

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ,
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
<<ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ>>**

Τσάτσος Χρήστος

Βιολόγος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *PTPN11* σε ασθενή με κλινικά
χαρακτηριστικά του συνδρόμου Leopard**

Λάρισα, 2016

**Μοριακή ανάλυση του γονιδίου *PTPN11* σε ασθενή με κλινικά
χαρακτηριστικά του συνδρόμου Leopard**

**Molecular analysis of *PTPN11* gene in a patient with clinical
characteristics of Leopard Syndrome**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Θεολογία Σαραφίδου (Επιβλέπουσα), Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτωρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος κ. Σαραφίδου Θεολογία, για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη βοήθεια, τη διόρθωση και τη βαθμολόγηση της παρούσας εργασίας, ως επιβλέπουσα καθηγήτρια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τμήματος κ. Μαμούρη Ζήση και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας κ. Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική-Βικτώρια, για τη συμμετοχή στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία, η οποία συνέβαλε στην ομαλή διεκπεραίωση της εργασίας. Ειδικότερα, τον Δρ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και τους υποψήφιους διδάκτορες Γιαννούλη Θεμιστοκλή, Σαρρή Κωνσταντίνα και Γαλλιοπούλου Ελένη για τη σημαντική βοήθεια τους σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη-----	1
Abstract-----	2
1. Εισαγωγή-----	3
Α) Γενικά στοιχεία για το σύνδρομο Leopard -----	3
Β) Κλινικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με το σύνδρομο Leopard-----	4
Γ) Μοριακή ανάλυση του συνδρόμου Leopard -----	9
Σκοπός της εργασίας-----	18
2. Υλικά και μέθοδοι-----	19
Α) Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενούς-----	19
Β) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)-----	19
Γ) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης-----	24
Δ) Καθαρισμός προϊόντων PCR (PCR Purification) -----	27
Ε) Αλληλούχηση του PCR προϊόντος-----	27
3. Αποτελέσματα -----	29
Α) Ενίσχυση με PCR των εξονίων του γονιδίου <i>PTPN11</i> -----	29
Β) Σύγκριση αλληλουχίας του γονιδίου <i>PTPN11</i> της ασθενούς με την αλληλουχία αναφοράς -----	30
4. Συζήτηση-----	36
5. Βιβλιογραφία -----	40
Παράρτημα -----	44

Περίληψη

Το σύνδρομο Leopard αποτελεί μία γενετική ασθένεια, που εμφανίζει αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα και προκαλείται από σημειακές μεταλλάξεις σε τρία γονίδια, το *PTPN11*, το *RAF1* και το *BRAF*. Οι μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια έχουν αντίκτυπο στην οδό μεταγωγής σημάτων RAS/MAPK, ενώ στο 90% των ασθενών που πάσχουν από το σύνδρομο έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*.

Το όνομα του συνδρόμου αποτελεί ένα ακρωνύμιο που αφορά τα σημαντικότερα κλινικά γνωρίσματα που εμφανίζουν οι ασθενείς: multiple lentigines (πολλαπλές εφηλίδες), electrocardiographic-abnormalities (ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες), ocular hypertelorism (υπερτελορισμός οφθαλμών), pulmonary stenosis (πνευμονική στένωση), abnormal genitalia (ανωμαλία ανάπτυξης γεννητικών οργάνων), retardation of growth (υστέρηση της ανάπτυξης) και sensorineural deafness (νευροαισθητήρια κώφωση). Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μοριακή διάγνωση του συνδρόμου μέσω του γονιδίου *PTPN11*, για μία ασθενή 63 χρονών που διαγνώστηκε κλινικά με το σύνδρομο, λόγω της παρουσίας πολλαπλών εφηλίδων, αρτηριακής υπέρτασης και κακοήθους μελανώματος. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *PTPN11*, με τη μέθοδο της PCR, στο γενετικό υλικό της ασθενούς, στη συνέχεια ακολούθησε η αλληλούχηση των προϊόντων PCR και τέλος συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της αλληλούχησης με την ακολουθία αναφοράς στο NCBI, με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμού, που θα συνέδεε την ασθενή με το σύνδρομο Leopard μοριακά. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των εξονίων μεταξύ των δύο ακολουθιών, έδειξαν πως δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός/μετάλλαξη στα εξόνια του γονιδίου *PTPN11* της ασθενούς.

Επομένως, για να εξακριβωθεί η κλινική διάγνωση που πραγματοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη ασθενή, θα πρέπει να ακολουθηθεί όμοια στρατηγική με αυτή που ακολουθήσαμε για το γονίδιο *PTPN11* και για τα υπόλοιπα δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση του συνδρόμου, το *RAF1* και το *BRAF*.

Abstract

Leopard syndrome is an autosomal dominant genetic disorder, caused by point mutations in three different loci: *PTPN11*, *RAF1* and *BRAF* genes. Mutations in these three genes have an impact on the RAS/MAPK signal transduction pathway. Furthermore, 90% of the patients with Leopard syndrome, carry mutations in the *PTPN11* gene.

Leopard, is an acronym, mnemonic for the major manifestations of this disorder: multiple lentigines, electrocardiographic-abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth and sensorineural deafness. In the present study, we attempted the molecular diagnosis of Leopard syndrome for a 63 years old woman patient, by analyzing the *PTPN11* gene. The patient was diagnosed clinically with the syndrome, because she was presented with multiple lentigines, hypertension and malignant melanoma. The first step was, the amplification of *PTPN11* exons from the patient's DNA followed by direct sequencing of the PCR products. Finally, we compared the sequencing results to the reference sequence from NCBI, to detect putative polymorphisms, which would confirm the clinical diagnosis of the Leopard syndrome. The result failed to show any polymorphism/mutation in the *PTPN11* gene exons of the patient.

Therefore, because no mutation was identified, to establish and confirm the clinical diagnosis performed for this patient, a future step would be to analyze the remaining two genes which are responsible for the appearance of the syndrome, namely the *RAF1* gene and the *BRAF* gene.

1. Εισαγωγή

A) Γενικά στοιχεία για το σύνδρομο Leopard

Το όνομα του συνδρόμου Leopard (LS, OMIM 151100), αποτελεί ένα ακρωνύμιο που αφορά τα σημαντικότερα κλινικά γνωρίσματα που εμφανίζουν οι ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα: multiple lentiginos (πολλαπλές εφηλίδες), electrocardiographic-abnormalities (ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες), ocular hypertelorism (υπερτελορισμός οφθαλμών), pulmonary stenosis (πνευμονική στένωση), abnormal genitalia (ανωμαλία ανάπτυξης γεννητικών οργάνων), retardation of growth (επιβράδυνση της ανάπτυξης) και sensorineural deafness (νευροαισθητήρια κώφωση) [Gorlin et al., 1969]. Παρόλο που δεν συμπεριλαμβάνεται στο ακρωνύμιο, η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (HCM) αποτελεί τη συχνότερη και πιο επικίνδυνη καρδιακή ανωμαλία, που αποτελεί απειλή για τη ζωή των ασθενών [Sarkozy et al., 2008]. Σύμφωνα με τα προτεινόμενα κλινικά κριτήρια για την διάγνωση του LS, θα πρέπει ο ασθενής να φέρει πολλαπλές εφηλίδες σε συνδυασμό με δύο ακόμη από τα κυριότερα γνωρίσματα του συνδρόμου. Αντίθετα, σε περίπτωση απουσίας των πολλαπλών εφηλίδων, θα πρέπει ο ασθενής να φέρει τρία γνωρίσματα του συνδρόμου και ταυτόχρονα να υπάρχει συγγενής πρώτου βαθμού που να έχει διαγνωστεί με το LS [Voron et al., 1976]. Παρομοίως, η μοριακή μελέτη ασθενών κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής, όταν οι πολλαπλές εφηλίδες δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμη, επιβεβαίωσε πως για την κλινική διάγνωση του συνδρόμου, απαιτείται οι ασθενείς να παρουσιάζουν τρία κύρια κλινικά χαρακτηριστικά, δυσμορφίες στο πρόσωπο (100%), υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (87%) και τέλος τις δερματικές κηλίδες café-au-lait [Digilio et al., 2006]. Παρόλα αυτά, σε πολλές περιπτώσεις ασθενών μπορεί να αντιμετωπιστεί πρόβλημα στην κλινική διάγνωση, λόγω της ήπιας εμφάνισης των κλινικών χαρακτηριστικών, σε συνδυασμό με την απουσία πολλαπλών εφηλίδων [Sarkozy et al., 2012].

Η συχνότητα εμφάνισης του LS στον πληθυσμό δεν είναι γνωστή και το σύνδρομο χαρακτηρίζεται ως σπάνιο και αποτελεί μέλος της ομάδας των NCFCs (neuro-cardio facial-cutaneous syndromes). Το LS φαίνεται να είναι το δεύτερο πιο συχνά εμφανιζόμενο σύνδρομο εντός της συγκεκριμένης ομάδας, μετά το Noonan syndrome (NS, OMIM 163950) [van der Burgt, 2007]. Τα σύνδρομα που ανήκουν στην ομάδα των NCFCs, μοιράζονται μεταλλάξεις στο μονοπάτι σηματοδότησης

RAS/MAPK και για αυτό το λόγο ονομάζονται και RASopathies και είναι αποτέλεσμα διαφορετικών μεταλλάξεων στα διάφορα στάδια του σηματοδοτικού μονοπατιού. Πέρα από τα προαναφερθέντα NS και LS, τα υπόλοιπα σύνδρομα που οφείλονται σε μεταλλάξεις που σχετίζονται με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του μονοπατιού RAS/MAPK είναι τα ακόλουθα: neurofibromatosis type 1 (NF1, OMIM 162200), gingival fibromatosis type 1 (OMIM 135300), capillary malformation-arteriovenous malformation (OMIM 608354), Costello syndrome (CS, OMIM 218040), autoimmune lymphoproliferative (OMIM 601859), cardio-facio-cutaneous (CFCS, OMIM 115150) και Legius syndromes (OMIM 611431) [Gelb and Tartaglia 2006; Denayer et al., 2008; Tidyman et al., 2009]. Ο κοινός παθογενετικός μηχανισμός πίσω από την εμφάνιση των παραπάνω συνδρόμων έχει ως αποτέλεσμα την επικάλυψη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών όπως, δυσμορφίες στο πρόσωπο, καρδιακές ανωμαλίες, δερματικές και οφθαλμικές ανωμαλίες, μειωμένη ανάπτυξη, νευρογνωστικές δυσλειτουργίες και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, για αυτό το λόγο πέραν των κλινικών στοιχείων κάθε ασθενούς για μια σωστή διαφορική διάγνωση, αυτή θα πρέπει να επιβεβαιώνεται και μοριακά [Martinez–Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].

B) Κλινικά χαρακτηριστικά που συνδέονται με το σύνδρομο Leopard

Τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά που βοηθούν στη διάγνωση του LS παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Δυσμορφίες στο πρόσωπο

Χαρακτηριστικά δυσμορφίας στο πρόσωπο εμφανίζονται σε ήπιο βαθμό σε νεογνά και βρέφη και γίνονται περισσότερο εμφανή κατά την παιδική ηλικία. Ο υπερτελορισμός, που περιλαμβάνει την αύξηση της απόστασης μεταξύ των δύο οφθαλμών κατά την ανάπτυξη του προσώπου, παρουσιάζεται σε όλες τις περιπτώσεις εμφάνισης του συνδρόμου. Επιπλέον, επίπεδη ρινική γέφυρα και δυσμορφία στα αυτιά των ασθενών παρουσιάζεται στο 87% των ασθενών. Επίσης, σπανιότερα παρατηρούμενα χαρακτηριστικά του συνδρόμου που αφορούν δυσμορφίες του προσώπου αποτελούν, η πτώση της μεσοβλεφάριας σχισμής, η αύξηση του πάχους των χειλιών με το ζεύγος των αυτιών στο πρόσωπο των ασθενών να βρίσκονται σε χαμηλότερο ύψος σε ένα ποσοστό 50%, μεγαλύτερα και στραμμένα προς τα έξω αυτιά και περιττό δέρμα στο λαιμό που παρουσιάζεται στο 37% των ασθενών [Somerville et al., 1972]. Στους ενήλικους ασθενείς, εκδηλώνονται υπερτελορισμός, πτώση της

μεσοβλεφάριας σχισμής, χαμηλά τοποθετημένα αυτιά, πρόωρη ρυτίδωση του δέρματος και βαθιές ρινικές και χειλικές πτυχώσεις [Martinez–Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012 ; Sarkozy et al., 2008].

Δερματολογικά κλινικά χαρακτηριστικά

Οι εφηλίδες είναι η πιο εμφανής εκδήλωση του LS και εμφανίζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των ασθενών, παρόλα αυτά η απουσία των εφηλίδων δεν απορρίπτει τη διάγνωση του συνδρόμου, ειδικότερα σε ασθενείς μικρής ηλικίας [Digilio et al., 2006]. Οι εφηλίδες είναι καφέ κηλίδες, διαμέτρου 2-8 mm, σε μερικές περιπτώσεις μεγαλύτερες. Συγκεντρώνονται στο ανώτερο τμήμα του κορμού και του λαιμού, αλλά παρουσιάζονται συχνά στο πρόσωπο, το κεφάλι, τα άκρα, τις παλάμες και τα γεννητικά όργανα (Εικ.1, Sarkozy et al., 2008). Οι εφηλίδες εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία και αυξάνονται σε αριθμό και σε ένταση χρώματος, με την πάροδο της ηλικίας του ασθενούς, ανεξάρτητα από την έκθεση στον ήλιο και διακρίνονται από τις φακίδες που εμφανίζονται λόγω της έκθεσης στο ηλιακό φως [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012]. Εξετάσεις βιοψίας μίας εφηλίδας, αποκαλύπτουν αυξημένο αριθμό μελανοκυττάρων ανά μονάδα επιφάνειας του δέρματος και συσσώρευση χρωστικών στο χόριο και τα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας [Voron et al., 1976]. Επιπλέον, σε ασθενείς με LS είναι πιθανό να παρατηρηθούν και άλλα σημάδια στο δέρμα, με την ορολογία «Café-au-lait spots» (CLS) που αποτελούν πλατιά σημάδια, φωτεινότερα σε χρώμα από τις εφηλίδες. Τα δύο αυτά είδη δερματικών κλινικών χαρακτηριστικών μπορεί να συνυπάρχουν στο 70-80% των ασθενών [Digilio et al., 2006]. Συνήθως, τα CLS προηγούνται σε εμφάνιση των εφηλίδων, καθώς παρουσιάζονται στους πρώτους μήνες ζωής και εμφανίζονται πιο σκούρα σε σκουρόχρωμα άτομα και αποτελούν κλινικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται στο 50% των ασθενών του συνδρόμου NF1 [Sarkozy et al., 2008 ; Gorlin et al., 1971]. Επιπρόσθετα, μπορεί να παρατηρηθούν δυσμορφίες νυχιών, υπερελαστικό δέρμα, παρουσία μεμβρανών δέρματος σε μεσοδακτύλιες περιοχές και τέλος περιοχές τριχόπτωσης στο τριχωτό της κεφαλής [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].



Εικόνα 1: Οι χαρακτηριστικές πολλαπλές εφηλίδες που υπάρχουν σε ασθενείς με LS, σε διαφορετικές ηλικίες. 1Α: Ασθενής 2 ετών με μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11* και εμφάνιση πολλαπλών εφηλίδων στο πάνω μέρος του κορμού. 1Β: Ασθενής 28 ετών με πολλαπλές εφηλίδες και παρουσία *CLS*. 1Γ: Ασθενής 28 ετών με πολλαπλές εφηλίδες στην πλάτη. 1Δ: Ασθενής 37 ετών με πολλαπλές εφηλίδες στην κνήμη (Sarkozy et al., 2008).

