



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΙΝΟΚΥΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟ»**

**ΚΑΛΛΙΤΗ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ  
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΣΕΖΟΥ Α. (Επιβλέπουσα)**

**ΤΖΕΤΗ Μ.(Μέλος)**

**ΓΙΑΠΙΤΖΑΚΗΣ Χ. (Μέλος)**

**ΛΑΡΙΣΑ 2017**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«MODIFYING GENES/FACTORS IN CYSTIC FIBROSIS»**

<b>Περιεχόμενα</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ</b>	<b>10</b>
<b>I.1. Ιστορική Αναδρομή</b>	
<b>I.2.Επιδημιολογία</b>	
<b>I.3.Γονίδιο CFTR και Διαμεμβρανική Πρωτεΐνη</b>	
<b>I.4.Παθοφυσιολογία</b>	
<b>I.5.Οι Μεταλλάξεις του Γονιδίου CFTR</b>	
<b>I.6.Κλινική Συμπτωματολογία</b>	
<b>I.7.Διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης</b>	
<b>I.8.Συσχέτιση Γονότυπου-Φαινότυπου</b>	
<b>I.9.Πρόγνωση-Θεραπεία</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: Τροποποιητικά Γονίδια του Φαινότυπου της</b>	
<b>Κυστικής Ίνωσης</b>	<b>26</b>
<b>II.1.Αναπνευστικός Φαινότυπος</b>	
<b>II.2.Γαστρεντερικός Φαινότυπος</b>	
<b>II.3.Διαβήτης της Ινοκυστικής νόσου</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ III :Υποψήφια τροποποιητικά γονίδια</b>	<b>35</b>
<b>III.1.Αναπνευστικός φαινότυπος</b>	
<b>III.1.1: Mannose Binding Lectin (MBL)</b>	
<b>III.1.2: Αυξητικός Παράγοντας Μετασχηματισμού (TGF-b1)</b>	
<b>III.1.3: Συνθετάση του Νιτρικού οξέος</b>	
<b>III.1.4: α-1 Αντιθρυψίνη</b>	

<b>III.1.5: Human Leykocyte Antigen</b>	
<b>III.1.6: Παράγοντας Νέκρωσης των όγκων</b>	
<b>III.1.7: Τρανσφεράση της γλουταθειόνης</b>	
<b>III.1.8: Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: Άλλα τροποποιητικά γονίδια</b>	<b>43</b>
<b>IV.1:Γαστρεντερικός Φαινότυπος</b>	
<b>IV.1.1:Διαβήτης Συσχετιζόμενος με την Κυστική Ίνωση</b>	
<b>IV.1.2:Ηπατική Νόσος Συσχετιζόμενη με την Κυστική Ίνωση</b>	
<b>IV.1.3:Σοβαρότητα της Ινοκυστικής Νόσου</b>	
<b>IV.1.4:Περιβαλλοντικοί Τροποποιητικοί Παράγοντες</b>	
<b>V: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>48</b>
<b>VI: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>49</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Κυστική Ίνωση αποτελεί την πιο διαδεδομένη κληρονομική και παράλληλα θανατηφόρα ασθένεια της λευκής φυλής, οι εκδηλώσεις της οποίας εμφανίζονται συνήθως κατά την πρώιμη παιδική ηλικία ή ακόμα και κατά τη γέννηση. Πρόκειται για ένα μονογονιδιακό νόσημα που μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και σχετίζεται με μεταλλάξεις στο CFTR γονίδιο του χρωμοσώματος 7, το οποίο κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CFTR που δρα ως διάυλος ιόντων χλωρίου. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί περισσότερες από 1300 μεταλλάξεις του γονιδίου, η συχνότερη εκ των οποίων είναι η ΔF508 που εμφανίζεται στο 70% των περιπτώσεων σε πληθυσμούς της Βόρειας Ευρώπης και περίπου 30-50% σε πληθυσμούς της Νότιας Ευρώπης. Το βασικό παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η διαταραχή στη μεταφορά ιόντων χλωρίου στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και η δημιουργία παχύρρευστης βλέννης που συσσωρεύεται στο επιθήλιο διαφόρων οργάνων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πάθηση χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο, καθώς επίσης η βαρύτητα των συμπτωμάτων και ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών. Συγκεκριμένα, μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε εσωτερικό όργανο, αλλά συνήθως πλήττει το αναπνευστικό σύστημα, το πάγκρεας, το έντερο και το ήπαρ και μεταξύ των εκδηλώσεων συγκαταλέγονται η χρόνια βρογχίτιδα, η παγκρεατική ανεπάρκεια, ο νεανικός διαβήτης και σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται ειλεός ή κίρρωση του ήπατος. Η φαινοτυπική ετερογένεια της κυστικής ίνωσης αποδίδεται αφενός στο μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων του CFTR γονιδίου και αφετέρου στη δράση περιβαλλοντικών παραγόντων όπως το κάπνισμα και η επίδραση της θεραπείας, αλλά και σε αλληλεπιδράσεις της CFTR πρωτεΐνης με άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει και τη συμβολή τροποποιητικών γονιδίων, καθώς και μεταλλάξεων σε αυτά, στην ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει την πάθηση ως προς τα συμπτώματα και τη βαρύτητα αυτών. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση και παρουσίαση μελετών που έχουν αναδείξει ένα σημαντικό αριθμό τροποποιητικών γονιδίων και παραγόντων, καθώς και την επίδρασή τους στο φαινότυπο της κυστικής ίνωσης. Ο αναπνευστικός φαινότυπος έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, καθώς αποτελεί την κυριότερη εκδήλωση της νόσου, ενώ σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται επηρεάζεται περισσότερο από τη δράση άλλων γονιδίων εκτός του CFTR. Τα γονίδια αυτά ενέχονται σε διαδικασίες που αφορούν την φλεγμονώδη

απάντηση, την άμυνα του ξενιστή έναντι σε λοιμωγόνους παράγοντες, τη βλάβη και επιδιόρθωση του επιθηλιακού ιστού, καθώς και την μεταφορά ιόντων. Μέχρι σήμερα, στα πλαίσια μελετών σχετικά με την κυστική ίνωση, η ανάδειξη και χαρτογράφηση όλο και περισσότερων τροποποιητικών γονιδίων παρέχει μια πιο εις βάθος εικόνα του φαινοτύπου της νόσου υποδηλώνοντας ότι η γενετική προσέγγιση είναι σημαντική στην ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων και μεθόδων. Η πρόοδος της γενετικής και η βελτίωση των κοινωνικοοικονομικών συνθηκών, καθώς επίσης και των υποστηρικτικών θεραπευτικών μέσων των πασχόντων από κυστική ίνωση φέρουν ελπιδοφόρο μήνυμα για την έκβαση της νόσου στις επόμενες δεκατίες.

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is associated with high morbidity rates and it is considered to be the most common inherited disease among Caucasians. CF complications usually occur throughout early childhood or even at birth. CF is a monogenic disorder with an autosomal recessive inheritance pattern and it is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. CFTR gene is located in chromosome 7 and encodes an ion-channel transmembrane protein (CFTR protein). To date, several studies have reported more than 1300 mutations in the CFTR gene, the most common of which is the mutation F508del ( $\Delta$ F508), which accounts for approximately 70% in Northern European populations and with frequency from 30-50% for Southern Europe. Key pathological features of the disease is the deregulated chloride-ion transport at the membrane of epithelial cells, as well as the formation of thickened and sticky mucus, which is accumulated in the epithelium of various organs. Interesting is the fact that CF is characterized by great heterogeneity regarding the clinical phenotype, as well as the severity of symptoms and the disease's progression rate varies significantly among patients. Specifically, CF can affect multiple internal organs, but particularly the respiratory system, pancreas, the gastrointestinal tract and the liver. The most common symptoms of the disease include chronic bronchitis, pancreatic insufficiency, juvenile diabetes and in rare cases ileus and liver cirrhosis. The heterogeneous range of phenotypes can be attributed to several factors such as mutations in the CFTR gene, environmental factors including smoking and the beneficial or harmful effects of treatment, as well as interactions between CFTR and other transmembrane proteins. Moreover, studies point towards the direction that non-CFTR genes and specifically modifier genes and their mutations provide a further explanation regarding the variety of the symptoms and their severity in cystic fibrosis. The aim of present thesis is the review of the studies that have revealed a significant number of modifier genes and factors in CF, as well as their contribution to the disease's clinical features. The respiratory phenotype is the most well studied, as it is considered to be one of the major pathological consequences of cystic fibrosis, as well as appears to be the most affected by modifier genes. The majority of these genes are involved in immune and inflammatory responses, damage and repair of epithelial tissue, as well as ion transport.

Candidate gene studies in combination with genome wide association studies have reported several modifier genes in CF providing a more in depth picture of the disease's phenotypes indicating the importance of the genetic influence in cystic fibrosis and its role in the development of new therapeutic approaches. The progress of genetics and the improvement of the socio-economic and therapeutic conditions regarding cystic fibrosis provide a promising future and outcome for CF patients.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυστική ίνωση (CF) είναι η πιο κοινή θανατηφόρα νόσος, η συχνότητα της οποίας εκτιμάται στο 1 στα 3200 νεογνά στον Καυκάσιο πληθυσμό. Πρόκειται για μία πάθηση που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομηκότητας, όπου οι εκδηλώσεις της νόσου αφορούν πολλαπλά συστήματα του οργανισμού και ποικίλλουν μεταξύ των ατόμων, ακόμη και σε άτομα που είναι ομόζυγα για την πιο συχή μετάλλαξη της κυστικής ίνωσης, την ΔF508del (Rosenstein et al 1998, Knowles MR et al 2002). Η βελτίωση της ιατρικής περίθαλψης τις τελευταίες δεκαετίες αύξησε το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς από λιγότερο από 5 έτη στη δεκαετία του 1940 έως τα 37 έτη που υπολογίζονται σήμερα για τους πάσχοντες από κυστική ίνωση αποδεικνύοντας ότι το γενετικό υπόστρωμα των ασθενών αλλά και μη γενετικοί παράγοντες καθορίζουν το έκβαση της νόσου. Ορόσημα γεγονότα για την κυστική ίνωση συνιστούν η βελτίωση της συμπτωματικής θεραπείας, όπου από τα μέσα της δεκαετίας του 1950 έχει καθιερωθεί η χρήση αντιβιοτικών καθώς και από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 η ανάπτυξη εξειδικευμένων φαρμάκων όπως παγκρεατικά ένζυμα που συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς (David PB et al 2006). Κεντρικές διαφορές στην ποιότητα της περίθαλψης και η επιρροή της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης διαδραμάτισαν βασικό ρόλο στην πορεία της νόσου και υπογραμμισαν επιπλέον την επιρροή των μη κληρονομικών παραγόντων στις εκδηλώσεις της νόσου. Συνεπώς, η προσπάθεια να αποκαλυφθεί το κλινικό νόημα των τροποποιητικών γονιδίων απαιτεί να ληφθούν υπόψη και να συσχετιστεί το γενετικό υπόστρωμα των ασθενών αλλά και οι μη γενετικοί παράγοντες όπως το περιβάλλον και η περίθαλψη (Cutting G Retal 2010).

Βασικό χαρακτηριστικό της αιτιοπαθογένειας της κυστικής ίνωσης αποτελούν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR στο χρωμόσωμα 7 που οδηγούν σε δυσλειτουργία του CFTR διαύλου ιόντων χλωρίου και κατ'επέκταση διαταραχή της ομοιόστασης ιόντων και ύδατος στις επιθηλιακές επιφάνειες (Ooi CY et al 2011, Watelet JB et al 2000). Η διαταραχή της ομοιόστασης του ύδατος από την πρωτεΐνη CFTR εξηγεί το αυξημένο ιξώδες της βλέννης που αποτελεί τη βάση για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου. Οι επιπτώσεις του στα όργανα που πλήττονται περισσότερο όπως η αναπνευστική οδός και ο γαστρεντερικός σωλήνας εκτιμούνται με τη ρινική μέτρηση δυνητικών διαφορών (NPD) και μετρήσεις εντερικού ρεύματος (ICM). Επιπλέον, μελέτες υποδεικνύουν ότι η κυστική ίνωση αποτελεί μία πάθηση που χαρακτηρίζεται από

σημαντική ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο, γεγονός που αποδίδεται σε μεταλλάξεις του CFTR γονιδίου, αλλά επίσης και στη δράση περιβαλλοντικών παραγόντων και τροποποιητικών γονιδίων υποδεικνύοντας και το σημαντικό ρόλο των τελευταίων στην παθολογία της νόσου. Δεδομένα που αναδεικνύουν συσχέτιση του γονοτύπου με το φαινότυπο επιτρέπουν και την ανάδειξη του ρόλου των τροποποιητικών γονιδίων στην πάθηση, παρέχοντας μια πιο εις βάθος εικόνα σχετικά με τη γενετική συνιστώσα της κυστικής ίνωσης(Bombieri C et al 2011).

## **I.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

Οι πρώτες αναφορές της κυστικής ίνωσης εντοπίζονται στις αρχές του 1900 και συγκεκριμένα, η πρώτη περιγραφή της νόσου υπολογίζεται το 1928 από τον Ελβετό παιδίατρο Guido Fanconi, ενώ το 1938 η Dorothy Hansine Andersen του Πανεπιστημίου της Columbia δημοσίευσε την πρώτη αναλυτική περιγραφή των συμπτωμάτων της κυστικής ίνωσης. Ήταν η πρώτη η οποία εκτός από την περιγραφή των συμπτωμάτων της κυστικής ίνωσης συσχέτισε την πνευμονοπάθεια και την εντερική νόσο με την κυστική ίνωση και διατύπωσε την υπόθεση ότι πως πρόκειται για πάθηση με υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας(Busch R et al 1999).

Όσο αφορά στη διάγνωση της νόσου, τα διαγνωστικά τεστ ιδρώτα εισήχθησαν το 1953 όταν ο di Sant' Agnese παρατήρησε μεγάλο έλλειμμα νατρίου και χλωρίου καθώς επίσης και σοβαρές ηλεκτρολυτικές διαταραχές σε παιδιά που έπασχαν από κυστική ίνωση κατά τη θερινή περίοδο(Kerem B et al 1989).

Το 1989 ταυτοποιήθηκε το υπεύθυνο γονίδιο για την κυστική ίνωση και περιγράφηκε η παραγόμενη ελαττωματική πρωτεΐνη η οποία μεταξύ άλλων είχε σημαντικό ρόλο στο κανάλι των ιόντων χλωρίου.

Μέχρι το τέλος του 2000 υπήρχαν οι πρώτες οργανωμένες συμπτωματικές θεραπείες για τους πάσχοντες από κυστική ίνωση.

Όσο αφορά την πιο συχνά απαντούμενη μετάλλαξη ΔF508 εκτιμάται ότι υπάρχει τουλάχιστον από 3000 έως 40000 χρόνια πριν, περίπου δηλαδή από τη Νεολιθική εποχή χωρίς όμως να είναι σαφές με ποιον τρόπο μια τέτοια μετάλλαξη κατάφερε να επιβιώσει στο γονιδίωμα των ανθρώπων τόσους αιώνες.

Η μέση επιβίωση των ασθενών με κυστική ίνωση κυμαινόταν από λιγότερο από μισή δεκαετία το 1960 ενώ στα τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα έφτασε σε ορισμένες χώρες μέχρι και τα 40 έτη(Dodge J .2015)

## **I.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Η ινοκυστική νόσος αποτελεί την πιο κοινή αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο που προκαλεί μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης σε άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής (Tobias et al. 2011). Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ), ετησίως διαγιγνώσκονται 30000 ασθενείς όπου η πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει διαγνωστεί μέχρι την ηλικία των 6 μηνών, ενώ στο Καναδά ο αριθμός των ασθενών ανέρχεται στα 4000 άτομα, καθώς επίσης φαίνεται ότι η νόσος πλήττει με την ίδια συχνότητα γυναίκες και άνδρες. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν ότι ο 1 στους 25 Ευρωπαίους και 1 στους 30 Καυκάσιους Αμερικανούς (Cystic Fibrosis Foundation) είναι φορείς τουλάχιστον μιας μετάλλαξης της κυστικής ίνωσης (Rosenstein and Cutting 1998; Hamosh et al. 1998) ενώ η Ιρλανδία έχει την μεγαλύτερη σε παγκόσμιο επίπεδο επίπτωση της κυστικής ίνωσης με 1 στους 1353 (Farrell et al. 2007). Η ινοκυστική νόσος συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο διαδεδομένων γενετικών ασθενειών που μειώνουν το προσδόκιμο επιβίωσης σε έθνη του δυτικού κόσμου, με εξαίρεση τη Φινλανδία όπου μόνο 1 στους 80 φέρει μια μετάλλαξη της κυστικής ίνωσης (Hytönen et al. 2001).

Επιπροσθέτως, πληθυσμιακές μελέτες υποστηρίζουν ότι η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων αλληλομόρφων της κυστικής ίνωσης ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Συγκεκριμένα, η συχνότητα των φορέων της μετάλλαξης F508del έχει υπολογιστεί σε 1:200 στην βόρεια Σουηδία, 1:143 στην Λιθουανία και 1:38 στη Δανία, καθώς επίσης η συχνότητα εμφάνισής της στην Ευρώπη παρουσιάζει μείωση από τον βορρά προς το νότο (30-90%) με αποτέλεσμα να έχουμε την αύξηση στη συχνότητα άλλων μεταλλάξεων στο παθολογικό γονίδιο. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις που απαντώνται στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες σε συχνότητα >1% είναι οι p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.G551D και p.W1282X, ενώ επίσης έχουν παρατηρηθεί άλλες 19 με συχνότητα 0,1-1% οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη πληθυσμιακή ετερογένεια και εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, Bobadilla et al. 2002; Estivill et al. 1997).

Σημαντικό όμως μειονέκτημα της ύπαρξης πολλών μεταλλάξεων στο γονίδιο του CFTR είναι η δυσκολία στη μοριακή διάγνωση της νόσου όπως στην περιοχή της Μεσογείου όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη ποικιλομορφία μεταλλάξεων καθιστώντας δύσκολη την μοριακή γενετική διάγνωση των ασθενών (Kanavakis et al. 2003).

### **1.3. ΓΟΝΙΔΙΟ CFTR ΚΑΙ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ**

Όπως έχει προαναφερθεί, το γονίδιο που ενέχεται στην παθοφυσιολογία της κυστικής ίνωσης είναι το CFTR και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7q31. Η κωδική περιοχή του γονιδίου απαρτίζεται από 27 εξόνια και τελικά κωδικοποιεί τη CFTR διαμεμβρανική πρωτεΐνη (Clain J et al., 2005), μία διαδικασία που ρυθμίζεται από την Α πρωτεϊνική κινάση και είναι άμεσα εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP. Μελέτες έχουν δείξει ότι έκφραση του γονιδίου CFTR εντοπίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα πολλών οργάνων όπως στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στο δέρμα, καθώς επίσης και στην πεπτική οδό και αναπαραγωγικό σύστημα, ενώ ο λειτουργικός του ρόλος έγκειται στην αποβολή του χλωρίου από τα κύτταρα στη βλέννη, η οποία έχει καλυπτικό και προστατευτικό ρόλο για αυτά.

