

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Π.Μ.Σ. «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ TFR2 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ
ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΣΗ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΣΤΕΡΙΟΥ ΣΑΪΤΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ

Καθηγητής Ανοσολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
Β. ΣΚΟΠΟΣ & ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	27
Γ. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
Ζ.ΕΠΙΛΟΓΟΣ	42
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BMP: Bone morphogenetic protein

BMPR: Bone morphogenetic protein receptor

FPN1: φερροπορτίνη

DMSO: διμεθυλοσουφοξείδιο

DMT1: Divalent metal transporter 1/ μεταφορέας δισθενών μετάλλων

dNTP: τριφωσφορικό δεοξυνουκλετίδιο

HFE Hemochromatosis: αιμοχρωμάτωση σχετιζόμενη με το HFE γονίδιο
(κλασσική ή τύπου 1 αιμοχρωμάτωση)

HJV: Hemojuvelin

Non HFE hemochromatosis: αιμοχρωμάτωση μη σχετιζόμενη με το HFE γονίδιο

IRE: iron regulatory element/ στοιχείο ρυθμιζόμενο από το σίδηρο

IRP: iron regulatory protein/ πρωτεΐνη ρυθμιζόμενη από το σίδηρο

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RGM: Repulsive Guidance Molecule

TF: τρανσφερίνη

TfR1: Transferrin receptor 1/ Υποδοχέας τρανσφερίνης 1

TfR2: Transferrin receptor 2/ Υποδοχέας τρανσφερίνης 2

Περίληψη

Η τύπου III κληρονομική αιμοχρωμάτωση αποτελεί ένα σπάνιο γενετικό νόσημα υπερφόρτωσης σιδήρου, το οποίο κληρονομείται με το σωματικό υπολειπόμενο τύπο και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου του TFR2. Ο TFR2 είναι ένας δεύτερος υποδοχέας της τρανσφερίνης που λειτουργεί ως αισθητήρας των επιπέδων σιδήρου του οργανισμού, ρυθμίζοντας τη σύνθεση επισιδίνης. Μελέτες του γονιδίου του TFR2 στον ελληνικό πληθυσμό δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία τόσο λόγω της σπανιότητας της αιμοχρωμάτωσης στην Ελλάδα όσο και λόγω των τεχνικών δυσκολιών ανάλυσης του γονιδίου. Σκοπός επομένως της παρούσης μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου ανάλυσης του εν λόγω γονιδίου και η εφαρμογή της στη συνέχεια σε Έλληνες ασθενείς με non-HFE αιμοχρωμάτωση.

Η μέθοδος περιέλαβε την ενίσχυση του DNA με διαδοχικές PCR που καλύπτουν το σύνολο των εξονίων και θέσεων ματίσματος του γονιδίου και στη συνέχεια την ανάλυση αλληλουχίας βάσεων των προϊόντων DNA. Μετά την προτυποποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου σε 4 ασθενείς με non-HFE αιμοχρωμάτωση.

Η ανάλυση αλληλουχίας σε 3 από τους 4 ασθενείς δεν ανέδειξε μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς του γονιδίου. Η ανάλυση αλληλουχίας ωστόσο του 4^{ου} ασθενούς ανέδειξε την ύπαρξη 2 μεταλλάξεων: της σιωπηλής μετάλλαξης gC19143T και της παρανοηματικής μετάλλαξης gT21143A/ pR752H. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση της εν λόγω μετάλλαξης ως προς την επίδρασή της στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα. Καθώς πρόσφατα έχουν περιγραφεί περιπτώσεις αιμοχρωμάτωσης οφειλόμενες σε διπλή ετεροζυγωτία διαφορετικών γονιδίων του μεταβολισμού του σιδήρου, το ενδεχόμενο η εν λόγω μετάλλαξη να δρα ως γενετικός τροποποιητής του μεταβολισμού του σιδήρου σε συνδυασμό με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Η διερεύνηση επομένως των υπολοίπων γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου, αλλά και η μελέτη περισσότερων ασθενών

Ελληνικής καταγωγής με υπερφόρτωση σιδήρου, θα επιτρέψει τον καθορισμό της 'συμβολής' των μεταλλάξεων του TfR2 γονιδίου στην μη κλασσική αιμοχρωμάτωση, συμβάλλοντας ακόμα περισσότερο στην κατανόηση τόσο της παθογένειας της αιμοχρωμάτωσης, όσο και του μεταβολισμού του σιδήρου.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΔΡΟΜΗ

Ο όρος 'αιμοχρωμάτωση' χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τον Von Recklinghausen¹ για να περιγράψει τη συσχέτιση της ιστικής εναπόθεσης σιδήρου με την κλινική τριάδα της κίρρωσης, του σακχαρώδους διαβήτη και της υπέρχρωσης του δέρματος [1]. Από την πρώτη αυτή περιγραφή της αιμοχρωμάτωσης και μέχρι τις μέρες μας, η γνώση μας πάνω στην αιτιοπαθογένεια και ιδίως στη γενετική της νόσου προόδευσε σημαντικά. Από τα μέσα περίπου του 20^{ου} αιώνα είχε αναγνωρισθεί η κληρονομική φύση της νόσου [2], ενώ στις δεκαετίες του 1970 και 1980 η αιμοχρωμάτωση αναγνωρίστηκε ως μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος η οποία συνδεόταν με βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 [3, 4]. Το 1996 αποτελεί χρονολογία σταθμό στην ιστορία της αιμοχρωμάτωσης καθώς αναγνωρίστηκε το γονίδιο της κλασσικής αιμοχρωμάτωσης, το HFE. Βρέθηκε, τότε, ότι η πλειονότητα των ασθενών ήταν ομοζυγώτες για μια σημειακή μετάλλαξη (C282Y) στο εν λόγω γονίδιο [5].

Μετά την αναγνώριση του HFE γονιδίου διαπιστώθηκε ότι μια μειονότητα ασθενών με κληρονομική αιμοχρωμάτωση, ιδίως στη Νότια Ευρώπη, δεν έφεραν παθογενετικές μεταλλάξεις του HFE [6-8]. Χρησιμοποιήθηκε τότε ο όρος της 'μη σχετιζόμενης με το HFE αιμοχρωμάτωσης' (non-HFE hemochromatosis) για να περιγράψει εκείνες τις περιπτώσεις της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης στις οποίες δεν ανευρίσκονταν παθογενετικές μεταλλάξεις του κλασσικού γονιδίου της αιμοχρωμάτωσης. Στα χρόνια που ακολούθησαν, η κατανόηση της γενετικής της αιμοχρωμάτωσης και του μεταβολισμού του σιδήρου προόδευσε σημαντικά καθώς ανευρέθησαν νέα γονίδια τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό του σιδήρου, μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν επίσης σε σύνδρομα υπερφόρτωσης σιδήρου. Μια από τις πρωτοπαθείς αυτές διαταραχές υπερφόρτωσης σιδήρου (η οφειλόμενη σε μεταλλάξεις του γονιδίου της φερροπορτίνης) εμφανίζει διαφορετικά παθογενετικά, επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά από εκείνα της κλασσικής, σχετιζόμενης με το HFE αιμοχρωμάτωσης. Οι υπόλοιπες ωστόσο πρωτοπαθείς διαταραχές

υπερφόρτωσης του σιδήρου, μοιράζονται κοινά παθογενετικά, κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά με την κλασική αιμοχρωμάτωση, και μπορούν επομένως να θωρηθούν διαφορετικές μορφές του ίδιου κλινικο-παθολογοανατομικού συνδρόμου[9].

Το πρώτο γονίδιο, μεταλλάξεις του οποίου αναγνωρίστηκαν σε ασθενείς με non-HFE αιμοχρωμάτωση είναι εκείνο του Tfr2, ενός δευτέρου υποδοχέα της τρανσφερίνης, ο οποίος ανακαλύφθηκε πριν από μια δεκαετία [10]. Μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου έχουν παρατηρηθεί κυρίως σε πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης και της Ιαπωνίας, είναι δε υπεύθυνες για την τύπου 3 κληρονομική αιμοχρωμάτωση, σύμφωνα με τη σύγχρονη διεθνή ταξινόμηση [11]. Ο συγκεκριμένος τύπος αιμοχρωμάτωσης και το σχετιζόμενο με αυτή γονίδιο θα αποτελέσουν το κύριο αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας τόσο στο θεωρητικό όσο και στο πειραματικό της τμήμα.

Η διαπίστωση της κλινικής και γενετικής ετερογένειας της αιμοχρωμάτωσης διεύρυνε σημαντικά τον ιστορικό ορισμό της αιμοχρωμάτωσης, ενώ συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση του μεταβολισμού του σιδήρου. Ταυτόχρονα, η ανάπτυξη σύγχρονων μοριακών τεχνικών επιτρέπει την πρώιμη, προσυμπτωματική και ακριβή διάγνωση των διαταραχών αυτών, καθιστώντας την αιμοχρωμάτωση μια νόσο πρότυπο μοριακής ιατρικής.

A.2. Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ

Δεν υπάρχουν σημαντικοί φυσιολογικοί μηχανισμοί ρύθμισης της απώλειας του σιδήρου. Ως εκ τούτου, η ομοιόσταση του σιδήρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εντερική απορρόφηση του σιδήρου. Αρκετοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν το ρυθμό της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου: οι αποθήκες σιδήρου του οργανισμού, η ερυθροποιητική δραστηριότητα του μυελού, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης του αίματος, το περιεχόμενο του αίματος σε οξυγόνο, και η παρουσία ή απουσία φλεγμονωδών κυτταροκινών [12]. Πολλοί από τους παράγοντες αυτούς μπορεί να δρουν ταυτόχρονα και να αλληλοσχετίζονται. Η εντερική απορρόφηση του

σιδήρου αυξάνεται όταν οι αποθήκες του σιδήρου είναι ελαττωμένες, υπάρχει αυξημένη ερυθροποιητική δραστηριότητα στο μυελό, χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και οξυγόνου στο αίμα. Αντίθετα, η απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο είναι ελαττωμένη όταν υπάρχει φλεγμονή- γεγονός που συμβάλλει στην αναιμία της χρονίας νόσου.

Το σύνολο σχεδόν της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου γίνεται στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Πρόκειται για μια πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την αναγωγή του σιδήρου σε δισθενή μορφή, την απορρόφηση από την κορυφαία επιφάνεια του εντεροκυττάρου, την ενδοκυττάρια αποθήκευση ή μεταφορά, και την απελευθέρωση από την πλαγιοβασική επιφάνεια του κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωρισθεί μια σειρά μορίων που συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές. Η αναγωγή του σιδήρου λαμβάνει χώρα στην ψηκτροειδή παρυφή του εντεροκυττάρου διά της δωδεκαδακτυλικής αναγωγάσης του σιδήρου (Dcytb) [13]. Ο αναχθείς σίδηρος απορροφάται εν συνεχεία στην κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου από το μεταφορέα δισθενούς μετάλλου (DMT1). Ο σίδηρος που έχει μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί είτε να αποθηκευθεί ενδοκυτταρίως στη φερριτίνη, είτε να μεταφερθεί στο πλάσμα δια της πλαγιοβασικής μεμβράνης επιφάνειας του κυττάρου. Η μεταφορά αυτή γίνεται διά του μεταφορέα της πλαγιοβασικής μεμβράνης του κυττάρου, της *φερροπορτίνης*, με τη βοήθεια της *hephaestin*, μιας πρωτεΐνης ομολόγου της σεουλοπλασμίνης με δραστηριότητα οξειδάσης του σιδήρου [14].

Η έκφραση των γονιδίων των ανωτέρω πρωτεϊνών υπόκειται σε ρύθμιση, και ως εκ τούτου μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων αυτών έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά καταστάσεων. Στη σιδηροπενική αναιμία, για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των δωδεκαδακτυλικών DMT1, της Dcytb και της φερροπορτίνης.

Ο σίδηρος που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία συνδέεται με την τρανσφερρίνη, με την οποία μεταφέρεται στις θέσεις χρήσης και αποθήκευσής του. Η μεγαλύτερη ποσότητα του σιδήρου χρησιμοποιείται από τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς

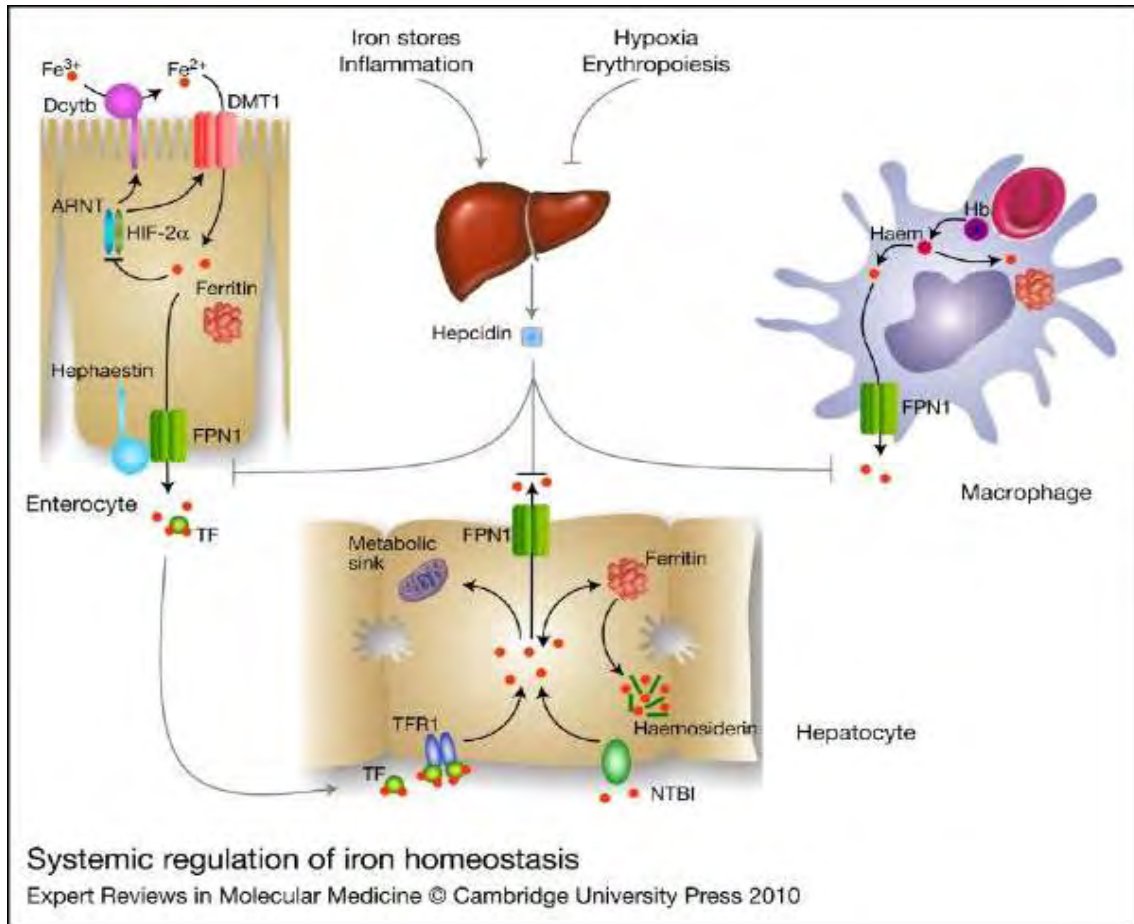
σειράς για την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης. Η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων τρανσφερρίνης 1 (TFR1) από τα κύτταρα αυτά, εξασφαλίζει την αυξημένη πρόσληψη του σιδήρου από το συγκεκριμένο διαμέρισμα. Ο σίδηρος της αιμοσφαιρίνης υφίσταται σημαντική ανακύκλωση καθώς τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Η έξοδος του σιδήρου από τα μακροφάγα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της φερροπορτίνης, του ίδιου δηλαδή μεταφορέα που εκφράζεται και στο εντεροκύτταρο του 12δακτύλου.