Καρδιακά προβλήματα

Παρότι δεν περιλαμβάνεται στο ακρωνύμιο, η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (HCM, hypertrophic cardiomyopathy) αποτελεί την πιο συχνή καρδιακή ανωμαλία για τους ασθενείς με LS, αντιπροσωπεύει ένα απειλητικό πρόβλημα για τη ζωή των ασθενών και είναι η πιο συνήθης αιτία αιφνίδιου καρδιακού θανάτου (SCD, sudden cardiac death) σε νέους ανθρώπους συμπεριλαμβανομένων και αθλητών [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2011]. Η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, συχνότερα παρατηρείται λόγω υπερτροφίας του μεσοκοιλιακού διαφράγματος σε ένα ποσοστό 80% των ασθενών που εμφανίζουν καρδιακά προβλήματα και μπορεί να συνδεθεί με απόφραξη της αριστερή κοιλίας στο 40% των ασθενών. Η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας την κάνει περισσότερο άκαμπτη, τα τοιχώματα της κοιλίας δεν μπορούν να χαλαρώσουν με αποτέλεσμα να υπάρχει διαστολική ανεπάρκεια και η κοιλία δεν μπορεί να γεμίσει με τη σωστή ποσότητα αίματος [Limongelli et al., 2007; Sarkozy et al., 2008; Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012]. Η HCM μπορεί να είναι εκ γενετής, αλλά συχνά εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της παιδικής

ηλικίας. Η έναρξη της HCM συνήθως προηγείται της εμφάνισης των εφηλίδων, όμως η υπερτροφική διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει ή να επιδεινώνεται παράλληλα με την εμφάνιση των εφηλίδων. Οι ασθενείς με υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, μπορεί να αναπτύξουν σημαντικά συμπτώματα και αρρυθμίες κατά τη διάρκεια της ιατρικής παρακολούθησης, για αυτό το λόγο νεογνά, βρέφη και παιδιά με υποψία LS χρειάζονται προσεκτική καρδιακή αξιολόγηση [Limongelli et al., 2008]. Ωστόσο, παρά την ύπαρξη συχνών καρδιακών προβλημάτων, οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα για τη σωστή κλινική διάγνωση. Από την άλλη πλευρά, οι ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες και η πνευμονική στένωση περιλαμβάνονται στο ακρωνύμιο, με τους περισσότερους ασθενείς που παρουσιάζουν ανωμαλίες να οφείλονται σε υπερτροφία της αριστερής κοιλίας στο 89% των περιπτώσεων, δημιουργώντας συσχέτιση με την HCM, ενώ το 39% των περιπτώσεων οφείλονται σε υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας και δεξιά κολπική διεύρυνση [Limongelli et al., 2007]. Επιπλέον, άλλοι τύποι ανωμαλιών του ρυθμού ή της καρδιακής αγωγιμότητας περιλαμβάνουν την παροξυσμική κολπική ταχυκαρδία, την κολπική μαρμαρυγή και τον πλήρη κολποκοιλιακό φραγμό [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez 2012]. Η πνευμονική στένωση είναι λιγότερο συχνή από ότι η HCM σε ασθενείς με LS και εμφανίζεται σε ποσοστό 23%, παρουσιάζοντας βαλβιδοπάθεια ή δυσπλασία της πνευμονικής βαλβίδας. Από την άλλη πλευρά, ανωμαλίες της αορτικής βαλβίδας και ανεπάρκεια μιτροειδούς βαλβίδας είναι συχνότερες. Τέλος, εμφανίζονται στεφανιαίες ανωμαλίες, όπως η διάταση των στεφανιαίων αρτηριών, ανωμαλίες στο σχήμα της αριστερής κοιλίας, ανεύρυσμα της αριστερής κοιλίας, κολποκοιλιακές διαφραγματικές ανωμαλίες και κοιλιακές διαφραγματικές ανωμαλίες [Limongelli et al., 2006].

Αναπτυξιακά προβλήματα

Το βάρος κατά τη γέννηση είναι συνήθως φυσιολογικό ή πάνω από το μέσο όρο στα νεογέννητα που αναπτύσσουν επιβράδυνση της ανάπτυξης μετά τη γέννηση. Καθυστέρηση της ανάπτυξης παρατηρείται στο 25% των προσβεβλημένων ατόμων, δεν σχετίζεται όμως με ενδοκρινικά προβλήματα ή συστηματικές ασθένειες [Voron et al., 1976 ; Gorlin et al., 1990 ; Sarkozy et al., 2008].

Σκελετικές ανωμαλίες

Η παραμόρφωση του θώρακα είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη σκελετική ανωμαλία και παρατηρείται στο 75% των νεογνών [Digilio et al. 2006]. Λιγότερο κοινά παρατηρούμενα κλινικά χαρακτηριστικά, αποτελούν, ο προγναθισμός, η σκολίωση, φτερούγισμα της ωμοπλάτης και υπέρ ευελιξία των οστών [Sarkozy et al. 2008 ; Gorlin et al., 1990].

Προβλήματα ακοής

Νευροαισθητήρια κώφωση εμφανίζεται στο 15-25% των ασθενών με LS [Sarkozy et al., 2004]. Οι περισσότερες περιπτώσεις κώφωσης έχουν διαγνωστεί κατά τη γέννηση ή κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις η κώφωση παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σε ενήλικες [Sarkozy et al., 2008]. Η νευροαισθητήρια κώφωση, είναι μία μορφή απώλειας ακοής στην οποία ο ήχος περνά κανονικά, όμως προβλήματα στο εσωτερικό αυτί ή στο ακουστικό νεύρο, έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ακοής [Polani and Moynahan, 1972].

Ανωμαλίες γεννητικών και ουροφόρων οδών

Μονομερής ή πιο πιθανό διμερής κρυφορχία παρατηρείται στο 50% των ανδρών. Επίσης συχνές ανωμαλίες είναι η υποσπαδία και υποπλασία που αφορούν την ατελή δημιουργία της ουρήθρας κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης. Αντίθετα οι νεφρικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένου του πεταλοειδούς νεφρού δεν είναι συχνές [Digilio et al. 2006].

Νευρολογικές ανωμαλίες

Ήπιες μαθησιακές δυσκολίες παρατηρήθηκαν στο 30% των περιπτώσεων, ενώ η νοητική υστέρηση είναι σπάνια και συνήθως ήπιου βαθμού [Sarkozy et al., 2008]. Η ικανότητα οπτικής αντίληψης είναι μειωμένη και η στέρηση, δηλαδή η ικανότητα του ανθρώπινου εγκεφάλου να αντιλαμβάνεται το βάθος, συνδυάζοντας τις ελάχιστα διαφορετικές εικόνες από οπτικά ερεθίσματα, συχνά δεν είναι φυσιολογική [Alfieri et al., 2008]. Λιγότερο συχνές νευρολογικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν το νυσταγμό, μειωμένη ικανότητα όσφρησης, αυτισμό, επιληπτικές κρίσεις και ανωμαλίες στα ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα [Watanabe et al., 2011]. Η υποτονία είναι κοινή σε νεογέννητα και μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση της ψυχοκινητικής ανάπτυξης [Digilio et al., 2006]. Σε ασθενείς με LS που παρουσιάζουν νευρολογικές ανωμαλίες,

όπως αναπτυξιακή καθυστέρηση ή επιληψία, η απεικόνιση του εγκεφάλου προτείνεται ως μέρος της διαγνωστικής διαδικασίας [Martinez–Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].

Καρκίνος

Μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργοποίησης του μονοπατιού RAS/MAPK μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μόνιμα ενεργοποιημένων πρωτεϊνών RAS, που μπορεί να προκαλέσει ακούσια και υπερδραστήρια σηματοδότηση στο εσωτερικό του κυττάρου, ακόμη και απουσία εισερχόμενου σήματος. Δεδομένου, ότι αυτά τα σήματα μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, η συνεχής ενεργοποίηση της RAS μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη καρκίνου. Μεταλλάξεις του γονιδίου *PTPN11* σε σωματικά κύτταρα παρατηρούνται σε αρκετούς τύπους αιματολογικών κακοηθειών, συχνότερα στη νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11* σε κύτταρα της βλαστικής σειράς προκαλούν το NS και το LS [Tartaglia et al., 2003]. Επιπλέον, έχει καταγραφεί ασθενής με κακοήθες μελάνωμα που φέρει μία τέτοια μετάλλαξη [Seishima et al., 2007]. Σε ασθενείς με LS και μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*, έχουν παρατηρηθεί οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, οξεία μυελογενής λευχαιμία και κυτταρικό μυοβλάστωμα. Παρόλα αυτά, η μελέτη μεμονωμένων ασθενών μέσω της βιβλιογραφίας, δεν καταγράφει αυξημένο κίνδυνο για την εκδήλωση κακοήθους καρκίνου σε ασθενείς με LS. Οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται για κακοήθεια, κυρίως κατά τη διάρκεια της παιδικής τους ηλικίας [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].

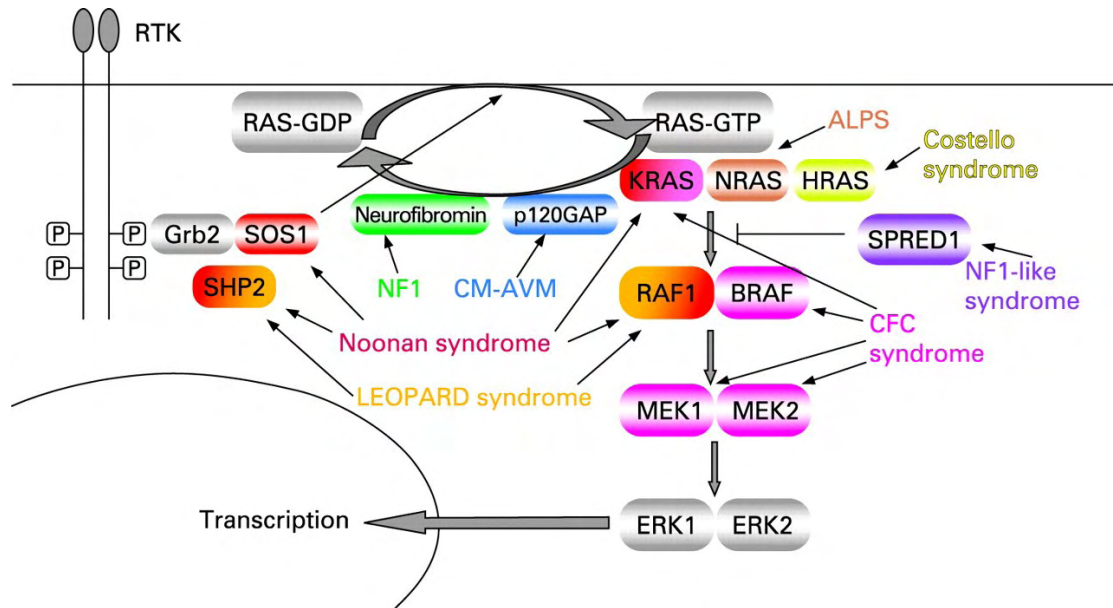
Γ) Μοριακή ανάλυση του συνδρόμου Leopard

Το LS είναι μία γενετικά ετερογενής διαταραχή, που εμφανίζει αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα και προκαλείται από μεταλλάξεις σε τρία γονίδια, το *PTPN11*, το *RAF1* και το *BRAF*. Η μοριακή ανάλυση των τριών αυτών γονιδίων ταυτοποιεί μεταλλάξεις στο 95% των ασθενών και οι μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια, έχουν αντίκτυπο στην οδό μεταγωγής σημάτων RAS/MAPK (Εικ. 2, Denayer et al., 2008). Ωστόσο, υπάρχει ένα ποσοστό ασθενών που ενώ φέρουν τα απαραίτητα κλινικά χαρακτηριστικά, δεν έχει εντοπιστεί κάποια μετάλλαξη [Tartaglia et al., 2001; Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012, Limongelli et al., 2008].

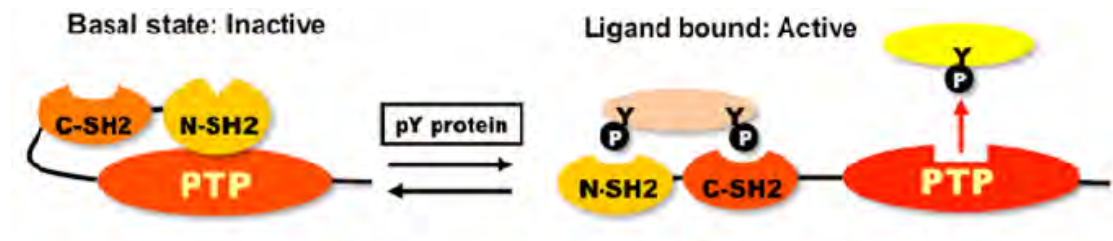
1. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11* οδηγούν στην εμφάνιση του LS

Το γονίδιο *PTPN11*, χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική θέση 12q24, κωδικοποιεί τη φωσφατάση τυροσίνης SHP2 (protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 11), μία ευρέως εκφραζόμενη πρωτεΐνη σε ιστούς τόσο ενηλίκων όσο και εμβρύων που ανήκει στην οικογένεια των PTPs (protein-tyrosine phosphatases) [Digilio et al., 2002]. Τα PTPs αποτελούν ένα ιδιαίτερα πολυμορφικό σύνολο μορίων που έχουν ως ρόλο τη ρύθμιση των αποκρίσεων των ευκαρυωτικών κυττάρων σε εξωκυττάρια σήματα. Η πρωτεΐνη SHP2 απαιτείται κατά την ανάπτυξη και ρυθμίζει τη μετακίνηση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση μέσω πολλαπλών οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του μονοπατιού RAS-MAPK [Feng, 1999]. Αποτελεί μόριο κλειδί για την κυτταρική απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης [Tartaglia et al., 2002]. Η πρωτεΐνη SHP2 αποτελείται από δύο υπομονάδες SH2, τις N-SH2 και C-SH2 που βρίσκονται στο N-τελικό άκρο, την υπομονάδα PTP που περιέχει την καταλυτική θέση δράσης της πρωτεΐνης και το C-τελικό άκρο που περιέχει δύο θέσεις φωσφορυλίωσης τυροσίνης και μία θέση πλούσια σε προλίνη της οποίας η λειτουργία δεν έχει αποσαφηνιστεί [Tartaglia et al., 2006]. Η πρωτεΐνη SHP2 παρουσιάζει ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση στο χώρο, που ρυθμίζεται μέσω ενός μηχανισμού μοριακού διακόπτη. Η υπομονάδα N-SH2 κατέχει τον κύριο ρόλο στον έλεγχο για την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση της πρωτεΐνης [Tartaglia et al., 2002]. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της πρωτεΐνης SHP2, αποδεικνύουν ότι η υπομονάδα N-SH2 αλληλεπιδρά με την περιοχή PTP σχηματίζοντας έναν βρόχο, μπλοκάροντας την καταλυτική θέση, καθιστώντας την πρωτεΐνη ανενεργή [Hof et al., 1998]. Στην περίπτωση που η ανενεργή πρωτεΐνη συνδεθεί με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης (pTyr-) σε διαφορετικές θέσεις στις υπομονάδες N-SH2 και C-SH2, τότε οι αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης που πραγματοποιούνται, έχουν σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της περιοχής N-SH2, από τη θέση PTP, κάνοντας έτσι διαθέσιμη την καταλυτική θέση, ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη (Εικ. 3 Qiu et al., 2014) [Tartaglia et al., 2002]. Η λειτουργία της ενεργοποιημένης SHP2, είναι η προώθηση του μορίου προσαρμογέα GRB2, ώστε να συνδεθεί μέσω των περιοχών του SH3 με ένα μόριο πλούσιο σε προλίνη, που ονομάζεται SOS και είναι παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης. Η SOS με τη σειρά της ενεργοποιεί την ανταλλαγή του GDP με GTP, που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης RAS και

ταυτόχρονα το μονοπάτι RAS/MAPK [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].



Εικόνα 2: Τα σύνδρομα της ομάδας NF1 και τα στάδια στα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγωγή του σήματος στο μονοπάτι σηματοδότησης RAS/MAPK (Denayer et al. 2008).



Εικόνα 3: Η ρύθμιση της πρωτεΐνης SHP-2, μέσω ενός μηχανισμού αυτοελέγχου. Λόγω της απουσίας καταλοίπων φωσφοτυροσίνης (pYr-) η πρωτεΐνη είναι σε κλειστή διαμόρφωση, μπλοκάροντας την καταλυτική θέση που βρίσκεται στην περιοχή PTP. Παρουσία των κατάλληλων μορίων πρόσδεσης, η κλειστή διαμόρφωση διαταράσσεται και ανοίγει (Qiu et al., 2014).

