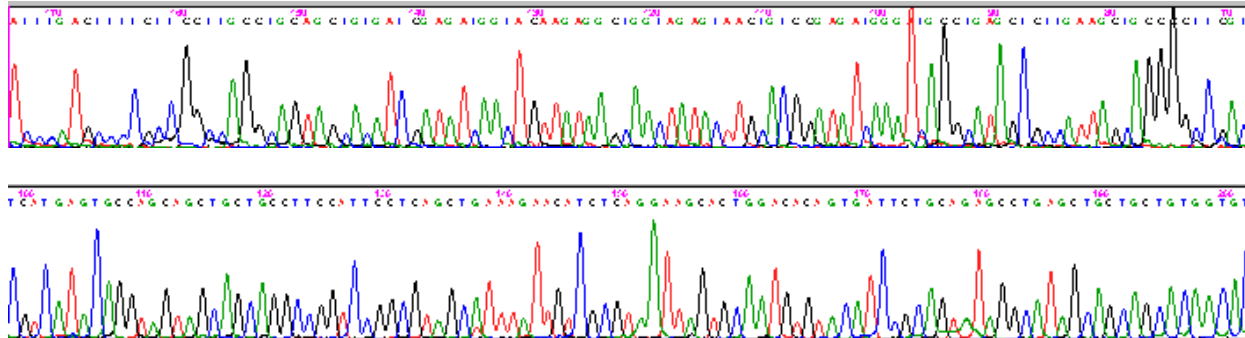
Εξόνιο 6



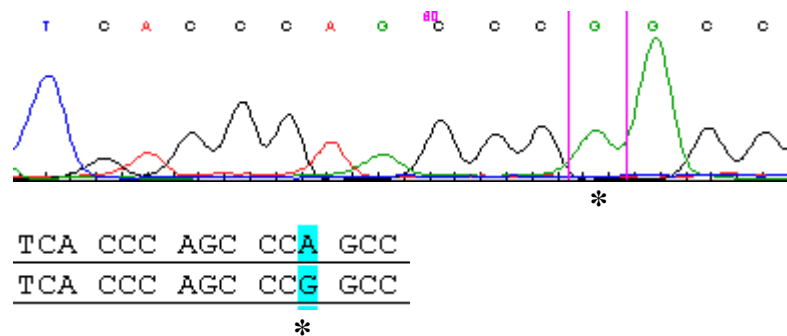
Εξόνιο 7



Εξόνιο 8



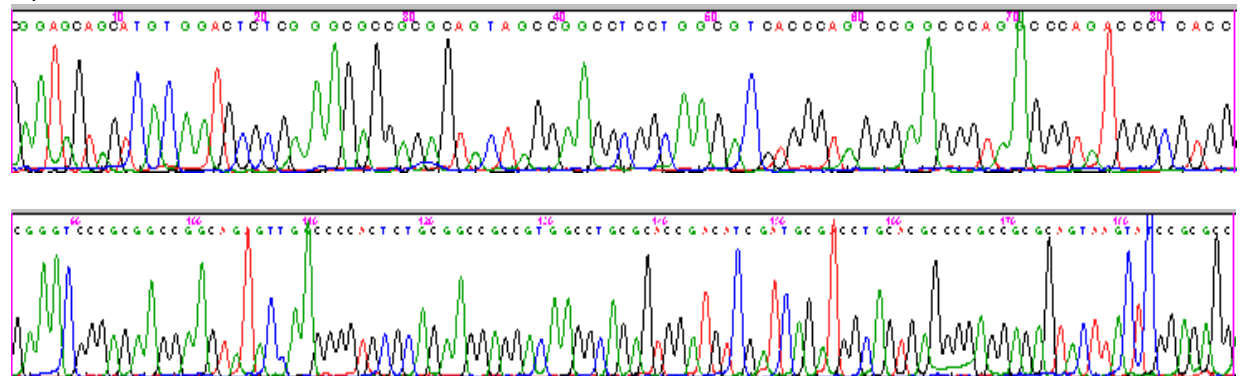
Γ) Στο τελευταίο τμήμα της έρευνας, έγινε έλεγχος του γονιδίου *FXN* για τον ασθενή που ανιχνεύθηκε ετερόζυγος ως προς τη μετάλλαξη επέκτασης των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FXN* (εικόνα 9-14<sup>ος</sup> ασθενής). Μετά την ανάλυση του δείγματος με τη διαδικασία αλληλούχησης για την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου, εντοπίστηκε μια σιωπηλή αλλαγή στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου και συγκεκριμένα στο νουκλεοτίδιο στη θέση 54 από το κωδικόνιο έναρξης της φραταξίνης. Η αλλαγή αυτή δεν προκαλεί αλλαγή στο αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου (εικόνα 10), μια και η τριπλέττα CCA όπως και η CCG κωδικοποιούν για αμινοξύ προλίνης. Η συγκεκριμένη αλλαγή αποτελεί πολυμορφισμό, ο οποίος έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες και αναφέρεται με τον κωδικό *refSNP ID: rs2481598*



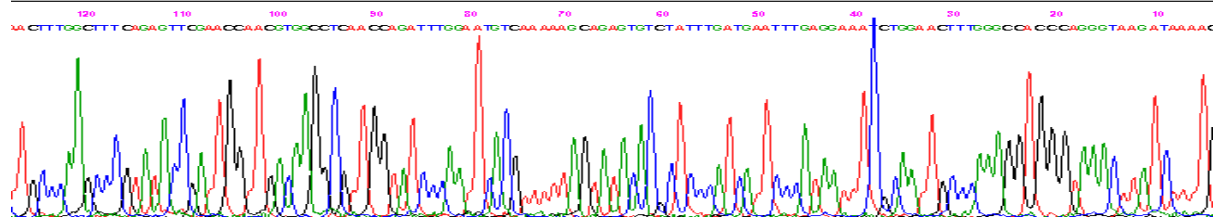
Εικόνα 10: Όπως φαίνεται (\*), ο ασθενής P14 φέρει τη σιωπηλή αλλαγή (A→G)

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα όλων των εξονίων του γονιδίου *FXN* για τον ασθενή P14:

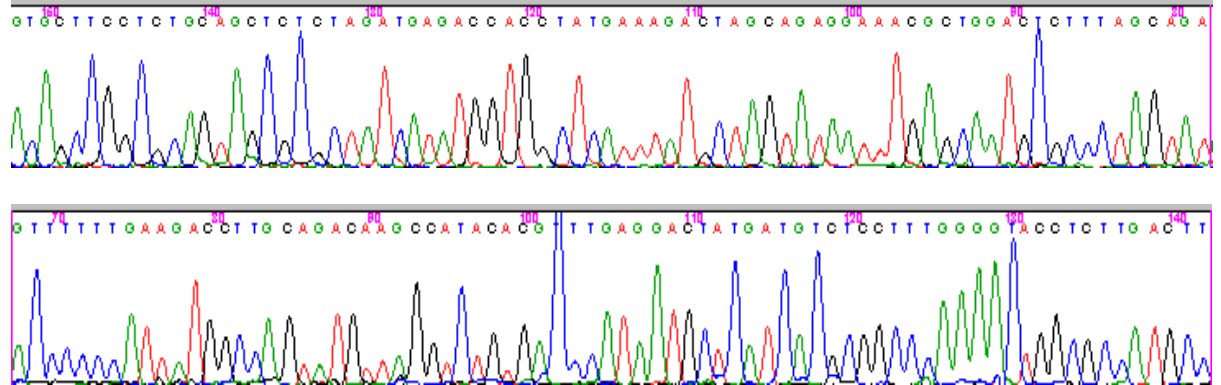
#### Εξόνιο 1



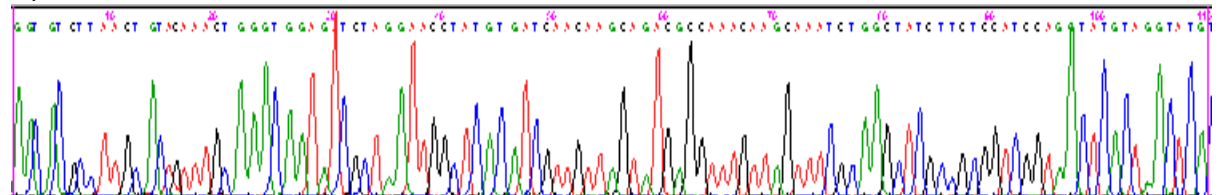
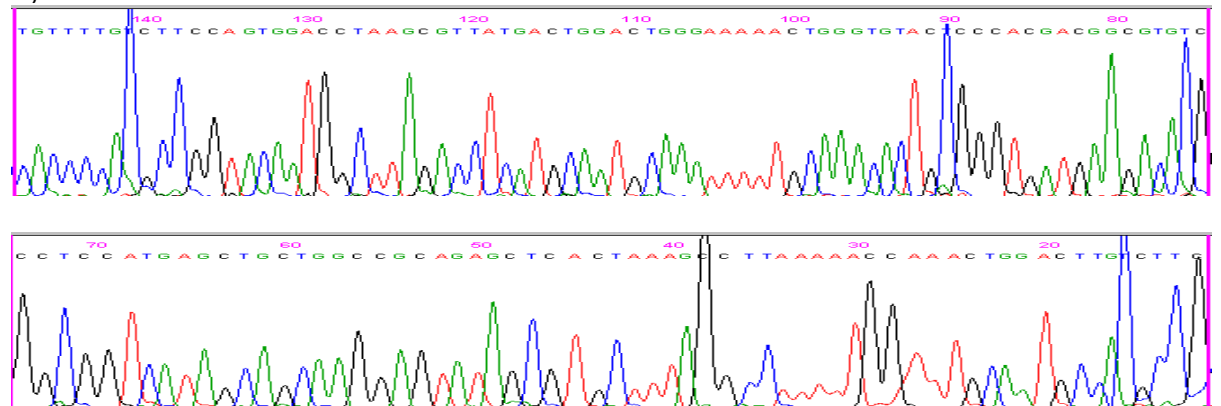
Εξόνιο 2



