



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

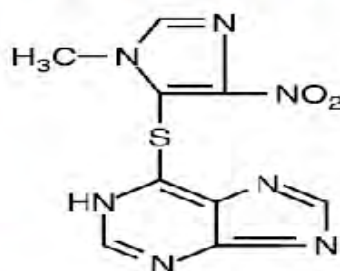
**«Φαρμακογενετική ανάλυση ανταπόκρισης σε θεραπεία με
αζαθειοπρίνη»**

**‘Pharmacogenetic response analysis for azathioprine
therapy’**

Αθανάσιος Πολυχρόνης

Λάρισα 2019

ΑΖΑΘΕΙΟΠΡΙΝΗ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δράση της αζαθειοπρίνης, η οποία ανήκει στην οικογένεια των θειοπουρινικών φαρμάκων, εκτείνεται από την θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων μέχρι και τη μεταμόσχευση οργάνων για την μείωση των πιθανοτήτων απόρριψης του μοσχεύματος από τον οργανισμό, λειτουργώντας ως ανοσοκατασταλτικό. Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της, η αζαθειοπρίνη, αφήνει ενεργά και μη κατάλοιπα στον οργανισμό. Τα ενεργά κατάλοιπα είναι τα 6-θειογουανινικά νουκλεοτίδια (TNGs), τα οποία με την είσοδο τους στο DNA μπορούν να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή και κυτταροτοξικότητα, γεγονός που αποτελεί βάση για τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Ωστόσο, αυξημένα επίπεδα αυτών των ενεργών μεταβολιτών της αζαθειοπρίνης έχουν συσχετιστεί με τη δημιουργία θανάσιμης μυελοκαταστολής και λευκοπενίας. Ο μεταβολισμός αυτών των φαρμάκων ρυθμίζεται φυσιολογικά στον οργανισμό από τα γονίδια TPMT και NUDT15. Κύριος ρόλος αυτών των γονιδίων είναι ο έλεγχος και η ρύθμιση των επιπέδων των ενεργών μεταβολιτών της αζαθειοπρίνης που εισέρχονται στο DNA. Ο μεταβολισμός της αζαθειοπρίνης μπορεί να επηρεαστεί από την ύπαρξη ορισμένων αλληλομόρφων των παραπάνω γονιδίων, τα οποία φέρουν συγκεκριμένους μονονουκλεοτιδικούς σημειακούς πολυμορφισμούς (SNPs). Έχει βρεθεί ότι η παρουσία των σπάνιων αλληλομόρφων, μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση υψηλών επιπέδων 6-TNGs και την εκδήλωση των παρενεργειών που αυτά προκαλούν. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι να προσδιοριστεί η παρουσία τεσσάρων συγκεκριμένων σημειακών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των γονιδίων TPMT και NUDT15, που έχουν συσχετιστεί με τον μεταβολισμό της αζαθειοπρίνης, σε ασθενείς που λαμβάνουν αζαθειοπρίνη καθώς και η συσχέτιση των πολυμορφισμών με την ανταπόκριση των ασθενών στη φαρμακευτική θεραπεία.

ABSTRACT

The action of azathioprine, which belongs to the thiopurine drug family, extends from the treatment of autoimmune diseases to organ transplantation to reduce the likelihood of rejection of the graft from the body by acting as immunosuppressant. During its metabolism, azathioprine leaves active and non-active residues in the body. The active residues are 6-thioguanine nucleotides (TNGs), which upon their entry into the DNA can cause immunosuppression and cytotoxicity, which is the basis for the treatment of certain diseases. However, elevated levels of these active azathioprine metabolites have been associated with the occurrence of dangerous and even fatal myelosuppression and leukopenia. The metabolism of these drugs is physiologically regulated by the TPMT and NUDT15 genes. The main role of these genes is to control and regulate the levels of active metabolites of azathioprine entering the DNA. Azathioprine's metabolism may be adversely affected by the existence of certain alleles of the above genes, which carry some specific single nucleotide polymorphisms (SNPs), resulting in the accumulation of large-level 6-TNG and the manifestation of the side effects they may cause. The aim of this dissertation is to determine the existence of four specific polymorphisms (SNPs) of the TPMT and NUDT15 genes associated with the AZA metabolic pathway in patients receiving azathioprine, and their association with the response to this drug therapy.

Τριμελής Επιτροπή

- **Μαμούρης Ζήσης**

Πρύτανης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Σαραφίδου Θεολογία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Μπόγδανος Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Μαμούρη Ζήση.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του θέματος και για το γεγονός ότι μου προσέφερε την δυνατότητα να αξιοποιήσω το χώρο και τους πόρους του εργαστηρίου για την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών κα. Σαραφίδου Θεολογία και τον Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων κ. Μπόγδανο Δημήτριο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ακόμη, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Πλαγερά Δημήτριο για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την εκπαίδευσή μου κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, αλλά και για τις συμβουλές του σχετικά με τη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την άμεση βοήθεια τους σε κάθε ερώτημα και δυσκολία που μου παρουσιαζόταν.

Ένα τελευταίο ευχαριστώ στους γονείς μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και για την αμέριστη υποστήριξή τους σε κάθε μου επιλογή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. Εισαγωγή

- 1.1. Θειοπουρίνες
- 1.2. Γενικά στοιχεία για τη δράση της αζαθειοπρίνης
- 1.3. Μεταβολικό μονοπάτι της αζαθειοπρίνης
- 1.4. Φαρμακογενετική
- 1.5. Φαρμακογενετική ανάλυση του γονιδίου TPMT
- 1.6. Φαρμακογενετική ανάλυση του γονιδίου NUDT15
- 1.7. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs: single nucleotide polymorphisms)
- 1.8. Το γονίδιο TPMT
- 1.9. Το γονίδιο NUDT15
- 1.10. Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

2. Πειραματικό μέρος (υλικά και μέθοδοι)

- 2.1. Δείγματα –
- 2.2. Απομόνωση DNA
- 2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- 2.4. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης
- 2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) :
Single-strand conformation polymorphism
- 2.5. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

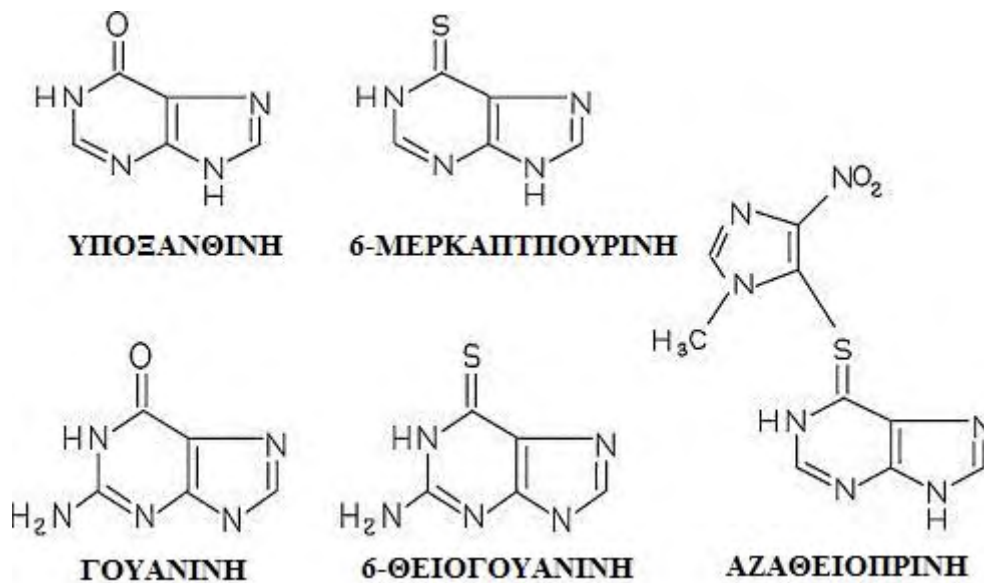
- 3.1. Απομόνωση DNA
- 3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη
- 3.3. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism
- 3.4. Αλληλούχηση προϊόντων PCR και Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης

4. Βιβλιογραφία

1.Εισαγωγή

1.1 Θειοπουρίνες

Κατά τη διάρκεια του 1951 οι Elion και Hutchins συνέθεσαν τους δύο θειοπουρινικούς αντιμεταβολίτες 6-μερκαπτοπουρίνη και (6-MP) και 6-θειογουανίνη (6-TG), οι οποίοι αποτελούν ανάλογα πουρίνης. Για το σχηματισμό της 6-MP, αντικαταστάθηκε ένα άτομο οξυγόνου από τον άνθρακα 6 της υποξανθίνης με ένα άτομο θείου, ενώ αντίστοιχα για τον σχηματισμό του 6-TG αντικαταστάθηκε το άτομο οξυγόνου της γουανίνης με ένα άτομο θείου [ELION *et al.* 1951]. Οι πρώτες μελέτες για την ανοσοκατασταλτική ιδιότητα αυτών των θειοπουρινών έδειξαν ευεργετικά αποτελέσματα σε θεραπείες ασθενών-παιδιών με οξεία λευχαιμία. Λίγα χρόνια αργότερα οι ίδιοι επιστήμονες συνέθεσαν αρκετά παράγωγα της 6-MP, μεταξύ των οποίων και η αζαθειοπρίνη (AZA). Η AZA είναι ένα προφάρμακο το οποίο μετατρέπεται μη ενζυμικά σε 6-MP [Εικόνα 1]. Οι πρώτες συγκριτικές μελέτες για την ανοσοκατασταλτική δράση της AZA και του 6-MP έγιναν σε ζώα και έδειξαν ότι η AZA είχε καλύτερη επίδραση στον οργανισμό, ενώ λίγο αργότερα παρατηρήθηκε ότι αποτελεί και πάρα πολύ καλό ανοσοκατασταλτικό παράγοντα για τον άνθρωπο. Τα φάρμακα με βάση τις θειοπουρίνες παρουσίασαν παρενέργειες όπως καταστολή του μυελού των οστών, ηπατοτοξικότητα και κάποια χαρακτηρίστηκαν ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Παρ' όλα αυτά, τόσο οι τοξικές παρενέργειες όσο και ο χαμηλός θεραπευτικός δείκτης αυτών των φαρμάκων δεν υπερτερούν της ευεργετικής δράσης των θειοπουρινών. Η δράση τους εκτείνεται από τη θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων, χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, αιματολογικών κακοηθειών, μέχρι και στη μεταμόσχευση οργάνων για την μείωση των πιθανοτήτων απόρριψης του μοσχεύματος από τον οργανισμό λειτουργώντας ως ανοσοκατασταλτικά. [Fotoohi *et all.* 2010].



Εικόνα 1: Μοριακή δομή των 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP), 6-θειογουανίνη (6-TG) και αζαθειοπρίνη (AZA). Η 6-MP αποτελεί το ανάλογο θείου της υποξανθίνης και η 6-TG το ανάλογο θείου της γουανίνης. Η AZA αποτελεί παράγωγο της 6-MP (Fotoohi et al. 2010).

2.2. Γενικά στοιχεία για τη δράση της αζαθειοπρίνης

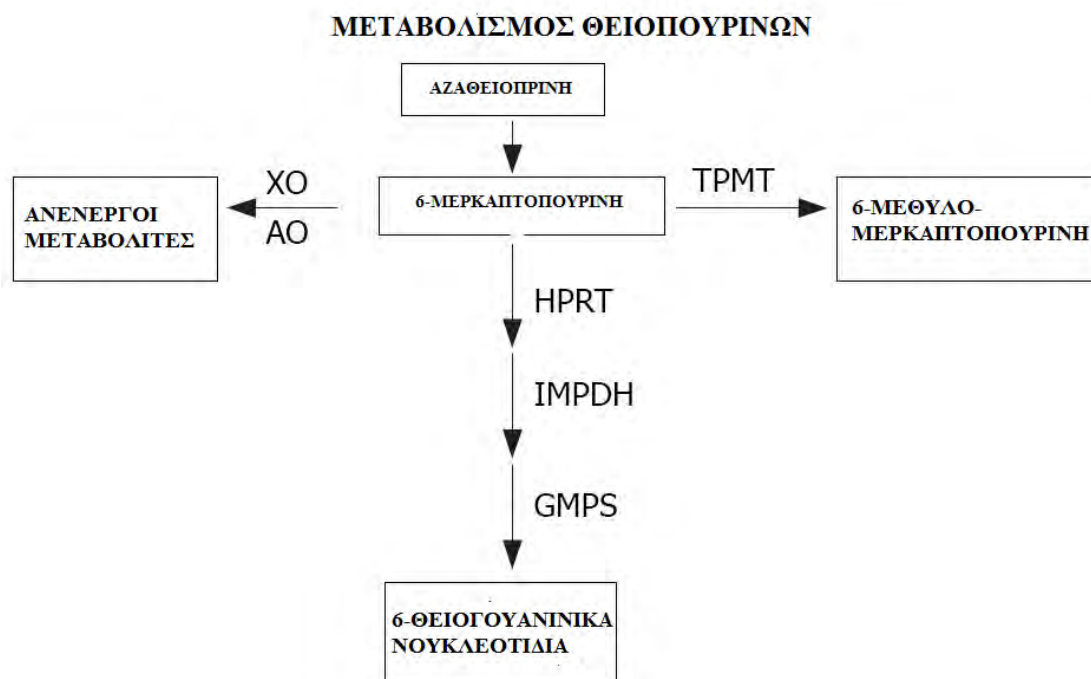
Η αζαθειοπρίνη (AZA) ,όπως προαναφέρθηκε, ανήκει στην οικογένεια των θειοπουρινών και αποτελεί ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χορηγείται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμοσχεύσεις (ιδίως του νεφρού) προκειμένου να αποφευχθεί η απόρριψη του μοσχεύματος. Επίσης χρησιμοποιείται αρκετά για την αντιμετώπιση και διαχείριση άλλων αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, δρώντας ως κορτικοστεροειδές [Laura Dean -2012],[María Josefina Etchevers et al. 2008].