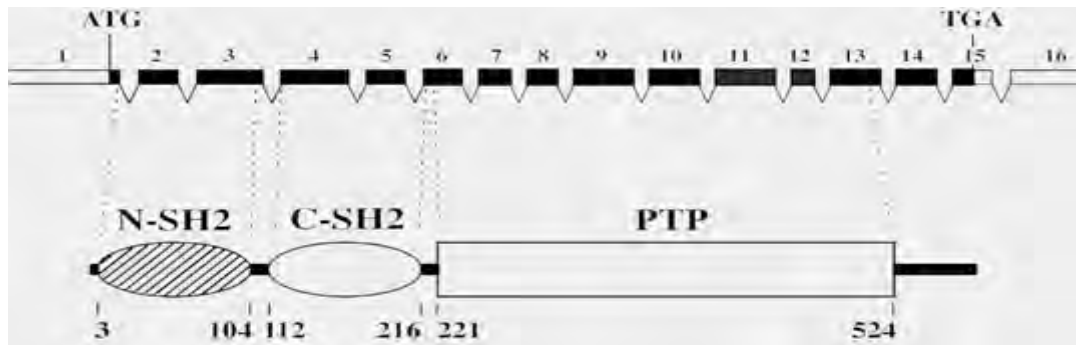
Λανθασμένη ρύθμιση της πρωτεΐνης SHP-2, μπορεί να οδηγήσει σε εκδήλωση ασθένειας, όπως στην πλειοψηφία των ασθενών με LS και NS. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11* που προκαλούν το NS, είναι μεταλλάξεις που προκαλούν κέρδος λειτουργίας <gain of function>, καθώς οι μεταλλάξεις συγκεντρώνονται στα σημεία αλληλεπίδρασης μεταξύ των τμημάτων N-SH2 και PTP και διαταράσσουν αυτή την ανασταλτική ενδομοριακή αλληλεπίδραση, με αποτέλεσμα να σταθεροποιούν την πρωτεΐνη SHP-2 στην ενεργή διαμόρφωση [Tartaglia et al., 2001]. Μελετώντας, σε

μοντέλο ποντικού μεταλλάξεις που σχετίζονται με το NS, αποδείχθηκε η υπερενεργοποίηση των MAPK κινασών, όπως οι ERK 1/2 κινάσες, επιβεβαιώνοντας το κέρδος λειτουργίας που έχουν σαν αντίκτυπο οι μεταλλάξεις που συνδέονται με το NS [Araki et al., 2004]. Έχουμε αναφέρει πως μεταξύ των συνδρόμων Noonan και Leopard υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των κλινικών χαρακτηριστικών και ένα μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων (50% και 90% αντίστοιχα) παρατηρούνται στο γονίδιο *PTPN11*. Επομένως, όπως συμβαίνει με το NS, μία παρόμοια κατάσταση κέρδους λειτουργίας αναμένεται και στο LS. Ωστόσο, δεν ισχύει απόλυτα η παραπάνω υπόθεση. Αρχικά, οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με το LS χαρακτηρίστηκαν ως <Loss of function>, καθώς συσχετίστηκε με τη μειωμένη παραγωγή φωσφατάσης, λόγω της μειωμένης καταλυτικής δράσης του PTP, εξαιτίας της κλειστής διαμόρφωσης στην οποία παραμένει η πρωτεΐνη [Kontaridis et al.2006 ; Hanna et al., 2006]. Στη συνέχεια όμως [Oishi et al., 2009], δείχθηκε αυξημένη δραστηριότητα του μονοπατιού MAPK/ERK, στα φτερά και στα μάτια μεταλλαγμένων στελεχών *Drosophila*, με τις μεταλλάξεις που προκαλούν το LS, την Tyr279Cys και την Thr468Met. Ακολούθως, μέσα από την έρευνα των Yu et al. (2013), παρατηρήθηκε πως η μετάλλαξη Tyr279Cys, έχει επίδραση στο βαθμό αλληλεπίδρασης της περιοχής N-SH2 και της PTP με αποτέλεσμα να την αποδυναμώνει. Αυτή η μειωμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων, έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα πρόσδεσης της υπομονάδας N-SH2 με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης (pTyr-). Για να μην πραγματοποιηθεί γενίκευση όσον αφορά, την επίδραση και των υπόλοιπων μεταλλάξεων που προκαλούν την εκδήλωση του LS, στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχα έρευνα και για τις 7 θέσεις όπου παρατηρούνται οι μεταλλάξεις στο PTP [Yu et al., 2014]. Για το σύνολο των μεταλλάξεων, τελικά παρατηρήθηκε ότι μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, όπως προαναφέρθηκε, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αυξημένη συγγένεια της SHP2 με την πρωτεΐνη Gab1, που φωσφορυλιώνεται μετά από διέγερση με αυξητικό παράγοντα, η οποία οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK. Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη SHP2 δεσμεύεται επιλεκτικά με τον προσαρμογέα Gab1, σε σύγκριση με την αγρίου τύπου SHP2, η οποία παραμένει για περισσότερο χρόνο στην πρωτεΐνη σκαλωσιάς. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αντισταθμίσει τη μειωμένη δραστηριότητα φωσφατάσης που έχει καταγραφεί *in vitro* [Kontaridis et al.2006].

Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις που προκαλούν το LS, μπορούν να συσχετιστούν με την ενεργοποίηση μία άλλης κατηγορίας κινασών, τις PI3K. Πρόκειται για, λιπιδικές κινάσες, οι οποίες έχουν παρόμοια δράση με το μονοπάτι διέγερσης RAS/MAPK, καθώς παρουσία αυξητικών παραγόντων παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη, την απόπτωση, τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων. Παρουσία του αυξητικού παράγοντα EGF παρατηρείται υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT. Αυτή η απορρύθμιση οφείλεται στην αποφωσφορυλίωση της Gab1 από τις θέσεις σύνδεσης με τη PI3K. Επίσης, με την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού έχει συνδεθεί η εκδήλωση της HCM [Edouard et al., 2009]. Επιπρόσθετα με την HCM, εμπλέκεται ακόμη μία κινάση, η GSK-3β που παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη [Frame et al., 2001]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/GSK-3β συνδέεται με μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο *PTPN11* [Pandit et al., 2007].

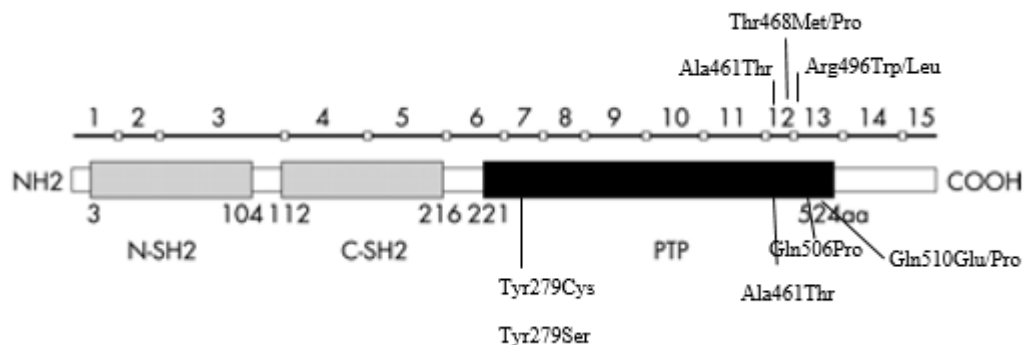
Η φαρμακευτική προσέγγιση του πιο επικίνδυνου κλινικού χαρακτηριστικού του LS, που αποτελεί η HCM, στηρίζεται στο μοντέλο της αυξημένης δραστηριότητας των μονοπατιών AKT/mTOR, η οποία φαίνεται πως είναι η υπεύθυνη για την ανάπτυξη και συντήρηση των HCMs. Επομένως, μία αποτελεσματική θεραπεία που θα ανέστρεφε την HCM στους ασθενείς, είναι η ραπαμυκίνη και τα ανάλογα της [Alexandre et al., 1999]. Η ραπαμυκίνη είναι ένας αναστολέας του μονοπατιού mTOR, η αυξημένη δραστηριότητα του οποίου είναι υπεύθυνη για την πρόκληση HCM, σε ασθενείς με LS.

Το 90% των ασθενών που έχουν διαγνωσθεί μοριακά με το LS, φέρει αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία του γονιδίου *PTPN11*. Στον άνθρωπο, το γονίδιο *PTPN11* αποτελείται από 16 εξόνια. Όλες οι μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στα εξόνια που κωδικοποιούν την υπομονάδα PTP, ειδικότερα στα εξόνια 7, 12 και 13. Το εξόνιο 1 περιέχει την 5' αμετάφραστη περιοχή, το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG και λίγα ακόμη κωδικόνια. Το εξόνιο 15 περιέχει την αλληλουχία λήξης της μετάφρασης, ενώ στο εξόνιο 16 περιλαμβάνεται το μεγαλύτερο μέρος της 3' αμετάφραστης περιοχής (Εικ. 3, Tartaglia et al. 2001) [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012].



Εικόνα 4: Δομή του γονιδίου PTPN11 (Tartaglia et al. 2001).

Μέχρι τώρα, έχουν βρεθεί έντεκα σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο, που προκαλούν αλλαγή στην αμινοξική ακολουθία και συνδέονται με το LS. Οι μεταλλάξεις είναι οι ακόλουθες: Tyr279Cys/Ser, Ala461Thr, Gly464Ala, Thr468Met/Pro, Arg498Trp/Leu, Gln506Pro, Gln510Glu/Pro και όλες εντοπίζονται σε εξόνια που κωδικοποιούν την υπομονάδα PTP. Το ενεργό κέντρο που βρίσκεται στη συγκεκριμένη υπομονάδα εντοπίζεται μεταξύ των καταλοίπων 457 έως 469 και σχετίζεται με την ομαλή δραστηριότητα φωσφατάσης (Εικ.5, [Sarkozy et al., 2003]) [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012]. Ενώ, από τις παραπάνω μεταλλάξεις οι δύο, Tyr279Cys και Thr468Met, ευθύνονται για το 65% των περιπτώσεων ασθενών με LS [Sarkozy et al. 2004].



Εικόνα 5. Οι αμινοξικές αλλαγές που ευθύνονται για την εμφάνιση του LS (Sarkozy et al., 2003), η εικόνα έχει προσαρμοστεί.

Σε μία από τις μεγαλύτερες κλινικές και μοριακές αναλύσεις ασθενών με LS που πραγματοποιήθηκε από τους Sarkozy et al. (2004), μελετήθηκαν τριάντα ασθενείς σε ηλικιακό εύρος από 8 μηνών έως 49 ετών και δείχθηκε ότι από τους 27 ασθενείς που ταυτοποιήθηκαν με μετάλλαξη, 10 έφεραν τη μετάλλαξη Tyr279Cys (33%), 10

ακόμη έφεραν τη μετάλλαξη Thr468Met (33%). Σπανιότερες ήταν αυτές που αφορούσαν την, μετάλλαξη Gly464Ala που παρατηρήθηκε σε δύο ασθενείς (6%), την μετάλλαξη Arg498Trp (6%) σε δύο άτομα και τις μεταλλάξεις Arg498Leu (3%), Gln506Pro (3%), Tyr279Ser (3%) σε έναν ασθενή η καθεμία. Σε τρεις ασθενείς (10%) δεν εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11*. Οι μεταλλάξεις στις θέσεις 464, 468, 498 και 506 δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με το σύνδρομο Noonan. Αντίθετα, η αμινοξική αλλαγή Tyr279Cys παρατηρήθηκε και σε ασθενείς που πάσχουν από το NS [Tartaglia et al., 2002]. Στη θέση 468 όπου φυσιολογικά κωδικοποιείται Thr η οποία εντοπίζεται στη δραστική θέση της ακολουθίας και παίζει ρόλο στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Υποκατάσταση αυτού του αμινοξέος μπορεί να αλλοιώσει την εγγενή δομική ισορροπία του καταλυτικού κέντρου με την αλλαγή της σύνδεσης των δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν την πρωτεΐνη [Digilio et al., 2002 ; Conti et al., 2003]. Η αμινοξική υποκατάσταση Gln506Pro, πιθανόν προκαλεί απώλεια της ανασταλτικής επίδρασης του τομέα N-SH2 στο ενεργό κέντρο φωσφατάσης [Conti et al. 2003].

Συνεχίζοντας με την έρευνα των Sarkozy et al., (2004), διαπιστώθηκε πως δυσμορφίες στο πρόσωπο, συμπεριλαμβανομένου του υπερτελορισμού, εντοπίστηκαν στο 90% των ασθενών. Ενώ πολλαπλές εφηλίδες έφεραν το 86% των ασθενών και πρέπει να τονιστεί πως στους ασθενείς που δεν έφεραν το κυριότερο κλινικό χαρακτηριστικό του LS, δηλαδή τις πολλαπλές εφηλίδες, βρέθηκαν οι δύο πιο συχνές μεταλλάξεις του συνδρόμου, δηλαδή η Tyr279Cys και η Thr468Met. Επομένως δεν είναι δυνατό να αντιστοιχήσουμε την παρουσία αυτών των συχνότερων μεταλλάξεων με συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, καρδιακά προβλήματα αντιμετώπιζαν το 71% των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*. Από όλες τις καρδιακές δυσλειτουργίες, η πλέον κοινή ήταν η HCM σε ποσοστό 80% των ασθενών. Επίσης, η HCM δεν συνδέθηκε με κάποια συγκεκριμένη μετάλλαξη. Παρόλα αυτά η διάγνωση της HCM είναι μία πολύ σημαντική βοήθεια για τη σωστή κλινική διάγνωση ενός υποψήφιου ασθενούς για LS, σε περίπτωση απουσίας των πολλαπλών εφηλίδων, καθώς είναι ένα κλινικό χαρακτηριστικό σχετιζόμενο σχεδόν αποκλειστικά με το LS. Επομένως, η κλινική διάγνωση της HCM βοηθά στη σωστή διαφορική διάγνωση του LS, μεταξύ των συνδρόμων που εμφανίζουν επικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά.

Επιπλέον, σε μία έρευνα από τους Limongelli et al., (2008) στην οποία μελετήθηκαν 24 ασθενείς που παρουσίαζαν υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, παρατηρήθηκε πως από αυτούς, οι 16 έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*. Όμως, μόνο ο ένας έφερε τη μετάλλαξη Tyr279Cys. Επίσης, δύο ασθενείς έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *RAF1*, ενώ για τους υπόλοιπους έξι ασθενείς δεν βρέθηκε μετάλλαξη. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως ασθενείς που δεν είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*, έδειξαν μία υψηλότερη συχνότητα οικογενειακού ιστορικού με καρδιακά προβλήματα και υψηλότερη πιθανότητα για την πρόκληση αιφνίδιου θανάτου. Επίσης, εμφανίζουν συχνότερα επεισόδια ταχυκαρδίας και κολπική μαρμαρυγή. Αντίθετα, οι ασθενείς με LS και μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*, συχνότερα εμφανίζουν ήπια κλινικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα να υπάρχει πρόβλημα στην κλινική τους διάγνωση.

B. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAF1* οδηγούν στην εμφάνιση του LS

Το γονίδιο *RAF1* που εντοπίζεται στη θέση 3p25.2, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *RAF1*, η οποία είναι μία MAP3K (MAP kinase) Ser/Thr, δηλαδή είναι η πρώτη κινάση του μονοπατιού των κινασών MAP. Η πρωτεΐνη *RAF1* ενεργοποιείται από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη RAS. Οι πρωτεΐνες RAS ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται μικρές GTPάσες και εμπλέκονται στη μεταφορά σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι κινάσες *RAF*, φωσφορυλιώνουν σε δύο κατάλοιπα Ser, τις κινάσες *MAPKK* (*MEK*). Οι *MEK* είναι μία ειδική κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών που έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν ταυτόχρονα κατάλοιπα Thr και Tyr, της *MAPK* (*ERK*), η οποία είναι μία κινάση Ser/Thr. Οι *ERK* περιέχουν πολύ καλά συντηρημένη την περιοχή -Thr x Tyr-, φωσφορυλίωση της οποίας οδηγεί στη ενεργοποίησή τους. Οι κινάσες *ERK* αποτελούν σημαντικούς τελεστές για τη φυσιολογία του κυττάρου, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση του κυττάρου και την κυτταρική μετανάστευση [Malumbres and Barbacid, 2003].

Το γονίδιο *RAF1* του ανθρώπου περιλαμβάνει 17 εξόνια και έχει 3 συντηρημένες περιοχές (CR): την περιοχή CR1 μεταξύ των εξονίων 2 έως 5 που περιέχει μία θέση πρόσδεσης για τη RAS και μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη, την περιοχή CR2 που αντιστοιχεί στο εξόνιο 7 και την περιοχή CR3 που αντιστοιχεί στα εξόνια 10 έως 17, περιέχει την περιοχή της κινάσης. Η ενεργοποίηση ή η

απενεργοποίηση του γονιδίου ρυθμίζεται μέσω της φωσφορυλίωσής του και αυτό συνάδει με το μεγάλο αριθμό θέσεων φωσφορυλίωσης σερίνης και θρεονίνης που φέρει.

Το 1/3 των ασθενών που δεν εμφανίζουν μετάλλαξη του γονιδίου *PTPN11*, φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *RAF1*. Οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *RAF1* σε ασθενείς με LS είναι η Ser257Leu και η Leu613Val. Συγκεκριμένα αυτές οι δύο μεταλλάξεις βρέθηκαν σε δύο ασθενείς που είχαν εξεταστεί μοριακά και βρέθηκαν αρνητικοί για μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11* [Pandit et al., 2007 ; Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012]. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *RAF1* είναι υπεύθυνες και για την εμφάνιση του NS, το 75% των ασθενών που πάσχουν από NS, λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο *RAF1*, αναπτύσσει HCM [Razzaque et al., 2007]. Τέλος, διερευνήθηκε η λειτουργική επίδραση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *RAF1* που προκαλούν LS, συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης Leu613Val και συσχετίστηκε η εμφάνιση της HCM στους ασθενείς με LS, με αύξηση της δραστηριότητας κινάσης και με αυξημένη ενεργοποίηση της ERK κινάσης [Pandit et al., 2007]. Αυτά τα στοιχεία, ενισχύουν το ρόλο της αυξημένης σηματοδότησής του μονοπατιού RAS/MAPK σε ασθενείς με LS που εμφανίζουν HCM [Muslin et al., 2005].

