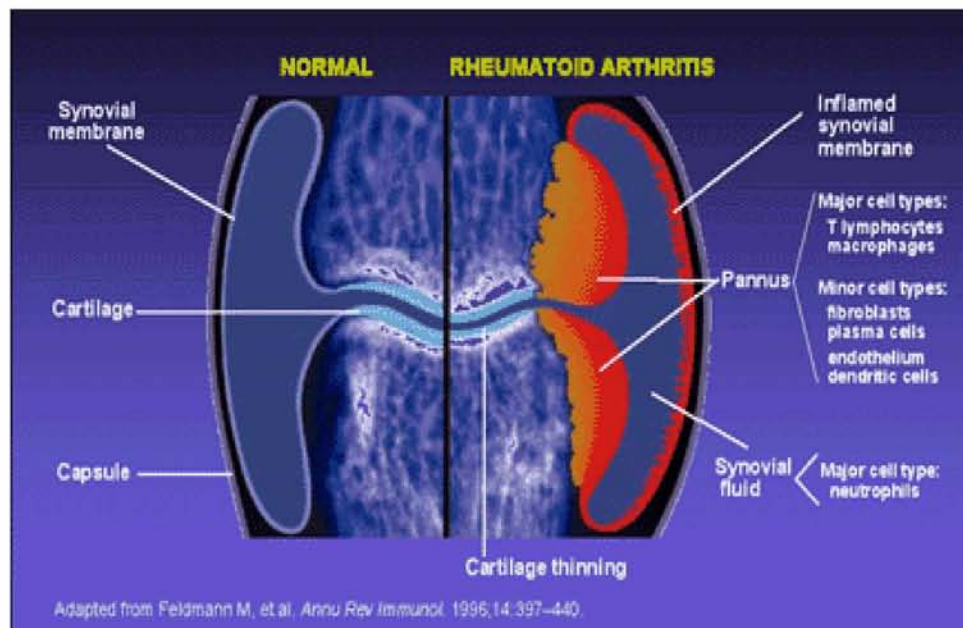


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γιαννή Παναγιώτα

Ταυτοποίηση πολυμορφισμών στο γονίδιο της γελσολίνης σε άτομα ελέγχου και ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στον ελληνικό πληθυσμό



**Ταυτοποίηση πολυμορφισμών στο γονίδιο της γελσολίνης σε άτομα
ελέγχου και ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα στον ελληνικό πληθυσμό**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

**Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Μαμούρης Ζήσης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

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

Βασιλόπουλος Ιωάννης: Διδάσκοντας ΠΔ 407/80

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Γενική Εισαγωγή
- 1.2 Ρευματοειδής αρθρίτιδα
 - 1.2.1 Γενικές πληροφορίες
 - 1.2.2 Συχνότητα εμφάνισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.3 Κλινικά χαρακτηριστικά
 - 1.2.4 Παθολογική ανατομία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.5 Διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.6 Ενεργότητα της νόσου και αξιολόγηση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.7 Γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.8 Αυτοαντισώματα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα
 - 1.2.9 Αιτιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.2.10 Παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
- 1.3 Θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.3.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
 - 1.3.2 Κορτικοστεροειδή
 - 1.3.3 Φάρμακα τροποποιητικά της εξέλιξης της νόσου
 - 1.3.4 Βιολογικοί Παράγοντες
- 1.4 Οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό ως πιθανός μηχανισμός στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
 - 1.4.1 Οι αθρικοί ινοβλάστες
 - 1.4.2 Χαρακτηριστικά των αρθρικών ινοβλαστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα
 - 1.4.3 Λειτουργίες που αποδιοργανώνονται στους ινοβλάστες
 - 1.4.4 Μορφολογικές αλλαγές των αρθρικών ινοβλαστών
- 1.5 Η ανάδειξη της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού των ινοβλαστών από τη γελσολίνη ως πιθανού παράγοντα παθογένειας
 - 1.5.1 Το γονίδιο Gsn
 - 1.5.2 Γενικές λειτουργίες της γελσολίνης
 - 1.5.2.1 Δράση της γελσολίνης στη φλεγμονή
 - 1.5.2.2 Αμυλοείδωση Ισλανδικού τύπου
 - 1.5.3 Μηχανισμός δράσης της γελσολίνης
 - 1.5.4 Μοντέλο ποντικού knock out για το γονίδιο Gsn
 - 1.5.5 Προτεινόμενο μοντέλο πρόκλησης ρευματοειδούς αρθρίτιδας