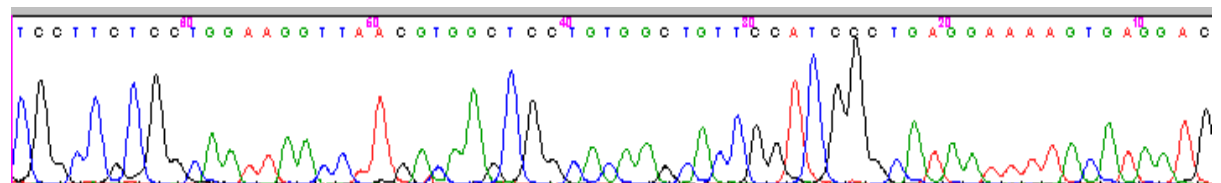
Εξόνιο 3



Εξόνιο 4

Εξόνιο 5<sup>α</sup>

Εξόνιο 5β





## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην πρώτη φάση της διατριβής, στην προσπάθεια καθορισμού της πληθυσμιακής συχνότητας της μετάλλαξης επέκτασης των GAA τριπλετών στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FXN*, έγινε έλεγχος σε 489 φυσιολογικά άτομα ως προς την *FRDA*, από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και σε συγκεκριμένες ομάδες του πληθυσμού.

Με βάση τις μελέτες που έχουν γίνει έως τώρα, το ποσοστό των φορέων υπολογίζεται ότι κυμαίνεται από 1:120-1:60 (ποσοστό: 0.83%-1.66%)<sup>2, 9, 17, 18</sup>. Συγκεκριμένα, η πιο πάνω μετάλλαξη είναι η πιο διαδεδομένη αιτία ασθένειας με επέκταση επαναλήψεων τρινουκλεοτιδίου, όπου 1/90 (ποσοστό 1.11%) στην Ευρώπη είναι φορείς<sup>4, 21</sup>.

Στην Ελλάδα είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού της συχνότητας της μετάλλαξης αυτής. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προήλθαν από φυσιολογικά άτομα της περιοχής της Θεσσαλίας και επιπλέον έγινε μια προσπάθεια ανίχνευσης πιθανής διαφοροποίησης του ποσοστού μεταξύ διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν άτομα με καταγωγή Θεσσαλική και επιπλέον πληθυσμιακές ομάδες της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλίας όπως Καραγκούνηδες, Σαρακατσάνοι και Αθίγγανοι. Με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, το γενικό ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης στη Θεσσαλία είναι 1.22%, ένα ποσοστό που βρίσκεται μέσα στα όρια που δίνονται από τις προηγούμενες επιδημιολογικές μελέτες για τον Ευρωπαϊκό χώρο. Το ποσοστό αυτό, διατηρείται μέσα στα φυσιολογικά όρια και στην περίπτωση των μεμονωμένων πληθυσμιακών ομάδων της έρευνας.

Από τα άτομα που βρέθηκαν ετερόζυγα ως προς τη μετάλλαξη, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του αριθμού επαναλήψεων των τριπλετών GAA. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο τριών ατόμων εντοπίστηκαν περισσότερες από 500 επαναλήψεις των τριπλετών, σε 2 ετερόζυγα άτομα

οι επαναλήψεις ήταν περίπου 134 και ένα άτομο ήταν φορέας της επέκτασης των τριπλετών σε περίπου 67 επαναλήψεις.

Με βάση το άρθρο των Sharma et al.<sup>33</sup> τα φυσιολογικά αλληλόμορφα κυμαίνονται έως 37 επαναλήψεις τριπλετών, τα αλληλόμορφα από 38-65 επαναλήψεις βρίσκονται σε προ-μεταλλακτικό επίπεδο τα οποία μπορούν να προκαλέσουν άτυπα ή ήπια κλινικά συμπτώματα, ενώ επαναλήψεις από 66 και πάνω είναι υπεύθυνες για εκδήλωση φαινοτύπου FRDA. Συμπερασματικά, όλοι οι ετερόζυγοι που ανιχνεύθηκαν στη μελέτη μας, είναι φορείς της μετάλλαξης της επέκτασης των GAA, μέσα στα όρια των επαναλήψεων που οδηγούν σε φαινότυπο όταν βρεθούν σε ομόζυγη κατάσταση, μια και οι ετερόζυγοι είναι φυσιολογικά άτομα, όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων μας.

#### **ΕΞΑΜΕΡΕΣ**

Στη μελέτη μας, παρουσιάστηκε μια ιδιαιτερότητα στα αποτελέσματα που μελετήθηκαν με την τεχνική της αλληλούχησης της περιοχής των GAA επαναλήψεων. Συγκεκριμένα, ο ασθενής *Θεσσαλός (1)*, όπως φαίνεται και στην εικόνα 8β στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, στη περιοχή των επαναλαμβανόμενων τριπλετών παρουσιάζει μια διαφορετική εικόνα από τη συνηθισμένη. Η αλληλουχία των επαναλήψεων ξεκινάει με 3 επαναλήψεις της τριπλέτας GAA.TTC, στη συνέχεια παρεμβάλλονται 33 μη διακοπτόμενες επαναλήψεις του εξαμερούς GAAGGA.TCCTTC και στο τέλος συνεχίζουν άλλες 7 επαναλήψεις της τριπλέτας GAA.TTC.

Με βάση το άρθρο των Sakamoto et al.<sup>117</sup> αποδεικνύεται πως επαναλήψεις του εξαμερούς (GAAGGA.TCCTTC) παρουσιάζονται στην περιοχή των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *FXN*, οι οποίες δεν προκαλούν το σχηματισμό του υπερσυμπυκνωμένου DNA (sticky DNA) και συνεπώς δεν παρατηρείται παθογένεση. Μετά από πειράματα σε πλασμίδια με εισαγωγή επαναλαμβανόμενου εξαμερούς μέσα σε επαναλαμβανόμενες τριπλέτες GAA.TTC (μεγάλου αριθμού τριπλετών υπεύθυνων για τη δημιουργία του υπερσυμπυκνωμένου DNA), φάνηκε πως η

παρεμβολή του εξαμερούς στη περιοχή των επαναλήψεων GAA σε ποσοστό πάνω από 20%, καταργεί το υπερσυμπυκνωμένο DNA. Παρόλα αυτά, παρεμβολές λιγότερες από 11% φαίνεται να επιτρέπουν τη δημιουργία των μη-B DNA δομών (τριπλοειδείς σχηματισμοί και υπερσυμπυκνωμένο DNA) με τον ίδιο τρόπο όπως και οι επαναλήψεις των τριπλετών του ίδιου αριθμού χωρίς τις παρεμβολές του εξαμερούς. Πιστεύεται πως ο μηχανισμός με τον οποίο παρεμποδίζεται η δημιουργία του υπερσυμπυκνωμένου DNA κατά τη παρεμβολή του εξαμερούς στις επαναλαμβανόμενες τριπλέτες των GAA.TTC (σε μεγάλο ποσοστό), είναι η δημιουργία μη κανονικών δεσμών (ζευγάρωμα κατά Hoogsteen) ανάμεσα στις βάσεις των triplexes, με αποτέλεσμα οι δομές αυτές να γίνονται ασταθείς.