Τα ηπατοκύτταρα αποτελούν την κύρια αποθήκη σιδήρου του οργανισμού, προσλαμβάνοντας σίδηρο από το πυλαίο σύστημα, απελευθερώνοντας σίδηρο σε περιόδους αυξημένων αναγκών, επίσης δια της φερροπορτίνης. Η απελευθέρωση επομένως σιδήρου δια της φερροπορτίνης από το εντεροκύτταρο, το μακροφάγο του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, και το ηπατοκύτταρο αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα ομοιόστασης του σιδήρου.

Η λειτουργική δραστηριότητα της φερροπορτίνης και κατ' επέκταση ο μεταβολισμός του σιδήρου καθορίζεται από τη επισιδίνη, ένα πεπτίδιο 25 αμινοξέων, το οποίο αν και αρχικά αναγνωρίσθηκε για την αντιμικροβιακή του δράση αποδείχθηκε τελικά ότι αποτελεί τη βασική ορμόνη ρύθμισης του σιδήρου [15]. Η επισιδίνη, ελαττώνει τη λειτουργική δραστηριότητα της φερροπορτίνης, συνδεδεμένη άμεσα μαζί της, γεγονός το οποίο προκαλεί την ενδοκυττάρωση και την αποδόμηση του εν λόγω μεταφορέα[16]. Η μεταβολή οδηγεί σε ελάττωση της μεταφοράς του σιδήρου από την πλαγιοβασική μεμβράνη του εντεροκυττάρου και επομένως της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου. Αντίστοιχα η επισιδίνη θα οδηγήσει σε ελάττωση της απελευθέρωσης σιδήρου από το μακροφάγο του ΔΕΣ και το ηπατοκύτταρο και σε αύξηση με αυτό τον τρόπο των αποθηκών του σιδήρου.

Το σύνολο των παραγόντων που -όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- ρυθμίζουν την εντερική απορρόφηση (αποθήκες σιδήρου, ερυθροποιητική δραστηριότητα, επίπεδα αιμοσφαιρίνης και οξυγόνου στο αίμα, φλεγμονή) ρυθμίζουν και την έκφραση της επισιδίνης από το ήπαρ. Σε μοριακό επίπεδο, η αντίληψη των αποθεμάτων σιδήρου του οργανισμού φαίνεται να μεσολαβείται από σύμπλεγμα πρωτεϊνών της κυτταρικής

μεμβράνης που περιλαμβάνει τους υποδοχείς τρανσφερίνης TFR1 & TFR2, (όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια-) τις πρωτεΐνες HFE, HJV (hemojuvelin) και BMP6.



Εικόνα 1. Η συστηματική ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου [17].
Συντομογραφίες: ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; DMT1, divalent-metal-ion transporter 1; FPN1, ferroportin; Hb, haemoglobin; HIF-2α, hypoxia-inducible factor 2α; NTBI, non-transferrin-bound iron; TF, transferrin; TFR1, transferrin receptor 1

Το ανωτέρω ωστόσο σχήμα ρύθμισης του μεταβολισμού του σιδήρου με το σύστημα επιιδίνης- φερροπορτίνης αποτελεί μια απλοποίηση του πραγματικού συστήματος ρύθμισης. Η φερροπορτίνη δεν ελέγχεται μόνο από τις συστηματικές ανάγκες σε σίδηρο μέσω της επιιδίνης, αλλά και από τις ανάγκες σιδήρου των ίδιων των κυττάρων στα οποία εκφράζεται. Το τελευταίο είναι σημαντικό καθώς η υπερβολική έξοδος σιδήρου από τα κύτταρα αυτά συνεπεία αυξημένης συστηματικής ζήτησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε σημαντική ελάττωση του ενδοκυττάριου σιδήρου με σοβαρές συνέπειες για τη λειτουργία του κυττάρων. Το mRNA της φερροπορτίνης

περιλαμβάνει στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή ένα IRE (iron regulatory element) το οποίο συνδέεται με IRPs (iron regulatory proteins) όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου είναι χαμηλά. Η αλληλεπίδραση αυτή εμποδίζει τη μετάφραση του mRNA, τη σύνθεση φερροπορτίνης και την έξοδο επομένως σιδήρου από τα κύτταρα. Αντιθέτως, ο DMT1 ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη πρόσληψη σιδήρου από τα εντεροκύτταρα αυξάνεται σε συνθήκες ενδοκυττάριας αποστέρησης σιδήρου, καθώς το mRNA περιέχει ένα IRE στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή στο οποίο συνδέονται οι IRPs σταθεροποιώντας το μόριο. Η σημασία της αλληλεπίδρασης IRE-IRP στη ρύθμιση των κυτταρικών και συστηματικών αναγκών σιδήρου αποδείχθηκε με πρόσφατα πειράματα σε ποντίκια, τα εντεροκύτταρα των οποίων δεν εξέφραζαν IRPs [18]. Τα ποντίκια αυτά ανέπτυξαν σύνδρομο εντερικής δυσαπορρόφησης και πέθαναν την 4^η εβδομάδα ζωής, εμφανίζοντας χαμηλά επίπεδα DMT1 και αύξηση των επιπέδων φερροπορτίνης [19].

A.3 ΟΙ ΤΥΠΟΙ ΤΗΣ ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΣΗΣ

Τα γενετικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 4 τύπων κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης φαίνονται στον πίνακα 1.

Ο συχνότερος τύπος αιμοχρωμάτωσης είναι η κλασσική ή τύπου I αιμοχρωμάτωση, η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις του *HFE* γονιδίου στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων της κλασσικής αιμοχρωμάτωσης, ανευρίσκεται σε ομοζυγωτία μια μόνο σημειακή μετάλλαξη στο εν λόγω γονίδιο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της κυστεΐνης στη θέση 282 της πρωτεΐνης HFE από μια τυροσίνη (C282Y) [5]. Η μετάλλαξη C282Y φαίνεται να προέρχεται από την τυχαία μετάλλαξη σε ένα μόνο Κέλτη πρόγονο στη Βόρειο-Δυτική Ευρώπη πριν από 2000 χρόνια. Το γενετικό αυτό έλλειμμα, δε φαίνεται να προκάλεσε σημαντικά εμπόδια στην αναπαραγωγή των φορέων. Αντιθέτως, ενδεχομένως παρείχε ορισμένα πλεονεκτήματα (π.χ. αντοχή στη διαιτητική ανεπάρκεια σιδήρου, ανθεκτικότητα σε ορισμένες λοιμώξεις), γεγονός που επέτρεψε τη διατήρηση της μετάλλαξης από γενιά σε γενιά και την εξάπλωσή της με

τη μετανάστευση του πληθυσμού. Λόγω του φαινομένου του ιδρυτή, η συχνότητα του ομοζύγου γονοτύπου C282Y είναι ιδιαίτερα υψηλή στη βόρεια Ευρώπη (1/300-1/400), ενώ η συχνότητα ελαττώνεται με τη μετακίνηση σε νοτιότερες περιοχές της Ευρώπης [20] (εικόνα 2). Ως προς τη φυλετική κατανομή, μια πρόσφατη πολυεθνική μελέτη ανέδειξε ότι η εν λόγω μετάλλαξη είναι συχνή στη λευκή φυλή, και εξαιρετικά σπάνια σε άτομα των υπολοίπων φυλών.

Στον ελληνικό πληθυσμό, η συχνότητα της κλασικής μετάλλαξης του HFE γονιδίου είναι εξαιρετικά χαμηλή, συνεπεία της 'μη κέλτικης' καταγωγής του πληθυσμού [20]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πρόσφατη μελέτη η συχνότητα της παθογενετικής μετάλλαξης C282Y του HFE γονιδίου στον πληθυσμό μιας περιφέρειας της Ελλάδος ήταν μηδενική [21].



Εικόνα 2. Συχνότητα των C282Y αλληλομόρφων στην Ευρώπη. Συχνότητα (%) των χρωμοσωμάτων που φέρουν τη μετάλλαξη C282Y σε περιοχές της Ευρώπης. Στοιχεία των Merryweather-Clarke [20]

Μια δεύτερη μετάλλαξη του HFE γονιδίου χαρακτηρίζεται από την αντικατάσταση της ιστιδίνης (H) από ασπαρτικό οξύ (D) στη θέση 63 της πρωτεΐνης (H63D). Σε ζωικά μοντέλα η εν λόγω μετάλλαξη παρέχει ένα μέτριο κίνδυνο υπερφόρτωσης με σίδηρο. Στους ανθρώπους η μετάλλαξη αυτή φαίνεται να αποτελεί μια συχνή πολυμορφική αλλαγή σε όλες τις εθνικές ομάδες, η συμβολή της ωστόσο στη κλινική νόσο είναι αμελητέα με εξαίρεση την περίπτωση σύνθετης ετεροζυγωτίας (C282Y/ H63D).

Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι αν και οι ομοζυγώτες για τη C282Y μετάλλαξη έχουν τη γενετική προδιάθεση της συσσώρευσης σιδήρου και της επακόλουθης ιστικής βλάβης, είναι αδύνατο να προβλεφθεί το αν και πότε θα εκφρασθεί φαινοτυπικά η μετάλλαξη. Η φυσική ιστορία της νόσου είναι μια πολυποίκιλη και πολυσταδιακή διαδικασία η οποία εξαρτάται από μια σειρά μεταβλητών. Ένα μικρό μάλιστα ποσοστό των ομοζυγωτών δε θα εμφανίσουν ποτέ κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα υπερφόρτωσης σιδήρου. Στις περισσότερες ωστόσο περιπτώσεις, η νόσος εκδηλώνεται κλινικά στη μέση ηλικία, αρχικά με μη ειδικά συμπτώματα όπως αδυναμία, εύκολη κόπωση και αρθραλγίες. Η ηπατική συμμετοχή (η οποία μπορεί να ποικίλει από ήπια αύξηση των τρανσαμινασών μέχρι ανάπτυξη κίρρωσης ή και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος) συνήθως προεξάρχει, χωρίς ωστόσο να σπανίζουν οι ενδοκρινικές διαταραχές (σακχαρώδης διαβήτης, υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός), η καρδιακή συμμετοχή (αρρυθμίες ή καρδιακή ανεπάρκεια) και η καταστροφική προσβολή των αρθρώσεων. Παρά τη διαταραχή του μεταβολισμού του σιδήρου, στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν παρατηρείται διαταραχή της αιματολογικής εικόνας των ασθενών. Οι θεραπευτικές αφαιμάξεις στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για τη μείωση του φορτίου του σιδήρου στο πλάσμα και τους ιστούς, χωρίς κίνδυνο εμφάνισης αναιμίας ακόμα και σε περιπτώσεις εντατικών αφαιμάξεων.[22]

Σε σχέση με την ηλικία και τη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων εκδηλώσεων, οι τύποι 2 και 3 της αιμοχρωμάτωσης μοιράζονται κοινά ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Η τύπου 2 αιμοχρωμάτωση αφορά στο νεανικό τύπο της αιμοχρωμάτωσης ο οποίος οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της hemojuvelin (τύπος 2A) και της επιιδίνης (τύπος 2B). Οι νεανικοί αυτοί τύποι της αιμοχρωμάτωσης χαρακτηρίζονται από ταχύτατη συσσώρευση σιδήρου η οποία παρατηρείται και στα δύο φύλα και οδηγεί σε εμφάνιση σοβαρών κλινικών εκδηλώσεων σε νεαρά ηλικία (μικρότερη των 30 ετών). Η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται από την αυξημένη συχνότητα υπογοναδισμού και μυοκαρδιοπάθειας. Η τύπου 3 αιμοχρωμάτωση, η οποία θα συζητηθεί αναλυτικά στη συνέχεια, είναι μια

αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου του TFR2, και φαινοτυπικά αποτελεί ένα ενδιάμεσο τύπο μεταξύ της κλασσικής και της νεανικής αιμοχρωμάτωσης.

Η τύπου 4 αιμοχρωμάτωση, τέλος, είναι μια αυτοσωμική επικρατής διαταραχή η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου της φερροπορτίνης 1. Διακρίνεται βάσει των συνεπειών των μεταλλάξεων στη λειτουργία της φερροπορτίνης σε δυο τύπους: τον τύπο 4α για τον οποίο από πολλούς συγγραφείς προτείνεται ο όρος νόσος της φερροπορτίνης καθώς εμφανίζει διακριτά γενετικά, ιστολογικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, από τους υπολοίπους τύπου αιμοχρωμάτωσης. Και τον τύπο 4β ο οποίος εμφανίζει την τυπική κλινική, εργαστηριακή και ιστολογική εικόνα της κλασσικής αιμοχρωμάτωσης [23].