Γ. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* οδηγούν στην εμφάνιση του LS

Το γονίδιο *BRAF*, που εντοπίζεται στη θέση 7q34, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BRAF, μία πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών RAF που προαναφέρθηκαν. Πρόκειται δηλαδή για μία MAP3K, που ενεργοποιείται από την RAS GTPάση και έχει τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνει και κατ' επέκταση να ενεργοποιεί τις MAP κινάσες MEK και ERK, παίζοντας ρόλο στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Το γονίδιο *BRAF* του ανθρώπου αποτελείται από 18 εξόνια και τα αλληλόμορφα που προκαλούν το LS, φέρουν τις αλλαγές στην αμινοξική τους αλληλουχία Thr241Pro και Leu245Phe [Martinez-Quintana and Rodriguez-Gonzalez, 2012]. Σε ασθενή με LS εντοπίστηκε μία ετερόζυγη de novo μετάλλαξη που οδήγησε στην αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία Thr241Pro, στο γονίδιο *BRAF* [Sarkozy et al., 2009]. Ο ασθενής παρουσίαζε μειωμένη ανάπτυξη, κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, δυσπλασία μιτροειδούς και αορτικής βαλβίδας, γνωστικά προβλήματα, νεογνική υποτονία, νευροαισθητήρια κώφωση και επιληπτικές κρίσεις. Το δέρμα έδειξε υπερκεράτωση, δηλαδή μία καλοήγη βλάβη του δέρματος που χαρακτηρίζεται

από πάχυνση του επιφανειακού τμήματος της επιδερμίδας. Επίσης, ο ασθενής εμφάνιζε πολλαπλές εφηλίδες σε όλο το σώμα, ακόμη και στις παλάμες και τα πέλματα. Επιπλέον εμφάνιζε κηλίδες Café-au-lait και πολλαπλούς σπίλους. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν έδειξε την ικανότητα μετασχηματισμού σε κύτταρα *in vitro*. Όμως υπήρξε αύξηση στη φωσφορυλίωση της κινάσης MEK, που υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK κινασών.

Επιπλέον, από τους Koudova et al. (2009) μελετήθηκε ασθενής, που δεν παρουσίαζε προβλήματα νοημοσύνης, με LS και έφερε τη μετάλλαξη Leu245Phe του γονιδίου *BRAF*, επρόκειτο για μία *de novo* μετάλλαξη και έδειξε πως δεν υπήρχαν στοιχεία μωσαϊκισμού των σωματικών κυττάρων.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι ο μοριακός έλεγχος του συνδρόμου Leopard μέσω της αλληλούχησης των εξονίων του γονιδίου *PTPN11*, σε γυναίκα ασθενή που διαγνώστηκε κλινικά με το σύνδρομο. Επιλέχτηκε, η μοριακή ανάλυση των εξονίων του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς στο 90% των ασθενών με μοριακή διάγνωση για το σύνδρομο Leopard, ταυτοποιήθηκε σημειακή μετάλλαξη σε κάποιο από τα εξόνια αυτού του γονιδίου και συγκεκριμένα στα εξόνια που αντιστοιχούν στην υπομονάδα του PTP, όπου βρίσκεται η καταλυτική θέση δράσης του ενζύμου. Επομένως, στόχος μας είναι η ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *PTPN11* από το DNA της ασθενούς με PCR και ακολούθως η αλληλούχηση τους, για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί βιβλιογραφικά και συνδέονται με την εμφάνιση του συνδρόμου.

Υλικά και μέθοδοι

A) Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενούς

Ασθενής γυναίκα 63 ετών, προσήλθε στα επείγοντα νευροχειρουργικά ιατρεία του Θριάσιου Γενικού Νοσοκομείου σε κατάσταση αφασίας και απώλειας συνείδησης. Η βιοψία του εγκεφαλικού αιματώματος έδειξε HBM 45 θετικά κύτταρα (κακοήθες), που υποδεικνύει εγκεφαλική κατάσταση μελανώματος, δίχως την ύπαρξη ενδείξεως για την ύπαρξη πρωτοπαθούς μελανώματος σε άλλο σημείο του σώματος. Το HBM 45 είναι ένα αντιμελανωτικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση μελανωμάτων και χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα [Snyder et al., 2002]. Η κλινική εξέταση του δέρματος έδειξε διάσπαρτες εφηλίδες στο πρόσωπο και σε υπόλοιπα σημεία του σώματος, χωρίς να επηρεάζει την παρουσία των εφηλίδων η έκθεση των συγκεκριμένων σημείων στον ήλιο, ενώ υπήρχε και ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης. Παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά υπάρχουν σε μία από τις κόρες της ασθενούς. Λόγω της παρουσίας των πολλαπλών εφηλίδων, ετέθη η υποψία του συνδρόμου Leopard. Η ασθενής εμφάνισε ένα μπλε σπίλο στη ρίνα, επομένως η διαφορική διάγνωση τίθεται μεταξύ του συνδρόμου των πολλαπλών εφηλίδων LS και του συνδρόμου Casey, η απουσία όμως ενδοκρινών διαταραχών στην ασθενή που είναι ένα βασικό κλινικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου Casey, στο οποίο επίσης υπάρχουν πολλαπλές εφηλίδες, καρδιακές διαταραχές και συγγενείς σπίλοι, οδηγεί στο συμπέρασμα πως με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά το πιθανότερο σενάριο είναι η ασθενής να πάσχει από το LS.

B) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μέθοδος

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι μία *in vitro* ενζυμική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα μοριακών εφαρμογών που έχουν σαν στόχο τον πολλαπλασιασμό μίας ειδικής αλληλουχίας DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers), που θα αποτελέσουν τα αρχικά τμήματα για τον σχηματισμό των συμπληρωματικών τμημάτων DNA [Mullis

et al., 1986]. Για το γονίδιο *PTPN11*, που αποτελείται από δεκαπέντε εξόνια που κωδικοποιούν αμινοξέα, τα οποία ενισχύθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν τα δεκαπέντε ζεύγη εκκινητών που παρουσιάζονται παρακάτω [Tartaglia et al., 2002], ενώ για το εξόνιο 1, για το οποίο η PCR δεν ήταν επιτυχής με τους συγκεκριμένους εκκινητές, σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές με το πρόγραμμα PRIMER3 <http://simgene.com/Primer3> (Πίνακας 1).

Σε μία PCR, το δείγμα DNA αναμιγνύεται με ένα ζεύγος εκκινητών, με τα τέσσερα διαφορετικά τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs τα οποία χρησιμοποιούνται από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq) σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, για να επιμηκύνουν τις συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA στόχου που σταδιακά σχηματίζονται. Η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή της PCR που είναι ένας θερμικός κυκλοποιητής. Οι συσκευές αυτές έχουν αυτοματοποιήσει πλήρως την εκτέλεση της αντίδρασης. Στις συσκευές αυτές, ένα ειδικό λογισμικό πρόγραμμα ελέγχει το σύστημα ψύξης/θέρμανσης, που είναι υπεύθυνο για τις αλλαγές της θερμοκρασίας, ανάλογα με το βήμα της αντίδρασης. Το δείγμα αρχικά θερμαίνεται στους 95°C προκειμένου να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65°C, ανάλογα με τη θερμοκρασία επαναδιάταξης (T_m) των εκκινητών ώστε αυτοί να υβριδοποιηθούν με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72 °C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 34 κύκλους, έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική, δηλαδή σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας αποδιάταξης του DNA στόχου, οι DNA πολυμεράσες που προέρχονται από ευκαρυωτικούς οργανισμούς απενεργοποιούνται και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική Taq πολυμεράση, η οποία αντέχει σε επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95 °C.

Η απόδοση μίας PCR, εξαρτάται από σειρά παραγόντων, όπως η συγκέντρωση των διάφορων συστατικών της αντίδρασης, το χρονικό διάστημα που διαρκεί κάθε στάδιό της, ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιούνται, η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών στο μόριο στόχο και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών. Οι εκκινητές πρέπει να αποτελούνται από 20 έως 24 νουκλεοτίδια, ενώ οι τιμές T_m των δύο εκκινητών πρέπει να είναι παρόμοιες, όπως και οι συγκεντρώσεις τους.

Υλικά

- DNA 100-200ng (Το DNA της ασθενούς μας εστάλη απομονωμένο)
- Δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs (100 mM από κάθε νουκλεοτίδιο)
- Ταq πολυμεράση της εταιρίας Kara
- 10x ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρίας Kara, με 1,5 mM MgCl₂
- 50 pmol εκκινητές

Πίνακας 1: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, για την ενίσχυση του γονιδίου PTPN11

Αλληλουχία εκκινητών (5' - 3')				
Exon	Forward	Reverse	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C)	Μέγεθος προϊόντος
1	GTCGCGAGCGGTGACATCACGGG	CCTTCCGGACGGGGCTAACCGA	64	337
2	ACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAG	CAGCAAGCTATCCAAGCATGGT	59	404
3	CGACGTGGAAGATGAGATCTGA	CAGTCACAAGCCTTTGGAGTCAG	59	383
4	AGGAGAGCTGACTGTATACAGTAG	CATCTGTAGGTGATAGAGCAAGA	60	446
5	CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTG	GTTGAAGCTGCAATGGGTACATG	57	328
6	TGCATTAACACCGTTTTCTGT	GTCAGTTTCAAGTCTCTCAGGTC	57	281
7	GAACATTTCTAGGATGAATTCC	GGTACAGAGGTGCTAGGAATCA	57	271
8	GACATCAGGCAGTGTTCACGTTAC	CCTTAAAGTTACTTTCAGGACATG	57	350
9	GTAAGCTTTGCTTTTCACAGTG	CTAAACATGGCCAATCTGACATGTC	57	356
10	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTGTC	GACCCCTGAATTCTACACACCATC	60	283
11	CAAAAGGAGACGAGTTCTGGGAAC	GCAGTTGCTCTATGCCTCAAACAG	59	452
12	GCTCCAAAGAGTAGACATGTGTTTC	GACTGTTTTCGTGAGCACTTTC	58	250
13	CAACACTGTAGCCATTGCAACA	CGTATCCAAGAGGCCTAGCAAG	59	355
14	ACCATTGTCCCTCACATGTGC	CAGTGAAAGGCATGTGCTACAAAC	60	259
15	CAGGTCCTAGGCACAGGAACTG	ACATTCCTCAAATTGCTTGCCT	60	321

Πειραματική πορεία

Για το εξόνιο 1 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τελικό όγκο 25μl και αναμίχθηκαν σε σωληνάκι τα ακόλουθα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξονίου 1.

Υλικά	μL
DNA	1
Primer Forward	0,5
Primer Reverse	0,5
Buffer 10x (1.5mM MgCl ₂)	2,5
MgCl ₂	0,5
dNTPs 40x	0,5
Taq DNA πολυμεράση	0,2
H ₂ O	19,8
Συνολικός όγκος	25 μL

Για τα εξόνια 2 έως 15 πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με τελικό όγκο 25μl, στις οποίες αναμιγνύονται σε ένα σωληνάκι τα ακόλουθα (Πίνακας 3):

Πίνακας 3: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων 2 έως 15.

Υλικά	μL
DNA	1
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Buffer 10x (1.5mM MgCl ₂)	2,5
dNTPs 40x	0.625
Taq DNA πολυμεράση	0,2
H ₂ O	18,175
Συνολικός όγκος	25 μL

Για την αλληλούχηση των προϊόντων απαιτείται ποσότητα προϊόντος PCR τουλάχιστον 5-50ng/μl. Έτσι για να έχουμε επαρκές προϊόν, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική PCR με τελικό όγκο 50μl (Πίνακας 4), ενώ για τα εξόνια 4, 14 και 15 πραγματοποιήθηκε δεύτερη αντίδραση των 25 μl και ενώθηκε με την προηγούμενη.

Πίνακας 4: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων σε τελικό όγκο 50μl.

Υλικά	μL
DNA	2
Primer Forward	2
Primer Reverse	2
Buffer 10x (1.5mM MgCl ₂)	5
dNTPs 40x	1.25
Taq DNA πολυμεράση	0.4
H ₂ O	37.35
Συνολικός όγκος	50 μL

Ακολουθεί καλή ανάμειξη και στη συνέχεια τοποθετούμε τα σωληνάκια της PCR στον θερμικό κυκλοποιητή για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Αναλυτικά τα πρόγραμμα της PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *PTPN11* παρουσιάζονται στους πίνακες 5, 6.

Πίνακας 5: Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξονίου 1

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	5min	1
95°C	30sec	X34
64°C	40sec	
72 °C	45sec	
72 °C	10min	1

Πίνακας 6: Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων 2 έως 15

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	4min	1
95°C	40sec	X34
57-65°C	45sec	
72°C	45sec	
72°C	10min	1

Μετά το πέρας της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 1,5% w/v πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκε με αντιδραστήρια της εταιρίας Invitrogen.

Γ) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μέθοδος

Ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδάτινα διαλύματα και υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση τμημάτων DNA. Μόρια DNA μεγέθους 100bp έως 10kb μπορούν να διαχωριστούν σε πήκτωμα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος, το DNA που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, κινείται προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και διανύουν απόσταση αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεων τους [Shambrook et al., 1989].

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, τη στερεοδιαμόρφωση του DNA και την εφαρμοζόμενη τάση. Καθώς, ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους, μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πήκτωμα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Αυτό οφείλεται στην αγαρόζη, η οποία είναι ένας πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από D-γαλακτόζη και από ομάδες 3,6-

ανυδρο-L-γαλακτόζης, όσο αυξάνουμε τη συγκέντρωση της αγαρόζης, μειώνεται η κινητικότητα του DNA στο εσωτερικό του πηκτώματος. Επίσης, μόρια DNA ίδιου μοριακού βάρους, αλλά διαφορετικής στερεοδιαμόρφωσης (υπερελικωμένα, κυκλικά ή ευθύγραμμα) κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική μηχανική παρεμπόδιση της μετακίνησης κατά μήκος του πηκτώματος ανάλογα με την αναδίπλωση του μορίου στο χώρο. Τέλος, η εφαρμοζόμενη τάση σε συνδυασμό με τη διαφορά δυναμικού, επηρεάζουν την κινητικότητα των μορίων DNA. Έτσι, για να επιτύχουμε τη μέγιστη ανάλυση τμημάτων DNA μεγαλύτερων από 2Kb, πρέπει να εφαρμόσουμε στο πήκτωμα τάση όχι μεγαλύτερη από 5 V/cm (η μονάδα cm αναφέρεται στην απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων).

Υλικά

- 1 x TAE (Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στη διατήρηση της σταθερότητας του pH και περιέχει ιόντα απαραίτητα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας).
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Καθιστά το DNA ορατό στο υπεριώδες φως, καθώς δεσμεύεται στη διπλή του έλικα και έχει την ιδιότητα να διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία. Με αποτέλεσμα να οπτικοποιούνται οι ζώνες του DNA ενός πηκτώματος μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία).
- Χρωστική bromophenol blue.

Όργανα

- Οριζόντια ηλεκτροφορητική συσκευή
- Τροφοδοτικό ρεύματος
- Μηχάνημα φωτογράφησης πηκτώματος

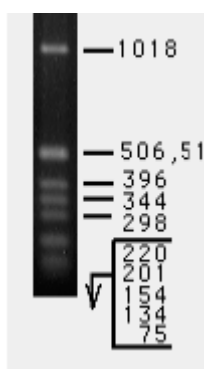
Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Σε 50ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (TAE 1x) διαλύεται με βρασμό η ποσότητα αγαρόζης που επιθυμούμε, στην προκειμένη περίπτωση 0,750gr. Στη συνέχεια, ρίχνουμε τη θερμοκρασία του διαλύματος και προστίθενται 5μl βρωμιούχου αιθιδίου, πριν η θερμοκρασία του διαλύματος φτάσει στο σημείο πήξης (~40°C). Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικά "πιάτα" ηλεκτροφόρησης συγκεκριμένων διαστάσεων.

Οι θέσεις υποδοχής των τμημάτων DNA σχηματίζονται από τα κτενάκια ηλεκτροφόρησης που τοποθετούνται στα "πιάτα" πριν την πήξη του διαλύματος και τέλος το πήκτωμα στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου μετά από 20 λεπτά.

Πορεία ηλεκτροφόρησης

Στη συνέχεια στα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται 5μl από το προϊόν της PCR και προστίθενται 4μl διαλύματος χρωστικής, το μπλε της βρωμοφαινόλης το οποίο περιέχει γλυκερόλη. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μη διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετείται μάρτυρας μοριακού βάρους, που έχει υποστεί πέψη με ένζυμα περιορισμού και δίνει ποικίλα τμήματα DNA γνωστών μεγεθών, προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται. Τέλος, το πήκτωμα τοποθετείται στις ειδικές οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, οι οποίες γεμίζονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x και η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος ρυθμίζεται στα 100V. Ακολουθεί η φωτογράφιση του πηκτώματος. Για την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών, Ladder DNA 1Kb της εταιρίας Invitrogen (Εικ. 6).



Εικόνα 6: Οι ζώνες που παρατηρούμε στο πήκτωμα αгарόζης, χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο δείκτη.

Δ) Καθαρισμός προϊόντων PCR

Μέθοδος

Το προϊόν της PCR είναι απαραίτητο να καθαριστεί από τα υπόλοιπα στοιχεία του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται, για να ακολουθήσει στην συνέχεια η αλληλούχησή του. Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR των εξονίων 2 έως 15 χρησιμοποιήσαμε το "PureLink Quick PCR Purification Kit" της εταιρίας Invitrogen (#417.04.31..03), ή το MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (#740609.250). Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες των αντίστοιχων εταιριών.