Πρόκειται για ένα αρκετά ασφαλές φάρμακο, ωστόσο έχει εντοπιστεί ότι μπορεί να προκαλέσει πολύ δυσάρεστες παρενέργειες σε ασθενείς. Η δράση του έχει συσχετιστεί με τη δημιουργία λεμφώματος και άλλων κακοηθειών, κυρίως δερματικών. Επίσης μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στον οργανισμό, να καταστείλει τον μυελό των οστών και να δημιουργήσει λευκοπενία. Επιπλέον αποφεύγεται η ταυτόχρονη χορήγηση του με άλλα ανάλογα πουρίνης όπως η αλλοπουρινόλη [NIH: U.S. National Library of Medicine- Azathioprine].

2.3. Μεταβολικό μονοπάτι της αζαθειοπρίνης

Η αζαθειοπρίνη είναι ένα φάρμακο αργής δράσης. Είναι ανάλογο πουρίνης και η δράση της ως αντιμεταβολίτης παρεμβαίνει στη σύνθεση νουκλειικών οξέων με αποτέλεσμα να εμποδίζει το σχηματισμό των απαραίτητων πουρινών. Το 88% της

ΑΖΑ μετατρέπεται σε 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) μέσω μη ενζυμικού μονοπατιού. Στη συνέχεια η 6-MP ακολουθεί διάφορα ενζυμικά μονοπάτια και μετατρέπεται σε ενεργούς και μη ενεργούς μεταβολίτες [María Josefina Etchevers et al. 2008],[Εικόνα 2].



Εικόνα 2: Το μεταβολικό μονοπάτι της αζαθειοπρίνης (AZA). Η AZA μετατρέπεται σε 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP). Η 6-MP από την μεθυλοτρανσφεράση θειοπουρίνης (TPMT) και την οξειδάση της ξανθίνης (XO) μετατρέπεται σε ανενεργούς μεταβολίτες, αλλά η φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση της υποξανθίνης (HPRT), η μονοφωσφορική αφυδρογονάση ινοσίνης (IMPDH) και η μονοφωσφορική συνθετάση γουανοσίνης (GMPS) καταλύουν τη σύνθεση των δραστικών 6-θειογουανινικών νουκλεοτιδίων (6-TGNs) [María Josefina Etchevers et al. 2008].

Το πρώτο μεταβολικό μονοπάτι ενεργοποιεί τα 6-θειογουανινικά νουκλεοτίδια (TNGs), οι οποίοι αποτελούν κύριους δραστικούς μεταβολίτες. Αρχικά όπως αναφέρθηκε η AZA μεταβολίζεται σε 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται από την φωσφοριβοσυλοτρανσφεράση της υποξανθίνης (HPRT1) με σκοπό τελικά να σχηματιστούν τα 6-TNGs. Η ενσωμάτωση των 6-TNGs, τα οποία είναι ενεργά ριβονουκλεοτίδια της 6-MP και λειτουργούν ως ανταγωνιστές της πουρίνης στο DNA του οργανισμού, μπορεί να οδηγήσουν σε τερματισμό αλυσίδας, σε κυτταροτοξικότητα και ανοσοκαταστολή [S Wright et al. 2004].

Η ανοσοκαταστολή και η λεμφοκυτταροτοξικότητα που προκαλείται από τα 6-TNGs είναι επιθυμητές για τη θεραπεία κάποιων ασθενειών όπως η λευχαιμία και το

λέμφωμα. Ωστόσο πολύ αυξημένα επίπεδα των 6-TNGs στο αίμα των ασθενών μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή του μυελού των οστών τους καθώς και άλλες ταυτόχρονες παρενέργειες. Για το λόγο αυτό, στο μεταβολισμό της 6-MP εμπλέκονται και άλλα μονοπάτια που ανταγωνίζονται την HPRT1 [Carmen Cuffari et al. 2006].

Τα μονοπάτια που φαίνεται να ανταγωνίζονται το μεταβολισμό της αζαθειοπρίνης σε 6-TNGs είναι δύο: 1) μέσω μεθυλίωσης (TPMT gene) και 2) μέσω οξειδωσης (από οξειδάση της ξανθίνης) [Laura Dean -2012].

Αρχικά το μονοπάτι της μεθυλίωσης μέσω του γονιδίου TPMT οδηγεί στη μετατροπή της 6-MP σε ανενεργούς μεταβολίτες όπως η 6-μέθυλο-μερκαπτοπουρίνη. Αντίστοιχα το μονοπάτι της οξειδωσης της 6-MP μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), που λαμβάνει χώρα στο εντερικό βλεννογόνο και στο ήπαρ, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανενεργών οξειδωμένων μεταβολιτών όπως το 6-θειουρικό οξύ. Ένα μεγάλο ποσοστό των θειοπουρινών μεταβολίζεται από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) αλλά το μονοπάτι της μεθυλίωσης φαίνεται να είναι αρκετά σημαντικότερο για την αδρανοποίηση του μεταβολισμού της AZA. Κύριο ρόλο για την εδραίωση της παραπάνω διαπίστωσης έπαιξε το γεγονός ότι η οξειδάση της ξανθίνης δεν εκφράζεται στο αίμα. Επομένως η κυρίαρχη εμπλοκή του γονιδίου TPMT στο μεταβολισμό της AZA, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οποιαδήποτε δυσλειτουργικότητα αυτού του γονιδίου μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη διαδικασία του μεταβολισμού [Kara Bradford and David Q Shih. 2011], [L Wang & R Weinshilboum. 2006].

2.4. Φαρμακογενετική

Η επιστήμη της φαρμακογενετικής γεννήθηκε όταν ήρθε στο προσκήνιο η ιδέα ότι τα γονίδια μπορούν να παίξουν πολύ σημαντικό ρόλο στο τρόπο με τον οποίο ένας ασθενής θα ανταποκριθεί στα φάρμακα τα οποία του χορηγούνται. Ήταν ήδη γνωστό, πως οι άνθρωποι διαφέρουν ως το πώς ανταποκρίνονται σε μια φαρμακευτική θεραπεία. Με την μελέτη του γενετικού υλικού φάνηκε ότι οι διάφορες γενετικές παραλλαγές επηρεάζουν την απορρόφηση, το μεταβολισμό και την απέκκριση των φαρμάκων με συνέπεια κάποιοι ασθενείς να τα βρίσκουν αναποτελεσματικά, άλλοι να χρειάζονται μικρότερες ή μεγαλύτερες δόσεις και σε κάποιες περιπτώσεις τα φάρμακα να είναι μέχρι και τοξικά και με δυσάρεστες παρενέργειες για τον οργανισμό. Επομένως έγινε αντιληπτό ότι οι γενετικές διαφορές στις μεταβολικές οδούς μπορεί να επηρεάσουν την απόκριση ενός ασθενούς στο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του, τόσο ως προς το θεραπευτικό αποτέλεσμα όσο και ως προς τις ανεπιθύμητες ενέργειες [Jürgen Brockmülle and Mladen V. Tzvetkov. 2008].

Η φαρμακογενετική συνδυάζει στοιχεία από τα πεδία της γενετικής, της φαρμακολογίας, της γονιδιωματικής και της βιοχημείας με στόχο την κατανόηση της

επίδρασης της γενετικής ποικιλομορφίας στην απόκριση σε ένα φάρμακο. Απώτερος σκοπός αποτελεί η λεπτομερής γνώση του γονοτύπου ενός ασθενούς για τη δημιουργία εξατομικευμένων φαρμακευτικών θεραπειών για καλύτερη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Η φαρμακογενετική είναι το απαραίτητο εργαλείο για τους επιστήμονες ώστε να υπολογίσουν τα οφέλη και τους κινδύνους που συνεπάγεται η επιλογή διαφορετικών φαρμάκων για τον κάθε ασθενή και να δημιουργήσουν την ιδανική θεραπεία για αυτόν.

Η φαρμακογενετική έχει αρχίσει ήδη να χρησιμοποιείται κλινικά σε διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές διαταραχές, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας και αρκετές άλλες. Ωστόσο η εφαρμογή της φαρμακογενετικής είναι ακόμα περιορισμένη και δεν έχει αναδείξει ακόμα τα ευεργετικά αποτελέσματα τα οποία αναμένεται ότι μπορεί να προσφέρει. Πρόκειται για μια επιστήμη που έχει να προσδώσει αρκετά οφέλη καθώς φαίνεται να μπορεί να συμβάλλει σε πολλούς τομείς. Αρχικά στην ανάπτυξη νέων και καινοτόμων φαρμάκων και έπειτα στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των ήδη υπάρχοντων φαρμάκων μέσω των κατάλληλων γενετικών εξετάσεων ώστε να αναδειχθούν οι ιδανικοί βιοδείκτες, που θα επιτρέψουν στον γιατρό να γνωρίζει το σωστό φάρμακο και την απαραίτητη δόση με την οποία θα ανταποκριθεί καλύτερα ο ασθενής. Ακόμη εκτιμάται ότι θα μειωθούν οι παρενέργειες, καθώς μέσω των γενετικών εξετάσεων αναμένεται να γίνει αναγνώριση των ασθενών που κινδυνεύουν να παρουσιάσουν παρενέργειες με τη χορήγηση κάποιων συγκεκριμένων φαρμάκων. Μακροπρόθεσμα λοιπόν μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου, να αντιμετωπίσει ασθένειες που τώρα φαίνονται μη θεραπεύσιμες και να μειώσει το κόστος των φαρμακευτικών θεραπειών [Rajiv Saini, Santosh Saini, and R. S. Sugandha. 2010].

Απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη των στόχων που θέτει η φαρμακογενετική είναι ο όσο το δυνατόν καλύτερος προσδιορισμός μεγάλου αριθμού γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με την ανταπόκριση σε διάφορα φάρμακα. Τέλος, η αξιολόγηση, μέσω κλινικών μελετών, των γενετικών εξετάσεων και θεραπειών ως προς την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα φαίνεται να είναι απαραίτητη για την εδραίωση του τομέα της φαρμακογενετικής.

2.5. Φαρμακογενετική ανάλυση του γονιδίου TPMT

Η προσπάθεια γενετικής ανάλυσης του γονιδίου TPMT ξεκίνησε από τα τέλη τις δεκαετίας του 70' και αποτέλεσε μία από τις πρώτες φαρμακογενετικές δοκιμασίες σύνδεσης της γενετικής ποικιλομορφίας με την απόκριση σε μια φαρμακευτική θεραπεία [Richard M. Weinshilboun and Susan L. Sladek. 1980]. Σύντομα το γονίδιο TPMT συσχετίστηκε με τον μεταβολισμό των θειοπουρινικών φαρμάκων. Προκειμένου να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση οι ασθενείς που χορηγούνται με θειοπουρινικά φάρμακα υποβάλλονται σε καθορισμό του γενετικού προφίλ του TPMT μέσω γονοτυπικής και φαινοτυπικής ανάλυσης. Η γονοτυπική ανάλυση του

TPMT περιλαμβάνει την μελέτη των πολυμορφισμών που μπορεί να φέρει ο ασθενής σε αυτό το γονίδιο ώστε να δημιουργηθεί η κατάλληλη εξατομικευμένη θεραπεία με χρήση θειοπουρινών. Επίσης, η φαινοτυπική ανάλυση ορίζεται μέσω του υπολογισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του TPMT στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου σημαντικό ρόλο παίζει το επίπεδο των 6-TNGs στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση των 6-TNGs στο αίμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον βαθμό της ενζυμικής δραστηριότητας του TPMT [L Wang & R Weinshilboun. 2006]. Επομένως το συμπέρασμα αυτών των αναλύσεων ήταν ότι η ύπαρξη διαφόρων αλληλομόρφων του TPMT, πέρα του αγρίου τύπου, συνέβαλε στον μη φυσιολογικό μεταβολισμό των θειοπουρινικών φαρμάκων και τη πρόκληση σοβαρών συνεπειών για τον οργανισμό. Αυτό το γεγονός είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η ανάγκη προσαρμογής της κάθε θεραπείας στον εκάστοτε ασθενή.

2.6. Φαρμακογενετική ανάλυση του γονιδίου NUDT15

Έπειτα από χρόνια φαρμακογενετικών αναλύσεων του γονιδίου TPMT και ερευνών για το μεταβολισμό των θειοπουρινών και κατ' επέκταση της AZA, ήρθε να προστεθεί ένας ακόμα παράγοντας που ανατρέπει τα δεδομένα στην όλη διαδικασία. Μελέτες σε ασιατικούς πληθυσμούς, επικεντρωμένες στην ανατολική Ασία, για ασθενείς που εμφάνισαν αρνητική ανταπόκριση στη θεραπεία με θειοπουρίνες έδειξαν από μηδενικά έως πολύ μικρά ποσοστά ύπαρξης μη φυσιολογικών αλληλομόρφων του γονιδίου TPMT. Επίσης, ακόμα και άτομα ομόζυγα για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο παρουσίασαν παρενέργειες μετά τη χορήγηση των θειοπουρινών. Για το λόγο αυτό προτάθηκε η ύπαρξη και άλλων παραγόντων που μπορεί να επηρεάζει τον μεταβολισμό αυτών των φαρμάκων. Ποικίλες αναλύσεις παρουσίασαν έναν ακόμη γενετικό συντελεστή στην όλη εξίσωση. Πιο συγκεκριμένα ένα αλληλόμορφο του γονιδίου NUDT15 (nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15) συσχετίστηκε με τις παρενέργειες των θειοπουρινών και κατ' επέκταση με το μεταβολισμό τους [Takaya Moriyama et al. 2016].

Με την χρήση των απαραίτητων γονοτυπικών και φαινοτυπικών αναλύσεων αποδείχθηκε ότι το δυσλειτουργικό αλληλόμορφο NUDT15 R139C συνδέεται με την πρόκληση λευκοπενίας ύστερα από χορήγηση AZA σε ασθενής με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, σύνδρομο Sjögren και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Με βάση λοιπόν αυτά τα ευρήματα, έγιναν προσπάθειες προσδιορισμού της συχνότητας αυτού του αλληλομόρφου στο παγκόσμιο πληθυσμό και της όσο το δυνατόν καλύτερης απεικόνισης του ρόλου που διαδραματίζει στο μεταβολικό μονοπάτι των θειοπουρινών [Xiang Fei et al. 2018].