Πίνακας 1. Γενετικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων αιμοχρωμάτωσης

Τύπος ΗΗ	Γονίδιο	Κληρονομικότητα	Κλινικά χαρακτηριστικά	Εργαστηριακά Ευρήματα	Βιοψία ήπατος	Λειτουργικές συνέπειες των μεταλλάξεων
1	HFE	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Μπορεί να περιλαμβάνει: κόπωση, αδυναμία, αρθροπάθεια, υπέρχρωση του δέρματος, χρόνια ηπατοπάθεια, σακχαρώδη διαβήτη, υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και άλλες ενδοκρινικές διαταραχές,	↑SF ↑TS	Υπερφόρτωση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα, ίνωση, κίρρωση	Διαταραχή της ρύθμισης της επισιδίνης από το σίδηρο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το έντερο και την απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα του ΔΕΣ
2A	Hemojuvelin (HJV)	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Παρόμοια με την κλασική αιμοχρωμάτωση-πρωιμότερη ωστόσο έναρξη (<30χρόνια), ενώ προεξάρχουν μυοκαρδιοπάθεια και υπογοναδισμός	↑SF ↑TS	Υπερφόρτωση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα, ίνωση, κίρρωση	Απώλεια της ρύθμισης της επισιδίνης η οποία οδηγεί σε αυξημένη εντερική απορρόφηση σιδήρου και απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα του ΔΕΣ
2B	Επισιδίνη (HAMP)	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Παρόμοια με την κλασική αιμοχρωμάτωση-πρωιμότερη ωστόσο έναρξη (<30χρόνια), ενώ προεξάρχουν μυοκαρδιοπάθεια και υπογοναδισμός	↑SF ↑TS	Υπερφόρτωση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα, ίνωση, κίρρωση	Απώλεια έκφρασης ή παραγωγή μη λειτουργικής επισιδίνης η οποία οδηγεί σε αυξημένη εντερική απορρόφηση σιδήρου και απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα του ΔΕΣ
3	Υποδοχέας τρανσφερίνης s2 (TFR2)	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Παρόμοια με την κλασική αιμοχρωμάτωση	↑SF ↑TS	Υπερφόρτωση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα, ίνωση, κίρρωση	Διαταραχή της ρύθμισης της επισιδίνης από το σίδηρο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το έντερο και την απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα του ΔΕΣ
4	Ferroportin (Fpn)	Αυτοσωμική επικρατής	Τυπική εικόνα: παρόμοια με την κλασική αιμοχρωμάτωση-ωστόσο συχνά συνυπάρχει μέτρια αναιμία & μικρότερη ανοχή στις αφαιμάξεις Άτυπη εικόνα: παρόμοια με την κλασική αιμοχρωμάτωση	↑SF normal TS ↑SF ↑TS	Υπερφόρτωση σιδήρου στα κύτταρα Kupffer-ίνωση Υπερφόρτωση σιδήρου στα ηπατοκύτταρα, ίνωση, κίρρωση	Διαταραχή της μεταφοράς σιδήρου από τη φερροπορτίνη, η οποία οδηγεί σε συσσώρευση σιδήρου στα κύτταρα του ΔΕΣ Διαταραχή της ρύθμισης της δραστηριότητας της φερροπορτίνης από τη επισιδίνη η οποία οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το έντερο και την απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα του ΔΕΣ

TS: κορεσμός τρανσφερίνης, **SF:** κορεσμός τρανσφερίνης

A.4 Η ΤΥΠΟΥ 3 ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΣΗ ΚΑΙ Ο TFR2

Η τύπου 3 αιμοχρωμάτωση αποτέλεσε το πρώτο μη σχετιζόμενο με το HFE σύνδρομο κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης, το οποίο αναγνωρίστηκε πριν από μια δεκαετία. Αρχικά περιγράφηκε σε 6 μέλη δυο οικογενειών από τη Σικελία, τα οποία εμφάνιζαν εικόνα υπερφόρτωσης σιδήρου παρόμοια με εκείνη της κλασσικής κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης. Διαπιστώθηκε ότι η διαταραχή συνδεόταν με μια περιοχή στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 (7q22), τα δε προσβεβλημένα άτομα ήταν ομόζυγα για μια μη νοηματική μετάλλαξη (Y250X) του Tfr2 [24].

Στα χρόνια που ακολούθησαν και παρά τη σπανιότητα του συνδρόμου, έχουν περιγραφεί αρκετές νέες περιπτώσεις κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης που οφείλονται σε μεταλλάξεις του TFR2 γονιδίου (κυρίως σε πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης και της Ιαπωνίας), διευκολύνοντας, εκτός των άλλων, τη φαινοτυπική σύγκριση του συνδρόμου με τους άλλους τύπους αιμοχρωμάτωσης. Παράλληλα, μοριακές και κυτταρικές μελέτες των τελευταίων χρόνων έριξαν φως στη δομή και στη λειτουργία του δεύτερου υποδοχέα της τρανσφερίνης, αναδεικνύοντας το ρόλο του τόσο στο μεταβολισμό του σιδήρου όσο και στην παθογένεια της αιμοχρωμάτωσης.

A.4.1 ΤΥΠΟΥ 3 ΑΙΜΟΧΡΩΜΑΤΩΣΗ: Ο ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

Η τύπου III αιμοχρωμάτωση είναι μια διαταραχή φαινοτυπικά παρόμοια με την κλασσική (HFE) αιμοχρωμάτωση καθώς, σε γενικές γραμμές, οι κλινικές επιπλοκές, το πρότυπο της συσσώρευσης σιδήρου στο ήπαρ και η ανταπόκριση στη φλεβοτομή δε διαφέρουν στα δυο σύνδρομα.

Η φαινοτυπική σύγκριση της TFR2 αιμοχρωμάτωσης με τους υπολοίπους τύπους αιμοχρωμάτωσης είναι δυσχερής, καθώς οι ασθενείς με τύπου III αιμοχρωμάτωση είναι λίγοι, διαφέρουν ως προς το φύλο, την ηλικία έναρξης της νόσου και τις κλινικές επιπλοκές. Από τη φαινοτυπική σύγκριση ωστόσο μικρών ομάδων ασθενών συνάγεται ότι πρόκειται για ένα τύπο αιμοχρωμάτωσης που εμφανίζεται σε άτομα της λευκής φυλής και σε Ιάπωνες, ο φαινότυπος του οποίου εμφανίζει ενδιάμεση βαρύτητα μεταξύ νεανικής και

κλασσικής αιμοχρωμάτωσης. Η υπερφόρτωση σιδήρου εμφανίζεται σε μικρή ηλικία (2^η ή 3^η δεκαετία της ζωής, ενώ έχει αναφερθεί και μια περίπτωση παιδιού 3,5 ετών με υπερφόρτωση σιδήρου [25], γεγονός που ομοιάζει με τη νεανική αιμοχρωμάτωση, με βραδύτερη ωστόσο εξέλιξη της νόσου. Ένα από τα χαρακτηριστικά της νόσου είναι ο σταθερά αυξημένος κορεσμός τρανσφερίνης ακόμα και μετά την έναρξη φλεβοτομών [26].

A.4.2 ΤΟ ΜΟΡΙΟ & Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ TfR2

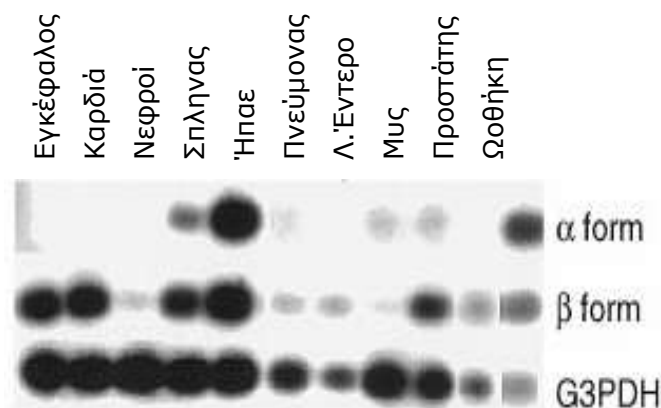
Ο TfR2 είναι μια τύπου 2 διαμεμβρανική πρωτεΐνη, ομόλογη με τον TfR1, τον πανταχού εκφραζόμενο υποδοχέα της τρανσφερίνης που μεταφέρει σίδηρο στα κύτταρα. Οι δυο πρωτεΐνες είναι 45% πανομοιότυπες και 66% παρόμοιες στους εξωκυττάριους τομείς τους.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι δυο υποδοχείς εμφανίζουν παρόμοιες μοριακές ιδιότητες. Έτσι, και οι δυο υποδοχείς συνδέονται στην κυτταρική επιφάνεια με την τρανσφερίνη, και μπορούν να μεσολαβήσουν στην πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα [10]. Επιπλέον, η σύνδεση της τρανσφερίνης στους δυο υποδοχείς εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος: η ολοτρανσφερίνη συνδέεται στους υποδοχείς αυτούς σε ουδέτερο pH, ενώ η αποτρανσφερίνη συνδέεται σε όξινο pH. Τέλος, και οι δυο υποδοχείς μπορούν να υποστηρίξουν, εφόσον εκφραστούν, την ανάπτυξη των TfR1 ανεπαρκών κυττάρων. [27].

Υπάρχουν ωστόσο διαφορές στην κατανομή, την ενεργότητα και τη ρύθμιση των δυο υποδοχέων τρανσφερίνης, όπως και στην παθοφυσιολογία των διαταραχών που προκαλούνται από την ανεπάρκειά τους, γεγονός που υποδηλώνει τους διαφορετικούς ρόλους των δυο πρωτεϊνών στη ομοιόσταση του σιδήρου.

Πρώτα απ' όλα, η ιστική κατανομή των δυο υποδοχέων είναι διαφορετική. Ο TfR1 εκφράζεται στο σύνολο σχεδόν των ιστών του οργανισμού, η έκφρασή του ωστόσο στο ήπαρ είναι ιδιαίτερα χαμηλή [28]. Αντιθέτως, ο TfR2 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ (Εικόνα 3). Επίσης, όπως έχουν δείξει μελέτες σε πειραματόζωα, η έκφραση του

TfR1 υποδοχέα στο ήπαρ κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μειώνεται σταδιακά, ενώ η έκφραση του δεύτερου υποδοχέα της τρανσφερίνης ακολουθεί αντίθετη πορεία [29, 30].



Εικόνα 3. Έκφραση των υποδοχέων τρανσφερίνης σε ποικίλους ιστούς ποντικού. Northern blot ανάλυση ιστών από C3H ποντικούς[24].

Ως προς τη λειτουργία του TfR2 ως υποδοχέα τρανσφερίνης, η συγγένεια της εν λόγω πρωτεΐνης για τη δισιδηρική τρανσφερίνη είναι 25 φορές χαμηλότερη από εκείνη του TfR1 [27, 31, 32]. Επιπρόσθετα, αρχικά πειράματα είχαν δείξει ότι η διαλυτή μορφή του TfR2, σε αντίθεση με τον TfR1, δεν αλληλεπιδρά *in vitro* με την πρωτεΐνη HFE [32]. Νεότερες ωστόσο μελέτες ανέδειξαν ότι ο εκφραζόμενος στα κύτταρα TfR2 όχι μόνο αλληλεπιδρά με την HFE αλλά και ανταγωνίζεται με τον TfR1 στη σύνδεση αυτή. Ο ανταγωνισμός αυτός, όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια, συμμετέχει στο σύστημα 'αίσθησης' του σιδήρου του οργανισμού και στη ρύθμιση της έκφρασης της hepcidin [33]. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο υποδοχέων υπάρχουν και στη ρύθμιση της έκφρασης των δυο πρωτεϊνών. Η έκφραση του mRNA του TfR1 σχετίζεται αντίστροφα με τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου [34-38], καθώς τα μεταγγραφα του TfR1 περιλαμβάνουν στις 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές IREs [39-42]. Αντιθέτως, η έκφραση του m-RNA δε φαίνεται να επηρεάζεται από μεταβολές του ενδοκυττάριου σιδήρου, γεγονός που είναι συνεπές με την απουσία IREs από το m-RNA του TfR2.

Υπάρχουν, τέλος, σημαντικές διαφορές ως προς τις συνέπειες της ανεπάρκειας του κάθε υποδοχέα στην επιβίωση και την ανάπτυξη του οργανισμού. Η παρουσία του TfR2 δεν

μπορεί να αναπληρώσει την απώλεια του Tfr1 σε Tfr1 knockout ποντίκια, καθώς αυτά πεθαίνουν τη 12^η ημέρα της ενδομήτριου ζωής. Αντιθέτως, μεταλλάξεις του Tfr2 προκαλούν αιμοχρωμάτωση τύπου 3 σε ανθρώπους και ποντίκια.

Βάσει των παραπάνω, η αρχική υπόθεση ότι ο Tfr2 είναι ένας δευτερος υποδοχέας της τρανσφερίνης με όμοια λειτουργία με τον Tfr1 φαίνεται να μην ισχύει. Ποιος είναι επομένως ο ρόλος του δευτέρου υποδοχέα της τρανσφερίνης;

Μελέτες των τελευταίων χρόνων ανέδειξαν ότι ο Tfr2 συμμετέχει σε ένα σύστημα 'αίσθησης' των επιπέδων σιδήρου της κυκλοφορίας και 'ρύθμισης' της έκφρασης της επιιδίνης, σύστημα στο οποίο επίσης συμμετέχουν ο Tfr1, η πρωτεΐνη HFE και το σύμπλεγμα υποδοχέα BMP. Ο ρόλος κάθε μορίου του συστήματος πρόσφατα προσδιορίστηκε.

A.4.2.1. Η ρύθμιση της επιιδίνης: ενώνοντας τα κομμάτια του puzzle

Τα τελευταία χρόνια ανεδείχθη ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs στη ρύθμιση της επιιδίνης. Οι BMPs ανήκουν στην υπεροικογένεια του TGFβ και (όπως και οι λοιποί συνδέτες της υπεροικογένειας) ενεργοποιούν ενδοκυττάρια μονοπάτια συνδεδεμένες με υποδοχείς κινασών σερίνης/ θρεονίνης. Το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα του υποδοχέα στη συνέχεια φωσφορυλιώνει ενδοκυττάρια πρωτεΐνες Smad οι οποίες ακολούθως μεταναστεύουν στον πυρήνα του κυττάρου και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση[43].