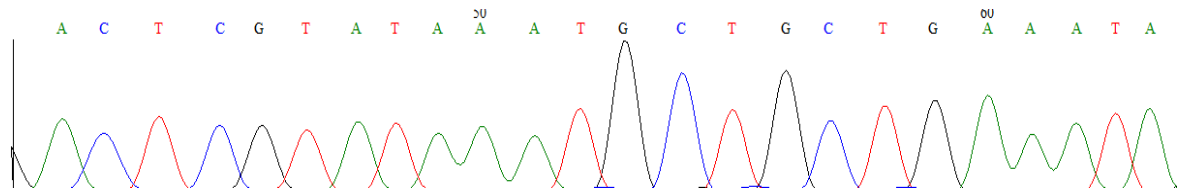
Ε) Αλληλούχηση του προϊόντος PCR

Μέθοδος

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιείται για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε πολυμορφισμούς μεταξύ των δειγμάτων DNA με τα οποία εργαζόμαστε πειραματικά, σε σχέση με τις ακολουθίες αναφοράς που υπάρχουν στις ψηφιακές βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Καταλαβαίνουμε επομένως πόσο σημαντικό είναι να πραγματοποιηθεί και να αξιολογηθεί σωστά η διαδικασία της αλληλούχησης, έτσι ώστε να βγάλουμε τα σωστά συμπεράσματα για τα δείγματα μας.

Πορεία της αλληλούχησης

- Η αλληλούχηση των καθαρισμένων προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο μοριακής βιολογίας CEMIA.
- Οι αλληλουχίες DNA, που μας εστάλησαν αναλύθηκαν σε μορφή χρωματογραφήματος με τη χρήση του προγράμματος BioEdit7 [Hall, 2011]. Πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της αλληλούχησης των νουκλεοτιδίων τόσο από τον εμπρόσθιο, όσο και από τον αντίστροφο εκκινητή του κάθε εξονίου, με σκοπό την επαλήθευση κάθε νουκλεοτιδίου της αλυσίδας δύο φορές, έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη που μπορεί να πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης. Μία χαρακτηριστική εικόνα αλληλούχησης φαίνεται στην Εικ. 7.



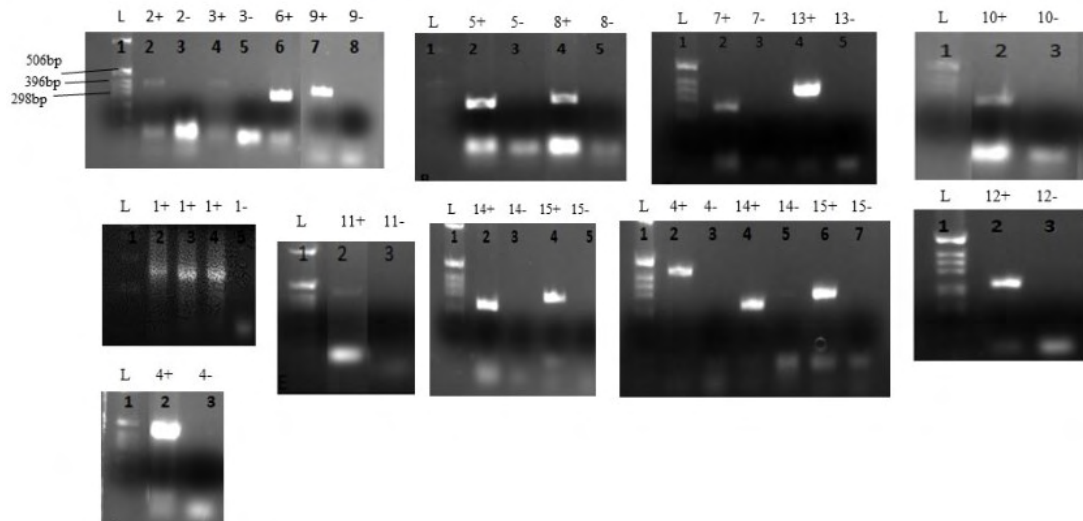
Εικόνα 7: Ενδεικτική ανάγνωση των νουκλεοτιδίων σε μορφή χρωματογραφήματος.

- Με βάση τα αποτελέσματα από την αλληλούχηση των εξονίων, έγινε σύγκριση ανάμεσα στην ακολουθία αναφοράς για το γονίδιο *PTPN11* (Gene ID: 5781) και τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των προϊόντων PCR.
- Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο Blast στο NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Η GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), είναι η ψηφιακή βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών (NIH – National Institute of Health) στην οποία βρίσκονται καταχωρημένες όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες DNA και δίνει τη δυνατότητα της σύγκρισης δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

3. Αποτελέσματα

A) Ενίσχυση με PCR των εξονίων του γονιδίου *PTPN11*

Η μελέτη αφορά μία 63χρονη ασθενή, που τα κλινικά της χαρακτηριστικά, δηλαδή η παρουσία πολλαπλών εφηλίδων, η ύπαρξη αρτηριακής υπέρτασης και το εγκεφαλικό μελάνωμα, συνδέονται με το LS. Με στόχο τον εντοπισμό μεταλλάξεων που συνδέονται με το LS και θα οδηγήσουν στην επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης. Έγινε αλληλούχηση των εξονίων του γονιδίου *PTPN11* από DNA που απομονώθηκε από το αίμα της ασθενούς. Αρχικά τα εξόνια ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης των εξονίων αποτυπώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% W/V και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω (Εικ. 8), ενώ στη συνέχεια καθαρίστηκαν προκειμένου να ακολουθήσει η αλληλούχηση τους. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων 1 έως 15 φαίνονται αναλυτικά στις Μεθόδους στους Πίνακες 2, 3 και 4, ενώ οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων φαίνονται στους Πίνακες 5 και 6. Το μέγεθος των προϊόντων που περιμένουμε αναφέρεται στον Πίνακα 1. Στην Εικόνα 8 (A έως K) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών (ladder) που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 8: Πηκτώματα αγαρόζης όπου εμφανίζονται τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR για τα εξόνια 1 έως 15. Συμβολισμοί: L → Ladder, (+): προϊόν PCR, (-) αρνητικός έλεγχος αντίδρασης. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα εξόνια που ενισχύθηκαν.

B) Σύγκριση αλληλουχίας του γονιδίου *PTPN11* της ασθενούς με την αλληλουχία αναφοράς

Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, αυτά στάλθηκαν στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας CEMIA, για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit7 αξιολογώντας τα χρωματογραφήματα (Εικ. 7). Όπως αναλύθηκε παραπάνω, με αυτό τον τρόπο κατέστη δυνατή η ανασκευή της αλληλουχίας των εξονίων του γονιδίου *PTPN11* της ασθενούς, η οποία παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα σε σύγκριση με την ακολουθία αναφοράς του γονιδίου. Μετά από τη σύγκριση των δύο ακολουθιών με το πρόγραμμα Blast, διαπιστώσαμε πως δεν υπάρχει πολυμορφισμός στα εξόνια 2 έως 15 (Εικ. 9), ενώ για το εξόνιο 1 το αποτέλεσμα της αλληλούχησης δεν ήταν αξιόπιστο. Παρόλο που ακολουθήσαμε την ίδια στρατηγική όσον αφορά την ενίσχυση του εξονίου 1 με την PCR και παρά την αλλαγή των εκκινήτων για αυτό το εξόνιο δεν επετεύχθη η αξιόπιστη αλληλούχηση του. Πάντως, μέχρι τώρα δεν έχει αναφερθεί καμία μετάλλαξη σε άτομα με LS σε αυτό το εξόνιο, το οποίο περιλαμβάνει μόλις 14 νουκλεοτίδια κωδικής αλληλουχίας.

Download Graphics					A) εξόνιο 2
Sequence ID: Icl Query_239985 Length: 407 Number of Matches: 1					
Range 1: 2 to 406 Graphics					Next Match Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
749 bits(405)	0.0	405/405(100%)	0/405(0%)	Plus/Plus	
Query 1	TACTGAATCCCAGGTCTCTACCaagggaaagggcagggaggaggcattgaccaagggagaag	60			
Sbjct 2	TACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAGGGAAAGGCAGGGAGGAGGCATTGACCAAGGAGAAG	61			
Query 61	agggggaaagggacaggggaaggTCTTGATTGTATTTCTAAAAATTTCTACTCTGCTCAT	120			
Sbjct 62	AGGGGGAAGGGACAGGGGAAGGTCTTGATTGTATTTCTAAAAATTTCTACTCTGCTCAT	121			
Query 121	AATGCGTCTTAGCTGTGTGTGTGTGGAAAGTAGTGCTGACAGTGTCTTGtttttttAITA	180			
Sbjct 122	AATGCGTCTTAGCTGTGTGTGTGTGGAAAGTAGTGCTGACAGTGTCTTGTTTTTTAITA	181			
Query 181	CTTACTTTGTCTTTCTTTTTAAGATGGTTTCACCCAAATATCACTGGTGTGGAGGCAGAA	240			
Sbjct 182	CTTACTTTGTCTTTCTTTTTAAGATGGTTTCACCCAAATATCACTGGTGTGGAGGCAGAA	241			
Query 241	AACCTACTGTTGACAAGAGGAGTTGATGGCAGTTTTTTGGCAAGGCCTAGTAAAAGTAAC	300			
Sbjct 242	AACCTACTGTTGACAAGAGGAGTTGATGGCAGTTTTTTGGCAAGGCCTAGTAAAAGTAAC	301			
Query 301	CCTGGAGACTTCACACTTTCCGTTAGGTAAGTTGGAATGAAAAGAGAGGATCCTGAGAGT	360			
Sbjct 302	CCTGGAGACTTCACACTTTCCGTTAGGTAAGTTGGAATGAAAAGAGAGGATCCTGAGAGT	361			
Query 361	GTTTTCTAGGTAGGAAGTGGTAAAACCATGCTTGGATAGCTTGCT	405			
Sbjct 362	GTTTTCTAGGTAGGAAGTGGTAAAACCATGCTTGGATAGCTTGCT	406			

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_198933 Length: 282 Number of Matches: 1

E) εξόνιο 6

Range 1: 10 to 274 Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
490 bits(265)	2e-143	265/265(100%)	0/265(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCGTTTTCTGTAATAATTTTCTTTATTTTACATCAACTGCTGACTCGATCAGCCCCTTA	60		
Sbjct 10	ACCGTTTTCTGTAATAATTTTCTTTATTTTACATCAACTGCTGACTCGATCAGCCCCTTA	69		
Query 61	ACACGACTCGTATAAATGCTGCTGAAATAGAAAGCAGAGTTCGAGAACTAAGCAAATTAG	120		
Sbjct 70	ACACGACTCGTATAAATGCTGCTGAAATAGAAAGCAGAGTTCGAGAACTAAGCAAATTAG	129		
Query 121	CTGAGACCACAGATAAAGTCAAACAAGGCTTTTGGGAAGAATTTGAGGTAAGTTATTA	180		
Sbjct 130	CTGAGACCACAGATAAAGTCAAACAAGGCTTTTGGGAAGAATTTGAGGTAAGTTATTA	189		
Query 181	AAACTGTTTTACGTGAGTTGTTATATCCTATTTTTAGTGGAGGAGAAGTGTCTTGTG	240		
Sbjct 190	AAACTGTTTTACGTGAGTTGTTATATCCTATTTTTAGTGGAGGAGAAGTGTCTTGTG	249		
Query 241	TTTGAATTGGACCTGAGAGACTTG	265		
Sbjct 250	TTTGAATTGGACCTGAGAGACTTG	274		

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_229689 Length: 271 Number of Matches: 1

Z) εξόνιο 7

Range 1: 1 to 271 Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
501 bits(271)	7e-147	271/271(100%)	0/271(0%)	Plus/Plus
Query 2	GAACATTTCCCTAGGATGAATTCCTTAAAGAAGTAATGCTGATCCAGGC	61		
Sbjct 1	GAACATTTCCCTAGGATGAATTCCTTAAAGAAGTAATGCTGATCCAGGC	60		
Query 62	CTGTGACTCTTTGACACGTAATAAATTTGACTTTTTCTTTCTTTCCAGACACTACAACAAC	121		
Sbjct 61	CTGTGACTCTTTGACACGTAATAAATTTGACTTTTTCTTTCTTTCCAGACACTACAACAAC	120		
Query 122	AGGAGTGCAAACTTCTCTACAGCCGAAAAGAGGGTCAAAGGCAAG	181		
Sbjct 121	AGGAGTGCAAACTTCTCTACAGCCGAAAAGAGGGTCAAAGGCAAG	180		
Query 182	atagatatataaaaaCATCCTGCCCTGTAAGTATCAATATTCGCTCAGTAATAGTCACTCT	241		
Sbjct 181	ATAGATATAAAAAATCCTGCCCTGTAAGTATCAATATTCGCTCAGTAATAGTCACTCT	240		
Query 242	IGGAGATTTTGATTCTAGCACCTCTGTACC	272		
Sbjct 241	IGGAGATTTTGATTCTAGCACCTCTGTACC	271		

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_245183 Length: 354 Number of Matches: 1

H) εξόνιο 8

Range 1: 5 to 354 Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	350/350(100%)	0/350(0%)	Plus/Plus
Query 2	GACATCAGGCAGTGTTCACGTTACTGTTTTGCTTACCTGGGCTTTAATTTTTATGTG	61		
Sbjct 5	GACATCAGGCAGTGTTCACGTTACTGTTTTGCTTACCTGGGCTTTAATTTTTATGTG	64		
Query 62	ttttttCAATCAITGAATGAACAAAACCTTGGACTAGGCTGGGGAGTAAGTGAAT	121		
Sbjct 65	TTTTTCAATCAITGAATGAACAAAACCTTGGACTAGGCTGGGGAGTAAGTGAAT	124		
Query 122	GTTTTTCCCTGAAGCAGTCCAGGACTTATGTGACCGTGGTCTCTTTTCTTCTAGTTGAT	181		
Sbjct 125	GTTTTTCCCTGAAGCAGTCCAGGACTTATGTGACCGTGGTCTCTTTTCTTCTAGTTGAT	184		
Query 182	CATACCAGGGTGTCTACACGATGGTGATCCCAATGAGCCTGTTTCAGATTACATCAAT	241		
Sbjct 185	CATACCAGGGTGTCTACACGATGGTGATCCCAATGAGCCTGTTTCAGATTACATCAAT	244		
Query 242	GCAAATATCATCATGGTAAGCTTTGCTTTTACAGTGTCTTCTGACCATACATTTCTAGC	301		
Sbjct 245	GCAAATATCATCATGGTAAGCTTTGCTTTTACAGTGTCTTCTGACCATACATTTCTAGC	304		
Query 302	CTATTTTGTATTTTAAATCCTTCCCATGTCTGAAAGTAACTTTAAGG	351		
Sbjct 305	CTATTTTGTATTTTAAATCCTTCCCATGTCTGAAAGTAACTTTAAGG	354		

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_79689 Length: 357 Number of Matches: 1 Θ) εξόνιο 9

Range 1: 11 to 352 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
632 bits(342)	0.0	342/342(100%)	0/342(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTTTTCACAGTGTCTTCTGACCATACATTTCTAGCCTATTTTTGTATTTTAAATCCTTCC			60
Sbjct 11	CTTTTCACAGTGTCTTCTGACCATACATTTCTAGCCTATTTTTGTATTTTAAATCCTTCC			70
Query 61	TCATGTCTGAAAGTAACTTTAAGGTGTTTGAAGGATTTTCTTCTAAATTTCTAGCCTG			120
Sbjct 71	TCATGTCTGAAAGTAACTTTAAGGTGTTTGAAGGATTTTCTTCTAAATTTCTAGCCTG			130
Query 121	AATTTGAAACCAAGTGCAACAATTCAAAGCCCAAAAAGAGTTACATTGCCACACAAGGCT			180
Sbjct 131	AATTTGAAACCAAGTGCAACAATTCAAAGCCCAAAAAGAGTTACATTGCCACACAAGGCT			190
Query 181	GCCTGCAAAACACGGTGAATGACTTTTGGCGGATGGTGTCCAAGAAAACCTCCCGAGTGA			240
Sbjct 191	GCCTGCAAAACACGGTGAATGACTTTTGGCGGATGGTGTCCAAGAAAACCTCCCGAGTGA			250
Query 241	TTGTCATGACACGAAAGAGTGGAGAGAGGAAAGGTAATCACAGAAACTTCTTTTCTG			300
Sbjct 251	TTGTCATGACACGAAAGAGTGGAGAGAGGAAAGGTAATCACAGAAACTTCTTTTCTG			310
Query 301	CTAAACTGTTTTTAAAGTATCAGACATGTCAGATTGGCCATG 342			
Sbjct 311	CTAAACTGTTTTTAAAGTATCAGACATGTCAGATTGGCCATG 352			

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_138389 Length: 284 Number of Matches: 1 I) εξόνιο 10