Αναλυτικότερα, η υπόθεση που αναλύεται στο συγκεκριμένο άρθρο, στηρίζεται στην ικανότητα των βάσεων να ζευγαρώνουν μεταξύ τους. Στην περίπτωση του γονιδίου *FXN* οι τριπλοειδείς σχηματισμοί σχηματίζουν τριάδες του τύπου TA\*A και CG\*G, που αποτελούνται από ζευγάρωμα βάσεων κατά το φυσιολογικό τρόπο Watson-Crick (T-A, C-G) και το αντίστροφο κατά Hoogsteen ζευγάρωμα (A\*A, G\*G). Το αντίστροφο κατά Hoogsteen ζευγάρωμα των βάσεων σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται με δύο δεσμούς υδρογόνου και τελικά οι τριάδες που δημιουργούνται είναι σταθερές. Στην περίπτωση όμως των επαναλήψεων του εξαμερούς, οι τριπλοειδείς σχηματισμοί αποτελούνται επιπλέον από τριάδες TA\*G και CG\*A στις οποίες, κατά το ζευγάρωμα των βάσεων του αντίστροφου Hoogsteen (μη συνδυασμένες βάσεις), υπάρχει μόνο ένας δεσμός υδρογόνου, με αποτέλεσμα να είναι οι τριάδες ασταθείς. Κατ'επέκταση, στις επαναλήψεις των εξαμερών, επειδή τουλάχιστον 33% των βάσεων έχουν μη συνδυασμένες τριάδες TA\*G και CG\*A, οι οποίες είναι ασταθείς, τα ζευγαρώματα αυτά αποσταθεροποιούν τις δομές των τριπλοειδών σχηματισμών και του υπερσυμπυκνωμένου DNA. Με βάση τις μελέτες που έγιναν στο συγκεκριμένο άρθρο, κατέληξαν πως 11% παρεμβολής εξαμερούς (περιέχεται το ελάχιστο 7.4% μη συνδυασμένων ζευγαρωμένων βάσεων), είναι το ανώτερο όριο, ώστε να

διατηρηθούν οι δομές των τριπλοειδών σχηματισμών και του υπερσυμπυκνωμένο DNA (εικόνα 11).

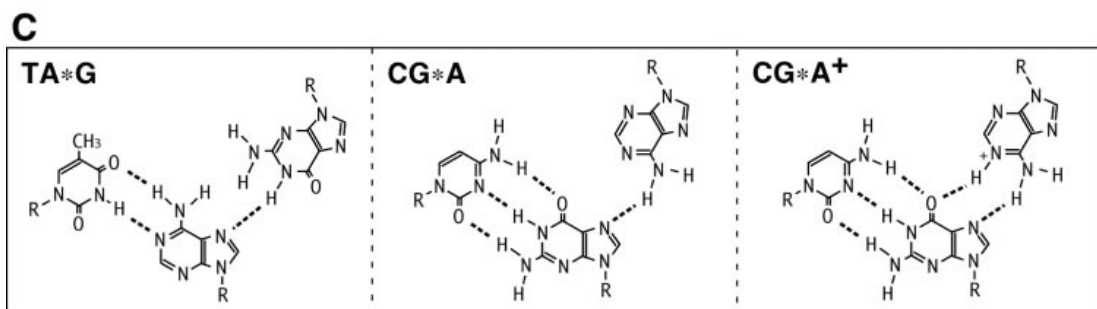
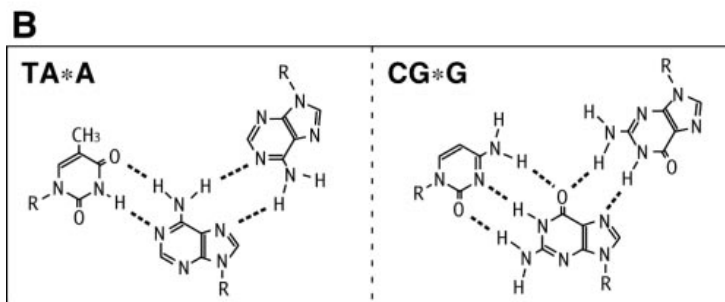
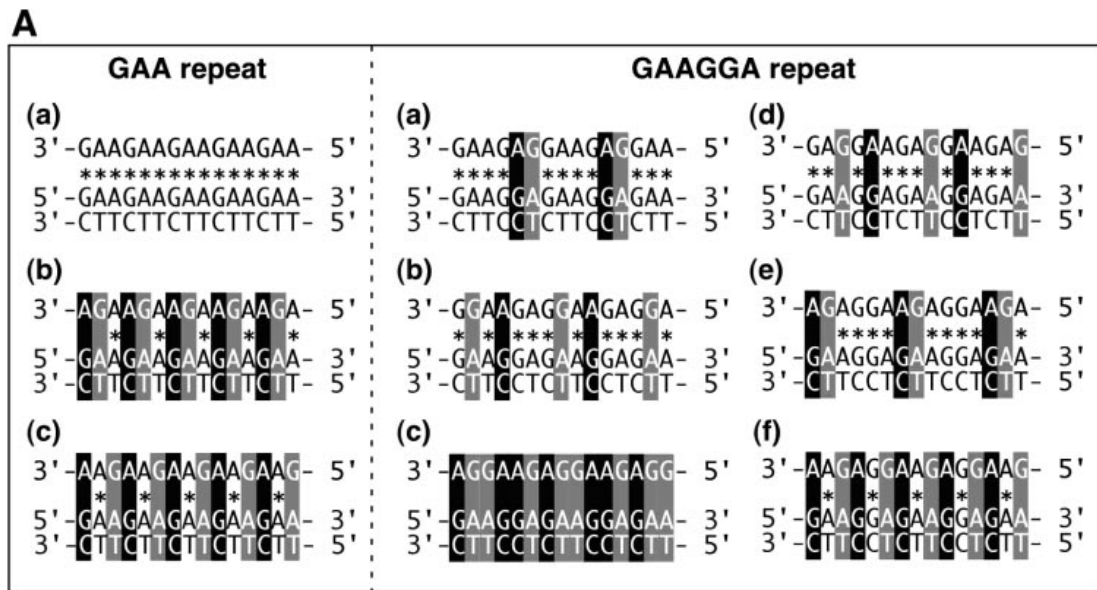
Επιπλέον, στα πειράματά τους στη προσπάθεια να μελετήσουν τη μεταγραφή με βάση τις παρεμβολές του εξαμερούς, μελέτησαν *in vitro* τη μεταγραφή σε πλασμίδια που περιείχαν επαναλήψεις μεγάλου μεγέθους GAA.TTC, τόσο απλών όσο και παρεμβαλλόμενων από επαναλήψεις του εξαμερούς σε διάφορα ποσοστά. Τα ευρήματά τους έδειξαν πως το μικρότερο ποσοστό μεταγράφων παρατηρήθηκαν στα πλασμίδια που είχαν μεγάλο αριθμό επαναλήψεων GAA.TTC χωρίς παρεμβολές του εξαμερούς, ενώ όσο αυξάνονταν το ποσοστό των παρεμβολών, αντιστοίχως αυξανόταν και η ποσότητα των μεταγράφων.

Με βάση όλα τα παραπάνω, όσο μεγαλύτερη είναι η παρεμβολή του εξαμερούς στις επαναλήψεις των τριπλετών GAA.TTC, τόσο λιγότερο παρεμποδίζεται η μεταγραφή και συνεπώς και η παραγωγή του *FXN* mRNA στους ασθενείς με FRDA.

Το εξαμερές (GAAGGA.TCCTTC)<sub>65</sub> έχει ανιχνευθεί στο παρελθόν σε τρία άτομα με βάση το άρθρο των Ohshima et al.<sup>118</sup> και το συμπέρασμα ήταν ότι δεν αποτελεί αιτία παθογένεσης μιας και δεν δημιουργεί τριπλοειδείς σχηματισμούς και υπερσυμπυκνωμένο DNA και δεν εμποδίζει τη μεταγραφή και την αντιγραφή του DNA.

Επίσης, στο άρθρο των Sakamoto et al.<sup>62</sup> αναφέρεται ότι οι επαναλήψεις του εξαμερούς δεν συνδέονται με την ασθένεια FRDA, είναι σταθερά κληρονομήσιμες από γονέα σε παιδί για 3 γενιές και δεν εμποδίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου σε κύτταρα που τις φέρουν, σε αντίθεση με τις επαναλήψεις GAA.TTC του ίδιου μεγέθους, οι οποίες προκαλούν σε μεγάλο βαθμό παρεμπόδιση.

Συμπερασματικά, το συγκεκριμένο άτομο της μελέτης μας, είναι φορέας μιας επέκτασης η οποία δεν συνδέεται στην ουσία με την FRDA και δεν μπορεί να προκαλέσει φαινότυπο, όταν βρεθεί σε ομόζυγη κατάσταση.