2.7. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs: single nucleotide polymorphisms)

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) προκύπτουν από την αντικατάσταση μιας αζωτούχας βάσης από μία άλλη, στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος και αποτελούν τον πιο συχνό τύπο γενετικής διαφοροποίησης στον άνθρωπο. Τα SNPs συναντώνται περίπου μια φορά ανά 1000 νουκλεοτίδια και υπολογίζεται ότι υπάρχουν τέσσερα με πέντε εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει περισσότερους από 100 εκατομμύρια SNPs στο παγκόσμιο πληθυσμό. Κάποιοι από αυτούς είναι μοναδικοί ενώ οι περισσότεροι απαντώνται σε πολλά άτομα. Η κατανομή τους στο γονιδίωμα δεν μπορεί να θεωρηθεί ομοιόμορφη, καθώς αρκετές χρωμοσωμικές περιοχές έχουν παρατηρηθεί να έχουν λίγους SNPs και ταυτόχρονα να συνορεύουν με περιοχές που παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό SNPs [NIH: U.S. National Library of Medicine-What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?-2019].

Τα περισσότεροι SNPs δεν επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία ή την εξέλιξη του. Το σπάνιο αλληλόμορφο κάθε SNP απαντάται, στο γενικό πληθυσμό, με συχνότητα 5%. Σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, όμως, τα SNPs μπορούν να καθορίσουν την ευαισθησία των ατόμων απέναντι σε νόσους και την απόκριση σε παθογόνα, χημικά, φάρμακα και άλλους παράγοντες. Επιπλέον, πολλά SNPs λειτουργούν σαν βιοδείκτες και βοηθούν τους ερευνητές στην χαρτογράφηση γονιδίων που συνδέονται με ασθένειες. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν βρίσκονται μέσα στα γονίδια ή σε μία ρυθμιστική περιοχή κοντά σε αυτό, μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασθένεια επηρεάζοντας την λειτουργία του γονιδίου. Αναλυτικότερα, συγκεκριμένα SNPs έχουν συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, τα συνδεόμενα με τη νόσο αλληλόμορφα συναντώνται και σε ένα σημαντικό ποσοστό του υγιούς πληθυσμού, σε αντίθεση με τις σπάνιες μεταλλάξεις των «μεντελικών» ασθενειών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως το ποσοστό συνεισφοράς των SNPs στην εμφάνιση της νόσου είναι μέτριο και δεν υπάρχει ισχυρή συσχέτιση. Πράγματι, σε λειτουργικό επίπεδο, το σπάνιο αλληλόμορφο κάθε SNP, συνήθως τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση με έναν ήπιο τρόπο, χωρίς να προκαλεί κάποια σοβαρή βλάβη στον οργανισμό.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων για ένα SNP μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών και εθνικών ομάδων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα έρευνες που συσχετίζουν ένα SNP με μία νόσο σε ένα πληθυσμό, να μην έχουν αντίκρισμα στον υπόλοιπο κόσμο. Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκε ένα διεθνές πρόγραμμα, το οποίο ονομάστηκε HarMap project, και είχε ως στόχο την καταγραφή των συχνοτήτων των αλληλομόρφων διαφόρων SNPs ανάμεσα σε πληθυσμιακές ομάδες αναφοράς. Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε μία ακόμα βάση δεδομένων η οποία ονομάζεται “1000 Genomes Project”, μέσω της οποίας έχει πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση του γονιδιώματος ενός μεγάλου αριθμού ατόμων, με αποτέλεσμα να αποτελεί πλέον, την πιο ολοκληρωμένη πηγή των ανθρώπινων SNPs. Κύριος στόχος

αυτής της βάσης δεδομένων είναι να προσδιοριστεί η πλειοψηφία των SNPs, οι οποίοι απαντώνται στους διάφορους πληθυσμούς με συχνότητα τουλάχιστον 1%. Περαιτέρω, μια ενδιαφέρουσα πλατφόρμα δεδομένων είναι η Frequency of INherited Disorders database – Pharmacogenomics (FINDbase), που περιλαμβάνει SNPs, κυρίως, με φαρμακογονιδιωματικό ενδιαφέρον και παρουσιάζει τις συχνότητες των αλληλομόρφων τους ανά πληθυσμό κι εθνικότητα [Georgitsi M et al. 2011].

Συμπερασματικά λοιπόν, ο εντοπισμός ποικίλων γενετικών διαφοροποιήσεων και η ανάλυση της επιρροής τους στον άνθρωπο, μπορεί να οδηγήσουν στη καλύτερη κατανόηση της γονιδιακής λειτουργίας. Αυτές οι γνώσεις έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν σκαλοπάτι για τη δημιουργία νέων και χρήσιμων δεικτών SNP που θα χρησιμοποιηθούν για ιατρικές εξετάσεις και την ανάπτυξη καινοτόμων και εξατομικευμένων φαρμακευτικών θεραπειών για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών [Barkur S. Shastry. 2009].

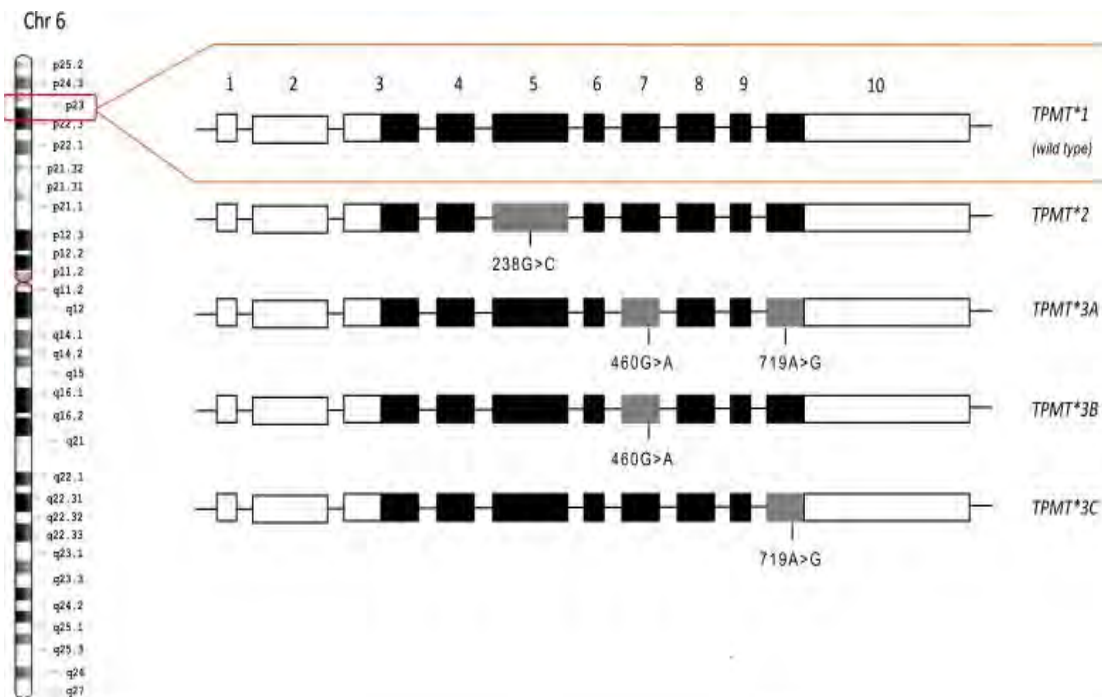
2.8. Το γονίδιο TPMT

Το γονίδιο μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης (TPMT) έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 6 του ανθρώπου και πιο συγκεκριμένα στη κυτταρογενετική ζώνη p22.3. Το γονίδιο φαίνεται να περιλαμβάνει 10 εξόνια και 8 από αυτά κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 245 αμινοξέων. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις εντοπίζονται στα εξόνια 5,7 και 10 [Chingiz Asadov et al. 2017], [Εικόνα 3]. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα από τα πιο κύρια ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, την μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης (TPMT) το οποίο διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό θειοπουρινικών φαρμάκων, όπως η αζαθειοπρίνη, η 6-μερκαπτοπουρίνη και η 6-θειογουανίνη. Η δραστηριότητα αυτού του ενζύμου σχετίζεται με μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) οι οποίοι κληρονομούνται με αυτοσωμικό συνεπικρατή τρόπο. Διάφορες μελέτες έχουν υποδείξει ότι το γονίδιο TPMT είναι εξαιρετικά πολυμορφικό καθώς έχουν αναγνωριστεί και καταγραφεί περισσότερες από 40 παραλλαγές αλληλομόρφων. Αυτή η πολυμορφικότητα επηρεάζει εξαιρετικά το μεταβολισμό των θειοπουρινών και κατά επέκταση της αζαθειοπρίνης.

Η ύπαρξη μόνο του αγρίου τύπου αλληλομόρφου TPMT*1 σχετίζεται με την φυσιολογική ενζυμική δραστηριότητα. Τα άτομα που είναι ομόζυγα για αυτό το αλληλόμορφο υπολογίζεται ότι αποτελούν το 90% του γενικού πληθυσμού και φέρουν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν σωστά στη θεραπεία αζαθειοπρίνης και σημαντικά μικρότερο ρίσκο να εμφανίσουν μυελοκαταστολή και άλλες πιθανές παρενέργειες.

Από την άλλη πλευρά η ύπαρξη άλλων αλληλομόρφων TPMT συνδέεται με μειωμένη ή απύουσα ενζυμική δραστηριότητα. Τα άτομα που είναι ετερόζυγα και φέρουν μόνο ένα μη λειτουργικό αλληλόμορφο, αφορούν περίπου το 10% του παγκόσμιου πληθυσμού και έχουν περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν παρενέργειες από

την θεραπεία με AZA σε σχέση με τους ομόζυγους για το αγρίου τύπου. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό αυτών, που κυμαίνεται μεταξύ του 40% με 70%, φαίνεται ότι μπορούν να ανταποκριθούν σε μια κανονική θεραπεία με AZA. Τέλος, τα άτομα που είναι ομόζυγα για δύο μη λειτουργικά αλληλόμορφα του γονιδίου TPMT αποτελούν περίπου το 0,3% του πληθυσμού και η θεραπεία με AZA μπορεί να τους προκαλέσει άμεσα θανάσιμη μυελοκαταστολή. Πιο συγκεκριμένα τέσσερις παραλλαγές αυτού του αλληλομόρφου αντιπροσωπεύουν περί το 90% αυτής της δυσλειτουργικής δραστηριότητας. Αυτά τα TPMT αλληλόμορφα κωδικοποιούνται με τις εξής ονομασίες : 1) TPMT*2, 2) TPMT*3A, 3)TPMT*3B και 4) TPMT*3C .[Laura Dean -2012]



Εικόνα 3: Σχηματικό διάγραμμα του γονιδίου της ανθρώπινης μεθυλοτρανσφεράσης της θειοπουρίνης και των κοινών μεταλλαγμένων αλληλομόρφων της. Το γονίδιο βρίσκεται στο βραχίονα του χρωμοσώματος 6 και αποτελείται από 10 εξώνια. Οι μεταλλάξεις των κοινών αλληλομόρφων εντοπίζονται στα εξώνια V, VII και X. Τα γκρι ορθογώνια αντιπροσωπεύουν εξώνια που περιέχουν μεταλλάξεις. Τα λευκά ορθογώνια είναι μη μεταφρασμένες περιοχές και τα μαύρα ορθογώνια αντιπροσωπεύουν εξώνια στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης [Chingiz Asadov et al. 2017].

Η συχνότητα αυτών των παραλλαγών διαφέρει ανάμεσα στις πληθυσμιακές ομάδες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Ευρώπη και γενικότερα στους καυκάσιους πληθυσμούς, το αλληλόμορφο που συναντάται κυρίως είναι το TPMT*3A. Από την άλλη πλευρά, το αλληλόμορφο TPMT*3C είναι συχνότερο στους αφρικανικούς και σε κάποιους ασιατικούς πληθυσμούς. Τα άλλα δυο αλληλόμορφα, TPMT*2 και TPMT*3B, συναντώνται από ελάχιστα έως σπάνια σε ορισμένους πληθυσμούς, όπως για παράδειγμα στη χώρα του Ιράν [Πίνακας 1].