Range 1: 1 to 283 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
523 bits(283)	2e-153	283/283(100%)	0/283(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTGCTTGTITAGGCTTTTATTTTTCAGAGTTCACAGAATT			60
Sbjct 1	GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTGCTTGTITAGGCTTTTATTTTTCAGAGTTCACAGAATT			60
Query 61	AACTTTCCTTTTTCTGATCTCTTCCAGAGTAAATGTGTCAAATACTGGCCTGATGAGTA			120
Sbjct 61	AACTTTCCTTTTTCTGATCTCTTCCAGAGTAAATGTGTCAAATACTGGCCTGATGAGTA			120
Query 121	TGCTCTAAAAGAAATATGGCGTCATGCGTGTITAGGAACGTCAAAGAAAAGCGCCGCTCATGA			180
Sbjct 121	TGCTCTAAAAGAAATATGGCGTCATGCGTGTITAGGAACGTCAAAGAAAAGCGCCGCTCATGA			180
Query 181	CTATACGCTAAGAGAACTTAAACTTTCAAAGGTTGGACAAGTAAGTATATTTGTCGTATTC			240
Sbjct 181	CTATACGCTAAGAGAACTTAAACTTTCAAAGGTTGGACAAGTAAGTATATTTGTCGTATTC			240
Query 241	TAGAGACTTTGGGAACCTGTTGATGGTGTGTAGGAATTCAGGGT 283			
Sbjct 241	TAGAGACTTTGGGAACCTGTTGATGGTGTGTAGGAATTCAGGGT 283			

Download Graphics

Sequence ID: Icl|Query_180743 Length: 454 Number of Matches: 1 K) εξόνιο 11

Range 1: 2 to 444 [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
819 bits(443)	0.0	443/443(100%)	0/443(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAAAGGAGACGAGTCTGGGAACCTCACGAAGAGGACCTTTCAGTGGAACTGGGGAGA			60
Sbjct 2	CAAAGGAGACGAGTCTGGGAACCTCACGAAGAGGACCTTTCAGTGGAACTGGGGAGA			61
Query 61	TTCTTCTCTCCATTTGGATTTAGGAAAGCTTAGAACCGGGTGATTCTCAACCTCTTG			120
Sbjct 62	TTCTTCTCTCCATTTGGATTTAGGAAAGCTTAGAACCGGGTGATTCTCAACCTCTTG			121
Query 121	ATTTAATTAATCTTTTCTGGTTTTCTTGGCTTACTCCAGGGGAATACGGAGAGAACG			180
Sbjct 122	ATTTAATTAATCTTTTCTGGTTTTCTTGGCTTACTCCAGGGGAATACGGAGAGAACG			181
Query 181	GTCGGCAATACCACTTTCGGACCTGGCCGGACCAGGGCTGCCAGCGACCTTGGGGC			240
Sbjct 182	GTCGGCAATACCACTTTCGGACCTGGCCGGACCAGGGCTGCCAGCGACCTTGGGGC			241
Query 241	GTGCTGGACTTCTGGAGGAGGTGCACCATAAGCAGGAGAGCATCATGGATGCAGGGCCG			300
Sbjct 242	GTGCTGGACTTCTGGAGGAGGTGCACCATAAGCAGGAGAGCATCATGGATGCAGGGCCG			301
Query 301	GTCGTGGTGCCTGCAGGTGACAGCTCCTGCTGCCCTTAGGCCACAGCCTGTCCCTGT			360
Sbjct 302	GTCGTGGTGCCTGCAGGTGACAGCTCCTGCTGCCCTTAGGCCACAGCCTGTCCCTGT			361
Query 361	CTCCTAGCCCCAGGGCTTGTCTTTACCTACCCACTCCTAGCTCTTTAACTGTAGGAAGA			420
Sbjct 362	CTCCTAGCCCCAGGGCTTGTCTTTACCTACCCACTCCTAGCTCTTTAACTGTAGGAAGA			421
Query 421	ATTTAATACTGTTTGGGCATA 443			
Sbjct 422	ATTTAATACTGTTTGGGCATA 444			

Download [Graphics](#)

Sequence ID: lcl|Query_87867 Length: 255 Number of Matches: 1 Λ) εξόνιο 12

Range 1: 5 to 254 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
462 bits(250)	3e-135	250/250(100%)	0/250(0%)	Plus/Plus
Query 2		GCTCCAAGAGTAGACATTGTTTCTGTGTGATATTAATGGCTTGGTTTIGAGTCTGAAACC		61
Sbjct 5		GCTCCAAGAGTAGACATTGTTTCTGTGTGATATTAATGGCTTGGTTTIGAGTCTGAAACC		64
Query 62		CCCATGAATGATTCGTGTGCTCCCTGCTTTTGTCTCTGCCCCGAGTCTGGAAITGGC		121
Sbjct 65		CCCATGAATGATTCGTGTGCTCCCTGCTTTTGTCTCTGCCCCGAGTCTGGAAITGGC		124
Query 122		CGGACGGGACGTTCAITGTGATTGATTAATCTATTGACATCATCAGAGAGAAAGTGGG		181
Sbjct 125		CGGACGGGACGTTCAITGTGATTGATTAATCTATTGACATCATCAGAGAGAAAGTGGG		184
Query 182		TCATCTGGTGGGCAAGAAGCGACAGTTTCTGTTTTAGTTTTATGGAAGGAAAGTGTCTAC		241
Sbjct 185		TCATCTGGTGGGCAAGAAGCGACAGTTTCTGTTTTAGTTTTATGGAAGGAAAGTGTCTAC		244
Query 242		GAAAAACAGTC 251		
Sbjct 245		GAAAAACAGTC 254		

Download [Graphics](#)

Sequence ID: lcl|Query_65133 Length: 365 Number of Matches: 1 Μ) εξόνιο 13

Range 1: 16 to 354 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
627 bits(339)	0.0	339/339(100%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 1		TAGCCATTGCAACATGCTCAGTTAAAACAGCAAAGACTAAATTAGCATTGCTCTGAGTC		60
Sbjct 16		TAGCCATTGCAACATGCTCAGTTAAAACAGCAAAGACTAAATTAGCATTGCTCTGAGTC		75
Query 61		CACTAAAAGTTGTGCATTAAACAACCTCATCCTGGCTCTGCAGTTTCTCTTTAATCTTCA		120
Sbjct 76		CACTAAAAGTTGTGCATTAAACAACCTCATCCTGGCTCTGCAGTTTCTCTTTAATCTTCA		135
Query 121		TGATGTTTCTTCGTAGGTGTGACTGCGATATTGACGTTCCCAAAACCATCCAGATGGT		180
Sbjct 136		TGATGTTTCTTCGTAGGTGTGACTGCGATATTGACGTTCCCAAAACCATCCAGATGGT		195
Query 181		GCGGTCTCAGAGGTGAGGATGGTCCAGACAGAAGCACAGTACCGATTATCTATATGGC		240
Sbjct 196		GCGGTCTCAGAGGTGAGGATGGTCCAGACAGAAGCACAGTACCGATTATCTATATGGC		255
Query 241		GGTCCAGCATTATATTGAAACACTACAGCGCAGGATTGAAGAAGAGCAGGTACCAGCCTG		300
Sbjct 256		GGTCCAGCATTATATTGAAACACTACAGCGCAGGATTGAAGAAGAGCAGGTACCAGCCTG		315
Query 301		AGGGCTGGCATGCGGATTCTCATTCTCTTGTAGGCCTC 339		
Sbjct 316		AGGGCTGGCATGCGGATTCTCATTCTCTTGTAGGCCTC 354		

Download [Graphics](#)

Sequence ID: lcl|Query_47775 Length: 263 Number of Matches: 1 Ν) εξόνιο 14

Range 1: 5 to 254 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
462 bits(250)	3e-135	250/250(100%)	0/250(0%)	Plus/Plus
Query 2		ACCATTGTCCTCACATGTGCACTCTTCCAAATTTTCAGAAAAGCAAGAGGAAGGGCAG		61
Sbjct 5		ACCATTGTCCTCACATGTGCACTCTTCCAAATTTTCAGAAAAGCAAGAGGAAGGGCAG		64
Query 62		AATATACAAATATTAAAGTATTCTTAGCGGACCAGACGAGTGGAGATCAGAGCCCTCTCC		121
Sbjct 65		AATATACAAATATTAAAGTATTCTTAGCGGACCAGACGAGTGGAGATCAGAGCCCTCTCC		124
Query 122		CGCCTTGTACTCCAACGCCACCCTGTGCAGAGTAAGTAGTGTGAAAGGAAATCTTTTTA		181
Sbjct 125		CGCCTTGTACTCCAACGCCACCCTGTGCAGAGTAAGTAGTGTGAAAGGAAATCTTTTTA		184
Query 182		CCTGGTCAITGGTGGTTTAAAAAGGTTTAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAGTTTG		241
Sbjct 185		CCTGGTCAITGGTGGTTTAAAAAGGTTTAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAGTTTG		244
Query 242		TAGCACATGC 251		
Sbjct 245		TAGCACATGC 254		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
593 bits(321)	2e-174	321/321(100%)	0/321(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAGGTCCTAGGCACAGGAACTGTGTCGTACCAATCTGGTGCCCAAGAAATGATGATG	60		
Sbjct 6	CAGGTCCTAGGCACAGGAACTGTGTCGTACCAATCTGGTGCCCAAGAAATGATGATG	65		
Query 61	TGTTTTATAGATATCATGTAAGCTTAAACAGCGTGGTCTACATTTTTGTAAATGTCCTTC	120		
Sbjct 66	TGTTTTATAGATATCATGTAAGCTTAAACAGCGTGGTCTACATTTTTGTAAATGTCCTTC	125		
Query 121	TTTTTCITTTCTCTCCAGAATGAGAGAAGACAGTCTAGAGTCTATGAAAACGTGGGCT	180		
Sbjct 126	TTTTTCITTTCTCTCCAGAATGAGAGAAGACAGTCTAGAGTCTATGAAAACGTGGGCT	185		
Query 181	GATGCAACAGCAGAAAAGTTTCAGATGAGAAAACCTGCCAAAACCTCAGCACAGAAATAG	240		
Sbjct 186	GATGCAACAGCAGAAAAGTTTCAGATGAGAAAACCTGCCAAAACCTCAGCACAGAAATAG	245		
Query 241	GTATTTAAATGCAAGTGTCTATGGTTAAATGTTTATATAAATGGCAGTATTTTTAAGC	300		
Sbjct 246	GTATTTAAATGCAAGTGTCTATGGTTAAATGTTTATATAAATGGCAGTATTTTTAAGC	305		
Query 301	AGGCAAGCAATTTGGGAATGT	321		
Sbjct 306	AGGCAAGCAATTTGGGAATGT	326		

Εικόνα 9: Αποτέλεσμα μετά από Blast των εξονίων 2 έως 15 (Α έως Ξ αντίστοιχα) του γονιδίου PTPN11 της ασθενούς με την ακολουθία αναφοράς.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η μοριακή διάγνωση του LS μέσω του γονιδίου *PTPN11*, για μία ασθενή 63 ετών. Η συγκεκριμένη ασθενής, εξετάστηκε κλινικά στο Θριάσιο Γενικό Νοσοκομείο και διαγνώστηκε με κακοήθες εγκεφαλικό μελάνωμα, διάσπαρτες εφηλίδες στο δέρμα στο πρόσωπο και σε άλλα σημεία του σώματος, καθώς και ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης. Επιπλέον, μία κόρη της ασθενούς φέρει παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με τους Voron et al., [1976] και τα προτεινόμενα κλινικά κριτήρια για τη διάγνωση του LS, ο ασθενής πρέπει να φέρει πολλαπλές εφηλίδες σε συνδυασμό με δύο ακόμη από τα κυριότερα γνωρίσματα του συνδρόμου όπως: δυσμορφίες στο πρόσωπο, καρδιακά προβλήματα, αναπτυξιακά προβλήματα, σκελετικές ανωμαλίες, προβλήματα ακοής, ανωμαλίες γενετικών και ουροφόρων οδών, νευρολογικές ανωμαλίες και τέλος την εμφάνιση καρκίνου. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ασθενής πληρούσε τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια και το πιθανότερο σενάριο είναι να πάσχει από το LS. Ωστόσο, απαιτείται και η μοριακή διάγνωση του συνδρόμου, έτσι ώστε να επικυρωθεί η κλινική διάγνωση, καθώς το LS συμπεριλαμβάνεται στα NCFCs (neuro-cardio facial-cutaneous syndromes), που αποτελεί μία ομάδα συνδρόμων με επικαλυπτόμενα κλινικά χαρακτηριστικά.

Το LS προκαλείται από σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες μέχρι τώρα έχουν εντοπιστεί σε τρία πιθανά γονίδια, το *PTPN11*, το *RAF1* και το *BRAF*. Το 90% των ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με LS, φέρει μετάλλαξη σε εξόνια του γονιδίου *PTPN11* [Sarkozy et al., 2004]. Για αυτό το λόγο επιλέξαμε, πως για τη μοριακή διάγνωση του συνδρόμου θα έπρεπε να προχωρήσουμε στην αλληλούχηση των εξονίων του γονιδίου *PTPN11* της ασθενούς, η οποία είναι και η κύρια στρατηγική που ακολουθείται σε όλες της περιπτώσεις. Εάν δεν εντοπίζεται κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11*, τότε η ανάλυση προχωρά στην αλληλούχηση του γονιδίου *RAF1* και τέλος του γονιδίου *BRAF* [Gelb and Tartaglia, 2010].

Το γονίδιο *PTPN11* αποτελείται από 16 εξόνια, από τα οποία τα 15 πρώτα κωδικοποιούν αμινοξέα, ενώ το εξόνιο 16 περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της 3' αμετάφραστης περιοχής. Στην παρούσα εργασία προχωρήσαμε στην ενίσχυση και αλληλούχηση των εξονίων 1 έως 15 του γονιδίου, με σκοπό τον εντοπισμό πολυμορφισμού στο γενετικό υλικό της ασθενούς που θα τη συσχέτιζε και σε μοριακό

επίπεδο με το LS. Τα προϊόντα PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση των εξονίων αποτυπώνονται στην Εικόνα 10 και παρατηρούμε πως η ενίσχυση αφορούσε τα επιθυμητά τμήματα DNA, καθώς έχουν το μέγεθος που αναμέναμε (Πιν. 1). Αξίζει να σημειωθεί πως οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα εξόνια 2 έως 15 βρίσκονταν σε απόσταση τουλάχιστον 50 βάσεων από το πρώτο νουκλεοτίδιο του εξονίου, όπως φαίνεται και στο Παράρτημα, με αποτέλεσμα να ελέγχονται και τα όρια ιντρονίων-εξονίων.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου ακολούθησε ο καθαρισμός τους και η αλληλούχηση η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας Cemía. Τα αποτελέσματα που μας εστάλησαν, αξιολογήθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit7. Τέλος, προχωρήσαμε στη σύνθεση της αλληλουχίας των συγκεκριμένων εξονίων για το γονίδιο *PTPN11* της ασθενούς όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα. Αντίθετα, για το εξόνιο 1 η αλληλούχηση δεν ήταν αξιόπιστη με αποτέλεσμα να μην μπορούσαμε να διαπιστώσουμε την νουκλεοτιδική αλληλουχία του συγκεκριμένου εξονίου, της ασθενούς. Θα πρέπει όμως να τονιστεί, πως δεν έχει συσχετιστεί μέχρι τώρα κάποια μετάλλαξη στο εξόνιο 1 με το LS. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί 4 αμινοξέα για την υπομονάδα N-SH2 της πρωτεΐνης, ενώ όλες οι μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το LS εντοπίζονται σε αμινοξέα της υπομονάδας του PTP και πρόκειται για τα εξόνια 6 έως 13 (Εικ. 5).

Η ανάλυση, η οποία έγινε με σύγκριση της αλληλουχίας της ασθενούς, με την ακολουθία αναφοράς που βρίσκεται στο NCBI, μέσω του αλγορίθμου Blast (Εικόνα 9) έδειξε ότι δεν υπάρχει κάποιος πολυμορφισμός στο γονίδιο *PTPN11* της ασθενούς, καθώς υπάρχει πλήρης ταύτιση μεταξύ των δύο αλληλουχιών όσον αφορά τα εξόνια 2 έως 15. Δηλαδή δεν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση με το LS ούτε με κάποιο άλλο σύνδρομο, το οποίο μπορεί να προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11*. Λόγω των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων και επειδή δεν εντοπίστηκε κάποια μετάλλαξη, συμπεραίνουμε πως για τη μοριακή επιβεβαίωση του συνδρόμου θα πρέπει να ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε για το *PTPN11* και για τα υπόλοιπα δύο γονίδια που σχετίζονται με το LS (*RAF1* και *BRAF*).