Κύρια λειτουργία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR είναι να ρυθμίζει τα κανάλια νατρίου (Na), καλίου (K) και χλωρίου (Cl), που ενεργοποιούνται μέσω του ασβεστίου (Ca) (Anderson MP and Welsh MJ., 2012), έτσι ώστε να περιορίζεται η διακίνηση του νατρίου. Επιπλέον, το γονίδιο CFTR επηρεάζει και την παραγωγή πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαδικασίες ωρίμανσης, μεταφοράς ιόντων αλλά και της φλεγμονώδους αντίδρασης, γεγονός που σε συνδυασμό με τα παραπάνω εξηγεί τη μεγάλη ετερογένεια στον κλινικό φαινότυπο ασθενών ακόμη και αυτών που είναι φορείς της ίδιας μετάλλαξης. Διαταραχές στη λειτουργία της διαμεμβρανικής CFTR πρωτεΐνης προκαλούν μεγάλη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) στον ιδρώτα, γεγονός που αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη του test ιδρώτα που πραγματοποιείται πριν από οποιονδήποτε γενετικό έλεγχο όταν υπάρχει υποψία της νόσου. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και τη λειτουργία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR διαδραματίζουν και τμήματα της δομής της. Ειδικότερα, αποτελείται από δύο ομόλογες περιοχές που διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δύο υδρόφιλες περιοχές NBD όπου συνδέεται η ATP και η ρυθμιστική περιοχή R. Η τελευταία ενέχεται σημαντικά στη λειτουργία και ρύθμιση της πρωτεΐνης. Εντοπίζεται

μεταξύ των περιοχών NBD και διαφέρει σημαντικά από τα υπόλοιπα τμήματα της πρωτεΐνης έχοντας περισσότερες υδρόφιλες περιοχές και φορτισμένα υπολείμματα, ενώ είναι χαρακτηριστική της CFTR πρωτεΐνης. Εντοπίζεται μεταξύ των θέσεων 590 και 831 και κωδικοποιείται από το εξόνιο 13 του αντίστοιχου γονιδίου. Έχει την ικανότητα φωσφορυλίωσης δεδομένου ότι φέρει θέσεις για φωσφορυλίωση από τις PKA και PKC πρωτεϊνικές κινάσες, και με αυτόν τον τρόπο ενέχεται σημαντικά στη λειτουργία και τη ρύθμιση της CFTR πρωτεΐνης (Dean M, and Allikmets R., 2001) (Chappe V et al., 2003). Αποτελεί περιοχή που έπειτα από έρευνες έχει αποδειχθεί ότι δεν διατηρεί σταθερή τρισδιάστατη πτυχή αλλά ούτε και σταθερή δευτεροταγή δομή. Η διαταραγμένη περιοχή R είναι πολύ πιο μεταβλητή από άλλες περιοχές όπου η πρωτεΐνη απλώς αναδιπλώνεται. Πρόκειται για έναν δυναμικό κόμβο που ενέχεται στις διάφορες αλληλεπιδράσεις της CFTR πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να αποτελεί κέντρο ελέγχου για τις βιολογικές της δράσεις καθώς και την διατήρηση της ισορροπίας των ιόντων στην κυτταρική μεμβράνη (Marasini C, Galeno L and Moran O, 2012)

Σε φυσιολογικές συνθήκες, εξωκυττάρια σήματα επάγουν την έκφραση του CFTR γονιδίου προωθώντας τη μεταγραφή του σε mRNA (Cutting GR, 2015). Το προκύπτον νηματοειδές πρότυπο μεταναστεύει μέσω των νουκλεοτιδικών πόρων για να αλληλεπιδράσει στη συνέχεια με τα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Εδώ σε συνδυασμό με το tRNA, το CFTR γονίδιο μεταφράζεται σε μια αλληλουχία αμινοξέων (Rogan MP et.al, 2011). Ακολουθώντας τα περειαίρω βήματα ωρίμανσης της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η CFTR πρωτεΐνη μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi προκειμένου να υποστεί μετα-μεταφραστική τροποποίηση και να πακεταριστεί σε μεταφορικά κυστίδια. Τελικώς, το κανάλι μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια για να εκφραστεί στην ακραία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (Mac Donald KD et al, 2007). Οι μεταλλάξεις στο CFTR γονίδιο μπορούν να επηρεάσουν κάθε βήμα της πρωτεϊνικής σύνθεσης, από την μεταγραφή του γονιδίου έως τη μετάφραση της πρωτεΐνης, την αναδίπλωση, και την διακίνηση αλλά και την έκφραση του καναλιού στην κυτταρική επιφάνεια (Nico D., 2013).

Η μεταλλαγμένη μορφή της CFTR πρωτεΐνης καθιστά τους διαύλους μη διαπερατούς στα ιόντα χλωρίου. Επιπρόσθετα επειδή η μεταφορά χλωρίου συνδέεται άμεσα με τη μεταφορά ιόντων νατρίου και άρα τη μεταφορά του νερού, οι ασθενείς δεν εκκρίνουν επαρκείς ποσότητες χλωριούχου νατρίου και νερού και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εκκρίνουν παχύρρευστη βλέννη, η οποία παρεμποδίζει τις φυσιολογικές αναπνευστικές

διαδικασίες του πνεύμονα ο οποίος σταδιακά στερείται της ελαστικότητας του. Η παχύρρευστη βλέννη παρεμποδίζει και τη ροή των παγκρεατικών εκκρίσεων διαμέσου του παγκρεατικού πόρου.

#### **I.4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΙΝΟΚΥΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η κυστική ίνωση είναι μία πάθηση που προσβάλλει πολλά όργανα του ανθρωπίνου σώματος. Οι πάσχοντες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια όσο αφορά στα συμπτώματα της νόσου, τη βαρύτητα αυτών αλλά και το ρυθμό εξέλιξης αυτής. Κύρια χαρακτηριστικά της παθολογίας της κυστικής ίνωσης είναι οι διαταραχές στη μεταφορά ηλεκτρολυτών και κυρίως νατρίου και χλωρίου μέσω των επιθηλιακών κυττάρων που αποικίζουν την αναπνευστική, πεπτική και γεννητική οδό. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η μείωση στην ποσότητα του νερού στο υγρό που περιβάλλει τους αεραγωγούς, καθώς επίσης παρατηρείται απόφραξη αυτών λόγω της παχύρρευστης βλέννης που εκκρίνεται και προκαλεί απόφραξη των εξωκρινών αδένων (McAuley DF et al.2000). Από τις παραπάνω διαταραχές προσβάλλονται κυρίως οι πνεύμονες δεδομένου ότι οι παχύρρευστες εκκρίσεις αποφράζουν τους άπω αεραγωγούς και τους υποβλεννογόνιους αδένες, με αποτέλεσμα τη διάταση των πόρων των αδένων αλλά και την κάλυψη της επιφάνειας των αεραγωγών με πλούσια σε πολυμορφοπύρηνα παχύρρευστα κολλώδη, βλεννοπυώδη επιχρίσματα. Επιπρόσθετα, υπάρχει υπερπλασία των υποβλεννογόνιων αδένων οι οποίοι περιβάλλονται από περιβρογχική φλεγμονή με αποτέλεσμα το σχηματισμό ουλώδους ιστού σε τελικό στάδιο (Zielenski J et al 2000), ενώ σύνηθες εύρημα είναι οι ασθενείς να εμφανίζουν οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω πνευμονίας. Η πρωταρχική, βέβαια αλλαγή που συναντάμε στους πνεύμονες, στα νεογνά και στα παιδιά είναι η διαυγαστική διάταση, λόγω της παθολογικής βλέννης που εντοπίζεται στους πόρους των υποβλεννογόνιων αδένων, κάτι η οποία φυσιολογικά δεν συναντάται. Η αναπνευστική λειτουργία φθίνει λόγω της εκτεταμένης και χρόνιας αντίδρασης των αεραγωγών. Τα έντονα φλεγμονώδη φαινόμενα αιτιολογούνται ως κύρια αντίδραση των αεραγωγών των ασθενών στις λοιμώξεις στις οποίες οι ασθενείς με κυστική ίνωση είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς. Οι ελαστάσες και οι πρωτεάσες οι οποίες είναι απαραίτητη άμυνα έναντι αυτών των μικροβίων απελευθερώνονται κατά την διάρκεια της φαγοκυττάρωσης και κατά τον κυτταρικό θάνατο, ενώ στη συνέχεια ξεφεύγουν από την αντιπρωτεασική άμυνα και συσσωρεύονται στους προαναφερθέντες αεραγωγούς των ασθενών περιορίζοντας έτσι την λειτουργία του

κροσσώτου επιθηλίου και εμποδίζοντας την απομάκρυνση των μικροβίων καταστρέφοντας εν τέλει τις δομικές πρωτεΐνες και δημιουργώντας βρογχεκτασίες. Αρχικά ο πνεύμονας επιχειρεί να αμυνθεί μέσω της α1- αντιθρυψίνης η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει τις ελεύθερες ελαστάσες και να τις αδρανοποιεί. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ιντερλευκίνης-8 και 6, παράγοντα-α της νέκρωσης όγκων στους αεραγωγούς τους.

Στις εκκρίσεις των ασθενών ανευρίσκονται πολλά παθογόνα μικρόβια τα οποία δεν είναι εφικτό να εκριζωθούν αποτελεσματικά. Μερικά από αυτά είναι η *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και η *Burkholderia cepacia*.

Όσο όμως αφορά τους ιδρωτοποιούς αδένες των ασθενών αυτών σε αντίθεση με άλλα όργανα του ανθρώπινου σώματος ούτε αποφράσσονται, ούτε εμφανίζουν ιδιαίτερες παθολογοανατομικές ανωμαλίες. Επιπλέον, το πάγκρεας συνιστά ένα όργανο που επηρεάζεται από διαταραχές της λειτουργίας του γονιδίου CFTR. Οι εξωκρινείς ιδιότητες του παγκρέατος είναι υπεύθυνες για την παραγωγή ενζύμων που καταλύουν την πέψη των τροφίμων στον εντερικό αυλό και κατά συνέπεια η εξωκρινής παγκρεατική ανεπάρκεια συνιστά γνωστή επιπλοκή της κυστικής ίνωσης. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση των πεπτικών ενζύμων που παρέχονται από το πάγκρεας με αποτέλεσμα αυτό να εκκρίνει μία παχιά βλέννα που εμποδίζει τους παγκρεατικούς αγωγούς. Συνήθως, δυσλειτουργία του παγκρέατος στη νόσο αποδίδεται σε μεταλλάξεις του αντίστοιχου γονιδίου. Επιπλέον, η παγκρεατική ανεπάρκεια θεωρείται η κύρια αιτία της εντερικής δυσαπορρόφησης στη νόσο επηρεάζοντας ένα ποσοστό της τάξεως του 85-90% των ασθενών. Το προαναφερθέν χαρακτηριστικό αποτελεί γνώρισμα της πρώιμης έναρξης της πάθησης και σχετίζεται κλινικά με απώλεια βάρους ή δυσκολία στην αύξηση αυτού, καθώς επίσης και δυσκολία στην απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών A, D, E και K. (Corey M et al 2001).

## **I.5. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CFTR**

Η πρώτη μετάλλαξη που ταυτοποιήθηκε ως συσχετιζόμενη με τη νόσο και παράλληλα η πιο συχνή στον γενικό πληθυσμό είναι η απουσία μιας φαινυλαλανίνης στη θέση 508 και συγκεκριμένα στην πρώτη περιοχή σύνδεσης πρωτεΐνης – ATP, και είναι γνωστή ως ΔF508 (Denning et al.,1992). Όλες οι υπόλοιπες μεταλλάξεις είναι εξαιρετικά σπάνιες και μόνο 7 εξ αυτών ξεπερνούν το ποσοστό 0,5% στη συχνότητα εμφάνισής τους (Boyle, 2003; Rosenstein, 2003).

Οι μεταλλάξεις της νόσου έχουν ταξινομηθεί σε έξι ομάδες και οι οποίες επιφέρουν διαφορετικό αποτέλεσμα στην εξέλιξη της νόσου, καθώς και στον κλινικό φαινότυπο αυτής. (Εικόνα 2). Ειδικότερα, οι μεταλλάξεις που συγκαταλέγονται στην πρώτη τάξη επηρεάζουν την παραγωγή της πρωτεΐνης διότι δημιουργείται ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή της πρωτεΐνης CFTR, ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου μεταλλάξεις της συγκεκριμένης κατηγορίας ενοχοποιούνται για μηδενική σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Επιπλέον, μπορούν να προκαλέσουν και την παραγωγή ασταθών μορίων mRNA. Στην κατηγορία αυτή των μεταλλάξεων οι οποίες σχετίζονται με πιο σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου, ανήκει η μετάλλαξη G542X (Maquat, 1995) .

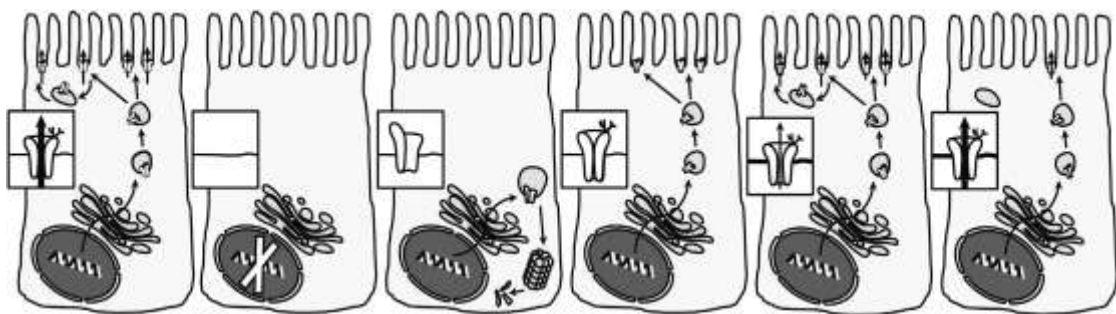
Οι μεταλλάξεις της δεύτερης ομάδας αφορούν την ορθή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και την περαιτέρω τροποποίηση αυτής. Επηρεάζουν κυρίως την ικανότητά της να μεταφερθεί στη μεμβράνη, ενώ έχουν συσχετιστεί με σοβαρές φαινοτυπικές διαταραχές δεδομένου ότι μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα και την απώλεια της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η προαναφερθείσα συνηθέστερη μετάλλαξη ΔF508 , η οποία αποτελεί τη πιο συχνή μετάλλαξη της κυστικής ίνωσης και οδηγεί σε σοβαρή νόσο καθώς επηρεάζει τη δομή και τον τρόπο αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. (Mendoza et al., 2012; Rabřeh et al., 2012). Η ΔF508 μετάλλαξη αφορά την απαλοιφή τριών νουκλεοτιδίων (CTT), η οποία εντοπίζεται στο εξόνιο 10 του γονιδίου CFTR. Αποτέλεσμα της απάλειψης των τριών νουκλεοτιδίων είναι η αφαίρεση μιας φαινυλαλανίνης στη θέση 508 στην περιοχή πρόσδεσης του ATP. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη ευθύνεται για διαταραχές στη μεταφορά των ιόντων καθώς το μεταλλαγμένο πεπτίδιο της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης είναι λιγότερο σταθερό σε σύγκριση με το φυσιολογικό πεπτίδιο με αποτέλεσμα να χάνει την ικανότητά του να προσδέσει το ATP. Στη φυσιολογική διαμεμβρανική CFTR πρωτεΐνη το αμινοξύ φαινυλαλανίνη βρίσκεται εντός μιας α-έλικας και συμβάλλει στην διαμόρφωση της NBD1 περιοχής, η οποία αλληλεπιδρά με το δακτύλιο πουρίνης του ATP. Η παθολογική CFTR πρωτεΐνη που παράγεται μέσω της μετάλλαξης ΔF508 οδηγεί σε απαλοιφή της φαινυλαλανίνης με αποτέλεσμα την απώλεια της ελικοειδούς α-δομής εντός της NBD1 περιοχής του CFTR και έτσι το μόριο που προκύπτει είναι δομικά ασταθές και εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στην πρόσδεση ATP. Η συχνότητα της μετάλλαξης ποικίλλει μεταξύ των πληθυσμών, με το μεγαλύτερο επιπολασμό να παρατηρείται σε πληθυσμούς Βορειοδυτικών Ευρωπαίων. Συγκεκριμένα, η συχνότητά της εκτιμάται στο 70-75% σε χώρες τις βόρειας Ευρώπης, ενώ στην Ελλάδα υπολογίζεται στο 54%.



- Οι μεταλλάξεις της τρίτης ομάδας αφορούν τις περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων αλλά και τη ρυθμιστική περιοχή με αποτέλεσμα να προκαλούν διαταραχή στην ρύθμιση της πρωτεΐνης και τον ιοντικών διαύλων. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μετάλλαξη **G551D** (Reddy et al, 2001; Sheppard et al., 1993)

- Οι μεταλλάξεις της τέταρτης ομάδας αφορούν τις διαμεμβρανικές περιοχές και κατά συνέπεια προκαλούν βλάβη στην αγωγιμότητα του χλωρίου (Reddy et al, 2001; Sheppard et al., 1993) ενώ οι μεταλλάξεις της πέμπτης ομάδας οδηγούν σε μείωση του αριθμού των μεταγραφών του CFTR γονιδίου (Pagani et al, 2004) ) καθώς επηρεάζουν το μάτισμα του πρόδρομου mRNA. Αποτέλεσμα είναι να παράγεται λειτουργική πρωτεΐνη αλλά σε μικρότερη ποσότητα οδηγώντας σε πιο ήπιες εκδηλώσεις της πάθησης.

- Οι μεταλλάξεις της έκτης ομάδας εμπεριέχουν τις συντιθέμενες πρωτεΐνες που προκαλούν αστάθεια στην κυτταρική επιφάνεια και τελικώς καταλήγουν να είναι μη λειτουργικές. Αποτελεί την τάξη με τις σπανιότερα απαντούμενες μεταλλάξεις.



Normal CFTR	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V
<b>Defect</b>	Defective Synthesis	Defective Processing or Maturation	Defective Regulation	Defective Conductance	Reduced Function and Synthesis
<b>Potential Therapy</b>	Read-through Therapy Potentiators NMD inhibitors e.g. ataluren, aminoglycosides	Proteostasis Strategy Correctors (+ potentiators) e.g. lumacaftor, VX-661	Potentiators e.g. ivacaftor	Potentiators e.g. ivacaftor	Splicing Modulators Potentiators
<b>Frequent Mutations</b>	G542X, W1282X, R553X, R1162X, E822X, 1717-1G>A, 711+1G>T, 621+1G>T	F508del, N1303K, I507del, R1066C, S549R, G85E	G178R, G551D, G551S, R560T, V520F, G870R, G1244E, S1255P, G1348D	R117H, R334W, R347P, R1070W	3272-26A>G, 3849+10kC>T, A455E, D565G

Εικόνα 2: Οι τάξεις των κύριων και συχνότερων μεταλλάξεων (1,2,3,4,5) σύμφωνα με τη δομή και τη λειτουργία της CFTR πρωτεΐνης. Η απεικόνιση γίνεται σε επίπεδο κυττάρου για την κάθε μετάλλαξη ξεχωριστά (Fanen P et al. Int J Biochem Cell Biol, Jul;52:94-102, 2014)

## 1.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Το αναπνευστικό επιθήλιο των ασθενών με ινοκυστική νόσο παρουσιάζει σημαντικό βαθμού αδιαβατότητα στο χλώριο και υπέρμετρη επαναπορρόφηση νατρίου. Αυτές οι αλλοιώσεις των βιοηλεκτρικών ιδιοτήτων του επιθηλίου συνεπάγονται σχετική αφυδάτωση των εκκριμάτων των αεροφόρων οδών, με αποτέλεσμα την ελαττωμένη μεταφορική λειτουργία του κροσσωτού επιθηλίου και την απόφραξη των βρόγχων. Αυτό καταλήγει στην ανάπτυξη χρόνιας βρογχικής λοίμωξης (Gaskin et al. 1982). Το αναπνευστικό δένδρο των περισσότερων ασθενών αποικίζεται από αιμόφιλο 18nfluenza, χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο και/ή ψευδομονάδα aeruginosa ( που επικρατεί σε μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς με προχωρημένη νόσο). Η χρόνια βρογχική λοίμωξη προκαλεί βήχα, που αποτελεί και τη συχνότερη αρχική πνευμονική εκδήλωση, αυξημένη παραγωγή εκκριμάτων, υπεραερισμό, βρογχεκτασία και τελικά πνευμονική ανεπάρκεια και θάνατο. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με σημαντική πνευμονική νόσο παρουσιάζουν πληκτροδακτυλία (Ratjen et al 2003; Turcios et al 2005).

