



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ταυτοποίηση Πολυμορφισμών στο Γονίδιο της KLK5 σε
άτομα ελέγχου και ασθενείς με Ατοπική Δερματίτιδα**

ΚΑΡΑΠΟΥΛΙΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ (ΙΟΥΝΙΟΣ, 2010)

**Ταυτοποίηση Πολυμορφισμών στο Γονίδιο της KLK5 σε
άτομα ελέγχου και ασθενείς με Ατοπική Δερματίτιδα**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

**Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

**Σαραφίδου Θεολογία: Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών**

Βασιλόπουλος Ιωάννης: Διδάσκοντας ΠΔ 407/80

Ευχαριστίες

Η παρακάτω διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 1/10/2009 έως 22/04/2010.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών που με δέχτηκε στο εργαστήριό του καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να εκπονήσω την παρούσα πτυχιακή εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, διδάσκοντα ΠΔ 407/80 για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε, τις συμβουλές και τις υποδείξεις του σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής αυτής εργασίας, καθώς και για τις διορθώσεις στην τελική μορφή της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Σταματοπούλου Δήμητρα και Σκριάπα Λαμπρινή και τους υποψήφιους διδάκτορες Σταμάτη Κωνσταντίνο, Γιαννούλη Θεμιστοκλή και Γεωργίου Στυλιανή για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κ. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, Διδάσκοντα ΠΔ 407/80 για την τιμή που μου κάνουν συμμετέχοντας στην τριμελή μου επιτροπή.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

- 1.1. Ο ρόλος του δέρματος
- 1.2. Ιστολογία του δέρματος των θηλαστικών
- 1.3. Οι στιβάδες της επιδερμίδας
 - 1.3.1. Βασική στιβάδα (SB)
 - 1.3.2. Ακανθωτή στιβάδα (SS)
 - 1.3.3. Κοκκιώδης στιβάδα (SG)
 - 1.3.4. Κεράτινη στιβάδα (SC)
- 1.4. Η διαδικασία κερατινοποίησης των κυττάρων της επιδερμίδας
- 1.5. Ο φυσικός 'φραγμός' του δέρματος
- 1.6. Η διαδικασία της απολέπισης διασφαλίζει την ομοιόσταση του διαδερμικού φραγμού
- 1.7. Το πρωτεολυτικό σύστημα απολέπισης
- 1.8. Ρύθμιση των πρωτεασών απολέπισης
- 1.9. Το pH του δέρματος
- 1.10. Ατοπική δερματίτιδα
 - 1.10.1. Επιδημιολογία της ασθένειας
 - 1.10.2. Κλινική διάγνωση της ατοπικής δερματίτιδας
 - 1.10.3. Θεραπεία της ατοπικής δερματίτιδας
 - 1.10.4. Μορφές της ατοπικής δερματίτιδας
 - 1.10.5. Το ανοσολογικό σύστημα στην ατοπική δερματίτιδα
 - 1.10.6. Αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην ατοπική δερματίτιδα
 - 1.10.7. Διαταραχή επιδερμικού φραγμού: αίτιο ή αποτέλεσμα;
 - 1.10.8. Υπεύθυνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες
 - 1.10.9. Εξωγενείς πρωτεάσες
 - 1.10.10. Υπεύθυνοι γενετικοί παράγοντες
 - 1.10.10.1. 1^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες του επιδερμικού φραγμού
 - 1.10.10.2. 2^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεάσες της ΚΣ
 - 1.10.10.3. 3^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν τους αναστολείς των πρωτεασών
 - 1.10.11. Η πρωτεάση KLK5
 - 1.10.12. Ο ρόλος της KLK5

2. Υλικά – Μέθοδοι

- 2.1. Συλλογή δειγμάτων
- 2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA
 - 2.2.1. Ο ρόλος των αντιδραστηρίων
 - 2.2.2. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του απομονωμένου DNA
- 2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
 - 2.3.1. Αντιδραστήρια της PCR
 - 2.3.2. Στάδια της PCR
 - 2.3.3. Θερμοκρασίες της PCR
 - 2.3.4. Παράγοντες που επιδρούν στην PCR
- 2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
 - 2.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση

Περίληψη

Η ατοπική δερματίτιδα (ΑΔ) είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης ασθένεια του δέρματος που πλήττει κυρίως το 10-20% των παιδιών παγκοσμίως. Σημαντικός παράγοντας της αιτιοπαθογένειάς της θεωρείται η διαταραχή του δερμοεπιδερμικού φραγμού, λόγω ελαττωματικής δράσης των πρωτεασών και των αναστολέων τους που συμμετέχουν στη διαδικασία απολέπισης του δέρματος. Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν την πιθανή συσχέτιση της πρωτεάσης KLK5 με τις φλεγμονώδεις εκδηλώσεις της ατοπικής δερματίτιδας, δηλαδή την πιθανή εμπλοκή της στην παθογένεια της ασθένειας.

Στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη αναλύθηκαν δύο κωδικά εξόνια του γονιδίου της KLK5 με στόχο την εύρεση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την παθογένεια της ασθένειας. Αφού απομονώθηκε DNA από δείγματα ασθενών με ατοπική δερματίτιδα, αλλά και φυσιολογικών ατόμων, ακολούθησε η ενίσχυση των δύο εξονίων με τη μέθοδο PCR. Τα δείγματα που εμφάνισαν PCR προϊόντα αναλύθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο SSCP. Μετά την παρατήρηση του προτύπου ζωνών τους, ένα δείγμα ασθενούς με ΑΔ, για το εξόνιο 4, εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο ζωνών σε σχέση με τα υπόλοιπα και αλληλουχήθηκε με σκοπό την ανίχνευση πολυμορφισμού στο γονίδιο της KLK5.

Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης εμφάνισε την παρουσία ετεροζυγωτίας (G/A) στην θέση 5884 στο εξόνιο 4 του γονιδίου της KLK5, το οποίο επιφέρει αλλαγή του ασπαραγινικού οξέος σε ασπαραγίνη στη θέση 153. Καθώς αυτή η αμινοξική αντικατάσταση βρίσκεται στην καταλυτική τριάδα (His¹⁰⁸ Asp¹⁵³ Ser²⁴⁵) η οποία είναι απαραίτητη για την ενζυμική δράση πρωτεΐνης, πιθανόν να επηρεάζει σημαντικά την λειτουργία της πρωτεάσης KLK5, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή της στην δυσλειτουργία του δερμοεπιδερμικού φραγμού που χαρακτηρίζει την ατοπική δερματίτιδα. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η περαιτέρω διερεύνησή του πολυμορφισμού σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα σε σχέση με υγιείς ανθρώπους (case-control association study), σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων ώστε να επιβεβαιωθεί η συμμετοχή του στην γενετική βάση της ασθένειας.

1. Εισαγωγή

Η προστασία του σώματος από την αφυδάτωση και τις επιβλαβείς φυσικές, μηχανικές και χημικές προσβολές του περιβάλλοντος είναι ουσιώδης για την επίγεια ζωή. Σε όλα τα όντα, από τα βακτήρια στα φυτά και τους ανθρώπους, υπάρχει ένα είδος 'ασπίδας' που τα διαχωρίζει και τα προστατεύει από το περιβάλλον. Για τα θηλαστικά, αυτή η ασπίδα είναι το δέρμα¹.

1.1. Ο ρόλος του δέρματος

Η ακεραιότητα του δέρματος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος². Το δέρμα αποτελεί το περίβλημα του σώματος διαχωρίζοντάς το από το εξωτερικό περιβάλλον. Ταυτόχρονα εμποδίζει τη διαδερμική απώλεια νερού μέσω ενός στεγανού φραγμού, της επιδερμίδας³.

Με βάση τον αριθμό των λειτουργιών που εκτελεί, το δέρμα ξεπερνάει κάθε άλλο όργανο. Η πρωταρχική του λειτουργία είναι φυσικά η προστασία, η οποία καλύπτει φυσική, χημική, ανοσολογική υπεράσπιση, καθώς και άμυνα εναντίων των παθογόνων, της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ελευθέρων ριζών. Αποτελεί ωστόσο, έναν καθοριστικό παράγοντα στη θερμορύθμιση, όπως επίσης λειτουργεί ως αισθητήριο όργανο και εκτελεί ενδοκρινείς λειτουργίες (σύνθεση της βιταμίνης D, περιφερική μετατροπή των πρόδρομων ορμονών). Πρέπει, τέλος, να αναφερθεί ιδιαίτερα πως το δέρμα αποτελεί το αντικείμενο έρευνας πολλών βιομηχανιών δισεκατομμυρίων δολλαρίων στο πεδίο της κοσμητικής και της φροντίδας του προσώπου, καθώς επίσης και στον τομέα της φαρμακολογίας.

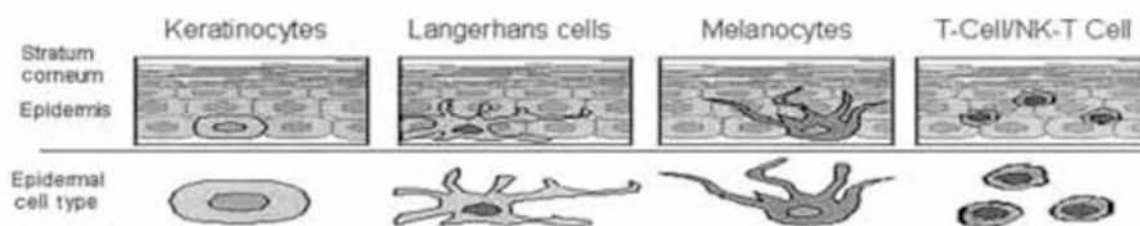
1.2. Ιστολογία του δέρματος των θηλαστικών

Το δέρμα αποτελείται από δύο διακριτές στιβάδες. Η δερμίδα αποτελεί τον εσωτερικό όγκο του δέρματος και περιέχει συνδεδεμένα στοιχεία ιστού. Η εξωτερική στιβάδα, η επιδερμίδα, δεν περιέχει αγγεία και αποτελείται κυρίως από τα κερατινοκύτταρα⁴.

Η δερμίδα, υποδιαιρείται σε 2 υποστιβάδες, τη δικτυωτή (reticular layer) και τη θηλιακή (papillary layer)⁵. Τα κυριότερα συστατικά της είναι ινίδια όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη, γλυκοπρωτεΐνες όπως η φμπρονεκτίνη ή η λαμίνη και δύο ομάδες υδρογονωμένων πολυσακχαριτών, οι γλυκοσαμινογλυκάνες (GAGs) και οι πρωτεογλυκάνες (PGs) που αποτελούν ένα 'τζελ' ενώνοντας το ινώδες αυτό πλέγμα. Τα συστατικά αυτά αναφέρονται συνολικά με τον όρο «εξωκυττάριο δίκτυο» (extracellular matrix, ECM), το οποίο ευνοεί την κατακράτηση νερού και την αντοχή στο περιβαλλοντικό μηχανικό 'stress'. Τα μόρια του ECM είναι σε υψηλό βαθμό υδρόφοβα, γεγονός που είναι απαραίτητο για τη θρέψη του μη αγγειακού ιστού της επιδερμίδας. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον διαχεόμενα μόρια, όπως αυξητικοί παράγοντες, ένζυμα και οι αναστολείς τους, μπορούν να δρουν αποτελεσματικά. Αυτό το ανθεκτικό δίκτυο, λοιπόν, διαμορφώνεται από ινοβλάστες και αποτελεί γι' αυτούς, διαδοχικά, ένα ιδανικό περιβάλλον για τα ζωντανά θρεπτικά στοιχεία και

ρυθμιστικά μόρια, συμπεριλαμβανομένου των αυξητικών παραγόντων. Γενικά, το εξωκυττάριο δίκτυο ECM περιέχει όλα τα συστατικά που περιβάλλουν τα κύτταρα σε έναν ιστό. Όσον αφορά το δέρμα όμως, το ECM ανήκει στη δερμίδα. Τα μόρια του ECM συχνά συνδυάζονται με σκοπό να επιτύχουν έναν υψηλό βαθμό οργάνωσης στο χώρο, οδηγώντας στο σχηματισμό των βασικών μεμβρανών (BMs). Η πρωταρχική λειτουργία μιας βασικής μεμβράνης (BM) είναι να διαχωρίζει διακριτούς ιστούς με έναν εκλεκτικό τρόπο, όπως για παράδειγμα τη δερμίδα από την επιδερμίδα στο δέρμα². Η δερμίδα, τέλος, χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό αγγείων και περιλαμβάνει επιπλέον τα ιστοκύτταρα, τα λευκοκύτταρα, τα λιποκύτταρα του δέρματος, καθώς επίσης και τους ιδρωτοποιούς αδένες⁴.

Η επιδερμίδα είναι ένα οργανωμένο επιθήλιο που παρέχει την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον του εξωτερικού περιβάλλοντος³. Περίπου το 95% του στρώματος αυτού αποτελείται από κερατινοκύτταρα και το υπόλοιπο 5% από μελανοκύτταρα, κύτταρα του Langerhans και κύτταρα του Merkel (μηχανοϋποδοχείς)⁴. Υπάρχουν ακόμη τα NK-T κύτταρα, καθώς και τα T κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση παθογόνων που εισέρχονται στο δέρμα, οπότε παρέχουν τα απαραίτητα σηματοδοτικά σήματα και παράγουν τους αντιφλεγμονώδεις παράγοντες⁶. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι τύποι κυττάρων της επιδερμίδας:



Εικόνα 1: Τουλάχιστον πέντε διαφορετικοί τύποι κυττάρων στη φυσιολογική ανθρώπινη επιδερμίδα ενεργοποιούνται κατά τη διείσδυση παθογόνων και βοηθούν κατά συνέπεια, στην άμυνα της επιδερμίδας και την προστασία της δερμίδας από ηλιακή ακτινοβολία ή βιολογικούς και χημικούς παράγοντες⁶.

Η επιδερμίδα, με πάχος περίπου 100-150 μm , είναι διαιρεμένη σε τέσσερις διακριτές στιβάδες, που απεικονίζονται στην Εικόνα 2 α), β):

- βασική στιβάδα (stratum basale, ΒΣ)
- ακανθωτή στιβάδα (stratum spinosum, ΑΣ)
- κοκκιώδης στιβάδα (stratum granulosum, ΚΟΣ)
- κεράτινη στιβάδα (stratum corneum, ΚΣ)⁴.

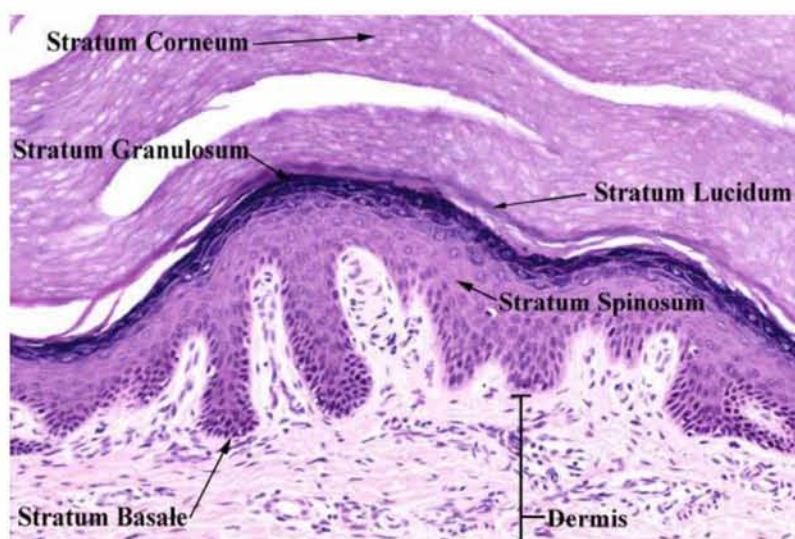
Ωστόσο, στις παλάμες των χεριών και στα πέλματα των ποδιών εμφανίζεται ακόμα μια υποστιβάδα της επιδερμίδας, που αναφέρεται ως stratum lucidum⁵.

Τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας είναι οργανωμένα στις στιβάδες αυτές, από τη βασική στιβάδα, μέσω της ακανθωτής και της κοκκιώδους, στην κεράτινη στιβάδα ακολουθώντας την προοδευτική διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης που ονομάζεται κερατινοποίηση. Υπάρχουν διάφοροι ρυθμιστικοί μηχανισμοί, που θα αναφερθούν παρακάτω, οι οποίοι επιτρέπουν τη συνεχή ροή των κυττάρων μέσω αυτών των βαθμιαία διαφοροποιημένων επιδερμικών στιβάδων².

1.3. Οι στιβάδες της επιδερμίδας

1.3.1. Βασική στιβάδα (ΒΣ)

Η στιβάδα αυτή είναι η κατώτερη της επιδερμίδας και είναι υπεύθυνη για τη συνεχή ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων⁷. Αποτελεί ένα λεπτό στρώμα κινοειδών βασικών κυττάρων τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα στη βασική μεμβράνη (BM) μέσω εξειδικευμένων δομών, των ημιδεσμοσωμάτων⁴.



Εικόνα 2: α) Οι στιβάδες της επιδερμίδας. Παρουσιάζεται επιπλέον και η στιβάδα της stratum lucidum που εμφανίζεται στις παλάμες των χεριών και στα πέλματα των ποδιών⁵.



β) Οι 4 στιβάδες της επιδερμίδας: SG:stratum basale, SS:stratum spinosum, SGR: stratum granulosum, SC: stratum corneum⁵.

Η βασική στιβάδα περιέχει επιδερμικά βλαστικά κύτταρα τα οποία διαιρούνται πολύ συχνά με αποτέλεσμα να προκύπτουν άλλα κύτταρα-απόγονοι, τα ΤΑ κύτταρα (transit amplifying cells)⁸. Ο μισός αριθμός των βλαστικών κυττάρων διαφοροποιείται και μεταναστεύει στην αμέσως επόμενη στιβάδα της επιδερμίδας για να αρχίσει η διαδικασία της ωρίμανσης. Τα υπόλοιπα μισά κύτταρα παραμένουν στη ΒΣ και διαιρούνται ξανά και ξανά για να την ανανεώσουν⁷. Όλα τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλή αναλογία πυρήνα-κυττοπλάσματος, περιέχουν κυτταρικά

οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, αλλά και ινίδια κερατίνης (τονοϊνίδια) τα οποία εισέρχονται στα ημιδεσμοσώματα. Η K14 και η K5 είναι δύο κερατίνες που εκφράζονται στα βασικά αυτά κύτταρα⁴.

1.3.2. Ακανθωτή στιβάδα (ΑΣ)

Τα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό ακανθωτό σχήμα σε ιστολογικές τομές. Εκτός από τα τυπικά κυτταρικά οργανίδια που συναντούνται στη βασική μεμβράνη, σε αυτήν τη στιβάδα παρατηρούνται ακόμα:

- πλούσια σε λιπίδια και επικαλυπτόμενα με παχιά μεμβράνη σωματίδια (lamellar bodies, LB), τα οποία είναι γνωστά και με τον όρο σωματίδια Odland
- κερατινοσώματα⁴, μεμβρανώδεις δομές (granules) που υπάρχουν ενδοκυτταρικά στα κερατινοκύτταρα των ανώτερων στιβάδων της επιδερμίδας, αλλά και εξωκυτταρικά, μεταξύ των υποστιβάδων ΚΟΣ και ΚΣ⁹.

Είναι επιπλέον αξιοσημείωτη, η αύξηση των κυτταρικών ινιδίων κερατίνης σε σύγκριση με τα βασικά κύτταρα της ΒΣ. Βιοχημικοί δείκτες για την στιβάδα αυτή χρησιμοποιούνται η κερατίνη 1 και 10. Στα ανώτερα στρώματα της ακανθωτής στιβάδας, τα κύτταρα αρχίζουν να επιμηκύνονται και να διασταυρώνονται με την κοκκιώδη στιβάδα⁴.

1.3.3. Κοκκιώδης στιβάδα (ΚΟΣ)

Διακριτές, μαύρες δομές κερατινοϋαλίνης (KHG) χαρακτηρίζουν τη στιβάδα αυτή⁴. Η κερατινοϋαλίνη είναι μια πρωτεϊνική δομή που συναντάται στην κοκκιώδη στιβάδα και εμπλέκεται πιθανόν στη διαδικασία της κερατινοποίησης⁹. Οι δομές KHGs αποτελούνται από τις πρωτεΐνες προφίλλαγκρίνη (πολυπρωτεΐνη αποτελούμενη από υπομονάδες φιλλαγκρίνης¹), λορικρίνη και μια πλούσια σε κυστεΐνη πρωτεΐνη. Σταδιακά, τα KHGs γίνονται μεγαλύτερα αντανακλώντας μια ποσοτική αύξηση στη σύνθεση της κερατίνης. Η προφίλλαγκρίνη, και κυρίως οι υπομονάδες φιλλαγκρίνης, έχει το ρόλο του μορίου που ενώνει και ευθυγραμμίζει τα ινίδια κερατίνης. Η προοδευτική κυτταρική διαφοροποίηση, απόδειξη της αυξανόμενης πρωτεϊνικής σύνθεσης, συνοδεύεται επίσης από αυξημένη λιπογένεση, καθώς ο αριθμός των lamellar bodies (LB) είναι μεγάλος. Τα ανώτερα κύτταρα της ΚΟΣ επιδεικνύουν μια μοναδική δομική και λειτουργική οργάνωση των LB⁴.

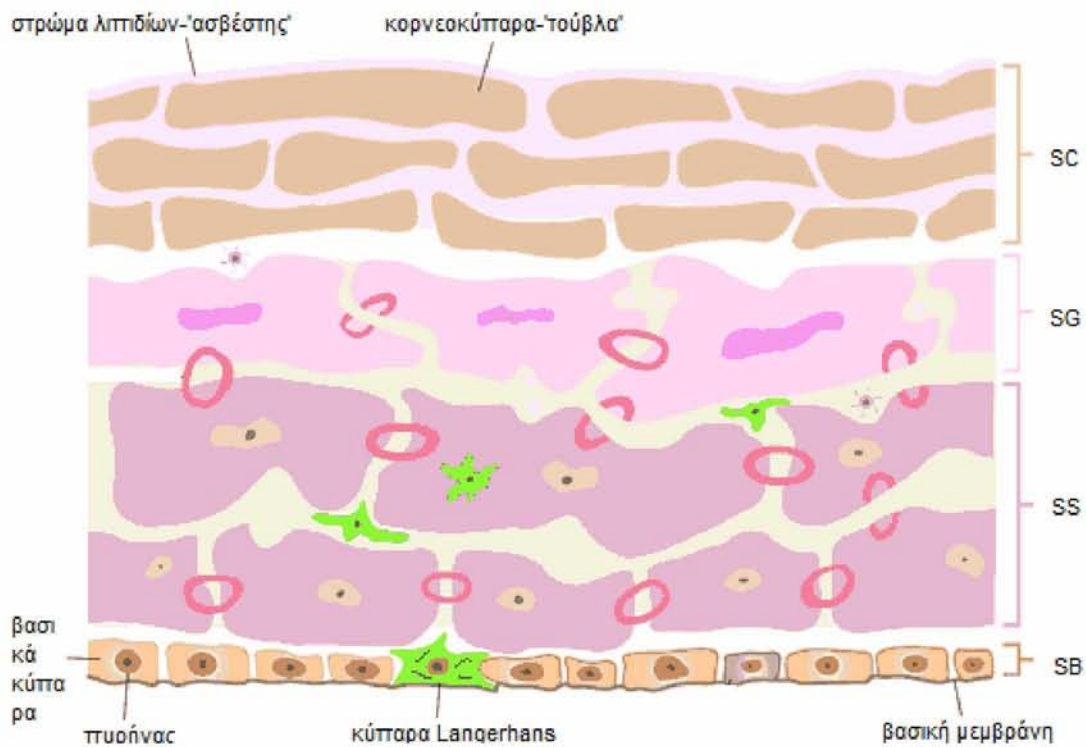
1.3.4. Κεράτινη στιβάδα (ΚΣ)

Η στιβάδα αυτή συντίθεται από τα εκκρινόμενα συστατικά των LB και τα τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα, τα κορνεοκύτταρα⁴. Αυτά τα κύτταρα παρέχουν μηχανική και χημική προστασία και μαζί με τα λιπίδια που τα περιβάλλουν εξασφαλίζουν τη διαπερατότητα του ύδατος. Η οργάνωση του κεράτινης στιβάδας

παρομοιάζεται με τοίχο από τούβλα και ασβέστη, με τα κορνεοκύτταρα να προσομοιάζουν τα τούβλα και τα εκκρινόμενα λιπίδια, που συγκρατούν ενωμένα τα κορνεοκύτταρα, με ασβέστη¹ (Εικόνα 3). Η διάταξη αυτή δημιουργεί ένα 'δύσκολο μονοπάτι' από το οποίο πρέπει να περάσουν οι διάφορες ουσίες προκειμένου να διασχίσουν την ΚΣ.

Στο ανθρώπινο δέρμα, η κεράτινη στιβάδα διαθέτει περίπου 18-21 κυτταρικές στιβάδες. Μεμονωμένα τα κορνεοκύτταρα είναι 20-40 μm σε διάμετρο, αντίθετα με τα βασικά κύτταρα της ΒΣ που έχουν 6-8 μm⁴. Τα κορνεοκύτταρα είναι επίπεδα κύτταρα που αντιπροσωπεύουν το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των εξωτερικών κερατινοκυττάρων (KCs) της στιβάδας ΚΟΣ. Το χαρακτηριστικό τους είναι ότι έχουν χάσει τα υποκυτταρικά τους οργάνδια και τον πυρήνα και είναι γεμάτα με ινίδια κερατίνης¹¹. Τα ινίδια κερατίνης αποτελούν το 80-90% της συνολικής τους μάζας και είναι στοιχισμένα παράλληλα στην επιφάνεια του δέρματος¹. Κατά τη διάρκεια σχηματισμού των κορνεοκυττάρων, τα κύτταρα της ΚΟΣ εκκρίνουν τα μεμβρανώδη συστατικά τους στον εξωκυττάριο χώρο για να σχηματίσουν το λιπιδικό μεμβρανικό δίκτυο ('ασβέστης') που περιβάλλει τα κορνεοκύτταρα.