Μελέτες των τελευταίων χρόνων απέδειξαν ότι η ενεργοποίηση του συμπλέγματος BMPR οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της hepcidin και σε ελάττωση των επιπέδων σιδήρου [44, 45], ενώ αντιστρόφως, η διακοπή της BMP σηματοδότησης (με αποσιώπηση είτε του ενδοκυττάρου μεσολαβητή Smad4, είτε του συνυποδοχέα του BMPR hemojuvelin) οδηγεί σε σημαντική ελάττωση των επιπέδων της επιιδίνης και σε υπερφόρτωση σιδήρου [45, 46]. Στα ίδια πειράματα διαπιστώθηκε επίσης ο ρόλος της hemojuvelin (HJV), ενός μορίου που ανήκει στην οικογένεια των Repulsive Guidance Molecules (RGMs), μεταλλάξεις της οποίας προκαλούν βαρύτατο σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου

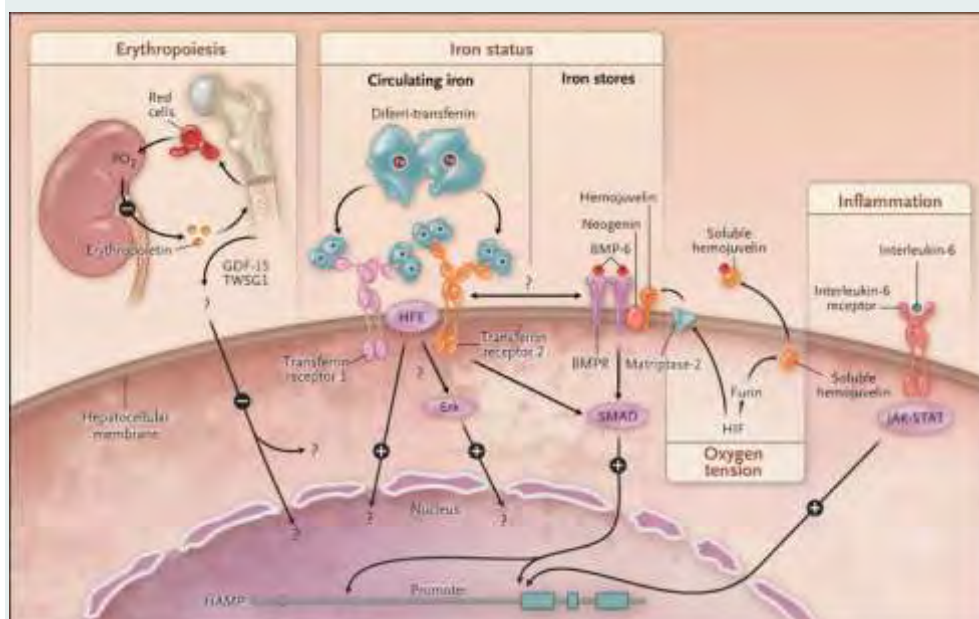
(αιμοχρωμάτωση τύπου IIa). Οι Babitt et al. απέδειξαν ότι η HJV συνδέεται με τους συνδέτες BMPs και δρα ως συν-υποδοχέας του σηματοδοτικού μονοπατιού του BMPR [45]. Από το σύνολο δε των συνδετών BMPs, πρόσφατα πειράματα ανέδειξαν τη BMP-6 ως το κύριο μόριο με το οποίο συνδέεται η HJV αποτελώντας το βασικό ενδογενή ρυθμιστή της έκφρασης της επισιδίνης και της ομοιόστασης του σιδήρου [47].

Το μονοπάτι του συμπλέγματος BMPR/HJV, με κύριο συνδέτη την BMP6 αποτελεί επομένως το σηματοδοτικό μονοπάτι που ρυθμίζει την έκφραση της επισιδίνης. Με ποιον όμως τρόπο αντιλαμβάνεται τα επίπεδα του σιδήρου στον οργανισμό, καθορίζοντας το βαθμό ενεργότητάς του και επομένως την έκφραση της επισιδίνης;

Οι δυο υποδοχείς τρανσφερίνης, καθώς συνδεόνται με την ολοτρανσφερίνη, αποτελούν τα καταλληλότερα μόρια-‘αισθητήρες’ των επιπέδων σιδήρου της κυκλοφορίας. Καθώς όμως η συγγένεια και των δυο υποδοχέων για την ολοτρανσφερίνη είναι πολύ υψηλή (της τάξεως των nM) η ανίχνευση μεταβολών στη συγκέντρωση της ολοτρανσφερίνης (τάξεως mM) με τους συμβατικούς μηχανισμούς του κορεσμού των υποδοχέων δεν είναι δυνατή. Η αλληλεπίδραση ωστόσο της HFE πρωτεΐνης με τους υποδοχείς τρανσφερίνης επιδρά στη λειτουργική τους συγγένεια με την ολοτρανσφερίνη, ο ανταγωνισμός δε των δυο υποδοχέων για την HFE πρωτεΐνη αποτελεί το βασικό μηχανισμό αντίληψης των επιπέδων σιδήρου και ρύθμισης της επισιδίνης.

Η σημασία της αλληλεπίδρασης του TfR1 και της HFE στη ρύθμιση του σιδήρου αποδείχθηκε σε μια πρόσφατη μελέτη σε ποντικούς όπου μεταλλάξεις του TfR1 ενίσχυαν ή αποδυνάμωναν την αλληλεπίδραση της HFE και του TfR1 [48]. Βρέθηκε ότι η μετάλλαξη του TfR1 που ενίσχυε την αλληλεπίδραση HFE-TfR1 οδηγούσε σε ελάττωση της έκφρασης επισιδίνης και υπερφόρτωση σιδήρου, ενώ η μετάλλαξη του υποδοχέα που αποδυνάμωνε αυτή την αλληλεπίδραση οδήγησε σε αυξημένη έκφραση επισιδίνης και σιδηροπενία. Αποδείχθηκε με αυτόν τον τρόπο ότι η HFE όταν αποδεσμεύεται από τον TfR1 αυξάνει τη σύνθεση επισιδίνης, αλληλεπιδρώντας πιθανότατα με το σύμπλεγμα του BMP υποδοχέα (εικόνα 5).

Ο TfR2 αλληλεπιδρά επίσης με τη HFE πρωτεΐνη [33, 49], σε αντίθεση ωστόσο με τον TfR1 δεν υπάρχει ανταγωνισμός στην αλληλεπίδραση αυτή από την ολοτρανσφερίνη. Αντιθέτως, τόσο η ολοτρανσφερίνη όσο και η HFE πρωτεΐνη σταθεροποιούν τον TfR2 [50, 51], ενώ πρόσφατα πειράματα αναδεικνύουν ότι τόσο ο ο TfR2 όσο και η HFE πρωτεΐνη αλληλεπιδρούν με τη hepcidin σχετίζοντας και αυτά τα μόρια με το σύμπλεγμα BMPR/BMP/HJV [19].

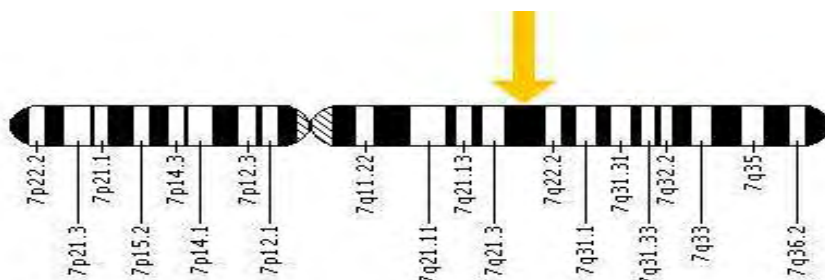


Εικόνα 5. Το μοντέλο ρύθμισης της επισιδίνης

Βάσει των ανωτέρω ευρημάτων ένα υποθετικό μοντέλο αντίληψης του σιδήρου και ρύθμισης της επισιδίνης είναι το ακόλουθο (**Εικόνα5**): Η σύνδεση της ολοτρανσφερίνης στους υποδοχείς τρανσφερίνης (TfR1 & TfR2) οδηγεί σε αποδέσμευση της HFE πρωτεΐνης από τον TfR1, και σε δέσμευσή της από το σταθεροποιημένο μόριο του TfR2. Ακολούθως, τόσο ο TfR2 όσο και η HFE σχετίζονται με το σύμπλεγμα υποδοχέα MP/BMP₆/HJV, γεγονός που οδηγεί σε ενεργοποίηση του υποδοχέα, φωσφορυλίωση του μορίου R-Smad, σύνδεση του τελευταίου με τη Smad4 και τελικά σε είσοδο των μορίων αυτών στον πυρήνα του κυττάρου όπου αυξάνουν την έκφραση της επισιδίνης. Στην εικόνα σημειώνονται και τα υπόλοιπα 3 μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της hepcidin: το άγνωστο μονοπάτι της ερυθροποίησης, το μονοπάτι της φλεγμονής μέσω Jak-STAT και εκείνου της υποξίας μέσω του HIF-1a. [52]

A.4.3. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ TFR2

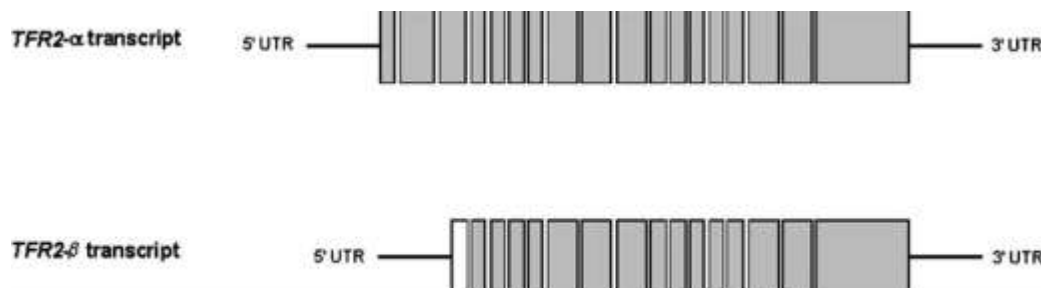
Το γονίδιο του TFR2 κλωνοποιήθηκε από τους Kawabata et al. πριν από μια δεκαετία [10]. Πρόκειται για ένα γονίδιο συνολικού μεγέθους 21kb, αποτελούμενο από 18 εξόνια, το οποίο εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 (7q22).



Εικόνα 6. Το χρωμόσωμα 7 και γενετικός τόπος του Tfr2

Καθώς υπάρχουν εναλλακτικοί τρόποι ματίσματος, διακρίνονται 2 διαφορετικά μετάγραφα του *TFR2* γονιδίου: το Tfr2a και το Tfr2b. Το μετάγραφο TFR2a περιλαμβάνει και τα 18 εξόνια του γονιδίου, σε αντίθεση με το δεύτερο μετάγραφο (TFR2b), η μεταγραφή του οποίου ξεκινά από μια εντός πλαισίου ανάγνωσης θέση (in frame) στο εξόνιο 4 και ως εκ τούτου στερείται των 3 πρώτων εξονίων του γονιδίου. Καθώς τα 3 πρώτα εξόνια κωδικοποιούν το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που περιλαμβάνει το ενδοκυττάριο, το ενδομεμβρανικό και τμήμα του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, είναι πιθανό το TFR2b να κωδικοποιεί μια διαλυτή, ενδοκυττάρια μορφή του TFR2 (Εικόνα 6).

Μεταξύ των δυο μεταγράφων φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές ως προς την ιστική κατανομή της έκφρασής τους. Ενώ η έκφραση του μεταγράφου Tfr2a, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ, το δεύτερο μετάγραφο του γονιδίου φαίνεται να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα [53]



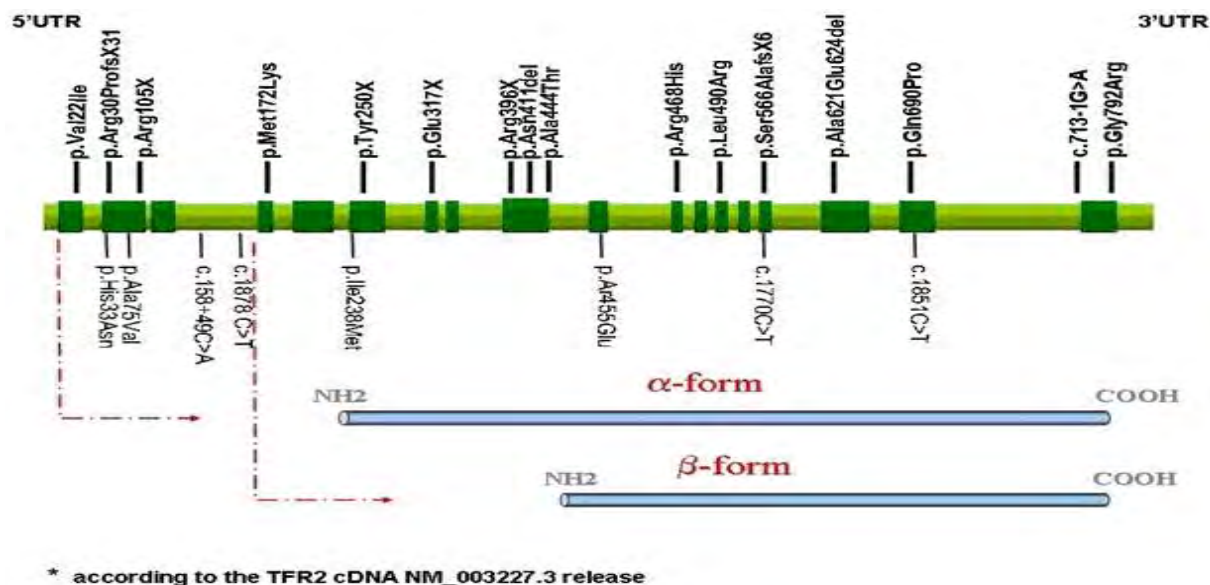
Εικόνα 7 . Τα δυο μετάγραφα του Tfr2.