Οι περισσότεροι ασθενείς με κυστική ίνωση παρουσιάζουν πρόιμη ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος λόγω συμύκνωσης της βλέννης στους εκφορητικούς παγκρεατικούς πόρους και στη συνέχεια αυτοπεψίας του οργάνου. Στον ασθενή που δεν βρίσκεται σε θεραπευτική αγωγή, η διαταραχή της πέψης συνοδεύεται από δευτεροπαθή δυσαπορρόφηση με αποτέλεσμα τη στεατόρροια, την απώλεια αζώτου με τα κόπρανα και τις διάφορες δευτεροπαθείς ανεπάρκειες βιταμινών όπως της βιταμίνης Κ,Α,Ε και D. Η δυσαπορρόφηση των θρεπτικών ουσιών προκαλεί υποθρεψία παρά την υπέρμετρη όρεξη του ασθενούς. Περίπου 10% των ασθενών γεννώνται με εντερική απόφραξη λόγω συμύκνωσης μηκωνίου. Στους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας είναι δυνατό να παρουσιασθεί εντερική απόφραξη λόγω της κακής πέψης και της παρουσίας παχύρρευστης βλέννης στον εντερικό αυλό. Παρόμοια κατάσταση μπορεί να παρατηρηθεί και μετά από διαιτητικές παρεκτροπές ή σε περιπτώσεις ανεπαρκούς αναπλήρωσης των παγκρεατικών ενζύμων. Σε μερικούς εφήβους και ενήλικες ασθενείς διαπιστώνεται σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης η οποία όμως αν και μπορεί να εκδηλωθεί με συμπτωματική υπεργλυκαιμία σπανίως συνοδεύεται από κετοξέωση (Ratjen et al 2003; Feranchak et al 2004; Milla et al 1998; Mickle et al 1998; Riedel et al 1997).

Όπως συμβαίνει στο αναπνευστικό και στο πεπτικό σύστημα, η παρουσία παχύρρευστης βλέννης μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Οι

γυναίκες με ινοκυστική νόσο εμφανίζουν παθολογική τραχηλική βλέννη και υπογονιμότητα ωστόσο μερικές από αυτές αποκτούν παιδιά. Συχνά παρατηρείται δευτεροπαθής αμηνόρροια λόγω της χρόνιας νόσου και του σημαντικά ελαττωμένου σωματικού βάρους. Οι άνδρες εμφανίζουν σχεδόν πάντοτε αζωοσπερμία και ατροφία ή έλλειψη του σπερματικού πόρου.

Η αδυναμία των πόρων των ιδρωτοποιών αδένων να συγκρατήσουν το χλωριούχο νάτριο είναι δυνατό να προκαλέσει εξάντληση από υπερβολική θερμότητα ή ανεξήγητη υποχλωρειαμική αλκάλωση στα μικρά βρέφη χωρίς όμως σοβαρές κλινικές επιπλοκές.

Η κυστική ίνωση είναι χρόνια πάθηση που εξελίσσεται ύπουλα παρουσιάζοντας πολλές επιπλοκές που οφείλονται στην ιξώδη βλέννη, στη δυσαπορρόφηση και στις λοιμώξεις (Rosenstein BJ et al 1998).

## **I.7. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ**

Το ενδεχόμενο της ινοκυστικής νόσου πρέπει να εξετάζεται σοβαρά σε κάθε περίπτωση ασθενούς με χρόνια ή υποτροπιάζουσα αναπνευστικά ή γαστρεντερικά συμπτώματα. Για να τεθεί η διάγνωση, η συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα πρέπει να υπερβαίνει τα 60 mEq/L σε δυο ξεχωριστές μετρήσεις στις οποίες έχει συγκεντρωθεί επαρκής ποσότητα ιδρώτα. Για να είναι αξιόπιστη η μέτρηση θα πρέπει να έχουν συλλεγεί τουλάχιστον 75mg και κατά προτίμηση περισσότερα των 100mg ιδρώτα. Εκτός από τους αυξημένους ηλεκτρολύτες στον ιδρώτα ο ασθενής πρέπει να έχει 1) χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια 2) ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος ή 3) επιβεβαιωμένο οικογενειακό ιστορικό τυπικής ινοκυστικής νόσου σε αδελφό ή πρώτο εξάδελφο. Αν και η μέτρηση των ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα είναι ειδική για την ινοκυστική νόσο, η εκτέλεση της εξέτασης παρουσιάζει πολλά τεχνικά προβλήματα και είναι αξιόπιστη μόνο σε εργαστήρια που την εφαρμόζουν συχνά και με σχολαστικό ποιοτικό έλεγχο. Ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να παρατηρηθούν σε ορισμένες κλινικές καταστάσεις. Μικρός αριθμός ασθενών μπορεί να έχει τυπικά αλλά ήπια συμπτώματα και οριακά ή ακόμα και φυσιολογικά επίπεδα χλωρίου στον ιδρώτα(De Boeck et al. 2006; Farrell et al. 2008).

Άλλες εξετάσεις που μπορεί να βοηθήσουν τη διάγνωση είναι η μέτρηση της βιοηλεκτρικής διαφοράς δυναμικού κατά μήκος του αναπνευστικού επιθηλίου, τα χαμηλά επίπεδα θρυψίνης κοπράνων και η διαπίστωση μιας γνωστής μετάλλαξης της ινοκυστικής νόσου με ανάλυση DNA με μοριακές μεθόδους. Η προγεννητική διάγνωση ενός γνωστού

γονότυπου ινοκυστικής νόσου είναι δυνατή με την εξέταση του αμνιακού υγρού ή της τροφοβλάστης (Knowles MR et al 2002)

## **I.8 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ- ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ**

Η κυστική ίνωση είναι ένα μονογονιδιακό νόσημα με μεγάλη κλινική ετερογένεια η οποία δεν μπορεί να δικαιολογηθεί αποκλειστικά και μόνο από τις μεταλλάξεις του υπεύθυνου *CFTR* γονιδίου. Υπάρχει λοιπόν η υπόθεση ότι στην διαμόρφωση του φαινότυπου της νόσου εμπλέκονται τροποποιητικά γονίδια, περιβαλλοντικοί παράγοντες καθώς και ο συνδυασμός όλων αυτών των παραγόντων (Knowles and Drumm 2012).

Οι μεταλλάξεις του *CFTR* γονιδίου που ανήκουν στις ομάδες 4 και 5 εμφανίζουν ηπιότερο φαινότυπο καθώς συσχετίζονται με υπολειπόμενη *CFTR* λειτουργία και οδηγούν σε παγκρεατική επάρκεια και λιγότερο υψηλά επίπεδα χλωρίου στον ιδρώτα σε αντίθεση με των υπολοίπων ομάδων οι οποίες σχετίζονται με πλήρη ή σχεδόν πλήρη έλλειψη της *CFTR* λειτουργίας (<3%) και οδηγούν σε παγκρεατική ανεπάρκεια, υψηλότερα ποσοστά πνευμονικής λοίμωξης και μεγαλύτερη θνησιμότητα (Kubesch et al. 1993; Koch et al. 2001; Ahmed et al. 2003; McKone et al. 2003; Green et al. 2010). Η παγκρεατική λειτουργία φαίνεται να επηρεάζεται από τον *CFTR* γονότυπο ενώ η αναπνευστική λειτουργία επηρεάζεται περισσότερο από τροποποιητικά γονίδια και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Ferec and Cutting 2012).

Σχεδόν 2.000 διαφορετικές παραλλαγές αλληλουχιών έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής στο *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). Η πιο μοριακή διαταραχή που προκαλεί κυστική ίνωση είναι η μετάλλαξη F508del(c.1521\_1523delCTT, p.Phe508del σύμφωνα με την τρέχουσα τυποποιημένη ονοματολογία), στην οποία η διαγραφή 3 bp στο εξόνιο 10 προκαλεί απώλεια αμινοξέος φαινυλαλανίνης στη θέση 508 της πρωτεΐνης. Παγκοσμίως, αυτό το αλληλόμορφο αντιστοιχεί στο ~60% όλων των χρωμοσωμάτων CF (εύρος 27% -87,5%), με σημαντικά μεταβλητές συχνότητες ανάλογα με τους πληθυσμούς και τις γεωγραφικές θέσεις (Kerem B et al. 1989).

Υπάρχουν άλλες 23 σχετικά κοινές μεταλλάξεις (συχνότητα 0,5%) παγκοσμίως και λίγες μεταλλάξεις με ασυνήθιστα υψηλή συχνότητα σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, γεγονός που υποδηλώνει τη γενετική μετατόπιση. Οι εναπομείνουσες μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν σπάνια ή και μεμονωμένα αλληλόμορφα που κατανέμονται σε ολόκληρο

το γονίδιο (Bobadilla JL et al. 2002). Οι μεταλλάξεις συμβάλλουν στον φαινότυπο από τη φύση και τη θέση τους στο γονίδιο και μπορούν να ταξινομηθούν από τις μοριακές επιδράσεις τους στην CFTR. Οι μεταλλάξεις της Κατηγορίας 1 που ορίζονται ως απώλεια λειτουργίας της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης και αναμένεται να οδηγήσουν σε ένα σοβαρό φαινότυπο. Οι μεταλλάξεις της κατηγορίας 2 προκαλούν λανθασμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (π.χ. F508del), οι μεταλλάξεις της κατηγορίας 3 επηρεάζουν την ενεργοποίηση ή την είσοδο του καναλιού CFTR (π.χ. G551D), οι μεταλλάξεις της κατηγορίας 4 μειώνουν την αγωγιμότητα των ιόντων μέσω του πόρου του καναλιού (π.χ. R117H, R334W, R347P), και οι μεταλλάξεις της κατηγορίας 5 μειώνουν την ποσότητα της λειτουργικής CFTR είτε με μερικώς παρεκκλίνον μάτισμα (π.χ. 3849 + 10kbC.T, 5T) είτε με ανεπαρκή διακίνηση (π.χ. A455E) (Welsh MJ et al. 1993). Η κατηγορία 6 περιλαμβάνει μεταλλάξεις δυσερμηνείας και μετατόπισης πλαισίου (π.χ. Q1412X, 4326delTC, 4279insA) που προκαλούν μια αποκοπή 70-100 bp του C-τερματικού άκρου της CFTR που οδηγεί σε μια αξιοσημείωτη αστάθεια μίας άλλης πλήρως επεξεργασμένης και λειτουργικής πρωτεΐνης και ως συνέπεια ενός σοβαρού φαινοτύπου κυστικής ίνωσης. Οι μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε από τις κλάσεις 2-5 παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών αποτελεσμάτων, καθιστώντας την πρόβλεψη της κλινικής πορείας ενός ασθενούς αδύνατη απλώς με βάση την ταξινόμηση μετάλλαξης (MacDonald KD et al 2007).

Επιπλέον, η πιθανότητα μια μετάλλαξη να συμβάλλει στον φαινότυπο εξαρτάται όχι μόνο από τη φύση της, τον εντοπισμό της στο γονίδιο και τον μοριακό μηχανισμό, αλλά και από την αλληλεπίδραση της με το δεύτερο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο CFTR και από γενετικούς τροποποιητές της ασθένειας. Αν και η CF θεωρείται μονογονιδιακή διαταραχή, μελέτες κλινικού φαινοτύπου σε συσχετισμό με τον γονότυπο έχουν αποκαλύψει μια πολύ περίπλοκη σχέση. Ορισμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προσδιορίζονται στενά από τον γονότυπο με ουσιαστικά μονογονιδιακό τρόπο, ενώ άλλα επηρεάζονται έντονα τόσο από τους τροποποιητικούς γενετικούς παράγοντες όσο και από το περιβάλλον (Haardt M et al. 1999).

Υπάρχει μια στενή σχέση μεταξύ του γονότυπου CFTR και του παγκρεατικού φαινοτύπου, αποκαλύπτοντας τις «σοβαρές» μεταλλάξεις (π.χ. F508del, όλες τις μεταλλάξεις της τάξης 1) που σχετίζονται με την παγκρεατική ανεπάρκεια και τις «ήπιες» μεταλλάξεις, όπως μια σειρά μεταλλάξεων δυσερμηνείας και εναλλακτικού ματίσματος, που σχετίζονται με την εύρυθμη λειτουργία του παγκρέατος (Ferrari M et al. 1996).

Είναι ενδιαφέρον ότι οι πάσχοντες από παγκρεατίτιδα που φέρουν δύο ήπιες μεταλλάξεις CFTR έχουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης παγκρεατίτιδας σε σύγκριση με ασθενείς με μέτριες ή σοβαρές μεταλλάξεις. Από την άλλη πλευρά, λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου και της έκθεσης του ασθενούς σε πλήθος ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, η πνευμονική έκβαση είναι κλινικά η πιο μεταβλητή καθώς και η πιο απρόβλεπτη συνιστώσα του φαινοτύπου CF.

Μελέτες που επικεντρώνονται στην πνευμονική κατάσταση σε συνάρτηση με το αλληλόμορφο F508del ανέφεραν ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων, από ανιχνεύσιμη επίδραση του γονότυπου CFTR σε καθόλου ή στατιστικά ασήμαντες επιδράσεις. Άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν πιο λεπτομερή εκτίμηση των μεταλλάξεων CFTR έχουν δείξει στατιστικά σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ των γονότυπων CFTR και της πνευμονικής κατάστασης, ενώ άλλες δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν μια σημαντική συσχέτιση. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ειδικών γονότυπων και της σοβαρότητας της πνευμονικής νόσου και ότι οι ομόζυγοι ασθενείς για τη μετάλλαξη F508del εμφανίζουν την πιο σημαντική διακύμανση της σοβαρότητας της πνευμονικής νόσου( Gallati S et al 2003 , Kerem E et al. 1990)

Ο αντίκτυπος των γονότυπων CFTR έχει επίσης διερευνηθεί σε σχέση με άλλα όργανα, όπως οι ιδρωτοποιοί αδένες και το αναπαραγωγικό σύστημα των ανδρών. Ένα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει από αυτές τις μελέτες είναι ότι η έκφραση της CFTR σε διαφορετικά συστήματα οργάνων του ίδιου ατόμου ποικίλλει και επομένως κάθε όργανο μπορεί να επηρεάζεται διαφορετικά, καθιστώντας τις διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις πολύ πιο πολύπλοκες (Borgo G et al 1993, Hubert D et al 1996)

Παρ'όλες τις προσπάθειες, η κλινική και λειτουργική συνάφεια αρκετών μεταλλάξεων CFTR δεν έχει περιγραφεί μέχρι στιγμής. Ωστόσο, για να αντιμετωπιστεί αυτό το κενό, έχει δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων γονότυπου-φαινοτύπου (<http://www.cft2.org>), που περιλαμβάνει περίπου 39.700 ασθενείς με CF, περίπου 190 μεταλλάξεις CFTR και δίνει στοιχεία εάν μια μετάλλαξη μπορεί να ταξινομηθεί ως ήπια ή βαριά μετάλλαξη και εάν σε συνδυασμό με τυπική μετάλλαξη οδηγεί σε κλασσική ή μη μορφή της νόσου. Πρόκειται για ένα τρέχον έργο και μια σημαντική προσθήκη στην παραδοσιακή βάση δεδομένων CFTR (Salvatore F et al 2002, Kraemer R et al 1998).

Συνολικά, όλα αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι ένας γονότυπος CFTR αποτελεί μόνο την πηγή ή το δυναμικό της νόσου, η οποία θα μεταβάλλεται σε διαφορετικό βαθμό και θα μεταφράζεται σε παθοφυσιολογία. Έτσι, κλασικές μελέτες γονότυπου-φαινοτύπου

είναι σημαντικές αλλά όχι επαρκείς και πρέπει να συμπληρωθούν με την αναζήτηση γενετικών επιδράσεων στο περιβάλλον και στον κλινικό φαινότυπο προκειμένου να ενισχυθεί η γνώση των μηχανισμών της νόσου και να αναπτυχθούν νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις. (Kraemer R et al 2000 και Kraemer R et al 2009)

## **I.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η πολυσύνθετη αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης συντονίζεται καλύτερα σε ένα τριτοβάθμιο κέντρο αναφοράς. Όπως και στη θεραπεία κάθε χρόνιου νοσήματος, η σχέση ασθενούς-ιατρού έχει μεγάλη σημασία. Οι γιατροί, οι ασθενείς, οι οικογένειες τους και κάθε άτομο που εμπλέκεται στη φροντίδα του παιδιού πρέπει να συνεργάζονται με σκοπό τη διατήρηση μιας αισιόδοξης και επιθετικής προσέγγισης της ζωής και της θεραπευτικής αγωγής. Οι προσπάθειες με σκοπό να προληφθούν οι επιπλοκές και να μην εξελιχθεί η πνευμονοπάθεια έχουν ζωτική σημασία. Ο εμβολιασμός έναντι του ιού της γρίπης και των άλλων νοσημάτων πρέπει να τηρείται με σχολαστικότητα. Δυστυχώς, δεν υπάρχει κάποιο γενικά αποδεκτό θεραπευτικό πρωτόκολλο της νόσου και πολλά θεραπευτικά μέτρα βρίσκονται υπό διχογνωμία (Kerem E et al 1989).

Η απώλεια ηλεκτρολυτών με τον ιδρώτα αντιμετωπίζεται με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας χλωριούχου νατρίου στην τροφή του ασθενούς.

Η πνευμονοπάθεια αντιμετωπίζεται με το συνδυασμό φυσικών μέτρων που βοηθούν στην απομάκρυνση της βλέννης από τους βρόγχους λόγω χάρη αναπνευστική φυσικοθεραπεία, σωματική άσκηση και φαρμακευτικών μέτρων για την αποβολή της βλέννης και τη βελτίωση της βατότητας των αεροφόρων οδών και αντιβιοτικών για τον έλεγχο της χρόνιας λοίμωξης. Η παρακολούθηση της μικροβιακής χλωρίδας των πνευμόνων και η επιθετική θεραπεία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά σε πλήρη θεραπευτική δόση βοηθούν στην επιβράδυνση της εξέλιξης της πνευμονοπάθειας. Η διακεκομμένη θεραπεία με εισπνοές τομπραμυσίνης βελτιώνει την πνευμονική λειτουργία και μειώνει τις λοιμώξεις από ψευδομονάδα. Ο ασθενής εισάγεται στο νοσοκομείο για ενδοφλέβια χορήγηση υψηλών δόσεων αντιβιοτικών όταν είναι αναγκαίο και ιδιαίτερα αν έχει προσβληθεί από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που χορηγούνται από το στόμα. Κανονικά η θεραπεία πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον 2 εβδομάδες γιατί ακόμα και αν χορηγείται η πλέον επιθετική αγωγή είναι δύσκολη η αποστείρωση του πνεύμονα. Η

λοιμωξη από Burkholderia cepacia αντιμετωπίζεται ιδιαίτερα δύσκολα και μπορεί να συνοδεύεται από ταχεία κλινική επιδείνωση. Επίσης, η ινοκυστική νόσος μπορεί να επιπλακεί με αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση που απαιτεί θεραπεία με στεροειδή και αντιμυκητιασικά φάρμακα. Οι πνευμονικές επιπλοκές, όπως ο πνευμοθώρακας, η αιμόπτυση και η ατελεκτασία αντιμετωπίζονται όπως και στους άλλους ασθενείς (Riordan JR et al 2008).