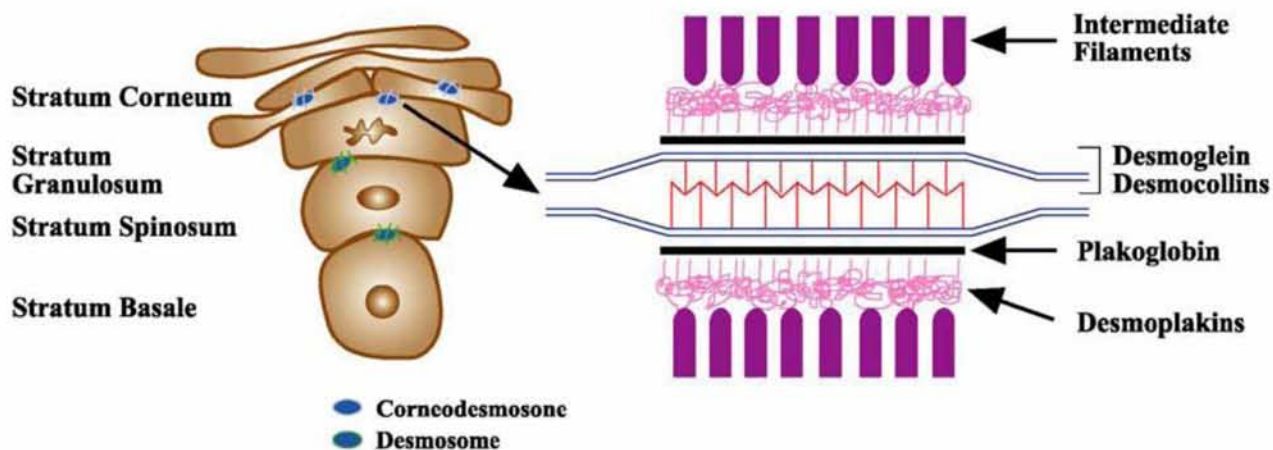
Τα KCs κύτταρα, κατά την τελική τους διαφοροποίηση, αντικαθιστούν την πλασματική τους μεμβράνη με ένα αδιάλυτο πρωτεϊνικό στρώμα που αναφέρεται ως «κεράτινος φάκελος» (CE)¹¹. Ο φάκελος αυτός περιβάλλει τα κορνεοκύτταρα¹ και τους παρέχει ανθεκτικότητα. Παράλληλα δρα ως ένα είδος 'σκαλωσιάς' για τα λιπίδια του εξωκυττάρου δικτύου. Κύριο συστατικό του CE είναι η φιλαγκρίνη, που έχει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς αθροίζει τα ινίδια κερατίνης σε δέσμες, συρρικνώνοντας με αυτόν τον τρόπο τα κορνεοκύτταρα σε επίπεδα κύτταρα με μεγάλη επιφάνεια. Πρωτεολυτικά ένζυμα αποικοδομούν τη φιλαγκρίνη σε μικρά πεπτίδια και στη συνέχεια σε ελεύθερα αμινοξέα. Τα ελεύθερα αμινοξέα καταβολίζονται περαιτέρω και οδηγούν στο σχηματισμό των «φυσικών παραγόντων υγρασίας» (natural moisturizing factors, NMF). Οι παράγοντες NMF είναι απαραίτητοι για την κατακράτηση νερού μέσα στα κορνεοκύτταρα, βοηθώντας στην ενυδάτωσή τους.



Εικόνα 3: Η δομή της ανώτερης στιβάδας της επιδερμίδας, της κεράτινης στιβάδας, παρομοιάζεται με τοίχο από τούβλα και ασβέστη. SG: stratum basale, SS: stratum spinosum, SGR: stratum granulosum, SC: stratum corneum¹².

Τα κorneοκύτταρα ενώνονται μεταξύ τους μέσω εξειδικευμένων δομών που ονομάζονται κorneοδεσμοσώματα. Τα κorneοδεσμοσώματα αποτελούν τροποποιημένα δεσμοσώματα και διασφαλίζουν τη δομική ακεραιότητα και συνοχή της ΚΣ. Του παρέχουν επιπλέον τη δύναμη να αντέχει ενάντια στις πιέσεις. Για το λόγο αυτό, παρομοιάζονται με σιδερένιες ράβδους που τοποθετούνται στα χάσματα μεταξύ των κorneοκυττάρων (τούβλων)¹¹. Τα κorneοδεσμοσώματα αποτελούνται από τις διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες δεσμογλίνη (desmoglein) και δεσμοκολλίνη (desmocollin) (οικογένεια καδερινών). Η δεσμογλίνη και η δεσμοκολλίνη συνδέονται με τα ινίδια κερατίνης μέσω των κorneοδεσμοσωμικών πρωτεϊνών (plaque proteins) πλακογλοβίνη (plakoglobin), δεσμοπλακίνη (desmoplakin) και πλακοφιλίνη (plakophilin). Η πρωτεΐνη κorneοδεσμοσίνη εκφράζεται στα κεράτινα επιθήλια και εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Μετά τη μετατόπισή της στο χώρο μεταξύ των στιβάδων ΚΟΣ και ΚΣ, ενσωματώνεται τελικά στα δεσμοσώματα. Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί τη μετατροπή από δεσμοσώμα σε κorneοδεσμοσώμα (Εικόνα 4)¹³.

Μεταξύ τους τα κorneοκύτταρα διαφέρουν ως προς τα στρώματα που τους περιβάλλουν, τον αριθμό των κorneοδεσμοσωμάτων και ως προς άλλους παράγοντες, ανάλογα με τη θέση του σώματος και την τοποθεσία τους μέσα στην ΚΣ (εσωτερικό stratum compactum ή εξωτερικό stratum disjunctum). Αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζουν επίσης το βαθμό ενυδάτωσής τους, ο οποίος ποικίλλει από 10 μέχρι 30%. Οι πτυχές και οι επιμηκύνσεις των εξωτερικών κorneοκυττάρων βοηθούν στο να ενώνονται καλύτερα μεταξύ τους, ενισχύοντας τη σταθερότητα αυτής της υποστιβάδας⁴.



Εικόνα 4: Η δομική ακεραιότητα της κερατίνης στιβάδας διατηρείται από τα τροποποιημένα δεσμοσώματα, τα κορνεοδεσμοσώματα, τα οποία ενώνουν σφιχτά τα κορνεοκύτταρα. Στην εικόνα παρουσιάζονται και οι πρωτεΐνες των κορνεοδεσμοσωμάτων⁶.

1.4. Η διαδικασία κερατινοποίησης των κυττάρων της επιδερμίδας

Το επιθήλιο της επιδερμίδας ανανεώνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Στους ανθρώπους εκτιμάται ότι η επιδερμίδα αλλάζει κάθε 40-56 μέρες, ενώ στα ποντίκια κάθε 8-10 μέρες. Αυτή η διαρκής αλλαγή της επιδερμίδας επιτυγχάνεται μέσω των επιδερμικών βλαστικών κυττάρων που βρίσκονται στη βασική στιβάδα (ΒΣ). Τα κύτταρα-απόγονοι των επιδερμικών βλαστικών κυττάρων, τα ΤΑ κύτταρα, βρίσκονται επίσης στο SB και υφίστανται λίγους κύκλους κυτταρικής διαίρεσης πριν ξεκινήσουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τα ΤΑ κύτταρα σταματούν τις κυτταρικές διαιρέσεις, αρχίζουν την έκφραση επιδερμικών δεικτών τελικής διαφοροποίησης και μετακινούνται προς τις ανώτερες στιβάδες της επιδερμίδας (κερατινοποίηση)⁸. Αυτό το πρόγραμμα τελικής κυτταρικής διαφοροποίησης οδηγεί στη μετανάστευση των ζωντανών επιδερμικών κερατινοκυττάρων στην επιφάνεια, καταλήγοντας ως αλληλοσυνδεόμενες στιβάδες νεκρών κορνεοκυττάρων¹. Τα κορνεοκύτταρα είναι κερατινοκύτταρα που έχουν συμπληρώσει το πρόγραμμα της τελικής διαφοροποίησης και έχουν χάσει τους πυρήνες και τα κυτταροπλασματικά τους οργανίδια.

Παρόλο που ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν για τη ρύθμιση των επιδερμικών βλαστικών κυττάρων, αξιοσημείωτη πρόοδος έχει γίνει για την κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ΤΑ κυττάρων. Μέσα στην επιδερμίδα, τα ΤΑ κύτταρα, όπως έχει αναφερθεί, τοποθετούνται στη βασική στιβάδα, ΒΣ, όπου πολλαπλασιάζονται. Παρόλο που ο ακριβής αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων δεν έχει ακόμη καθοριστεί, τα ΤΑ κύτταρα τελικά αποχωρούν από τον κυτταρικό κύκλο και ξεκινούν την τελική διαφοροποίηση. Για να διασφαλιστεί σωστή επιδερμική διαφοροποίηση, αυτή η ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης ελέγχεται αυστηρά. Μια πρωτεΐνη καταλυτικής σημασίας για τη ρύθμιση αυτή είναι η p63. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται σε τουλάχιστον 6 διαφορετικές ισομορφές ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος και

χρήσης διαφορετικού προαγωγέα. Η κυρίαρχη ισομορφή της p63 στην νεογνική επιδερμίδα, η ΔNp63α, οδηγεί αμέσως στην έκφραση της κερατίνης 14 (K14). Η K14 εκφράζεται στα ΤΑ κύτταρα αλλά όχι στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Έχει βρεθεί πως η ΔNp63α είναι σημαντική για τη διατήρηση του σταδίου πολλαπλασιασμού των ΤΑ κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ΔNp63α εμπλέκεται στη διατήρηση των ΤΑ κυττάρων, εμποδίζοντας την πρόωρη τελική διαφοροποίησή τους⁸.

1.5. Ο φυσικός 'φραγμός' του δέρματος

Οι περισσότερες λειτουργίες του δέρματος μπορούν να θεωρηθούν προστατευτικές, ή πιο εξειδικευμένα, ως λειτουργίες άμυνας (Πίνακας 1). Η κεράτινη στιβάδα, η ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας, είναι υπεύθυνη για αυτές τις λειτουργίες οι οποίες αλληλοσυσχετίζονται λόγω κοινής τοποθεσίας ή κοινών βιοχημικών διαδικασιών¹⁴. Το γεγονός ότι αυτή η στιβάδα δεν είναι ένας 'άκαμπτος σκληρός τοίχος', αλλά παρουσιάζει ευλυγισία, το κάνει να συμπεριφέρεται σαν ένα βιοπολυμερές ή μια μεμβράνη. Η 'μεμβράνη' αυτή αποτελεί ένα 'φραγμό' εναντίων των παθογόνων μικροβίων και των χημικών που προσπαθούν να εισχωρήσουν μέσα στον οργανισμό από το περιβάλλον⁴. Παράγει, ακόμη, αντιμικροβιακά λιπίδια, πεπτίδια, υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors) και χημειοκίνες που μαζί αποτελούν τη φυσική ανοσία του δέρματος¹⁵.

Table I. Protective functions of mammalian stratum corneum

Function	Localization
Permeability barrier ^a	Extracellular
Cohesion (integrity) → desquamation ^a	Extracellular
Antimicrobial barrier (innate immunity) ^a	Extracellular
Mechanical (impact and shear resistance)	Corneocyte
Toxic chemical/antigen exclusion	Extracellular
Selective chemical absorption	Extracellular
Hydration	Corneocyte
UV barrier	Corneocyte
Initiation of inflammation (cytokine activation) ^a	Corneocyte
Psychosensory interface	Unknown
Thermal barrier	Unknown

^aRegulated or thought to be activated by (SC) pH.

Πίνακας 1: Οι λειτουργίες της επιδερμικής κεράτινης στιβάδας των θηλαστικών¹⁴.

Η ικανότητα του δέρματος να περιορίζει την απώλεια ύδατος από το σώμα αλλά και την είσοδο παθογόνων οφείλεται στην οργάνωση της ΚΣ. Η στιβάδα αυτή αποτελείται από τα άδεια σε λιπίδια και πλούσια σε πρωτεΐνη κορνεοκύτταρα, ενσωματωμένα σε ένα εμπλουτισμένο με λιπίδια εξωκυτταρικό δίκτυο που υποβοηθά τη δημιουργία του 'φραγμού' του δέρματος¹⁴. Συγκεκριμένα, το λιπιδικό εξωκυτταρικό δίκτυο εμποδίζει την εσωτερική απώλεια νερού και τη διείσδυση των υδατοδιαλυτών

ουσιών. Παρέχει ακόμη την ευελιξία στο 'φραγμό' του δέρματος, διασφαλίζοντας την στεγανότητά του¹¹. Τα λιπίδια προέρχονται από ενεργά 'εργοστάσια' σύνθεσης λιπιδίων, αποτελεσματικά σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα των στιβάδων της επιδερμίδας, τα επιδερμικά σωμάτια LB (lamellar bodies). Τα LB σωμάτια είναι δομές πλούσιες σε λιπίδια και υδρολάσες και αποτελούν το 10% του κυτοσολίου της ΚΣ. Μετά την έκκρισή τους στην επιφάνεια μεταξύ των στιβάδων ΚΟΣ-ΚΣ, τα συστατικά των LB σωματίων μετατρέπονται από ένα πολικό μείγμα λιπιδίων σε ένα υδρόφοβο μείγμα από κεραμίδια (οικογένεια λιπιδικών μορίων¹⁶), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και χοληστερόλη και οργανώνονται σε μεμβράνες. Σχηματίζεται επομένως ένα υδρόφοβο δίκτυο μέσα στο οποίο είναι τοποθετημένα τα κorneοκύτταρα. Ο 'φραγμός' διαπερατότητας του δέρματος εξηγείται επομένως από:

- τις ακριβείς ποσότητες των συστατικών
- τον υδρόφοβο χαρακτήρα
- την έκκριση και διάχυση των λιπιδίων
- την οργάνωση των λιπιδίων σε διπλές μεμβράνες

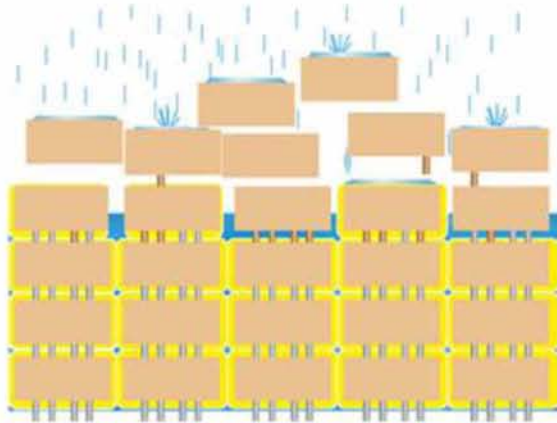
Εκτός από την παροχή λιπιδίων για το 'φραγμό' του δέρματος, τα σωμάτια LB εξασφαλίζουν ακόμη: ένζυμα που απελευθερώνουν τα λιπίδια από τα αντίστοιχα πρόδρομά τους, πρωτεάσες που εμπλέκονται στη διαδικασία της απολέπισης, αναστολείς των πρωτεασών, όπως η ελαφίνη και η κυστατίνη, μια πρωτεΐνη που καλύπτει τα κorneοδεσμοσώματα, την κorneοδεσμοσίνη (CDSN) ώστε να είναι ανθεκτικά σε πρόωμη πρωτεόλυση, όπως και αντιμικροβιακά πεπτιδία¹⁴.

1.6. Η διαδικασία της απολέπισης διασφαλίζει την ομοιόσταση του διαδερμικού φραγμού

Η διαδικασία της απολέπισης περιλαμβάνει τη ρυθμισμένη μετάβαση των κυττάρων από την κατάσταση ισχυρής ενδοκυτταρικής σύνδεσης στα βαθύτερα στρώματα, σε μια κατάσταση όπου τα κύτταρα αποβάλλονται από την επιφάνεια του δέρματος (Εικόνα 5)¹⁷. Τα κorneοκύτταρα που αποβάλλονται αντικαθιστούνται συνεχώς από αυτά των κατώτερων στιβάδων που υφίστανται τελική διαφοροποίηση. Για το λόγο αυτό, υπάρχει μια ισορροπία ανάμεσα στην κυτταρική διαφοροποίηση των βασικών κυττάρων και την απολέπιση των κorneοκυττάρων, απαραίτητη ώστε να διατηρεί το επιθήλιο ένα σταθερό πάχος¹³. Η κεράτινη στιβάδα, λοιπόν, διατηρεί την καθορισμένη οργάνωσή του αναγεννώντας τα συστατικά της, τόσο τα κorneοκύτταρα, όσο και το δίκτυο λιπιδίων⁴. Επειδή η επιδερμίδα, λοιπόν, είναι ένας ιστός που αναγεννάται συνεχώς, ο 'φραγμός' που σχηματίζει το δέρμα και η διαρκής παραγωγή της ΚΣ, ως αποτέλεσμα της επιδερμικής διαφοροποίησης, ρυθμίζονται από τη διαδικασία της απολέπισης².

Στη διαδικασία της απολέπισης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ένα δίκτυο από πρωτεάσες, ρυθμιζόμενες από αναστολείς. Οι πρωτεάσες αυτές αποικοδομούν τις εξωκυττάρειες πρωτεΐνες συγκόλλησης των κorneοδεσμοσωμάτων που κρατούν τα κorneοκύτταρα συνδεδεμένα. Το αποτέλεσμα είναι τα κorneοκύτταρα να αποδεσμεύονται από την επιφάνεια του δέρματος¹³. Το υπεύθυνο πρωτεολυτικό σύστημα αποτελείται από προ-ένζυμα, ένζυμα, ενεργοποιητές ενζύμων και

αναστολείς¹⁷. Ένα μείγμα από πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης και ασπαρτικές πρωτεάσες εκκρίνεται από τον εξωκυττάριο χώρο του SC κατά την απολέπιση για να επιτευχθεί το σπάσιμο των κορνεοδεσμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, ανενεργά πρόδρομα πρωτεασών ενεργοποιούνται και ρυθμίζονται από πρωτεΐνες-αναστολείς. Η διάσπαση των εξωκυττάρων πρωτεϊνών των κορνεοδεσμοσωμάτων από τις πρωτεάσες οδηγεί στην εξασθένηση των δεσμών μεταξύ των κορνεοκυττάρων και επακόλουθα, στη μείωση της σύνδεσής τους¹³.



Εικόνα 5: Κατά τη φυσιολογική διεργασία της απολέπισης, τα κορνεοδεσμοσώματα στην επιφάνεια αρχίζουν να σπάζουν και τα κορνεοκύτταρα απομακρύνονται από την επιφάνεια του δέρματος¹³.

1.7. Το πρωτεολυτικό σύστημα απολέπισης

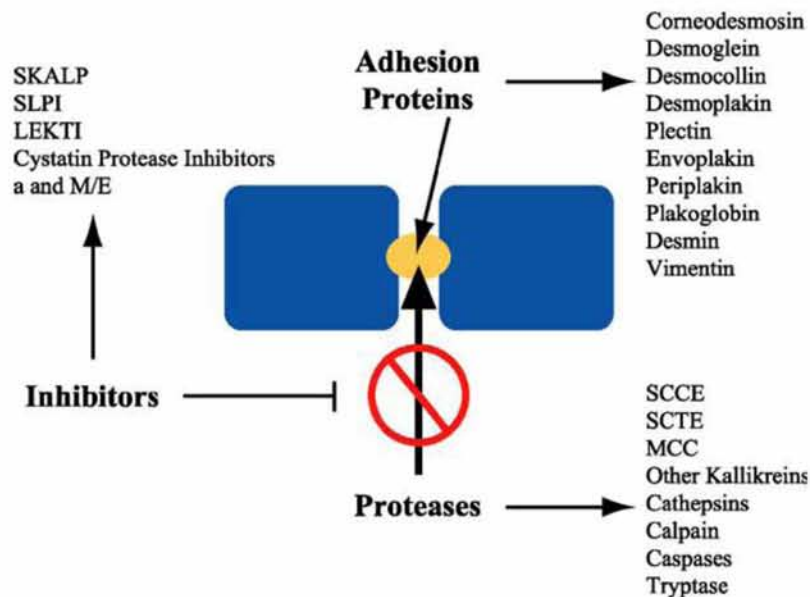
Η κεράτινη στιβάδα (ΚΣ) έχει δεχθεί ότι περιέχει πολλές πρωτεάσες υπεύθυνες για τη διαδικασία της απολέπισης. Ανάμεσα σ'αυτές συγκαταλέγεται η πρωτεάση χυμοθρυψίνης (SCCE, human kallikrein 7, hK7, KLK7) και η πρωτεάση τρυψίνης (SCTE, hK5, KLK5) που ανήκουν στην οικογένεια των καλλικρινών (kallikrein family)¹⁷. Στην οικογένεια αυτή ανήκει και η KLK8 που είναι άφθονη στην ΚΣ και έχει δράση τρυψίνης, όπως και η KLK14 που εμφανίζει κυρίως δράση τρυψίνης, αλλά και σημαντική δράση χυμοθρυψίνης¹⁸. Αυτές είναι πρωτεάσες σερίνης που δρουν σε αλκαλικό pH, εκφράζονται στα κερατινοκύτταρα και είναι παρούσες στους εξωκυττάρους χώρους του SC¹¹.

Η πρωτεάση SCCE (KLK7) έχει δειχθεί ότι υδρολύει τη δεσμοσίνη και τη δεσμοκολλίνη 1 των κορνεοδεσμοσωμάτων, σε αντίθεση με την πρωτεάση SCTE (KLK5) που διασπά την δεσμογλίνη 1 (DSG 1)¹³. Πρόσφατα η KLK14 βρέθηκε ότι αποικοδομεί τη DSG με μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με την KLK5¹¹. Αυτές πρωτεάσες, KLK7, KLK5, KLK14, παράγονται ως ανενεργά πρόδρομα. Η απομάκρυνση των προπεπτιδίων, μετά από πέψη με τρυψίνη, καταλήγει στο σχηματισμό των πρωτεολυτικά ενεργών ενζύμων. Μελέτες έχουν αποκαλύψει πως η KLK5 έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τις KLK7 και KLK14, όπως και τον εαυτό της. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η KLK5 ίσως αποτελεί τον αρχικό ρυθμιστή του 'KLK- πρωτεολυτικού καταρράκτη' στο SC¹¹. Άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στην απολέπιση είναι πρωτεάσες κυστεΐνης (καθεψίνη L2), η ασπαρτική πρωτεάση cathepsin D, L-like έζυμα, καθώς και πολλές γλυκοσιδάσες¹³.

1.8. Ρύθμιση των πρωτεασών απολέπισης

Οι ενεργότητες των πρωτεασών που εμπλέκονται στη διαδικασία της απολέπισης ρυθμίζονται από διάφορες πρωτεάσες-αναστολείς, οι οποίες ελέγχουν το ρυθμό αποικοδόμησης των κορνεοδεσμοσωμάτων (Εικόνα 6).

Η ενεργότητα της πρωτεάσης SCCE ρυθμίζεται από τον αναστολέα λευκοπρωτεάσης σερίνης και την ελαφίνη, γνωστή και ως αντιλευκοπρωτεάση που παράγεται από το δέρμα, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά στα κορνεοκύτταρα. Αντι-SCCE δράση φαίνεται να έχει και ο λεμφοεπιθηλιακός αναστολέας πρωτεάσης σερίνης Kazal-type 5 που κωδικοποιείται από το γονίδιο SPINK5. Αυτός ο αναστολέας εκφράζεται στις ίδιες περιοχές με την SCCE και συνδέεται με το σύνδρομο Netherton, μια κατάσταση του δέρματος λόγω δυσλειτουργίας του φυσικού 'φραγμού'. Η ανθρώπινη επιδερμίδα, επίσης, εκφράζει τις πρωτεάσες-αναστολείς κυστατίνη A και M/E, που είναι εξειδικευμένες πρωτεάσες κυστεΐνης¹³.



Εικόνα 6: Ρύθμιση της απολέπισης από πρωτεάσες, όπως οι πρωτεάσες kallikrein και από αναστολείς των πρωτεασών. Στην εικόνα φαίνονται και οι πρωτεΐνες συγκόλλησης των κορνεοδεσμοσωμάτων, οι οποίες αποικοδομούνται από τις πρωτεάσες¹³.

1.9. Το pH του δέρματος

Το δέρμα παρουσιάζει ένα όξινο pH, γνωστό ως acid mantle, που συνεισφέρει στην καλύτερη λειτουργία του φυσικού 'φραγμού' αυτού του ιστού. Στον άνθρωπο, το pH της επιφάνειας του δέρματος είναι σχεδόν ουδέτερο κατά τη γέννηση (pH 6.5) και φτάνει στο φυσιολογικό όριο μερικές εβδομάδες μετά τη γέννηση.

Παρόλο που το acid mantle του SC αρχικά θεωρούνταν αρχικά ότι προέρχεται από εξωγενείς πηγές (μεταβολίτες μικροοργανισμών, ελεύθερα λιπαρά οξέα, προϊόντα από εκκριτικούς αδένες), πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ενδογενή

μονοπάτια, όπως η παραγωγή παραπροϊόντων της κερατινοποίησης, η σύνθεση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, καθώς και η αντλία $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, αποτελούν επιπρόσθετες πηγές. Οι παράγοντες NMF, για παράδειγμα, συμβάλλουν σημαντικά στο όξινο pH του δέρματος, το οποίο με τη σειρά του έχει πολλές επιδράσεις στο δέρμα. Συγκεκριμένα:

- ✓ παρουσιάζει ισχυρή ανιμικροβιακή δράση
- ✓ μειώνει την αποίκηση των παθογόνων βακτηρίων στο δέρμα
- ✓ ευνοεί την προσκόλληση των μη παθογόνων βακτηρίων στο δέρμα
- ✓ παίζει ρόλο στην απολέπιση, στη διατήρηση της ομοιόστασης του 'φραγμού' του δέρματος αλλά και την ακεραιότητα του SC.

Οι πρωτεάσες σερίνης που εμπλέκονται στη διαδικασία της απολέπισης, όπως η KLK5 και η KLK7, παρουσιάζουν τη βέλτιστη δράση τους σε ουδέτερο-ελαφρώς αλκαλικό pH. Μια αλλαγή του pH από 7.5 στο 5.5 μειώνει την ενεργότητα της KLK7 στο 50%. Η ενεργότητα αυτή ελέγχεται in vivo από τη δράση του ευαίσθητου στο pH αναστολέα, LEKTI. Αντίθετα, η καθεψίνη D και οι γλυκοσιδάσες έχουν βέλτιστο σε όξινο pH. Με άλλα λόγια, η βαθμίδωση του pH κατά μήκος της επιδερμίδας είναι πολύ σημαντική στη ρύθμιση της απολέπισης και στην παραγωγή του λιπιδικού εξωκυττάριου δικτύου.

Όταν το pH του δέρματος αυξάνεται, αναστέλλοντας για παράδειγμα το μεταφορέα $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, παρατηρείται διαταραχή του επιδερμικού 'φραγμού'. Η διαταραχή αυτή διορθώνεται μετά από έκθεση της περιοχής του δέρματος σε όξινο διάλυμα¹¹.

1.10. Ατοπική δερματίτιδα

Κατά τη δεκαετία του 1920 διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι ορισμένα άτομα, και άλλα μέλη των οικογενειών τους, είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στο να αναπτύσσουν αλλεργικές αντιδράσεις σε συγκεκριμένα αλλεργιογόνα. Αυτές οι αντιδράσεις συνήθως εκδηλώνονται:

- στη μύτη → αλλεργική ρινίτιδα
- στα μάτια → αλλεργική επιπεφυκίτιδα
- στους πνεύμονες → αλλεργικό άσθμα
- στα έντερα → τροφική αλλεργία
- στο δέρμα → ατοπική δερματίτιδα

Η προδιάθεση για εκδήλωση τέτοιων διαταραχών είναι γνωστή ως «ατοπική ιδιοσυγκρασία»¹⁹ και τα άτομα που τείνουν να τις εκδηλώνουν ονομάζονται «ατοπικά»²⁰.

Η ατοπική δερματίτιδα (ΑΔ) είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης και βασανιστικά κνησμώδης δερματοπάθεια που συνδέεται με υπερενεργοποίηση του δέρματος σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα που είναι αβλαβή στους υγιείς μη-ατοπικούς ανθρώπους¹³. Παρουσιάζεται συνήθως κατά τη νηπιακή και παιδική ηλικία αλλά μπορεί να συνεχιστεί ή να αρχίσει και κατά την περίοδο ενηλικίωσης. Το ενδιαφέρον

εστιάζεται κυρίως στην αυξανόμενη διάδοσή της αλλά και στις επιπτώσεις που εμφανίζει στην ποιότητα ζωής²¹.