Εικόνα 11: α) Πιθανοί συνδυασμοί βάσεων των επαναλαμβανόμενων τριπλετών GAA.TTC (αριστερά) και του επαναλαμβανόμενου εξαμερούς GAAGGA.TCCTTC (δεξιά)(οι αστερίσκοι συμβολίζουν τους σταθερούς δεσμούς αντίστροφου Hoogsteen ζευγαρώματος, ενώ τα κουτάκια τις ασταθείς μη συνδυασμένες τριάδες βάσεων), β) σταθεροί δεσμοί βάσεων αντίστροφου Hoogsteen ζευγαρώματος, γ) ασταθείς, μη συνδυασμένες τριάδες βάσεων<sup>117</sup>

Τελικά, μέσα από όλα αυτά δημιουργείται η σκέψη, πως το φαινόμενο των παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών στις επεκτάσεις των GAA.TTC σε ασθενείς με FRDA, θα μπορούσε να είναι μια σοβαρή αιτία για την ποικιλομορφία των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Με βάση προηγούμενες μελέτες, ο φαινότυπος της FRDA είναι μερικώς καθορισμένος από το μέγεθος της επέκτασης των (GAA)<sub>n</sub>. Το μέγεθος των επαναλήψεων επηρεάζει την ηλικία εκδήλωσης της ασθένειας, την ηλικία εμφάνισης της δυσαρθρίας, τις κινητικές διαταραχές και τον ρυθμό εκδήλωσης της ασθένειας. Αν και υπάρχει σαφής συσχετισμός του μεγέθους των επαναλήψεων και του φαινότυπου, το φαινόμενο της ποικιλομορφίας μεταξύ των ασθενών του συγκεκριμένου συνδρόμου είναι συχνό. Αναλυτικότερα, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ακόμη και σε ασθενείς με παραπλήσιο αριθμό επαναλήψεων, οπότε συχνά το μέγεθος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να προβλέψει την εξέλιξη της ασθένειας για κλινικούς σκοπούς ή για γενετική συμβουλευτική<sup>23</sup>.

Τα παραπάνω δεδομένα, οδηγούν στην σκέψη, πως η επέκταση του εξαμερούς ή η παρεμβολή του σε επαναλαμβανόμενες τριπλέττες μέσα στα όρια που προκαλούν φαινότυπο FRDA, είναι μια πιθανή αιτία που θα μπορούσε να δικαιολογήσει το φαινόμενο της ποικιλομορφίας μεταξύ των διαφόρων ασθενών. Συνεπώς, η τεχνική της αλληλούχησης των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε αλληλόμορφα με επέκταση των επαναλήψεων GAA θα μπορούσε να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόγνωση της εξέλιξης των φορέων τους, με βάση την ύπαρξη ή μη παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών όπως και το ποσοστό αυτών σε σχέση με τη συνολική επέκταση. Δυστυχώς, στους ασθενείς της FRDA υπάρχει τεχνική αδυναμία, μια και δεν είναι δυνατό να γίνει αλληλούχηση ολόκληρου του κομματιού της επέκτασης των επαναλήψεων GAA.TCC, μια και οι αταξικοί ασθενείς, συνήθως φέρουν κατά μέσο όρο 700-900 τριπλέττες.

Οι αυτοσωμικές υπολειπόμενες παρεγκεφαλιδικές αταξίες (ARCA) είναι μια ετερογενή ομάδα νευροεκφυλιστικών συνδρόμων, με διαφορετικά νευρολογικά, οφθαλμολογικά ή γενικά κλινικά στοιχεία. Όμως, η κατηγοριοποίηση των διαφορετικών υποομάδων δεν είναι πάντα εύκολη, λόγω του παράγοντα της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο συχνά να διακρίνεις από τα κλινικά χαρακτηριστικά ενός ασθενούς, την αταξία την οποία φέρει. Η μοριακή ανάλυση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για μερικές υποομάδες των ARCA, όπως η αταξία του Friedreich<sup>119</sup>.

Στο 2<sup>ο</sup> κομμάτι της έρευνάς μας, εξετάστηκαν 14 ασθενείς με τυπικά χαρακτηριστικά της FRDA (πίνακας 4).

Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος ηλικίας έναρξης της νόσου των ασθενών της συγκεκριμένης μελέτης ήταν τα 16.7 έτη, με ηλικιακό εύρος 5-30 έτη. Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν αταξία βαδίσσεως και αστάθεια κατά τη βάδιση, τα οποία και αποτελούν τα αρχικά κλινικά χαρακτηριστικά στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Επίσης, όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν παρεγκεφαλιδική σημειολογία με κύριες εκδηλώσεις τη δυσαρθρία και τη δυσδιαδοχοκινήσια. Από τους οφθαλμούς νυσταγμό εμφάνιζαν οι 13 στους 14 ασθενείς. Από αυτούς οι 10 είχαν αδυναμία εστίασεως του βλέμματος και οι 8 εξ' αυτών διαταραχή των συζυγών κινήσεων παρακολούθησης και δυσμετρία στην επιτέλεση των σακκαδικών κινήσεων. Κανείς από τους ασθενείς που περιγράφονται δεν παρουσίαζε οπτική ατροφία και διαταραχή της οπτικής οξύτητας. Ταυτόχρονα, η οπτικοκινητική απραξία ήταν απύσασε σε όλες τις περιπτώσεις. Κινητική αδυναμία παρατηρήθηκε στην πλειοψηφία των ασθενών (στο 70 %), ενώ η μυική ατροφία, κυρίως στα περιφερικά τμήματα των άκρων διαπιστώθηκε μόνο στους τρεις από τους ασθενείς που εμφάνισαν κινητική αδυναμία. Κατά τη νευρολογική εξέταση τα τενόντια αντανακλαστικά ήταν κατηρηγμένα στους περισσότερους ασθενείς, ενώ εκλύονταν εκτατικό αντανακλαστικό του πέλματος (σημείο Babinski) στο 78% αυτών. Η εν τω βάθει αισθητικότητα ήταν διαταραγμένη, κυρίως στα κάτω άκρα, στα οποία διαπιστώθηκαν κυρίως διαταραχή της

παλλαισθησίας και της διακρίσεως δύο ταυτόχρονων ερεθισμάτων στο 70% των ασθενών. Βαθμιαία ελάττωση της ακουστικής αντιλήψεως και σταδιακή κώφωση εμφάνισε ένας μόνο ασθενής. Σημαντικό ποσοστό των πασχόντων παρουσίασαν σκελετικές ανωμαλίες, κυρίως σκολίωση 50% και κοίλοποδία (pes cavus) (65%). Οι αλλοιώσεις αυτές σε ικανό αριθμό των πασχόντων διαπιστώθηκαν ήδη από την αρχή των κλινικών εκδηλώσεων ενώ η σκολίωση σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις έπαιρνε το χαρακτήρα της κυφοσκολίωσης. Η προσβολή άλλων συστημάτων και οργάνων στην εν λόγω διαταραχή αφορά κυρίως την καρδιά με την ανάπτυξη υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας ως την πιο συχνή εκδήλωση και την εμφάνιση περιορισμένης ανοχής στην γλυκόζη και σακχαρώδη διαβήτη. Από τους ασθενείς που μελετήσαμε ένας μόνο εμφάνισε σακχαρώδη διαβήτη και ένας μόνο ευρήματα υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας. Σφιγκτηριακές διαταραχές δεν παρουσίασε κανένας ασθενής ενώ δυσκαταποσία εμφάνισαν 3 ασθενείς. Η νευροαπεικόνιση που έγινε με MRI εγκεφάλου και MRI ΑΜΣΣ κατέδειξε σε όλους τους ασθενείς διαφορετικού βαθμού παρεγκεφαλιδική ατροφία, όμως σε κανέναν ασθενή δεν αποκάλυψε λέπτυνση της αυχενικής μοίρας του νωτιαίου μυελού που απαντάται κυρίως στα προχωρημένα στάδια της νόσου. Ο νευροφυσιολογικός έλεγχος κατέδειξε κινητικές ταχύτητες αγωγής εντός των φυσιολογικών ορίων σε όλους τους ασθενείς ενώ η αισθητική αγωγιμότητα παρουσίαζε το χαρακτήρα αξονοπάθειας στο 50 % των ασθενών. Οι ασθενείς αυτοί εμφάνιζαν και κλινικά σημεία αισθητικής νευροπάθειας με νευροπαθητικά άλγη, αιμωδίες και ποικίλες τροφονευρωτικές αλλοιώσεις. Ο καρδιολογικός έλεγχος δεν κατέδειξε παθολογικά ευρήματα στο ηλεκτροκαρδιογράφημα, τα οποία συνήθως συνίστανται σε αναστροφή του T, σε κανέναν ασθενή. Το υπερηχογράφημα όμως αποκάλυψε σε ένα ασθενή ευρήματα υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας με πάχυνση του μεσοκοιλιακού διαφράγματος και πάχυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας.