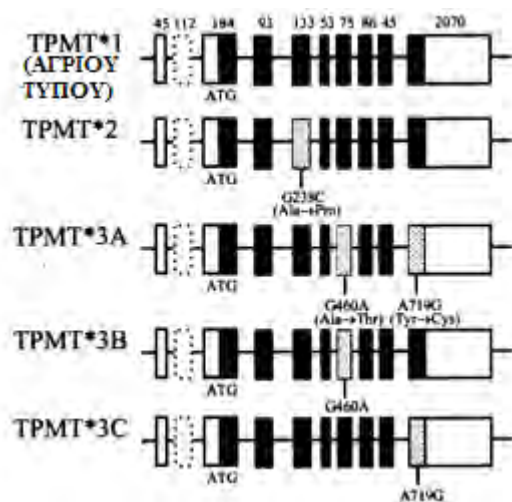
Πίνακας 1:

Συχνότητες των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων TPMT σε μεγάλες εθνικές ομάδες και πληθυσμούς (%). [Chingiz Asadov et al. 2017]

ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	*2	*3A	*3B	*3C
ΚΑΥΚΑΣΙΟΙ	0.2	3.5	0.04	0.4
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΙ	0.4	2.5	0.4	0.5
ΜΕΣΗ ΑΝΑΤΟΛΗ	0.7	1.1	0.5	0.5
ΑΣΙΑΤΕΣ	0	0.01	0	1.5
ΑΦΡΙΚΑΝΟΙ	0.08	0.2	0	4.9
ΝΟΤΙΟΑΜΕΡΙΚΑΝΟΙ	0.8	2.8	0.05	0.9
ΕΥΡΩΠΑΙΟΙ	0.5	5.7	0	0.8
ΒΡΕΤΑΝΟΙ	0.5	4.5	0	0.3
ΓΕΡΜΑΝΟΙ	0.2	4.5	0	0.4
ΡΩΣΟΙ	0.1	2.3	0	0.4
ΙΤΑΛΟΙ-ΚΑΥΚΑΣΙΟΙ	0	2.2	0.3	0.3
ΙΣΠΑΝΟΙ	0	2.5	0.7	1
ΤΟΥΡΚΟΙ	0	0.9	0	0.9
ΙΡΑΝΟΙ	2.2	1.7	1.6	0.5
ΙΣΡΑΗΛΙΝΟΙ	0	1.2	0	0.4
ΚΑΖΑΚΟΙ	0	0.3	0	0.9
ΑΙΓΥΠΤΙΟΙ	0	0.3	0	1.3
ΚΙΝΕΖΟΙ	0	0.1	0	1
ΙΑΠΩΝΕΣ	0	0	0	1.6
ΚΟΡΕΑΤΕΣ	0	0	0	1
ΙΝΔΟΙ	0	0.5	0	0.8

Μεταξύ των τεσσάρων αλληλομόρφων του γονιδίου TPMT εντοπίζονται 3 διαφορετικοί πολυμορφισμοί. Ο πολυμορφισμός rs1800462 στο αλληλόμορφο TPMT*2 πρόκειται για μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή, την c.238G>C στο εξόνιο 5. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στην αντικατάσταση μίας αλανίνης από μια προλίνη, στο κωδικόνιο 80 (p.Ala80Pro). Το αλληλόμορφο TPMT*3A φέρει *in cis* δύο μη συνώνυμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (rs1800460 και rs1142345). Ο πρώτος πρόκειται για μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή c.460G>A στο εξόνιο 7 που

οδηγεί σε μία αμινοξική αντικατάσταση στο κωδικόνιο 154 (p.Ala154Thr). Αντίστοιχα, ο δεύτερος αφορά σε μία αλλαγή c. 719A>G στο εξόνιο 10 που έχει ως αποτέλεσμα μια αντικατάσταση στο κωδικόνιο 240 (p. Tyr240Cys). Τέλος, το αλληλόμορφο TPMT*3B φέρει και αυτό τον πολυμορφισμό rs1800460 στο κωδικόνιο 154, ενώ το αλληλόμορφο TPMT*3C φέρει τον πολυμορφισμό rs1142345 στο κωδικόνιο 240 [Laura Dean -2012], [Εικόνα4].

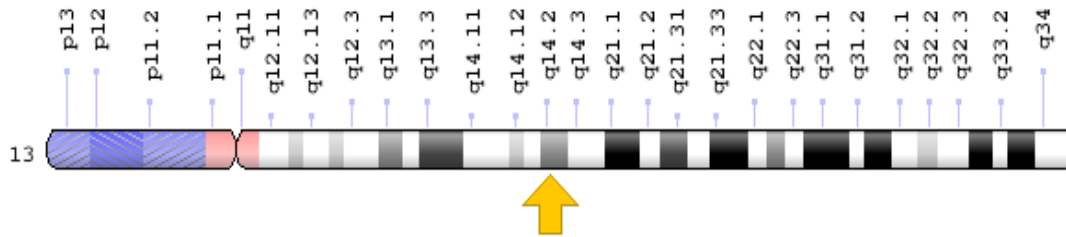


Εικόνα 4: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο TPMT. Τα γκρι κουτιά αντιπροσωπεύουν εξόνια τα οποία περιέχουν μεταλλαγές που οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος. Τα λευκά κουτιά αναπαριστούν αμετάφραστες περιοχές και τα μαύρα κουτιά, εξόνια του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (McLeod et al. 2000).

Επιπροσθέτως, παρατηρείται μια διαφορά στη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας ανάλογα με το ποιο αλληλόμορφο του γονιδίου TPMT εκφράζεται στον ασθενή. Τα αλληλόμορφα TPMT*3^A και TPMT*3^B έχουν τρομερά σημαντική επίπτωση στην ενζυμική δραστηριότητα στα άτομα που τα φέρουν. Για το λόγο αυτό ασθενείς ομόζυγοι για αυτά τα δύο αλληλόμορφα παρουσιάζουν θανάσιμη απόκριση σε καθιερωμένες δόσεις AZA. Από την άλλη, τα αλληλόμορφα TPMT*2 και TPMT*3C δεν επηρεάζουν δραματικά την δραστηριότητα του ενζύμου και η απόκριση των ατόμων που είναι ομόζυγοι για αυτά έχουν πιο ήπια απόκριση μεν, κυτταροτοξική δε, σε κανονικές θεραπείες με AZA [Wang L et al. 2003].

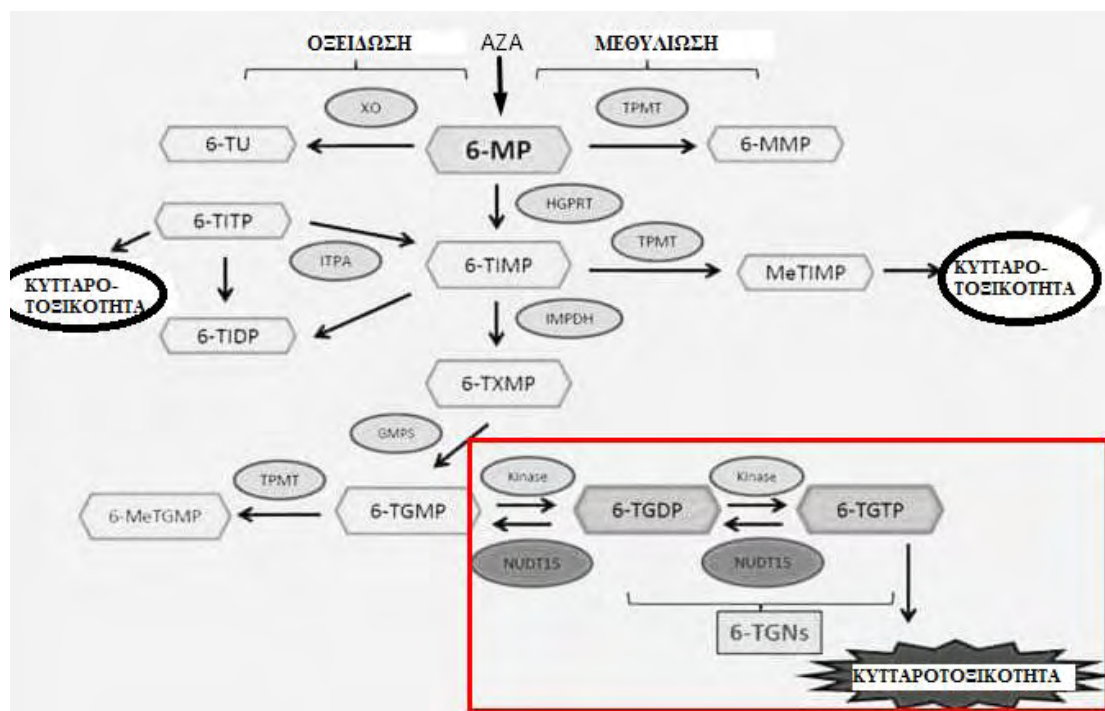
2.9. Το γονίδιο NUDT15

Το γονίδιο NUDT15 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 13 και πιο συγκεκριμένα στη κυτταρογενετική ζώνη q14.2 [Εικόνα 5]. Ανήκει στην υπεροικογένεια των ενζύμων της υδροξυλάσης Nudix και αποτελεί μια πρωτεΐνη 164 αμινοξέων. Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν την ικανότητα να υδρολύουν ενώσεις με τη δομή ενός διφωσφορικού νουκλεοζίτη συνδεδεμένου με ένα άλλο τμήμα X.



Εικόνα 5: Απεικόνιση του χρωμοσώματος 13. Με το κίτρινο βελάκι σημειώνεται η κυτταρογενετική περιοχή q14.2. [NIH: U.S. National Library of Medicine- NUDT15 gene]

Το γονίδιο NUDT15 εμποδίζει την ενσωμάτωση των ενεργών μεταβολιτών των 6-TNGs στο DNA. Αναλυτικότερα, έχει την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνει τους μεταβολίτες 6-τριφωσφορική θειογουανοσίνη (6-TGTP) και 6-τριφωσφορική δεοξυ-θειογουανοσίνη (6-TdGTP) σε 6-μονοφωσφορική θειογουανοσίνη (6-TGMP) και σε 6-μονοφωσφορική δεοξυ-θειογουανοσίνη (6TdGMP) αντίστοιχα, σταματώντας έτσι την κυτταρική απόπτωση που μπορεί να προκαλέσουν [Takaya Moriyama et al. 2016], [Εικόνα 5].



Εικόνα 6: Το μεταβολικό μονοπάτι των θειοπουρινών AZA, 6-MP και 6-TG. Η εικόνα εστιάζει στην ικανότητα του γονιδίου NUDT15 να αποφωσφορυλιώνει τους μεταβολίτες 6-τριφωσφορική θειογουανοσίνη (6-TGTP) και 6-διφωσφορική θειογουανοσίνη (6-TGDP) σε 6-μονοφωσφορική θειογουανοσίνη (6-TGMP), πριν προκληθεί κυτταροτοξικότητα [Minu Singh et al. 2017].

Με βάση λοιπόν τις γνώσεις την φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου NUDT15 έγιναν γονοτυπικές και φαινοτυπικές αναλύσεις για τα αλληλόμορφα αυτού του γονιδίου με σκοπό την σύνδεση τους στο μεταβολισμό των θειοπουρινικών φαρμάκων και τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή συσχέτιση του αλληλομόρφου NUDT15 R139C με την όλη διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο αυτό φέρει τον πολυμορφισμό rs116855232 που πρόκειται για μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή, την c.415C>T στο εξώνιο 3. Η αλλαγή αυτή οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση μίας αργινίνης από μια κυστεΐνη, στο κωδικόνιο 139 (p.Arg139Cys). Ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί σε μείωση της θερμικής σταθερότητας του γονιδίου και σε σταδιακή αποικοδόμηση του. Έτσι το γονίδιο χάνει τη λειτουργικότητα του με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποφωσφορυλιώσει τους ενεργούς μεταβολίτες 6-TGTP και 6-TdGTP και πάυει να αποτελεί φραγμός για την είσοδό τους στο DNA ή το RNA. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα αυτών των μεταβολιτών πυροδοτούν την κυτταρική απόπτωση, την κυτταροτοξικότητα και την πρόκληση λευκοπενίας [Xiang Fei et al. 2018 (2)].

Τα άτομα που είναι ομόζυγα για το αγρίου τύπου αλληλόμορφο του NUDT15 φέρουν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν θετικά σε θεραπεία με AZA και πολύ μικρό ρίσκο πρόκλησης λευκοπενίας. Αντίθετα άτομα ετερόζυγα για το αλληλόμορφο NUDT15 R139C έχουν πολλές πιθανότητες(>50%) να ανταποκριθούν αρνητικά στην AZA. Τέλος, οι ασθενείς που είναι ομόζυγοι για το μη λειτουργικό αλληλόμορφο αντιμετωπίζουν άμεση και θανάσιμη πρόκληση λευκοπενίας μετά την χορήγηση τους με θειοπουρινικά φάρμακα.

Η συχνότητα του αλληλομόρφου NUDT15 R139C διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις πληθυσμιακές ομάδες. Στην ανατολική Ασία συναντάται σε ποσοστό 9,8%, στους Ισπανόφωνους σε ποσοστό 4,1%, στους Ευρωπαίους σε ποσοστό 0,2% και 0,0% σε Αφρικανικούς πληθυσμούς [Xiang Fei et al. 2018].

2.10. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Η μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης (TPMT) είναι ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος το οποίο καταλύει τη μεθυλίωση των θειοπουρινικών φαρμάκων, όπως η αζαθειοπρίνη (AZA), η οποία χορηγείται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Η μη ύπαρξη αγρίου τύπου αλληλομόρφων του γονιδίου TPMT συνδέεται με μειωμένη ή απύσχα ενζυμική δραστηριότητα με αποτέλεσμα η χορήγηση AZA να μην έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα ή ακόμα και να οδηγεί σε δυσάρεστες παρενέργειες για τον οργανισμό. Επιπροσθέτως, ένα ακόμα γονίδιο με σημαντική συνεισφορά στο μεταβολισμό της AZA είναι το NUDT15. Μελέτες όμως έδειξαν ότι ένα αλληλόμορφο του γονιδίου μπορεί να επηρεάσει και αυτό με τη σειρά του αρνητικά τον μεταβολισμό, με ποικίλες συνέπειες όπως πρόκληση κυτταροτοξικότητας και λευκοπενίας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία ενός εύκολου και οικονομικού πειραματικού πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό της ύπαρξης τεσσάρων συγκεκριμένων γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε ασθενείς που λαμβάνουν αζαθειοπρίνη και η συσχέτιση τους με την απόκριση που έχουν σε αυτή τη φαρμακευτική θεραπεία. Πιο αναλυτικά ελέγχεται η ύπαρξη τριών πολυμορφισμών στο γονίδιο TPMT και ενός στο γονίδιο NUDT15. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου TPMT είναι οι εξής: 1) rs1800462, 2) rs1800460 και 3) rs1142345. Τα αλληλόμορφα γονίδια που φέρουν αυτά τα SNPs είναι τα TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B και TPMT*3C. Αντίστοιχα ο πολυμορφισμός του γονιδίου NUDT15 είναι ο rs116855232 και αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο NUDT15 R139C.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός του πειράματος ακολουθήθηκε ένα συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο για κάθε εξεταζόμενο δείγμα. Αρχικά έγινε απομόνωση DNA από κάθε δείγμα που μελετάται, της οποίας η επιτυχία ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτής αγαρόζης και φωτομέτρησης. Έπειτα, τα δείγματα DNA χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Δηλαδή ενισχύθηκαν τα τμήματα DNA που αναμέναμε να βρίσκονται οι πολυμορφισμοί που εξετάζονται. Για την εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η τεχνική ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) με σκοπό την ταυτοποίηση διαφορών ανάμεσα στα τμήματα DNA που προηγουμένως ενισχύθηκαν. Για την περαιτέρω πιστοποίηση των αποτελεσμάτων της SSCP τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν προκειμένου να δώσουν πιο σαφή δεδομένα για τις όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων.