1.10.1. Επιδημιολογία της ασθένειας

Η ατοπική δερματίτιδα είναι μια από τις συχνότερες δερματικές παθήσεις της παιδικής ηλικίας, με επίπτωση που φτάνει το 25% στις ΗΠΑ, την Ευρώπη και την Ιαπωνία²² και το 10-20% παγκοσμίως²¹. Η νόσος εμφανίζεται στο 60% των περιπτώσεων στο πρώτο έτος της ζωής, και στο 85% μέχρι την ηλικία των 5 ετών²². Η εξάπλωση της ΑΔ έχει αυξηθεί 2-3 φορές τα τελευταία 30 χρόνια στις βιομηχανοποιημένες χώρες, παραμένει ωστόσο πολύ χαμηλότερη στις κατεξοχήν αγροτικές περιοχές, όπως η Κίνα, η ανατολική Ευρώπη και η Αφρική²¹. Σύμφωνα με τη θεωρία της 'υγιεινής', η διαφοροποίηση αυτή θα πρέπει να αποδοθεί στη μείωση του αντιγονικού ερεθισμού από λοιμογόνους παράγοντες κατά τη νηπιακή ηλικία, λόγω της βελτίωσης της υγιεινής φροντίδας και της ευρείας χρήσης των αντιβιοτικών στις βιομηχανοποιημένες χώρες. Αντίθετα, η ζωή στις αγροτικές περιοχές με τη στενή διαβίωση σε μεγάλες ομάδες και την επαφή με τα οικιακά ζώα, πιθανώς να αποτελεί παράγοντα προστασίας από την εκδήλωση της ΑΔ²². Αξιοσημείωτο αποτελεί ακόμη το γεγονός ότι, η ασθένεια αυτή είναι πιο κοινή στις υψηλές κοινωνικά τάξεις²¹.

Μεγάλες αποκλίσεις όσον αφορά την εξάπλωση της ΑΔ έχουν αναφερθεί μέσα σε χώρες που κατοικούνται από παρόμοιες εθνικές ομάδες, υποδεικνύοντας ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν την έκφραση της ασθένειας αυτής. Αποτελέσματα από συγκριτικές μελέτες στην ανατολική και δυτική Γερμανία έχουν επιβεβαιώσει ότι ο τρόπος ζωής και το περιβάλλον παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση των ατοπικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου της ατοπικής δερματίτιδας. Κάποιοι από τους παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με την αύξηση της ΑΔ περιλαμβάνουν: μικρό αριθμό μελών στην οικογένεια, αυξημένο εισόδημα και εκπαίδευση, μετανάστευση από αγροτικό σε αστικό περιβάλλον και αυξημένη χρήση αντιβιοτικών. Ουσιαστικά, οι παράγοντες αυτοί αποτελούν το δυτικό τρόπο ζωής. Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζονται από μελέτες που αναφέρουν ότι οι αλλεργικές απαντήσεις καθοδηγούνται από Th 2 ανοσοαποκρίσεις, ενώ οι μολυσματικές ασθένειες επάγονται από Th 1 ανοσοαπαντήσεις. Επιπλέον, οι Th 1 αποκρίσεις ανταγωνίζονται την ανάπτυξη των Th 2 κυττάρων. Συνεπώς, ο μειωμένος αριθμός μολύνσεων ή η απουσία των Th 1 διεγερτικών σημάτων (όπως η ενδοτοξίνη) κατά την πρώιμη παιδική ηλικία μπορεί να προδιαθέσουν τα παιδιά σε ενισχυμένες αλλεργικές απαντήσεις, όπως η έκφραση ατοπικής δερματίτιδας²¹. Αντίθετα, ο επαναλαμβανόμενος ερεθισμός από τοξίνες και μικροβιακούς παράγοντες (αγροτικές περιοχές) ευνοούν τη δραστηριότητα των Th 1 εις βάρος των Th 2 και προφυλάσσουν το νεογνό και το νήπιο²².

1.10.2. Κλινική διάγνωση της ατοπικής δερματίτιδας

Η ατοπική δερματίτιδα εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων (Πίνακας 2). Τα πιο ήπια συμπτώματα είναι ξηρές, ωχρές κηλίδες στο δέρμα (pityriasis alba) ή εκζέματα των χεριών, ενώ τα πιο σοβαρά περιλαμβάνουν ερυθρόδερμα εξανθήματα.

Η φαγούρα και οι χρόνιες εκζεματοειδείς περιοχές με χαρακτηριστικό σχήμα και εξάπλωση αποτελούν τα κυριότερα συμπτώματα της ΑΔ, απαραίτητα για τη διάγνωση. Παρόλο που η φαγούρα παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ημέρας, συνήθως επιδεινώνεται νωρίς το απόγευμα και το βράδυ. Τα αποτελέσματα της φαγούρας είναι η τραχιά επιδερμίδα και η εμφάνιση λειχήνων και μικρών φουσκάλων στο δέρμα. Τα αλλεργιογόνα (μη-μικροβιακά αντιγόνα¹⁹), η μειωμένη υγρασία και η υπερβολική εφίδρωση μπορεί να αυξήσουν τη φαγούρα και να κάνουν πιο τραχιά την επιδερμίδα (Εικόνα 7β).

Panel 1: Clinical features of atopic dermatitis*

Essential features

Pruritus
Facial and extensor eczema in infants and children
Flexural eczema in adults
Chronic or relapsing dermatitis

Frequently associated features

Personal or family history of atopic disease
Xerosis
Cutaneous infections
Non-specific dermatitis of the hands or feet
Raised serum IgE concentrations
Positive immediate-type allergy skin tests
Early age of onset

Other features

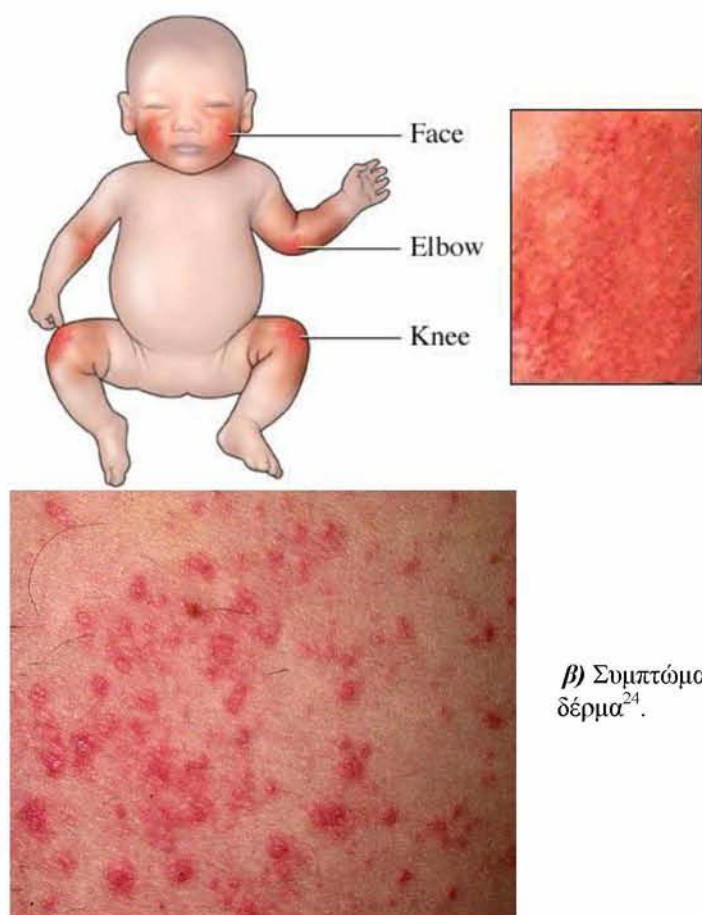
Ichthyosis, palmar hyperlinearity, keratosis pilaris
Pityriasis alba
Nipple eczema
White dermatographism and delayed blanch response
Anterior subcapsular cataracts, keratoconus
Dennie-Morgan infraorbital folds, orbital darkening
Facial erythema or pallor

*Other skin disorders that can mimic atopic dermatitis should be excluded.

Πίνακας 2: Κλινικά χαρακτηριστικά της ατοπικής δερματίτιδας²¹.

Αιχμηρές περιοχές δέρματος παρατηρούνται, επίσης, σε παιδιά και χαρακτηρίζονται από έντονα κόκκινες φουσκάλες με φαγούρα σε συνδυασμό με εκδορές και ορώδεις εκκρίσεις. Η χρόνια ατοπική δερματίτιδα εμφανίζει ανάπτυξη λειχήνων, φουσκάλων και εκδορών. Σε όλα τα στάδια της ασθένειας οι ασθενείς παρουσιάζουν ξηρό δέρμα. Η εξάπλωση και η αντίδραση του δέρματος ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ασθενή και την ένταση της ασθένειας. Κατά τη νηπιακή ηλικία, η ατοπική δερματίτιδα είναι γενικώς πιο έντονη και προσβάλλει κυρίως το πρόσωπο, το κεφάλι και τις εξωτερικές επιφάνειες των άκρων (Εικόνα 7α). Στα μεγαλύτερα παιδιά καθώς και στους χρόνιους ασθενείς, παρατηρείται δημιουργία λειχηνών και τοποθέτηση των εξανθημάτων στις αναδιπλωμένες επιφάνειες των άκρων²¹. Γενικότερα, το πρόσωπο, οι πτυχές και οι καμπτικές επιφάνειες είναι περιοχές που αποτελούν κατεξοχήν θέσεις εντόπισης της ΑΔ, στις οποίες παρατηρείται πιο έντονη λέπτυνση της κερατίνης²². Τα χρόνια εκζέματα των χεριών

στους ενήλικους μπορεί να αποτελούν τις αρχικές εκδηλώσεις της ατοπικής δερματίτιδας²¹.



Εικόνα 7: α) Στα παιδιά, η ατοπική δερματίτιδα συνήθως επηρεάζει τα μάγουλα, τα γόνατα και τους αγκώνες²³.

β) Συμπτώματα της ατοπικής δερματίτιδας στο δέρμα²⁴.

Δραματικές είναι οι επιπτώσεις της ΑΔ και στην ποιότητα ζωής των ασθενών, καθώς προκαλείται στρες, διαταραχές ύπνου και συγκέντρωσης, αλλά και χαμηλή αυτοεκτίμηση. Ταυτόχρονα, επηρεάζει δυσμενώς και την ποιότητα ζωής των γονέων και τη φροντίδα των υπολοίπων, μη νοσούντων, παιδιών της οικογένειας. Φαίνεται επίσης πως υπάρχει στενή συσχέτιση του επιπέδου άγχους την ώρα της εξέτασης ή της γενικότερης αντίδρασης συμπεριφοράς του ασθενούς και του βαθμού έντασης των εκδηλώσεων ατοπίας, ιδιαίτερα της ΑΔ. Συχνά ωστόσο αυτή η παρατήρηση, δεν αξιοποιείται στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών²².

1.10.3. Θεραπεία της ατοπικής δερματίτιδας

Η θεραπεία της ατοπικής δερματίτιδας βασίζεται στη χρήση ενυδατικών προϊόντων, τοπικών ή/και συστηματικών αντιβιοτικών, τοπικών κορτικοειδών και ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων. Η μακροχρόνια θεραπεία με ισχυρά ή μέσης ισχύος κορτικοστεροειδή, οδηγεί στη λεπτύνση της επιδερμίδας, ως αποτέλεσμα της

αναστολής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και της επιτάχυνσης της ωρίμανσής τους. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται βλάβη του δερμοεπιδερμικού φραγμού. Στις πολύ σοβαρές μορφές της νόσου, χρησιμοποιούνται η υπεριώδης ακτινοβολία, τα συστηματικά στεροειδή στις εξάρσεις και τα ανοσοκατασταλτικά συστηματικά φάρμακα, με κύριο εκπρόσωπο την κυκλοσπορίνη.

Η σχετικά πρόσφατα ανακάλυψη των αναστολέων καλσινευρίνης, προσέφερε μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική πρόταση στην αντιμετώπιση, αλλά και την πρόληψη των εξάρσεων της ατοπικής δερματίτιδας. Παρά τη μεγάλη διείσδυσή τους στο δέρμα, η συστηματική απορρόφησή τους είναι εξαιρετικά χαμηλή και παρατηρείται τοξικότητα μόνο όταν η συγκέντρωσή τους στο αίμα είναι πολύ αυξημένη²².

1.10.4. Μορφές ατοπικής δερματίτιδας

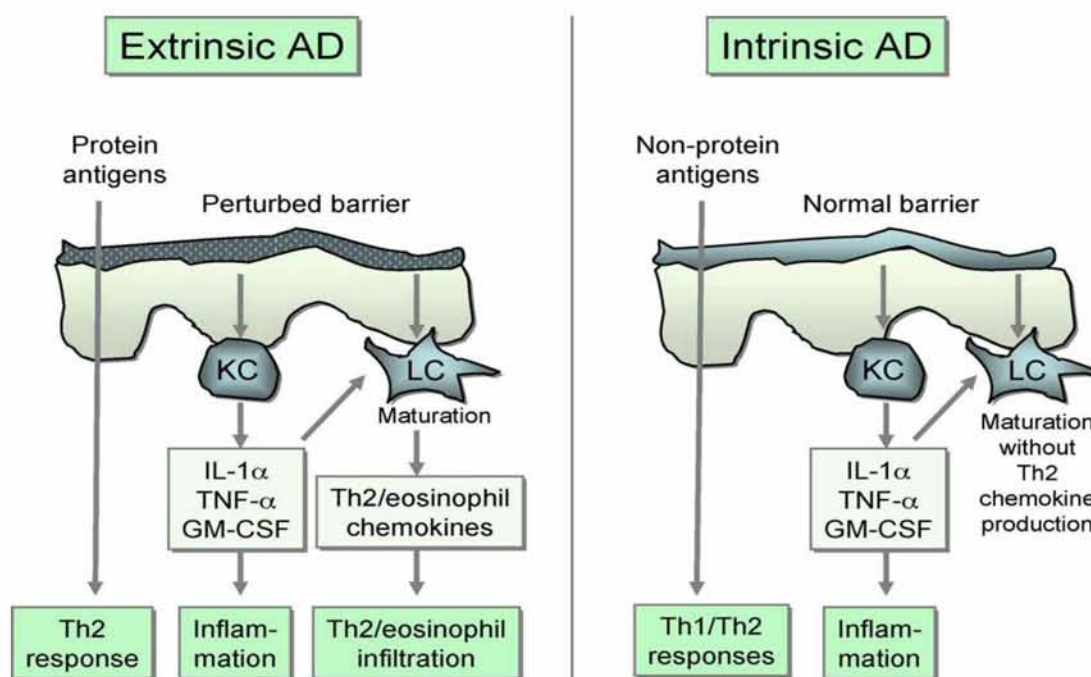
Οι ατοπικές διαταραχές συνιστούν ένα σημαντικό τμήμα της ανοσοπαθολογίας του ανθρώπου στον δυτικό κόσμο και εκδηλώνονται τουλάχιστον στο 5% του πληθυσμού¹⁹. Ο ατοπικός χαρακτήρας (atopy) μπορεί να προσδιοριστεί ως η αυθόρμητη τάση ενός ατόμου, κατά την παιδική συνήθως ηλικία και την εφηβεία, να συνθέτει μεγάλα ποσά IgE ανοσοσφαιρινών, οι οποίες αντιδρούν με ένα ή περισσότερα συνήθη αντιγόνα²⁵. Από πολύ παλιά επομένως, έγινε φανερό ότι πολλά άτομα με αλλεργικές ασθένειες είχαν πολύ αυξημένα επίπεδα ολικών IgE. Κάτι ανάλογο είχε παρατηρηθεί και σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα. Ωστόσο, η σύνδεση μεταξύ της ΑΔ και της αλλεργιοειδικής- IgE ευαισθησίας παραμένει αμφίβολη. Αυτό οφείλεται στην ασάφεια του ορισμού 'τι αποτελεί ένα ατοπικό άτομο'. Για την ΑΔ έχει εισηχθεί ο όρος «σύνδρομο ατοπικού εκζέματος-δερματίτιδας» (atopic eczema-dermatitis syndrome)²⁵.

Η ατοπική δερματίτιδα διαχωρίζεται συχνά σε 2 υποκατηγορίες, την «αληθινή» ατοπική (true AD) δερματίτιδα και την «μη-ατοπική» (non-atopic) δερματίτιδα. Το κριτήριο του διαχωρισμού αυτού είναι αν ο ασθενής έχει αυξημένα τα επίπεδα IgE αντισωμάτων, το οποίο είναι ενδεικτικό της ανοσολογικής υπερενεργοποίησης. Όταν είναι πιο ήπια, η δερματίτιδα συνήθως είναι μη-ατοπική και μπορεί φυσιολογικά να ελεγχθεί με κατάλληλη διακοπτόμενη θεραπεία. Σε πολύ σοβαρή όμως μορφή ατοπικής δερματίτιδας, τα ολικά επίπεδα IgE είναι >10,000U και η θεραπεία πρέπει να είναι συστηματική¹¹.

Η πρώτη μορφή ΑΔ, που ορίζεται και ως εξωγενής²² (extrinsic form), συνδέεται με αυξημένα επίπεδα των ολικών IgE αντισωμάτων αλλά και των ειδικών στα περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα IgE¹³. Επιπλέον, σχετίζεται με την ανάπτυξη τροφικής αλλεργίας και κυρίως άσθματος και αλλεργικής ρινίτιδας¹⁹. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η αλλεργική ευαισθησία του δέρματος προδιαθέτει τα άτομα σε αναπνευστικές ασθένειες²¹.

Η δεύτερη μορφή, ονομάζεται επίσης ενδογενής²² (intrinsic form) και είναι η μη αλλεργική μορφή. Εμφανίζει τα επίπεδα των IgE μέσα στα φυσιολογικά όρια, ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, και καμία αύξηση των ειδικών IgE στα περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα¹³. Παρόλα αυτά, στο 80% των ασθενών με «μη-ατοπική» ΑΔ, τα επίπεδα των IgE αυξάνονται διαδοχικά και οι ασθενείς τελικά εμφανίζουν «αληθινή» ΑΔ. Το υπόλοιπο 20% των ασθενών συνεχίζει να εμφανίζει τη μη-ατοπική μορφή και ποτέ δεν παρουσιάζει αυξημένα IgE.

Οι δύο μορφές της ΑΔ εμφανίζουν αρκετές διαφορές σε ανοσολογικό επίπεδο. Αναλυτικότερα, τα υπεύθυνα αντιγόνα είναι πρωτεΐνες στην αλλεργική μορφή (extrinsic AD), ενώ στη μη-αλλεργική μορφή (intrinsic AD) είναι μη πρωτεϊνικά. Και στις 2 μορφές, τα αντιγόνα διεγείρουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα κερατινοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένου των IL-1 α , TNF- α και GM-CSF που προάγουν την ωρίμανση των κυττάρων Langerhans (LC). Στην αλλεργική μορφή, τα κύτταρα LC παράγουν τις χημειοκίνες CCL17/TARC, CCL22/MDC και CCL5/RANTES. Με τον τρόπο αυτό επάγονται τα Th2 κύτταρα και τα εωσινόφιλα. Από την άλλη πλευρά, στη δεύτερη μορφή της ΑΔ οι χημειοκίνες αυτές δεν παράγονται από τα κύτταρα LC²⁶(Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Οι δύο μορφές της ατοπικής δερματίτιδας και οι ανοσολογικές διαφορές τους²⁶.

1.10.5. Το ανοσολογικό σύστημα στην ατοπική δερματίτιδα

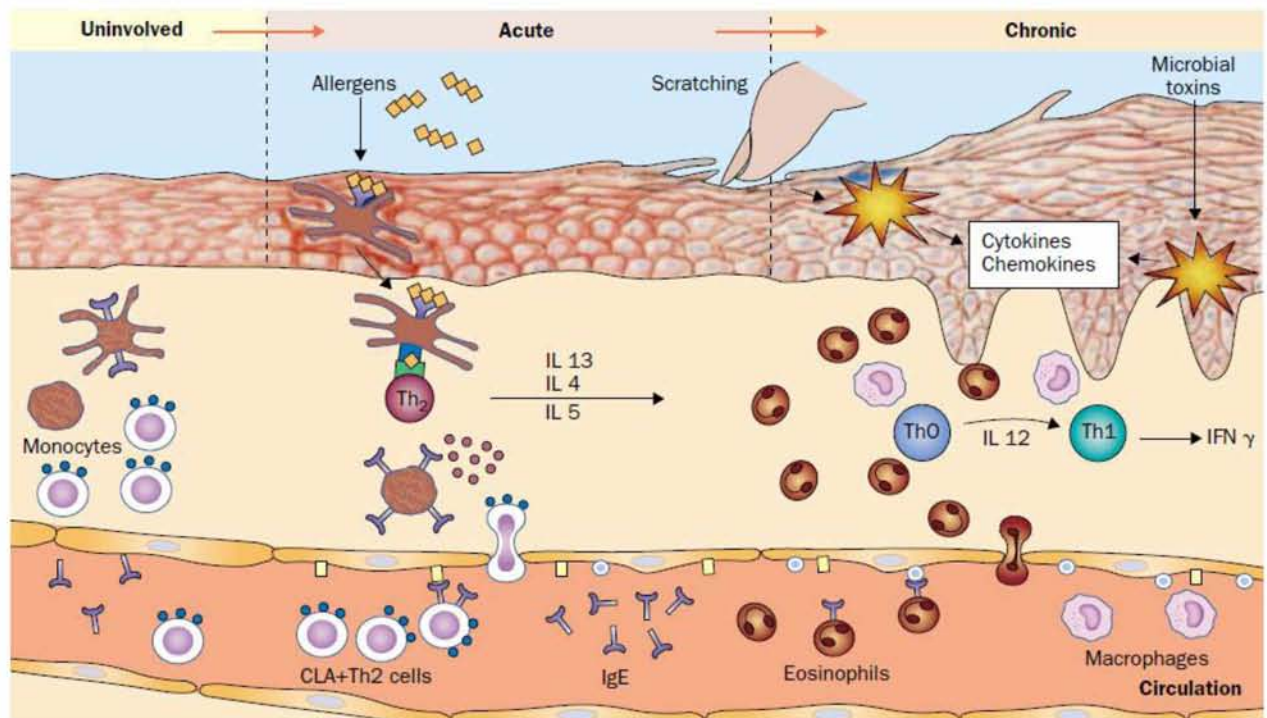
Η ατοπική δερματίτιδα φαίνεται ότι έχει ανοσολογική βάση²¹, καθώς κυρίαρχη είναι η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρωταρχικό ρόλο διαδραματίζει η κυριαρχία των Th2 κυττάρων, τα οποία πρωταγωνιστούν στις αλλεργικές αντιδράσεις, όπως προαναφέρθηκε. Στο οξύ στάδιο είναι η ανεπαρκής δράση των Th1 κυττάρων, ενώ στο χρόνιο στάδιο είναι τα Th1 κύτταρα αυτά που συντηρούν τη νόσο. Είναι αξιοσημείωτο πως αυτή η ανισορροπία των Th2/Th1 κυττάρων παρατηρείται επίσης και σε φυσιολογικά βρέφη και μικρά παιδιά, γεγονός που ίσως εξηγεί την αυξημένη επίπτωση της νόσου σε αυτές τις ηλικίες.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια υποτυπώδης Th1 αντίδραση, η οποία εκφράζεται με την παραγωγή INF- γ και μία αυξημένη ετοιμότητα για παραγωγή των ιντερλευκινών IL-4 και IL-13, οι οποίες χαρακτηρίζουν τα Th2 κύτταρα. Στα φυσιολογικά άτομα, η παραγωγή INF- γ ως απόκριση σε πολυκλωνικά ερεθίσματα

είναι μειωμένη κατά τη γέννηση, αλλά αυξάνει μετά την ηλικία των τριών ετών, πλησιάζοντας τα επίπεδα των ενηλίκων. Η ικανότητα παραγωγής της κυτταροκίνης IL-4 από τα Th2 κύτταρα είναι επίσης μειωμένη κατά τη γέννηση. Αυξάνει όμως ραγδαία στον 4^ο μήνα της ηλικίας, φτάνοντας σε επίπεδα υψηλότερα των ενηλίκων στο τέλος της βρεφικής ηλικίας, οπότε και αρχίζει να μειώνεται φτάνοντας σταδιακά στα επίπεδα των ενηλίκων. Παρότι η ανωριμότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των νεογνών να παράγει μία ισχυρή Th1 κυτταρική αντίδραση στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν προκαλεί κλινικά παθολογικές καταστάσεις, η περαιτέρω ανάσχεση της ωρίμανσής του από κάποιο εξωτερικό παράγοντα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση κλινικά έκδηλης νόσου.

Καθοριστικός στην ατοπική δερματίτιδα φαίνεται και ο ρόλος της ισταμίνης. Η απελευθέρωση της ισταμίνης από τα ενεργοποιημένα σιτευτικά κύτταρα, βασεόφιλα και μονοκύτταρα του φλεγμαίνοντος δέρματος, επηρεάζει την ωρίμανση των ανοσοκυττάρων και επιδρά στην ενεργοποίηση, πόλωση και χημειοταξία τους, ενώ δρα ρυθμιστικά στα Th1 και Th2 κύτταρα. Φαίνεται λοιπόν ότι, η ισταμίνη αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ των αντιδράσεων της άμεσης υπερευαισθησίας (τύπου 1) και της κυτταρικής (T-λεμφοκύτταρα) ανοσίας.

Στην εξωγενή μορφή της AD υπάρχει άμεση συσχέτιση των ειδικών IgE αντισωμάτων και των αντίστοιχα ενεργοποιημένων από τροφικά και εισπνεόμενα αλλεργιογόνα, T-κυττάρων. Ο αριθμός των CD4⁺ κυττάρων είναι αυξημένος στο περιφερικό αίμα, ενώ αντίθετως μειωμένος είναι ο αριθμός των CD8⁺ κυτταροτοξικών/κατασταλτικών κυττάρων. Ωστόσο, τα CD8⁺ CLA⁺ κύτταρα μνήμης, παρουσιάζουν αυξημένη ετοιμότητα αντίδρασης στα υπεραντιγόνα, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας. Η προαναφερθείσα συσχέτιση με το ψυχικό στρες φαίνεται και από πρόσφατες έρευνες που έδειξαν πως το τελευταίο προκαλεί ανοσολογικές μεταβολές στους ασθενείς με AD, αυξάνοντας τα CD8⁺ κύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα CLA⁺ κύτταρα και τα κύτταρα που παράγουν IL-5²². Στην Εικόνα 9 περιγράφονται τα διάφορα ανοσολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ατοπική δερματίτιδα.



Εικόνα 9: Ανοσολογικά μονοπάτια στην ατοπική δερματίτιδα²¹.

1.10.6. Αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην ατοπική δερματίτιδα

Η εξάπλωση της ατοπικής δερματίτιδας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρουσιάζει μια προοδευτική αύξηση στις αναπτυγμένες κοινωνίες από το 1940. Πώς όμως είναι δυνατόν η εξάπλωση της ΑΔ να αυξάνεται τόσο δραματικά αν οι παράγοντες που την καθορίζουν είναι μόνο γενετικοί; Η αύξηση της εξάπλωσής της υποδηλώνει ότι οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος πρέπει να είναι καθοριστικές για την έκφραση της ασθένειας¹¹. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπεύθυνων γονιδίων, του περιβάλλοντος, φαρμακολογικών διαταραχών και των ανοσολογικών παραγόντων συμβάλλουν, συνεπώς, στην παθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας²¹. Συγκεκριμένα για την ατοπική δερματίτιδα, οι μελέτες διδύμων έχουν δείξει συμπτωτικότητα μικρότερη από το 100% για τους ΜΖ διδύμους (72-86%), αλλά πολύ υψηλότερη σε σχέση με τους ΔΖ διδύμους (21-23%). Αυτό υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των γενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της ΑΔ²⁷.