Η παγκρεατική ανεπάρκεια αντιμετωπίζεται με υποκατάσταση των παγκρεατικών ενζύμων, κατά προτίμηση με τη χορήγηση εντεροδιαλυτών σκευασμάτων και με υπερθερμιδική διατροφή. Ακόμα και με την άριστη δυνατή υποκατάσταση των ενζύμων, οι απώλειες λίπους και πρωτεΐνης στα κόπρανα ενδέχεται να είναι σχετικά μεγάλες. Η πρόσληψη λίπους δεν περιορίζεται έστω και αν η στεατόρροια είναι μεγάλη αλλά αντίθετα αυξάνονται οι δόσεις των ενζύμων με σκοπό τη μέγιστη δυνατή αποκατάσταση των κενώσεων. Ωστόσο η χορήγηση λιπάσης που υπερβαίνει τις 2500 U/kg/ημέρα έχουν συνδυασθεί με εντερική απόφραξη λόγω ινώδους εντεροπάθειας του παχέος εντέρου. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες χορηγούνται σε δόσεις διπλάσιες του κανονικού κατά προτίμηση σε υδατοδιαλυτό σκεύασμα. Ο ειλεός από μηκόνιο συχνά απαιτεί χειρουργική επέμβαση είναι όμως δυνατό να αποκατασταθεί με υποκλυσμούς με υπερωσμωτικό σκιαγραφικό υλικό. Με τον ίδιο τρόπο αντιμετωπίζεται και η εντερική απόφραξη στους μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς.

Θεραπευτικές μέθοδοι που βρίσκονται υπό μελέτη και φαίνεται να έχουν κάποια ωφέλεια είναι η χορήγηση εισπνεόμενης DNAσης για τη ρευστοποίηση της βλέννης, τα αντιφλεγμονώδη, η μεταμόσχευση πνεύμονα και η γονιδιακή θεραπεία.

Το κύριο αίτιο νοσηρότητας στην ινοκυστική νόσο είναι η πνευμονοπάθεια, η βαρύτητα της οποίας εξαρτάται από την κληρονομική βαρύτητα της νόσου και από τη θεραπευτική αγωγή. Οι ασθενείς που παρουσίασαν ειλεό από μηκόνιο, εφόσον επιζήσουν μετά το πρώτο έτος της ζωής τους έχουν την ίδια πρόγνωση με τους άλλους ασθενείς με κυστική ίνωση. Από τα στοιχεία του Cystic Fibrosis Foundation προκύπτει ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης είναι περίπου τα 27 έτη αλλά η βαρύτητα της νόσου ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών (Kerem E et al 1989).

## **II. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ**



Τα τροποποιητικά γονίδια στα μονογονιδιακά νοσήματα είναι διαφορετικά γονίδια από το μεμονωμένο μεταλλαγμένο γονίδιο, τα οποία επηρεάζουν την έκφραση της ασθένειας. Τα τροποποιητικά γονίδια μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση της νόσου μέσω πολλών τρόπων. Μπορούν να εμπλέκονται σε ενδοκυττάρειες διεργασίες όπου το αιτιώδες ή πρωτογενές γονίδιο (π.χ., γονίδιο CFTR) εκφράζεται. Τα προϊόντα των τροποποιητικών γονιδίων μπορούν να επηρεάσουν τη συγκόλληση, μεταγραφή, μετάφραση, διακίνηση πρωτεϊνών, γλυκοζυλίωση ή άλλες μετα-μεταφραστικές διαδικασίες καθώς επίσης και την πρωτεϊνική έκφραση, αποικοδόμηση ή έκκριση.

Εναλλακτικά, τα τροποποιητικά γονίδια μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους σε κύτταρα στα οποία δεν υφίσταται καμία έκφραση του πρωτογενούς γονιδίου. Η έκφραση των τροποποιητικών γονιδίων μπορεί να ρυθμίσει αποκρίσεις όπως φλεγμονή, ίνωση, άμυνα του ξενιστή, μεταφορά ιόντων ή σχεδόν οποιαδήποτε άλλη απάντηση σε μια διαταραχή της ομοιόστασης (Sontag MK et al. 2004).

Σήμερα, μια από τις πιο κοινές μεθόδους για τη μελέτη συσχετισμών μεταξύ των γενετικών παραλλαγών του υποψήφιου τροποποιητικού γονιδίου και του κλινικού φαινότυπου είναι η ταυτοποίηση των μεμονωμένων νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs: μονονουκλεοτιδικές αλλαγές στο γονιδίωμα που είναι συνήθως πολυμορφικές) (Lazarus R et al. 2002). Σε αντίθεση με τις γονιδιακές μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε λιγότερο από 1% των ατόμων του πληθυσμού, τα SNP υπάρχουν σε περισσότερο από 1% του πληθυσμού και περιλαμβάνουν γενικές γενετικές παραλλαγές των φυσιολογικών ατόμων. Αποδεικτικά στοιχεία σύνδεσης μεταξύ ενός SNP και του φαινότυπου της ασθένειας υποδεικνύουν ότι το SNP εντοπίζεται σε κάποιο τροποποιητικό γονίδιο ή ότι το SNP είναι σε σύνδεση με αυτό. Οι λειτουργικοί SNPs που αλλάζουν το φαινότυπο της νόσου είναι, για παράδειγμα, ένα SNP στην περιοχή του υποκινητή ενός τροποποιητικού γονιδίου επηρεάζοντας τον ρυθμό μεταγραφής, ένα SNP σε ένα εξόνιο που επηρεάζει πρωτεϊνική δομή ή λειτουργία και ένα SNP εντός ενός ιντρονίου που παρεμβαίνει σε μηχανισμούς ματίσματος (Brookes AJ et al. 1999).

Τα τροποποιητικά γονίδια μπορεί να επηρεάσουν τη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας των ατόμων με κυστική ίνωση μέσω ποικίλων μηχανισμών. Αυτοί μπορεί να διαμορφώσουν τον φαινότυπο ενεργώντας επί του βασικού μορίου όπως η παροχή εναλλακτικής αγωγιμότητας χλωρίου, και μέσω της ρύθμισης της συναρμογής και της έκφρασης του γονιδίου CFTR. Μπορούν να τροποποιήσουν την ευαισθησία σε λοιμώξεις καθώς επίσης και φλεγμονώδη απάντηση. Επιπλέον, ο πνευμονικός φαινότυπος μπορεί να

τροποποιηθεί από γονίδια που σχετίζονται με τη βλεννογονική κάθαρση, την επιθηλιακή βλάβη ιστού και την επισκευή. Η βλάβη του γαστρεντερικού (ήπαρ, πάγκρεας, έντερο) στην ΚΙ μπορεί να επηρεάζεται από γονίδια που ρυθμίζουν την πρωτεόλυση και την ίνωση. Αρκετά γονίδια που εξετάστηκαν ως πιθανά τροποποιητικά γονίδια θα συνοψιστούν παρακάτω. Στους Πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται τα δυνητικά τροποποιητικά γονίδια του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού φαινοτύπου (Garred P et al. 1999).

Table 1  
Potential pulmonary modifier genes investigated in CF

Gene	Author	N pat	Polymorphism	FEV <sub>1</sub>	CXR	PA	BC	Mortality
MBL	Garred et al.	149	A/0+X/Y	–		0	++	++
	Davies et al.	558	A/0+X/Y	–		0	0	
	Gabolde et al.	164	A/0	–		0		
	Yarden et al.	179	A/0+X/Y	–		0		
NOS1	Grasemann et al.	75	AAT <sub>n</sub> ≥12	0		++		
	Grasemann et al.	40	AAT <sub>n</sub> ≥12	0		++		
	Texereau et al.	59	GT <sub>n</sub> >27	+		0	0	
NOS3	Grasemann et al.	70	894G/T	0		+ <sup>a</sup>		
AAT	Doring et al.	215	M/S,Z	0		++		
	Meyer et al.	269	M/S,Z			0		
	Mahadeva et al.	157	M/S,Z	+	0	0	0	
	Mahadeva et al.	79	M/S,Z					0
	Frangolias et al.	716	M/S,Z	0		+	0	0
		716	1237G/A	0		0	0	0
HLA-II	Henry et al.	124	1237G/A	+	++	–		
	Aron et al.	98	DR4-/+	0		–		
		98	DR7-/+	0		+		
TNF-α	Hull and Thomson	53	–308G/A	–	0	0		
GST M1	Hull and Thomson	53	A,B/0	0	–	0		
GST M3	Flamant et al.	146	A/B	+		0		
TGF β <sub>1</sub>	Arkwright et al.	171	869T/C	+		0	0	0
ACE	Arkwright et al.	261	D/I	+		0	0	0
β <sub>2</sub> AR	Buscher et al.	126	16R/G	–		0		
CLC-2	Blaisdell et al.	31	Various	0				

Abbreviations: N pat—number of patients; FEV<sub>1</sub>—forced expiratory volume in one second; CXR—chest X-ray; PA—*P. aeruginosa* colonization; BC—*B. cepacia* colonization; MBL—mannose-binding lectin; NOS—nitric oxide synthase; AAT—α<sub>1</sub>-antitrypsin; HLA—human leukocyte antigen gene II; TNF-α—tumor necrosis factor-α; GST—glutathione S-transferase; TGF-β<sub>1</sub>—transforming growth factor-β<sub>1</sub>; ACE—angiotensin 1 converting enzyme; β<sub>2</sub>AR—β<sub>2</sub> adrenoreceptor; CLC-2—chloride channel-2.

Symbols: ++, strongly positive association ( $p < 0.01$ ); +, positive association ( $p < 0.05$ ); 0, no significant association; –, negative association ( $p < 0.05$ ); – –, strongly negative association.

<sup>a</sup> In females only.

Πίνακας 1: (Garred P et al. 1999).

Table 2  
Potential gastro-intestinal modifier genes investigated in CF

Gene	Author	Ref	N pat	Polymorphism	LD	Diabetes	MI	Weight
MBL	Gabolde et al.		216	A/0	++			
AAT	Mahadeva et al.		157	M/S,Z	0			
HLA-II	Carrington et al.		67	DQB1 Asp57-/+		-		
	Lanng et al.		57	DR3, DR4		0		
	Duthie et al.		274	DQ6-/+	+			
TNF- $\alpha$	Hull and Thompson		53	-308G/A				-
GST M1	Hull and Thompson		53	A,B/0				0
GST M3	Flamant et al.		146	A/B				0
GST P1	Henrion-Caude et al.		106	105I/V	--			
ACE	Arkwright et al.		261	D/I	-	0		
HFE	Rohlfis et al.		89	C282Y			0	
	Devaney et al.		122	C282Y			0	
ATB <sup>0</sup>	Lariba et al.		48	Various			0	

Abbreviations: N pat—number of patients; LD—liver disease; MI—meconium ileus; MBL—mannose-binding lectin; AAT— $\alpha_1$ -antitrypsin; HLA—human leukocyte antigen gene II; TNF- $\alpha$ —tumor necrosis factor- $\alpha$ ; GST—glutathione S-transferase; TGF- $\beta_1$ —transforming growth factor- $\beta_1$ ; ACE—angiotensin I converting enzyme; HFE—putative hereditary hemochromatosis gene; ATB<sup>0</sup>—neutral amino acid transporter B<sup>0</sup>.

Symbols: ++, strongly positive association ( $p < 0.01$ ); +, positive association ( $p < 0.05$ ); 0, no significant association; -, negative association ( $p < 0.05$ ); --, strongly negative association.

**Πίνακας 2:** (Garred P et al.1999).

## II. 1 Αναπνευστικός Φαινότυπος

Η κοινοπραξία Τροποποιητών Γονιδίων της Κυστικής Ίνωσης της Βόρειας Αμερικής πραγματοποίησε μια συνδυασμένη μελέτη GWAS σε ένα σύνολο 3.467 ασθενών με ΚΙ και αναγνώρισε σημαντική και επαναλαμβανόμενη συσχέτιση με τους επιτόπους εντός των χρωμοσωμικών περιοχών 11p13 και 20q13.2 που τροποποιούν τη σοβαρότητα της νόσου των πνευμόνων και φιλοξενούν γονίδια βιολογικής σημασίας για την ΚΙ (Wright FA et al 2011).

Το ισχυρότερο σήμα εντοπίστηκε στο 11p13 στα γονίδια AP1P (αλληλεπιδρώσα με APAF1 πρωτεΐνη) και EHF (ομόλογος παράγοντας ETS) με ρυθμιστικά χαρακτηριστικά και συσχέτισμό έκφρασης γειτονικών γονιδίων όπως EHP με ELF5, EHF με AP1P και AP1P στο PDHX. Το γονίδιο EHF κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που ανήκει σε μια υποοικογένεια παράγοντα μεταγραφής του ETS που χαρακτηρίζεται από επιθηλιακή εξειδικευμένη έκφραση και δρα ως ένας σημαντικός ρυθμιστής επιθηλιακής διαφοροποίησης υπό συνθήκες στρες και φλεγμονής. Πολύ πρόσφατα, το EHF έχει επιβεβαιωθεί ως τροποποιητής του φαινοτύπου της ΚΙ στην ομάδα ασθενών της ευρωπαϊκής μελέτης διδύμων με ΚΙ μέσω της αλλαγής των δυνατοτήτων των επιθηλιακών

κυττάρων για την ορθή διεργασία της αναδίπλωσης και της διακίνησης του μεταλλαγμένου CFTR (Stanke F et al. 2014).

Το δεύτερο γονίδιο εντός της 11p13 περιοχής, APIP, αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που εξαρτάται από το κυτόχρωμα c και προκαλείται από την APFA1 και προλαμβάνει την ισχαιμική / υποξική βλάβη. Προτείνεται ότι η αυξημένη έκφραση της APIP που οδηγεί σε υπερβολική αναστολή της απόπτωσης μπορεί να επιδεινώσει την πνευμονική νόσο της ΚΙ, υποστηρίζοντας την αντίληψη ότι η αναστολή της απόπτωσης στους αεραγωγούς οδηγεί σε καθυστερημένη κάθαρση των ουδετερόφιλων και συνεπώς σε μια υπερπλαστική κατάσταση και συμβάλλει στη μεταπλασία των κυττάρων το οποίο αποτελεί ένα χαρακτηριστικό της ασθένειας των αεραγωγών στα άτομα με ινοκυστική νόσο( Dibbert B et al. 1999, Harris JF et al.2005).

Οι SNPs στη διαγονιδιακή περιοχή του 11p13 μπορεί να μειώσουν την έκφραση του EHF και του APIP αλλά και άλλων εγγύς γονιδίων όπως ELF5 και PDHX για το λόγο αυτό υπάρχουν μελέτες που εξελίσσονται ώστε να διερευνηθούν οι μηχανισμοί παθογένεσης της νόσου που προκύπτουν από γονιδιωματικούς πολυμορφισμούς(Knowles MR et al 2012).

Πέντε γονίδια (CBLN4, MC3R, CASS4, CSTF1, AURKA) εντοπίστηκαν εντός της περιοχής σύνδεσης 20p13.2, τα οποία εκφράζονταν είτε σε εμβρυικά είτε σε ενήλικα πνευμονικά ή βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Το CASS4, για παράδειγμα, είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνικών ικριωμάτων CAS και παίζει ρόλο στη σηματοδότηση βασίζόμενο στην κινάση τυροσίνης, η οποία ρυθμίζει την προσκόλληση και την εξάπλωση των κυττάρων(Tikhmyanova N et al.2010).

Το AURKA κωδικοποιεί μία κινάση A που εμπλέκεται σε διάφορα μιτωτικά συμβάντα, όπως η δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου, η ωρίμανση κεντροσώματος, η χρωμοσωμική ευθυγράμμιση, η κυτοκίνηση, καθώς και στην σωστή αποσύνθεση των πρωτογενών κροσσών(Pugacheva EN et al 2007).

Το πιο ενδιαφέρον όμως μεταξύ των πέντε γονιδίων είναι το MC3R, το οποίο έχει εμπλακεί στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου και της διαμόρφωσης της συσσώρευσης ουδετερόφιλων στη φλεγμονή των πνευμόνων, και τα δύο από τα οποία είναι βασικά χαρακτηριστικά της πνευμονικής νόσου της κυστικής ίνωσης. Έχουν ξεκινήσει μελέτες για τον εντοπισμό των μηχανισμών της πνευμονικής νόσου που μπορεί να αντανάκλουν το σήμα σύνδεσης στο 20p13.2 (Savastano DM et al. 2009, Getting SJ et al. 2008).

Επιπλέον, υπήρξαν έξι άλλες περιοχές υποδηλώνουν συσχέτιση, μεταξύ των οποίων η θέση HLA τάξης II DR στο 6p21.3, η οποία είναι καλά γνωστό ότι εμπλέκεται στην

εκδήλωση προφλεγμονωδών και αυτοάνοσων διαταραχών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου 1, η σκλήρυνση κατά πλάκας και ο εξαιρετικά συντηρημένος προγονικός απλότυπος 8.1 που κωδικοποιείται στην περιοχή HLA ο οποίος έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της ασθένειας των πνευμόνων σε άτομα με κυστική ίνωση (Corvol H et al.2012).

Σε μία προσέγγιση, οι Emond et al αλληλούχησαν 43 ασθενείς με ινοκυστική νόσο οι οποίοι παρουσίαζαν πρώιμη εμφάνιση χρόνιας λοίμωξης *Pseudomonas aeruginosa* καθώς και 48 άτομα που δεν είχαν ποτέ μολυνθεί με *P. Aeruginosa* κατά την ηλικία 14 ετών ή και έπειτα. Οι παραλλαγές σε ένα μόνο γονίδιο, το DCTN4 (dynactin 4), στο χρωμόσωμα 5q33.1 βρέθηκαν να σχετίζονται σημαντικά με την πρώιμη ηλικία χρόνιας μόλυνσης *P. Aeruginosa* καθώς και με την πρώτη βλενώδη καλλιέργεια *P. Aeruginosa* που οφείλεται στο DCTN4 το οποίο αποτελεί μέρος της διαδικασίας αυτοφαγίας, ως σημαντικός γενετικός τροποποιητής του φαινοτύπου της ΚΙ(Emond MJ et al 2012).

## II.2 Γαστρεντερικός φαινότυπος

Χρησιμοποιώντας αναλύσεις σε επίπεδο γονιδιώματος, οι Blackman et al αναγνώρισαν αρκετές χρωμοσωμικές περιοχές που υποδηλώνουν συμβολή (4q35.1, 8p23.1, 11q25) ή προστασία από ανάπτυξη (20p11.22, 21q22.3) ειλεού εκ μηκωνίου. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους σύνδεσης σε μια οικογενειακή μελέτη που ακολούθησε σε ένα μη σχετικό δείγμα ασθενών με κυστική ίνωση, οι Henderson et al επιβεβαίωσαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ ενός απλότυπου τριών πολυμορφισμών που αντιστοιχεί στο γονίδιο MSRA στο χρωμόσωμα 8 και στον ειλέο εκ μηκωνίου (Blackman SM et al 2006, Henderson LB et al 2012).