Οι 14 ασθενείς της μελέτης μας όπως φαίνεται παρουσιάζουν τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά FRDA, παρόλα αυτά η μοριακή εξέταση δεν το επιβεβαίωσε. Συγκεκριμένα,



η ανάλυση της PCR για την επέκταση των επαναλήψεων GAA όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο των μεθόδων, έδειξε πως 13 ασθενείς ήταν φυσιολογικοί για την επέκταση των GAA ενώ ένας ασθενής ήταν ετερόζυγος.

Στη συνέχεια της μελέτης μας πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του γονιδίου της απραταξίνης για τους παραπάνω ασθενείς, στηριζόμενοι στα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί σε προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες<sup>6, 8, 10-13</sup>. Συγκεκριμένα, όπως ήδη έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο των κλινικών χαρακτηριστικών της ασθένειας της οπτικοκινητικής απραξίας, η εικόνα ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης παρουσιάζουν μια φαινοτυπική ποικιλομορφία, σε συνδυασμό με έλλειψη τυπικών συμπτωμάτων της AOA1 σε κάποιες περιπτώσεις ή ακόμα και εμφάνιση άτυπων χαρακτηριστικών όπως το σημείο Babinski και εικόνας FRDA.

Στηριζόμενοι στα προηγούμενα δεδομένα, συνεχίστηκε η μελέτη των 14 ασθενών (με κλινική εικόνα FRDA αλλά χωρίς την τυπική μετάλλαξη), μελετώντας το γονίδιο της *APTCH* με τη μέθοδο αλληλούχησης των εξονίων του γονιδίου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν έδειξαν μεταλλάξεις για το γονίδιο *APTCH* στους 14 ασθενείς που μελετήθηκαν, οπότε η έρευνά μας δεν επιβεβαιώνει τα δεδομένα των προηγούμενων μελετών. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η διαφορετική πληθυσμιακή προέλευση των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Η μελέτη μας είναι η πρώτη και η μοναδική σε άτομα από τον Ελληνικό χώρο σχετικά με μεταλλάξεις του γονιδίου *APTCH* σε ασθενείς με φαινότυπο FRDA αλλά χωρίς να φέρουν την τυπική μετάλλαξη της επέκτασης των GAA τριπλετών. Κατ' επέκταση παραμένει ένα ερωτηματικό κατά πόσο η μελέτη του γονιδίου *APTCH* αποτελεί ένα εργαλείο κλινικής σημασίας για τέτοιους ασθενείς. Μελλοντικά δεδομένα από μεγαλύτερες έρευνες ασθενών διαφορετικής προελεύσεως θα μπορούσαν να διαλευκάνουν την υπόθεση αυτή.

Σχετικά με το τρίτο μέρος της έρευνας, ο 14<sup>ος</sup> ασθενής βρέθηκε φορέας της μετάλλαξης επέκτασης των GAA τριπλετών στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *FXN*, εντούτοις το εύρημα αυτό δεν δικαιολογεί την κλινική εικόνα του ασθενούς. Με βάση τη

διεθνή βιβλιογραφία<sup>2-4</sup>, 2% των FRDA ασθενών είναι φορείς της επέκτασης GAA και μιας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο της φραταξίνης. Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στην μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου *FXN* για τον τελευταίο ασθενή, με σκοπό την προσπάθεια ανίχνευσης πιθανής σημειακής μετάλλαξης του γονιδίου. Η τεχνική της αλληλούχησης του γονιδίου *FXN* έδειξε μια αλλαγή στο πρώτο εξόνιο της φραταξίνης (εικόνα 6), η οποία όμως δεν προκαλεί αλλαγή αμινοξέως και συνεπώς δεν αλλάζει το αναγνωστικό πλαίσιο της πρωτεΐνης. Η συγκεκριμένη αλλαγή αποτελεί φυσιολογικό πολυμορφισμό ο οποίος αναφέρεται με τον κωδικό ref SNP ID: rs2481598. Συνεπώς, είναι απομακρυσμένη η πιθανότητα να προκαλείται η πάθηση του συγκεκριμένου ασθενή από μεταλλαγή του γονιδίου *FXN*, και επομένως η γενετική βάση του 14<sup>ου</sup> ασθενή παραμένει αδιευκρίνιστη.

Γενικότερα, οι αυτοσωμικές υπολειπόμενες παρεγκεφαλιδικές αταξίες (ARCA) ανήκουν στην κατηγορία των κληρονομήσιμων αταξιών και κάθε τύπος αταξίας αυτής της κατηγορίας προκαλείται από μετάλλαξη ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται γενετική ετερογένεια, μια και σε κάποιες ομάδες των ARCA εντοπίζονται μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια ή γονιδιακούς τόπους. Στις διαγνωστικές μεθόδους των ARCA η νευροαπεικονιστική και νευροφυσιολογική εξέταση αποτελούν ένα πρώτο και βασικό εργαλείο για την κλινική διάγνωση, όπως επίσης και οι βιοχημικές αναλύσεις για τον καθορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας ιδιαίτερως στις μεταβολικές διαταραχές. Την τελευταία δεκαετία η εξέλιξη της γενετικής και η ανίχνευση των μεταλλαγμένων γονιδίων που ευθύνονται για τις διάφορες κατηγορίες των παρεγκεφαλιδικών αταξιών έδωσε ένα σημαντικό εργαλείο για τον τομέα της κλινικής διάγνωσης και κατ' επέκταση για την γενετική συμβουλευτική ατόμων, ζευγαριών και οικογενειών<sup>1</sup>.

Στους ασθενείς που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή τα κλινικά γνωρίσματα που παρατηρήθηκαν αποτέλεσαν το πρωταρχικό εργαλείο στην

προσπάθεια να διαγνωστεί ο τύπος της παρεγκεφαλιδικής αταξίας για κάθε άτομο. Η αρχική σκέψη ήταν η μελέτη του γονιδίου της φραταξίνης, μια και ο φαινότυπος των ατόμων αυτών παρέπεμπε στην FRDA. Εντούτοις, η μοριακή εξέταση δεν επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση, με συνέπεια την περαιτέρω μελέτη των αταξικών ασθενών και συγκεκριμένα του γονιδίου της απραταξίνης. Αν και στους ασθενείς της έρευνάς μας δεν παρατηρούνταν κάποια βασικά κλινικά γνωρίσματα της ασθένειας (όπως οπτικοκινητική απραξία, υποαλβουμιναιμία), η μελέτη μας βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες ασθενών με φαινότυπο FRDA οι οποίοι διαγνώστηκαν θετικοί για την οπτικοκινητική απραξία τύπου I, χωρίς να παρουσιάζουν βασικά κλινικά γνωρίσματα της ασθένειας αυτής. Στην έρευνά μας δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της απραταξίνης, οπότε παραμένει αδιευκρίνιστη η γενετική βάση των ασθενών.

Πιθανές μελλοντικές προσεγγίσεις για τα άτομα αυτά θα ήταν κάποιες επιπλέον κατηγορίες αυτοσωμικών υπολειπόμενων παρεγκεφαλιδικών αταξιών. Η μελέτη του γονιδίου ATM για πιθανή εύρεση μεταλλάξεων είναι ένα επόμενο βήμα στη μελέτη των ασθενών. Μεταλλάξεις του γονιδίου ATM αποτελούν τη γενετική βάση της αταξίας τηλαγγειεκτασίας στην οποία η αρχική διάγνωση στηρίζεται στα βασικά γνωρίσματα της οπτικοκινητικής απραξίας και της τηλαγγειεκτασίας του επιτεφυκότα. Παρόλα αυτά, η φαινοτυπική ποικιλομορφία και οι άτυπες κλινικές εκδηλώσεις ασθενών με το συγκεκριμένο τύπο αταξίας αφήνει περιθώρια μελέτης του γονιδίου ATM για τους ασθενείς της έρευνάς μας. Παράλληλα, η αταξία με ανεπάρκεια της βιταμίνης E (AVED) είναι ένας τύπος αταξίας όπου οι κλινική εικόνα των ασθενών φέρει αρκετές ομοιότητες με τους ασθενείς της FRDA. Στους ασθενείς με τη συγκεκριμένη αταξία παρατηρούνται ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E στον ορό τους, το οποίο αποτελεί και βασικό βιοχημικό δείκτη διάγνωσης των ατόμων αυτών. Στην περίπτωση εντοπισμού χαμηλών επιπέδων της βιταμίνης E του ορού, η μοριακή ανάλυση του υπεύθυνου γονιδίου  $\alpha$ -TTP για την πιθανή εύρεση μεταλλάξεων, θα μπορούσε να αποτελέσει τον επόμενο στόχο για τη περαιτέρω

μελέτη των ασθενών μας. Τέλος, η αταξία με οπτικοκινητική απραξία τύπου II θα μπορούσε να αποτελέσει το επόμενο πεδίο έρευνας των ασθενών μας. Οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν συνήθως οπτικοκινητική απραξία και αυξημένα επίπεδα γ-σφαιρίνης, α-πρωτεΐνης και κινάσης κρεατινίνης. Εντούτοις, η φαινοτυπική ποικιλομορφία και στη συγκεκριμένη κατηγορία αταξίας μας δίνει το περιθώριο μελέτης μεταλλάξεων του υπεύθυνου γονιδίου SETX.