Τέλος, με την ολοκλήρωση του παραπάνω πειραματικού πρωτοκόλλου έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικά δεδομένα.

2. Πειραματικό μέρος (υλικά και μέθοδοι)

2.1. Δείγματα

Για τη παρούσα διπλωματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος ασθενών με ρευματολογικές παθήσεις όπως σκληρόδερμα και ρευματοειδής αρθρίτιδα. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν 16 δείγματα με μοναδικό κριτήριο να λαμβάνουν το φάρμακο αζαθειοπρίνη ως θεραπευτική αγωγή. Οι ασθενείς αποτελούνται και από άνδρες και από γυναίκες διαφόρων ηλικιών. Τα ονόματα των ασθενών δεν αναφέρονται πουθενά στη παρούσα εργασία και επιλέχθηκε να κωδικοποιηθούν με τις εξής ονομασίες : 1-2- S4-S27-S37-S41-S25-S34-S71-S74-S75-S76-S78-S100-S101-S102

2.2. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ένα kit απομόνωσης και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Σε 500μl δείγματος αίματος προστέθηκαν 1000μl ρυθμιστικού διαλύματος SSC (αλατούχο διάλυμα-κιτρικό νάτριο). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανακίνηση μέσω vortex και σε φυγοκέντρηση. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης πετάχτηκε το υπερκείμενο.
- 2) Στο ίζημα που απομένει προστέθηκαν και πάλι 1000μl διαλύματος SSC. Ακολούθησε ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση και πέταμα του υπερκειμένου διαλύματος.
- 3) Στη συνέχεια προστέθηκαν στο ίζημα 180μl Lysis Buffer T₁ και 25μl πρωτεϊνάσης. Ακολούθησε ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση.
- 4) Τα δείγματα ασφαλίστηκαν και επωάστηκαν σε φούρνο για 30 λεπτά στους 56°C.
- 5) Έπειτα προστέθηκε σε κάθε δείγμα 200μl Lysis Buffer B₃. Ακολούθησε ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά
- 6) Εν συνεχεία προστέθηκαν 210μl αιθανόλης 100%. . Ακολούθησε ανακίνηση με vortex και φυγοκέντρηση και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε στήλες τα οποία τοποθετήθηκαν σε νέα eppendorfs.
- 7) Τα νέα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11χιλιάδες στροφές για ένα λεπτό. Ακολούθως πετάχτηκαν τα eppendorfs και οι στήλες τοποθετήθηκαν σε νέα.
- 8) Έπειτα προστέθηκαν 500μl Washing Buffer σε κάθε δείγμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11χιλιάδες στροφές για 1 λεπτό και πέταμα του υπερκειμένου.
- 9) Ακόμη στα δείγματα προστέθηκαν 600μl Lysis Buffer B₅ και ακολούθησε και πάλι φυγοκέντρηση στις 11χιλιάδες στροφές για 1 λεπτό. Οι στήλες μεταφέρθηκαν εκ νέου σε eppendorfs χωρητικότητας 1,5 ml.
- 10) Τα δείγματα δέχτηκαν διάλυμα Elusion Buffer (BE) 1000 μl και επωάστηκαν για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11) Τέλος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11 χιλιάδες στροφές για 1 λεπτό. Οι στήλες πετάχτηκαν και το δείγμα DNA που θέλαμε να απομονωθεί βρισκόταν πλέον στο εσωτερικό των eppendorfs.

Μετά την απομόνωση το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης και ελέγχθηκε ως προς τη καθαρότητα με φωτομέτρηση. Τα δείγματα DNA ήταν πλέον έτοιμα για να εξεταστούν και να χρησιμοποιηθούν για τις περαιτέρω τεχνικές.

2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) :

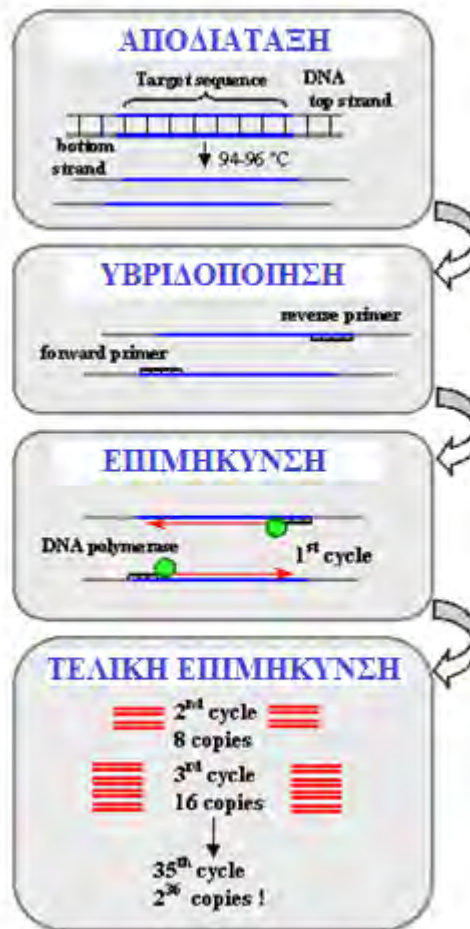
Αρχή της μεθόδου : Την μέθοδο αυτή την ανέπτυξε κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 80' ο κάτοχος βραβείου Νόμπελ Kary Mullis . Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στηρίζεται στην ικανότητα που διαθέτει η DNA πολυμεράση να συνθέτει νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς έναν κλώνο-εκμαγείο. Επειδή η πολυμεράση αυτή μπορεί να προσθέτει νουκλεοτίδια μόνο σε μια προεξέχουσα 3'-OH ομάδα, χρειάζεται ένας εκκινητής (γνωστός στην αγγλική ως primer) στον οποίο μπορεί να προσθέσει το πρώτο νουκλεοτίδιο και στη συνέχεια να συντεθεί ο υπόλοιπος κλώνος.

Κατά την PCR προστίθενται στην αντίδραση δυο εκκινητές, οι λεγόμενοι forward primer και reverse primer, δηλαδή δυο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συνήθως 20 έως 24 νουκλεοτίδια, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς τα άκρα της αλληλουχίας DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε.

Το τελικό αποτέλεσμα της τεχνικής PCR είναι η αλληλουχία DNA που μελετάται να υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Συγκεκριμένα, σε κάθε κύκλο της PCR το κάθε αντίγραφο διπλασιάζεται. Έτσι λοιπόν, αν για παράδειγμα η PCR που πραγματοποιούμε είναι 35 κύκλοι, στο τελικό διάλυμα θα υπάρχουν 2^{35} πανομοιότυπες μεταξύ τους αλληλουχίες, σύμφωνα με τον τύπο 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων *{Polymerase Chain Reaction (PCR)-NCBI}*.

Η μέθοδος της ενίσχυσης του αρχικού τμήματος DNA αποτελεί τη βάση των τεχνικών που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, καθώς όλες προϋποθέτουν την ύπαρξη αυξημένης συγκέντρωσης του DNA-στόχου ώστε να λειτουργήσουν ικανοποιητικά και να δώσουν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Προκειμένου λοιπόν, να ενισχυθούν τα τμήματα του DNA που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς που μελετώνται σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε η τεχνική της PCR για κάθε δείγμα που χρησιμοποιήθηκε. Μάλιστα σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, μέσω του προγράμματος primer BLAST του ncbi, ώστε να ενισχυθούν τα συγκεκριμένα τμήματα DNA που διαθέτουν τα υπό μελέτη SNPs.



Εικόνα 7: Οι κύκλοι (στάδια) της PCR {Polymerase Chain Reaction (PCR)-NCBI}.

Πίνακας 2: Το πρόγραμμα των συνθηκών της PCR παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR		
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ
ΑΡΧΙΚΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	95	4min
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	95	40sec
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	57-58-59*	40sec
ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	72	1.30min
ΤΕΛΙΚΗ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ	72	10min

* Η θερμοκρασίες στο στάδιο της υβριδοποίησης θα διαφέρουν ανάλογα με τον εκκινητή που θα χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 3: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε ειδικά PCR tubes, κάθε ένα από τα οποία περιείχε DNA από ένα δείγμα. Τα συστατικά της αντίδρασης PCR παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα.

	ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
1	Δείγμα DNA	1μl
2	ddH₂O	39,8 μl
3	MgCl₂	1μl
4	dNTPs/νουκλεοτίδια	1μl
5	Buffer/ροθμιστικό διάλυμα	5μl
6	Εκκινητής Forward	1μl
7	Εκκινητής Reverse	1μl
8	Taq DNA Polymerase	0,2μl

*Σε μερικές περιπτώσεις χρειάστηκε να μεταβληθεί η ποσότητα του MgCl₂ σε 0,5 μl ώστε να υπάρξουν οι κατάλληλες συνθήκες για την ενίσχυση του εκάστοτε πολυμορφισμού. Η μη σωστή ποσότητα MgCl₂ μπορεί να επηρεάσει την ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA με αποτέλεσμα την ύπαρξη περίσσειας μη ειδικών προϊόντων DNA μετά το πέρας της αντίδρασης. Επιπλέον μπορεί να επηρεαστεί η πιστότητα αντιγραφής της DNA πολυμεράσης.

2.4. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού, αναγνώρισης και καθορισμού θραυσμάτων ποικίλων μεγεθών DNA που κυμαίνονται ανάμεσα 100bp και 25 kb είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αρχή της μετακίνησης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αρχικά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μέγεθος του DNA. Τα γραμμικά δίκλιωνα μόρια DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους. Επίσης κύριο ρόλο παίζει η συγκέντρωση της αγαρόζης καθώς έχει βρεθεί ότι σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τα κομμάτια DNA παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα αντίστοιχα. Τέλος, η στερεοδιάταξη του DNA επηρεάζει την κινητικότητα των θραυσμάτων στο πήκτωμα. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και το γραμμικό DNA είναι τρεις μορφές DNA των οποίων η κινητικότητα εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μια μορφή κινείται γρηγορότερα από την άλλη. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.

➤ Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης είναι τα εξής:

- Loading Buffer
- TAE 0,5X
- Αγαρόζη
- Χρωστική
- Ladder

➤ Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την ηλεκτροφόρηση είναι η εξής:

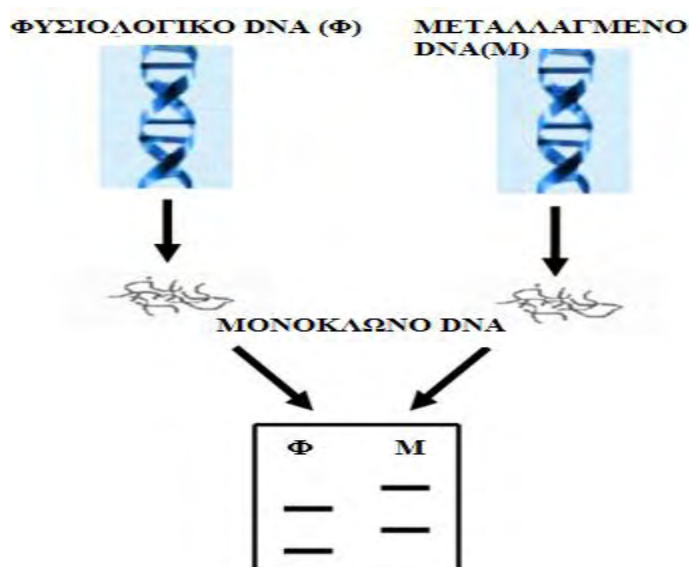
Αρχικά ζυγίστηκε η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμίχθηκε με συγκεκριμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 0,5 x TAE. Η αγαρόζη διαλύθηκε με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα έγινε τελείως διαυγές. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα χρωστικής ουσίας. Έπειτα πριν πήξει το τζελ, το διάλυμα εισήχθη σε ένα καλούπι ειδικών διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής). Οι θέσεις των δειγμάτων DNA (πηγαδάκια) σχηματίστηκαν με τη βοήθεια εργαλείου που τοποθετήθηκε στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Στα δείγματα DNA που αναλύθηκαν προστέθηκε διάλυμα χρωστικής Loading buffer. Ακολούθως όταν έπηξε το διάλυμα τοποθετήθηκε στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία ήταν γεμάτη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το τζελ. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στα πηγδάκια και αναλύθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης για περίπου 15 λεπτά. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism

Η SSCP είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως και έχει την ικανότητα να ταυτοποιεί διαφορές ανάμεσα σε δυο ή περισσότερα τμήματα DNA μεταξύ μίας πληθώρας δειγμάτων και έχει εφαρμογή σε ποικίλα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Με το τρόπο αυτή μπορούν να ανιχνευτούν διαφορές μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, ακόμη και σε ένα νουκλεοτίδιο (SNPs).

Αρχή της μεθόδου : Η διαφορετική κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων DNA σε τζελ πολυακρυλαμίδης κατάλληλης συγκέντρωσης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, επιτρέπει την ανίχνευση των σημειακών μεταλλαγών. Δηλαδή δυο μόρια DNA που εμφανίζουν διαφορές, ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο, στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, θα έχουν μια ανιχνεύσιμη διαφορά στην κινητικότητά τους. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου μειώνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του προϊόντος

της PCR. Το ιδανικό σενάριο είναι το μήκος του προϊόντος της PCR να μην ξεπερνά τις 300 βάσεις {Kakavas V. et al.-2008}. Οι διαφορές στην κινητικότητα απεικονίζονται στη παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 8: Ο διαχωρισμός δύο μορίων DNA σύμφωνα με την μέθοδο SSCP {Kakavas V. et al.-2008}.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ:

Αρχικά σε PCR tubes προστέθηκαν 10μl προϊόντος PCR και 10μl denaturation buffer (αποδιατακτικό) και τα δείγματα επώαστηκαν για περίπου 10 λεπτά στις κατάλληλες συνθήκες. Με την αποδιάταξη τα δίκλινα τμήματα DNA μετατρέπονται σε μονόκλινα. Τέλος τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση ώσπου να ηλεκτροφορηθούν.