Η ατοπική δερματίτιδα επομένως είναι μια πολυπαραγοντική και ετερογενής γενετική ασθένεια¹³. Η ετερογένεια αιτιολογείται επειδή η ευπάθεια στην ΑΔ προκαλείται από διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα²⁸. Ο αριθμός (‘δόση’) και ο συνδυασμός των εμπλεκόμενων παραγόντων καθορίζουν τη σοβαρότητα και την πιθανότητα έκφρασης της αναπτυσσόμενης ασθένειας¹¹. Το πιο πιθανό μοντέλο για την ανάπτυξη της ΑΔ περιγράφει την επίδραση μιας ‘γενετικής δόσης’ και μιας ‘περιβαλλοντικής δόσης’. Για παράδειγμα, αν ένα άτομο έχει μια μετάλλαξη σε 5 υπεύθυνα γονίδια για την ΑΔ, τότε οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που απαιτούνται για την εκδήλωση της ασθένειας μπορεί να είναι μηδαμινοί. Αν υπάρχουν μεταλλάξεις

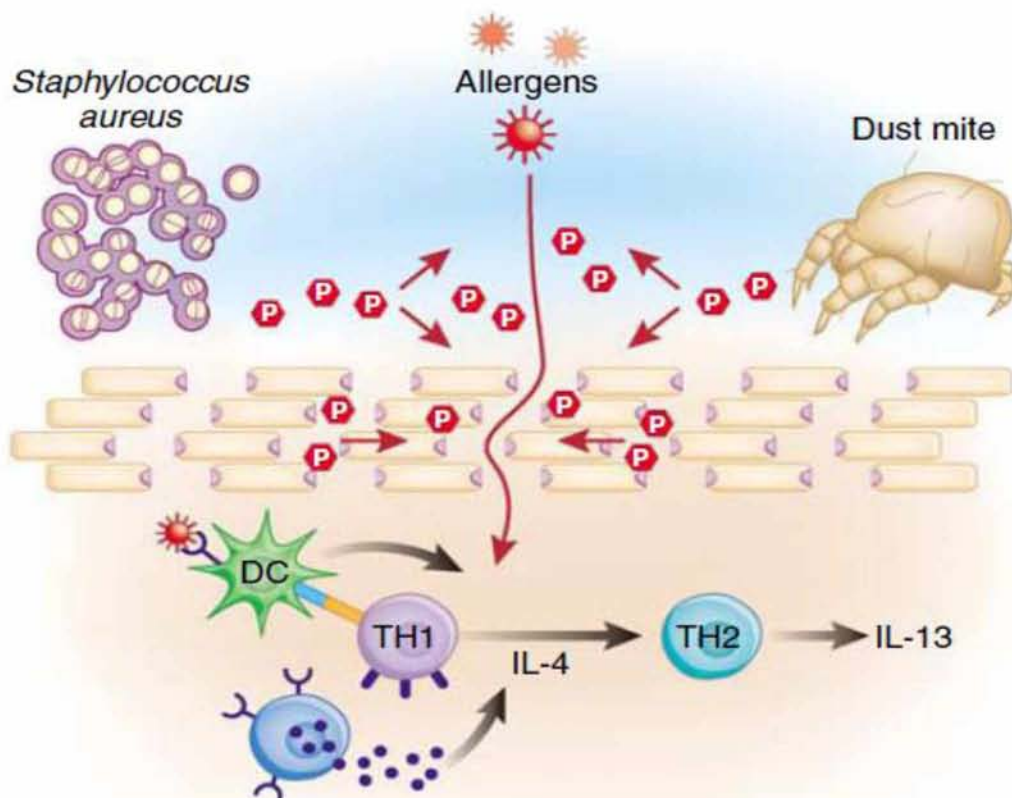
σε 2 από τα γονίδια όμως, τότε απαιτείται πολύ περισσότερη περιβαλλοντική έκθεση για την εκδήλωσή της¹³.

1.10.7. Διαταραχή επιδερμικού φραγμού: αίτιο ή αποτέλεσμα;

Η διαταραχή του δερματικού φραγμού είναι παρούσα τόσο στις εκζεματοειδείς όσο και στις κλινικώς φυσιολογικές περιοχές στους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα. Για πολλά χρόνια υπήρχε η διαμάχη για το αν η διαταραχή αυτή ήταν κύρια και λειτουργούσε ως αιτία της ΑΔ, ή ήταν το αποτέλεσμα των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και της φλεγμονής²⁹.

Η υπόθεση ότι η διαταραχή του φραγμού διαπερατότητας μπορεί να καθορίζει την ΑΔ είναι γνωστή ως «outside–inside» hypothesis. Η αντίθετη, ανοσολογική πλευρά, γνωστή ως «inside–outside hypothesis» υποδεικνύει ότι η διάσπαση του φραγμού στην ΑΔ είναι δευτερογενής συνέπεια της ανοσολογικής απόκρισης στα ερεθίσματα και τα αλλεργιογόνα. Το ποια από τις 2 υποθέσεις είναι η σωστή δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί¹¹. Είναι όμως σίγουρο πως, με το που προκαλείται αλλεργική αντίδραση και ο φραγμός του δέρματος καταστρέφεται (είτε είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα στην προσβολή του δέρματος), πραγματοποιείται προοδευτική επιδείνωση της διαταραχής του φραγμού και ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αλλεργικής αντίδρασης και φλεγμονής. Ουσιαστικά λοιπόν, και οι δύο θεωρίες απευθύνονται σε διαφορετικά στάδια της ασθένειας²⁹. Η λειτουργία του φραγμού πάντως φαίνεται να μεταβάλλεται σε σχέση με τη μορφή της ασθένειας. Το γεγονός αυτό δείχνει πως μεταβολές στη λειτουργία του μπορεί να επηρεάζουν την σοβαρότητα της ΑΔ. Επιπλέον, η βλάβη του φραγμού από απορροπαντικά ή κόψιμο του δέρματος προκαλεί την απελευθέρωση και παραγωγή κυτταροκινών, όπως IL-1a, IL-b, παράγοντας tumor necrosis factor-a (TNF-a) και παράγοντας granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Αυτό υποδεικνύει πως η διαταραχή του φραγμού αρκεί για τη δημιουργία φλεγμονής και δερματίτιδας¹¹.

Στην Εικόνα 10 απεικονίζεται η βλάβη του επιδερμικού φραγμού στα άτομα με ατοπική δερματίτιδα. Η υπερενεργότητα των αποικοδομητικών πρωτεασών που βρίσκονται στην επιδερμίδα, μαζί με τις εξωγενείς πρωτεάσες που θα αναφερθούν παρακάτω, από έντομα ή *Staphylococcus aureus* για παράδειγμα, διευκολύνουν τη διάσπαση των κορνεοδεσμοσωμάτων. Η διαταραχή αυτή στον επιδερμικό 'φραγμό' επιτρέπει τη διείσδυση των αλλεργιογόνων. Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) που τοποθετούνται στη δερμίδα, παρουσιάζουν τα αλλεργιογόνα (allergens) στα Τ-βοηθητικά κύτταρα (TH). Τα CD4⁺ Τ κύτταρα στρατολογούνται (μπλε) και εκκρίνουν την IL-4. Τα ενεργοποιημένα DC και η IL-4 επάγουν τη μεταβολή από Th1 σε Th2, με την επακόλουθη απελευθέρωση των προφλεγμονώδων κυτταροκινών και αύξηση των IgE επιπέδων. Κλινικά, το αποτέλεσμα αυτής της απόκρισης είναι άσθμα¹¹.



Εικόνα 10: Η διαταραχή του 'φραγμού' της επιδερμίδας στα άτομα με ατοπική δερματίτιδα¹¹.

1.10.8. Υπεύθυνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

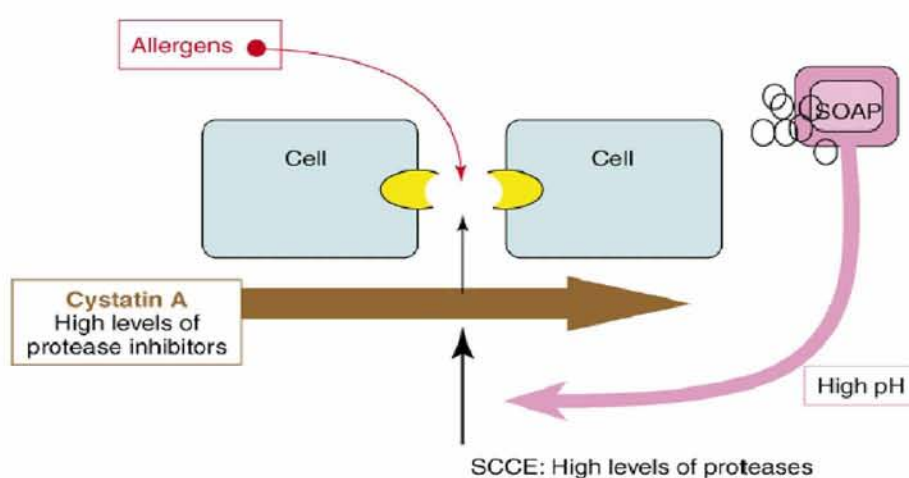
Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συνδεθεί με την ΑΔ. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η πλύση με σαπούνια και απορρυπαντικά, καθώς και η έκθεση σε ζούφια από τη σκόνη και αλλεργιογόνα από την τροφή. Τα ζούφια ειδικά αναπτύσσονται σε υγρασία, και η αύξηση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με την μείωση αερισμού στα σπίτια δημιουργούν ένα πιο ζεστό και υγρό περιβάλλον, που ευνοεί την ανάπτυξή τους.

Τα απορρυπαντικά χρησιμοποιούνται ευρέως για τον καθαρισμό του ανθρώπινου δέρματος. Μπορεί, όμως, να προκαλέσουν βλάβες στο δέρμα, αλλά και ξηρότητα, τραχύτητα, ερυθρότητα και πρήξιμο. Η χρήση σαπουνιών και επιφανειοδραστικών ουσιών που περιέχονται στα αφρίζοντα προϊόντα καθαρισμού είναι μία από τις πιο κοινές αιτίες που προκαλούν δερματίτιδα εξ επαφής στα χέρια, αλλά και εξάρσεις ατοπικής δερματίτιδας. Έχει δειχθεί πως στους ασθενείς με ΑΔ η διαδερμική απώλεια νερού (TEWL) είναι αυξημένη σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αυτό συμβαίνει διότι τα απορρυπαντικά αυξάνουν τη διαλυτότητα των λιπιδίων στην επιφάνεια του δέρματος.

Οι συνέπειες των σαπουνιών και απολυμαντικών στο δέρμα μπορούν να εξηγηθούν μερικώς από την απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτταροκινών από τα κορνεοκύτταρα. Ωστόσο, σημαντικές είναι οι επιπτώσεις τους στο pH του δέρματος. Η πλύση του δέρματος με σαπούνι αυξάνει το pH κατά 3U στις παλάμες των χεριών για περισσότερο από 90 λεπτά. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το αυξημένο pH έχει

καταστρεπτικές επιπτώσεις στον επιδερμικό φραγμό. Εκτός από την απελευθέρωση κυτταροκινών όμως, τα απορρυπαντικά φαίνεται ότι μεταβάλλουν την έκφραση των δεικτών της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και των πρωτεσών του SC²².

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη χρήση των σαπουνών και των απορρυπαντικών στην ατοπική δερματίτιδα. Η χρήση τους αυξάνει το pH του δέρματος από το φυσιολογικό που είναι στο 5.5 μέχρι το 7.5, και υψηλότερα μερικές φορές, μέχρι 10. Οι πρωτεάσες, όπως η SCCE, είναι ευαίσθητες σε μεταβολές του pH και εμφανίζουν τη βέλτιστη ενεργότητά τους σε ουδέτερο pH. Η πλύση του δέρματος με τα διάφορα απολυμαντικά παρέχει ένα σημαντικό περιβαλλοντικό ερέθισμα που, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεασών, οδηγεί σε ισχυρότερη βλάβη του επιδερμικού φραγμού στην ατοπική δερματίτιδα³⁰.



Εικόνα 11: Η χρήση σαπουνών και απορρυπαντικών στην ατοπική δερματίτιδα³⁰.

Ο *S. Aureous*, ως περιβαλλοντικός παράγοντας, εμπλέκεται στην παθογένεια της ΑΔ. Δεν αποτελεί μέλος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας που αποικεί το δέρμα, όμως στις εκζεματοειδείς περιοχές του δέρματος των ΑΔ ασθενών έχουν εντοπιστεί μέχρι και 14×10^6 οργανισμοί / cm^2 ¹¹. Ο αποικισμός του δέρματος από τον Χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο, αποτελεί σημαντικό παράγοντα επιδείνωσης της νόσου σε πολλούς ασθενείς με ΑΔ. Η μείωση των αμυντικών πρωτεϊνών του δέρματος στους ασθενείς με ΑΔ, όπως οι κανθελισιδίνες και οι ντεφενσίνες, προδιαθέτει την προσβολή από *S. Aureous*. Πολλά είδη *S. Aureous* παράγουν εξωτοξίνες με υπεραντιγονικές ιδιότητες που ενεργοποιούν τα Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ μπορούν να δράσουν και ως συμβατικά αλλεργιογόνα. Μελέτες δείχνουν ότι τόσο η σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη Β, όσο και η σταφυλοκοκκική α-τοξίνη επιδεινώνουν τη βαρύτητα της νόσου, προκαλώντας στους ευαίσθητοποιημένους ασθενείς την αύξηση του δείκτη SCORAD, ο οποίος καταμετρά αντικειμενικά και υποκειμενικά χαρακτηριστικά της νόσου²².

1.10.9. Εξωγενείς πρωτεάσες

Τα ζωύφια είναι πηγή για πάνω από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες που μπορούν να επάγουν IgE-διαμεσολαβούμενες αποκρίσεις. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι πρωτεάσες σερίνης και κυστεΐνης και έχει δειχθεί πως διασπούν τις πρωτεΐνες συγκόλλησης των κορνεοδεσμοσωμάτων.

Ο *S. Aureus* ίσως παίζει κάποιο ρόλο στη διάρκεια και τη σοβαρότητα της ΑΔ, λόγω της απελευθέρωσης των εξωτοξινών του. Εκτός από τις ανοσολογικές τους επιπτώσεις που προαναφέρθηκαν, οι τοξίνες αυτές βλάπτουν άμεσα το δέρμα. Ο *S. Aureus* παράγει πρωτεάσες που διασπούν τα κορνεοδεσμοσώματα, καθώς και λιπάσες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του λιπιδικού δικτύου που τα περιβάλλει. Οι εξωγενείς πρωτεάσες και οι λιπάσες από τα ζωύφια και τον *S. Aureus* ίσως συμβάλλουν στη διαταραχή του επιδερμικού φραγμού στην ατοπική δερματίτιδα¹¹.

1.10.10. Υπεύθυνοι γενετικοί παράγοντες

Πολλά γονίδια έχουν συνδεθεί με την αυξημένη παραγωγή των IgE αντισωμάτων, όπως της IL4 και του υψηλής συγγένειας IgE υποδοχέα. Ωστόσο, παρατηρήσεις ότι ένα μεγάλο ποσοστό παιδιών με ΑΔ δεν έχει αυξημένα IgE επίπεδα υποδεικνύει ότι άλλες κατηγορίες γονιδίων ίσως έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της ΑΔ¹³. Αφού η διαταραχή στον επιδερμικό φραγμό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελεί κρίσιμο γεγονός για την ανάπτυξη της ατοπικής δερματίτιδας, μεταλλάξεις στα γονίδια που ρυθμίζουν τη λειτουργία του, σχετίζονται με την ασθένεια. Έχουν ταυτοποιηθεί 3 κατηγορίες γονιδίων που οι μεταλλάξεις τους συνδέονται στενά με την ατοπική δερματίτιδα. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν την ακεραιότητα του επιδερμικού φραγμού. Η πιθανή συνέπεια των γενετικών μεταλλαγών τους είναι το πρόωρο σπάσιμο του φραγμού, που καταλήγει στο να γίνεται πιο λεπτός. Ένας λεπτός, ελαττωματικός φραγμός διευκολύνει τη διείσδυση των αλλεργιογόνων μέσα στο δέρμα. Αυτό μπορεί να αυξήσει το ρίσκο της ευαισθησίας στην ασθένεια, καθώς διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιγόνων και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων του δέρματος. Η αυξημένη διείσδυση των αλλεργιογόνων μέσα από την επιδερμίδα μπορεί να οδηγήσει στην έναρξη φλεγμονώδους απάντησης μέσα στο stratum corneum/stratum granulosum, επάγοντας την απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτταροκινών από τα κερατινοκύτταρα³⁰.

Οι 3 κατηγορίες γονιδίων που οι μεταλλάξεις τους σχετίζονται με την ΑΔ είναι οι εξής:

1.10.10.1. 1^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες του επιδερμικού φραγμού

Οι πιο σημαντικοί γενετικοί παράγοντες που σχετίζονται ΑΔ είναι οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του γονιδίου *FLG*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την προφίλλαγκρίνη, το πρόδρομο μόριο της δομικής πρωτεΐνης φιλλαγκρίνης και ανήκει στο σύμπλεγμα επιδερμικής διαφοροποίησης. Το σύμπλεγμα αυτό είναι μια

ομάδα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων και μερικές από αυτές συμπεριλαμβάνονται στον φάκελο CE. Η περιοχή αυτή συνδέεται ισχυρά με ένα μεγάλο αριθμό διαταραχών, όπως η ατοπική δερματίτιδα και η ψωρίαση.

Το 2006 ταυτοποιήθηκαν 2 μεταλλαγές του *FLG* γονιδίου ως η αιτία της ασθένειας ichthyosis vulgaris που ακολουθείται συχνά από την ΑΔ¹¹. Οι μεταλλαγές του γονιδίου αυτού έχουν ταυτοποιηθεί ως οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για τη ατοπική δερματίτιδα και συνδέονται στενά με την εμφάνιση άσθματος στους ΑΔ ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζουν για πρώτη φορά μια ασθένεια δέρματος με συστηματικές αλλεργικές εκδηλώσεις, μέσω της ελαττωματικής λειτουργίας του επιδερμικού φραγμού³¹.

Η σύνδεση των *FLG* μεταλλαγών με την ΑΔ παρέχει την εξήγηση για τα μειωμένα επίπεδα τόσο της φιλλαγκρίνης όσο και των NMF παραγόντων στο δέρμα των ασθενών. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μείωση της ικανότητας κατακράτησης νερού από τα κorneοκύτταρα. Εκτός από την ελάττωση των NMF παραγόντων, δημιουργείται βλάβη και στον φάκελο CE, γεγονός που επηρεάζει την ελαστικότητα και την ανθεκτικότητα του δέρματος. Αυτού του είδους η διαταραχή στο φραγμό του δέρματος αυξάνει τον κίνδυνο εισβολής αλλεργιογόνων, πιθανώς μέσω της δημιουργίας χασμάτων μεταξύ των συρρικνωμένων-αφυδατωμένων κorneοκυττάρων.

Μέσω των διαγονιδιακών knockout ποντικών έγινε, επιπλέον, φανερή και η σημασία πολλών πρωτεϊνών συγκόλλησης των κorneοδεσμοσωμάτων (DSG, δεσμοκολλίνη 1, δεσμοπλακίνη) που συμβάλλουν στη σωστή λειτουργία του επιδερμικού φραγμού. Έχει προταθεί ότι οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών των πρωτεϊνών μεταβάλλουν την ικανότητά τους να διατηρούν την ακεραιότητα του φραγμού και συμβάλλουν στη δημιουργία της ΑΔ.

Εκτός από τον κύριο φραγμό που τοποθετείται στην ΚΣ, οι εμπύρηνες στιβάδες της επιδερμίδας, ΚΟΣ και ΑΣ, δημιουργούν ένα δεύτερο φραγμό, που επίσης προσφέρει προστασία από τους εξωτερικούς παράγοντες. Πολλές ομάδες πρωτεϊνών συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας αυτού του δεύτερου φραγμού. Ανωμαλία στη ρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών συνδέεται με πολλές καταστάσεις του δέρματος, στις οποίες εκτός από τις ασθένειες ichthyosis vulgaris, psoriasis vulgaris και lichen planus, συμπεριλαμβάνεται και η ΑΔ¹¹.

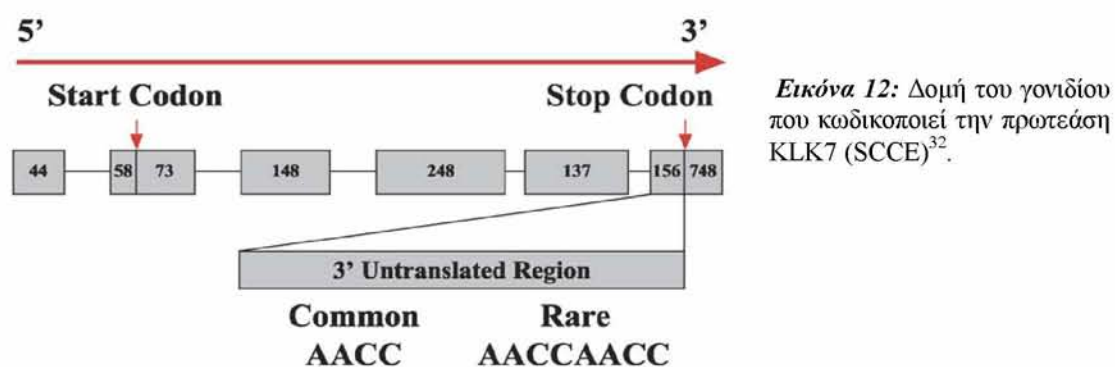
1.10.10.2. 2^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεάσες της ΚΣ

Στους ΑΔ ασθενείς, η έκφραση επτά KLK πρωτεασών, που βρίσκονται μέσα στο SC είναι αυξημένη. Συγκεκριμένα, έχει δείχθει ότι διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την ανθρώπινη KLK7 πρωτεάση αναπτύσσουν αλλαγές στο δέρμα τους όμοιες με αυτές που παρατηρούνται στη χρόνια ΑΔ. Η υπερέκφραση της KLK7 στα ποντίκια αυτά έχει οδηγήσει σε πρόωρο σπάσιμο των κorneοδεσμοσωμάτων, αυξάνοντας την απολέπιση των κorneοκυττάρων και οδηγώντας σε λεπτότερο φραγμό δέρματος. Η επακόλουθη βλάβη της λειτουργίας του ευνοεί πιθανών τη διείσδυση των αλλεργιογόνων και την ανάπτυξη δερματίτιδας¹³. Το γονίδιο της πρωτεάσης αυτής θεωρήθηκε, επομένως, υποψήφιο για την ατοπική δερματίτιδα.

Για να επαληθευτεί η υπόθεση αυτή όμως, ελέγχθηκε η κωδική περιοχή του γονιδίου (5 εξόνια) για πολυμορφισμούς και πραγματοποιήθηκε μελέτη σύνδεσης (case-control) σε παιδιά με ΑΔ και σε υγιείς ανθρώπους. Τα αποτελέσματα

αποκάλυψαν 16 συνώνυμους πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) και μια ένθεση 4 ζευγών βάσεων (AACC) στην 3' UTR περιοχή του KLK7 γονιδίου που συνδέθηκε με την ΑΔ (Εικόνα 12)³². Καθώς η 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA καθορίζει τη σταθερότητά του, οποιαδήποτε μετάλλαξη στην περιοχή αυτή μπορεί να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης. Συνεπώς, η ένθεση AACC μπορεί να αυξάνει το χρόνο ημιζωής του mRNA της KLK7, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή του ενζύμου στο δέρμα ασθενών με τη μη-αλλεργική (intrinsic) μορφή της ΑΔ. Αυτή η υπερέκφραση της KLK7 μπορεί να προκαλέσει πρόωρη λύση των κορνεοδεσμοσωμικών πρωτεϊνών και την επακόλουθη απολέπιση των κορνεοκυττάρων. Ο φραγμός συνεπώς διαταράσσεται και γίνεται λεπτότερος, ευνοώντας την είσοδο αλλεργιογόνων και την ανάπτυξη φλεγμονώδους απάντησης³⁰.

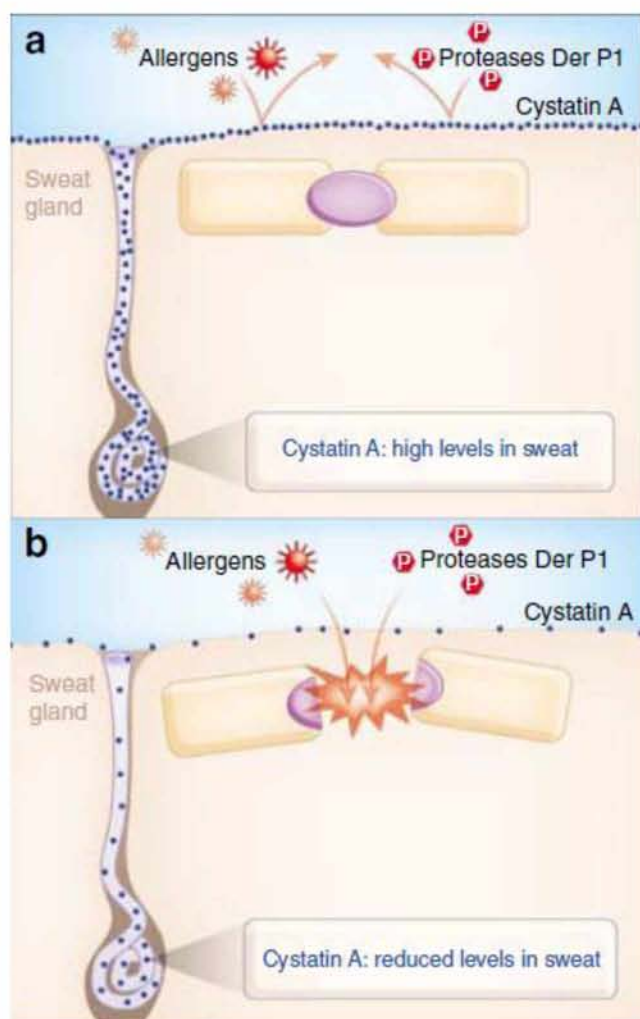
Μετά την πρώτη αυτή μελέτη όμως, δύο επιπρόσθετες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς δεν επιβεβαίωσαν τη σύνδεση της ένθεσης αυτής με την ΑΔ¹¹. Έχουν ταυτοποιηθεί πάντως διάφοροι πολυμορφισμοί σε άλλες πρωτεάσες, όπως η πρωτεάση MCC (mast cell chymase) των σιτευτικών κυττάρων, που η αυξημένη ενεργότητά της ίσως συνδέεται με τα υψηλά επίπεδα των IgE αντισωμάτων στους ενήλικους με ΑΔ¹³.



1.10.10.3. 3^η κατηγορία: Γονίδια που κωδικοποιούν τους αναστολείς των πρωτεασών

Γενετικές μεταλλαγές έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και σε γονίδια που κωδικοποιούν μέλη των αναστολέων των πρωτεασών, που εμπλέκονται στη διαδικασία της απολέπισης¹³. Έχει ταυτοποιηθεί μια μεταλλαγή στο γονίδιο CSTA που συνδέεται με την ΑΔ. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεάση-αναστολέα κυσταΐνης, κυστατίνη ΑΔ. Μειωμένη έκφραση της κυστατίνης Α έχει παρατηρηθεί στο δέρμα των ασθενών με ΑΔ. Η μετάλλαξη στο γονίδιο CSTA καταλήγει σε μειωμένη σταθερότητα του mRNA και συνεπώς σε μειωμένα επίπεδα της κυστατίνης Α. Το αποτέλεσμα είναι η μειωμένη αναστολή τόσο των ενδογενών όσο και των εξωγενών πρωτεασών. Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται η αποικοδόμηση των κορνεοδεσμοσωμάτων, καταστρέφοντας το φραγμό του δέρματος και επιτρέποντας τη διέλευση των αλλεργιογόνων. Η Εικόνα 13 απεικονίζει το ρόλο της κυστατίνης Α. Σε φυσιολογικό δέρμα, η κυστατίνη Α (μπλε κουκίδες) εκκρίνεται στον ιδρώτα και κυλάει μέχρι την επιφάνεια του δέρματος σχηματίζοντας ένα προστατευτικό στρώμα. Οι εξωγενείς πρωτεάσες, από ζώδια για παράδειγμα (Der P1), αναστέλλονται από το προστατευτικό στρώμα της κυστατίνης Α με αποτέλεσμα να μην μπορούν να

διασπών τα κορνεοδεσμοσώματα (μωβ σφαίρες) που κρατούν ενωμένα τα κορνεοκύτταρα (πορτοκαλί τετράγωνα) στην κεράτινη στιβάδα. Αντίθετα, στην ατοπική δερματίτιδα, η κυστατίνη Α, λόγω της ανώμαλης έκφρασής της, δεν σχηματίζει το προστατευτικό στρώμα στην επιδερμίδα. Έτσι, οι εξωγενείς πρωτεάσες διασπών τον επιδερμικό φραγμό και είναι πιο εύκολη η διέλευση των αλλεργιογόνων¹¹.