Ενδιαφέρον, τέλος, παρουσιάζει η επίδραση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στο γονίδιο του *TfR2* και η συσχέτιση της επίδρασης αυτής με το πρότυπο ιστικής έκφρασης του υποδοχέα που έχει περιγραφεί. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας *C/EBPα*, προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του προαγωγέα του *TfR2* γονιδίου. Καθώς ο συγκεκριμένος παράγοντας αφθονεί στο ήπαρ, η επίδραση του στο γονίδιο του *TfR2* θα μπορούσε να συμβάλλει στην έκφραση του υποδοχέα από τα ηπατοκύτταρα. Επίσης, σε μελέτες της αλληλουχίας του *TfR2* γονιδίου σε ποντικούς (murine *TfR2*) βρέθηκε ότι στην περιοχή του εκκινητή, υπάρχουν 2 αλληλουχίες σύνδεσης του *GATA-1*, ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος εκφράζεται στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των ερυθροκυττάρων. Στην ίδια μελέτη ανευρίσκονται επίσης στην περιοχή του εκκινητή του *m-TfR2* γονιδίου πιθανές αλληλουχίες σύνδεσης (*CACCC*) για τον *EKLF*, έναν επίσης ειδικό μεταγραφικό παράγοντα για την ερυθρά σειρά. Η επίδραση των ειδικών αυτών μεταγραφικών παραγόντων της ερυθράς σειράς θα μπορούσε να εξηγήσει την έκφραση του *TFR2* στα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης της ερυθράς σειράς, η οποία εξασθενεί στα επόμενα στάδια διαφοροποίησης πιθανώς υπό την επίδραση ενός ακόμα μεταγραφικού παράγοντα της ερυθράς σειράς, του *FOG-1* [29].

A.4.5 ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ *TfR2* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Από την πρώτη περιγραφή στη βιβλιογραφία συνδρόμου υπερφόρτωσης σιδήρου οφειλόμενου σε μεταλλάξεις του *TfR2* γονιδίου [24], ένας ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός δημοσιεύσεων περιγράφει παθογενετικές μεταλλάξεις του *TfR2*. Συνολικά έχουν περιγραφεί 15 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου κυρίως σε οικογένειες της Νότιας Ευρώπης (ιδίως της Ιταλίας) και της Ιαπωνίας, οι περισσότερες εκ των οποίων είναι σπάνιες και μη πολυμορφικές.

Στην εικόνα 7 φαίνεται το σύνολο των παθογενετικών μεταλλάξεων του γονιδίου του *TfR2* που έχουν περιγραφεί, ενώ στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων αυτών και η σχετική βιβλιογραφία.



Εικόνα 8. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου του Tfr2.

Η συχνότερη μετάλλαξη του Tfr2 γονιδίου, η pY250X είναι και η πρώτη μετάλλαξη που περιγράφηκε. Η εν λόγω μετάλλαξη έχει περιγραφεί σε 4 διαφορετικές οικογένειες της Ιταλίας, οι οποίες ωστόσο ζούνε στην ίδια γεωγραφική περιοχή και θα μπορούσαν επομένως να εμφανίζουν κάποια μακρινή συγγένεια. Πρόκειται για μια σημειακή μετάλλαξη χαρακτηριζόμενη από αντικατάσταση μιας κυτοσίνης από γουανίνη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρώιμου κωδικονίου λήξης στη θέση 250 της πρωτεΐνης (μη νοηματική μετάλλαξη) [24].

Μια δεύτερη μετάλλαξη που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι η AVAQ594-597del, καθώς έχει περιγραφεί τόσο σε 3 αδέρφια με υπερφόρτωση σιδήρου στην Ιταλία, όσο και σε μια περίπτωση οικογενούς κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης στην Ιαπωνία [54, 55]. Η εν λόγω μετάλλαξη αφορά στην απαιοφή 12 νουκλεοτιδίων στο 16^ο εξόνιο του Tfr2 γονιδίου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απαιοφή 4 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης που αποτελεί και τον τομέα διμερισμού του υποδοχέα [54, 55].

Η μη νοηματική μετάλλαξη Q317X έχει επίσης αυξημένο ενδιαφέρον, καθώς η βαρύτητα του φαινοτύπου που προκαλεί συσχετίστηκε με την συνύπαρξη ή όχι παθογενετικών μεταλλάξεων του HFE. Αναλυτικότερα, η εν λόγω μετάλλαξη περιγράφηκε από τους

Pietrangelo et al. σε δυο αδέρφια με νεανικό τύπο αιμοχρωμάτωσης, στα οποία ανευρέθηκε επίσης σύνθετη ομοζυγωτία C282Y/H63D του HFE γονιδίου. Η ίδια μετάλλαξη ανευρέθη ωστόσο και σε ένα τρίτο αδερφό της οικογένειας με εικόνα αιμοχρωμάτωσης ενηλίκου τύπου, ο οποίος έφερε τα φυσιολογικά HFE αλληλία. Από την παρατήρηση αυτή συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις των δυο αυτών γονιδίων έχουν αθροιστικό αποτέλεσμα, και ως εκ τούτου, όταν συνδυασθούν, μπορούν να εμφανίσουν βαρύτερο φαινότυπο υπερφόρτωσης σιδήρου [56]. Η σύγχρονη αντίληψη για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HFE και του υποδοχέα TfR2 στη ρύθμιση της έκφρασης της επιιδίνης ενισχύει περαιτέρω αυτό το συμπέρασμα.

Πίνακας 2. Οι παθογενετικές μεταλλάξεις του TfR2						
Μετάλλαξη	Εξόνηο	Πρωτεϊνική αλλαγή	Αριθμός οικογενειών	Τύπος	Προέλευση	Παραπομπές
c64 G>A	1	V22I	1	Παρανοηματική	Ιταλία	Biasiotto et al. 2003
c.84-88insC°	2	E60X	1	Μετατόπιση πλασίου ανάγνωσης	Νότια Ιταλία	Roetto et al, 2001 [57]
c.313C>T°	2	R105X	1	Μη Νοηματική	Βόρεια Γαλλία	Le Gac et al, 2004 [58]
c.515T>A°	4	M172K	1	Μη Νοηματική	Κεντρική Ιταλία	Roetto et al, 2001[57] Majore et al, 2006 [59]
c.750C>G°	6	Y250X	4	Μη Νοηματική	Ιταλία	Camaschella et al, 2004 [24] Piperno et al, 2004 [25]
c.949C>T	8	Q317X	1	Μη Νοηματική	Πορτογαλία	Pietrangelo et al, 2005 [56]
c.1186C>T*	9	R396X	1	Μη Νοηματική	Σκωτία	Lee and Barton, 2006 [60]
c1231-3del	9	Del N411	1	Απαλοιφή	Ιταλία	Basiotto et al., 2008 [61]
c1330 G>A	10	A444T	1	Παρανοηματική	Ιταλία	Basiotto et al. 2008 [61]
c.1403G>A	11	Arg481His	1	Παρανοηματική	Ταϊβάν	Hsiao et al. 2007[62]

c.1469T>G ^o	11	L490R	1	Παρανοηματικ ή	Ιαπωνία	Koyama et al, 2005 [63]
c.1665delC ^o	14	V561X	1	Απαλοιφή	Ιαπωνία	Koyama et al, 2005 [63]
c.1780-1791del ^o	16	AVAQ594-597del	2	Απαλοιφή	Βόρεια Ιταλία, Ιαπωνία	Girelli et al, 2002 [54] Hattori et al, 2003[55]
c.2069A>C ^o	17	Q690P	1	Παρανοηματικ ή	Πορτογαλία	Mattman et al, 2002 [64]
IVS17+5636 G >A	IVS17	Διαταραχή ματίσματος IVS17	1	Διαταραχή ματίσματος IVS17	Ιταλία	Basiotto et al. 2008 [61]
c.2374G>A *	18	C792R	1	Παρανοηματικ ή	Σκωτία	Lee and Barton, 2006 [60]

Καθώς η αιμοχρωμάτωση είναι μια σχετικά σπάνια νόσος στον Ελλαδικό χώρο, οι περιπτώσεις μη κλασσικής αιμοχρωμάτωσης είναι επίσης περιορισμένες. Ως εκ τούτου, μελέτες ανάλυσης του Tfr2 γονιδίου σε ασθενείς Ελληνικής καταγωγής απουσιάζουν από τη βιβλιογραφία, ενώ ως τις μέρες μας, δεν έχει αναφερθεί παθογενετική μετάλλαξη του Tfr2 γονιδίου στον ελληνικό πληθυσμό.

B. ΣΚΟΠΟΣ & ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οι μελέτες της τελευταίας δεκαετίας έχουν δείξει ότι οι πληθυσμοί της Νότιας Ευρώπης και της Ιαπωνίας, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από χαμηλή συχνότητα της C282Y μετάλλαξης, εμφανίζουν σχετικά αυξημένη συχνότητα παθογενετικών μεταλλάξεων του Tfr2 γονιδίου στους ασθενείς που πάσχουν από αιμοχρωμάτωση. Στην Ιαπωνία, για παράδειγμα, όπου η αιμοχρωμάτωση είναι μια εξαιρετικά σπάνια νόσος, η τύπου III αιμοχρωμάτωση αποτελεί το συχνότερο σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου [63].

Η μελέτη επομένως του Tfr2 γονιδίου σε Έλληνες ασθενείς με αιμοχρωμάτωση παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον, καθώς η συχνότητα της κλασσικής μετάλλαξης του HFE γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό είναι επίσης χαμηλή, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα συμμετοχής άλλων γονιδίων του μεταβολισμού του σιδήρου στην παθογένεια της νόσου. Παρά το αυξημένο αυτό ενδιαφέρον, μελέτες του Tfr2 γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό απουσιάζουν από τη σύγχρονη βιβλιογραφία.

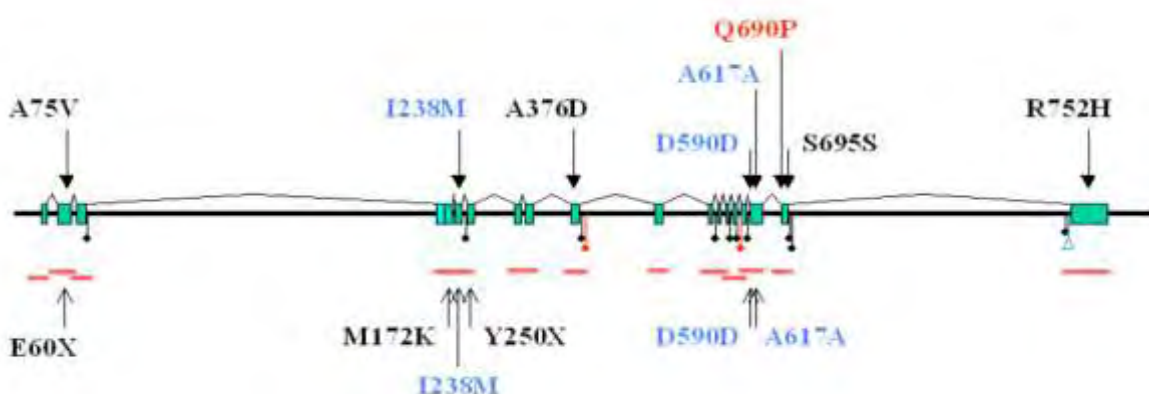
Για την έλλειψη δεδομένων ευθύνεται τόσο η χαμηλή συχνότητα της αιμοχρωμάτωσης στην Ελλάδα όσο και η δυσκολία ανάλυσης του Tfr2 γονιδίου, καθώς πρόκειται για ένα μεγάλο μεγέθους γονίδιο αποτελούμενο από πολλά εξόνια, το οποίο δεν εκφράζεται παρά μόνο σε ορισμένους ιστούς του οργανισμού. Επίσης, σε αντίθεση με το HFE γονίδιο, όπου μια μοναδική μετάλλαξη σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδίου είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των περιπτώσεων κλασσικής αιμοχρωμάτωσης, οι περισσότερες παθογενετικές μεταλλάξεις του Tfr2 εντοπίζονται σε όλη την έκταση του γονιδίου. Ως εκ τούτου, η ευαισθησία των διαθέσιμων στην κλινική πράξη γενετικών δοκιμασιών ανίχνευσης μεταλλάξεων του Tfr2 γονιδίου (οι οποίες ανιχνεύουν 4 βασικές μεταλλάξεις του γονιδίου: E60X M172K, Y250X, AVAG594-597 del) είναι μικρότερη του 50%, περιορίζοντας σημαντικά τόσο τη διαγνωστική τους αξία όσο και τη χρησιμότητά τους στη μελέτη του γονιδίου σε ασθενείς με αιμοχρωμάτωση [65].

Σκοπός επομένως της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και προτυποποίηση μιας ευαίσθητης και αξιόπιστης μεθόδου ανάλυσης του Tfr2 γονιδίου και η εφαρμογή στη

συνέχεια αυτής της τεχνικής σε ορισμένο αριθμό Ελλήνων ασθενών με μη κληρονομική αιμοχρωμάτωση.

Όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση του TfR2 γονιδίου περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον ήπαρ. Η χρησιμοποίηση επομένως του συμπληρωματικού DNA (c-DNA) του γονιδίου για την ανίχνευση μεταλλάξεων είναι δυσχερής καθώς η πρακτική αυτή θα απαιτούσε τη λήψη και χρησιμοποίηση ηπατικού ιστού από κάθε ασθενή για την παραγωγή και ενίσχυση του c-DNA. Πράγματι, η αρχική προσπάθεια ενίσχυσης του c-DNA του γονιδίου χρησιμοποιώντας c-DNA περιφερικού αίματος ασθενών ήταν ανεπιτυχής. Ο σχεδιασμός επομένως της συγκεκριμένης μελέτης βασίστηκε στη χρήση γενομικού DNA (genomic DNA) περιφερικού αίματος, και περιελάμβανε δύο βασικά στάδια: την ενίσχυση με τη PCR του γενομικού DNA του TfR2 και την ανάλυση αλληλουχίας (sequencing) των παραγόμενων προϊόντων.

Η ενίσχυση του DNA του TfR2 γονιδίου με PCR είναι μια εργώδης διαδικασία καθώς, όπως προαναφέρθηκε, πρόκειται για ένα μεγάλο μεγέθους γονίδιο (~21kb), που αποτελείται από 18 εξόνια. Σχεδιάστηκαν επομένως 12 διαφορετικές PCR οι οποίες ενισχύουν διαδοχικά τμήματα του γονιδίου που περιλαμβάνουν το σύνολο των εξονίων και των θέσεων ματίσματος του γονιδίου (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ενίσχυση του TfR2 γονιδίου με διαδοχικές PCR.

Το δεύτερο στάδιο της μελέτης περιλαμβάνει την ανάλυση αλληλουχίας (sequencing) κάθε παραγόμενου τμήματος DNA, μετά από κατάλληλη προετοιμασία κάθε δείγματος (είτε με άμεσο

καθαρισμό προϊόντος PCR, είτε με απομόνωσή του από γέλη αгарόζης). Η ανάλυση αλληλουχίας χρησιμοποίησε τους εκκινητές των PCR του πρώτου σταδίου, ενώ περιέλαβε τόσο τον έλεγχο γνωστών μεταλλάξεων του TfR2 όσο και τη 'σάρωση' του γονιδίου για νέες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς.