Για την δημιουργία του τζελ ηλεκτροφόρησης 10% της SSCP χρησιμοποιήθηκαν τα εξής συστατικά:

- 6,25gr Acrylamide
- 0,16gr Bis-Acrylamide
- 6,25ml Glycerol 50%
- 3,2ml TBE 10X
- 62,5μl TEMED
- 375μl APS 20%
- ddH₂O έως το διάλυμα να φτάσει 62,5ml

Για την δημιουργία του τζελ ηλεκτροφόρησης 10% της SSCP ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν όλα τα παραπάνω συστατικά εκτός του TEMED και του APS 20% και αναδεύτηκαν μέχρι την ομογενοποίηση τους.
2. Το διάλυμα διηθήθηκε σε ογκομετρικό σωλήνα και προστέθηκε νερό έως τα 62,5 ml.
3. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και προστέθηκαν TEMED ΚΑΙ APS 20%.
4. Έπειτα το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικό καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για την SSCP. Με ειδικά χτενάκια δημιουργήθηκαν τα πηγαδάκια στα οποία εισήχθησαν τα αποδιεταγαγμένα δείγματα.

Μετά την δημιουργία του τζελ και την εισαγωγή των αποδιεταγαγμένων δειγμάτων ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση για περίπου 20 ώρες. Στη συνέχεια για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης έγινε χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

ΔΙΑΛΥΜΑ 1ο (400ml)

1. 0,5ml οξικού οξέος
2. 400ml ddH₂O

ΔΙΑΛΥΜΑ 2ο (200ml)

1. 0,2gr στερεού AgNO₃
2. 200ml ddH₂O

ΔΙΑΛΥΜΑ 3ο (200ml)

1. 3gr NaOH
2. 0,01gr NaBH₄
3. 1ml φορμαλδεΐδης
4. 200ml ddH₂O

Αρχικά το τζελ τοποθετήθηκε μέσα σε ένα πλαίσιο αλουμινίου σε ειδική συσκευή ανάδευσης και αναμίχθηκε με το 1ο διάλυμα. Πρώτα εισήχθησαν τα 200ml του 1ου διαλύματος και αναδεύτηκαν για 2 λεπτά. Έπειτα απομακρύνθηκαν τα 200ml και προστέθηκαν τα υπόλοιπα 200ml του διαλύματος. Ανάμεσα από κάθε πλύση το τζελ ξεπλύθηκε με αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια ακολούθησε πλύση με το διάλυμα νιτρικού αργύρου για περίπου 15 λεπτά. Τέλος έγιναν δύο πλύσεις με ddH₂O δύο λεπτών η κάθε μια και προστέθηκε το τελευταίο διάλυμα. Η πλύση αυτή διήρκεσε περίπου 25 λεπτά μέχρι που εμφανίστηκαν οι επιθυμητές ζώνες στο τζελ και το τζελ ξεπλύθηκε για μια τελευταία φορά με αποσταγμένο νερό.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στα πηκτώματα μελετήθηκαν τα πρότυπα που παρουσιάζει ο κάθε ασθενής και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα άτομα ομαδοποιήθηκαν και επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό άτομο για κάθε πρότυπο έτσι ώστε να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε ομάδας.

2.6. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας απαιτεί αρχικά το καθαρισμό των προϊόντων της PCR ώστε να απαλλαγθούν από τα εκάστοτε παραπροϊόντα. Στη συνέχεια τα δείγματα που υπέστησαν καθαρισμό στάλθηκαν σε εταιρία που πραγματοποιεί αλληλουχήσεις. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και, γνωρίζοντας τη θέση του πολυμορφισμού που μελετάμε μέσα στην αλληλουχία, να διαπιστώσουμε αν είναι όντως παρών. Αυτό γίνεται με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (Bioedit, MEGA) και με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST του ncbi.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση DNA

Τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν, έτρεξαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης για να εξακριβωθεί αν επιτεύχθηκε η απομόνωση τους. Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε μέσω φωτομέτρησης των δειγμάτων DNA και μέτρηση της απορρόφησής τους αν η απομόνωση από το αίμα των ασθενών παρείχε υψηλής καθαρότητας DNA. Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης για δείγματα DNA που απομονώθηκαν.

S25 S34 S71 S74 S75 S76 S78 S100 S101 S102



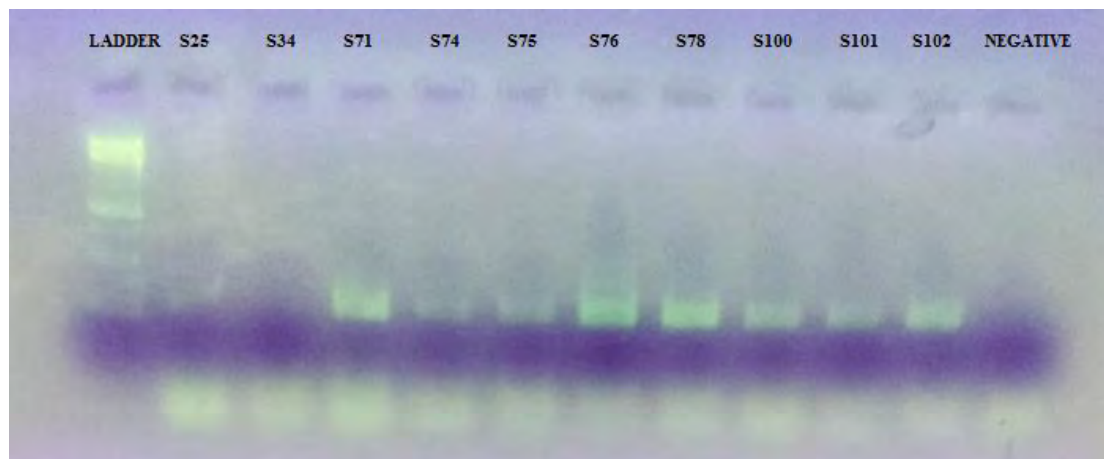
Εικόνα 9: Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης για τα δείγματα S25,S34,S71,S74,S76,S78,100,S101,S102 ύστερα από την απομόνωση DNA.

3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

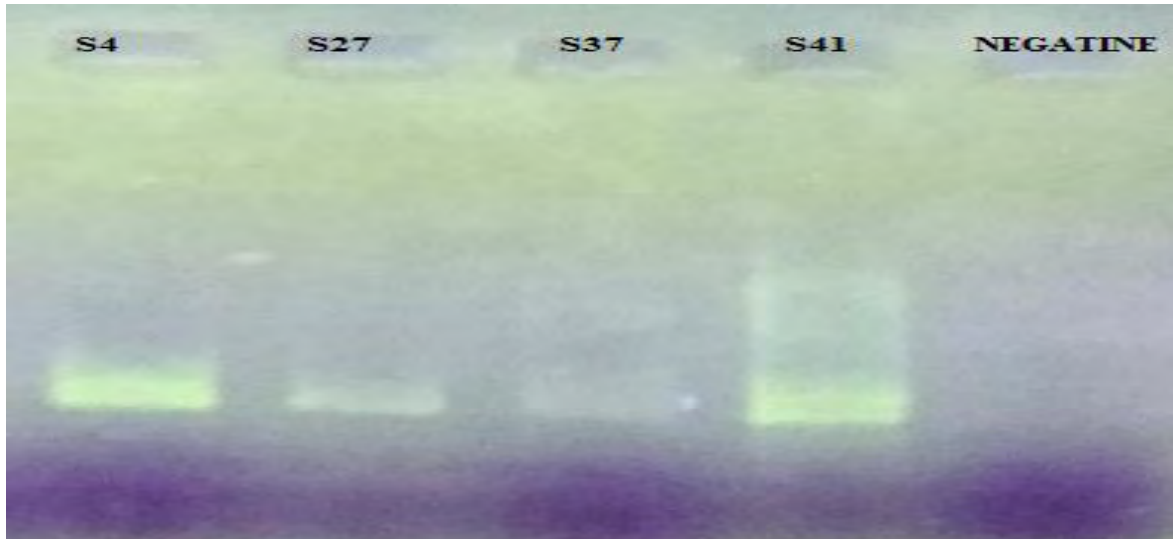
Όλα τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές ώστε να εντοπιστούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ενίσχυση του εκάστοτε τμήματος DNA που εξετάζεται. Σχεδιάστηκαν οι απαραίτητοι εκκινητές για κάθε πολυμορφισμό, εντοπίστηκαν οι θερμοκρασίες στις οποίες η ενίσχυση φαίνεται να είναι αποτελεσματικότερη και ρυθμίστηκε η ποσότητα του MgCl₂ που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί.

Τόσο τα τμήματα DNA που περιέχουν τα SNPs που βρίσκονται στο γονίδιο TPMT, όσο και το τμήμα για το SNP που βρίσκεται στο γονίδιο NUDT15 ενισχύθηκαν για κάθε δείγμα ασθενούς που χρησιμοποιήθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

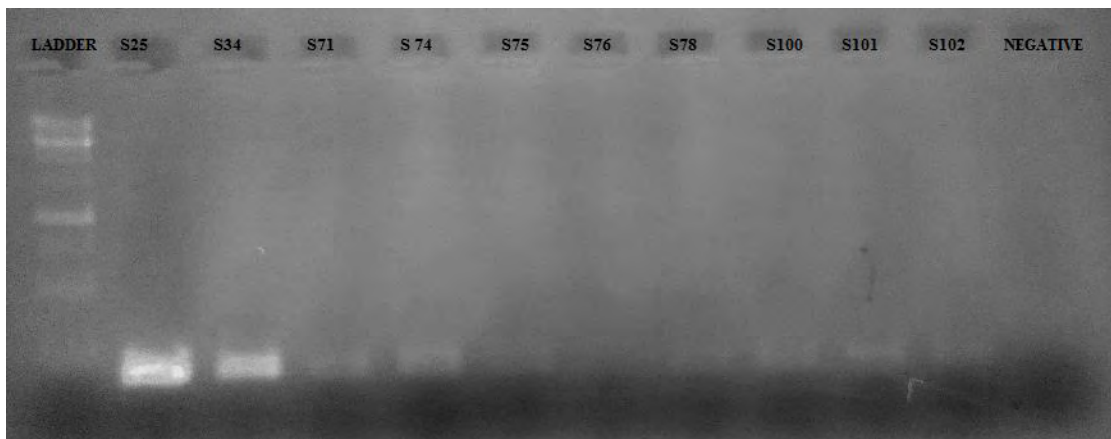
Ενδεικτικά, στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR για ορισμένα από τα παραπάνω δείγματα, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, συγκέντρωσης 1%. Επίσης χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder), ο οποίος προστέθηκε με σκοπό να μπορούμε να εκτιμήσουμε αν το γονιδιακό προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση έχει το μέγεθος που αναμένουμε ή αν πρόκειται για κάποιο άλλο παραπροϊόν που προέκυψε τυχαία.



Εικόνα 10: Τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, για τον πολυμορφισμό rs1800462.



Εικόνα 11: Τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, για τον πολυμορφισμό rs1800460



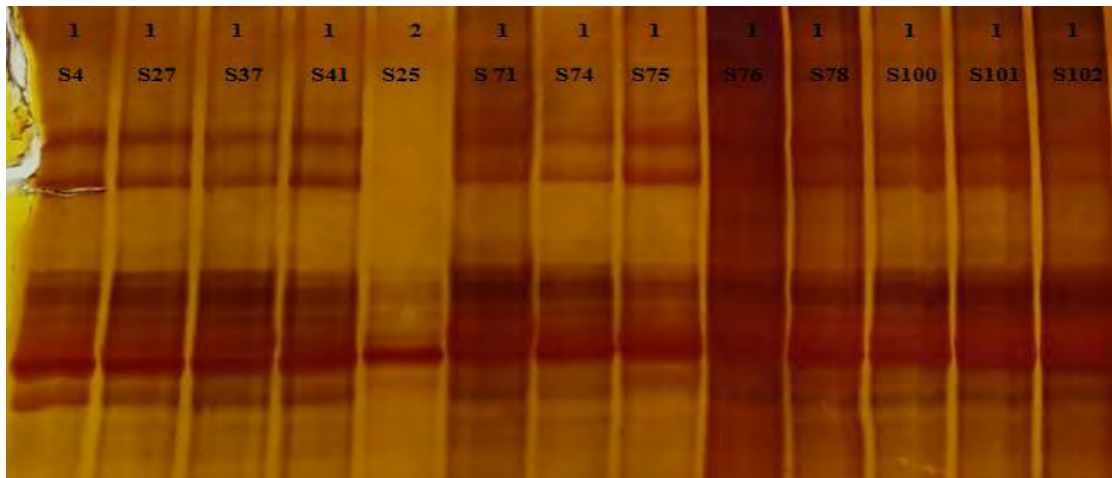
Εικόνα 12: Τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, για τον πολυμορφισμό rs1142345.