Μια άλλη μελέτη σύνδεσης που επαναλήφθηκε σε ένα ανεξάρτητο δείγμα οικογενειών με κυστική ίνωση έδωσε στοιχεία για μια θέση που προάγει τον ειλέο εκ μηκωνίου στο χρωμόσωμα 12p13.3 και επεσήμανε τη συμμετοχή του γονιδίου του υποδοχέα 2 της αδιπονεκτίνης (ADIPOR2). Επιπλέον, ένας προστατευτικός τύπος χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 4q13.3, συμπεριλαμβανομένου του συν-μεταφορέα SLC4A4 διττανθρακικού νατρίου ως υποψήφιο γονίδιο. Μια συμβατική μελέτη GWAS αναγνώρισε τη σύνδεση αρκετών SNPs σε δύο περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του SLC26A9 στο χρωμόσωμα 1 (1q32.1) και SLC6A14 στο χρωμόσωμα X (Xq23-24), με ειλέο εκ μηκωνίου σε 3.763 άτομα που έχουν προσβληθεί και οι μελέτες αυτές επαναλήφθηκαν και επανεξετάστηκαν σε μια ανεξάρτητη ομάδα ασθενών από τη Βόρεια Αμερική και τη Γαλλία. Μια μετέπειτα

μελετώμενη υπόθεση με τη μέθοδο GWAS επιβεβαίωσε τα SLC26A9 και SLC6A14 και επιπλέον SLC9A3 ως τροποποιητές της εμφάνισης του ειλεού εκ μηκωνίου, αλλά επίσης παρείχε αποδείξεις συλλογικής συσχέτισης πολλαπλών συστατικών της κορυφαίας μεμβράνης με την εμφάνιση ειλεού εκ μηκωνίου(Dorfman R et al 2009, Sun L et al 2012).

Σε μια άλλη προσέγγιση, τα δεδομένα του δείκτη μάζας σώματος που συλλέχθηκαν από τη μελέτη διδύμων που έπασχαν από ινοκυστική νόσο Twin-Sibling Study (ClinicalTrials.Gov identifier NCT00037778) αναλύθηκαν για να καθορίσουν τη συμβολή των γενετικών τροποποιητών στη διατροφική κατάσταση των νεαρών ασθενών με ΚΙ ηλικίας 5-10 ετών(Vanscoy LL et al 2007,Bradley GM et al 2012). Για 1.010 τα άτομα με παγκρεατική ανεπάρκεια, σημαντική σύνδεση του δείκτη μάζας σώματος και δύο χρωμοσωμικών περιοχών, των 1p36.1 και 5q14 βρέθηκαν, όπου το τελευταίο περιλάμβανε το γονίδιο ARRDC3, έναν ρυθμιστή της σωματικής μάζας και της ενεργειακής δαπάνης σε άνδρες(Patwari P et al 2011).

### **II.3 Διαβήτης της Ινοκυστικής Νόσου**

Μια μελέτη GWAS που περιείχε 3.059 ασθενείς με κυστική ίνωση έδειξε μια σύνδεση των SNPs και του 5' άκρου του γονιδίου SLC26A9 με διαβήτη που σχετίζεται με την ινοκυστική νόσο (Πίνακας 1). Αυτά τα ευρήματα επαναλήφθηκαν σε 694 άτομα. Επιπλέον, οι SNPs για τον διαβήτη τύπου 2 κοντά στα CDKAL1, CDKN2A / B και IGF2BP2 βρέθηκαν να συνδέονται επίσης με διαβήτη που σχετίζεται με την κυστική ίνωση. Καθώς το SLC26A9 κωδικοποιεί ένα μεταφορέα ανιόντων συσχετιζόμενο με το χλώριο και τα διττανθρακικά, οι συγγραφείς θεωρούν ότι « η μεταβολή στην έκφραση του CFTR ή του SLC26A9 (ή και των δύο) μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη λειτουργία των β-κυττάρων μεταβάλλοντας τη ροή του χλωρίου ή των διττανθρακικών ή και των δύο»(Blackman SM et al 2008).

➡ Direct modifiers of the CFTR interactome

Locus	Gene	Function	Phenotype	Method	Reference
12q13.13	<i>KRT8</i>	Cytoskeleton remodeling	Disease severity	CGA	98
12q13.13	<i>KRT18</i>	Cytoskeleton remodeling, delivery of mutated CFTR to the plasma and in IL-6-mediated barrier protection	Disease severity	CGA	98
17q21.2	<i>KRT19</i>	Cytoskeleton remodeling, organization of myofibers	Lung disease	CGA	80
19q13.41	<i>PPP2R1A</i>	Regulation of CFTR channel activity	Lung disease	CGA	80
9q34.11	<i>PPP2R4</i>	Regulatory subunit for serine/threonine-protein phosphatase 2A	Lung disease	CGA	80
16p12.2	<i>SCNN1B</i>	Electrodiffusion of the luminal sodium through the apical membrane of epithelial cells	Lung disease	CGA	81
16p12.2	<i>SCNN1G</i>	Electrodiffusion of luminal sodium through the apical membrane of epithelial cells	Lung disease	CGA	81
5p15.33	<i>SLC9A3</i>	Important role in signal transduction, sodium/proton exchanger	MI + lung	GWAS/CGA	58,76,76,99
15q15.1	<i>SNAP23</i>	Important regulator of transport vesicle docking and fusion	Lung disease	CGA	80
7q11.23	<i>STX1A</i>	Docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones Mediates Ca <sup>2+</sup> regulation of exocytosis acrosomal reaction in sperm	Lung disease	CGA	79

Abbreviations: CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; MI, meconium ileus; CGA, candidate gene approach; GWAS, genome-wide association study; IL, interleukin.

Πίνακας 1: Emond MJ et al 2012



➡ Indirect modifiers of different pathways

Locus	Gene	Pathway/function	Phenotype	Method	Reference
17q23.3	ACE	Metabolism, peptide hormone/electrolyte balance, vasopressor	Liver disease	CGA	93
12p13.33	ADIPO2	Metabolism, lipids, and lipoproteins/adiponectin receptor	MI	GWAS	57
6p21.32	AGER	Immune system, innate/inflammatory response	Lung disease	CGA	82
11p13	APIP	Metabolism, amino acids/inhibitor of apoptosis	Lung disease	GWAS	45,46,48,49
5q14.3	ARRDC3	Metabolism, lipids and lipoproteins/regulator of body mass and energy expenditure	BMI	GWAS	60
20q13.2	AURKA	Mitotic cell cycle/cytokinesis and disassembly of primary cilia	Lung disease	GWAS	46,51
2q37.3	CAPN10	Signal transduction/calcium-regulated protease	Diabetes	CGA	90
20q13.31	CASS4	Signal transduction/tyrosine kinase-based signaling	Lung disease	GWAS	46,50
20q13.2	CBLN4	Cell-cell communication/synaptic function	Lung disease	GWAS	46
6p22.3	CDKAL1	Gene expression/tRNA processing	Diabetes	GWAS	61
9p21.3	CDKN2B	Mitotic cell cycle/signaling by TGF-β receptor complex	Diabetes	GWAS	61
1p31-p22	CLCA4	Transmembrane transport of small molecules/mediator of calcium-activated chloride conductance	Intestine	CGA	88,89
20q13.2	CSTF1	Gene expression/processing of intron-less pre-mRNA	Lung disease	GWAS	
2q35	CXCR1	Signal transduction/chemokine receptor, activation of neutrophils	Lung disease	CGA	83
2q35	CXCR2	Signal transduction/chemokine receptor, activation of neutrophils	Lung disease	CGA	83
5q31-q32	DCTN4	Immune system, adaptive/dynein targeting	<i>P. aeruginosa</i>	EWAS	62
4q31.22	EDNRA	Signal transduction/endothelin receptor, smooth muscle proliferation	Lung disease	CGA	75
11p13	EHF	Metabolism of proteins/regulation of epithelial cell differentiation and proliferation	Lung disease	GWAS	45,46,47
11p.13	ELF5	Metabolism of proteins/regulation of keratinocyte differentiation, ectoderm development	Lung disease	GWAS	45,46
11q13.2	GSTP1	Metabolism, biological oxidations/glutathione conjugation	Liver disease	CGA	94
6q23.3	IFNGR1	Immune system/interferon gamma receptor	Disease severity	CGA	97
7q31.1	IFRD1	Developmental biology/regulator of neutrophil effector function	Lung disease	CGA	46,72
3q27.2	IGF2BP2	Gene expression /regulation of translation of insulin-like growth factor 2 mRNAs	Diabetes	GWAS	61
2q14	IL1B	Immune system/cytokine signaling, inflammatory response	Disease severity	CGA	97
4q13.3	IL-8	Signal transduction/chemokine signaling, airway inflammation	Lung disease	CGA	72-74
10q11.2	MBL2	Immune system, innate/activates the lectin complement pathway	Lung + liver + Pseudomonas	CGA	10,45,63,64
20q13.2	MC3R	Signal transduction/energy balance and neutrophil accumulation	Lung disease	GWAS	46,52,53
8p23.1	MSRA	Cellular response to stress/repair of proteins inactivated by oxidation	MI	GWAS	56
11p15.5	MUC5AC	Metabolism of proteins/protection of the mucosa from infection and chemical damage	Lung disease	CGA	84
11p13	PDHX	Metabolism of citric acid cycle/regulation of the pyruvate dehydrogenase complex	Lung disease	GWAS	45,46
14q32.13	SERPINA1	Hemostasis/inhibitor of serine proteases	Liver disease	CGA	92,96
4q13.3	SLC4A4	Transmembrane transport of small molecules/electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter	MI	GWAS	57
Xq23	SLC6A14	Transmembrane transport of small molecules/amino acid transport across the plasma membrane, uptake of basic and neutral amino acids	MI + lung + Pseudomonas	GWAS	58,99
1q32.1	SLC26A9	Transmembrane transport of small molecules /anion exchanger mediating chloride, sulfate and oxalate transport	MI + diabetes	GWAS/CGA	58,61,99
17q21	STAT3	Immune system/mediates cellular responses to interleukins and other growth factors	Intestine	CGA	97
10q25.3	TCF7L2	Signal transduction/maintenance of the epithelial stem cell compartment of the small intestine	Diabetes	CGA	91
19q13.2	TGFB1	Signal transduction/regulation of airway inflammation, extracellular matrix organization	Lung disease	CGA	10,70,71,95
1q41	TLR5	Immune system, innate/cytokine secretion and the inflammatory response	Lung disease	CGA	87

Abbreviations: BMI, body mass index; MI, meconium ileus; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; CGA, candidate gene approach; EWAS, exome-wide association study; GWAS, genome-wide association study; TGF-β, transforming growth factor-beta; mRNA, messenger RNA; tRNA, transfer RNA.

Πίνακας 2: Emond MJ et al 2012



## III: ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

### III.1 Αναπνευστικός φαινότυπος

Η ελαττωματική μεταφορά ιόντων έχει ως αποτέλεσμα την διαταραγμένη εκκαθάριση των βλεννογόνων και, ως εκ τούτου, οδηγεί σε οξείες και χρόνιες μολύνσεις που ακολουθούνται από φλεγμονώδη απόκριση και αποτελούν τη βάση πνευμονικής νόσου στην κυστική ίνωση. Επομένως, τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτές τις οδούς αναμένεται να συνεισφέρουν στον φαινότυπο της κυστικής ίνωσης με τροποποίηση της κλινικής πορείας και της σοβαρότητας της πνευμονικής νόσου (Πίνακας 2).

Ένα από τα πρώτα και εκτενέστερα μελετημένα γονίδια τροποποίησης πνευμονικού φαινοτύπου είναι το MBL2, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λεκτίνη πρόσδεσης μαννόζης (MBL) και επιλέχθηκε ως υποψήφιο με βάση τον κρίσιμο ρόλο του στην έμφυτη ανοσοαπόκριση και το γεγονός ότι η ανεπάρκεια MBL οδηγεί σε επιρρέπεια βακτηριακής και ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, τα ευρήματα αυτών των πολυάριθμων μελετών είναι εν μέρει αντιφατικά και ο ρόλος του MBL2 ως γενετικού τροποποιητή της ΚΙ παραμένει θέμα συζήτησης. Έξι μελέτες στις οποίες συμμετείχαν περισσότεροι από 2.000 ασθενείς με ΚΙ εμφανίζουν μια συσχέτιση των γονότυπων με έλλειψη MBL με πιο σοβαρή πνευμονική νόσο, τρεις μελέτες ανέφεραν την εμφάνιση της λοίμωξης από *P. aeruginosa* νωρίτερα, ενώ αρκετές μελέτες δεν ανίχνευσαν συσχέτισμό με πνευμονική νόσο και μόλυνση με *P. aeruginosa*.

Στην πιο περιεκτική μελέτη του MBL2 ως τροποποιητικού γονιδίου της κυστικής ίνωσης, οι Dorfman et al αξιολόγησαν τη συσχέτιση των γονότυπων MBL2 με τον πνευμονικό φαινότυπο της ινοκυστικής νόσου σε μια ομάδα 1.019 Καναδών παιδιατρικών ασθενών και κατέδειξαν ότι η ανεπάρκεια MBL2 συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο πρώιμης μόλυνσης με *P. aeruginosa* και ρυθμό έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας στους παιδιατρικούς ασθενείς με ΚΙ. Οι McDougal et al έδειξαν ότι ο γονότυπος MBL2 σχετίζεται με την κατάσταση της λοίμωξης παρά με τις άλλες μεταβλητές και ότι η έλλειψη MBL2 κυρίως έχει ως αποτέλεσμα προηγούμενη μόλυνση με *P. aeruginosa* και μετατροπή στη βλεννώδη μορφή, οδηγώντας πιθανώς σε πιο σοβαρή πνευμονική νόσο και μειωμένη επιβίωση (Dorfman R et al 2008, McDougal KE et al 2010).

Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν αναθεωρηθεί και συμπεριληφθεί σε μετα-ανάλυση από τους Chalmers et al, οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο MBL2 είναι τροποποιητής του πνευμονικού φαινοτύπου της ΚΙ και ότι η ανεπάρκεια MBL σχετίζεται με προηγούμενη απόκτηση του *P. aeruginosa*, και υψηλότερη συχνότητα ΚΙ τελικού σταδίου(Chalmers JD et al 2011).

### **III.1.1 Mannose-binding lectin (MBL)**

Η MBL είναι μια πρωτεΐνη ορού που συμμετέχει στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η MBL ενεργοποιεί το σύστημα συμπληρώματος με MBL-συνδεδεμένες πρωτεάσες σερίνης και μπορεί να αλληλεπιδράσουν με υποδοχείς στα φαγοκύτταρα. Οι συνδέτες για MBL, μαννόζη και ολιγοσακχαρίτες N-ακετυλογλυκοζαμίνης, υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών. Η ανθρώπινη MBL προέρχεται από ένα μόνο γονίδιο στο χρωμόσωμα 10, το MBL2. Στο εξόνιο 1 του γονιδίου MBL2, 3 υποκατάσεις μονής βάσης προκαλούν χαμηλά επίπεδα MBL στον ορό. Το κανονικό αλληλόμορφο έχει την ονομασία A, ενώ η κοινή ονομασία για τα υπόλοιπα αλλήλια(B, C, D) είναι 0. Ακόμη και σε ετεροζυγώτες, κάθε ένα από τα 3 μειώνουν την ποσότητα λειτουργικών MBL υπομονάδων 5-10 φορές. Εκτός από το εξόνιο 1 αλληλόμορφα, μερικές υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων στον υποκινητή του γονιδίου MBL2 επηρεάζουν τα επίπεδα MBL στον ορό.

Συγκεκριμένα, ένας πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 221 (τύπος X / Y) έχει μια σημαντική καθοδική επίδραση στην περιεκτικότητα MBL στον ορό. Έχει αποδειχθεί ότι τα αλληλόμορφα των παραλλαγών της MBL έχουν σαν αποτελέσματα χαμηλά λειτουργικά επίπεδα MBL στον ορό και συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαφορετικών τύπων λοιμώξεων κυρίως σε παιδιά, αλλά και σε ενήλικες. Επιπλέον, η ανεπάρκεια MBL έχει επίσης αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην εκδήλωση αυτάνοσων ασθενειών. Σε όλες τις 4 δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν την κυστική ίνωση, βρέθηκε σημαντικά μειωμένη πνευμονική λειτουργία σε φορείς μορίων MBL 0 σε σύγκριση με AA ομοζυγώτες. Σε μία μελέτη, οι φορείς των παραλλαγών βρέθηκαν να είναι πιο συχνά αποικισμένοι με *B.ceracia* (Garred P et al.1999), ενώ σε άλλη μελέτη, οι ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για τα μεταβλητά αλληλόμορφα είχαν σχεδόν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αποικισμού από *P. Aeruginosa*(Gabolde M et al.1999). Αυτό,ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλες 2 μελέτες(Davies JC et al.2004, Yarden J et al 2004).

Τέλος, συσχετισμοί μεταξύ των παραλλαγμένων αλληλόμορφων της MBL και της παρουσίας κίρρωσης του ήπατος και της επιβίωσης έχουν περιγραφεί. Συμπερασματικά, το

γονίδιο MBL φαίνεται να είναι ένας καλά επικυρωμένος τροποποιητής του φαινοτύπου των πασχόντων από κυστική ίνωση.

Το δεύτερο γονίδιο που εξετάζεται πιο συχνά για τις επιδράσεις του ως τροποποιητής είναι ο TGFb1, το οποίο είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονής των αεραγωγών (Akhurst RJ et al 2004, Yang YC et al 2012) και αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος (Silverman ES et al 2004, Chiang CH et al 2013) και χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής νόσου (Wu L et al 2004). Η πρώτη μεγάλη μελέτη που αναφέρει μια συσχέτιση μεταξύ των παραλλαγών του TGFb1 στον υποκινητή (-509C.T) και του εξωνίου 1 (κωδικόνιο 10, c.29C.T) και της σοβαρότητας της ασθένειας του πνεύμονα στην ινοκυστική νόσο σε μια ομάδα 808 F508del ομοζυγωτών δημοσιεύθηκε από τους Drumm et al (Drumm ML et al 2005). Αυτό το εύρημα επανεξετάστηκε σε 498 ασθενείς με διάφορους γονότυπους και επιβεβαιώθηκε ανεξάρτητα από τους Bremer et al , που αποδεικνύει τη συσχέτιση ενός απλοτύπου TGFb1 (rs8179181 / -509C / c.29T) με την πνευμονική λειτουργία στους πάσχοντες από κυστική ίνωση. Μερικές μικρές μελέτες δεν ανέφεραν καμία ή όχι την ίδια συσχέτιση μεταξύ της λειτουργίας του πνεύμονα, του TGFb1 και της κυστικής ίνωσης. (Bremer LA et al 2008)

### **III.1.2 Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού [Transforming growth factor-b1 (TGF-b1)]**

Ο TGF-b1 είναι μια κυτοκίνη με τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που προάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την εναπόθεση κολλαγόνου. Ένας πολυμορφισμός (T869C) με αποτέλεσμα την μικρότερη παραγωγή του TGF-b1 αποδείχθηκε ότι έχει ως αποτέλεσμα βραδύτερη επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας σε ασθενείς με ΚΙ. (Arkwright PD et al 2000)

Οι Gu et al ταυτοποίησαν το σχετικό με την ιντερφερόνη ρυθμιστή της ανάπτυξης (IFRD1) ως τροποποιητή της σοβαρότητας της ασθένειας του πνεύμονα του ασθενούς με κυστική ίνωση. Μέσω μεταγραφικών μηχανισμών, η IFRD1 ρυθμίζει τη λειτουργία των ουδετερόφιλων κατά τη διάρκεια της βακτηριακής μόλυνσης και μπορεί να ρυθμίζει την παθογένεση της ασθένειας του πνεύμονα μέσω αυτής της οδού. Οι πολυμορφισμοί στο IFRD1 γονίδιο έδειξαν συσχέτιση σε έναν οικογενειακό πληθυσμό (δίδυμων και αδελφών),

αλλά δεν πέτυχαν σημαντικά ευρήματα και δεν έχουν επανεξεταστεί σε άλλους πληθυσμούς που έπασχαν από ινοκυστική νόσο(Gu Y et al 2009).