Οι παρεγκεφαλιδικές αταξίες αποτελούν ένα σημαντικό πεδίο στην ιατρική κοινότητα με παγκόσμιο ενδιαφέρον, μια και είναι έντονη η αναγκαιότητα να αναπτυχθούν αποτελεσματικές θεραπείες για τις ασθένειες αυτές. Σπουδαίες εξελίξεις έχουν επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια σχετικά με την παθογένεση των παρεγκεφαλιδικών αταξιών με τη βοήθεια της προόδου σε τεχνικό επίπεδο όσο και την χρήση ζωικών και κυτταρικών μοντέλων. Γενικότερα, υπάρχει μια προσπάθεια να γίνει μια κλινικο-γενετική κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων ή ομάδων των παρεγκεφαλιδικών διαταραχών στηριζόμενοι στα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεσή τους. Αυτή η προσέγγιση προσφέρει σημαντικά εφόδια στη διαχείριση, τη θεραπεία και τις μελλοντικές έρευνες των παρεγκεφαλιδικών αταξιών. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, των κρίσιμων μονοπατιών και η ανάπτυξη κατάλληλων μοντέλων αποτελούν τα απαραίτητα εφόδια στην επιτυχή προσέγγιση των κατάλληλων θεραπειών για τις ασθένειες αυτές. Παρατηρείται πλέον πως οι θεραπευτικές γραμμές που ακολουθούνται σχετίζονται με την επίδραση στη γονιδιακή έκφραση και τη ρύθμιση της μεταγραφής, την αλλαγή στη δράση μια μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με στόχο τη μείωση της τοξικής της δράσης, την επίδραση σε παράγοντες που συμμετέχουν στο μηχανισμό απόπτωσης, την επίδραση στη μιτοχονδριακή λειτουργία και την οξειδωτική βλάβη<sup>120</sup>.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια μεγάλη προσπάθεια να μελετηθούν ζωικά μοντέλα με μεταλλάξεις που σχετίζονται με τα νευρολογικά νοσήματα μιμούμενα το φαινότυπο των παρεγκεφαλιδικών αταξιών. Τα μοντέλα αυτά βοηθούν στη μελέτη των μηχανισμών της

παρεγκεφαλιδικής δυσλειτουργίας, στην αξιολόγηση των θεραπευτικών προσεγγίσεων και στον έλεγχο των παλιών ή νέων συνθετικών χημικών ενώσεων. Σχετικά με την ασθένεια FRDA έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλα που βοηθούν στη μελέτη της επίδρασης των μειωμένων επιπέδων φραταξίνης. Τα μοντέλα αυτά αναπαράγουν καρδιακή υπερτροφία, δυσλειτουργία των αισθητήριων νευρώνων χωρίς αλλαγή των μικρών αισθητήριων και κινητικών νευρώνων, ελλείμματα στα σύμπλοκα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και δράση ακονιτάσης. Τα χαρακτηριστικά αυτά μιμούνται τις ανωμαλίες που παρατηρούνται στους ασθενείς με FRDA<sup>121</sup>.

Συμπερασματικά, οι αυτοσωμικές υπολειπόμενες παρεγκεφαλιδικές αταξίες (autosomal recessive cerebellar ataxias-ARCA) είναι νευρολογικές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό ή ανώμαλη ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας και του νωτιαίου μυελού, αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομηση και στις περισσότερες περιπτώσεις εκδήλωση των πρώτων συμπτωμάτων σε νεαρή ηλικία, πριν την ηλικία των 20 ετών. Η κατηγοριοποίηση των διαφορετικών υποομάδων δεν είναι πάντα εύκολη λόγω του παράγοντα της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο συχνά να διακρίνεις από τα κλινικά χαρακτηριστικά ενός ασθενούς, την αταξία την οποία φέρει. Εντούτοις, την τελευταία δεκαετία η εξέλιξη της γενετικής και η ανίχνευση των μεταλλαγμένων γονιδίων που ευθύνονται για τις διάφορες κατηγορίες των παρεγκεφαλιδικών αταξιών προσφέρει ένα σημαντικό εργαλείο στον τομέα της επιβεβαίωσης της κλινικής διάγνωσης, ενώ η αναγκαιότητα να αναπτυχθούν αποτελεσματικές θεραπείες για τις ασθένειες αυτές είναι έντονη. Η συνεχής έρευνα των μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται καθώς και η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων είναι σημαντικά εργαλεία των επιστημόνων στην προσπάθειά τους να προσεγγίσουν αποτελεσματικά τις συγκεκριμένες ασθένειες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Palau F, Espinos C. Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:47
2. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclou F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic gaa triplet repeat expansion. *Science.* 1996;271:1423-1427
3. Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI. Atypical friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the gaa triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1251-1256
4. Cossee M, Durr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschutter A, Muller U, Mandel JL, Brice A, Koenig M, Cavalcanti F, Tamaro A, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Labuda M, Montermini L, Poirier J, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol.* 1999;45:200-206
5. Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M. Evolution of the friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:7452-7457
6. Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Pechoux S, Chamayou C, Ochsner F, Kuntzer T, Tardieu M, Said G, Habert MO, Demarquay G, Tannier C, Beis JM, Brice A, Koenig M, Durr A. Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: Clinical and genetic studies. *Brain.* 2003;126:2761-2772
7. Crisculo C, Mancini P, Sacca F, De Michele G, Monticelli A, Santoro L, Scarano V, Banfi S, Filla A. Ataxia with oculomotor apraxia type 1 in southern italy: Late onset and variable phenotype. *Neurology.* 2004;63:2173-2175
8. Ferrarini M, Squintani G, Cavallaro T, Ferrari S, Rizzuto N, Fabrizi GM. A novel mutation of aprataxin associated with ataxia ocular apraxia type 1: Phenotypical and genotypical characterization. *J Neurol Sci.* 2007;260:219-224
9. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S. The relationship between trinucleotide (gaa) repeat length and clinical features in friedreich ataxia. *Am J Hum Genet.* 1996;59:554-560
10. Tranchant C, Fleury M, Moreira MC, Koenig M, Warter JM. Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology.* 2003;60:868-870
11. Crisculo C, Mancini P, Menchise V, Sacca F, De Michele G, Banfi S, Filla A. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type i. *Ann Neurol.* 2005;57:777
12. Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ikeguchi K, Nijima K, Kaneko J, Namekawa M, Ogawa T, Date H, Tsuji S, Nakano I, Nishizawa M. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: The aprataxin gene mutations. *Neurology.* 2002;59:590-595
13. Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new hit superfamily gene. *Nat Genet.* 2001;29:184-188
14. Evidente VG, Gwinn-Hardy KA, Caviness JN, Gilman S. Hereditary ataxias. *Mayo Clin Proc.* 2000;75:475-490
15. Pandolfo M, Montermini L. Molecular genetics of the hereditary ataxias. *Adv Genet.* 1998;38:31-68
16. Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM. Friedreich ataxia: An overview. *J Med Genet.* 2000;37:1-8
17. Epplen C, Epplen JT, Frank G, Mitterski B, Santos EJ, Schols L. Differential stability of the (gaa)n tract in the friedreich ataxia (stm7) gene. *Hum Genet.* 1997;99:834-836
18. Alper G, Narayanan V. Friedreich's ataxia. *Pediatr Neurol.* 2003;28:335-341
19. Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, Lemieux B, Aube M, Leger C, Bouchard JP. Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci.* 1976;3:279-286