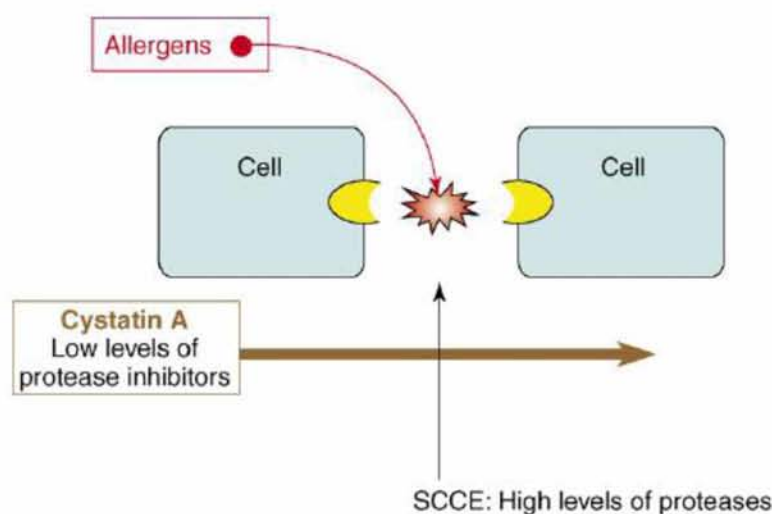


Εικόνα 13: Ο ρόλος του αναστολέα πρωτεασών κυστατίνη Α, σε φυσιολογικό δέρμα **α)** και στην ατοπική δερματίτιδα **β)**¹¹.

Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει μεταλλάξεις στο γονίδιο SPINK5, το οποίο κωδικοποιεί τον αναστολέα των πρωτεασών σερίνης LEKTI, με την ΑΔ. Στην πραγματικότητα, οι μεταλλάξεις του SPINK5 είναι η αιτία του συνδρόμου Netherton¹¹. Άτομα με το σύνδρομο αυτό παρουσιάζουν δυσλειτουργία του φραγμού, συμπεριλαμβανομένου της ανώμαλης απολέπισης και κερατινοποίησης. Ανάλυση του δέρματος των ασθενών αυτών δείχνει μια αύξηση στη διάσπαση των κορνεοδεσμοσωμάτων και μείωση, συνεπώς, στη σύνδεση των κορνεοκυττάρων¹³. Η ατοπική δερματίτιδα, που παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο

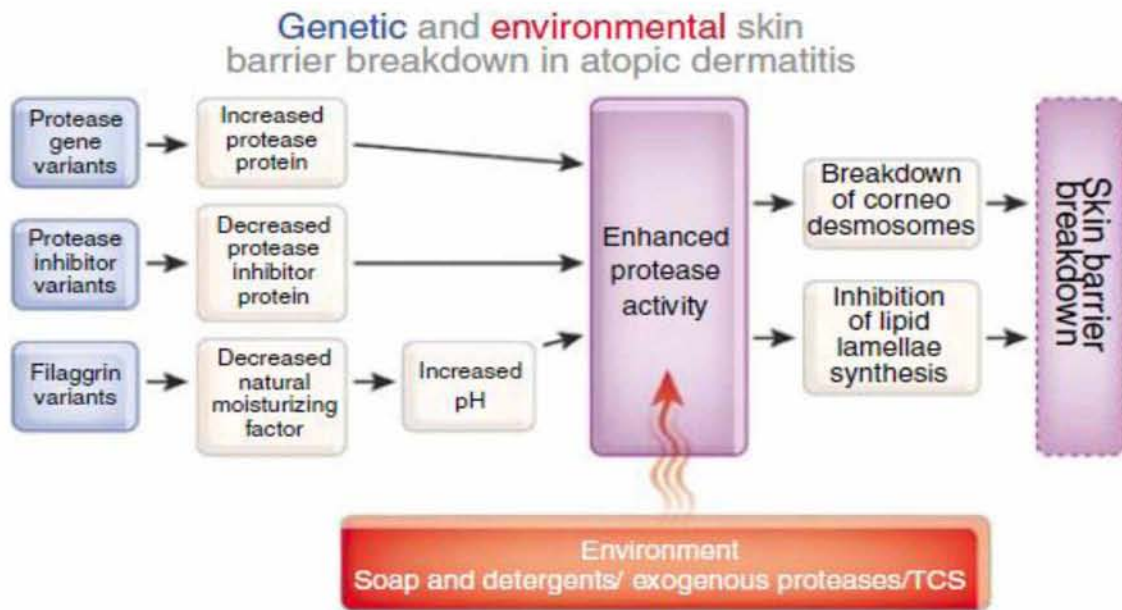
Netherton, συνδέεται με πολυμορφισμούς του SPINK5 που επιδρούν στη λειτουργία του αναστολέα LEKTI. Έχει αποδειχθεί πως η έλλειψη του LEKTI οδηγεί στην αυξημένη διάσπαση της DSG 1 και της κορνεοδεσμοσίνης, λόγω της αυξημένης δράσης των πρωτεασών KLK5 και KLK7. Δύο ξεχωριστές μελέτες σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς ερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ της ΑΔ και των γονιδίων SPINK5, KLK7 και FLG. Δεν βρέθηκε όμως καμία σύνδεση, υποδεικνύοντας οι μεταλλάξεις, σε αυτά τα γονίδια τουλάχιστον, δεν καθορίζουν την ατοπική δερματίτιδα¹¹.

Μεταλλαγές τόσο στα γονίδια πρωτεασών, όσο και στα γονίδια των αναστολέων τους, μπορεί να συνδυαστούν σε μερικούς ασθενείς. Το αποτέλεσμα είναι μια πολύ πιο σοβαρή διαταραχή του επιδερμικού φραγμού του δέρματος σε σύγκριση με το αν οι μεταλλαγές πραγματοποιούνταν μόνο σε μια από τις δύο αυτές κατηγορίες γονιδίων³⁰ (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Γενετικές μεταλλαγές μπορεί να συμβούν μεμονωμένα, είτε σε γονίδιο μιας πρωτεάσης, όπως της KLK7 (SCCE), είτε σε γονίδιο μιας πρωτεάσης-αναστολέα, όπως της κυστατίνης Α³⁰.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται συνοπτικά οι 3 κατηγορίες γονιδίων, πρωτεάσες, αναστολείς πρωτεασών και δομικές πρωτεΐνες, που συμβάλλουν στη διαταραχή του επιδερμικού φραγμού στην ατοπική δερματίτιδα. Μεταλλαγές στα γονίδια των πρωτεασών και των αναστολέων τους οδηγούν απευθείας σε αυξημένη ενεργότητα των πρωτεασών στο SC και συνεπώς σε επιταχυνόμενη διάσπαση των κορνεοδεσμοσωμικών συνδέσμων. Μεταλλαγές στο γονίδιο της φιλλαγκρίνης οδηγεί σε αυξημένο pH στο SC, καταλήγοντας τελικά σε αυξημένη ενεργότητα πρωτεασών και μειωμένη ενεργότητα των αναστολέων τους. Περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως οι εξωγενείς πρωτεάσες από ζώψια ή *Staphylococcus aureus* επιταχύνουν επίσης την πρωτεολυτική διάσπαση του επιδερμικού φραγμού, συμβάλλοντας στη διαταραχή της λειτουργίας του¹¹.



Εικόνα 15: Οι 3 κατηγορίες γονιδίων που συμβάλλουν στη διαταραχή του επιδερμικού φραγμού στην ατοπική δερματίτιδα¹¹.

1.10.11. Η πρωτεάση KLK5

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την KLK5 (kallikrein-related peptidase 5) είναι ένα από τα 15 μέλη της υποοικογένειας kallikrein που έχουν ταυτοποιηθεί και τοποθετείται σε ένα τμήμα του χρωμοσώματος 19³². Μέχρι το 1998 σχεδόν θεωρούνταν ότι η γονιδιακή οικογένεια kallikrein στον άνθρωπο περιλάμβανε μόνο 3 μέλη, τις 'classical' kallikrein KLK1, KLK2, KLK3. Πρόσφατες μελέτες όμως οδήγησαν στον πλήρη χαρακτηρισμό του γονιδιακού τύπου των ανθρώπινων kallikrein και την ταυτοποίηση και των 15 μελών αυτής της οικογένειας στη χρωμοσωμική περιοχή του 19q13.4.

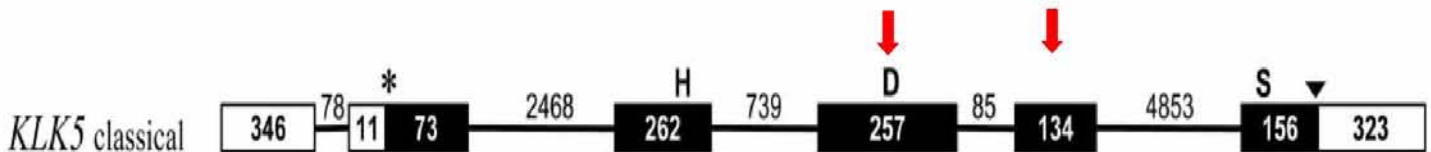
Εκτεταμένες μελέτες τα τελευταία χρόνια οδήγησαν στην αναγνώριση πολλών κοινών χαρακτηριστικών των γονιδίων kallikreins, μερικά από τα οποία είναι μοναδικά για αυτή την οικογένεια γονιδίων. Τα κοινά χαρακτηριστικά της οικογένειας kallikrein συνοψίζονται παρακάτω:

- όλα τα γονίδια έχουν 5 κωδικά εξόνια και τα περισσότερα έχουν ένα ή δύο 5' μη μεταφραζόμενα κωδικόνια
- το πρώτο κωδικό εξόνιο περιέχει πάντα μια 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, ακολουθούμενη από το κωδικόνιο έναρξης (μεθειονίνη)
- το κωδικόνιο λήξης τοποθετείται πάντα 150-189 bp από την αρχή του τελευταίου κωδικού εξονίου
- τα μεγέθη των εξονίων είναι παρόμοια ή και ταυτόσημα
- οι θέσεις των ιντρονίων μέσα στα κωδικά εξόνια είναι συντηρημένες σε όλα τα γονίδια
- οι θέσεις των καταλοίπων της καταλυτικής τριάδας είναι συντηρημένη, με την ιστιδίνη να βρίσκεται πάντα κοντά στο τέλος του δευτέρου κωδικού εξονίου,

το ασπαραγινικό οξύ στη μέση του τρίτου εξονίου και τη σερίνη στην αρχή του πέμπτου κωδικού εξονίου

- όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας kallikrein συντίθενται ως προ-πεπτίδια και η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από 223-252 αμινοξέα
- εκτός από τη συντηρημένη καταλυτική αμινοξικής τριάδας, επτά επιπρόσθετα πρωτεϊνικά μοτίβα είναι επίσης συντηρημένα στις πρωτεάσες αυτές
- τα περισσότερα, αν όχι όλα τα γονίδια των πρωτεασών υπόκεινται σε ρύθμιση από στεροειδείς ορμόνες
- όλες οι πρωτεΐνες περιέχουν 10-12 κατάλοιπα κυστεΐνης που σχηματίζουν πέντε ή έξι δισουλφιδικούς δεσμούς και οι θέσεις των καταλοίπων αυτών είναι συντηρημένες
- τα σήματα πολυαδενυλίωσης έχουν βρεθεί 10-20 βάσεις μακριά από την πολυαδενυλική 'ουρά' των mRNAs των πρωτεασών αυτών³³.

Ακολουθώντας τη δομή της οικογένειας πρωτεασών kallikreins, το γονίδιο της KLK5 αποτελείται από 6 εξόνια, εκ των οποίων τα 5 είναι κωδικά, 5 ιντρόνια και το μήκος του είναι 9.5 Kb³⁴ (Εικόνα 16). Υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφόρων μεταγράφων της ίδιας όμως πρωτεΐνης³⁵. Ειδικότερα, έχουν ταυτοποιηθεί πέντε εναλλακτικά μετάγραφα για το γονίδιο της KLK5. Τα μετάγραφα αυτά διαφέρουν στον αριθμό και το μήκος των 5' μη κωδικών και/ή των τελευταίων δύο κωδικών εξονίων. Η έκφραση του γονιδίου της KLK5 επάγεται από οιστρογόνα και προγεστερόνη³².



Εικόνα 16: Η οργάνωση του γονιδίου της KLK5. Με μαύρο απεικονίζονται τα κωδικά εξόνια, ενώ με άσπρο τα μη κωδικά. Οι ενδιάμεσες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα ιντρόνια. Οι αριθμοί μέσα στα κουτιά αλλά και πάνω από τις γραμμές δείχνουν το μήκος των εξονίων και ιντρονίων, αντίστοιχα, σε ζεύγη βάσεων. Με αστερίσκο συμβολίζεται το εναρκτήριο κωδικόνιο, ενώ με μαύρο ανάποδο βέλος το τελικό κωδικόνιο. Απεικονίζεται ακόμη και η καταλυτική τριάδα των αμινοξέων, H:ιστιδίνη, D:ασπαρτικό οξύ, S:σερίνη³⁴. Με κόκκινα βελόνια υποδεικνύονται τα εξόνια 3 και 4 που θα μελετηθούν στη συγκεκριμένη εργασία.

Η εκκρινόμενη πρωτεάση KLK5 αποτελείται από 293 αμινοξέα. Αναλυτικότερα, συντίθεται από ένα πεπτίδιο-οδηγό 29 αμινοξέων, ακολουθούμενο από ένα ενεργό πεπτίδιο 37 αμινοξέων και την ώριμη αλυσίδα 227 αμινοξέων με 4 πιθανές θέσεις N-γλυκοσυλίωσης. Οι θέσεις της καταλυτικής τριάδας αμινοξέων είναι συντηρημένες. Η KLK5 συντίθεται ολόκληρη ενδοκυτταρικά. Κατά το εκκριτικό μονοπάτι, το πεπτίδιο-οδηγός αποκόπτεται και το ζυμογόνο απελευθερώνεται έξω από το κύτταρο. Κατά την ενεργοποίησή του, το προ-πεπτίδιο αφαιρείται και παράγεται η ώριμη ενεργή πρωτεΐνη.

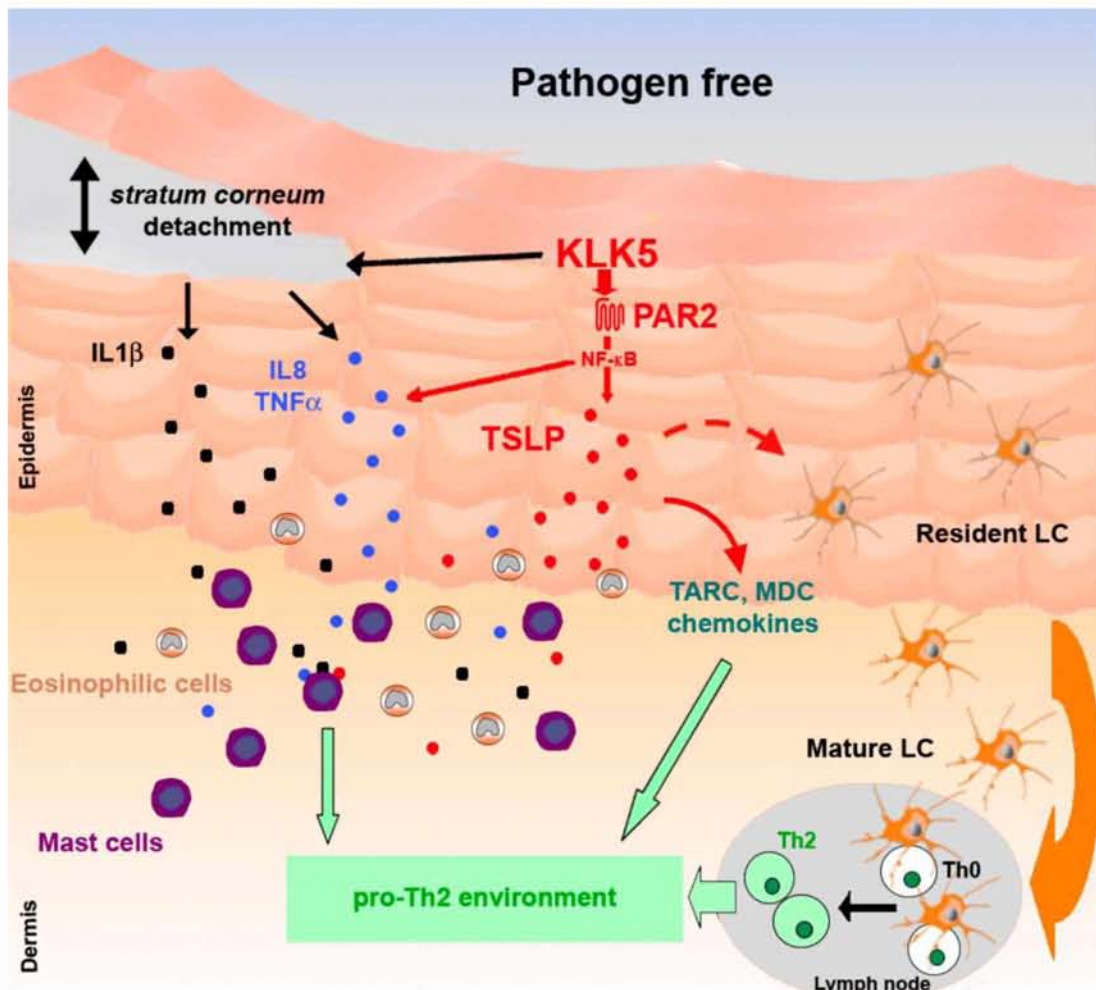
Σε επίπεδο mRNA, η KLK5 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, κυρίως στους όρχεις, τον εγκέφαλο, το μαστό, το θυρεοειδή και τους σιελογόνους αδένες. Η ίδια η πρωτεΐνη εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο δέρμα, στους σιελογόνους αδένες, στους όρχεις και στα θηλυκά γεννητικά όργανα. Η KLK5 έχει επίσης ταυτοποιηθεί σε πολλά βιολογικά υγρά³⁴.

1.10.12. Ο ρόλος της KLK5

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η KLK5 εμπλέκεται στη διαδικασία της απολέπισης στην επιδερμίδα³². Χρησιμοποιείται όμως και ως βιοδείκτης για τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, αλλά και του καρκίνου του προστάτη³⁶. Ένας επιπλέον σημαντικός ρόλος της πρωτεάσης αυτής είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα PAR2, μαζί με την KLK14. Ο μεμβρανικός αυτός GPCR υποδοχέας εμπλέκεται στις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε πολλούς ιστούς. Έχει ακόμα συνδεθεί και με την παθοφυσιολογία φλεγμονώδων ασθενειών του δέρματος, όπως η ατοπική δερματίτιδα και η ψωρίαση¹⁸.

Μια πρόσφατη έρευνα, το Μάιο του 2009 όμως, απέδειξε έναν νέο ρόλο της KLK5. Συγκεκριμένα, φανέρωσε πως η έλλειψη του αναστολέα LEKTI προκαλεί υπερενεργοποίηση της KLK5, οδηγώντας τελικά σε βλάβες του δέρματος όμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην ατοπική δερματίτιδα. Έτσι, αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά ο ρόλος της υπερενεργοποίησης της KLK5 στην έναρξη προφλεγμονώδους και προαλλεργικού μονοπατιού, ανεξάρτητα από την αρχική διαταραχή του φραγμού. Με άλλα λόγια, η KLK5 αποτελεί έναν κύριο επιδερμικό πρωταγωνιστή στη φλεγμονή του δέρματος, καθώς και στην επαγωγή αλλεργικών φλεγμονωδών σημάτων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η υπερέκφραση συγκεκριμένων μεσολαβητών στα κερατινοκύτταρα, ανεξάρτητα από την υπερενεργοποίηση της KLK5. Οι μεσολαβητές αυτοί μπορεί να επάγονται λόγω της υπερενεργοποίησης άλλων πρωτεασών, όπως η KLK7 ή η KLK14, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών όταν υπάρχει έλλειψη του LEKTI στο δέρμα³¹.

Στην Εικόνα 17 απεικονίζεται το προφλεγμονώδες και προαλλεργικό μικροπεριβάλλον, ανεξάρτητο από εξωτερικά ερεθίσματα, που προκαλεί η KLK5. Συγκεκριμένα, στα κερατινοκύτταρα με έλλειψη του LEKTI, η υπερενεργοποίηση της KLK5 επάγει άμεσα την υπερέκφραση των TSLP, IL8 και TNF- α , μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF- κ B και του υποδοχέα PAR2. Η υπερενεργοποίηση της KLK5 αποικοδομεί τα κορνεοδεσμοσώματα στην επιφάνεια μεταξύ του ΚΟΣ και της ΚΣ. Το γεγονός αυτό προκαλεί διαταραχή στην ακεραιότητα του SC και έκκριση των IL-1 β , IL8 και TNF- α από τα μηχανικώς διαταραγμένα κερατινοκύτταρα. Επιπρόσθετα, όλες αυτές οι κυτταροκίνες μπορούν να επάγουν την έκκριση των χημειοκινών TARC κι MDC από τα κερατινοκύτταρα και τους δερματικούς ινοβλάστες. Αυτοί οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές επάγουν τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των εοσινόφιλων και των σιτευτικών κυττάρων. Ο TSLP έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί τα τοπικά κύτταρα Langerhans (LCs), τα οποία μεταναστεύουν στους λεμφαδένες, προωθώντας τη διαφοροποίηση των Th0 κυττάρων σε Th2. Συλλογικά, τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα μαζί με τα εοσινόφιλα και τα σιτευτικά κύτταρα επάγουν ένα προ- Th2 μικροπεριβάλλον, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του ΑΔ φαινοτύπου³¹.



Εικόνα 17: Ο ρόλος της KLK5 στη δημιουργία του φαινοτύπου της ατοπικής δερματίτιδας³¹.

Σκοπός της εργασίας

Βάσει των πρόσφατων δεδομένων σχετικά με το ρόλο της πρωτεάσης KLK5 στην παθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση και η ταυτοποίηση πολυμορφισμών στο γονίδιο της, εστιάζοντας στα δύο από τα πέντε κωδικά του εξόνια, με απώτερο στόχο τη συσχέτιση αυτών με την παθογένεια της ασθένειας. Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί τμήμα της ευρύτερης μελέτης για την αναζήτηση πολυμορφισμών σε όλα τα κωδικά εξόνια του γονιδίου της KLK5.

2. Υλικά – Μέθοδοι

Συνοπτικά, κατά τη διάρκεια αυτής της πειραματικής διαδικασίας, αρχικά έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA από βλεννογόνο παρειάς στα δείγματα-ελέγχου και από περιφερικό αίμα στα δείγματα των ασθενών με ΑΔ. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκαν τα εξόνια 4 και 5 του γονιδίου KLK5, τόσο στα δείγματα-ελέγχου, όσο και στον ασθενών. Μέρος του προϊόντος της PCR αποδιατάχθηκε σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης και ακολούθησε η μέθοδος SSCP. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μη αποδιατακτική πηκτή πολυακρίλαμίδης, ηλεκτροφορήθηκαν για ~ 22-24 ώρες και εμφάνισαν τα πρότυπά τους μετά από χρώση της πηκτής πολυακρίλαμίδης με την τεχνική χρώσης του νιτρικού αργύρου (silver staining). Στα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο ζωνών ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχισή τους με σκοπό την ταυτοποίηση κάποιου πολυμορφισμού.

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Για τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος απομονώθηκε DNA από 48 δείγματα-ελέγχου (βλεννογόνο παρειάς) και 31 δείγματα ασθενών (περιφερικό αίμα) με ατοπική δερματίτιδα. Τα δείγματα-ελέγχου συλλέχθηκαν στο εργαστήριο από άτομα εθελοντές με καταγραφή ιστορικού. Τα δείγματα των ασθενών με ΑΔ προήλθαν από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν με βάση το δείκτη SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis). Ο δείκτης αυτός καταμετρά αντικειμενικά και υποκειμενικά χαρακτηριστικά της νόσου. Τα αντικειμενικά χαρακτηριστικά αφορούν τη βαρύτητα της νόσου με βάση το ερύθημα, την εκδορά, τη λειχηνοποίηση και την ξηρασία του προσβεβλημένου δέρματος. Τα υποκειμενικά χαρακτηριστικά αντίθετα, καταμετρούν την ένταση του κνησμού και την ύπαρξη διαταραχών του ύπνου. Σύμφωνα με το δείκτη αυτό, οι ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα είχαν κριθεί ότι έπασχαν από την αλλεργική μορφή της ατοπικής δερματίτιδας (true atopic dermatitis) με εμφάνιση αυξημένων επιπέδων των αντισωμάτων IgE³⁷.

2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η μέθοδος απομόνωσης του DNA από τα κύτταρα των οργανισμών είναι καθοριστικής σημασίας για τη μελέτη του. Η σωστή απομόνωση του DNA πρέπει να είναι αποδοτική τόσο σε ποσοτικό, όσο και σε ποιοτικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, πρέπει να δίνει DNA σε αρκετή ποσότητα, αλλά και σε καλή κατάσταση, δηλαδή να μην είναι διασπασμένο σε μικρά κομμάτια. Το είδος και η ποσότητα των κυττάρων που περιέχει το πρωτογενές υλικό σε συνδυασμό με το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό ή πλασμιδιακό DNA) συνιστούν καθοριστικούς παράγοντες για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου απομόνωσης DNA.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πυρηνικού DNA στηρίχθηκε στο κλασικό πρωτόκολλο επώασης με πρωτεϊνάση K. Αναλυτικότερα, τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν είναι:

Απομόνωση DNA από βλεννογόνο παρειάς (δείγματα-ελέγχου)

1. Στα σωληνάκια erpendorfs που περιέχουν τα βουρτσάκια προστίθενται 0,5 ml NaOAc 0,2M.
Έντονη ανάδευση των σωλήνων (vortex) και στη συνέχεια προσθήκη 50μl SDS 5% και 5 μl proteinase K (20 ng/μl).
2. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 55°C με συνεχή ανακίνηση.
3. Αφαιρούνται τα βουρτσάκια με τσιμπίδα που απολυμαίνεται με αιθανόλη μετά από κάθε δείγμα.
4. Προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V).
Vortex και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 13000 rpm για 10 min.
5. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια erpendorfs και προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V).
Vortex και φυγοκέντρηση (4°C) στις 13000 rpm για 5 min.
6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια erpendorfs και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης.
Ανάμειξη των δειγμάτων και επώαση στους -20 °C για 15 min ή overnight.
7. Φυγοκέντρηση (4°C) στις 13000 rpm για 20 min.
8. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70 %.
Φυγοκέντρηση (4°C) στις 13000 rpm για 10 min.
9. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκειμένου ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα.
Ξήρανση.
10. Προσθήκη 100 μl dd H₂O.
11. Ολονύκτια (over night) διάλυση στους 4 °C.
12. Αποθήκευση των δειγμάτων σε στους -20°C.

Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα (δείγματα ασθενών)

1. Ξεπάγωμα των δειγμάτων αίματος.
2. Αναμιγνύονται 0,5ml αίματος και 1ml SSC 1x σε σωληνάκια eppendorfs των 2ml.
Έντονη ανάδευση των σωλήνων (vortex) και φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 13000 rpm για 3 min.
3. Απομάκρυνση 1ml από το υπερκείμενο και προσθήκη 1ml SSC 1x.
Vortex και φυγοκέντρωση (4°C) στις 13000 rpm για 1 min.
4. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκειμένου, προσθήκη 0.5ml CH₃COONa 0,2M.
Vortex και στη συνέχεια προσθήκη 50μl SDS 5% και 5 μl proteinase K (20 ng/μl).
Επώαση για 1 ώρα σε φούρνο στους 55°C, με συχνή ανακίνηση των δειγμάτων.
5. Προσθήκη 0,5ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V).
Vortex και φυγοκέντρωση (4°C) στις 13000 rpm για 10 min.
6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια eppendorfs και προσθήκη 1 ml χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V:1V).
Vortex και φυγοκέντρωση (4°C) στις 13000 rpm για 5 min.
7. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια eppendorfs και προσθήκη 1 ml ισοπροπανόλης.
Προσεχτική ανακίνηση των σωλήνων και επώαση στους -20 °C για 15 min ή ολονύκτια.
8. Φυγοκέντρωση (4°C) στις 13000 rpm για 20 min.
9. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70 %.
Φυγοκέντρωση (4°C) στις 13000 rpm για 10 min.
10. Προσεχτική απομάκρυνση του υπερκειμένου ώστε να μην ξεκολλήσει το ίζημα.
Ξήρανση.
11. Προσθήκη 100 μl dd H₂O.
12. Ολονύκτια διάλυση στους 4 °C.
13. Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20 °C.

2.2.1. Ο ρόλος των αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και ο ρόλος τους είναι:

- EDTA 0,5 M: είναι αντιπηκτικός παράγοντας που αποτρέπει την πήξη του αίματος και τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Για το λόγο αυτό, το αίμα των ασθενών με AD μετά τη λήψη του διατηρήθηκε σε σωληνάκια falkon των 15ml που περιέχουν 500 μl EDTA 0,5M.
- SSC 1X: είναι ένα ήπιο λυτικό διάλυμα που καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες ώστε τα επόμενα διαλύματα να δράσουν στις πυρηνικές μεμβράνες.
- CH₃COONa 0,2M: το οξικό νάτριο βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA.
- SDS 5%: είναι ένα ισοτονικό απορρυπαντικό που διασπά την κυτταρική μεμβράνη και γαλακτωματοποιεί πρωτεΐνες και λιπίδια. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές λιπιδίων και πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται προστατεύοντας το DNA από νουκλεάσες.
- πρωτεΐνωση K 20 ng/μl: προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Το ένζυμο παραμένει ενεργό παρά την παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών που αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, όπως το SDS.
- φαινόλη: είναι ένας ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας των πρωτεϊνών και διαχωρίζει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα κατά την εκχύλιση του DNA. Όταν προστίθεται μαζί με το χλωροφόρμιο, μετά τη φυγοκέντρηση, δημιουργούνται τρεις φάσεις: μία ανώτερη υδατική φάση, μία κατώτερη οργανική φάση και μία ενδιάμεση στοιβάδα μεταξύ των δύο προηγούμενων φάσεων. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός της διαλυτής φάσης που περιέχει το DNA από την οργανική. Η φαινόλη είναι εξισορροπημένη σε PH>7 ώστε, μετά τη φυγοκέντρηση, να κατανέμεται στην οργανική φάση καθώς είναι ένας οργανικός διαλύτης. Το DNA παραμένει στην υδατική φάση.
- χλωροφόρμιο (24/1 v/v χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη): η προσθήκη χλωροφορμίου έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Όπως και η φαινόλη, το χλωροφόρμιο είναι ένας οργανικός, πτητικός παράγοντας που προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και απομάκρυνση της περίσσειας φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες. Το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται δύο οργανικοί διαλύτες (φαινόλη και χλωροφόρμιο) και όχι μόνο ένας, συνεισφέρει στην επιτυχημένη απομάκρυνση των πρωτεϊνών⁴².
- Ισοπροπανόλη, παγωμένη αιθανόλη 70%: το DNA αρχικά κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και ακολουθεί πλύση με παγωμένη αιθανόλη 70%. Το DNA λόγω της ιονικής του φύσης παραμένει αδιάλυτο ως ίζημα σε αυτούς τους οργανικούς διαλύτες.

2.2.2. Ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος του απομονωμένου DNA

Αφού πραγματοποιηθούν τα πρωτόκολλα απομονώσεως DNA από βλεννογόνο παρειάς για τα δείγματα-ελέγχου και από περιφερικό αίμα για τα δείγματα των ασθενών γίνεται ποιοτικός αλλά και ποσοτικός έλεγχος του DNA που έχει απομονωθεί.

Ο ποιοτικός έλεγχος προσδιορίζει την ύπαρξη ή όχι DNA στα δείγματα που απομονώθηκαν. Επιπλέον, αποκαλύπτει αν αυτό διασπασμένο σε κομμάτια ή όχι. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 1% όπου η εμφάνιση ζώνης υποδηλώνει την ύπαρξη DNA. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης θα αναλυθεί παρακάτω.

Αντίθετα, ο ποσοτικός έλεγχος περιλαμβάνει τη φωτομέτρηση των δειγμάτων σε κατάλληλη συσκευή (φωτόμετρο) ώστε να προσδιοριστεί ακριβώς η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA σε κάθε δείγμα. Η μέθοδος της φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA απορροφά το υπεριώδες φως με μέγιστο στα 260nm, λόγω της ύπαρξης των αρωματικών βάσεων, δηλαδή της αδενίνης, θυμίνης, γουανίνης και κυτοσίνης. Κατά τη διαδικασία της φωτομέτρησης, το δείγμα εκτίθεται στο υπεριώδες φως, σε μήκος κύματος 260nm, και ένας φωτοανιχνευτής μετρά το φως που περνά διαμέσου του δείγματος. Όσο περισσότερο φως απορροφάται από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του DNA.

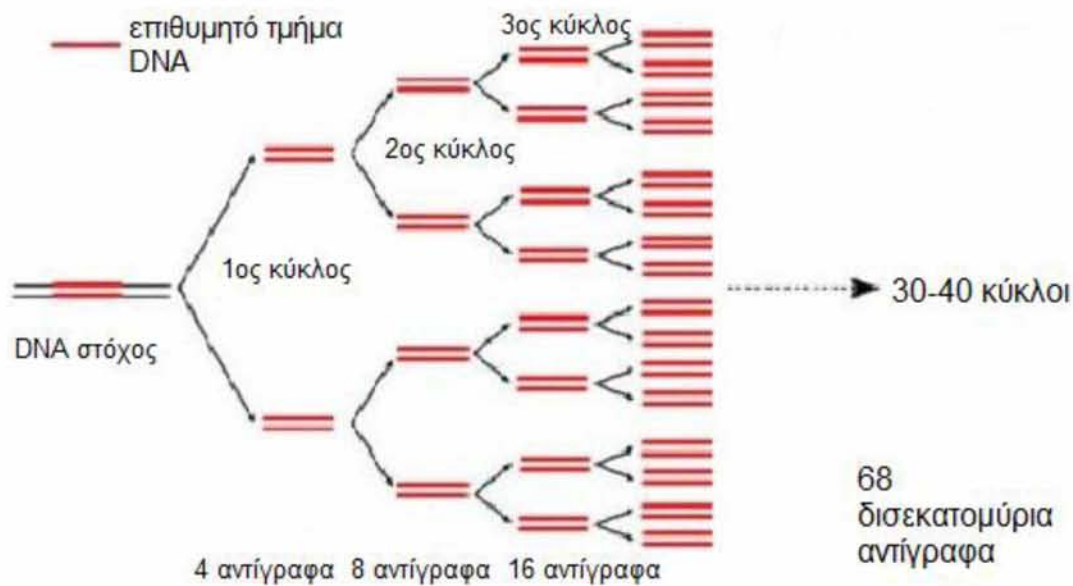
Για το πείραμα αυτό, 2 μl από κάθε απομονωμένο δείγμα αραιώθηκαν σε 98 μl ddH₂O και προστέθηκαν σε μια κυψελίδα. Η τιμή της απορρόφησης στα 260nm αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του DNA του δείγματος. Αντίθετα, η τιμή της απορρόφησης στα 280nm μετράει τις προσμίξεις του δείγματος σε πρωτεΐνες. Ο λόγος 260/280 αποτελεί δείκτη του περιεχομένου νουκλεϊκών οξέων/πρωτεϊνών στο δείγμα, δηλαδή της καθαρότητας του απομονωμένου DNA και πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,8-2. Στην περίπτωση που είναι αισθητά μικρότερος, το δείγμα περιέχει πολλές πρωτεΐνες ή φαινόλη και η μέτρησή του δεν είναι ακριβής. Επίσης, η απορρόφηση στα 230nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οργανικών υπολειμμάτων ή αλάτων και ο λόγος 260/230 πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,5. Η σύγκριση γίνεται αυτόματα από το φωτόμετρο UV-Vis Eppendorf, το οποίο χρησιμοποιήθηκε³⁸.

2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική PCR αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρίας Cetus. Τον Οκτώβριο του 1993, μάλιστα, απονεμήθη το βραβείο Νόμπελ Χημείας στον Δρ K.Mullis για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR³⁹. Εκτός των ερευνητικών εφαρμογών, πληθώρα άλλων διαγνωστικών εφαρμογών βασίζονται σε αυτή την τεχνική όπως: η αναγνώριση ιών και βακτηρίων, η αναγνώριση διαφόρων παθογόνων σε τροφές και πόσιμο νερό, η ταυτοποίηση οικογενειακών σχέσεων αξιοποιώντας πολυμορφικές αλληλουχίες DNA, η αναγνώριση θυμάτων και ενόχων ακόμα και για εγκλήματα που διεπράχθησαν πριν από δεκαετίες ή εκατονταετίες⁴⁰.

Με τη συγκεκριμένη τεχνική επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, "in vitro". Πραγματοποιείται, δηλαδή, ο

πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας από ένα μόνο μόριο DNA. Σε διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης³⁹. Υπάρχουν 3 κύρια στάδια σε μία PCR τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 ή 40 κύκλους, έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική (Εικόνα18). Ένα μόριο μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης δίνει 2^{30} (περίπου 10^9) μόρια DNA⁴⁰. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C ³⁹.



Εικόνα 18: Η εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA στόχου σε μια PCR⁴¹.

2.3.1. Αντιδραστήρια της PCR

Για την PCR απαιτούνται:

- το δείγμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί (DNA στόχος)
- τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers)
- το ειδικό ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση)⁴⁰
- τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH ~ 8.2 για τη δράση του ενζύμου³⁹.

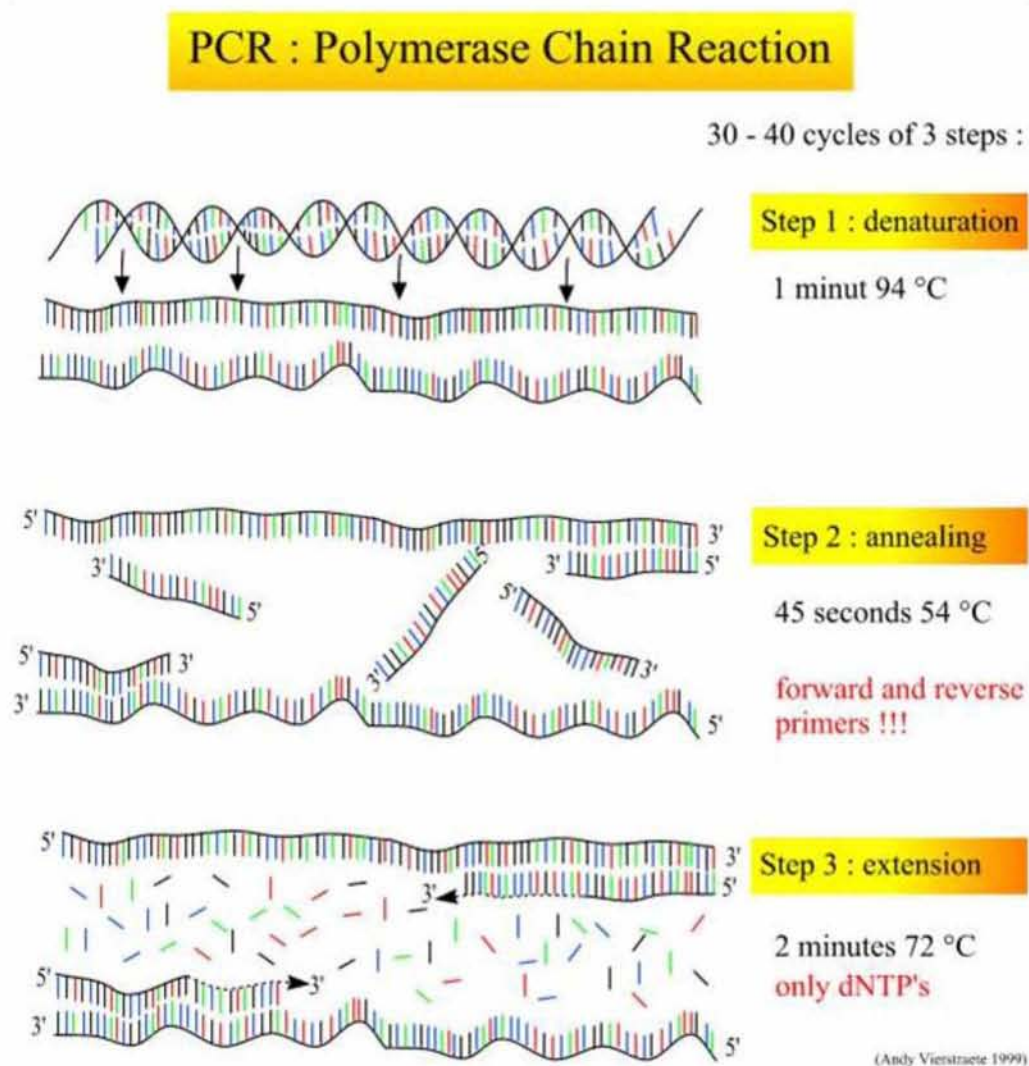
2.3.2. Στάδια PCR

1) Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τη μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο³⁹.

2) Ακολουθεί ψύξη του δείγματος ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA⁴⁰.

3) Με τη δράση του ενζύμου Ταq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού και πραγματοποιείται επιμήκυνση της αλυσίδας (πολυμερισμός)³⁹.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα στάδια της τεχνικής PCR:



Εικόνα 19: Τα 3 στάδια της αντίδρασης PCR που ακολουθούνται σε κάθε κύκλο της⁴².

2.3.3. Θερμοκρασίες της PCR

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια, μετουσίωσης (αποδιάταξης), υβριδισμού και επέκτασης. Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95°C για 30 sec περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65°C επί 1 min και τέλος, η επέκταση των εκκινητών στους 72-74°C επί 30 sec έως 1 min, ανάλογα του μεγέθους του προϊόντος της PCR και της ποιότητας της Ταq DNA πολυμεράσης³⁹.

2.3.4. Παράγοντες που επιδρούν στην PCR

Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Υπάρχουν ειδικά λογισμικά προγράμματα που βοηθούν αρκετά στη επιλογή. Συνήθως το μήκος των εκκινητών είναι 17-28 νουκλεοτίδια με 50-60% περιεκτικότητα στα νουκλεοτίδια G και C. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία υβριδοποίησης ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (Tm), το οποίο είναι επιθυμητό να βρίσκεται μεταξύ 55°C και 80°C. Θερμοκρασίες υβριδισμού μεταξύ 55°C και 65°C δίνουν συνήθως τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η σημαντικότερη βελτίωση στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR έγινε με την ανακάλυψη DNA πολυμερασών που είναι θερμοσταθερές, αντέχουν δηλαδή την επαναλαμβανόμενη θέρμανση στους 94-95°C. Έτσι, δε χρειάζεται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε κύκλο πολυμερισμού. Οι πολυμεράσες αυτές απομονώνονται από θερμοφιλά βακτήρια όπως το είδος *Thermus aquaticus* (Τaq), ή από Αρχαία που επίσης ζουν σε υψηλές θερμοκρασίες (90°C). Το μειονέκτημα συνήθως της Ταq πολυμεράσης είναι ότι δεν περιέχει 3'→5' δράση εξωνουκλεάσης και έτσι στο τελικό προϊόν παραμένουν νουκλεοτίδια που έχουν εισαχθεί λανθασμένα⁴². Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση της Ταq πολυμεράσης³⁹.

Ένας άλλος παράγοντας που αυξάνει τη συχνότητα του πολυμερισμού λάθος νουκλεοτιδίων είναι η υψηλή συγκέντρωση ιόντων Mg²⁺, που αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της Ταq πολυμεράσης⁴⁰.

Τέλος, η ειδικότητα της PCR εξαρτάται και από τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση των εκκινητών, αλλά και του DNA στόχου³⁹.

Για τις ανάγκες της μελέτης πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των εξονίων 4 και 5 του γονιδίου της KLK5 με τη μέθοδο PCR. Οι αλληλουχίες των δύο εξονίων είναι οι εξής:

ggatggtttg gggaccgggg gtgggggatgg ggggtgggct ggggctgggt gtggggttg
gattggcggt ggacgtggag atagagatca gggttggtgg **tgacctgccc catcttcctc**
agagttttca gagtcctgtct cggccactac tccctgtcac cagtttatga atctgggcaq
cagatgttcc aggggggtcaa atccatCccc caccctggct actcccaccc tggccactct
aacGacctca tgctcatcaa actgaacaga agaattcgtc ccactaaaga tgtcagaccc
Atcaacgtct cctctcattg tccctctgct gggacaaagt gcttgggtgc tggctggggg
acaaccaaga gccccaaagg **tgagtgtcca ggttcttctt** gataccgacc catctctgcc
gccttccatc tttctccact tctcattgtg ttctgtttg acagtgcact tccctaaggt

Εικόνα 20: Η αλληλουχία του εξονίου 4 του γονιδίου της KLK5. Με κόκκινο φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτού του εξονίου, ενώ το υπογραμμισμένο κομμάτι αντιστοιχεί στην κωδική αλληλουχία(NC_000019.9).

gccttccatc tttctccact tctcattgtg ttctgtttg acagtgcact tccctaaggt
cctccagtgc ttgaatatca Gcgtgctaag tcagaaaagg tgcgaggatg cttacccgag
acagatagat gacaccatgt tctgcgccgg tgacaaaagca ggtagagact cctgccaggt
gaggacacct ctctttattc agcagataca **actgagtgc caactcggta** acatggagcg
ttgccaaatt ctgagaatcc agcaattgcc aagacagtca ggaccctgt tctcacagag

Εικόνα 21: Η αλληλουχία του εξονίου 5 του γονιδίου της KLK5(NC_000019.9).

Για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζευγάρια των εκκινητών:

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')
SCTEex4 F(3952-3971)	TGA CCT GCC CCA TCT TCC TC
SCTEex4 R(4232-4251)	AAG AAG AAC CTG GAC ACT CA
SCTEex5 F(4272-4291)	GCC TTC CAT CTT TCT CCA CT
SCTEex5 R(4482-4501)	TAC CGA GTT GGC ACT CAG TG

Πίνακας 4: Τα ζευγάρια των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της KLK5 και οι αλληλουχίες τους(NC_000019.9).

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή erpendorf. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν και οι ποσότητές τους είναι:

Αντιδραστήρια (εξόνιο 4)	Ποσότητες
DNA	2μl
Buffer (10x→1x)	2,5μl
MgCl ₂ (25mM→1mM)	1μl
dNTPs (10mM each)	0,5μl
Primer F (50pmoles/μl)	1μl
Primer R (50pmoles/μl)	1μl
Taq polymerase (5U/μl)	0,7μl
dd H ₂ O	16,3μl

Αντιδραστήρια (εξόνιο 5)	Ποσότητες
DNA	2μl
Buffer (10x→1x)	2,5μl
MgCl ₂ (25mM→1mM)	1μl
dNTPs (10mM each)	0,5μl
Primer F (50pmoles/μl)	0,5μl
Primer R (50pmoles/μl)	0,5μl
Taq polymerase (5U/μl)	0,7μl
dd H ₂ O	17,3μl

Πίνακας 5: Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητές τους για την PCR.

Αρχικά, παρασκευαζόταν το μίγμα της αντίδρασης (master mix). Αυτό περιείχε όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το DNA. Οι ποσότητες υπολογίζονταν για $n+1$ αντιδράσεις, δηλαδή για μία αντίδραση παραπάνω, ώστε να είναι αρκετό το μίγμα. Κατόπιν, το μίγμα της αντίδρασης μοιραζόταν στα σωληνάκια erpendorfs. Αφού αναμειχθεί καλά το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα, τα σωληνάκια τοποθετούνταν στο μηχάνημα της PCR και ρυθμιζονταν οι κατάλληλες συνθήκες για την έναρξη της αντίδρασης.

Για να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες στις οποίες οι εκκινητές θα ενισχύσουν τα εξόνια, αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR για διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις ιόντων Mg²⁺ (PCR διαβαθμισμένων θερμοκρασιών). Το εύρος θερμοκρασιών ήταν 51-62°C και οι συγκεντρώσεις των ιόντων Mg²⁺ 1mM, 1,5mM, 2mM, 2,5mM. Τα προϊόντα της PCR διαβαθμισμένων θερμοκρασιών ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης θα αναλυθεί παρακάτω. Ιδανικές συνθήκες, δηλαδή ιδανική θερμοκρασία και συκέντρωση των ιόντων Mg²⁺ για την ενίσχυση κάθε εξονίου, θεωρήθηκαν αυτές στις οποίες εμφανίστηκε ζώνη στο πήκτωμα, εντονότερη σε σχέση με τις άλλες. Επιλέχθηκαν επομένως οι εξής συνθήκες για κάθε αντίδραση PCR, η οποία περιλάμβανε 35 κύκλους:

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 5 min

Αποδιάταξη: 95°C για 45 sec

Συγκόλληση εκκινητών: 59°C για το εξόνιο 4 και 62°C για το εξόνιο 5

Επέκταση: 72°C για 45 sec

Τελική επέκταση: 72°C για 10 min.

Με βάση αυτές τις συνθήκες πραγματοποιήθηκαν όλες οι PCR και για τα δύο εξόνια του γονιδίου της KLK5. Ο αριθμός των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε PCR και σε περαιτέρω μελέτη φαίνεται στον πίνακα:

Εξόνια	Δείγματα-ελέγχου	Δείγματα ασθενών με AD
4	48	31
5	45	24

Πίνακας 6: Ο αριθμός των δειγμάτων-ελέγχου και των ασθενών με AD που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA, για τα εξόνια 4 και 5 του γονιδίου της KLK5.

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ονομάζεται ηλεκτροφόρηση και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν τα μακρομόρια, όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό⁴³. Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή προς το θετικό πόλο εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται γρηγορότερα μέσα από τους πόρους της πηκτής και μεταναστεύουν πιο μακριά σε σχέση με τα μεγαλύτερα μόρια⁴⁴.

2.4.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης είναι:

- η στερεοδιάταξη του DNA (υπερελικωμένη κυκλική μορφή, ανοιχτή κυκλική μορφή, γραμμική)
- το μέγεθος του DNA
- η συγκέντρωση αγαρόζης
- η ένταση του ρεύματος⁴⁰.

2.4.2. Οπτικοποίηση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης

Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα με μία φθορίζουσα χρωστική, το βρωμιούχο αιθίδιο. Η ουσία αυτή παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA⁴⁰. Όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία (UV – γύρω στα 300 nm), το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό λόγω σχηματισμού των συμπλόκων παρεμβολής με το δίκλωνο DNA³⁹. Έτσι οι ζώνες του

DNA χρωματίζονται⁴⁰ και μπορούν να ανιχνευτούν τα προϊόντα της PCR³⁹. Επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ένα ισχυρό μεταλλαξιγόνο, δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το δέρμα και για αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στο χειρισμό του⁴⁰.

2.4.3. Διαλύματα της ηλεκτροφόρησης

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA, προστίθεται κατάλληλο διάλυμα (loading buffer) που περιέχει χρωστική (μπλε της βρωμοφαινόλης ή κυανού της ξυλόλης), ώστε να γίνεται εύκολη η παρατήρηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον, το διάλυμα αυτό περιέχει και γλυκερόλη ώστε το DNA να καθιζάνει καθώς τοποθετείται στην πηκτή⁴⁰.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, συνεπώς, με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης πραγματοποιήθηκε τόσο ο ποιοτικός έλεγχος της απομόνωσης DNA, που αναφέρθηκε παραπάνω, όσο και η ανίχνευση των προϊόντων της PCR, ώστε να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των δύο εξονίων του γονιδίου της KLK5.

Για την παρασκευή της πηκτής αгарόζης και την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες των πειραμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (έλεγχος απομόνωσης DNA)

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή και τοποθέτηση της ειδικής 'χτένας' που θα δημιουργήσει θέσεις-'πηγάδια' για τη φόρτωση του δείγματος.
2. Τοποθέτηση 0,5 gr αгарόζης σε κωνική φιάλη.
3. Προσθήκη 50 ml TAE 1x.
4. Βράσιμο του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων με συχνή ανάδευση.
5. Ανακίνηση του διαλύματος μέχρι να κρυώσει.
6. Προσθήκη 2 ml βρωμιούχου αιθιδίου.
7. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο μέχρι να πήξει.
8. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1x ώστε να καλύπτει τα πηγάδια.
9. Ανάμειξη 2ml χρωστικής (loading buffer) με 3ml DNA και εισαγωγή των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής. Τοποθετείται επιπλέον και ο μοριακός μάρτυρας (ladder) για την επιβεβαίωση του σωστού μεγέθους των PCR προϊόντων.
10. Ρύθμιση της τάσης του ρεύματος στα 150V και έναρξη της ηλεκτροφόρησης.
11. Παρατήρηση των ζωνών του DNA στη συσκευή UV μετά από περίπου 30 λεπτά (η χρωστική εμφανίζεται περίπου στα 2/3 του μήκους της πηκτής).

Για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% (έλεγχος προϊόντων PCR)

Ζυγίζεται 0,75 gr αгарόζης και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με παραπάνω, με τη διαφορά ότι αναμειγνύονται 2ml loading buffer με 5ml προϊόν PCR.

2.5. *Ανάλυση του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP)*

Η ανάλυση του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) καθιερώθηκε από τους Orita και συνεργάτες (1989) ως μια απλή, αποδοτική και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση αλλαγών στην αλληλουχία γονιδιακών τόπων. Βασίζεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος, διαμέσου μη αποδιατακτικών πηκτωμάτων, εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους.

2.5.1. *Διαδικασία*

Ειδικότερα, μετά από την ενίσχυση μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA, τμήματα DNA υποβάλλονται σε αποδιάταξη με θέρμανση ή με χημικούς παράγοντες (φορμαμίδιο). Κατόπιν, τα αποδιαταγμένα τμήματα DNA ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλιωνα τμήματα DNA παίρνουν ένα συγκεκριμένο τρισδιάστατο σχήμα, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, και συνεπώς αποκτούν διαφορετική διαμόρφωση. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα εξαρτάται λοιπόν από αυτό το τρισδιάστατο σχήμα. Με βάση τις αρχές αυτές, είναι σαφές ότι διαφορά έστω και σε μία μόνο βάση, ανάμεσα στο υπό εξέταση τμήμα DNA και στο αντίστοιχο φυσιολογικό τμήμα, επαρκεί ώστε αυτά να αποκτήσουν διαφορετική διαμόρφωση και συνεπώς να μετακινηθούν σε διαφορετική θέση κατά την ηλεκτροφόρηση.