Εκτός από τα MBL2, TGFβ1 και IFRD1, που συσχετίζονται με φλεγμονή των αεραγωγών στους πάσχοντες από Κυστική Ίνωση είναι το IL-8, το οποίο και έχει προταθεί ως τροποποιητικός παράγοντας της σοβαρότητας της νόσου του πνεύμονα επηρεάζοντας την ικανότητα του ξενιστή να ανέχεται τη μόλυνση. Ένα αποτέλεσμα των παραλλαγών της IL-8 παρατηρήθηκε αρχικά σε μια ομάδα 737 πασχόντων από κυστική ίνωση F508del ομοζυγωτών και διαπιστώθηκε ότι η επίδραση ήταν πιο έντονη σε άρρενα άτομα. Μια δεύτερη μελέτη σε άλλους 385 ασθενείς ήταν σε θέση να επιβεβαιώσει αυτό το εύρημα για τους άνδρες.(Hillian AD et al 2008). Ωστόσο, μια περαιτέρω ανάλυση 329 ασθενών απέτυχε να ανιχνεύσει μια συσχέτιση μεταξύ της ασθένειας των πνευμόνων και παραλλαγών της IL-8. (Corvol H et al 2008)

Μια συσχέτιση με την προσβολή των πνευμόνων στην κυστική ίνωση έχει περιγραφεί για την παραλλαγή 6672G>C (rs5335) στην 3' UTR του γονιδίου του ενδοθηλιακού υποδοχέα τύπου A (EDNRA). Το αλληλόμορφο C βρέθηκε συχνότερα σε ασθενείς με ΚΙ με σοβαρή πνευμονική νόσο σε τέσσερις χωριστές ομάδες πασχόντων από ΚΙ και συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα mRNA EDNRA, με αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών ινών και επακόλουθη επιδείνωση του πνευμονικού φαινοτύπου μεταβάλλοντας τον τόνο των λείων μυϊκών ινών στους αεραγωγούς και / ή στα αγγεία. (Darrah et al 2010)

Καθώς η δυσλειτουργία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR οδηγεί σε ανισορροπία άλατος και ύδατος στα επιθήλια των αεραγωγών και μειωμένη εκκένωση των βλεννογόνων, μελετήθηκαν παραλλαγές στο γονίδιο SLC9A3 που κωδικοποιεί το NHE3 και βρέθηκαν να σχετίζονται με την ευαισθησία στις βακτηριακές λοιμώξεις και τη σοβαρότητα της πνευμονικής νόσου (Dorfman R et al 2011). Το SLC9A3 αλληλεπιδρά με την CFTR μέσω ενός ρυθμιστικού συμπλέγματος που περιλαμβάνει το NHERF-2, την εζρίνη και την πρωτεϊνική κινάση A και ως εκ τούτου παρέχει γενετικές ενδείξεις ενός τροποποιητικού αποτελέσματος (Favia M et al 2006). Επιπλέον, γονίδια που φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CFTR όπως τα SCNN1B και SCNN1G που κωδικοποιούν τις β-υπομονάδες και γ-υπομονάδες του ENaC, έχουν βρεθεί ότι εμπλέκονται στην τροποποίηση της πνευμονικής νόσου των πασχόντων από ινοκυστική νόσο (Stanke F et al 2006, Von Kanel T et al 2013, Gisler FM et al 2013).

Περαιτέρω συσχετίσεις με τον πνευμονικό φαινότυπο έχουν περιγραφεί, αλλά δεν έχουν ακόμη επανεξεταστεί, για την παραλλαγή -429T /C στον υποκινητή του γονιδίου AGER, για τα SNPs στο CXCR1 και CXCR2 και για ένα 6,4 kb VNTR αλληλόμορφο του εκκρινόμενου γονιδίου βλεννίνης MUC5AC . Το αλληλόμορφο AGER -429C έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα του υποκινητή που ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση του γονιδίου AGER. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου ενεργοποιεί τη δημιουργία αντιδραστικών ριζών οξυγόνου και προάγει την ενεργοποίηση οδών μεταγωγής σήματος , η υπερβολική έκφραση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη φλεγμονή των αεραγωγών και αυξημένη σοβαρότητα της νόσου του πνεύμονα (Beucher J et al 2012).

Οι υποδοχείς χημειοκίνης CXCR1 και CXCR2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ουδετεροφιλική φλεγμονή και έχει προσδιοριστεί ένα συγκεκριμένο σύμπλεγμα απλοτύπου CXCR1 / 2 που σχετίζεται με τη λειτουργία των πνευμόνων σε ασθενείς με ΚΙ και πιστεύεται ότι διαμορφώνει το πνευμονικό αποτέλεσμα μέσω μιας δυσλειτουργίας των ουδετεροφιλικών λειτουργιών (Kormann MS et al 2012 ). Καθώς το γονίδιο MUC5AC μπορεί να εμπλέκεται στην εκκένωση των βλεννοκεφαλών, οι Guo et al εικάζουν ότι το 6,4 kb αλληλόμορφο VNTR που συσχετίζεται με τη σοβαρότητα του αναπνευστικού φαινοτύπου θα μπορούσε να μεταβάλλει τη λειτουργία της βλέννης των αεραγωγών, επηρεάζοντας την κατάσταση της φλεγμονής και την εξέλιξη της πνευμονικής νόσου(Guo X et al 2011).

Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι η αντιφλεγμονώδης θεραπεία μπορεί να βελτιώσει τη λειτουργία των πνευμόνων και το σωματικό βάρος σε ασθενείς με κυστική ίνωση και μελέτες υποδεικνύουν ότι η αναστολή του υποδοχέα της TLR5 ομαλοποιεί την φλεγμονώδη απόκριση που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού των ασθενών μετά από την έκθεση τους σε *P. Aeruginosa* (Lai HC et al 2000). Για να επικυρωθεί η TLR5 ως τροποποιητής της νόσου και αντιφλεγμονώδης στόχος, οι Blomhke et al εξέτασαν τη σχέση μεταξύ του TLR5 SNP c.1174C>T (rs5744168) οδηγώντας σε ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού και τις δύο κλινικές παραμέτρους της πνευμονικής λειτουργίας και του σωματικού βάρους σε 2,219 ασθενείς με ΚΙ. Κατόρθωσαν να αποδείξουν ότι το αλληλόμορφο C1174T του TLR5 γονιδίου μειώνει σημαντικά την ανταπόκριση TLR5 και οδηγεί σε βελτιωμένη θεραπευτική κατάσταση σε ενήλικες με ΚΙ, παρέχοντας αποδείξεις ότι οι θεραπευτικές στρατηγικές για την αναστολή της TLR5 μπορεί να είναι επωφελείς για την κλινική έκβαση των ασθενών με κυστική ίνωση (Blomhke CJ et al 2008, Blomhke CJ et al 2010 ).

### **III.1.3 Συνθετάση νιτρικού οξέος [Nitric oxide synthase (NOS)]**

Το οξείδιο του αζώτου (NO) έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικό σε πληθώρα ρυθμιστικών διαδικασιών στον πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένης της άμυνας του ξενιστή, τη φλεγμονή και τον έλεγχο βρογχοσκόπησης. Υπάρχουν τρεις ισομορφές των NO συνθεσών (NOS): νευρωνική NOS (NOS1), επαγωγίμο NOS (NOS2) και ενδοθηλιακό NOS (NOS3). Τα NOS1 και NOS3 εκφράζονται σε διάφορους τύπους κυττάρων, ενώ το NOS2 ρυθμίζεται από κυτοκίνες κυρίως στο επίπεδο της γονιδιακής μεταγραφής (Grasemann H et al 2003).

Τα επίπεδα εκπνεόμενου NO είναι αυξημένα σε άτομα με φλεγμονώδεις πνευμονοπάθειες, όπως το άσθμα και η βρογχολίτιδα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Εντούτοις, παρά τη φλεγμονώδη φύση της ασθένειας των πνευμόνων του CF, τα επίπεδα NO στον εκπνεόμενο αέρα από τους ασθενείς με CF είναι χαμηλότερα από αυτά των υγιών μαρτύρων και ατόμων με άλλα φλεγμονώδη νοσήματα του πνεύμονα (Zheng S et 2004).

Πρόσφατα, ο Grasemann απέδειξε ότι ο αριθμός των AAT που επαναλαμβάνονται στο γονίδιο NOS1 να συσχετίζεται αρνητικά με εκπνεόμενο NO σε ασθενείς με ΚΙ. Επιπλέον, οι ασθενείς με CF με υψηλό αριθμό επαναλήψεων AAT φάνηκε να αποικίζονται πιο συχνά με *P. aeruginosa* και *A. fumigatus*. Σε έναν άλλο πληθυσμό, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του αριθμού GT επαναλήψεων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου NOS1 και των υψηλότερων επιπέδων εκπνεόμενου NO με μικρότερη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας. Η ομάδα του Grasemann βρήκε επίσης μια συσχέτιση μεταξύ ενός κοινού πολυμορφισμού (G847T) στο γονίδιο NOS3, υψηλότερα εκπνεόμενα επίπεδα NO και μειωμένο κίνδυνο αποικισμού με *P. aeruginosa* στις γυναίκες. Αυτή η διαπίστωση δεν βρέθηκε σε άρρενα άτομα και στον συνολικό πληθυσμό. Συμπερασματικά, τουλάχιστον το γονίδιο NOS1 φαίνεται να είναι σημαντικός τροποποιητής του πνευμονικού φαινοτύπου της ΚΙ (Grasemann H et al 2000, Grasemann H et al 2002, Texereau J et 2004).

### **III.1.4 α1 Αντιθρυψίνη [α1-Antitrypsin (α1-AT)]**

Μια κύρια αιτία της χρόνιας πνευμονικής νόσου στην ΚΙ είναι μια επίμονη ανισορροπία μεταξύ των πρωτεασών των ουδετεροφίλων, και ιδιαίτερα της ελαστάσης και των αντι-πρωτεασών της α1-AT. Η α1-AT είναι μια γλυκοπρωτεΐνη οξείας φάσης και είναι ο σημαντικότερος αναστολέας πρωτεασών στον πνεύμονα. Οι περισσότερες κλινικά

σημαντικές παραλλαγές είναι οι κοινές S (Glu264Val) και Z (Glu342Lys) οι οποίες ανευρίσκονται σε περίπου 12% του πληθυσμού. Ένας άλλος πολυμορφισμός στο στοιχείο δέσμευσης του ενισχυτή 3 της μη κωδικοποιητικής περιοχής του γονιδίου α1-AT (G1237A) μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της α1-αντιθρυψίνης κατά τη διάρκεια της απόκρισης οξείας φάσης αφήνοντας τα επίπεδα της βασικής γραμμής ανεπηρέαστα (Mahadeva R et al 1998).

Οι Doring et al. απέδειξαν το συντομότερο χρονικά αποικισμό με *P.aeruginosa* σε ασθενείς που έφεραν τα παραλλαγμένα αλληλία της α1 αντιθρυψίνης αλλά δεν επιβεβαιώθηκε από τους Meyer et al. Οι Doring et al δεν βρήκαν κάποια σχέση μεταξύ της ανεπάρκειας και της πνευμονικής λειτουργίας, αλλά σε μια άλλη μελέτη, στην οποία προσαρμόστηκε για την ηλικία, μια σημαντικά καλύτερη πνευμονική λειτουργία βρέθηκε σε ασθενείς με ανεπάρκεια γονότυπου (M, S, Z) σε σύγκριση με ασθενείς με φυσιολογικό φαινότυπο (Doring G et al 1994, Meyer P et al 2002). Στην τελευταία μελέτη, καμία σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού G1237A και της πνευμονικής λειτουργίας δεν ανεβρέθη. Από την άλλη πλευρά, σε μια μελέτη των Henry et al., ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με καλύτερη πνευμονική λειτουργία, λιγότερες αλλαγές απεικονιστικά και μικρότερο ποσοστό επιδείνωσης. Τέλος, σε μια μεγάλη πρόσφατη καναδική μελέτη (n = 716) δεν ανευρέθη καμία συσχέτιση μεταξύ ανεπάρκειας Z και S ή πολυμορφισμού G1237A με την ηλικία του αποικισμού από *P. aeruginosa*. Μπορεί επομένως να συναχθεί το συμπέρασμα ότι, παρά την σημαντική ποσότητα δεδομένων, ο αντίκτυπος της α1-AT στο φαινότυπο των ατόμων με κυστική ίνωση εξακολουθεί να είναι ασαφής (Henry MT et al 2001, Frangolias DD et al 2003).

### **III.1.5 Human leukocyte antigen (HLA) system**

Το σύστημα HLA είναι η ανθρώπινη εκδοχή του μεγάλου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Ελέγχει ποσοτικά και ποιοτικά πτυχές των ανοσολογικών αποκρίσεων. Ορισμένα HLA αλληλόμορφα έχουν δείξει ότι σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία σε μολυσματικές ασθένειες, υψηλότερο κίνδυνο αυτοάνοσων ασθενειών και ανάπτυξης καρκίνου. Μια μελέτη σε ασθενείς με CF έδειξε ότι ο αποικισμός με *P. aeruginosa* ήταν σημαντικά λιγότερο πιθανός μεταξύ του HLA DR4 ενώ οι φορείς του αλληλόμορφου DR7 ήταν περισσότερο πιθανό να αποικιστούν με *P. aeruginosa* και είχαν υψηλότερα IgE επίπεδα. Δεν υπάρχει συσχέτιση με την πνευμονική λειτουργία ή την ύπαρξη ρινικών πολύποδων. Συσχέτιση με τον γονότυπο HLA έχει επίσης περιγραφεί για

το διαβήτη (DQB1 Asp57) και την ηπατοπάθεια της κυστικής ίνωσης (DQ6). ( Klein J et al 2000, Aron Y et al 1999, Carrington M et al 1994, Carrington M et al 1993)

### **III.1.6 Παράγοντας νέκρωσης όγκων [Tumor necrosis factor-a (TNF-a)]**

Ο TNF-a είναι μια προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στους πνεύμονες ασθενών με ΚΙ. Ένας πολυμορφισμός του γονιδίου προαγωγού του TNF-a (G-308A) σχετίζεται με υψηλότερα επαγωγίμα επίπεδα μεταγραφής του TNF-a. Οι ασθενείς με CF που έφεραν έναν πολυμορφισμό G308A έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικά χαμηλότερη πνευμονική λειτουργία και σωματικό βάρος σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς αυτόν τον πολυμορφισμό (Kroeger KM et al 1997 , Hull J et al 1998).

### **III.1.7 Τρανσφεράση της γλουταθειόνης [Glutathione S-transferases (GST)]**

Η γλουταθειόνη είναι το κύριο τοπικό πνευμονικό αντιοξειδωτικό και υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις στο συνεκτικό υγρό των επιθηλίων. Οι GST αποτοξινώνουν τα επιβλαβή οργανικά υδροϋπεροξειδία τα οποία δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε οξειδωτικό στρες,όπως αυτό που βρέθηκε στους πνεύμονες των ασθενών με ΚΙ. Τα GSTs συζεύγνουν τα υδροπεροξειδία με γλουταθειόνη, εμποδίζοντας έτσι περαιτέρω την πνευμονική βλάβη. Ένα γονίδιο σε αυτή την αντιοξειδωτική οικογένεια, GST M1, έχει ένα κοινό αλληλόμορφο που δεν λειτουργεί (GST M1-0). Οι ασθενείς με CF που είναι ομόζυγοι γι' αυτό το αλληλόμορφο έχουν χειρότερα απεικονιστικά ευρήματα και χειρότερη έκβαση της νόσου. Μια άλλη συσχέτιση υπήρξε μεταξύ ενός παραλλαγμένου γονότυπου που αποτελείται από μια έλλειψη τριών βάσεων για το GST M3 και της καλύτερης λειτουργίας των πνευμόνων. Τέλος, μελετήθηκε ένας πολυμορφισμός στο GST P1 (Ile105Val) που συσχετίζεται με ηπατική νόσο. (Flamant C et al 2004, Henrion-Caude A et al 2002)

### **III.1.8 Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης [Angiotensin I converting enzyme (ACE)]**

Το ACE είναι ένα άλλο προφλεγμονώδες μόριο, το οποίο ενεργοποιείται από τον TGF- $\beta$ 1, και μπορεί να έχει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη περαιτέρω σημαντικής βλάβης στα εμπλεκόμενα στην κυστική ίνωση όργανα. Ένας πολυμορφισμός στο ACE, που αποτελείται



από παρουσία (I) ή απουσία (D) ενός θραύσματος DNA 250 bp σχετίζεται με τα επίπεδα ACE στον ορό. Ο γονότυπος (DD) σε ασθενείς με ΚΙ βρέθηκε ότι παράγει μεγάλη ποσότητα ACE και σχετίζεται με την ηλικία του ασθενούς κατά την οποία ο FEV1 ήταν μικρότερος από το 50% και με την ανάπτυξη κίρρωσης του ήπατος. (Arkwright PD et al 2003)

#### **IV. Άλλα τροποποιητικά γονίδια**

Εκτός από τα τροποποιητικά γονίδια που εμπλέκονται στην άμυνα του ξενιστή και τη φλεγμονή, έχουν περιγραφεί και άλλα τροποποιητικά γονίδια. Οι β2-αδρενοϋποδοχείς (β2AR) είναι σημαντικοί μεσολαβητές του κυκλικού AMP στον αεραγωγό. Μπορούν να τροποποιήσουν τη δραστηριότητα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR σε ασθενείς με CF με μεταλλάξεις που έχουν ως συνέπεια υπολειμματική λειτουργία της CFTR (π.χ., DF508). Για παράδειγμα, ένας πολυμορφισμός του β2AR (R16G) αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με μειωμένη πνευμονική λειτουργία και μεγαλύτερη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας (Buscher R et al 2002, Rohlfes EM et al 1998).

Σε δύο μελέτες ασθενών με ΚΙ, ειλεός εκ μηκωνίου παρατηρήθηκε συχνότερα σε φορείς ενός πολυμορφισμού (C282Y) στο γονίδιο για αιμοχρωμάτωση (HFE) σε σύγκριση με ασθενείς που δεν παρουσίασαν ειλεό εκ μηκωνίου (19% έναντι 10% και 31% έναντι 13%, αντίστοιχα). Και στις δύο μελέτες, το εύρημα αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό.