Όπως έχει παρατηρηθεί έως τώρα, σε ασθενείς με κλινική διάγνωση του LS και χωρίς μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11* ακολουθείται η παραπάνω τακτική. Σύμφωνα με την έρευνα των Pandit et al., [2007], σε έξι ασθενείς που δεν έφεραν μεταλλάξεις

στο γονίδιο *PTPN11*, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο *RAF1* και στο *BRAF* [Sarkozy et al., 2009]. Επίσης, σύμφωνα με την έρευνα των Seishima et al., [2007] συνδέθηκε ασθενής με μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF* με το κλινικό χαρακτηριστικό του κακοήθους μελανώματος, που είναι ένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσίασε η ασθενής της παρούσας έρευνας. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως σε ασθενείς που ελέγχονται μοριακά μόνο στο γονίδιο *PTPN11*, υπάρχει πιθανότητα να μην εντοπιστούν πολυμορφισμοί, όπως στην έρευνα των Sarkozy et al., [2004], όπου από τους 30 ασθενείς που ελέγχθηκαν στους 3 δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη. Επίσης, σε έρευνα 84 ατόμων για συσχέτιση καρδιακών προβλημάτων με μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11* [Sarkozy et al., 2003], παρατηρήθηκε πως μόνο 11 ασθενείς έφεραν μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο και έπασχαν από LS, ενώ 50 ασθενείς δεν έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *PTPN11*, οι υπόλοιποι 23 ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTPN11* έπασχαν από το NS.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στα στοιχεία της κλινικής διάγνωσης του ασθενούς, καθώς λόγω της επικάλυψης κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ των συνδρόμων, μπορεί να οδηγήσει εξ' αρχής σε λανθασμένα συμπεράσματα καθώς στη ρύθμιση του μονοπατιού RAS/MAPK, εκτός της SHP2, λαμβάνουν μέρος πολλές ακόμη πρωτεΐνες (Εικ. 2) όπως η Grb2, Sos, NF1. Έτσι, μεταλλάξεις στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν σαν αντίκτυπο φαινοτυπικές ομοιότητες με το LS. Σύμφωνα με την έρευνα των Wu et al. (1996), σε μία ασθενή που είχε σχετιστεί κλινικά με το LS, εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *NF1*, συνδέοντας μοριακά την ασθενή με το σύνδρομο NF1.

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως δεν έγινε μοριακή ανάλυση των ιντρονίων του γονιδίου *PTPN11*, αν και ακόμη δεν έχει συσχετιστεί μοριακά κάποια τέτοια μετάλλαξη. Τέλος, επειδή η ασθενής εμφάνισε ένα μπλε σπίλο στη ρίνα, ίσως υπάρχει κλινική συσχέτιση της ασθενούς με το σύνδρομο Casey. Το συγκεκριμένο σύνδρομο, συνδέεται κλινικά και με την παρουσία εφηλίδων, καρδιακών διαταραχών και συγγενών σπύλων. Όμως, λόγω της απουσίας ενδοκρινικών διαταραχών στην ασθενή, που είναι ένα βασικό κλινικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου, η ασθενής συνδέθηκε κλινικά με το LS.

Συμπερασματικά, όπως προέκυψε από την ανάλυση, στη συγκεκριμένη ασθενή δεν ανιχνεύτηκε καμία μετάλλαξη στην κωδική περιοχή του γονιδίου *PTPN11*. Ως εκ

τούτου η παρούσα μοριακή ανάλυση, η οποία εντοπίζει περίπου 90% των καταγεγραμμένων μεταλλάξεων που σχετίζονται με το σύνδρομο LEOPARD, δεν ανίχνευσε μεταλλάξεις υπεύθυνες για την εμφάνιση του συνδρόμου.

5. Βιβλιογραφία

- Alexandre J., Raymond E., Armand J.P. (1999): Rapamycin and CCI-779. *Bull Cancer* 86: 808-811.
- Alfieri P., Cesarini L., Zampino G., Pantaleoni F., Selicorni A., et al. (2008): Visual function in Noonan and LEOPARD syndrome. *Neuropediatrics* 39: 335-340.
- Araki T., Mohi M.G., Ismat FA., Bronson R.T., Williams I.R., Kutok J.L., Yang W., Pao L.I., Gilliland D.G., Epstein J.A., Neel B.G. (2004): Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage- dependent effects of *Ptpn11* mutation. *Nat Med* 10: 849-857.
- Conti E., Dottorini T., Sarkozy A., Tiller G.E., Esposito G., Pizzuti A., Dallapiccola B. (2003): A novel *PTPN11* mutation in LEOPARD syndrome. *Hum Mut Mutation in Brief* 21:645.
- Denayer E., de Ravel T., Legius E (2008): Clinical a molecular aspects of RAS related disorders. *J Med Genet* 45: 695-703.
- Digilio M.C., Conti E., Sarkozy A., Mingarelli R., Dottorini T., Marino B., Pizzuti A., Dallapiccola B. (2002): Grouping of multiple-lentiginis/LEOPARD and Noonan syndromes on the *PTPN11* gene. *Am J Hum Genet* 71: 389-394.
- Digilio M.C., Sarkozy A., de Zorzi A., Pacileo G., Limongelli G., et al. (2006): LEOPARD syndrome: clinical diagnosis in the first year of life. *Am J Med Genet A* 140: 740-746.
- Edouard T., Combier J.P., Nedelec A., Bel-Vialar S., Metrich M., Conte-Auriol F., et al. (2010): Functional Effects of *PTPN11* (SHP2) Mutations Causing LEOPARD Syndrome on Epidermal Growth Factor-Induced Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase 3 Signaling. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 30: 2498-2507.
- Feng G.S. (1999): Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res* 253:47-54.
- Frame S., Cohen P. (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359: 1-16.
- Gelb B.D., Tartaglia M. (2010): LEOPARD Syndrome. *University of Washington*.
- Gelb B.D, Tartaglia M. (2006): Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2: R220-R226
- Gorlin R.J., Anderson R.C., Blaw M. (1969): Multiple lentiginis syndrome. *Am J Dis Child* 17: 652-662.
- Gorlin R.J., Anderson R.C., Blaw M. (1971): The leopard (multiple lentiginis) syndrome revisited. *Birth Orig Artic Ser* 7: 110-115.
- Gorlin R.J., Cohen M.M., Levn LS. (1990): Leopard syndrome. In: Gorlin R.J., Cohen M.M., Levn LS (editors). Syndrome of the head and neck. *Oxford University Press* pp: 461-464.

- Hall T. (2011): BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2: 60-61.
- Hanna N., Montagner A., Lee W.H., Miteva M., Vidal M., Vidaud M., Parfait B. (2006): Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on Gab1. *FEBS Lett* 580: 2477-2482.
- Hof P., Pluskey S., Dhe-Paganon S., Eck M.J., Shoelson S.E. (1998): Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92: 441-450.
- Kontaridis M.I., Swanson K.D., David F.S., Barford D., Neel B.G. (2006): *PTPN11* (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* 281: 6785-6792.
- Koudova M., Seemanova E., Zenker M. (2009): Novel *BRAF* mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. *Eur J Med Genet* 52: 337-340.
- Limongelli G., Hawkes L., Calabro R., McKenna W.J., Syrris P. (2006): Mutation screening of the *PTPN11* gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Med Genet* 49: 426-430.
- Limongelli G., Pacileo G., Marino G., Digilio M.C., Sarkozy A., Elliott P., Versacci P., et al. (2007): Prevalence and clinical significance of cardiovascular abnormalities in patients with the LEOPARD syndrome. *Am J Cardiol* 100: 736-741.
- Limongelli G., Sarkozy A., Pacileo G., Calabro P., Digilio MC., Maddaloni V., Gagliardi G., Di Salvo G., Iacomino M., Marino B., Dallapiccola B., Calabro R. (2008): Genotype-phenotype analysis and natural history of left ventricular hypertrophy in LEOPARD syndrome. *Am J Med Genet A* 146A(5): 620-628.
- Malumbres M., Barbacid M. (2003): RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3: 459-465.
- Martinez-Quintana E., Rodriguez-Gonzalez F. (2011): Leopard syndrome and hypertrophic cardiomyopathy. *Radiologia* 53: 284-286.
- Martinez-Quintana E., Rodriguez-Gonzalez F. (2012): LEOPARD Syndrome: Clinical Features and Gene Mutations. *Mol Syndromol* 3: 145-157.
- Muslin A.J. (2005): Role of raf proteins in cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival. *Trends Cardiovasc Med* 15: 225-229.
- Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain-reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Oishi K., Zhang H., Gault W.J., Wang C.J., Tan C.C., Kim I.K., Ying H., Rahman T., Pica N., Tartaglia M., et al. (2009): Phosphatase defective LEOPARD syndrome mutations in *PTPN11* gene have gain-of-function effects during *Drosophila* development.
- Pandit B., Sarkozy A., Pennacchio L.A., Carta C., Oishi K., Martinelli S., Pogna E.A., Schackwitz W., et al. (2007): Gain-of-function *RAF1* mutations cause

Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39: 1007-1012.

- Polani P.E., Moynahan E.J. (1972): Progressive cardiomyopathic lentiginosis. *Q J Med* 41: 205-225.
- Qiu W., Wang X., Romanov V., Hutchinson A., Lin A., Ruzanov M., et al. (2014): Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (*PTPN11*). *BMC Structural Biology* 14:10.
- Razzaque M.A., Nishizawa T., Komoike Y., Yagi H., Furutani M., Amo R., Kamisago M., Momma K., et al. (2007): Germline gain-of-function mutations in *RAF1* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39(8): 1013-1017.
- Sambrook L., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd edn.*
- Sarkozy A., Conti E., Seripa D., Digilio M.C., et al., (2003): Correlation between *PTPN11* gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet* 40: 704-708.
- Sarkozy A., Conti E., Digilio M.C., Marino B., Morini E., Pacileo G., Wilson M., et al. (2004): Clinical and molecular analysis of 30 patients with multiple lentiginous LEOPARD syndrome. *J Med Genet* 41:e68.
- Sarkozy A., Digilio MC, Dallapiccola B. (2008): Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 3: 13.
- Sarkozy A., Carta C., Moretti S., Zampino G., Digilio M.C., et al. (2009): Germline *BRAF* mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 30:695-702.
- Seishima M., Mizutani Y., Shibuya Y., Arakawa C., Yoshida R., Ogata T. (2007): Malignant melanoma in a woman with leopard syndrome: Identification of a germline *PTPN11* mutation and a somatic *BRAF* mutation. *Br J Dermatol* 157: 1297-1299.
- Snyder M.L., Paolino AFG. (2002): Melan-A as a useful diagnostic immunohistochemical stain for the diagnosis of primary sinonasal melanomas. *Head Neck* 24: 52-55.
- Somerville J., Bonham-Carter R.E. (1972): The heart in lentiginosis. *Br Heart J* 34: 58-66.
- Tartaglia M., Mehler E.L., Goldberg R., Zampino G., Brunner H.G., et al. (2001): Mutations in *PTPN11* encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29: 465-468.
- Tartaglia M., Kalidas K., Shaw A., Song X., Musat D.L., Van der Burgt I., Brunner H.G., Bertola D.R., et al., (2002): *PTPN11* Mutations in Noonan Syndrome: Molecular Spectrum, Genotype-Phenotype Correlation, and Phenotypic Heterogeneity. *Am J Hum Genet* 70(6): 1555-1563.

- Tartaglia M., Martinelli S., Stella L., Bocchinfuco G., Flex E., et al. (2006): Diversity and functional consequences of germline and somatic *PTPN11* mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 78: 279-290.
- Tidyman W.E, Rauen K.A. (2009): The RASopathies: development syndromes of RAS/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 19: 230-236.
- Van der Burgt. (2007): Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2: 4.
- Voron D.A, Hatfield H.H, Kalkhoff R.K. (1976): Multiple lentiginos syndrome. Case report and review of the literature. *Am J Med* 60: 447-456.
- Watanabe Y., Yano S., Niihori T., Aoki Y., Matsubara Y., et al. (2011): A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev* 33: 576-579.
- Wu R., Legius E., Robberecht W., Dumoulin M., Cassiman J.J., Fryns J.P. (1996): Neurofibromatosis type I gene mutation in a patient with features of LEOPARD syndrome. *Hum Mutat* 8: 51-56.
- Yu ZH., Xu J., Walls CD., Chen L., Zhang S., Zhang RY., Wu L., Wang L., et al. (2013): Structural and Mechanistic Insights into LEOPARD Syndrome-Associated SHP2 Mutations. *J Biol Chem* 288: 10472-10482.
- Yu ZH., Zhang RY., Walls CD., Chen L., Zhang S., Wu L. et al. (2014): Molecular Basis of Gain-of-Function LEOPARD Syndrome-Associated SHP2 Mutations. *Biochemistry* 53: 4136-4151.

Παράρτημα

Παρατίθεται η αλληλουχία των εξονίων του γονιδίου *PTPN11*, με βάση την ακολουθία αναφοράς του NCBI (Gene ID: 5781). Με μαύρη σκίαση σημειώνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου μέσω της PCR, με γκρι σκίαση σημειώνονται τα εξόνια του γονιδίου. Επίσης, η αρίθμηση αντιστοιχεί στον αριθμό του νουκλεοτιδίου της ακολουθίας αναφοράς στο οποίο αναφερόμαστε, ενώ με υπογράμμιση φαίνεται η αλληλουχία της ασθενούς που ήταν αξιόπιστη.

```
1 cggccgcggt ttccaggagg aagcaaggat gctttggaca ctgtgcgtgg cgctccgcg
61 gagccccgcg gctgccattc cggccgctcg ctcggtcctc cgtcgacggg aagcaggaa
121 tggcggcggg cgtcgcgagc ggtgacatca egggggcgac ggcgcgaa ggcggggcg
181 gaggaggagc gagccgggccc gggggcagc tgcacagtct ccgggatccc caggcctgga
241 ggggggtctg tgcgcggccg gctggctctg ccccgctcc ggtcccgagc gggcctccct
301 cgggccagcc cgatgtgacc gagccagcg gagcctgagc aaggagcggg tccgtcgcgg
361 agccggaggg cgggaggaa atgacatcgc ggaggtgagg agccccgagg ggcgccgcg
421 gggcctcggc cggccaccg cgcgcttcgg ttagccccgt ccggaagg ggg gcgccccggc
```

.....

```
27301 ccctagccc cagtcctct gatcatatcc ccagacacc ctactgaatc ccaggtctct
27361 accaagggaa aggcaggag gagcattga ccaaggaag gaggggaa ggcacaggaa
27421 ggtcttgatt tgtatctct aaaatctct actctctca taatgcctct tagctgtct
27481 gttgtgaaa gtagtctga cagtctctg ttttttatt actactttg tcttcttt
27541 taagatggt tcaccaaat atcactggtg tggagcaga aaactactg ttgacaagag
27601 gagttgatg cagtttttg gcaagcccta gtaaaagtaa ccctggagac ttcacacttt
27661 ccgttaqgta agttgaaatg aaaaagagag atcctgagag tgtttctag gtaggaagt
27721 gtaaaaccat gcttgatag cttgctg cct2Rgcatttogag tttgaaggcc tbatctgagc
```

.....

```
31501 aaatcgacg tggaaatga gatctga ttt tactgggtgta actctttatt tgtcccctg
31561 cctcccttc caatggacta ttttagaaga aatggagctg tcaccacat caagattcag
31621 aacactggtg attactatga cctgtatgga ggggagaaat ttgccacttt ggtgagttg
31681 gtccagtatt acatggaaca tcacgggcaa ttaaaaagaga agaatggaga tgtcattgag
31741 cttaaatatc ctctgaactg tgcagatcct acctctgaaa ggtcagtaac attttaqtga
31801 ccacaaaagtc tgcctctccc ttgtgccctg agtctcagaa atgcatgacg gctctgtat
31861 gactctctga ctccaaaagc ttgtgactgt ttttgagct gtaatctta aagaattact
```

.....

```
34321 aggtgggatt gatcaatccc ttggaggaa gtgtctact ttaattgtg tttaggagag
34381 ctgactgtat acagtat ttt tgtgaaagaa caacatgac ccatagtaga gctaaattct
34441 ttttatttt ttaaaaactt tagtggttt catggacatc tctctggaa agaagcagag
34501 aaattattaa ctgaaaaagg aaaacatggt agttttcttg tacgagagag ccagagccac
34561 cctggaqatt ttgtctttc tgtgcgact ggtgatgaca aagggagag caatgacggc
34621 aagtctaaag tgaccatgt tatgattcgc tgtcaggtaa atctccagtt gaaaaatggg
34681 tctggcaaga tgttaccttt ggtgatttt tctgctgaca gaagacagac accattacat
34741 tcaaaqtca attgtctttt atttatttat ttatttattt atttatttga gacaggtct
34801 tgctctatca cctacagatg gggtttcacc acgttgggtc tggtgacca aatctttggg
```

.....

```
35701 tttgatggac atttaagttg tctctatata ctagctattg tgaataatgc tgcaqtgaac
35761 atgagagtgc ttg aaaaaac taatgtaaca taaaggtaac aaataataaa tgtcatgtg
35821 ttatcttga aggaactgaa atacgacggt ggtggagag aacggtttga tctttgaca
35881 gatcttggg aacattataa gaagaatcct atggtgaaa cattgggtac agtactacaa
35941 ctcaagcag tgagcagatt ggaagctca agctttctcc ttaaaaactt aaaacaaatc
```