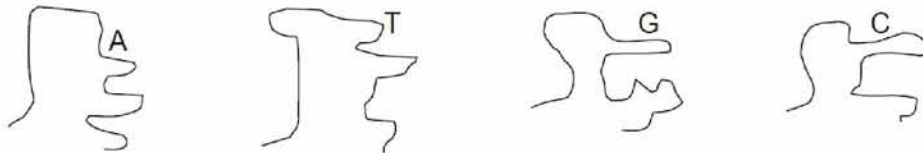
Για την ανάλυση SSCP είναι σημαντικό να επιτυγχάνεται πλήρης και, κατά το δυνατόν, μη αναστρέψιμη αποδιάταξη των κλώνων του DNA. Η ατελής αποδιάταξη, η μερική αναδίπλωση και η επανασύνδεση προς δίκλινο DNA μειώνει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα του μονόκλωνου DNA που περιέχεται στο διάλυμα ανάλυσης και συνεπώς επηρεάζει την ανίχνευση μονόκλωνων μορίων. Η αποδιάταξη των προϊόντων της PCR γίνεται συνήθως με επώαση σε υψηλή θερμοκρασία, δηλαδή 95°C για 5 έως 7 λεπτά, ακολουθούμενη αμέσως από ψύξη σε πάγο για 10 λεπτά περίπου. Υπάρχουν διάφοροι αποδιατακτικοί παράγοντες, όπως το φορμαμίδιο. Στην Εικόνα 22 απεικονίζεται σχηματικά η μέθοδος SSCP:

Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου SSCP

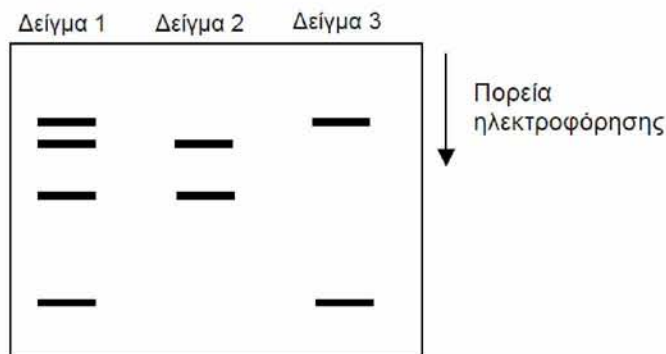
Έστω ότι σε μία θέση ενός τμήματος DNA διπλοειδούς οργανισμού υπάρχει η ετεροζυγωτία A/G. Συνεπώς στο ένα αλληλόμορφο το δίκλωνο DNA θα έχει σύσταση A/T και στο άλλο αλληλόμορφο G/C.



Μετά την αποδιάταξή τους και κατά την ηλεκτροφόρηση, τα τέσσερα, μονόκλιωνα πλέον, μόρια αποκτούν διαφορετική τρισδιάστατη διαμόρφωση, έστω αυτήν που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, με αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα.



Έτσι, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την χρώση του πηκτώματος, στο συγκεκριμένο δείγμα (Δείγμα A) θα προκύψουν τέσσερις διακριτές ζώνες. Επίσης, αν στο πήκτωμα αυτό συμπεριληφθούν και δείγματα, ομόζυγα για το αλληλόμορφο 1 και 2 αντίστοιχα (Δείγμα 2 και 3), τελικά θα έχουμε μία εικόνα ως εξής:



Εικόνα 22: Η μέθοδος SSCP.

2.5.2. Παράγοντες που επιδρούν στη μέθοδο SSCP

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την ευαισθησία της ανάλυσης SSCP είναι:

- Η σύσταση του πηκτώματος: Το πιο κοινό πήκτωμα είναι το συνδεδεμένο πολυμερές ακρυλαμιδίου (8-12%). Το μικρό μέγεθος των πόρων των πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου τα καθιστά ιδανικά για την υψηλή διακριτική ικανότητα και ανάλυση, ακόμα και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων.
- Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος: Το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-βορικού αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα εκλογής στην ανάλυση SSCP. Η προσθήκη γλυκερόλης, ακόμη, έχει βρεθεί ότι μειώνει το pH και ελαττώνει την ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του σκελετού των νουκλεϊκών οξέων, επιτρέποντας έτσι υψηλότερη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών τμημάτων DNA.
- Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης: Προφανώς ο χρόνος της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται τόσο από το μήκος του πηκτώματος όσο και από την τάση που εφαρμόζεται. Είναι προτιμότερο να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση με σχετικά χαμηλή τάση, η οποία θα αυξηθεί μόλις τα τμήματα έχουν εισέλθει στο πήκτωμα.
- Το μήκος του πηκτώματος: Κατά κανόνα, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του πηκτώματος, τόσο καλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα, καθώς συχνά οι διαφορές στη διαμόρφωση του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου μονόκλωνου DNA είναι τόσο μικρές ώστε να μετακινούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους.
- Η συγκέντρωση του DNA: Οι υψηλές συγκεντρώσεις DNA οδηγούν συχνά στη μείωση της ειδικής συγκέντρωσης του μονόκλωνου DNA, γιατί τα δύο μονόκλινα μόρια τείνουν να επανασυνδεθούν και να σχηματίσουν δίκλινο DNA. Συνεπώς, καλό είναι να διατηρείται σχετικά χαμηλή συγκέντρωση DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης.
- Η θερμοκρασία της ηλεκτροφόρησης: Η γνωστή επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα της δευτεροταγούς δομής των μονόκλωνων τμημάτων DNA μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα της SSCP σε ποικίλο βαθμό (ανάλογα με την πρωτοταγή αλληλουχία). Συνιστάται να εκτελείται σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας⁴⁵.

Τα δείγματα στα οποία ενισχύθηκαν σωστά τα εξόνια από την PCR, υποβλήθηκαν στη διαδικασία ανάλυσης SSCP.

Αρχικά, γίνεται προετοιμασία της συσκευής που θα πραγματοποιηθεί η ανάλυση SSCP. Πρώτα στήνονται σε ειδική βάση τα τζάμια που θα χρησιμοποιηθούν. Τα τζάμια αυτά σχηματίζουν ένα ειδικό άνοιγμα στο οποίο θα τοποθετηθεί το διάλυμα της πηκτής μέχρι να πήξει. Στα δύο άκρα των τζαμιών τοποθετούνται spacers για να δημιουργηθεί το επιθυμητό πάχος στην πηκτή. Τα spacers που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα είχαν πάχος 2cm. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή 62,5ml πηκτής πολυακρυλαμίδης 10% και την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για το πείραμα αυτό είναι τα ακόλουθα:

1. Προσθήκη 6,25gr ακρυλαμίδης και 0,16gr bis-ακρυλαμίδη σε κωνική φιάλη για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος της ακρυλαμίδης.
2. Συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι να καλυφθεί η σκόνη (κάτω από 50ml).
3. Ανάδευση του διαλύματος.
4. Προσθήκη 6,5ml γλυκερόλης 50% και 5ml TBE 10x στην κωνική φιάλη που αναδεύεται.
5. Διήθηση του διαλύματος και μεταφορά του σε ογκομετρικό σωλήνα.
6. Προσθήκη ddH₂O μέχρι τον όγκο των 62,5ml και μεταφορά του διαλύματος σε κωνική φιάλη.
7. Προσθήκη 62,5μl TEMED (Tetramethylethylenediamine) και 325μl APS (ammonium persulfate) στην κωνική φιάλη.
8. Ανάδευση του διαλύματος της κωνικής και γρήγορη τοποθέτησή του σε τζάμια, πριν αυτό πήξει.
9. Τοποθέτηση των ειδικών 'χτενών' που θα δημιουργήσουν τα 'πηγάδια' και συμπλήρωση στις άκρες με το διάλυμα που περίσσεψε για να αντικατασταθεί τυχόν ποσότητα του διαλύματος που μπορεί να χύθηκε λόγω της εισαγωγής των χτενών.
10. Στερεοποίηση της πηκτής (~ 30 λεπτά) και προσθήκη στη συσκευή ηλεκτροφόρησης TBE 0,5x .
11. Αφού πήξει η πηκτή, αφαιρούνται τα τζάμια από την ειδική βάση καθώς και τα χτενάκια.
12. Πραγματοποιείται καθαρισμός των πηγαδιών διότι η αφαίρεση των χτενών μπορεί να αφήσει υπολείμματα ακρυλαμίδης.
13. Τοποθέτηση των τζαμιών στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
14. Γέμισμα με TAE 1x τόσο της συσκευής όσο και ανάμεσα των τζαμιών για να δημιουργηθεί κύκλωμα.
15. Ανάμειξη 5μl από τα προϊόντα της PCR με 10μl κατάλληλου διαλύματος χρωστικής (loading buffer) και τοποθέτησή τους στο ειδικό μηχάνημα αποδιάταξης.
16. Διατήρηση των αποδιαταγμένων προϊόντων σε πάγο.
17. Τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγάδια της πηκτής.
18. Ρύθμιση της συσκευής στα 230V και 47mA, σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων για ~22 ώρες.

Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναφέρθηκαν για το διάλυμα της πηκτής αφορούν την παρασκευή μίας μόνο πηκτής. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα επιτρέπει την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση δύο πηκτών πολυακρυλαμίδης. Επομένως για την παρασκευή δύο πηκτών υπολογίζονται οι διπλάσιες ποσότητες των αντιδραστηρίων.

2.5.3. Χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Για να γίνει ορατό το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο. Για τη χρώση αυτή χρησιμοποιούνται 3 διαλύματα:

Διάλυμα 1

Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται 10ml αιθανόλης, 0,5ml οξικού οξέος και ddH₂O μέχρι τον όγκο των 400ml. 200ml του διαλύματος αυτού προστίθεται στην πηκτή πολυακρυλαμίδης για 3min υπό ανάδευση και ακολούθως τα υπόλοιπα 200ml για άλλα 3min. Στη συνέχεια, η πηκτή ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό για 1min.

Διάλυμα 2

Μετά το πρώτο διάλυμα, στην πηκτή προστίθενται 200ml διαλύματος νιτρικού αργύρου AgNO₃ (1gr AgNO₃/ 1ltH₂O) για 15min υπό ανάδευση, δηλαδή το διάλυμα 2. Ακολουθεί ξέπλυμα της πηκτής 2 φορές με απεσταγμένο νερό για 1min.

Διάλυμα 3

Το τελευταίο διάλυμα αποτελείται από 3gr NaOH, 0,01gr NaBH₄, 1ml φορμαλδεΰδης και 200ml H₂O. Το διάλυμα αυτό προστίθεται στην πηκτή και διατηρείται υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των δειγμάτων σε ικανοποιητικό βαθμό (περίπου 20min). Τέλος, ξεπλένεται η πηκτή με απεσταγμένο H₂O.

Μετά τη χρώση της πηκτής είναι δυνατή η παρατήρηση των προτύπων (ζωνών) που έχουν εμφανιστεί στο πήκτωμα.

2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Όσα δείγματα (PCR προϊόντα) εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν εκ νέου σε PCR, με τελικό όγκο 50μl. Από το PCR προϊόν ηλεκτροφορούνται 7μl σε πηκτή αγαρόζης 1,5% ώστε να διαπιστωθεί αν το επιθυμητό τμήμα έχει ενισχυθεί αρκετά. Το υπόλοιπο προϊόν, περίπου 40μl, καθαρίζεται με kit της Invitrogen για ανάκτηση καθαρού PCR προϊόντος. Ο τελικός όγκος που αποδίδει ο καθαρισμός είναι περίπου 48μl.

2.6.1. Ποιοτική και ποσοτική αποτίμηση του καθαρισμού

Όπως και στον έλεγχο της απομόνωσης DNA, ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA των καθαρών PCR προϊόντων έγινε με φωτομέτρηση στα 260 nm. Συγκεκριμένα, έγινε λήψη 2 μl από το PCR προϊόν και αραιώσή τους σε 98 μl ddH₂O. Το μίγμα προστέθηκε στην κυβελίδα και ρυθμίστηκε στο φωτόμετρο η κατάλληλη αραιώση. Η τιμή που δίνει το φωτόμετρο αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του DNA στο καθαρισμένο δείγμα.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Με αυτό τον τρόπο επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού.

2.6.2. Κατακρήμνιση του καθαρού προϊόντος

Μετά τον καθαρισμό, το καθαρό πλέον προϊόν υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση του DNA. Η κατακρήμνιση του DNA έγινε με προσθήκη 300 μl παγωμένης αιθανόλης 70% και 10 μl NaOAc 3M στο καθαρό προϊόν. Επειδή η αιθανόλη είναι πολύ λιγότερο πολική σε σχέση με το νερό, αν γίνει προσθήκη αρκετής, η έλξη μεταξύ DNA και κατιόντων που περιέχονται στο διάλυμα γίνεται αρκετά ισχυρή ώστε να σχηματίσει σταθερούς ιονικούς δεσμούς με αποτέλεσμα το DNA να κατακρημνίζεται. Το NaOAc είναι το θειικό άλας του οξικού οξέος και διευκολύνει την κατακρήμνιση του DNA προσφέροντας τα ιόντα που χρειάζονται για να αλληλεπιδράσουν με το DNA παρεμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών.

Τα erpendorfs αναδεύτηκαν ελαφρά για να εξαφανιστούν οι υφές και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C για 20 λεπτά (για άμεση χρήση του DNA που περιέχουν) ή overnight. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 25 min και αφαιρέθηκε το υπερκείμενό τους. Τέλος, ακολούθησε ξήρανση στο φούρνο στους 37°C για 1 ώρα.

2.7. Αλληλούχιση των προϊόντων PCR

Η διαδικασία κατά την οποία καθορίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος DNA ονομάζεται αλληλούχιση του DNA⁴⁶. Υπάρχουν δύο βασικοί λόγοι για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός μορίου DNA:

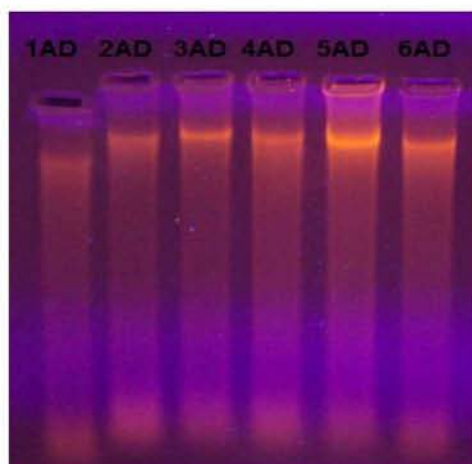
- Παρέχει τη βάση για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας του DNA
- Προσδιορίζει την ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας στη μορφή των μεταλλάξεων και των γενετικών ανασυνδυασμών και εκτιμά τη σημασία της³⁹.

Το τελευταίο στάδιο στην ερευνητική διαδικασία επομένως, είναι η αλληλούχιση των PCR προϊόντων που στην ανάλυση SSCP εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο ζωνών. Τα προϊόντα αυτά, είχαν καθαριστεί προηγουμένως και περιείχαν την απαιτούμενη συγκέντρωση DNA ώστε να αναλυθούν για την αναζήτηση τυχών πολυμορφισμών. Η ύπαρξη πολυμορφισμών θα επιβεβαιώσει το διαφορετικό πρότυπο που εμφάνισαν κατά την ανάλυση SSCP⁴¹. Η επεξεργασία των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής BioEdit και ClustalW2.

3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση γενωμικού DNA

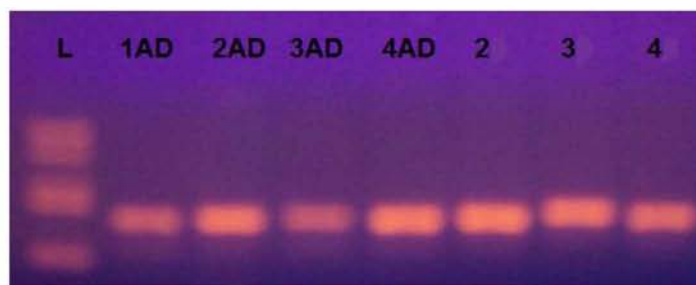
Στην παρούσα έρευνα απομονώθηκε DNA από 48 άτομα ελέγχου και 31 ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά απομονωμένα δείγματα, στα οποία φαίνεται η ύπαρξη DNA.



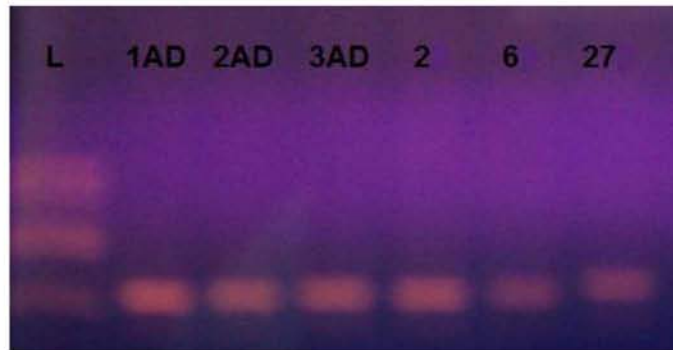
Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση στα απομονωμένα δείγματα των ασθενών: 1-6 AD.

3.2. Μέθοδος PCR

Τα δείγματα τα οποία μελετήθηκαν με τη μέθοδο PCR ήταν 48 δείγματα-ελέγχου, 31 δείγματα ασθενών για το εξόνιο 4 και, 45 δείγματα-ελέγχου, 24 δείγματα ασθενών για το εξόνιο 5 του γονιδίου της KLK5. Στις Εικόνες 24 και 25 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά οι ηλεκτροφορήσεις των ενισχυμένων δειγμάτων και για τα δύο εξόνια. Η επιβεβαίωση της ενίσχυσης του σωστού τμήματος του γονιδίου της KLK5, 300bp για το εξόνιο 4 και 230bp για το εξόνιο 5, προέρχεται από τη σύγκριση του μεγέθους των προϊόντων PCR με τον μοριακό μάρτυρα(ladder).



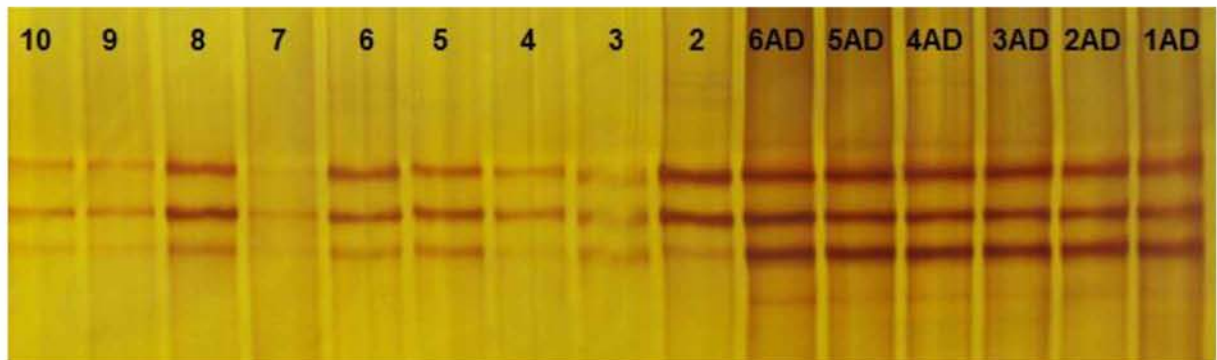
Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων του εξονίου 4 για τα δείγματα 1-3AD των ασθενών και 2-4 από τα δείγματα ελέγχου. Ο μοριακός μάρτυρας (L) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Bluescript μετά από πέψη με BSTU. Οι ζώνες του μάρτυρα μοριακού βάρους έχουν τα ακόλουθα μεγέθη: 1^η ζώνη 581bp, 493bp, 2^η ζώνη 376bp, 332bp, 330bp, 3^η ζώνη 206bp, 200bp. Η ζώνη του προϊόντος PCR για το εξόνιο 4 εμφανίζεται στις 300bp, δηλαδή λίγο πιο κάτω από την 3^η ζώνη του μοριακού μάρτυρα.



Εικόνα 25: Τα PCR προϊόντα του εξονίου 5 στα δείγματα 1-6 AD των ασθενών και 2, 6, 27 των δειγμάτων ελέγχου. Ο μοριακός μάρτυρας είναι ο ίδιος που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων του εξονίου 4. Τα προϊόντα PCR φαίνονται λίγο πιο πάνω από την 3^η ζώνη του μοριακού μάρτυρα, δηλαδή στις 230bp.

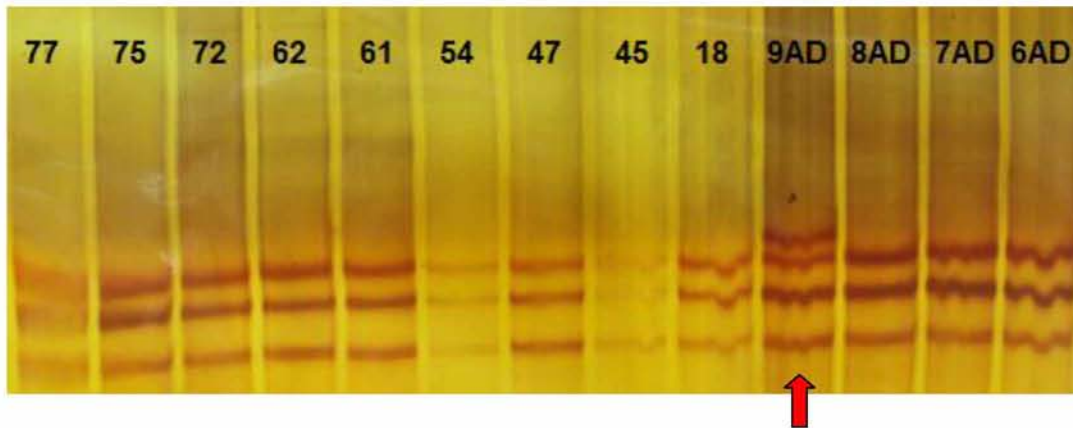
3.3. Ανάλυση SSCP

Στα δείγματα που ενισχύθηκαν τα εξόνια 4 και 5 του γονιδίου της KLK5, δηλαδή εμφάνισαν προϊόντα PCR, ακολούθησε η ανάλυσή τους με τη μέθοδο SSCP.



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης των δειγμάτων 1-6AD των ασθενών και 2-10 των δειγμάτων ελέγχου για το εξόνιο 4.

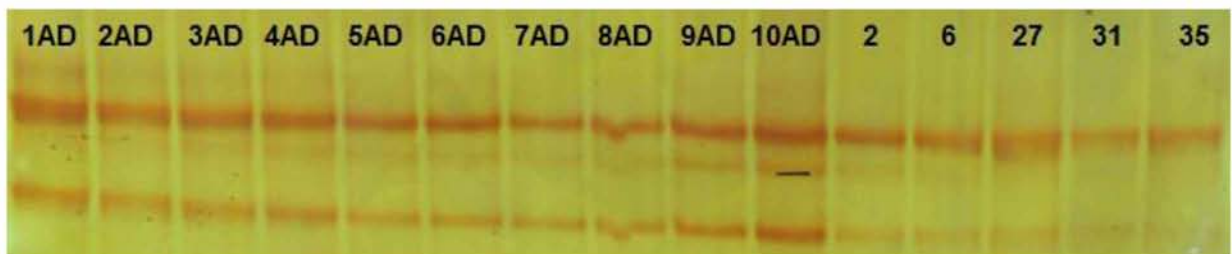
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, τα συγκεκριμένα δείγματα παρουσίασαν το ίδιο πρότυπο ζωνών (3 ζώνες) για το εξόνιο 4. Το ίδιο ακριβώς πρότυπο παρουσίασαν και όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο SSCP για το εξόνιο 4, τόσο των ασθενών όσο και των ατόμων ελέγχου. Μόνο ένα δείγμα εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο σε σχέση με τα υπόλοιπα. Το δείγμα αυτό ανήκε σε ασθενή με ατοπική δερματίτιδα και παρουσίασε 4 ζώνες αντί για τις συνηθισμένες 3 και παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 27: Το διαφορετικό πρότυπο ζωνών που εμφάνισε το δείγμα 9AD σε σχέση με τα υπόλοιπα, για το εξόνιο 4 (σημειώνεται με μαύρο βέλος).

Επομένως, το δείγμα αυτό θεωρείται υποψήφιο για την ύπαρξη κάποιου πολυμορφισμού στο εξόνιο 4 του γονιδίου της KLK5. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε εκ νέου PCR και ο καθαρισμός του, έτσι ώστε να περιέχει επαρκή ποσότητα καθαρού DNA και να είναι έτοιμο για αλληλούχιση. Η διαδικασία αλληλούχισης θα αποκαλύψει αν υπάρχει κάποια διαφορά στην αλληλουχία της μιας αλυσίδας του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου, λόγω πολυμορφισμού. Αυτή η διαφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ίσως είναι ο λόγος της διαφορετικής της κινητικότητας στην πηκτή πολυακρυλαμίδης σε σχέση με τις υπόλοιπες. Συνεπώς το πρότυπο των 4 ζωνών που εμφανίστηκε στο δείγμα 9AD ίσως αντιπροσωπεύει τις 4 αλυσίδες των δύο αλληλομόρφων του εξονίου 4 που έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαιτίας πιθανού πολυμορφισμού στη μία αλυσίδα. Αν ισχύει αυτό, ο ασθενής αυτού του δείγματος θα είναι ετερόζυγο άτομο. Αντίθετα, αν ήταν ομόζυγος θα εμφάνιζε δύο ζώνες στην πηκτή πολυακρυλαμίδης. Οι 3 ζώνες που εμφάνισαν όλα τα υπόλοιπα δείγματα αντιστοιχούν στις 2 αποδιαταγμένες αλυσίδες του ενός αλληλομόρφου και στο δίκλωνο DNA του άλλου αλληλομόρφου που δεν αποδιατάχθηκε.

Στην ανάλυση SSCP των προϊόντων PCR του εξονίου 5, όλα τα δείγματα, ασθενών και φυσιολογικών, εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο ζωνών. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως δεν υπάρχει πολυμορφισμός σε κάποια από τις αλυσίδες των αλληλομόρφων του εξονίου 5. Συνεπώς κανένα από τα προϊόντα PCR του εξονίου 5 δεν θεωρήθηκε υποψήφιο για αλληλούχιση. Στην εικόνα 28 παρουσιάζεται ενδεικτικά η ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για το εξόνιο 5 του γονιδίου της KLK5:



Εικόνα 28: Η ανάλυση SSCP των δειγμάτων 1-9AD των ασθενών και 2, 6, 27, 31, 35 των δειγμάτων ελέγχου για το εξόνιο 5. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν το ίδιο πρότυπο ζωνών, δηλαδή 2 ζώνες. Συνεπώς πρόκειται για ομόζυγα άτομα.