20. Harding AE. Friedreich's ataxia: A clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*. 1981;104:589-620
21. Pandolfo M. Molecular basis of friedreich ataxia. *Mov Disord*. 2001;16:815-821
22. Colucci WS, Packer M, Bristow MR, Gilbert EM, Cohn JN, Fowler MB, Krueger SK, Hershberger R, Uretsky BF, Bowers JA, Sackner-Bernstein JD, Young ST, Holcslaw TL, Lukas MA. Carvedilol inhibits clinical progression in patients with mild symptoms of heart failure. Us carvedilol heart failure study group. *Circulation*. 1996;94:2800-2806
23. Schols L, Amoiridis G, Przuntek H, Frank G, Epplen JT, Epplen C. Friedreich's ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain*. 1997;120 ( Pt 12):2131-2140
24. Harding AE. Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol*. 1993;61:1-14
25. Montermini L, Richter A, Morgan K, Justice CM, Julien D, Castellotti B, Mercier J, Poirier J, Capozzoli F, Bouchard JP, Lemieux B, Mathieu J, Vanasse M, Seni MH, Graham G, Andermann F, Andermann E, Melancon SB, Keats BJ, Di Donato S, Pandolfo M. Phenotypic variability in friedreich ataxia: Role of the associated gaa triplet repeat expansion. *Ann Neurol*. 1997;41:675-682
26. Koenig. Friedreich ataxia and aved. In: Scriver CR BA, Sly WS, editors, ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001:5845-5855.
27. McCormack ML, Guttmann RP, Schumann M, Farmer JM, Stolle CA, Campuzano V, Koenig M, Lynch DR. Frataxin point mutations in two patients with friedreich's ataxia and unusual clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:661-664
28. Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M. Clinical and genetic abnormalities in patients with friedreich's ataxia. *N Engl J Med*. 1996;335:1169-1175
29. Lhatoo SD, Rao DG, Kane NM, Ormerod IE. Very late onset friedreich's presenting as spastic tetraparesis without ataxia or neuropathy. *Neurology*. 2001;56:1776-1777
30. Klopstock T, Chahrokh-Zadeh S, Holinski-Feder E, Meindl A, Gasser T, Pongratz D, Muller-Felber W. Markedly different course of friedreich's ataxia in sib pairs with similar gaa repeat expansions in the frataxin gene. *Acta Neuropathol*. 1999;97:139-142
31. Pandolfo M. Friedreich's ataxia: Clinical aspects and pathogenesis. *Semin Neurol*. 1999;19:311-321
32. Ragno M, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Curatola L, Bollettini F, Coccozza S, Caruso G, Santoro L, Filla A. Broadened friedreich's ataxia phenotype after gene cloning. Minimal gaa expansion causes late-onset spastic ataxia. *Neurology*. 1997;49:1617-1620
33. Sharma R, De Biase I, Gomez M, Delatycki MB, Ashizawa T, Bidichandani SI. Friedreich ataxia in carriers of unstable borderline gaa triplet-repeat alleles. *Ann Neurol*. 2004;56:898-901
34. Pandolfo M. Molecular pathogenesis of friedreich ataxia. *Arch Neurol*. 1999;56:1201-1208
35. Jiralerspong S, Liu Y, Montermini L, Stifani S, Pandolfo M. Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo. *Neurobiol Dis*. 1997;4:103-113
36. Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O, Koenig M. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*. 1997;16:345-351
37. Pianese L, Cavalcanti F, De Michele G, Filla A, Campanella G, Calabrese O, Castaldo I, Monticelli A, Coccozza S. The effect of parental gender on the gaa dynamic mutation in the frda gene. *Am J Hum Genet*. 1997;60:460-463
38. Montermini L, Kish SJ, Jiralerspong S, Lamarche JB, Pandolfo M. Somatic mosaicism for friedreich's ataxia gaa triplet repeat expansions in the central nervous system. *Neurology*. 1997;49:606-610
39. Monros E, Molto MD, Martinez F, Canizares J, Blanca J, Vilchez JJ, Prieto F, de Frutos R, Palau F. Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the friedreich ataxia gaa trinucleotide repeat. *Am J Hum Genet*. 1997;61:101-110
40. Cossee M, Campuzano V, Koutnikova H, Fischbeck K, Mandel JL, Koenig M, Bidichandani SI, Patel PI, Molte MD, Canizares J, De Frutos R, Pianese L, Cavalcanti F, Monticelli A, Coccozza S, Montermini L, Pandolfo M. Frataxin fracas. *Nat Genet*. 1997;15:337-338
41. Montermini L, Andermann E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, Cavalcanti F, Pianese L, Iodice L, Farina G, Monticelli A, Turano M, Filla A, De Michele G, Coccozza S. The friedreich ataxia gaa triplet repeat: Premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1261-1266

42. Labuda M, Labuda D, Miranda C, Poirier J, Soong BW, Barucha NE, Pandolfo M. Unique origin and specific ethnic distribution of the friedreich ataxia gaa expansion. *Neurology*. 2000;54:2322-2324
43. Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dolle P, Koenig M. Inactivation of the friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1219-1226
44. Potter NT, Miller CA, Anderson JJ. Mutation detection in an equivocal case of friedreich's ataxia. *Pediatr Neurol*. 2000;22:413-415
45. Van Driest SL, Gakh O, Ommen SR, Isaya G, Ackerman MJ. Molecular and functional characterization of a human frataxin mutation found in hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Metab*. 2005;85:280-285
46. Bartolo C, Mendell JR, Prior TW. Identification of a missense mutation in a friedreich's ataxia patient: Implications for diagnosis and carrier studies. *Am J Med Genet*. 1998;79:396-399
47. Zuhlke CH, Dalski A, Habeck M, Straube K, Hedrich K, Hoeltzenbein M, Konstanzer A, Hellenbroich Y, Schwinger E. Extension of the mutation spectrum in friedreich's ataxia: Detection of an exon deletion and novel missense mutations. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:979-982
48. De Castro M, Garcia-Planells J, Monros E, Canizares J, Vazquez-Manrique R, Vilchez JJ, Urtasun M, Lucas M, Navarro G, Izquierdo G, Molto MD, Palau F. Genotype and phenotype analysis of friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet*. 2000;106:86-92
49. De Michele G, Filla A, Cavalcanti F, Tammaro A, Monticelli A, Pianese L, Di Salle F, Perreti A, Santoro L, Caruso G, Coccoza S. Atypical friedreich ataxia phenotype associated with a novel missense mutation in the x25 gene. *Neurology*. 2000;54:496-499
50. Forrest SM, Knight M, Delatycki MB, Paris D, Williamson R, King J, Yeung L, Nassif N, Nicholson GA. The correlation of clinical phenotype in friedreich ataxia with the site of point mutations in the frda gene. *Neurogenetics*. 1998;1:253-257
51. Al-Mahdawi S, Pook M, Chamberlain S. A novel missense mutation (I198r) in the friedreich's ataxia gene. *Hum Mutat*. 2000;16:95
52. Zhu D, Burke C, Leslie A, Nicholson GA. Friedreich's ataxia with chorea and myoclonus caused by a compound heterozygosity for a novel deletion and the trinucleotide gaa expansion. *Mov Disord*. 2002;17:585-589
53. Spacey SD, Szczygielski BI, Young SP, Hukin J, Selby K, Snutch TP. Malaysian siblings with friedreich ataxia and chorea: A novel deletion in the frataxin gene. *Can J Neurol Sci*. 2004;31:383-386
54. Pook MA, Al-Mahdawi SA, Thomas NH, Appleton R, Norman A, Mountford R, Chamberlain S. Identification of three novel frameshift mutations in patients with friedreich's ataxia. *J Med Genet*. 2000;37:E38
55. Sakamoto N, Ohshima K, Montermini L, Pandolfo M, Wells RD. Sticky DNA, a self-associated complex formed at long gaa\*ttc repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J Biol Chem*. 2001;276:27171-27177
56. Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:3785-3798
57. Tiner WJ, Sr., Potaman VN, Sinden RR, Lyubchenko YL. The structure of intramolecular triplex DNA: Atomic force microscopy study. *J Mol Biol*. 2001;314:353-357
58. Potaman VN, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS, Bidichandani SI, Ashizawa T, Sinden RR. Length-dependent structure formation in friedreich ataxia (gaa)<sup>n</sup>(ttc)<sup>n</sup> repeats at neutral ph. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1224-1231
59. Mariappan SV, Catasti P, Silks LA, 3rd, Bradbury EM, Gupta G. The high-resolution structure of the triplex formed by the gaa/ttc triplet repeat associated with friedreich's ataxia. *J Mol Biol*. 1999;285:2035-2052
60. Shimizu M, Hanvey JC, Wells RD. Multiple non-b-DNA conformations of polypurine.Polypyrimidine sequences in plasmids. *Biochemistry*. 1990;29:4704-4713
61. Sinden R. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press, Inc.
62. Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, Ohshima K, Pandolfo M, Griffith JD, Wells RD. Sticky DNA: Self-association properties of long gaa.Ttc repeats in r.R.Y triplex structures from friedreich's ataxia. *Mol Cell*. 1999;3:465-475