Επι ανεύρεσης νέων μεταλλάξεων θα ακολουθήσει έλεγχος των πιθανών μεταβολών που προκαλούν στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, και βιοπληροφορική ανάλυση των μεταλλάξεων για ενδεχόμενη βλαπτική του επίδραση στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης.

Γ. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1 Επιλογή πληθυσμού μελέτης

Πληθυσμός ελέγχου

Για την προτυποποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε γενομικό DNA (genomic DNA) περιφερικού αίματος ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν σε γενετικό έλεγχο στο εργαστήριο ανοσολογίας- ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για νοσήματα που δε σχετίζονται με διαταραχές του μεταβολισμού του σιδήρου.

Επιλογή ασθενών

Για την ενίσχυση του Tfr2 γονιδίου επελέγησαν αρχικά 13 ασθενείς με κλινικοεργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα συμβατά με υπερφόρτωση σιδήρου απουσία της C282Y μετάλλαξης του HFE. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνται από το Αιματολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης. Πρόκειται για ασθενείς με βιοχημικές παραμέτρους υπερφόρτωσης σιδήρου (αυξημένος κορεσμός τρανσφερίνης, υψηλή φερριτίνη) και ευρήματα συσσώρευσης σιδήρου στο ήπαρ στη μαγνητική τομογραφία, οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε γενετικό έλεγχο για την παθογενετική μετάλλαξη του HFE ο οποίος απέβη αρνητικός. Ο γενετικός έλεγχος για τη μετάλλαξη C282Y του HFE πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μέθοδο PCR των Feder et al. [5]

Για την ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου Tfr2, από τους 13 ασθενείς επελέγησαν δείγματα 4 εξ αυτών, ελλείψει επαρκούς ποσότητας γενομικού DNA για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου στους υπολοίπους ασθενείς. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα κλινικά, βιοχημικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά των 4 ασθενών.

Πίνακας 3. Κλινικά, εργαστηριακά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Ασθενής	Ηλικία (2011 (έτη)	Φερριτίνη (ng/ml)	Κορεσμός τρανσφερίνης (%)	Γενετικός έλεγχος αιμοχρωμάτωσης	MRI ήπατος	Αφαιμάξεις
1 ^{ος}	52	397 (2011)	34,9 (95/278)	αρνητικός έλεγχος για τις μεταλλάξεις του HFE (C282Y και H63D)	Δεν υπάρχει απεικόνιση με MRI. Ανάδειξη λιπώδους διήθησης σε υπερηχογραφικό έλεγχο	Δεν υποβάλλεται σε αφαιμάξεις (είναι αιμοδότης)
2 ^{ος}	52	416 (2005)	26,35 (73/277)	αρνητικός έλεγχος για τις μεταλλάξεις του HFE (C282Y και H63D)	MRI (2006) Μυοκάρδιο χωρίς παθολογικά ευρήματα Μετρίου βαθμού σιδήρωση ήπατος (2,2gr./ 230μmol ιστού)	Δεν υποβάλλεται σε αφαιμάξεις
3 ^{ος}	51	1351 (2007) 82 (2011)	44,9 (130/289)	αρνητικός έλεγχος για τις μεταλλάξεις του HFE (C282Y και H63D) αρνητικός έλεγχος για μεταλλάξεις του γονιδίου της Hpcidin	MRI (2008) Μυοκάρδιο χωρίς παθολογικά ευρήματα Μετρίου βαθμού σιδήρωση ήπατος (2,74gr./ 250μmol ιστού) MRI (2008) χωρίς μεταβολές των ευρημάτων	Πρόγραμμα αφαιμάξεω
4 ^{ος}	48	982 (2007)	26,7 (74/277)	αρνητικός έλεγχος για τις μεταλλάξεις του HFE (C282Y και H63D)	MRI (2006) Μυοκάρδιο χωρίς παθολογικά ευρήματα Μετρίου βαθμού σιδήρωση ήπατος	Δεν υποβάλλεται σε μεταλλάξεις

Γ.2 Εργαστηριακές μεθοδοι

Γ.2.1. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από δείγμα περιφερικού αίματος (σε EDTA) με την χρήση του *QiAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen UK)*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Γ.2.2. Σχεδιασμός των εκκινητών TfR2

Για την πραγματοποίηση των PCR επελέγησαν εκκινητές από προηγούμενες μελέτες ανάλυσης TfR2 των Koyama et al. και των Mattman et al. [63, 64]. Ο σχεδιασμός των εκκινητών αυτών του TfR2 γονιδίου είχε βασιστεί στην αλληλουχία του χρωμοσώματος 7q22 του ανθρώπινου γονιδιώματος (GenBank AFO53356) και στην αλληλουχία του c-DNA της GenBank XM036083., σχεδιάστηκαν δε έτσι ώστε να περιλαμβάνουν το σύνολο των αλληλουχιών και των 18 εξονίων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Γ.2.3. Προτυποποίηση των αντιδράσεων PCR

Σε κάθε αντίδραση PCR, 100-200 ng γενομικού DNA ενισχύθηκαν σε μια αντίδραση συνολικού όγκου 30μl η οποία περιελάμβανε 62,5μmol/l κάθε dNTP, 20 pmol κάθε εκκινητή, 1,5 mmol/l MgCl₂, και 0,8U Taq πολυμεράσης (Invitrogen, UK) σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Επιπλέον, σε 2 από τις 12 αντιδράσεις (PCR 2 & 12), στο μίγμα της αντίδρασης προσετέθη διάλυμα DMSO. Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε συσκευές PCR PTC-200, Mj (Watertown, MA).

Οι συνθήκες της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών προτυποποιήθηκαν έτσι ώστε να παράγεται ένα μόνο προϊόν σε κάθε αντίδραση. Σε γενικές γραμμές, ξεκινώντας από ένα στάδιο αποδιάταξης του DNA διάρκειας 2 λεπτών στους 94°C, ακολουθούν 30 -32 κύκλοι ενίσχυσης του DNA με τις συνθήκες που σημειώνονται και ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης του DNA διάρκειας 5 λεπτών στους 72°C. Οι προτυποποιημένες συνθήκες και των 12 αντιδράσεων φαίνονται στον πίνακα 4.

Τα προϊόντα των PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε γέλη αгарόζης 2%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και εξέτασή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός των παραγόμενων προϊόντων με τη χρήση QIAquick gel extraction kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κασκευαστή

Γ.2.4. Ανάλυση αλληλουχίας του Tfr2 γονιδίου

Η ανάλυση αλληλουχίας των καθαρισμένων πλέον προϊόντων DNA πραγματοποιήθηκε σε γενετικό αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) με τη χρήση Big Dye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems). Για την ανάλυση αλληλουχίας του Tfr2 γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές του πρώτου σταδίου (της ενίσχυσης του γονιδίου). Σημειώνεται, ωστόσο, ότι βάσει της εντόπισης του κάθε εκκινητή στο γονίδιο, του μεγέθους (σε bp) του προϊόντος κάθε PCR και του τελικού αποτελέσματος του sequencing, στην πλειονότητα των αντιδράσεων επελέγη ο ένας εκ των δυο εκκινητών (είτε forward είτε reverse) προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος και το κόστος της διαδικασίας (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Ανάλυση αλληλουχίας TFR2- χρήση εκκινητών

PCR	Εξόνιο	Sanger αντίδραση	PCR	Εξόνιο	Sanger αντίδραση
1	1	reverse	7	10	forward
2	2	reverse	8	11,12,13	reverse
3	3	forward ή reverse	9	14	reverse
4	4,5,6	forward	10	15,16	forward ή reverse
5	7,8	forward και reverse	11	17	forward και reverse
6	9	reverse	12	18	reverse

Πίνακας4. Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη			
Εξόνια	Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Προϊόν PCR
1	5'-gaggagcagccttggttcag -3' 5'-gaggagcagccttggttcag-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 63°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	267bp
2	5'-tcactgacctcattattgcc-3' 5'-aaggctggcgggtggcaaga-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 61°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	439bp
3	5'-aagatcctctcagaccgtctacc-3' 5'-atctcagacagtcagctccctc-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 58°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	776bp
4,5,6	5'-tcttttcctaaactcaggaaccc-3' 5'-gttcttctctgtctccctctcac-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 56°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	784bp
7,8	5'-gggaattgaatcagaaggaaaa-3' 5'-tttctagttcaccacaatcacc-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 58°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	771bp
9	5'-caactaaagttcccactggattg-3' 5'-aaggtaggtctgttctactgct-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	560bp
10	5'-aaccttgtaagtccagaatgacc-3' 5'-ctatcctcctcgggccac-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 57°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	402bp
11,12,13	5'-accaggacagaagaagacaagg-3' 5'-cacctgttcatagagagtctgcc-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 57°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	608bp
14	5'-gtagtgtacgtgagcctggaca-3' 5'-acctccataaaggagaactcgac-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 59°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	532bp
15,16	5'-gcagactctctatgaacaggtgg-3' 5'-gaggaggtagacgaggacagagt-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 56°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	776bp
17	5'-actctgtctctgtctacctcctc-3' 5'-agtgtggacatgcttttctttc-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 60°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	642bp
18	5'-gtgtggtgtaagaagggaacag-3' 5'-tgagaaattgatcagcaatgaga-3'	94 °C για 2 λεπτά, ακολουθούμενη από 32 κύκλους (94 °C για 30 sec, 57°C για 30 sec, 72 °C για 30 sec) και με τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά	947bp

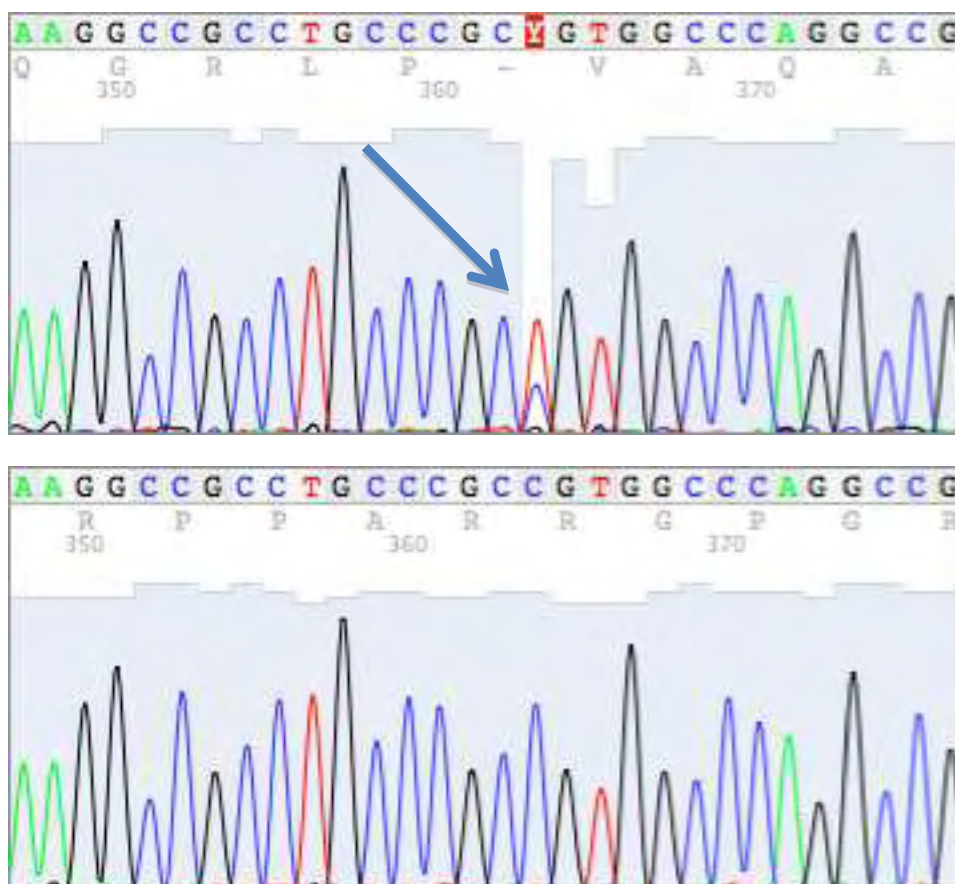
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ.1. Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων του TFR2 στους ασθενείς

Η ανάλυση αλληλουχίας του συνόλου των εξονίων του *TFR2* γονιδίου σε 3 από τους 4 ασθενείς της μελέτης δεν ανέδειξε την παρουσία μεταλλάξεων του *TFR2* γονιδίου (wild type γονίδιο). Στους ασθενείς αυτούς η γενετική διερεύνηση των υπολοίπων γονιδίων του μεταβολισμού του σιδήρου καθώς και η αναζήτηση αιτίων δευτεροπαθούς υπερφόρτωσης σιδήρου είναι εύλογη.