3.4. Αλληλούχιση

Στο δείγμα 9AD που εμφάνισε το διαφορετικό πρότυπο ζωνών για το εξόνιο 4 στην ανάλυση SSCP, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αλληλούχισης. Μαζί με το δείγμα αυτό επιλέχθηκε και ένα ακόμη, το 8AD, που εμφάνισε το κλασικό πρότυπο των 3 ζωνών. Με τη βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής BioEdit και ClustalW2 αποκαλύπτονται και στοιχίζονται οι αλληλουχίες των δύο δειγμάτων, οι οποίες απεικονίζονται παρακάτω:

```

8Ad-KLK5exon3      CATCTTCCTCAGAGTTTTTCAGAGTCCGTCTCGGCCACTACTCCCTGTCACCAGTTTATGA 60
9AD-KLK5exon3      CATCTTCCTCAGAGTTTTTCAGAGTCCGTCTCGGCCACTACTCCCTGTCACCAGTTTATGA 60
*****

8Ad-KLK5exon3      ATCTGGGCAGCAGATGTTCCAGGGGGTCAAATCCATCCCCACCCTGGCTACTCCCACCC 120
9AD-KLK5exon3      ATCTGGGCAGCAGATGTTCCAGGGGGTCAAATCCATCCCCACCCTGGCTACTCCCACCC 120
*****

8Ad-KLK5exon3      TGGCCACTCTAACCTCATGCTCATCAAACGAGAGAAGAATTCGTCCCCTAAAGA 180
9AD-KLK5exon3      TGGCCACTCTAACCTCATGCTCATCAAACGAGAGAAGAATTCGTCCCCTAAAGA 180
*****

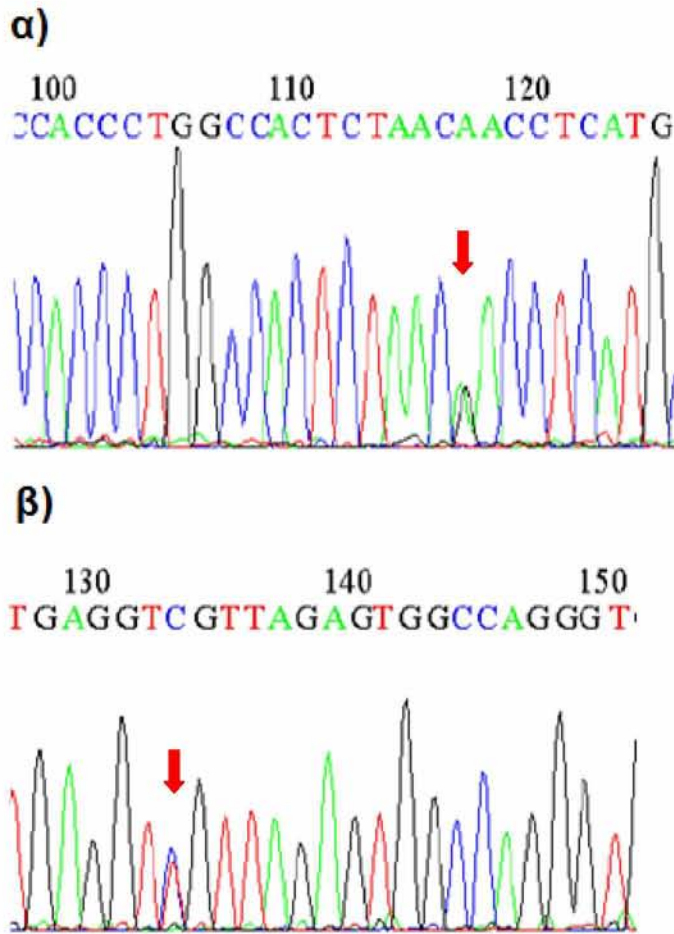
8Ad-KLK5exon3      TGTGAGACCCATCAACGTCTCCTCTCATTTGTCCTCTGCTGGGACAAAGTGCTTGGTGTC 240
9AD-KLK5exon3      TGTGAGACCCATCAACGTCTCCTCTCATTTGTCCTCTGCTGGGACAAAGTGCTTGGTGTC 240
*****

8Ad-KLK5exon3      TGGCTGGGGGACAACCAAGAGCCCCCAAGGTGAGTGTCC----- 279
9AD-KLK5exon3      TGGCTGGGGGACAACCAAGAGCCCCCAAGGTGAGTGTCCAGGTTCTTCT 289
*****

```

Εικόνα 29: Οι αλληλουχίες των δειγμάτων 9AD και 8AD, μετά τη στοιχίση τους με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW2. Με κόκκινο φαίνεται η φυσιολογική τριπλέτα που αντιστοιχεί στο ασπαραγινικό οξύ (D). Με κίτρινο απεικονίζεται η αλλαγή από G σε A (μετάπτωση) στη θέση 4095 της αλληλουχίας του εξονίου 4 του δείγματος 9AD (NC_000019.9). Με υπογράμμιση φαίνονται οι εκκινητές (F πάνω και R κάτω).

Το ηλεκτροφορέγραμμα που αποκάλυψε το πρόγραμμα του υπολογιστή απεικονίζεται στην Εικόνα 30:



Εικόνα 30: Το τμήμα της αλληλουχίας του εξονίου 4 με βάση τον εκκινητή F (forward) **α)** και R (reverse) **β)** που αποκάλυψε το ηλεκτροφορογράμμο. Με κόκκινο βελάκι απεικονίζεται η ετεροζυγωτία.

Όπως φαίνεται από τη στοίχιση των δύο αλληλουχιών στην εικόνα 29, στη θέση 4095 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του εξονίου 4 του δείγματος 9AD υπάρχει η αλλαγή της γουανίνης (G), που εμφανίζεται φυσιολογικά στο δείγμα 8AD, σε αδενίνη (A). Η γενετική αυτή αλλαγή είναι μια μετάπτωση καθώς μια πουρίνη, η γουανίνη στη συγκεκριμένη περίπτωση, αλλάζει σε μια άλλη πουρίνη, την αδενίνη. Το αποτέλεσμα αυτής της αλλαγής είναι η μεταβολή του ασπαραγινικού οξέος (D) σε ασπαραγίνη (N). Σε όλη την υπόλοιπη αλληλουχία τους τα δύο δείγματα εμφανίζουν ταύτιση που υποδηλώνεται από τους αστερίσκους στο κάτω μέρος. Η αλληλουχία του δείγματος 8AD δεν παρουσιάζεται μέχρι τέλους, αλλά μετά τη θέση 279 εμφανίζονται κάποιες παύλες. Αυτό σημαίνει πως σε εκείνο το τμήμα δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της αλληλουχίας από το πρόγραμμα του υπολογιστή, λόγω κακής ποιότητας της αλληλουχίας στο τελικό άκρο. Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται η αλληλουχία της πρωτεΐνης KLK5. Η αντικατάσταση του αμινοξέος εντοπίζεται στη θέση 153 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας.

"MATARPPWMWVLCALITALLLGVTEHVLANNDVSCDHPSTVPS
GSNQDLGAGAGEDARSDDSSRIINGSDCDMHTQFWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQW
LLTAAHCRKKVFRVRLGHYSLSPVYESGQMFQGVKSIHPHGYSHPGHSN LMLIKLN
RRIRPTKDVRPINVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHFVKVLQCLNISVLSQKRCE
DAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDCQGDSCGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPCARPNRPGVYT
NLCKFTKWIQETIQANS"

Εικόνα 31: Η αλληλουχία των αμινοξέων που προκύπτει από το μετάγραφο του γονιδίου της KLK5 (NC_000019.9). Με κόκκινο φαίνεται το αμινοξύ που αλλάζει και από ασπαραγινικό (D) γίνεται ασπαραγίνη (N) στο εξόνιο 4 (δείγμα 9AD). Το τμήμα της μεταφραζόμενης αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο εξόνιο 4 φαίνεται με υπογράμμιση.

Συνεπώς, από τα 31 δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν για το εξόνιο 4 μόνο ένα εμφάνισε πολυμορφισμό. Δηλαδή, ένας ασθενής από τους 31 που μελετήθηκαν ήταν ετερόζυγος ενώ οι υπόλοιποι ομόζυγοι. Για το εξόνιο 5 αντίθετα, κανένα από τα 24 δείγματα ΑΔ δεν εμφάνισε αλλαγή, επομένως ανήκουν σε ομόζυγα άτομα.

4. Συζήτηση

Έχουν γίνει εντατικές μελέτες πολλών ετών σχετικά με την παθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας. Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος ανέδειξαν πολλές γενετικές περιοχές οι οποίες συσχετίζονται με την ασθένεια, όπως 4q35.2, 11q13, 16q24.1 5q31.1. Πολυμορφισμοί σε γονίδια αυτών των γενετικών τόπων αποτελούν όμως μόνο ένα κομμάτι της γενετικής βάσης της παθογένειας της ΑΔ. Ωστόσο, η αιτιοπαθολογία της παραμένει άγνωστη¹³.

Τις προηγούμενες δεκαετίες, εκτεταμένες έρευνες είχαν εστιαστεί στην υπόθεση ότι η δυσλειτουργία του επιδερμικού φραγμού αποτελεί δευτερεύων συνέπεια της φλεγμονώδους αντίδρασης στα ερεθίσματα και αλλεργιογόνα («inside-outside hypothesis»). Τα τελευταία χρόνια, μια αναδυόμενη θεωρία εξετάζει τη διαταραχή της λειτουργίας του φραγμού του δέρματος ως πρωταρχικό γεγονός στην αιτιοπαθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας («outside-inside hypothesis»)¹³.

Εάν μια διαταραχή στην λειτουργία του δερμοεπιδερμικού φραγμού αποτελούσε πρωταρχικό γεγονός στην δημιουργία της ΑΔ, τότε τα γονίδια που συνθέτουν τον μηχανισμό λειτουργίας του δερμοεπιδερμικού φραγμού αποτελούν σημαντικούς υποψήφιους παράγοντες συμμετοχής στην γενετική βάση και παθογένεια της ασθένειας. Αν και αυτή η υπόθεση προτάθηκε από τον Alain Taieb το 1999⁴⁷, μόλις τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να ερευνάται συστηματικά. Η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών των κορνεοδεσμοσωμάτων αποτελεί το τελευταίο στάδιο απαραίτητο για την διαδικασία της απολέπισης. Βάσει του δεδομένου αυτού κρίνεται εύλογο ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεάσες και τους αναστολείς τους αποτελούν κύριους υποψήφιους στόχους για την συμμετοχή τους στην γενετική βάση και αιτιοπαθογένεια της ΑΔ. Οι πρωτεάσες με την μεγαλύτερη διαπιστωμένη πρωτεολυτική δράση στα ανώτερα στρώματα της κεράτινης στιβάδας είναι οι σερινο-πρωτεάσες *SCCE/KLK7* και *SCTE/KLK5*¹⁷. Πρόσφατες μελέτες έχουν κάνει μια πρωτότυπη και ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ μιας μετάλλαξης στην 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της *SCCE/KLK7* και της ΑΔ, η οποία είναι πιο σημαντική σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα IgE³². Τα ερευνητικά αυτά δεδομένα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η υπερ-έκφραση της *SCCE/KLK7* σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού οδήγησε σε ένα κλινικό φαινότυπο αντίστοιχο με αυτόν της ΑΔ⁴⁸, κατέστησαν το γονίδιο της *SCCE/KLK7* κυρίαρχο υποψήφιο για μια πρωταρχική γενετική διαταραχή στον επιδερμικό φραγμό των ασθενών με ατοπική δερματίτιδα.

Ωστόσο πολύ πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έρχονται να ανατρέψουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο της *SCCE/KLK7*, προτείνοντας την *SCTE/KLK5* ως τον κυρίαρχο ρυθμιστή της πρωτεόλυσης του δερμοεπιδερμικού φραγμού και πρωτεύων γενετικό στόχο στην αιτιοπαθογένεια της ΑΔ³¹.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκε το γονίδιο της πρωτεάσης *KLK5*. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν τα δύο από τα πέντε κωδικά εξόνια του, για εύρεση τυχόν πολυμορφισμών που δύναται να συσχετίσουν το γονίδιο αυτό με την παθοφυσιολογία της ατοπικής δερματίτιδας. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, ένα μόνο δείγμα ασθενή με ατοπική δερματίτιδα εμφάνισε αλλαγή στη νουκλεοτιδική αλληλουχία για το εξόνιο 4 του γονιδίου της *KLK5* (G4095A).

Αναλυτικότερα, η σημειακή μετάλλαξη που εμφανίστηκε στο δείγμα 9AD προκαλεί τη μεταβολή του ασπαραγινικού οξέος σε ασπαραγίνη στη θέση 153 της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης *KLK5*. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι θέσεις των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας είναι συντηρημένες σε όλες τις πρωτεάσες καλλικρεΐνης³³. Για την *KLK5* συγκεκριμένα οι θέσεις των

καταλυτικών αμινοξέων είναι: His¹⁰⁸, Asp¹⁵³ και Ser²⁴⁵⁵⁰. Γίνεται φανερό επομένως πως το ασπαραγινικό οξύ που αλλάζει στο εξόνιο 4 του δείγματος 9AD είναι ένα από τα 3 καταλυτικά αμινοξέα του γονιδίου της KLK5. Είναι γνωστό ακόμη πως κάθε ένα από αυτά τα κατάλοιπα περιβάλλεται από ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο (DLMLI). Εφόσον η νουκλεοτιδική αλλαγή G4095A στο εξόνιο 4 του γονιδίου της KLK5 επηρεάζει ένα από τα καταλυτικά αμινοξέα, η αντικατάσταση αυτού του καταλοίπου από κάποιο άλλο (ασπαραγίνη), μπορεί να επηρεάσει την καταλυτικότητα της αμινοξικής τριάδας στην πρωτεΐνη και επακόλουθα την ενζυμική δράση της KLK5. Το ασπαραγινικό είναι ένα αμινοξύ με όξινη πλευρική αλυσίδα, που είναι αρνητικά φορτισμένη σε φυσιολογικό pH. Η ασπαραγίνη είναι το μη φορτισμένο παράγωγο του ασπαραγινικού, καθώς περιέχει τελική ομάδα καρβοξυλαμιδίου αντί καρβοξυλίου⁴³. Η διαφορά αυτή στο φορτίο των δύο αμινοξέων ίσως είναι ο παράγοντας που επηρεάζει τη λειτουργία της KLK5. Η αντικατάσταση ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος (ασπαραγινικό) από ένα μη φορτισμένο (ασπαραγίνη) πιθανώς διαταράσσει τη δομή της πρωτεΐνης στο χώρο. Η αλλαγή όμως της δομής της πρωτεΐνης έχει αντίκτυπο στη λειτουργία της. Επιπρόσθετα η KLK5 ως πρωτεάση σερίνης στην κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας, έχει κύριο ρόλο στη διαδικασία της απολέπισης¹⁷. Συνεπώς η διαταραχή της λειτουργίας της μπορεί να προκαλέσει ελαττωματική πρωτεόλυση των κορνεοδεσμοσωμάτων, των δομών που συγκρατούν ενωμένα τα κορνεοκύτταρα μεταξύ τους. Διαδοχικά η σύνδεση των κορνεοκυττάρων διαταράσσεται οπότε προκαλείται βλάβη του δερμοεπιδερμικού φραγμού. Η διαταραχή της λειτουργίας του διευκολύνει την είσοδο των αλλεργιογόνων στο δέρμα, προκαλώντας τη φλεγμονώδη απόκριση που χαρακτηρίζει την ατοπική δερματίτιδα. Για το λόγο αυτό, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός που ανιχνεύθηκε στη παρούσα εργασία, αποτελεί σημαντικό μελλοντικό ερευνητικό στόχο για την εμπλοκή της KLK5 στην αιτιοπαθογένεια της ατοπικής δερματίτιδας.

Ωστόσο, η συχνότητα της γενετικής αλλαγής που βρέθηκε είναι μικρή για τον αριθμό των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό παραπέμπει στο βαθμό συντήρησης του γονιδίου της πρωτεάσης KLK5 ανάμεσα στα διάφορα είδη. Η οργάνωση των KLK γονιδίων είναι συντηρημένη μεταξύ των γονιδιωμάτων του ανθρώπου, του χιμπατζή και των τρωκτικών, εμφανίζει δηλαδή συνταινιακότητα. Συγκεκριμένα, ο γενετικός τόπος των KLK γονιδίων στον χιμπατζή είναι εντυπωσιακά όμοιος με τον αντίστοιχο του ανθρώπου και περιέχει ορθόλογα και στα 15 KLK γονίδια του ανθρώπου, άρα και στο γονίδιο της KLK5, με 99% ομοιότητα στην αλληλουχία τόσο σε επίπεδο DNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Η συντήρηση κυρίως των γονιδίων KLK4-KLK15 στα είδη που προαναφέρθηκαν υποδηλώνει ότι οι κωδικοποιούσες πρωτεάσες σερίνης εκτελούν βασικές λειτουργίες στα θηλαστικά⁴⁹. Για το λόγο αυτό, το γονίδιο της KLK5 είναι απαραίτητο και, επειδή βρίσκεται σε περισσότερους από έναν συγγενικούς οργανισμούς, η λειτουργία του είναι συντηρημένη⁵¹. Επομένως, αναμένεται μειωμένη ποικιλομορφία στα εξόνια του, γεγονός που δικαιολογεί εν μέρει την απουσία περισσότερων πολυμορφισμών στην KLK5. Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να θεωρηθεί υπεύθυνος για τη χαμηλή συχνότητα ποικιλομορφίας στο τμήμα του γονιδίου της KLK5 που αναλύθηκε οφείλεται στον αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε μόνο ένας μικρός αριθμός ατόμων, από τους οποίους οι ασθενείς έπασχαν από την εξωγενή, αλλεργική μορφή ατοπικής δερματίτιδας (extrinsic form), όπου τα επίπεδα IgE αντισωμάτων είναι αυξημένα. Κρίνεται επομένως σκόπιμο, η μελέτη των εξονίων αυτών και σε ασθενείς που εμφανίζουν τη

μη-ατοπική μορφή της ΑΔ, αλλά και επέκταση της έρευνας σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Επιπλέον κρίνεται σκόπιμη η μελλοντική διεξαγωγή μελετών συσχέτισης (case-control association analysis) σε υγιή άτομα και σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, εξετάζοντας και συγκρίνοντας την συχνότητα των αλληλόμορφων (G και A) σε κάθε πληθυσμό. Διαφορά στην συχνότητα του σπάνιου αλληλόμορφου στον πληθυσμό της ΑΔ θα ενίσχυε την συμμετοχή της KLK5 στην γενετική βάση της παθογένειας της νόσου. Επιπλέον, είναι δυνατό να γίνουν έρευνες για την αξιολόγηση της ενεργότητας της KLK5 σε δείγματα ατόμων με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Τα πειράματα αφορούν την απομόνωση κερατινοκυττάρων από το δέρμα ασθενών με τη μετάλλαξη αυτή, ώστε να καθίσταται δυνατή η *ex vivo* μελέτη του επιπέδου ενεργότητας της KLK5 (*in situ* zymography). Επίσης η ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐσης θα μπορούσε να εξεταστεί χρησιμοποιώντας χρωμοφόρα υποστρώματα όπως σε προηγούμενες μελέτες¹⁸.

Βιβλιογραφία

- ¹ Zoltan Nemes, Peter M. Steinert (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 31, No 1, 5-19.
- ² Y. Sandjeu, M. Haftek (2009) Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *Journal of physiology and pharmacology*, 60, Suppl 4, 23-30.
- ³ Anaïs Briot, Céline Deraison, Matthieu Lacroix, Chrystelle Bonnart, Aurélie Robin, Céline Besson, Pierre Dubus, and Alain Hovnanian (2009) Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J. Exp. Med.* Vol. 206 No. 5 1135-1147.
- ⁴ Gopinathan K. Menon (2002) New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 Suppl. 1 S3–S17.
- ⁵ <http://www.nku.edu/~dempseyd/SKIN.htm>: Εικόνα 2α, β.
- ⁶ Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, C.M.Chuong, B.J. Nickoloff, Maderson PA, Sundberg JP, Tagami H, Plonka PM, Thestrup-Pedersen P.M.Elias, L.A. Goldsmith, K, Bernard BA, Schröder JM, Dotto P, Chang CH, Williams ML, E.Macher, P.A. Maderson, Feingold KR, King LE, Kligman AM, Rees JL, Christophers E. (2002) What is the ‘true’ function of skin? *Exp Dermatol* 11: 159–187, Εικόνα 1.
- ⁷ http://dermatology.about.com/od/anatomy/ss/epidermis_7.htm.
- ⁸ Maranke I. Koster (2009) Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170: 7–10. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x.
- ⁹ Walter S Krawczyk and George F Wilgram (1975) The synthesis of keratinosomes during epidermal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 64, 263–267; doi:10.1111/1523-1747.ep12510679.
- ¹⁰ <http://en.wikipedia.org/wiki/Keratohyalin>: Keratohyalin.
- ¹¹ Michael J. Cork, Simon G. Danby, Yiannis Vasilopoulos, Jonathan Hadgraft, Majella E. Lane, Manar Moustafa, Richard H. Guy, Alice L. MacGowan, Rachid Tazi-Ahnini, Simon J. Ward (2009) Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* doi:10.1038/jid.2009.133, Εικόνες 10, 13, 15.

- ¹² <http://www.hse.gov.uk/skin/professional/causes/understand.htm>: Εικόνα 3.
- ¹³ Michael J. Cork, Darren A. Robinson, Yiannis Vasilopoulos, Adam Ferguson, Manar Moustafa, Alice MacGowan, Gordon W. Duff, Simon J. Ward, Rachid Tazi-Ahnini (2006) New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene–environment interactions. *J Allergy Clin Immunol*, 118:3-21, Εικόνες 4, 5, 6.
- ¹⁴ Peter M. Elias (2005) Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. *J Invest Dermatol*, DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23668.x, Πίνακας 1.
- ¹⁵ Ganz T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. Sep;3(9):710-20. Review.
- ¹⁶ <http://en.wikipedia.org/wiki/Ceramide>: Ceramide.
- ¹⁷ Brattsand M., Stefanson K., Lundh C., Haasum Y., Egelrud T. (2004) A Proteolytic Cascade of Kallikreins in the Stratum Corneum. *J. Invest Dermatol*.
- ¹⁸ Kristina Stefansson, Maria Brattsand, Dirk Roosterman, Cordula Kempkes, Georgeta Bocheva, Martin Steinhoff, Torbjorn Egelrud (2008) Activation of Proteinase-Activated Receptor-2 by Human Kallikrein-Related Peptidases. *Journal of Investigative Dermatology* (2008), Volume 128.
- ¹⁹ Todd I., Spickett G. (2008) Ανοσολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., 5^η Έκδοση.
- ²⁰ Abbas K. A., Lichtman H. A. (2004) Βασική ανοσολογία, Λειτουργίες και Δυσλειτουργίες του Ανοσοποιητικού Συστήματος. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.
- ²¹ Leung Y. M. D., Bieber T. (2003) Atopic dermatitis. *Lancet* Vol 361: 151–60, Πίνακας 2, 3, Εικόνα 9.
- ²² Χαϊδεμένος Γ., Κατσιούλα Π., Τριγώνη Α., Παπακωνσταντίνου Μ., Κατσάμπας Α. (2006) Ατοπική δερματίτιδα και τοπική χρήση του Pimecrolimus. *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 17:4 315-322.

²³ <http://64.143.176.9/library/healthguide/en-us/support/topic.asp?hwid=tp12332>: Εικόνα 7α.

²⁴ <http://www.doctorshangout.com/photo/photo/list?page=268>: Εικόνα 7β.

²⁵ Carsten Flohr, S. G. O. Johansson, Carl-Fredrik Wahlgren, Hywel Williams (2004) How atopic is atopic dermatitis? American Academy of Allergy, Asthma and Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2004.04.027.

²⁶ Yoshiki Tokura (2010) Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. Journal of Dermatological Science 58 (2010) 1–7, Εικόνα 8.

²⁷ Yin-Hsiu Chien, Wuh-Liang Hwu, Bor-Luen Chiang (2007) The Genetics of Atopic Dermatitis. Clin. Rev. Allerg. Immunol. 33: 178-190, Doi 10.1007/s12016-007-0041-8.

²⁸ Gelehrter D. T., Collins S. F., Ginsburg D. (2003) Αρχές Ιατρικής Γενετικής. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 2^η Ελληνική Έκδοση, Εικόνα 13.

²⁹ Marsella R., Samuelson D. (2009) Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. Veterinary Dermatology, 20, 533–540, DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00809.x.

³⁰ Cork J. M., Danby S., Vasilopoulos Y., Moustafa M., MacGowan A., Varghese J., Duff W. G., Tazi-Ahnini R., Ward J. S. (2008) Gene–environment interactions in atopic dermatitis. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. Vol. 5, No. 1, Doi: 10.1016/j.ddmec.2008.02.003, Εικόνες 11, 14.

³¹ Anaïs Briot, Céline Deraison, Matthieu Lacroix, Chrystelle Bonnart, Aurélie Robin, Céline Besson, Pierre Dubus, Alain Hovnanian (2009) Kallikrein 5 induces atopic dermatitis–like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. J. Exp. Med. Vol. 206 No. 5 1135-1147, Εικόνα 17.

³² Vasilopoulos Y., Cork J. M., Murphy R., Williams C. H., Robinson A. D., Duff W. G., Ward J. S., Tazi-Ahnini R. (2004) Genetic Association Between an AACC Insertion in the 3' UTR of the Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme Gene and Atopic Dermatitis. J Invest Dermatol 123:62 –66, Εικόνα 12.

³³ Advances in Clinical Chemistry (2005) Human Tissue Kallikreins: From Gene Structure to Function and Clinical Applications. Elsevier Academic Press, Volume 39, Edited by Gregory S. Makowski, Εικόνα 16.

³⁴ <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/KLK5ID41085ch19q13.html>.

³⁵

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=25818\[uid\]:KLK5](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=25818[uid]:KLK5).

³⁶ Yousef GM, White NM, Kurlender L, Michael I, Memari N, Robb JD, Katsaros D, Stephan C, Jung K, Diamandis EP (2004) The kallikrein gene 5 splice variant 2 is a new biomarker for breast and ovarian cancer. *Tumour Biol. Sep-Dec;25(5-6):327-8.*

³⁷ Rullo VE., Segato A., Kirsh A., Sole D. (2008) Severity scoring of atopic dermatitis: a comparison of two scoring systems. *Allergol Immunopathol;36(4):205-11.*

³⁸ Μόσιαλος Δ., Λιαδάκη Κ. (2008-2009) Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοτεχνολογίας Ζώων.

³⁹ Μαρκουλάτος Π., Τζανακάκη Τ. (2007) Εργαστηριακές Ασκήσεις Μικροβιολογίας-Ιολογίας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

⁴⁰ Ματθιόπουλος Κ., Κωστελίδου Κ., Αυγουστίνος Α. : Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μοριακής Βιολογίας Ι.

⁴¹ http://parts.mit.edu/igem07/index.php/Error_prone_PCR: Εικόνα 18.

⁴² http://www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/sc/sc_recombinant.html: Εικόνα 19.

⁴³ Berg M. J., Tymoczko L. J., Stryer L. (2005) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

⁴⁴ http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη.

⁴⁵ Patrinos P. G., Ansorge W. (2008) Μοριακή Διαγνωστική. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε.

⁴⁶ <http://en.wikipedia.org/wiki/Sequencing>: DNA sequencing

⁴⁷ Taieb A. (1999) Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. Contact Dermatitis. 41(4):177-80. Review.

⁴⁸ Hansson L, Backman A, Ny A, Edlund M, Eckholm E, Ekstrand Hammarstrom B, et al. (2002) Epidermal Overexpression of Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme in Mice: A Model for Chronic Itchy Dermatitis. J Invest Dermatol 2002; 118: 444-449.

⁴⁹ Carla A. Borgono, Iacovos P. Michael, Eleftherios P. Diamandis (2004) Human Tissue Kallikreins: Physiologic Roles and Applications in Cancer. Mol Cancer Res.

⁵⁰ Yousef M. G., Diamandis P. E. (1999) The New Kallikrein-like Gene, *KLK-L2* Molecular Characterization, Mapping, Tissue Expression, and Hormonal Regulation. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 53, pp. 37511–37516.