36001 ctaatagaga attttqcaaa catacagagg tagacagaat agtatcatca gcctccatgt
36061 accattgca gcttcaadta tcaaatcttt ttttttttt ttttttttga gacagtotta
5R
.....
6F
37141 ttttttttt tttttttgca ttaacaccgt tttctgtaat attttcttta tttacatca
37201 actgctgtac tcgatcagcc ccttaacacg actcgtataa atgctgctga aatagaaagc
37261 agagttcgag aactaagcaa attagctgag accacagata aagtcaaaca aggcttttgg
37321 gaagaatttg aggtaagtta ttaaaaaact gtttttacgt gagttgttat atcctatttt
37381 tagtgagga qaagtgtctc ttgtgtttgg aattggacct gagagacttg aaactgadgt 6R
.....
7F
54061 cgctgacc agatgaacat tctgtagct atcgacaca attctgaaca tttcctagga
54121 tgaattcctt aaagaagtaa tgcgatcca ggcttttttc ttttctgtg actctttgac
54181 acgtaataat attgactttt ctttctttcc agacactaca acaacaggag tgcaaaacttc
54241 tctacagccg aaaagagggt caaagqcaag aaaacaaaa caaaaataga tataaaaaa
54301 tcctgcccctg taagtatcaa tattccgctc agtaaatagtc actcttggag attttgattc 7R
54361 ctagcacctc tctacctttc ctcagggtcg tgtgctottg ttagcacatc ggaggcctta
.....
8F
58741 ttgagacatc aggcagtgtt cacgttactg tttgcttac ctggcctta attttatgt
58801 gtttttttt caatcattga atgaacaaaa ctggactag gctggggagt aactgatttg
58861 aactgttttt tcctgaagca gtcaggact tatgtgaccg tggctctttt tcttctagt
58921 tgatcatacc aggtgtgccc tacagatgg tgatcccaat gagcctgttt cagattacat
58981 caatgcaaat atcatcatgg taagctttgc tttcacagt gtttctgac catactttc
59041 tagcctattt ttgtatttta aatccttctc catgtcctga aagtaacttt aaggtgtttg 8R
.....
9F
59891 caatgcaaat atcatcatgg taagctttgc tttcacagt gtttctgac catactttc
59041 tagcctattt ttgtatttta aatccttctc catgtcctga aagtaacttt aaggtgtttg
59101 aaggattttc ttctaaatt tctagcctga atttgaacc aagtgcaaca attcaaaagc
59161 caaaaagagt tacattgcca cacaaaggctg cctgcaaac acggtgaatg acttttggcg
59221 gatggtgttc caagaaaact cccgagtgat tgtcatgaca acgaaagaag tggagagagg
59281 aaagtaaat cacagaaact tctttctgc taaactgttt ttaaagtatc agacatgtca
59341 gattggccat gtttagaat tgaataaatg aattaagctt actgtaactg attctctgga
9R
.....
10F
63241 ttggtggtta ttaagcaaga ctgaaacatt tgttgttgc ttgtttagcc tttatttca
63301 gagttcacag aattaacttt cttttttct gatctctcc agagtaaatg tgtcaataac
63361 tggcctgatg agtatgctc aaaagaatat ggcgtcatgc gtgttaggaa cgtcaaagaa
63421 agcgcgctc atgactatac gctaaagaaa cttaaacttt caaaggttgg caaagtaagt
63481 atattgtcgt attctagaga ctttgggaac tgttgatggt gtgtaggaat tcaggctctt 10R
.....
11F
67561 agagttgct ccaggattgc ccaaaaggag acgagttctg ggaacctcac gaagaggacc
67621 tttcagtgga acctggggag attctcttcc tctccattgg atttaggaaa gcttagaacc
67681 gggtgattcc tcaacctott gatttattta attcttttct ggtttttott ggtctactc
67741 caggggaata cggagagaac ggtctggcaa taccactttc ggacctggcc ggaccacggc
67801 gtgccagcg acctgqqgg cgtcgtggac ttctggagg aggtgcacca taagcagga
67861 agcatcatgg atgcagggcc ggtcgtggg cactgcaggt gacagctcct gctgcccctc
67921 tagccacag cctgtccctg tctctagcg cccagggctt gcttttacct accactcct
67981 agctctttaa ctgtaggaag aatttaatat ctgtttgagg catagagcaa ctgcatttgag 11R
.....
12F
69601 aatagctca aagagtagac attgttcttg ttgatattaa tggcttgggt ttgagtctga
69661 aaccctcatg aatgattctg ttgcccctgc ttttgcctc tctgccgca gtgctggaat
69721 tggccggaca gggacgttca ttgtgattga tattcttatt gacatcatca gagagaaagg
69781 tgggtcatct ggtgggcaag aagcgacagt tctgttttt agttatgga aggaaagtgc
69841 tcacgaaaac agtctgggga agagaggttg aatgggaaaa ttctttcaca aaaactctggg
12R
.....

13F

70141 agaagttcaa cactgtagcc attgcaacat gctcagttaa aacagcaaaq actaaattag
70201 cattgtctct gagtccacta aaagtgtgac attaaacaac ttcacccctgg ctctgcagtt
70261 tctcttttatt cttcatgatg tttccttcgt aggtgttgac tgcgatattg acgttcccaa
70321 aaccatccag atggtgcggt ctcagaggtc agggatggtc cagacagaag cacagtaccg
70381 atttatctat atggcgggtc agcattatat tgaacaacta cagcgcagga ttgaagaaga
70441 gcaggtacca gctcgaaggg tggcatgagg attctcattc tcttgcctagg cctcttggat 13R
70501 acgctctct tttgagcagg aggacaggct ctgatagaca actggttgat ttcggaatgg

.....

14F

83341 aaataccttt tttgcttttt atccccttaa aataaccatt gtcctcaca tgtgcactct
83401 tccaaatttc agaaaagcaa gagaaaggg cacgaatata caaatattaa gtattctcta
83461 gcgaccaga cagtgagaga tcagagccct ctcccgcctt gtactccaac gccaccctgt
83521 gcaggttaag tagtgctgaa ggaattcctt tttacctggt catggtggtt taaaaaggtt
83581 taaaaaaca aacaaaaac aaaacacaag tttgtagcac atgcctttca ctggtgcacg 14R

.....

15F

85801 ctatctcttc tctccctggg aatgtcaggt cctaggcaca ggaactgtgt ctgtaccata
85861 tctggtgccc aaagaatgta gtatgtgttt tatagatata atgtaagctt aaacagcgtg
85921 gtctacattt ttgtaaatgt ctttcttttt ctttctctc cagaatgaga gaagacagtg
85981 ctagagtcta tgaaacggtg ggcctgatgc aacagcaga aagtttcaga tgaqaaaacc
86041 tgccaaaact tcagcacaga aataaggtatt taaatgcaag tgctctattg gtttaattgtt
86101 tatataattg gcagtatttt taagcagca agcaatttgg gaatgtttta gcaaaagtga 15R

Η αλληλουχία για το εξόνιο 2 του γονιδίου *PTPNI* της ασθενούς που ήταν αξιόπιστη αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 27342– 27746 (φαίνεται με διπλή υπογράμμιση στην αλληλουχία αναφοράς) της αλληλουχίας αναφοράς και είναι η ακόλουθη:

>TACTGAATCCCAGGTCTCTACCAAGGGAAAGGCAGGGAGGAGGCATTGACCAAGGAGAAGAGGGGGAA
GGGACAGGGAAGGTCTTGATTTGTATTTTCTAAAAATTTTCTACTCTGCTCATAATGCGTCTTAGCTGTG
TTGTTGTGGAAAGTAGTGTGACAGTGTCTTGTTTTTTTTATTTACTTTACTTTTGTCTTTCTTTTTAAGATG
GTTTCACCCAAATATCACTGGTGTGGAGGCAGAAAACCTACTGTTGACAAGAGGAGTTGATGGCAGTTT
TTTGGCAAGGCCTAGTAAAAGTAACCCCTGGAGACTTCACACTTTCCGTTAGGTAAGTTGGAATGAAAAG
AGAGGATCCTGAGAGTGTTTTCTAGGTAGGAAGTGGTAAAACCATGCTTGGATAGCTTGCT

Ομοίως για το εξόνιο 3 (νουκλεοτίδια 31581-31888):

>TTTTAGAAGAAATGGAGCTGTCACCCACATCAAGATTCAGAACACTGGTGATTACTATGACCTGTATGGAGG
GGAGAAATTTGCCACTTTGGCTGAGTTGGTCCAGTATTACATGGAACATCACGGGCAATTTAAAAGAGAA
GAATGGAGATGTCATTGAGCTTAAATATCCTCTGAACTGTGCAGATCCTACCTCTGAAAGGTCAGTAAC
ATTTTAGTGACCACAAAGTCTGCTGCTCCCTTGTGCCCTGAGTGTGAGAAATGCATGACGGTCTGTGTA
TGACTCTGACTCCAAAGGCTTGTGACT

Εξόνιο 4 (νουκλεοτίδια 34373-34820):

>TAGGAGAGCTGACTGTATACAGTAGTTTTTGTGAAAGAACAACATGAACCCATAGTAGAGCTAAATCT
TTTTTATTTTTTAAAAACTTTAGGTGGTTTTATGGACATCTCTCTGGGAAAGAAGCAGAGAAAATTATTA
ACTGAAAAAGGAAACATGGTAGTTTTTCTTGTACGAGAGAGCCAGAGCCACCCTGGAGATTTTTGTCTTT
TCTGTGCGCACTGGTGTATGACAAAGGGGAGAGCAATGACGGCAAGTCTAAAAGTGACCCATGTTATGATT
CGCTGTGAGGTAATCTCCAGTTGAAAAATGGGTCTGGCAAGATGTTACCTTTGGGTGATTTTTCTGCT
GACAGAAGACAGACACCATTACATTCAAAAGTCAGATTGTCTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTA
TTTGAGACAGGGTCTTGCTCTATCACCTACAGATG

Εξόνιο 5 (νουκλεοτίδια 35750-36069):

>CTGCAGTGAACATGAGAGTGCTTGAAAAACACTAATGTAACATAAAGGTAACAAATAATAAATGTCATG
TGTTTTATCTTGAAAGGAAGCTGAAATACGACGTTGGTGAGGAGAACGGTTTGATTCTTTGACAGATCTT
GTGGAACATTATAAGAAGAATCCTATGGTGGAAACATTGGGTACAGTACTACAACCTCAAGCAGGTGAGC
AGATTGGAAAGCTCAAGCTTTCTCCTTAAAAAAGCTTAAAAACAAATCCTAATAGAGAATTTTGCAAACATA
CAGAGGTAGACAGAATAGTATCATCAGCCTCCATGTACCCATTGC

Εξόνιο 6 (νουκλεοτίδια 37165-37430):

>ACCGTTTTCTGTAATATTTTTCTTTATTTTACATCAACTGCTGTAAGTCTGATCAGCCCTTAACACGACT
CGTATAAATGCTGCTGAAATAGAAAGCAGAGTTGAGAACTAAGCAAATTAGCTGAGACCACAGATAAA
GTCAAACAAGGCTTTTGGGAAGAATTTGAGGTAAAGTTATTAATAAAGTGTTTTTACGTGAGTTGTTATA
TCCTATTTTTAGTGGAGGAGAAGTTGCTCTTGTGTTTGGAAATGGACCTGAGAGACTTG

Εξόνιο 7 (νουκλεοτίδια 54104-54376):

>TGAACATTTCTTAGGATGAATTCCTTAAAGAAGTAATGCTGATCCAGGCTTTTTCTTTTTCTGTGAC
TCTTTGACACGTAATAATATTGACTTTTTCTTTCTTTCCAGACACTACAACAACAGGAGTGCAAACCTCT
CTACAGCCGAAAAGAGGGTCAAAGGCAAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TAAGTATCAATATTCCGCTCAGTAATAGTCACTCTTGGAGATTTTGATTCTTAGCACCTCTGTACC

Εξόνιο 8 (νουκλεοτίδια 58745-59094):

>GACATCAGGCAGTGTTCACGTTACTGTTTTGCTTACCTGGGCTTTAATTTTTATGTGTTTTTTTTTTCA
ATCATTGAATGAACAAAAGCTTTGGACTAGGCTGGGGAGTAACTGATTTGAACTGTTTTTTCTGAAAGCAG
TCCAGGACTTATGTGACCGTGGTCTTTTTCTTTCTAGTTGATCATAACCAGGGTTGTCTACACGATGG
TGATCCCAATGAGCCTGTTTTCAGATTACATCAATGCAAAATATCATCATGGTAAGCTTTGCTTTTTACAG
TGTTTTCTGACCATACATTTCTAGCCTATTTTTGTATTTTAAATCCTTCCTCATGTCTGAAAGTAACT
TTAAGG

Εξόνιο 9 (νουκλεοτίδια 59010-59351):

>CTTTTACAGTGTTTTTCTGACCATACATTTCTAGCCTATTTTTGTATTTTAAATCCTTCCTCATGTCC
TGAAAGTAACTTTAAGGTGTTTGAAGGATTTTCTTCTTAAATTTCTAGCCTGAATTTGAAACCAAGTGC
AACAAATTCAAAAGCCCAAAAAGAGTTACATTGCCACACAAGGCTGCCCTGCAAAACACGGTGAATGACTTT
TGGCGGATGGTGTTCGAAGAAAAGTCCCGAGTGATTGTCATGACAACGAAAGAAGTGGAGAGAGGAAAG
GTAAATCACAGAAACTTCTTTTTCTGCTAAAGTGTTTTTAAAGTATCAGACATGTCAGATTGGCCATG

Εξόνιο 10 (νουκλεοτίδια 63251-63537):

>GCAAGACTTGAACATTTGTTTGTGCTTGTTTAGGCTTTTATTTTACAGAGTTCACAGAATTAACCTTTCT
TTTTTTCTGATCTCTTCCAGAGTAAATGTGTCAAATACTGGCCTGATGAGTATGCTCTAAAAGAATATG
GCGTCATGCGTGTTAGGAACGTCAAAGAAAAGCGCCGCTCATGACTATACGCTAAGAGAACTTAAACTTT
CAAAGGTTGGACAAGTAAGTATATTGTCGTATTCTAGAGACTTTGGGAAGTGTGATGGTGTGTAGGAA
TTCAGGGT

Εξόνιο 11 (νουκλεοτίδια 67582-68024):

>CAAAAGGAGACGAGTTCTGGGAACCTCACGAAGAGGACCTTTCAGTGGAACCTGGGGAGATTCTCTTC
CTCTCCATTGGATTTAGGAAAGCTTAGAACC GGGTGATTCTCAACCTCTTGATTTATTTAATTCTTTT
CTGGTTTTTTCTTGGCTCTACTCCAGGGGAATACGGAGAGAACGGTCTGGCAATACCACTTTTCGGACCTG
GCCGGACCACGGCGTGCCAGCGACCTGGGGGCGTGCTGGACTTCTTGAGGAGGTGCACCATAAGCA
GGAGAGCATCATGGATGCAGGGCCGGTCTGGTGCCTGCAGGTGACAGCTCCTGCTGCCCTCTAGGC
CACAGCCTGTCCCTGTCTCCTAGCGCCAGGGCTTGTCTTTACCTACCCACTCCTAGCTCTTTAACTGT
AGGAAGAATTTAATATCTGTTTTGAGGCATA

Εξόνιο 12 (νουκλεοτίδια 69605-69854):

>GCTCCAAAGAGTAGACATTTGTTTCTGTTGATATTAATGGCTTGGTTTTGAGTCTGAAAACCCCATGAA
TGATTCTGTTGTCCCTGCTTTTTGTCTTCTGCCCGCAGTGCTGGAAATGGCCGGACAGGGACGTTTCAT
TGTGATTGATATTTCTTATTGACATCATCAGAGAGAAAGGTGGGTCATCTGGTGGGCAAGAAGCGACAGT
TTCTGTTTTTAGTTTTATGGAAGGAAAGTGCTCACGAAAACAGTC

Εξόνιο 13 (νουκλεοτίδια 70155-70494):

>TAGCCATTGCAACATGCTCAGTTAAAACAGCAAAGACTAAATTAGCATTTGTCTCTGAGTCCACTAAAA
GTTGTGCATTAACAACCTTCATCCTGGCTCTGCAGTTTTCTCTTTATTCTTCATGATGTTTCCCTTCGTAG
GTGTTGACTGCGATATTGACGTTCCCAAAACCATCCAGATGGTGC GGTCCTCAGAGGTCAGGGATGGTCC
AGACAGAAGCACAGTACCGATTTATCTATATGGCGGTCCAGCATTATATTGAAACACTACAGCGCAGGA
TTGAAGAAGAGCAGGTACCAGCCTGAGGGCTGGCATGCGGATTCATTTCTCTTGCTAGGCCTC

Εξόνιο 14 (νουκλεοτίδια 83375-83624):

>ACCATTGTCCCTCACATGTGCACTCTTCCAAATTTTCAGAAAAGCAAGAGGAAAGGGCACGAATATACA
AATATTAAGTATTCTCTAGCGGACCAGACGAGTGGAGATCAGAGCCCTCTCCCGCCTTGTA CTCCAACG
CCACCCTGTGCAGAGTAAGTAGTGCTGAAGGAAATTTCTTTTTACCTGGTCATGGTGGTTTTAAAAGGTT
TAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACACAAGTTTTGTAGCACATGC

Εξόνιο 15 (νουκλεοτίδια 85826-86146):

>CAGGTCCTAGGCACAGGAACCTGTGTCTGTACCATATCTGGTGCCCAAAGAATGTAGTATGTGTTTTAT
AGATATCATGTAAGCTTAAACAGCGTGGTCTACATTTTTGTAAATGTCTTTCTTTTTCTTTCTCTCCA
GAATGAGAGAAGACAGTGCTAGAGTCTATGAAAACGTGGGCCTGATGCAACAGCAGAAAAGTTTCAGAT
GAGAAAACCTGCCAAAACCTCAGCACAGAAAATAGGTATTTAAATGCAAGTGCTCTATTGGTTAATTGTT
TATATAATTGGCAGTATTTTTAAGCAGGCAAGCAATTTGGGAATGT