3.3. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism

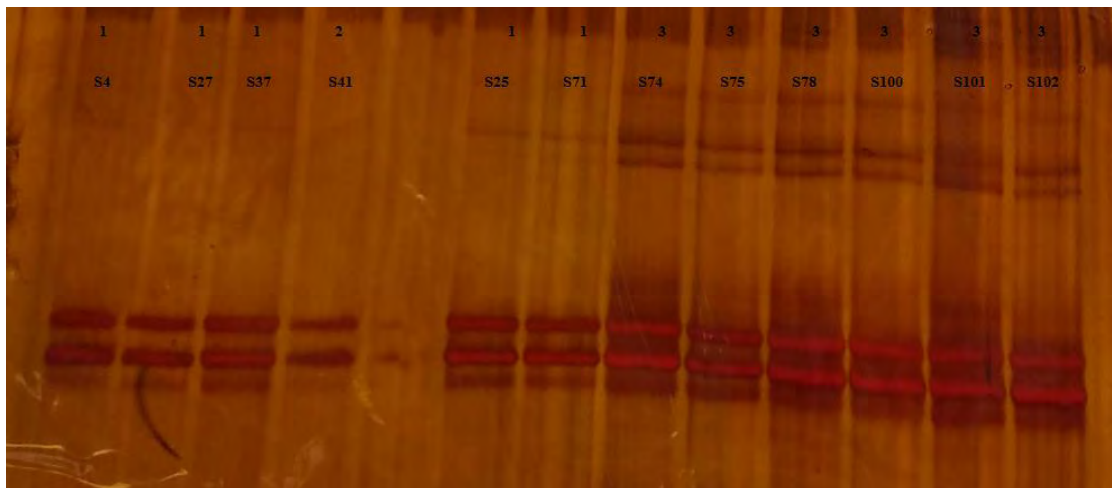
Για κάθε ένα από τα τέσσερα τμήματα DNA που μελετήθηκαν, εμφανίζονται περισσότερα από ένα πρότυπα στις πηκτές πολυακρυλαμίδης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει σημειακές διαφορές στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αντίστοιχων δειγμάτων.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά μερικές εικόνες με τα αποτελέσματα, που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου της SSCP, για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς.

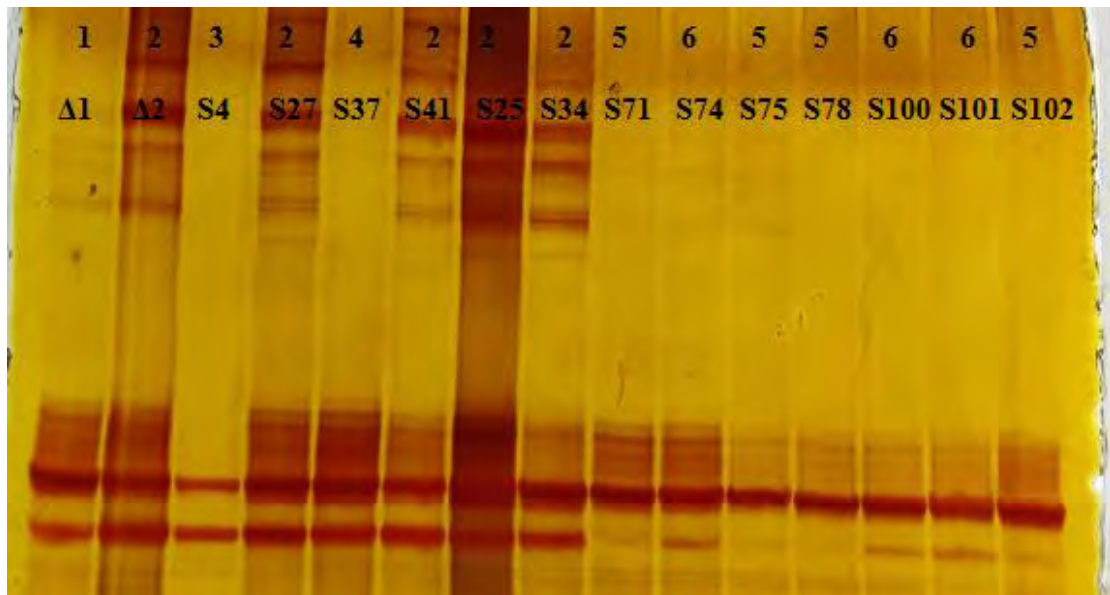
Στις εικόνες με τις πηκτές πολυακρυλαμίδης αναφέρονται ποια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και σε ποιο πρότυπο αντιστοιχεί ο καθένας.



Εικόνα 13: Αποτελέσματα SSCP για το SNP rs1800462 του γονιδίου TPMT. Παρατηρούνται 2 διαφορετικά πρότυπα



Εικόνα 14: Αποτελέσματα SSCP για το SNP rs116855232 του γονιδίου NUDT15. Παρατηρούνται 3 διαφορετικά πρότυπα

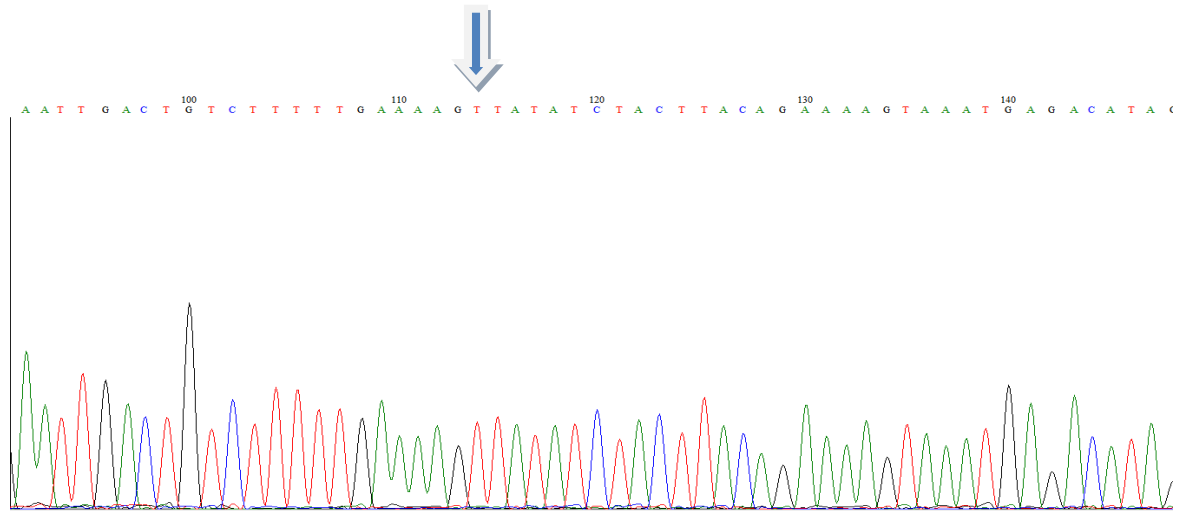


Εικόνα 15: Αποτελέσματα SSCP για το SNP rs1142345 του γονιδίου TPMT. Παρατηρούνται 6 διαφορετικά πρότυπα.

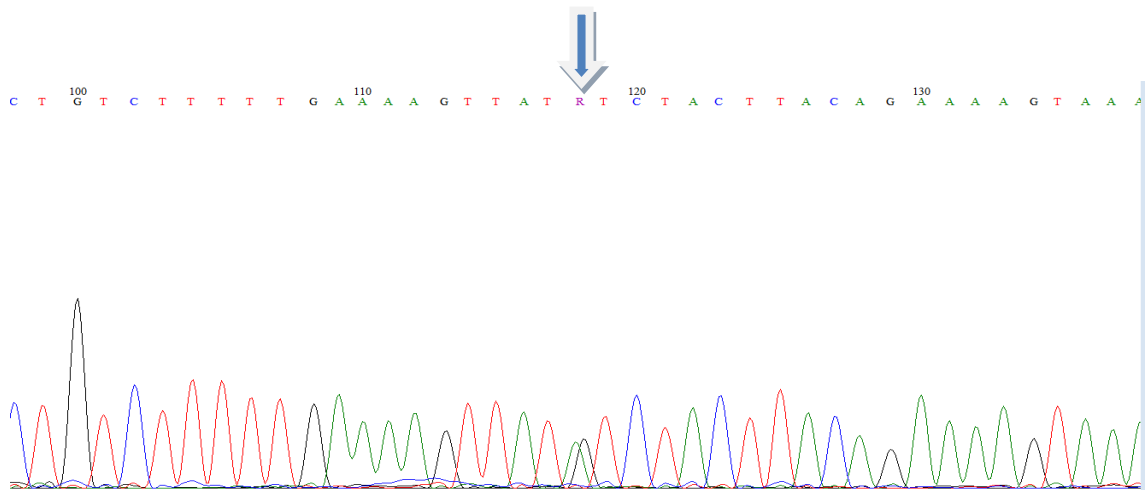
Η παρουσία διαφορετικών προτύπων και κατ' επέκταση η διαφορετική κινητικότητα δεν υποδηλώνουν απαραίτητα την ύπαρξη ή την απουσία του υπό μελέτη πολυμορφισμού. Η τεχνική της SSCP δεν μπορεί να διευκρινίσει απόλυτα σε ποιο σημείο της αλληλουχίας διαφέρουν τα τμήματα DNA. Για το λόγο αυτό κρίνεται καίρια η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.

3.4. Αλληλούχηση προϊόντων PCR και ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης :

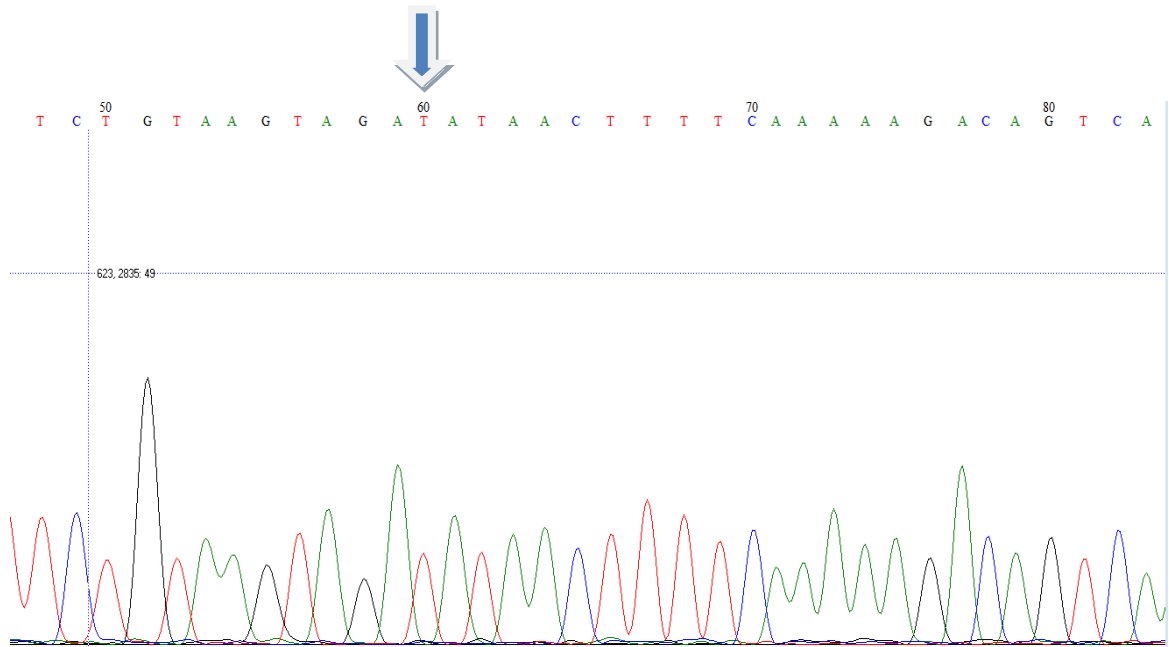
Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Bioedit. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται, ενδεικτικά, χρωματογραφήματα ως προς τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς.



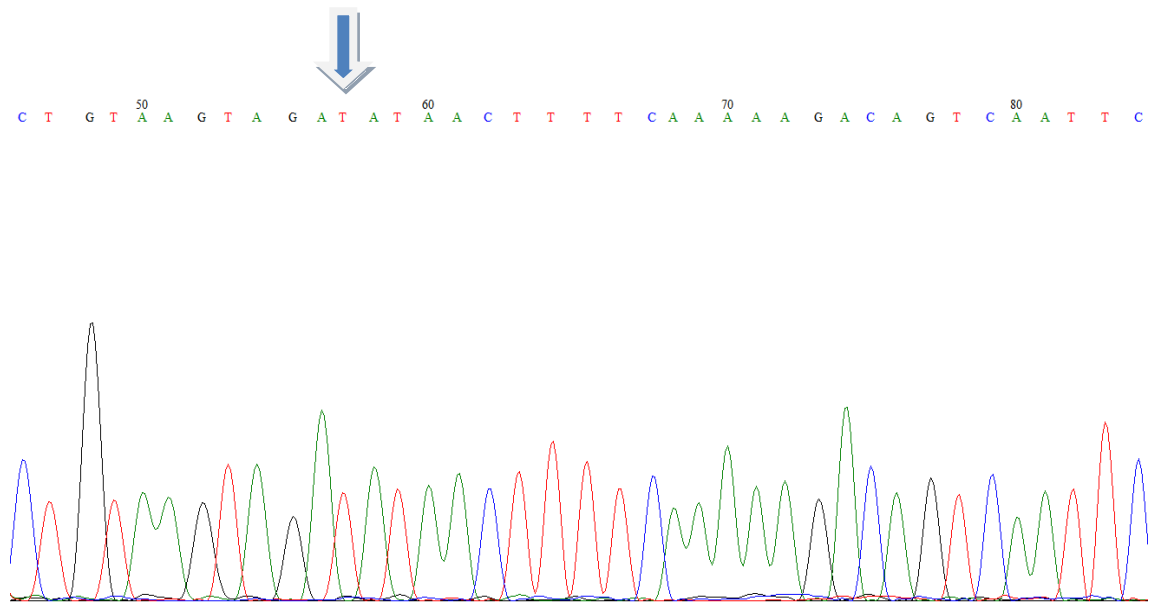
Εικόνα 16: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 1 για το SNP rs1142345 στο γονίδιο TPMT, το οποίο αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (T/T). Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού.



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 4 για το SNP rs1142345 στο γονίδιο TPMT, το οποίο αναφέρεται σε άτομο ετερόζυγο. Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 3 για το SNP rs1142345 στο γονίδιο TPMT, το οποίο αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (T/T). Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού.