63. Vetcher AA, Napierala M, Iyer RR, Chastain PD, Griffith JD, Wells RD. Sticky DNA, a long gaa.Gaa.Ttc triplex that is formed intramolecularly, in the sequence of intron 1 of the frataxin gene. *J Biol Chem*. 2002;277:39217-39227
64. Soragni E, Herman D, Dent SY, Gottesfeld JM, Wells RD, Napierala M. Long intronic gaa\*ttc repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:6056-6065
65. Grabczyk E, Mancuso M, Sammarco MC. A persistent rna.DNA hybrid formed by transcription of the friedreich ataxia triplet repeat in live bacteria, and by t7 rnap in vitro. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:5351-5359
66. Herman D, Jenssen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*. 2006;2:551-558
67. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C, Trabzuni D, Pook M. The friedreich ataxia gaa repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet*. 2008;17:735-746
68. Greene E, Mahishi L, Entezam A, Kumari D, Usdin K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:3383-3390
69. Rai M, Soragni E, Jenssen K, Burnett R, Herman D, Coppola G, Geschwind DH, Gottesfeld JM, Pandolfo M. Hdac inhibitors correct frataxin deficiency in a friedreich ataxia mouse model. *PLoS One*. 2008;3:e1958
70. Marmolino D, Acquaviva F. Friedreich's ataxia: From the (gaa)n repeat mediated silencing to new promising molecules for therapy. *Cerebellum*. 2009;8:245-259
71. Stewart MD, Li J, Wong J. Relationship between histone h3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*. 2005;25:2525-2538
72. Wilson RB. Frataxin and frataxin deficiency in friedreich's ataxia. *J Neurol Sci*. 2003;207:103-105
73. Acquaviva F, De Biase I, Nezi L, Ruggiero G, Tatangelo F, Pisano C, Monticelli A, Garbi C, Acquaviva AM, Coccozza S. Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with iscu1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line caco-2. *J Cell Sci*. 2005;118:3917-3924
74. Condo I, Ventura N, Malisan F, Tomassini B, Testi R. A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J Biol Chem*. 2006;281:16750-16756
75. Puccio H, Koenig M. Friedreich ataxia: A paradigm for mitochondrial diseases. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:272-277
76. Voncken M, Ioannou P, Delatycki MB. Friedreich ataxia-update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics*. 2004;5:1-8
77. Ramazzotti A, Vanmansart V, Foury F. Mitochondrial functional interactions between frataxin and isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2004;557:215-220
78. Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein isu1p. *EMBO J*. 2003;22:4815-4825
79. Park S, Gakh O, O'Neill HA, Mangravita A, Nichol H, Ferreira GC, Isaya G. Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem*. 2003;278:31340-31351
80. Adamec J, Rusnak F, Owen WG, Naylor S, Benson LM, Gacy AM, Isaya G. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: Implications for friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*. 2000;67:549-562
81. Huang ML, Becker EM, Whitnall M, Rahmanto YS, Ponka P, Richardson DR. Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16381-16386
82. Richardson DR. Friedreich's ataxia: Iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12:235-245
83. Cooper JM, Schapira AH. Friedreich's ataxia: Coenzyme q10 and vitamin e therapy. *Mitochondrion*. 2007;7 Suppl:S127-135
84. Hebert MD, Whittom AA. Gene-based approaches toward friedreich ataxia therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:3034-3043

85. Kearney M, Orrell RW, Fahey M, Pandolfo M. Antioxidants and other pharmacological treatments for friedreich ataxia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;CD007791
86. Lynch DR, Perlman SL, Meier T. A phase 3, double-blind, placebo-controlled trial of idebenone in friedreich ataxia. *Arch Neurol*. 2010;67:941-947
87. Rinaldi C, Tucci T, Maione S, Giunta A, De Michele G, Filla A. Low-dose idebenone treatment in friedreich's ataxia with and without cardiac hypertrophy. *J Neurol*. 2009;256:1434-1437
88. Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ. The role of histone acetylation in smn gene expression. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1171-1182
89. Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: Histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005;4:41-50
90. Di Prospero NA, Fischbeck KH. Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet*. 2005;6:756-765
91. Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B. The benzamide m344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases smn2 rna/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet*. 2006;120:101-110
92. Boesch S, Sturm B, Hering S, Goldenberg H, Poewe W, Scheiber-Mojdehkar B. Friedreich's ataxia: Clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Ann Neurol*. 2007;62:521-524
93. Gomez-Sebastian S, Gimenez-Cassina A, Diaz-Nido J, Lim F, Wade-Martins R. Infectious delivery and expression of a 135 kb human frda genomic DNA locus complements friedreich's ataxia deficiency in human cells. *Mol Ther*. 2007;15:248-254
94. Lim F, Palomo GM, Mauritz C, Gimenez-Cassina A, Illana B, Wandosell F, Diaz-Nido J. Functional recovery in a friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an hsv-1 amplicon vector. *Mol Ther*. 2007;15:1072-1078
95. Pandolfo M, Montermini L. Prenatal diagnosis of friedreich ataxia. *Prenat Diagn*. 1998;18:831-833
96. Inoue N IK, Mawatari S, Shida K, Kuroiwa Y. Congenital ocular motor apraxia and cerebellar degeneration-report of two cases. *Rinsho Shinkeigaku* 1971;11:855-861
97. Fukuhara N, Nakajima T, Sakajiri K, Matsubara N, Fujita M. Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (hmsnca): A new disease. *J Neurol Sci*. 1995;133:140-151
98. Amouri R, Moreira MC, Zouari M, El Euch G, Barhoumi C, Kefi M, Belal S, Koenig M, Hentati F. Aprataxin gene mutations in tunisian families. *Neurology*. 2004;63:928-929
99. Baba Y, Uitti RJ, Boylan KB, Uehara Y, Yamada T, Farrer MJ, Couchon E, Batish SD, Wszolek ZK. Aprataxin (aptx) gene mutations resembling multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13:139-142
100. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T, Watanabe M, Ikeda Y, Aoki M, Nagata T, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new hit/zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet*. 2001;29:189-193
101. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonca P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. Homozygosity mapping of portuguese and japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 2001;68:501-508
102. Sano Y, Date H, Igarashi S, Onodera O, Oyake M, Takahashi T, Hayashi S, Morimatsu M, Takahashi H, Makifuchi T, Fukuhara N, Tsuji S. Aprataxin, the causative protein for eaoh is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol*. 2004;55:241-249
103. Yoon G, Westmacott R, MacMillan L, Quercia N, Koutsou P, Georghiou A, Christodoulou K, Banwell B. Complete deletion of the aprataxin gene: Ataxia with oculomotor apraxia type 1 with severe phenotype and cognitive deficit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:234-236
104. Clements PM, Breslin C, Deeks ED, Byrd PJ, Ju L, Bieganski P, Brenner C, Moreira MC, Taylor AM, Caldecott KW. The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from atm and interacts with the DNA strand break repair proteins xrcc1 and xrcc4. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3:1493-1502
105. Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, Chen P, Howe O, Rudolph JH, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G, Lavin MF. Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet*. 2004;13:1081-1093

106. Rass U, Ahel I, West SC. Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*. 2007;130:991-1004
107. Chappell C, Hanakahi LA, Karimi-Busheri F, Weinfeld M, West SC. Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J*. 2002;21:2827-2832
108. Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, Weinfeld M, Durocher D. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase iv. *EMBO J*. 2004;23:3874-3885
109. Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW. Xrcc1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*. 2001;104:107-117
110. Luo H, Chan DW, Yang T, Rodriguez M, Chen BP, Leng M, Mu JJ, Chen D, Songyang Z, Wang Y, Qin J. A new xrcc1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment. *Mol Cell Biol*. 2004;24:8356-8365
111. Hirano M, Furiya Y, Kariya S, Nishiwaki T, Ueno S. Loss of function mechanism in aprataxin-related early-onset ataxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:380-386
112. Seidle HF, Bieganski P, Brenner C. Disease-associated mutations inactivate amp-lysine hydrolase activity of aprataxin. *J Biol Chem*. 2005;280:20927-20931
113. Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*. 2006;443:713-716
114. Caldecott KW. Xrcc1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 2003;2:955-969
115. Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (nhej) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5:1042-1048
116. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase- $\alpha$ : Evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol*. 1996;134:757-770
117. Sakamoto N, Larson JE, Iyer RR, Montermini L, Pandolfo M, Wells RD. Gga\* $\text{tcc}$ -interrupted triplets in long gaa\* $\text{ttc}$  repeats inhibit the formation of triplex and sticky DNA structures, alleviate transcription inhibition, and reduce genetic instabilities. *J Biol Chem*. 2001;276:27178-27187
118. Ohshima K, Sakamoto N, Labuda M, Poirier J, Moseley ML, Montermini L, Ranum LP, Wells RD, Pandolfo M. A nonpathogenic gaagga repeat in the friedreich gene: Implications for pathogenesis. *Neurology*. 1999;53:1854-1857
119. Barbot C, Coutinho P, Choro R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro J, Guimaraes A, Mendonca P, do Ceu Moreira M, Sequeiros J. Recessive ataxia with ocular apraxia: Review of 22 portuguese patients. *Arch Neurol*. 2001;58:201-205
120. Manto M, Marmolino D. Cerebellar disorders--at the crossroad of molecular pathways and diagnosis. *Cerebellum*. 2009;8:417-422
121. Manto M, Marmolino D. Animal models of human cerebellar ataxias: A cornerstone for the therapies of the twenty-first century. *Cerebellum*. 2009;8:137-154