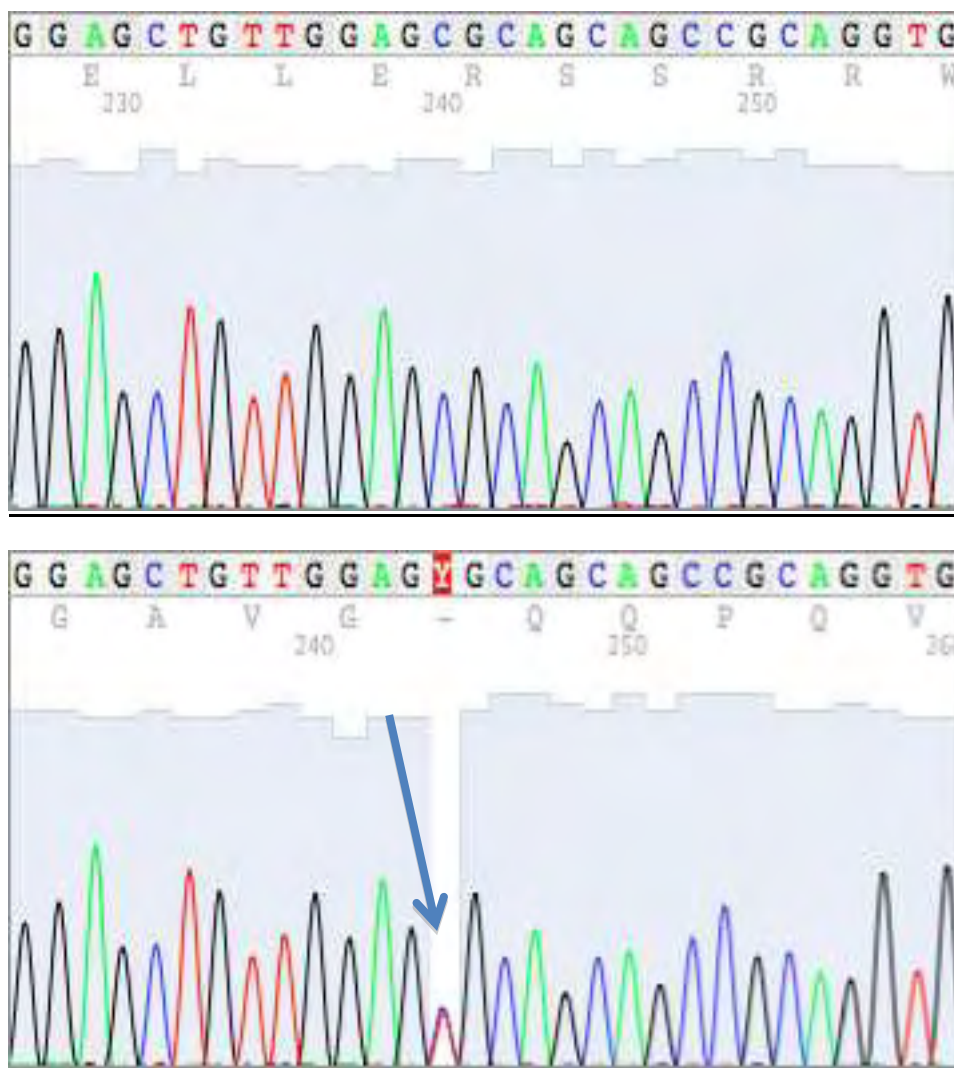
Αντιθέτως, στην περίπτωση του 4^{ου} ασθενούς η ανάλυση αλληλουχίας ανέδειξε την ύπαρξη δυο μεταλλάξεων του γονιδίου σε σχέση με τον τύπο με τα φυσιολογικά αλλήλια.

Η πρώτη μετάλλαξη ενοπίστηκε στο 16^ο εξόνιο και αφορά στην αντικατάσταση της κυτοσίνης στις θέση 19143 του γονιδίου από θυμίνη. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι σιωπηλή καθώς δεν οδηγεί σε αλλαγή του κωδικοποιούμενου αμινοξέος.



Εικόνα 10. Αντικατάσταση της κυτοσίνης στη θέση 19143 του γονιδίου από θυμίνη

Η δεύτερη μετάλλαξη αφορά στο 18^ο εξόνιο του γονιδίου. Πρόκειται για αντικατάσταση της γουανίνης στη 21143 από αδενίνη, γεγονός που οδηγεί σε αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 752 της πρωτεΐνης από θρεονίνη (R752H).



Εικόνα 11. Αντικατάσταση της γουανίνης στη θέση 21143 του γονιδίου από αδενίνη.

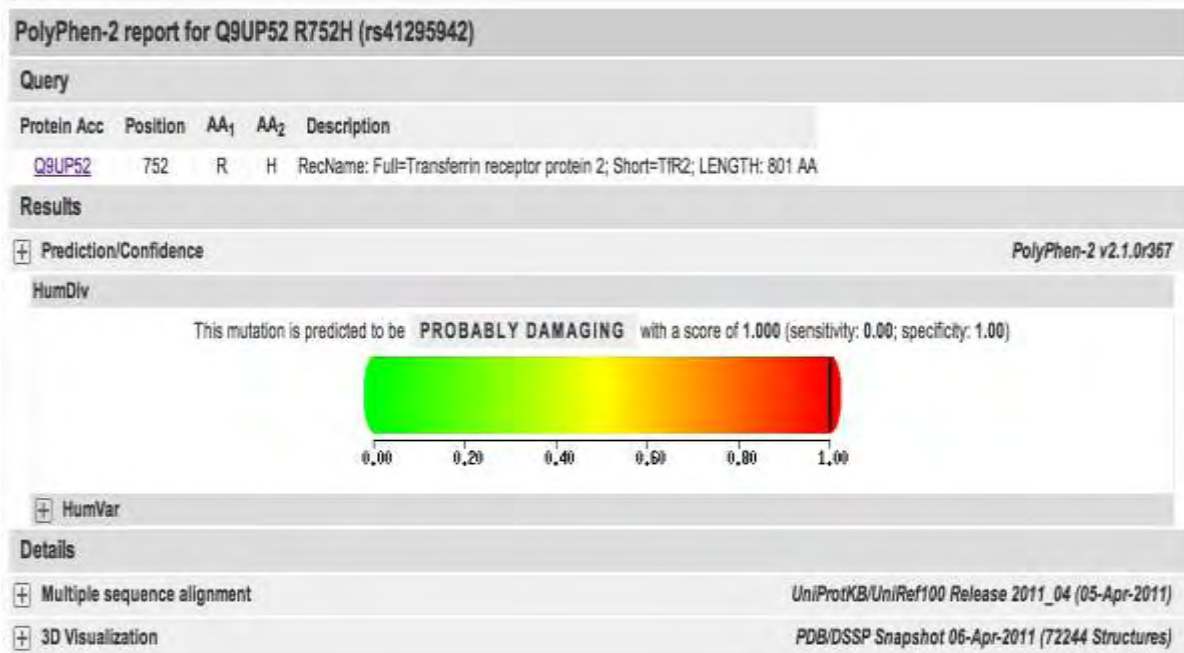
Δ.2. Βιοπληροφορική ανάλυση μεταλλάξεων

Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των ανωτέρω μεταλλάξεων βάσει των δεδομένων του NCBI για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις καθώς και βάσει προγραμμάτων πρόβλεψης των λειτουργικών επιδράσεων των μεταλλάξεων IFT και Polyphen-2.

Η πρώτη μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση της κυτοσίνης στη θέση 19143 του γονιδίου από θυμίνη (g19143C>T). Πρόκειται για γνωστό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου ('rs2075674' στη βάση δεδομένων SNPs του NCBI), η συχνότητα του οποίου σε διάφορες μελέτες και πληθυσμιακές ομάδες υπολογίζεται από 4,2 έως 18,3% [66]. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει κλινική σημασία καθώς δεν οδηγεί σε αλλαγή του κωδικοποιούμενου αμινοξέος (σιωπηλή μετάλλαξη με διατήρηση της αλανίνης στη θέση 617).

Η δεύτερη μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση της γουανίνης στη θέση 21143 του γονιδίου από αδενίνη με αποτέλεσμα την αντικατάσταση στην πρωτεϊνική αλληλουχία της αργινίνης στη θέση 752 από ιστιδίνη (missense μετάλλαξη R752H). Η συχνότητα της εν λόγω μετάλλαξης (σύμφωνα με τη βάση δεδομένων SNPs του NCBI 'rs41295942'), είναι σημαντικά χαμηλότερη, κυμαινόμενη από 0% έως 2,1%. Στη μεγαλύτερη εξ αυτών των μελετών που περιέλαβε γενετική ανάλυση 2658 ατόμων (NHLBI-ESP) η συχνότητα της μετάλλαξης υπολογίστηκε σε 1,4%, μόλις υπερβαίνοντας τη συχνότητα του 1% που απαιτείται για τον ορισμό της ως πολυμορφισμού [67]

Η βιοπληροφορική ανάλυση της μετάλλαξης με δυο διαφορετικά προγράμματα βιοπληροφορικής δίνει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ανάλυση της μετάλλαξης με το πρόγραμμα SIFT ανέδειξε ότι η μετάλλαξη γίνεται ανεκτή χωρίς σημαντική διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της πρωτεΐνης ($p=0,12$ - μη ανεκτή μετάλλαξη αν $P<0,05$) [68]. Αντίθετα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 12, η ανάλυση της μετάλλαξης R752H με το πρόγραμμα Polyphen-2 ανέδειξε την εν λόγω μετάλλαξη ως δυνητικά καταστροφική για το μόριο (score 1.000 με ευαισθησία 0.00, ειδικότητα 1.00) [69].



Εικόνα 12. Βιοπληροφορική ανάλυση της R752H μετάλλαξης (Polyphen-2)

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και προτυποποίηση μιας αξιόπιστης τεχνικής ανάλυσης της αλληλουχίας του Tfr2 γονιδίου και η εφαρμογή της στη συνέχεια σε ασθενείς με σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου απουσία της παθογενετικής μετάλλαξης C282Y του HFE γονιδίου.

Η ανάπτυξη της τεχνικής βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες των Koyama et al. και Mattman et al. [63, 64] με προσαρμογή ωστόσο των πειραματικών συνθηκών, έτσι ώστε να αυξηθεί η απόδοση και η αξιοπιστία με ταυτόχρονη μείωση του κόστους της τεχνικής. Με την προσαρμογή της μεθόδου, η οποία τελικά περιέλαβε 12 διαδοχικές PCR και 16 αντιδράσεις sequencing, 'σαρώνεται' ολόκληρο το γονίδιο στο σύνολο των εξονίων και των θέσεων ματίσματος εξασφαλίζοντας ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων. Ωστόσο, παρά τη βελτίωση της διαδικασίας, το κόστος της μεθόδου (οικονομικό και χρόνος εργασίας) παραμένει υψηλό, γεγονός που αποτρέπει την ευρεία χρήση της για τον έλεγχο των ατόμων με non HFE αιμοχρωματώση. Η σπανιότητα επίσης του συνδρόμου στο γενικό πληθυσμό καθιστά δυσανάλογη τη σχέση κόστους οφέλους για την ευρεία χρήση της μεθόδου.

Στα πλαίσια ελάττωσης του κόστους και ευρύτερης εφαρμογής της μεθόδου, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εισαγωγή τεχνικών οι οποίες επιτρέπουν την ταχεία, αποτελεσματική και οικονομική 'σάρωση' του εξεταζόμενου πληθυσμού για μεταλλάξεις του γονιδίου, όπως είναι η DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography). Η εφαρμογή τέτοιων μεθόδων θα περιορίζε τον αριθμό των ατόμων που θα υποβληθούν σε ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου μόνο σε εκείνα στα οποία η χρωματογραφία ανίχνευσε την παρουσία μεταλλάξεων, περιορίζοντας το κόστος της ανάλυσης αλληλουχίας του γονιδίου. Πράγματι, οι Biasotto et al. πριν από λίγα χρόνια εφάρμοσαν επιτυχώς τη DHPLC για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε 3 εξόνια του Tfr2 γονιδίου σε σημαντικό αριθμό ασθενών Ιταλικής καταγωγής με βιοχημικούς δείκτες υπερφόρτωσης σιδήρου, με επακόλουθη επιβεβαίωση και 'ταυτοποίηση' της μετάλλαξης με ανάλυση αλληλουχίας των 'υπόπτων' εξονίων. [70]. Επομένως, ένα μοντέλο ευρύτερης και

οικονομικής εφαρμογής της ανάλυσης αλληλουχίας του Tfr2 γονιδίου με τη χρήση DHPLC θα βελτιώνει τη σχέση κόστους και οφέλους της μεθόδου.

Πέρα όμως από τους όποιους περιορισμούς (συνεπεία του υψηλού οικονομικού και εργασιακού κόστους), η μέθοδος που αναπτύχθηκε στη παρούσα εργασία αποδείχθηκε εξαιρετικά ακριβής στην ανάλυση αλληλουχίας και στην ανίχνευση μεταλλάξεων του Tfr2 γονιδίου στους υπο εξέταση ασθενείς. Όπως προαναφέρθηκε, στους 3 από του 4 ασθενείς ελέγχθηκε το σύνολο των εξονίων και των θέσεων ματίσματος του γονιδίου χωρίς να βρεθεί όποια μετάλλαξη (wild type γονότυπος). Οι ασθενείς, δεδομένων των βιοχημικών και απεικονιστικών παραμέτρων υπερφόρτωσης σιδήρου και του αρνητικού γενετικού ελέγχου για μεταλλάξεις του HFE γονιδίου, χρήζουν περαιτέρω ελέγχου τόσο προς την κατεύθυνση των λοιπών γονιδίων μεταβολισμού του σιδήρου όσο και προς την αναζήτηση καταστάσεων (ηπατοπάθειες, κατανάλωση αλκοόλ, αιμοσφαιρινοπάθειες) δευτεροπαθούς αιμοχρωμάτωση.

Αντιθέτως στον 4^ο ασθενή που ανευρέθησαν δυο σημειακές μεταλλάξεις, στο 16^ο και το 18^ο εξόνιο του γονιδίου. Η πρώτη μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση της κυτοσίνης στη θέση 19143 του γονιδίου από θυμίνη (g19143C>T). Όπως προαναφέρθηκε πρόκειται για γνωστό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου, η συχνότητα του οποίου σε διάφορες μελέτες και πληθυσμιακές ομάδες υπολογίζεται από 4,2 έως 18,3%, ο οποίος δεν έχει κλινική σημασία καθώς δεν οδηγεί σε αλλαγή του κωδικοποιούμενου αμινοξέος (σιωπηλή μετάλλαξη με διατήρηση της αλανίνης στη θέση 617).