Μια πολύ ισχυρή συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ ενός γενετικού τόπου στο χρωμόσωμα 19q13, που ονομάζεται CFM1, και της εμφάνισης ειλεού εκ μηκωνίου σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Ο γενετικός τόπος CFM1 βρίσκεται σε στενότερη σύνδεση με ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα νατριοεξαρτώμενο ουδέτερο αμινοξύ μεταφορέα που ονομάζεται ATB0 ή SLC1A5. Ωστόσο, καμία συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ειλεού εκ μηκωνίου και του συγκεκριμένου αλληλόμορφου ή απλοτύπου ATB0 ήταν εφικτό να αποδειχθεί (Denavey J et al 2003, Zielenski J et al 1999).

Διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια IFI16, CCNE2 και IGFBP2 είναι δυναμικοί τροποποιητές της πνευμονικής λειτουργίας στην κυστική ίνωση ενώ το EPHX1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, DSP και SLC33A1, GPNMB, NCF2, RASGRP1, LGALS3 και PTPN13, είναι δυναμικοί τροποποιητές των κλινικών εκδηλώσεων του ήπατος και του παγκρέατος, αντίστοιχα. Συσχετιζόμενα γενετικά μονοπάτια δείχνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο πιθανώς εμπλέκεται σημαντικά στις εκδηλώσεις της Κυστικής ίνωσης με την

ουβικιτίνη C να διαδραματίζει πιθανώς κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση ηπατικής ή παγκρεατικής νόσου σε νοσούντες από ινοκυστική νόσο.(Troune et al 2017)

Η IFI16 η οποία πιθανώς διαδραματίζει κάποιο ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις αυτοάνοσες διαταραχές εκφράζεται κανονικά στον κυτταρικό πυρήνα αλλά μπορεί να εντοπιστεί εσφαλμένα στο κυτταρόπλασμα και να εκκριθεί. Πράγματι, σημαντικά επίπεδα εξωκυττάριας IFI16 πρωτεΐνης έχουν ταυτοποιηθεί στους ορούς των ασθενών με αυτοάνοσες ασθένειες. Αυτά τα δεδομένα παρέχουν στοιχεία για τη λειτουργία της IFI16 μετά από φλεγμονή και βλάβη ιστού, όπως παρατηρείται στην ινοκυστική νόσο.(Mondini M et al 2010.)

Το ανθρώπινο γονίδιο CCNE2 κωδικοποιεί πρωτεΐνη 404 αμινοξέων, που σχετίζεται με την κυκλίνη E. Συνδέεται με το Cdk2 σε ένα λειτουργικό σύμπλοκο κίνησης (Payton M et al 2002) και εμπλέκεται στην εξέλιξη της G1 φάσης (Laufer N et al 1998) .Η ενεργοποιημένη ουδετερόφιλη ελαστάση βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους αεραγωγούς των ασθενών με κυστική ίνωση (Nakamura H et al 1992) και έχει επιζήμια αποτελέσματα στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών. Επειδή η προστασία του φυσιολογικού ανθρώπινου βρογχικού επιθηλίου από την ελαστάση έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του σταδίου G, μέσω της αναστολής της σύμπλεξης της κυκλίνης E (Fischer BM et al 200) , προτάθηκε ότι η CCNE2 εμπλέκεται ενδεχομένως στην παθοφυσιολογία του CF.

Οι αυξητικοί παράγοντες που ομοιάζουν με την ινσουλίνη (IGF) διεγείρουν την ανάπτυξη πολλαπλών τύπων κυττάρων. Ο IGF-II έχει πρόσβαση στον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας και ενεργοποιείται από τον IGFBP-2 (Kelley K et al 1996) . Έχει περιγραφεί ότι τα επίπεδα του IGF-II στον ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς με κυστική ίνωση παρά στους μάρτυρες, ενώ τα επίπεδα του IGFBP-2 στον ορό ήταν σημαντικά υψηλότερα (Street ME et al 2006) . Οι γραμμομοριακές αναλογίες IGF-II / IGFBP-2 βρέθηκαν επίσης σημαντικά χαμηλότερες σε ασθενείς με ινοκυστική νόσο. Επειδή η χρόνια φλεγμονή είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του IGF /IGFBP στην κυστική ίνωση και επειδή ο IGF2 προάγει την ανάπτυξη παγκρεατικών βήτα κυττάρων με τα οποία συσχετίζονται ορισμένες μορφές σακχαρώδους διαβήτη,το IGFBP-2 προτάθηκε επίσης ως τροποποιητικό γονίδιο της ινοκυστικής νόσου .

Το γονίδιο EPHX1 κωδικοποιεί ένα πανταχού παρόν ένζυμο συσχετιζόμενο με τις α και β υδρολάσες. Μεταλλάξεις στο γονίδιο EPHX1 συμβάλλουν σε διάφορες ασθένειες ( Vaclavikova R et al 2015) ενώ συνδεδεμένο με την έκθεση σε καπνο ενδέχεται να προκαλέσει καρκίνωμα του πνεύμονα (Peluso ME et al 2013) . Όσον αφορά την κυστική

ίνωση, η χαμηλή δραστηριότητα του EPHX1 βρέθηκε ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) στους Καυκάσιους (Li H et al 2013) . Γενετικοί πολυμορφισμοί των GSTP1 και EPHX1 δείχθηκε ότι συσχετίζονται με τους δείκτες οξειδωτικού στρες και τη λειτουργία των πνευμόνων στη ΧΑΠ (Vibhuti A et al 2007) .

Η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος (CGD) είναι η πιο κοινή ανοσοανεπάρκεια φαγοκυττάρων λόγω μεταλλάξεων σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την NADPH οξειδάση στα φαγοκύτταρα. Όπως και στην ινοκυστική νόσο , το CGD χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις και φλεγμονή στους πνεύμονες . Επειδή οι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο NCF2 παρουσιάζουν σοβαρές λοιμώξεις ομοίως και οι ασθενείς με μετάλλαξη στο CGD ( Kuhns DB et al 2010 , Ben-Farhat et K et al 2016 ) γονίδιο συγκαταλέγονται στα γονίδια που δυνητικά τροποποιούν τον φαινότυπο της κυστικής ίνωσης.

Τέλος, γονίδια που κωδικοποιούν παράγωγα που συμμετέχουν στον έλεγχο των καναλιών χλωρίου πέραν της διαμεμβανικής πρωτεΐνης CFTR δυνητικά θα μπορούσαν να αποτελέσουν τροποποιητικά γονίδια. Το CLC-2 γονίδιο που εντοπίζεται στο πνευμονικό επιθήλιο θα μπορούσε να συμμετέχει σε ένα εναλλακτικό κανάλι χλωρίου. Εντούτοις, οι πολυμορφισμοί αυτού του γονιδίου δεν φαίνεται να συσχετίζονται με τη σοβαρότητα της πνευμονικής νόσου(Larriba S et al 2001, Blaisdell CJ et al 2004).

#### **IV.1 Γαστρεντερικός Φαινότυπος**

Η προδιάθεση για το ειλεό εκ μηκωνίου στην κυστική ίνωση είναι σαφώς καθορισμένη γενετικά. Ωστόσο, η προσέγγιση του υποψήφιου γονιδίου δεν έχει εφαρμοστεί μέχρι στιγμής σε αυτό το κλινικό σύμπτωμα της κυστικής ίνωσης. Ο γενετικός τύπος του γονιδίου CLCA έχει αναγνωριστεί προηγουμένως ως ένας διαμορφωτής του βασικού γαστρεντερικού ελαττώματος σε ασθενείς με κυστική ίνωση (Ritzka M et al 2004). Χρησιμοποιώντας έναν εξατομικευμένο χάρτη SNP με συνολικά 17 διαλεκτικούς δείκτες και μια στρατηγική επανεξέτασης για λεπτομερή χαρτογράφηση, οι Kolbe et al ανίχνευσαν σημαντικές διαφορές στην κατανομή αλληλίων για τους δείκτες εντός του προαγωγού του γονιδίου CLCA4 μεταξύ των ομόζυγων ασθενών με F508del είτε με αγωγιμότητα που δεν προκαλείται από CFTR, είτε από Ca<sup>2+</sup> . Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η CLCA4 ρυθμίζει την ικανότητα έκφρασης της υπολειμματικής έκκρισης χλωρίου σε ιστό του κόλου

και ως εκ τούτου δρα ως τροποποιητής του βασικού ελαττώματος στα εντερικά κύτταρα των ασθενών με κυστική ίνωση(Kolbe EW et al 2013).

#### **IV.1.1 Διαβήτης συσχετιζόμενος με την κυστική ίνωση**

Το γεγονός ότι ο διαβήτης αποτελεί συνηθισμένη επιπλοκή της ΚΙ και επηρεάζεται έντονα από τροποποιητικά γονίδια και ότι ένα οικογενειακό ιστορικό διαβήτη τύπου 2 αυξάνει τον κίνδυνο για διαβήτη σχετιζόμενου με το CF αυξάνει την ανάγκη δοκιμής των σχετιζόμενων με το T2DM γονιδίων ως πιθανών τροποποιητών του διαβήτη συσχετίζεται με την κυστική ίνωση. Αναλύοντας έξι γονίδια που συμβάλλουν στην εκδήλωση του διαβήτη τύπου 2, οι Derbel et al παρουσίασαν την πρώτη απόδειξη για την εμπλοκή ενός πολυμορφισμού στο γονίδιο CAPN10 στην παθογένεση του σχετιζόμενου με την ΚΙ διαβήτη(Derbel S et al 2006). Μια άλλη προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου αποκάλυψε τα τροποποιητικά αποτελέσματα μιας παραλλαγής στο TCF7L2 γονίδιο που συσχετίζεται τόσο με διαβήτη τύπου 2 όσο και με διαβήτη που σχετίζεται με την ΚΙ, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι ο διαβήτης αναπτύσσεται σε ασθενείς που μπορεί να έχουν υποκείμενη ευαισθησία στη δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος(Blackman SM et al 2009)

#### **IV.1.2 Ηπατική νόσος συσχετιζόμενη με την κυστική ίνωση**

Μόνο ένα υποσύνολο (3% -5%) ασθενών με ΚΙ εμφανίζει σοβαρή ηπατική νόσο , που χαρακτηρίζεται από κίρρωση με πυλαία υπέρταση που υποδεικνύει τη συμβολή της γενετικής μεταβλητότητας χωρίς τη συμβολή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR στον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρής ηπατικής νόσου. Η μεγαλύτερη μελέτη δύο σταδίων επικεντρώθηκε σε εννέα λειτουργικές παραλλαγές σε πέντε υποψήφια γονίδια (SERPINA1, ACE, GSTP1, MBL2, TGFβ1) που είχαν μελετηθεί προηγουμένως σε εκδήλωση ηπατικής νόσου σε ασθενείς με κυστική ίνωση, αλλά συμπεριέλαβαν μόνο μικρές και ετερογενείς ομάδες ασθενών με και χωρίς πυλαία υπέρταση(Frangolias DD et al 2003, Arkwright PD et al 2003, Henrion-Caude A et al 2002, Gabolde M et al 2001). Δύο μεγάλοι πληθυσμοί ασθενών με ΚΙ (128/971 και 139 / 1,227, αντίστοιχα) και χωρίς (843/971 και 1,088 / 1,227, αντίστοιχα) ηπατική νόσο και πυλαία υπέρταση δοκιμάστηκαν και μόνο το αλληλόμορφο Z της SERPINA1 βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με ηπατική νόσο της κυστικής ίνωσης και πυλαία υπέρταση. Οι παραλλαγές στο TGFβ1 συσχετίστηκαν επίσης με την εμφάνιση σοβαρής ηπατικής νόσου στο στάδιο 1 της μελέτης.(Bartlett JR et al 2009)

### IV.1.3 Σοβαρότητα της ινοκυστικής νόσου

Μία μελέτη συσχέτισης που συγκρίνει ομάδες ομόζυγων ασθενών για τη μετάλλαξη F508del και επιλέχθηκαν για ακραίο κλινικό φαινότυπο ή / και λόγω του βασικού ελαττώματος τους εξέτασε τα γονίδια STAT3, IL1B και IFNGR1 ως τροποποιητές της ινοκυστικής νόσου. Στοιχεία για την συσχέτιση αλληλόμορφων βρέθηκαν για τα STAT3 και τη CFTR-μεσολαβούμενη έκκριση υπολειμματικών χλωριούχων ιόντων στον εντερικό ιστό, για την IL1B και τη σοβαρότητα της νόσου και για το IFNGR1 και την ενδοκοιλιακή συρρίκνωση υποδηλώνοντας ότι οι ανοσοαντιδραστικές οδοί και η έκκριση ιόντων συγχωνεύονται στο επίπεδο των επιθηλιακών κυττάρων για την ενσωμάτωση της σηματοδότησης των κυτοκινών λόγω της έμφυτης και επίκτητης ανοσολογικής άμυνας (Labenski H et al 2011).

Μια άλλη μελέτη υποψήφιων τροποποιητικών γονιδίων διερεύνησε τα δύο γειτονικά γονίδια κυτοκερατίνης KRT8 και KKT18 σε ζεύγη ομοζυγών για τη F508del και μη συγγενικά περιστατικά που επιλέχθηκαν για τον ακραίο κλινικό ή ηλεκτροφυσιολογικό φαινότυπο τους που χαρακτηρίστηκε από μετρήσεις εντερικού ρεύματος ή ρινικής διαφοράς δυναμικού. Το KRT8, αλλά όχι το KRT18, συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της ασθένειας της ΚΙ. Η απουσία έκκρισης χλωρίου προσδιορίστηκε από τον υπολειπόμενο απλότυπο 1122 (rs1907671, rs4300473, rs2035878, rs2035875), ενώ στον αντίθετο απλότυπο 2211 κυριαρχούσε η παρουσία CFTR-μεσολαβούμενης απόσβεσης χλωριούχου υπολείμματος και συνδέθηκε με έναν ήπιο φαινότυπο. Η σημασία αυτών των αποτελεσμάτων για το KRT8 είναι ότι οι τροποποιητές της σοβαρότητας της ασθένειας της ΚΙ μπορούν να αναγνωριστούν μέσω της σύνδεσής τους με το βασικό ελάττωμα, το οποίο επηρεάζεται λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Stanke F et al 2011).

Οι Li et al εξέτασαν την υπόθεση ότι τα ίδια αλληλόμορφα κινδύνου για το ειλεό εκ μηκωνίου SLC26A9, SLC9A3 και SLC6A14 είναι πλειοτροπικά για τη σοβαρότητα της πνευμονικής νόσου, την ηλικία κατά την πρώτη μόλυνση με *P. aeruginosa* και την πρώιμη εξωκρινή παγκρεατική νόσο. Διαπίστωσαν ότι το SLC26A9 ήταν πλειοτροπικό για τον ειλεό εκ μηκωνίου και την παγκρεατική βλάβη στο rs7512462, το SLC9A3 για τον ειλεό εκ μηκωνίου και τη νόσο των πνευμόνων στο rs17563161 και το SLC6A14 για τον ειλεό εκ μηκωνίου, την πνευμονοπάθεια και την ηλικία στην πρώτη μόλυνση *P. aeruginosa* στο rs3788766. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι η πλειοτροπία σε μια πολυοργανική ασθένεια πρέπει να ελεγχθεί και μπορεί να εκτιμηθεί σε ένα μόνο δείγμα μελέτης. Τα

αποδεικτικά στοιχεία της πλεοτροπίας για τα γονίδια (τροποποιητή) μπορεί να επιτρέψουν την ανάπτυξη συμπληρωματικών θεραπευτικών στρατηγικών που θα ωφελήσουν πολλαπλούς ιστούς που σχετίζονται με τη νόσο (Li W et al 2014).

#### **IV.1.4 Περιβαλλοντικοί Τροποποιητικοί Παράγοντες**

Ο εντοπισμός των αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος στην ινοκυστική νόσο θα μπορούσε να αποδειχθεί κλινικά πολύτιμος. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να είναι περισσότερο επιδεκτικοί στις παρεμβάσεις σε αντίθεση με τους γενετικούς τροποποιητές. Ωστόσο, η ακριβής περιγραφή και ποσοτικοποίηση των περιβαλλοντικών τροποποιητικών παραγόντων είναι πιο δύσκολη και πιο χρονοβόρα διαδικασία σε σύγκριση με τον προσδιορισμό των γενετικών τροποποιητικών παραγόντων. Μπορεί να υποτεθεί ότι οι δυσμενείς επιδράσεις που παρατηρούνται σε συγκεκριμένους πολυμορφισμούς ενισχύονται παρουσία επιβλαβών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Περιλαμβάνονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ MBL2 και *Pseudomonas* (Garred P et al 1999, Trevisiol C et al 2005) και MBL2 και *Staphylococcus aureus* (Carlsson M et al 2005) που οδηγούν σε επιπλέον μείωση της πνευμονικής λειτουργίας. Εκτός από τις λοιμώξεις, τα δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις γνωστών περιβαλλοντικών τροποποιητών της κυστικής ίνωσης, για παράδειγμα, την επίδραση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στη λειτουργία των πνευμόνων των ασθενών με ΚΙ (Goss GH et al 2004), είναι σχεδόν ανύπαρκτα. Ωστόσο, οι πρόσφατες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του παθητικού καπνού και του TGFB1, καθώς και της CFTR, έχουν εντοπιστεί. Το κάπνισμα φαίνεται ότι μπορεί να αυξήσει τη σοβαρότητα της ινοκυστικής νόσου. Σε παιδιά που πάσχουν από ΚΙ και εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα, η πνευμονική λειτουργία βρέθηκε να μειώνεται πιο γρήγορα σε σύγκριση με εκείνα χωρίς έκθεση στον καπνό (Smyth A et al 1994, Rubin BK et al 1990, Konovesi T et al 1993). Λειτουργικές μελέτες έχουν επίσης δείξει μειωμένη λειτουργία της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR από την έκθεση στον καπνό τσιγάρων. Αυτό υποδηλώνει τη δυνατότητα άνθρωποι χωρίς ΚΙ να μπορούν επίσης να παρουσιάζουν ήπιο φαινότυπο ινοκυστικής νόσου όταν εκτίθεται στους κατάλληλους περιβαλλοντικούς τροποποιητικούς παράγοντες (Raju SV et al 2014).

#### **V:ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Παρόλο που το βασικό παθογνωμονικό στοιχείο της ινοκυστικής νόσου είναι οι διαφορές μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR, η εκδήλωση φαινοτύπων όπως ο διαβήτης ή η ηπατική νόσος καθώς και η σοβαρότητα της νόσου εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, γεγονός που δίνει έμφαση στην αναζήτηση τροποποιητικών γονιδίων της ινοκυστικής νόσου και το ενδιαφέρον σχετικά με την περαιτέρω κατανόηση και άλλων πολύπλοκων ασθενειών, όπως το άσθμα ή οι καρδιαγγειακές διαταραχές.