Εικόνα 19: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 5 για το SNP rs1142345 στο γονίδιο TPMT, το οποίο αναφέρεται σε άτομο ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (T/T). Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεθυλοτρανσφεράση της θειοπουρίνης (TPMT) είναι ένα ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό των θειοπουρινικών φαρμάκων, όπως η αζαθειοπρίνη (AZA), η οποία έχει καθιερωθεί ως ανοσοκατασταλτικό σε μεταμοσχεύσεις οργάνων αλλά και για τη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου. Η παρουσία συγκεκριμένων πολυμορφισμών στο γονίδιο TPMT επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου που παράγεται. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί αρκετά SNPs στην κωδική περιοχή του γονιδίου TPMT, τα οποία επηρεάζουν την ενζυμική του δραστηριότητα, κυρίως μέσω μεταβολών που προκαλούν στην αλληλουχία του ενζύμου. Εκτός όμως από το γονίδιο TPMT, κείμενο ρόλο στο μεταβολισμό των θειοπουρινών, βρέθηκε ότι διαδραματίζει και το γονίδιο NUDT15, στο οποίο εντοπίστηκαν αντίστοιχα SNPs που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του.

Ανατρέχοντας στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν τέσσερις συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στους παραπάνω γονιδιακούς τόπους για τους οποίους έχει βρεθεί στο παρελθόν συσχέτιση με την αρνητική ρύθμιση του μεταβολισμού της αζαθειοπρίνης. Οι τρεις από αυτούς εντοπίζονται σε τέσσερα αλληλόμορφα γονίδια του TPMT και ο ένας σε αλληλόμορφο του γονιδίου NUDT15. Στόχος λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η δημιουργία ενός εύκολου και οικονομικού πειραματικού πρωτόκολλου για τον προσδιορισμό της ύπαρξης αυτών των τεσσάρων συγκεκριμένων γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε δεκαέξι ασθενείς που λαμβάνουν αζαθειοπρίνη και η συσχέτιση τους με την απόκριση που έχουν σε αυτή τη φαρμακευτική θεραπεία.

Με αυτόν τον στόχο, αρχικά έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα ασθενών που λαμβάνουν αζαθειοπρίνη από τη παθολογική κλινική. Στη συνέχεια ενισχύθηκαν μέσω PCR οι υπό μελέτη γονιδιακοί τόποι και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης, από την οποία αναδείχθηκαν διαφορετικά πρότυπα, τα οποία αλληλουχίστηκαν προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαφορετικοί γονότυποι και ακολούθησε ανάλυση των αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος Bioedit.

Από τους 16 ασθενείς που μελετήθηκαν 4 άτομα παρουσίασαν τοξικότητα στη χορήγηση της αζαθειοπρίνης, οπότε και διέκοψαν τη θεραπεία. Επομένως, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των αποτελεσμάτων που πήραμε από την αλληλούχιση των δειγμάτων με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Σύμφωνα με τις αλληλουχίσεις των δειγμάτων που έγιναν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και με τις υπάρχουσες αλληλουχίσεις που είχαν πραγματοποιηθεί από το εργαστήριο για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, δεν προέκυψε ταύτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικά δεδομένα.

Πιο αναλυτικά, οι ασθενείς που παρουσίασαν τοξικότητα στην αζαθειοπρίνη και αναγκάστηκαν να σταματήσουν τη χορήγηση της δεν βρέθηκαν να φέρουν κανένα από τα εξεταζόμενα σπάνια αλληλόμορφα. Οι αλληλουχίσεις των δειγμάτων αυτών των τεσσάρων ασθενών έδειξαν ότι είναι ομόζυγοι για καθένα από τα συχνά αλληλόμορφα που μελετώνται. Επίσης άτομα ετερόζυγα με το σπάνιο αλληλόμορφο δεν παρουσίασαν προβλήματα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αζαθειοπρίνη που να οδηγούσαν στην διακοπή της. Αναμενόμενα, κανένας από τους ασθενείς δεν βρέθηκε να είναι ομόζυγος για το εκάστοτε σπάνιο αλληλόμορφο.

Πιο συγκεκριμένα, για τον πολυμορφισμό rs1800462 όλοι οι ασθενείς βρέθηκαν να είναι ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο G/G. Για τον πολυμορφισμό rs1800460 βρέθηκαν 4 άτομα που είναι ετερόζυγα (A/G). Κανένα από αυτά τα άτομα δεν παρουσίασε προβλήματα κατά τη διάρκεια χορήγησης AZA ώστε να χρειαστεί η διακοπή της. Τα υπόλοιπα άτομα βρέθηκαν ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο (G/G). Για τον πολυμορφισμό rs1142345 διαπιστώθηκε ότι τα ίδια 4 άτομα είναι ετερόζυγα (A/T), ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς είναι και αυτοί ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο. Η ομοιότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ αυτών των δύο πολυμορφισμών είναι σχετικά αναμενόμενη γιατί το αλληλόμορφο TPMT*3A φέρει *in cis* αυτούς τους δύο μη συνώνυμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (rs1800460 και rs1142345). Τέλος για τον πολυμορφισμό rs116855232 στο γονίδιο NUDT15 όλοι οι ασθενείς βρέθηκαν να είναι ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο C/C. (Πίνακας 4)

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί με βάση τη τρέχουσα βιβλιογραφία μια πρώτη προσέγγιση για τη συσχέτιση των τεσσάρων συγκεκριμένων γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αζαθειοπρίνη στον ελληνικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αντίστοιχων μεγαλύτερων μελετών σε Ευρωπαϊκούς και Ασιατικούς πληθυσμούς. Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα μας δεν συνάδουν με τα κλινικά δεδομένα των ασθενών, καθώς και με τα πρότυπα που εμφανίζονται από τη μέθοδο της SSCP (Πίνακας 5), έγκειται σε δύο κύριους λόγους. Πρώτον, ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ μικρός. Τα 16 άτομα που έλαβαν μέρος σε αυτό το πείραμα δεν μπορούν να δώσουν σαφή αποτελέσματα για την συσχέτιση των τεσσάρων συγκεκριμένων γενετικών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) με την ανταπόκριση που έχουν στη φαρμακευτική θεραπεία με την αζαθειοπρίνη. Δεύτερον, σε αυτή την έρευνα επιλέχθηκαν να εξεταστούν τα τέσσερα πιο συχνά αλληλόμορφα του γονιδίου TPMT που συνδέονται με τη δυσλειτουργική δραστηριότητα του και μόλις ένα αλληλόμορφο του γονιδίου NUDT15. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι ήδη γνωστή η ύπαρξη και άλλων αλληλομόρφων αυτών των δύο γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό της αζαθειοπρίνης και μπορούν άμεσα να τον επηρεάσουν. Σε αυτή τη μελέτη δεν εξετάστηκε κανένας άλλος πολυμορφισμός στους υπό έρευνα γονιδιακούς τόπους που θα εξηγούσε την διακοπή χορήγησης της αζαθειοπρίνης στους 4 ασθενείς ώστε να γίνει μια περεταίρω συσχέτιση τους.

Επομένως, απαιτείται αύξηση του αριθμού των δειγμάτων, τόσο ασθενών όσο και ατόμων ελέγχου και περαιτέρω έρευνα ώστε να γίνει αντιληπτό εάν όντως η ύπαρξη των πολυμορφισμών αυτών στο γονιδίωμα προσδίδει στο άτομο που τους φέρει ευαισθησία στη χορήγηση της αζαθειοπρίνης. Τέλος, είναι σημαντικό να διερευνηθούν περαιτέρω οι συγκεκριμένοι γονιδιακοί τόποι και να προσδιοριστεί η συχνότητα και άλλων πολυμορφισμών, η ύπαρξη των οποίων διαπιστώθηκε τόσο μέσω της εμφάνισης διαφορετικών προτύπων στη διαδικασία SSCP όσο και από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η συχνότητα αυτών των παραλλαγών διαφέρει ανάμεσα στις πληθυσμιακές ομάδες. Άρα είναι πιθανό στον ελληνικό πληθυσμό η ανταπόκριση στη θεραπεία με αζαθειοπρίνη να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών γενετικών «παραλλαγών» από αυτές που έχουν εντοπιστεί σε Ευρωπαίους και άλλους καυκάσιους πληθυσμούς. Για το λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει μια βάση για μια πιο διευρυμένη έρευνα όσον αφορά τον μεταβολισμό της αζαθειοπρίνης. Η κατανόηση των μηχανισμών που απαιτούνται για να μπορέσει ένα άτομο να μεταβολίσει την αζαθειοπρίνη μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά τη βάση για την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου γενετικού προφίλ, που θα επιτρέψει στους Έλληνες επιστήμονες να γνωρίζουν, εκ των προτέρων, την κατάλληλη δόση του φαρμάκου που θα χορηγήσουν στον ασθενή ώστε αυτό να είναι όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερο και ασφαλέστερο.

Πίνακας 4: παρουσιάζονται αναλυτικά ο αριθμός του κάθε δείγματος, ο γονότυπος στον οποίο αντιστοιχεί ως προς τον υπό μελέτη πολυμορφισμό και η ανταπόκριση που είχαν οι ασθενείς στη χορήγηση αζαθειοπρίνης.

ΔΕΙΓΜΑ	rs1800462 Γονότυπος	rs1800460 Γονότυπος	rs1142345 Γονότυπος	rs116855232 Γονότυπος	Χορήγηση AZA
Δ1	G/G	G/G	T/T	C/C	Διακοπή χορήγησης
Δ2	G/G	G/G	T/T	C/C	Διακοπή χορήγησης
S4	G/G	G/G	T/T	C/C	Διακοπή χορήγησης
S25	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S27	G/G	G/G	T/T	C/C	Διακοπή χορήγησης
S34	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S37	G/G	A/G	A/T	C/C	Χορήγηση
S41	G/G	A/G	A/T	C/C	Χορήγηση
S71	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S74	G/G	A/G	A/T	C/C	Χορήγηση
S75	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S76	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S78	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S100	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση
S101	G/G	A/G	A/T	C/C	Χορήγηση
S102	G/G	G/G	T/T	C/C	Χορήγηση

Πίνακας 5: παρουσιάζονται αναλυτικά ο αριθμός του κάθε δείγματος και ο αριθμός του προτύπου που προκύπτει με τη μέθοδο της SSCP για κάθε ένα από αυτά.

ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΤΥΠΟ			
	rs1800462	rs1800460	rs1142345	rs116855232
Δ1	1	1	1	1
Δ2	1	1	2	1
S4	1	2	3	1
S25	2	1	2	1
S27	1	2	2	1
S34	2	2	2	1
S37	1	3	4	1
S41	1	3	2	2
S71	1	3	5	1
S74	1	2	6	3
S75	1	2	5	3
S76	1	2	5	3
S78	1	2	5	3
S100	1	1	6	3
S101	1	1	6	3
S102	1	1	5	3

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barkur S. Shastry (2009) – ‘SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype’
2. Carmen Cuffari (2006) – ‘A Physician’s Guide to Azathioprine Metabolite Testing’
3. Chingiz Asadov, Gunay Aliyeva, and Kamala Mustafayeva (2017) – ‘Thiopurine S-Methyltransferase as a Pharmacogenetic Biomarker: Significance of Testing and Review of Major Methods’
4. ELION GB, HITCHINGS GH, VANDERWERFF H. (1951) - ‘Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines.’
5. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F (2010) - ‘Thiopurines: factors influencing toxicity and response.’
6. Georgitsi M, Viennas E, Gkantouna V, Christodouloupoulou E, Zagoriti Z, Tafrali C, Ntellos F, Giannakopoulou O, Boulakou A, Vlahopoulou P, Kyriacou E, Tsaknakis J, Tsakalidis A, Poulas K, Tzimas G, Patrinos GP. (2011) – ‘Population-specific documentation of pharmacogenomic markers and their allelic frequencies in FINDbase.’
7. Jürgen Brockmölle and Mladen V. Tzvetkov (2008) – ‘Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment’
8. Kakavas V. Konstantinos, Plageras Panagiotis E., Vlachos T. Antonios Papaioannou, Agelos Noulas, V. Argiris (2008) - ‘PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases’, Mol Biotechnol
9. Kara Bradford and David Q Shih (2011) – ‘Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease’
10. Laura Dean (2012) - ‘Azathioprine Therapy and TPMT Genotype’
11. L Wang & R Weinshilboum (2006) – ‘Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions’

12. María Josefina Etchevers, Montserrat Aceituno, and Miquel Sans (2008) – ‘Are we giving azathioprine too late? The case for early immunomodulation in inflammatory bowel disease’
13. McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. (2000) – ‘Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia.’
14. Minu Singh, Prateek Bhatia, Sanjeev Khera, Amita Trehan (2017) – ‘Emerging role of NUDT15 polymorphisms in 6-mercaptopurine metabolism and dose related toxicity in acute lymphoblastic leukemia’
15. NCBI: Polymerase Chain Reaction (PCR)
16. NIH: U.S. National Library of Medicine-What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?-2019
17. NIH: U.S. National Library of Medicine- Azathioprine
18. Rajiv Saini, Santosh Saini, and R. S. Sugandha (2010) – ‘ Pharmacogenetics: The future medicine’
19. Richard M. Weinshilboum and Susan L. Sladek (1980) – ‘Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity’
20. S Wright, D S Sanders, A J Lobo, and L Lennard (2004) – ‘Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease’
21. Takaya Moriyama et al. (2016) – ‘NUDT15 Polymorphisms Alter Thiopurine Metabolism and Hematopoietic Toxicity’
22. Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. (2003) – ‘Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation.’

23. Xiang Fei, Qing Shu, Bing-zhu Hua, Shi-ying Wang, Zhi-yong Chen, Weihong Ge, and Yun Fang (2018) – ‘NUDT15 R139C variation increases the risk of azathioprine-induced toxicity in Chinese subjects’

24. Xiang Fei, Qing Shu, Huaijun Zhu, Bingzhu Hua, Shiying Wang, Ling Guo, Yun Fang and Weihong Ge (2018) - NUDT15 R139C Variants Increase the Risk of Azathioprine-Induced Leukopenia in Chinese Autoimmune Patients