Η δεύτερη μετάλλαξη αφορά στην αντικατάσταση της γουανίνης στη θέση 21143 του γονιδίου από αδενίνη με αποτέλεσμα την αντικατάσταση στην πρωτεϊνική αλληλουχία της αργινίνης στη θέση 752 από ιστιδίνη (παραιοηματική μετάλλαξη R752H). Η συχνότητα της εν λόγω μετάλλαξης, είναι σημαντικά χαμηλότερη (από 0% έως 2,1%). Στη μεγαλύτερη δε εξ αυτών των μελετών η συχνότητά της υπολογίστηκε σε 1,4%, μόλις υπερβαίνοντας τη συχνότητα του 1% που απαιτείται για τον ορισμό της ως πολυμορφισμού [67]

Ως προς την κλινική σημασία της δεύτερης μετάλλαξης R752H, προηγούμενες μελέτες των Mattman et al & Biasiotto et al έχουν περιγράψει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ετερόζυγο μορφή σε ασθενείς με σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου, χωρίς ωστόσο να θεωρείται παθογενετική υπερφόρτωσης σιδήρου.[61, 64]

Η βιοπληροφορική ανάλυση της μετάλλαξης R752H με δυο διαφορετικά προγράμματα βιοπληροφορικής ανέδειξε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η ανάλυση της μετάλλαξης με το πρόγραμμα SIFT ανέδειξε ότι η μετάλλαξη γίνεται ανεκτή χωρίς σημαντική διαταραχή της δομής και της λειτουργίας της πρωτεΐνης. Το εύρημα υποστηρίζεται από τις κοινές βιοχημικές ιδιότητες των δυο αμινοξέων (τόσο η ιστιδίνη όσο και η αργινίνη είναι υδρόφιλα αμινοξέα με θετικά φορτισμένη πλάγια αλυσίδα) [68]. Αντίθετα, η ανάλυση της μετάλλαξης με το πρόγραμμα Polyphen-2 το οποίο χρησιμοποιεί παραμέτρους αντιστοίχισης πολλαπλών αλληλουχιών (Multiple Sequence Alignment-MSA) και δομής της πρωτεΐνης, αναδεικνύει την εν λόγω μετάλλαξη ως δυνητικά καταστροφική για το μόριο. Οι διαφορές των δυο μεθόδων πιθανότατα οφείλονται στις διαφορετικές παραμέτρους που λαμβάνουν υπόψιν στα βιοπληροφορικά μοντέλα

Ακόμα όμως και αν η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε σημαντική διαταραχή της δομής και της λειτουργίας του υποδοχέα, καθώς η τύπου III αιμοχρωμάτωση είναι σωματικό υπολειπόμενο νόσημα, δεν είναι ικανή να προκαλέσει σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου απουσία δεύτερης παθογενετικής μετάλλαξης. Δεδομένης ωστόσο της πολυπλοκότητας του μεταβολισμού του σιδήρου, δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη μετάλλαξη να λειτουργεί ως γενετικός τροποποιητής (genetic modifier) που προδιαθέτει σε υπερφόρτωση του σιδήρου, και ο οποίος σε συνδυασμό με άλλους γενετικούς (π.χ. άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του σιδήρου) και περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. η κατανάλωση αλκοόλ) μπορεί να οδηγήσει σε σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου. Οι Pietrangelo et al., όπως έχει ήδη αναφερθεί, απέδειξαν το αθροιστικό αποτέλεσμα παθογενετικών μεταλλάξεων του υποδοχέα TfR2 και της HFE πρωτεΐνης σε μια οικογένεια Ιταλών ασθενών [56], όπου ο συνδυασμός ομοζυγωτίας της μετάλλαξης Q317X του γονιδίου *TFR2* με σύνθετη

ετεροζυγωτία C282Y-H63D του *HFE* επιβάρυνε σημαντικά τον κλινικό φαινότυπο. Τα ευρήματα επιβεβαιώνονται και από νεότερες μελέτες που ανέδειξαν σε ασθενείς με υπερφόρτωση σιδήρου διπλη ετεροζυγωτία H63D του *HFE* και F280L του *TFR2* [71, 72]. Είναι πιθανό επομένως, ένας ετεροζυγώτης με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη (εφόσον είναι παθογενετική), όταν υπάρχουν και άλλοι γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες που προδιαθέτουν σε υπερφόρτωση σιδήρου να εμφανίσει σύνδρομο υπερφόρτωσης σιδήρου.

Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη του *TfR2* γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό, ο οποίος, όπως ήδη έχει αναφερθεί, χαρακτηρίζεται από τον ιδιαίτερα χαμηλό επιπολασμό τόσο της αιμοχρωμάτωσης όσο και της κλασσικής μετάλλαξης του *HFE* γονιδίου [21]. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την ύπαρξη πολυμορφισμών και μεταλλαγών του *TfR2* γονιδίου σε Έλληνες ασθενείς με non-*HFE* αιμοχρωμάτωση. Ο χαμηλός όμως αριθμός των ασθενών που αναλύθηκαν δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό της 'συμβολής' των μεταλλαγών του *TfR2* γονιδίου στην παθογένεια της αιμοχρωμάτωσης στον ελληνικό πληθυσμό. Η μελλοντική διεύρυνση της μελέτης, με την ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού ασθενών (έχει ήδη πραγματοποιηθεί το στάδιο της ενίσχυσης των εξονίων του *TfR2* γονιδίου με PCR σε 9 ακόμα ασθενείς με αιμοχρωμάτωση Ελληνικής καταγωγής) θα επιτρέψει τον προσδιορισμό της συχνότητας των μεταλλάξεων του γονιδίου στους ασθενείς με αιμοχρωμάτωση του Ελληνικού πληθυσμού. Η εισαγωγή, επίσης, τεχνικών σάρωσης του εν λόγω γονιδίου για μεταλλάξεις ενδεχομένως θα επέτρεπε τον οικονομικότερο καθορισμό της συχνότητας συγκεκριμένων μεταλλαγών ή πολυμορφισμών του *TfR2* γονιδίου και στο γενικό ελληνικό πληθυσμό.

Z. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση αλληλουχίας του *TfR2* γονιδίου σε Έλληνες ασθενείς με non-*HFE* αιμοχρωμάτωση. Η ανάλυση αυτή υπόκειντο σε περιορισμούς που σχετίζονταν τόσο με τη σπανιότητα του συνδρόμου στον Ελληνικό πληθυσμό όσο και με τις 'τεχνικές' δυσκολίες ανάλυσης ενός μεγάλου γονιδίου με πλήθος

εξονίων και παθογενετικών μεταλλάξεων. Παρά τους περιορισμούς αυτούς όχι μόνο αναπτύχθηκε και προτυποποιήθηκε η αξιόπιστη τεχνική ανάλυσης του συνόλου των εξονίων, αλλά ανεδείχθη η παρουσία πολυμορφισμών και μεταλλάξεων του TfR2 γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό χωρίς ωστόσο να αποδεικνύεται ο παθογενετικός τους ρόλος. Η αναζήτηση στους ασθενείς με ετερόζυγες μεταλλάξεις του TfR2 άλλων γενετικών και περιβαλλοντικών τροποποιητικών του σιδήρου καθώς και η διεύρυνση της μελέτης με την ανάλυση περισσότερων ασθενών στο μέλλον θα επιτρέψει τον καθορισμό της 'συμβολής' των μεταλλάξεων του TfR2 γονιδίου στην μη κλασσική αιμοχρωμάτωση, συμβάλλοντας ακόμα περισσότερο στην κατανόηση τόσο της παθογένειας της αιμοχρωμάτωσης, όσο και του μεταβολισμού του σιδήρου.

H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Recklinghausen, F.V., [*Hemochromatosis*]. Taggeblatt Versammlung Dtsch Naturforsch Arzte Heidelberg 1889(62): p. 324-325.
2. Sheldon, J., *Haemochromatosis*. London: Oxford University Press, 1935.
3. Simon M, P.Y., Bourel M, Fauchet R, Genetet B, *Hémochromatose idiopathique maladie associée à l'antigène tissulaire HL-A 3*. Nouv Presse Med, 1975(4): p. 1432.
4. Simon M, L.M.L., Fauchet R, et al., *A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association*. Am J Hum Genet 1987, 1987(41): p. 89-105.
5. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
6. Borot, N., et al., *Mutations in the MHC class I-like candidate gene for hemochromatosis in French patients*. Immunogenetics, 1997. **45**(5): p. 320-4.
7. Piperno, A., et al., *Heterogeneity of hemochromatosis in Italy*. Gastroenterology, 1998. **114**(5): p. 996-1002.
8. Pietrangelo, A., et al., *Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 725-32.
9. Pietrangelo, A., *Non-HFE hemochromatosis*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 21-9.
10. Kawabata, H., et al., *Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 20826-32.
11. *Hemochromatosis*. In: *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*. Baltimore: McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, 2000. (Accessed May 10, 2004, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>).
12. Miret S, S.R., McKie AT., *Physiology and molecular biology of dietary iron absorption*. Annu Rev Nutr 2003, 2003(23): p. 283-301.
13. McKie, A.T., et al., *An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron*. Science, 2001. **291**(5509): p. 1755-9.
14. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
15. Ganz, T., *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. Blood, 2003. **102**(3): p. 783-8.
16. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
17. Darshan, D., D.M. Frazer, and G.J. Anderson, *Molecular basis of iron-loading disorders*. Expert Rev Mol Med. **12**: p. e36.
18. Galy, B., et al., *Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 79-85.
19. Ganz, T., *Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together*. Cell Metab, 2008. **7**(4): p. 288-90.
20. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. J Med Genet, 1997. **34**(4): p. 275-8.
21. Papazoglou, D., et al., *Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece*. Acta Haematol, 2003. **109**(3): p. 137-40.

22. Pietrangelo, A., *Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2383-97.
23. Pietrangelo, A., *The ferroportin disease*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(1): p. 131-8.
24. Camaschella, C., et al., *The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 14-5.
25. Piperno, A., et al., *Homozygosity for transferrin receptor-2 Y250X mutation induces early iron overload*. Haematologica, 2004. **89**(3): p. 359-60.
26. Wallace, D.F. and V.N. Subramaniam, *Non-HFE haemochromatosis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(35): p. 4690-8.
27. Kawabata, H., et al., *Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16618-25.
28. Fleming, R.E., et al., *Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2214-9.
29. Kawabata, H., et al., *Regulation of expression of murine transferrin receptor 2*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1949-54.
30. Theiler, K., *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. New York, NY: Springer-Verlag, 1989.
31. Tsunoo, H. and H.H. Sussman, *Placental transferrin receptor. Evaluation of the presence of endogenous ligand on specific binding*. J Biol Chem, 1983. **258**(7): p. 4118-22.
32. West, A.P., Jr., et al., *Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38135-8.
33. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28494-8.
34. Lu, J.P., K. Hayashi, and M. Awai, *Transferrin receptor expression in normal, iron-deficient and iron-overloaded rats*. Acta Pathol Jpn, 1989. **39**(12): p. 759-64.
35. Sciot, R., et al., *Lack of hepatic transferrin receptor expression in hemochromatosis*. Hepatology, 1987. **7**(5): p. 831-7.
36. Ward, J.H., et al., *Heme regulation of HeLa cell transferrin receptor number*. J Biol Chem, 1984. **259**(21): p. 13235-40.
37. Mattia, E., et al., *Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells*. J Biol Chem, 1984. **259**(5): p. 2689-92.
38. Rao, K.K., et al., *Effects of alterations in cellular iron on biosynthesis of the transferrin receptor in K562 cells*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(4): p. 595-600.
39. Casey, J.L., et al., *Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation*. Science, 1988. **240**(4854): p. 924-8.
40. Mullner, E.W. and L.C. Kuhn, *A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm*. Cell, 1988. **53**(5): p. 815-25.
41. Owen, D. and L.C. Kuhn, *Noncoding 3' sequences of the transferrin receptor gene are required for mRNA regulation by iron*. EMBO J, 1987. **6**(5): p. 1287-93.
42. Mullner, E.W., B. Neupert, and L.C. Kuhn, *A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA*. Cell, 1989. **58**(2): p. 373-82.

43. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
44. Babitt, J.L., et al., *Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1933-9.
45. Babitt, J.L., et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 531-9.
46. Wang, R.H., et al., *A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2005. **2**(6): p. 399-409.
47. Andriopoulos, B., Jr., et al., *BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 482-7.
48. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 205-14.
49. Chen, J. and C.A. Enns, *The Cytoplasmic domain of transferrin receptor 2 dictates its stability and response to holo-transferrin in Hep3B cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6201-9.
50. Johnson, M.B., et al., *Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(3): p. 743-54.
51. Robb, A. and M. Wessling-Resnick, *Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4294-9.
52. Fleming, R.E. and P. Ponka, *Iron overload in human disease*. N Engl J Med, 2012. **366**(4): p. 348-59.
53. Le Gac, G. and C. Ferec, *The molecular genetics of haemochromatosis*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1172-85.
54. Girelli, D., et al., *Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1295-302.
55. Hattori, A., et al., *AVAQ 594-597 deletion of the Tfr2 gene in a Japanese family with hemochromatosis*. Hepatol Res, 2003. **26**(2): p. 154-156.
56. Pietrangelo, A., et al., *Juvenile hemochromatosis associated with pathogenic mutations of adult hemochromatosis genes*. Gastroenterology, 2005. **128**(2): p. 470-9.
57. Roetto, A., et al., *New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2555-60.
58. Le Gac, G., et al., *Early onset hereditary hemochromatosis resulting from a novel TFR2 gene nonsense mutation (R105X) in two siblings of north French descent*. Br J Haematol, 2004. **125**(5): p. 674-8.
59. Majore, S., et al., *Homozygous p.M172K mutation of the TFR2 gene in an Italian family with type 3 hereditary hemochromatosis and early onset iron overload*. Haematologica, 2006. **91**(8 Suppl): p. ECR33.
60. Lee, P.L. and J.C. Barton, *Hemochromatosis and severe iron overload associated with compound heterozygosity for TFR2 R455Q and two novel mutations TFR2 R396X and G792R*. Acta Haematol, 2006. **115**(1-2): p. 102-5.
61. Biasiotto, G., et al., *New TFR2 mutations in young Italian patients with hemochromatosis*. Haematologica, 2008. **93**(2): p. 309-10.
62. Hsiao, P.J., et al., *A novel mutation of transferrin receptor 2 in a Taiwanese woman with type 3 hemochromatosis*. J Hepatol, 2007. **47**(2): p. 303-6.

63. Koyama, C., et al., *Two novel mutations, L490R and V561X, of the transferrin receptor 2 gene in Japanese patients with hemochromatosis*. *Haematologica*, 2005. **90**(3): p. 302-7.
64. Mattman, A., et al., *Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 1075-7.
65. Camaschella, C. and A. Roetto, *TFR2-Related Hereditary Hemochromatosis*. NCBI- Gene Reviews, 2008.
66. *NCBI-Single Nucleotide Polymorphism.rs2075674*.
67. *NCBI-Single Nucleotide Polymorphism. rs41295942 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>*
68. *SIFT http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html*.
69. *Polyphen-2. Prediction of functional effects of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>*.
70. Biasiotto, G., et al., *Identification of new mutations of the HFE, hepcidin, and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload*. *Clin Chem*, 2003. **49**(12): p. 1981-8.
71. Rueda Adel, C., et al., *Mutations in HFE and TFR2 genes in a Spanish patient with hemochromatosis*. *Rev Esp Enferm Dig*, 2011. **103**(7): p. 379-82.
72. Mendes, A.I., et al., *Non-classical hereditary hemochromatosis in Portugal: novel mutations identified in iron metabolism-related genes*. *Ann Hematol*, 2009. **88**(3): p. 229-34.