Ο αριθμός των τροποποιητικών γονιδίων που επηρεάζουν τον φαινότυπο της κυστικής ίνωσης που έχει αναφερθεί μέχρι τώρα είναι εντυπωσιακός και παρέχει καινοφανή γνώση για τις βιολογικές οδούς και την παθοφυσιολογία της νόσου, προετοιμάζοντας το δρόμο για την κατανόηση και άλλων γενετικών διαταραχών. Οι αναλύσεις σε όλη την έκταση του γονιδιώματος θα γίνουν ρουτίνα στο εγγύς μέλλον και μπορεί να βελτιώσουν τη διάγνωση και τη φαινοτυπική πρόβλεψη των γενετικών διαταραχών, συμπεριλαμβάνοντας όλα τα γονίδια που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην εκδήλωση μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που έχουν αποδειχθεί ότι τροποποιούν την πορεία της νόσου θα γίνουν πολλά υποσχόμενοι στόχοι για θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Συμπερασματικά, η μελέτη των τροποποιητικών γονιδίων ανοίγει νέες διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές προοπτικές, οδηγώντας παράλληλα στην αντίληψη ότι δεν υπάρχει μια ενιαία διαταραχή και ότι τα γενετικά νοσήματα αντιπροσωπεύουν μια συνέχεια της επιρροής του πρωτεύοντος γονιδίου από τροποποιητικά γονίδια, καθιστώντας την επιστήμη της γενετικής πιο ενδιαφέρουσα και συνάμα πιο περίπλοκη σε σύγκριση με το παρελθόν.

## VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmed N, Corey M, Forstner G, Zielenski J, Tsuilc, Ellis L et al. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut* 52:1159–1164, 2003

Akhurst RJ. TGF beta signaling in health and disease. *Nat Genet.* 2004;36(8):790–792.

Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, et al. End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(3):384–389.

Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, et al. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA.* 2009;302(10):1076–1083.

Ben-Farhat K, Ben-Mustapha I, Ben-Ali M, Rouault K, Hamami S, Mekki N, et al. A Founder Effect of c.257 + 2T > C Mutation in NCF2 Gene Underlies Severe Chronic Granulomatous Disease in Eleven Patients. *J Clin Immunol.* 2016;[Epub ahead of print].

Bertrand CA, Frizzell RA. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(1):C1–C18.

Beucher J, Boelle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, Clement A, Corvol H. AGER - 429T/C is associated with an increased lung disease severity in cystic fibrosis. *PLoS One.* 2012;7(7):e41913.

Blackman SM, Commander CW, Watson C, et al. Genetic modifiers of cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes.* 2013;62(10):3627–3635.

Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1030–1039.

Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, et al. A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis. *Diabetologia.* 2009;52(9):1858–1865.

Blaisdell CJ, Howard TD, Stern A, Bamford P, Blecker ER, Stine OC. CLC-2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) as potential modifiers of cystic fibrosis disease severity. *BMC Med Genet* 2004;5:26.

Blohmke CJ, Park J, Hirschfeld AF, et al. TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis. *J Immunol.* 2010;185(12):7731–7738.



Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, et al. Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J Immunol.* 2008;180(11):7764–7773.

Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations – correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575–606.

Bobadilla JL, Macek MJR, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations: Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19:575–606, 2002

Bobadilla JL, Macek MJR, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations: Correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19:575–606, 2002

Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011;10 Suppl 2:S86–S102.

Borgo G, Gasparini P, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G, Pignatti PF. Cystic fibrosis: the delta F508 mutation does not lead to an exceptionally severe phenotype. A cohort study. *Eur J Pediatr.* 1993;152(12):1006–1011.

Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr Opin Pulm Med* 9:498–503, 2003

Bradbury NA. Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev.* 1999;79(Suppl 1):S175–S191.

Bradley GM, Blackman SM, Watson CP, Doshi VK, Cutting GR. Genetic modifiers of nutritional status in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(6):1299–1308.

Bremer LA, Blackman SM, Vanscoy LL, et al. Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(14): 2228–2237.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177– 86.

Busch R. On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 1999; 36:13-15

Buscher R, Eilmes KJ, Grasmann H, Torres B, Knauer N, Sroka K, et al. Beta2 adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. *Pharmacogenetics* 2002;12:347– 53

Carlsson M, Sjöholm AG, Eriksson L, et al. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization

may be decisive for a relationship. *Clin Exp Immunol* 2005;139:306–313. [PubMed: 15654829]

Chalmers JD, Fleming GB, Hill AT, Kilpatrick DC. Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: a review and meta-analysis. *Glycobiology*. 2011;21(3):271–282.

Chiang CH, Chuang CH, Liu SL, Shen HD. Genetic polymorphism of transforming growth factor beta1 and tumor necrosis factor alpha is associated with asthma and modulates the severity of asthma. *Respir Care*. 2013;58(8):1343–1350.

Corvol H, Beucher J, Boelle PY, et al. Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2012;11(1):63–67.

Corvol H, Boelle PY, Brouard J, et al. Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(12):1224–1232.

Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1214:57–69.

Cystic fibrosis genetic analysis consortium. Cystic fibrosis mutation database. Available at: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>.

Darrah R, McKone E, O'Connor C, et al. EDNRA variants associate with smooth muscle mRNA levels, cell proliferation rates, and cystic fibrosis pulmonary disease severity. *Physiol Genomics*. 2010;41(1): 71–77

Davies JC, Turner MW, Klein N. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. *Eur Respir J* 2004;24:798– 804.

Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(5):475–482.

De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61(7):627–35, 2006

Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 1992; 358:761–4.

Derbel S, Doumaguet C, Hubert D, et al. Calpain 10 and development of diabetes mellitus in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2006;5(1): 47–51.

Devaney J, Maher M, Smith T, Houghton JA, Glennon M. HFE alleles in an Irish cystic fibrosis population. *Genet Test* 2003;7:155 – 8.

Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, et al. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13330–13335.

Dodge J. A millennial view of cystic fibrosis. *Developmental period medicine*. 2015 ; XIX ; 9-13

Dorfman R, Li W, Sun L, et al. Modifier gene study of meconium ileus in cystic fibrosis: statistical considerations and gene mapping results. *Hum Genet*. 2009;126(6):763–778.

Dorfman R, Sandford A, Taylor C, et al. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1040–1049.

Dorfman R, Taylor C, Lin F, et al. Modulatory effect of the SLC9A3 gene on susceptibility to infections and pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(4):385–392.

Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353(14):1443–1453.

Emond MJ, Louie T, Emerson J, et al. Exome sequencing of extreme phenotypes identifies DCTN4 as a modifier of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Nat Genet*. 2012;44(8): 886–889.

Farrell PM, Joffe S, Foley L, Canny GJ, Mayne P, Rosenberg M. Diagnosis of cystic fibrosis in the Republic of Ireland: epidemiology and costs. *Ir Med J*. 100(8):557–560, 2007

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, LeGrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW III. Guidelines for diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*. 14(2):S4–S1, 2008

Favia M, Fanelli T, Bagorda A, et al. NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(2):452–459.

Ferec C, Cutting GR: Assessing the disease-liability of mutations in CFTR. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009480, 2012

Ferrari M, Cremonesi L. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(6):235–241.

Fischer BM, Zheng S, Fan R, Voynow JA. Neutrophil elastase inhibition of cell cycle progression in airway epithelial cells in vitro is mediated by p27kip1. *Am J Physiol*

Lung Cell Mol Physiol. 2007; 293(3): L762±8.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00067.2007> PMID: 17586698

Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, et al. Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(3 Pt 1):390–396.

Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. *BMJ* 1999;319:1166–7.

Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M, Lenaerts C, Feingold J, Besmond C. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet.* 2001;38(5):310–311.

Gallati S. Genetics of cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2003;24(6):629–638.

Garred P, Pressler T, Madsen HO, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:431–437. [PubMed: 10449435]

Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:431–7.

Getting SJ, Riffo-Vasquez Y, Pitchford S, et al. A role for MC3R in modulating lung inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21(6):866–873.

Gisler FM, von Kanel T, Kraemer R, Schaller A, Gallati S. Identification of SNPs in the cystic fibrosis interactome influencing pulmonary progression in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(4):397–403.

Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, et al. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:816–821. [PubMed: 14718248]

Green DM, McDougal KE, Blackman SM, Sosnay PR, Henderson LB, Naughton KM, Collaco JM, Cutting GR. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respir Res* 11: 140, 2010

Gu Y, Harley IT, Henderson LB, et al. Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature.* 2009; 458(7241):1039–1042.

Guo X, Pace RG, Stonebraker JR, et al. Mucin variable number tandem repeat polymorphisms and severity of cystic fibrosis lung disease: significant association with MUC5AC. *PLoS One.* 2011;6(10): e25452.

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21873–21877.

Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J. Pediatr*. 132 (2): 255–9, Feb 1998

Harris JF, Fischer MJ, Hotchkiss JR, et al. Bcl-2 sustains increased mucous and epithelial cell numbers in metaplastic airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(7):764–772.

Henderson LB, Doshi VK, Blackman SM, et al. Variation in MSRA modifies risk of neonatal intestinal obstruction in cystic fibrosis. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002580.

Henrion-Caude A, Flamant C, Roussey M, et al. Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1): 913–917.

Hillian AD, Londono D, Dunn JM, et al. Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8. *Genes Immun*. 2008;9(6):501–508.

Hubert D, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, et al. Genotype-phenotype relationships in a cohort of adult cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 1996;9(11):2207–2214.

Hytönen M, Patjas M, Vento SI et al. Cystic fibrosis gene mutations deltaF508 and 394delTT in patients with chronic sinusitis in Finland. *Acta Otolaryngol*. 121 (8): 945–7, December 2001

Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M. Cystic fibrosis in Greece: Molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 63:400–409, 2003

Kelley Kevin M, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, et al. Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1996; 28:619±637.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073–1080.

Kerem B-S, Rommens JM, Buchaman JA et al. Identification of the Cystic Fibrosis gene : Genetic analysis. *Science*.1989 ; 245 : 1013-1020

Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui LC, Levison H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *J Pediatr*. 1989;114(5):767–773.

Kerem E, Corey M, Kerem BS, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*. 1990;323(22):1517–1522.

Kim D, Steward MC. The role of CFTR in bicarbonate secretion by pancreatic duct and airway epithelia. *J Med Invest*. 2009;56 Suppl:336–342.

Knowles M, Drumm M: The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009548, 2012

Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a009548.

Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? *N Engl J Med*. 2002;347(6):439–442.

Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, Mastella G, Navarro J, Strandvik B, McKenzie S. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): Comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol* 31: 1–12, 2001

Kolbe EW, Tamm S, Hedtfeld S, Becker T, Tummler B, Stanke F. CLCA4 variants determine the manifestation of the cystic fibrosis basic defect in the intestine. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(6):691–694.

Kormann MS, Hector A, Marcos V, et al. CXCR1 and CXCR2 haplotypes synergistically modulate cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2012;39(6):1385–1390.

Kovesi T, Corey M, Levison H. Passive smoking and lung function in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 1266–1271.

Kraemer R, Aebi C, Casaulta Aebischer C, Gallati S. Early detection of lung disease and its association with the nutritional status, genetic background and life events in patients with cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67(5):477–490.

Kraemer R, Birrer P, Liechti-Gallati S. Genotype-phenotype association in infants with cystic fibrosis at the time of diagnosis. *Pediatr Res*. 1998;44(6):920–926.

Kraemer R, Latzin P, Pramana I, Ballinari P, Gallati S, Frey U. Long-term gas exchange characteristics as markers of deterioration in patients with cystic fibrosis. *Respir Res*. 2009;10:106.

Kubesch P, Dork T, Wulbrand U et al. Genetic determinants of airways' colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Lancet*. 341:189–93, 1993

Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2010; 363(27):2600±10. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007097> PMID: 21190454

Labenski H, Hedtfeld S, Becker T, Tummler B, Stanke F. Initial interrogation, confirmation and fine mapping of modifying genes: STAT3, IL1B and IFNGR1 determine cystic fibrosis disease manifestation. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(12):1281–1288.

Lai HC, Kosorok MR, Laxova A, Davis LA, FitzSimmon SC, Farrell PM. Nutritional status of patients with cystic fibrosis with meconium ileus: a comparison with patients without meconium ileus and diagnosed early through neonatal screening. *Pediatrics*. 2000;105(1 Pt 1):53–61.

Larriba S, Sumoy L, Ramos MD, Gimenez J, Estivill X, Casals T, et al. ATB(0)/SLC1A5 gene. Fine localisation and exclusion of association with the intestinal phenotype of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2001;9:860 – 6.

Lauper N, Beck ARP, Cariou S, Richman L, Hofmann K, Reith W, et al. Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 1998; 17(20):2637±2643. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202477> PMID: 9840927

Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 2002;190:9– 25.

Li H, Fu WP, Hong ZH. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a comprehensive meta-analysis. *Oncol Lett*. 2013; 5:1022±1030. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1099> PMID: 23426996

Li W, Soave D, Miller MR, et al. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet*. 2014;133(2):151–161.

MacDonald KD, McKenzie KR, Zeitlin PL. Cystic fibrosis transmembrane regulator protein mutations: 'class' opportunity for novel drug innovation. *Paediatr Drugs*. 2007;9(1):1–10.

Maquat LE. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNAmetabolism in vertebrate cells. *RNA* 1995; 1: 453–65.

McDougal KE, Green DM, Vanscoy LL, et al. Use of a modeling framework to evaluate the effect of a modifier gene (MBL2) on variation in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(6):680–684.

McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: A retrospective cohort study. *Lancet* 361:1671–1676, 2003

Mondini M, Costa S, Sponza S, Gugliesi F, Gariglio M, Landolfo S. The interferon-inducible HIN-200 gene family in apoptosis and inflammation: implication for autoimmunity. *Autoimmunity* 2010; 43:226±31

Morrow T. Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. *J Manag Care Pharm* 2007;13:497–505. [PubMed: 17672811]

Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest.* 1992; 89:1478±1484. <https://doi.org/10.1172/JCI115738> PMID: 1569186

Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, et al. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2011;140(1):153–161.

Patwari P, Emilsson V, Schadt EE, et al. The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab.* 2011;14(5):671–683.

Payton M, Coats S. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(4):315±20.PMID: 11854029

Peluso ME, Munnia A, Srivatanakul P, Jedpiyawongse A, Sangrajang S, Ceppi M, et al. DNA adducts and combinations of multiple lung cancer at-risk alleles in environmentally exposed and smoking subjects. *Environ. Mol. Mutagen.* 2013; 54:375±383. <https://doi.org/10.1002/em.21788> PMID: 23797975

Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature.* 2012;487(7405):109–113.

Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell.* 2007;129(7):1351–1363.

Quinton PM. Role of epithelial HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(6):C1222–C1233.

Raju SV , Tate JH , Peacock SKG , Fang P , Oster RA , Dransfi eld MT , Rowe SM . Impact of heterozygote CFTR mutations in COPD patients with chronic bronchitis . *Respir Res.* 2014 ; 15 : 18 .



Ritzka M, Stanke F, Jansen S, et al. The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. *Hum Genet.* 2004;115(6):483–491.

Rohlfes EM, Shaheen NJ, Silverman LM. Is the hemochromatosis gene\_a modifier locus for cystic fibrosis? *Genet Test* 1998;2:85– 8.

Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 132(4):589-95, 1998

Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Cystic fibrosis. *Lancet.* 1998;351(9098): 277–282.

Rubin BK . Exposure of children with cystic fi brosis to environmental tobacco smoke . *N EnglJ Med* . 1990 ; 323 : 782 – 788.

Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet.* 2002;111(1):88–95.

Savastano DM, Tanofsky-Kraff M, Han JC, et al. Energy intake and energy expenditure among children with polymorphisms of the melanocortin-3 receptor. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(4):912–920.

Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(2):214–219.

Smyth A , O’Hea U , Williams G , Smyth R , Heaf D . Passive smoking and impaired lung function in cystic fi brosis . *Arch Dis Child* . 1994 ; 71 : 353 – 354 .

Sontag MK, Accurso FJ. Gene modifiers in pediatrics: application to cystic fibrosis. *Adv Pediatr* 2004;51:5– 36.

Stanke F, Becker T, Cuppens H, et al. The TNFalpha receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis. *Hum Genet.* 2006;119(3):331–343.

Stanke F, Hedtfeld S, Becker T, Tummler B. An association study on contrasting cystic fibrosis endophenotypes recognizes KRT8 but not KRT18 as a modifier of cystic fibrosis disease severity and CFTR mediated residual chloride secretion. *BMC Med Genet.* 2011;12:62.

Stanke F, van Barneveld A, Hedtfeld S, Wolfl S, Becker T, Tummler B. The CF-modifying gene EHF promotes p.Phe508del-CFTR residual function by altering protein glycosylation and trafficking in epithelial cells. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(5):660–666.

Street ME, Ziveri MA, Spaggiari C, Viani I, Volta C, Grzincich GL, et al. Inflammation is a modulator of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein system inducing reduced bioactivity of IGFs in cystic fibrosis. *Eur J*

Endocrinol. 2006; 154(1):47±52. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02064> PMID: 16381990

Sun L, Rommens JM, Corvol H, et al. Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet.* 2012;44(5):562–569.

Tikhmyanova N, Tulin AV, Roegiers F, Golemis EA. Dcas supports cell polarization and cell-cell adhesion complexes in development. *PLoS One.* 2010;5(8):e12369.

Tobias E. et al. Essential Medical Genetics. John Wiley & Sons. P.312. ISBN 1-118-29370-3, 2011

Trevisiol C, Boniotto M, Giglio L, et al. MBL2 polymorphisms screening in a regional Italian CF center. *J Cyst Fibros* 2005;4:189–191. [PubMed: 16046196]

Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423–9.

Vaclavikova R, Hughes DJ, Souček P. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. *Gene* 2015; 571(1):1±8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.071> PMID: 26216302

Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(10):1036–1043.

Vibhuti A, Arif E, Deepak D, Singh B, Qadar Pasha MA. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPHX correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359(1):136±42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.076> PMID: 17532303

Viel M, Leroy C, Hubert D, Fajac I, Bienvenu T. ENaCbeta and gamma genes as modifier genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008;7(1):23–29.

Von Kanel T, Stanke F, Weber M, et al. Clinical and molecular characterization of the potential CF disease modifier syntaxin 1A. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(12):1462–1466.

Watelet JB, Van Cauwenberge P, Bachert C. Rhinological aspects of cystic fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2000;55(6):475–477.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251–1254.

Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet.* 2011;43(6):539–546.

Wu L, Chau J, Young RP, et al. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2004;59(2):126–129.

Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek Jr M, Zemkova D, Vavrova V, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet* 2004;41:629–33

Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999;22:128–9

Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. *Allergy*. 2012;67(10):1193–1202.

Mendoza JL, Schmidt A, Li Q, Nuvaga E, Barrett T, Bridges RJ, et al. Requirements for efficient correction of DeltaF508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. *Cell* 2012; 148:164–74.

Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 2004; 5:389–96.

Rabeh WM, Bossard F, Xu H, Okiyoneda T, Bagdany M, Mulvihill CM, et al. Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore DeltaF508 CFTR folding and function. *Cell* 2012; 148:150–63.

Reddy MM, Quinton PM. Selective activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> conductances. *JOP* 2001; 2:212–8.

Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl<sup>-</sup> channels with altered properties. *Nature* 1993; 362: 160–4.

Rosenstein BJ. Nonclassic cystic fibrosis: a clinical conundrum. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36:10–2.

Fanen P et al. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *Int J Biochem Cell Biol*, Jul;52:94-102, 2014)

Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med*. 19(3):423-41, 1998

Riedel BD. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis. *Pediatr Ann* Apr;26(4):235-41, 1997

Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 361: 681–68, 2003

Turcios NL. Cystic fibrosis, an overview. *J Clin Gastroenterol*. 34:307–17, 2005

Milla, P. J. Cystic fibrosis: present and future. *Digestion* 59:579-88, 1998

Mickle JE, Cutting GR. Clinical implications of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations. *Clin Chest Med* 19: 443–458, 1998

Feranchak AP. Hepatobiliary complications of cystic fibrosis. *Curr Gastroenterol Rep* 6:231–9, 2004