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 Συλλογή δειγμάτων
- 2.2 Απομόνωση DNA
 - 2.2.1 Απομόνωση DNA από επιθηλιακά κύτταρα ατόμων ελέγχου

- 2.3 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της απόδοσης του πρωτοκόλλου απομόνωσης
- 2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR
 - 2.4.1 Υλικά για προετοιμασία της PCR
 - 2.4.2 Στάδια της θερμικής κυκλοποίησης
- 2.5 Έλεγχος της PCR
- 2.6 Η μέθοδος SSCP- Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας
 - 2.6.1 Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης
- 2.7 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)
- 2.8 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR
 - 2.8.1 Κατακρήμνιση του καθαρού προϊόντος
- 2.9 Επεξεργασία αλληλουχιών

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 Προέλευση δειγμάτων ομάδων ελέγχου - ασθενών
- 3.2 Απομόνωση DNA
- 3.3 PCR
- 3.4 Ανάλυση των προτύπων σε gel ακρυλαμίδης 10%
- 3.5 Αποτελέσματα αλληλούχησης για το εξόνιο 5
- 3.6 Αποτελέσματα αλληλούχησης για το εξόνιο 6

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρακάτω διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 1/10/2009 έως 22/04/2010. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών που με δέχτηκε στο εργαστήριό του αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να εκπονήσω την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, διδάσκοντα ΠΔ 407/80 για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας, τις συμβουλές και τις υποδείξεις του, καθώς και για τις διορθώσεις στην τελική μορφή της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Σταματοπούλου Δήμητρα και Σκριάπα Λαμπρινή και τους υποψήφιους διδάκτορες Σταμάτη Κωνσταντίνο και Γιαννούλη Θεμιστοκλή για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που προκαλείται από μια ποικιλία γενετικών και περιβαλλοντικών συνιστωσών και επανατροφοδοτείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ διάφορων ανοσολογικών κυτταρικών τύπων. Τα τελευταία χρόνια εκτός από αυτούς τους κυτταρικούς τύπους η προσοχή έχει στραφεί σε μη ανοσολογικούς με επικρατέστερους τους αρθρικούς ινοβλάστες. Υπό την επίδραση εξωγενών σημάτων έχει παρατηρηθεί *in vitro* ότι οι αρθρικοί ινοβλάστες στη ρευματοειδή αρθρίτιδα επιδεικνύουν φαινότυπο καρκινικού τύπου. Ένα από τα φαινόμενα που μαρτυρούν αυτό το γεγονός είναι η παρατήρηση, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, της αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και οι αλλαγές στην αλληλεπίδραση των αρθρικών ινοβλαστών με το εξωκυτταρικό δίκτυο. Υπεύθυνες για αυτές τις μεταβολές είναι οι πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού και ιδιαίτερα εκείνες που σχετίζονται με τον πολυμερισμό της ακτίνης καθιστώντας τις υποψήφιους στόχους μελέτης. Επιπρόσθετα μελέτη βασισμένη σε μικροσυστοιχίες αποκάλυψε την απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη μορφοποίηση του κυτταροσκελετού. Το δεδομένο που έρχεται για να ενισχύσει αυτή την υπόθεση είναι η υποέκφραση του γονιδίου της γελσολίνης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η γελσολίνη είναι ένας αναστολέας του πολυμερισμού της ακτίνης και το γονίδιο της εδράζεται στην περιοχή 9q33, η οποία έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση της ασθένειας. Πρόσφατα βρέθηκε υποέκφραση της πλασματικής μορφής της γελσολίνης σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, γεγονός που την καθιστά πιθανό παράγοντα συνεισφοράς στη γενετική βάση της ασθένειας.

Στηριζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση πολυμορφισμών στο γενετικό τόπο της γελσολίνης εστιαζόμενη στα εξόνια 5 και 6 σε δείγματα υγιών εθελοντών ατόμων χωρίς ιστορικό κάποιας ασθένειας και δείγματα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα από νοσοκομεία της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας. Με τη χρήση της SSCP ανάλυσης μελετήθηκαν ως προς την ύπαρξη νέων πολυμορφισμών και τα δύο εξόνια. Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό πρότυπο καθαρίστηκαν για την παραλαβή καθαρού PCR προϊόντος και υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση. Ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών και σύγκριση τους με ομοπαράθεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη ενός πολυμορφισμού στο εξόνιο 3 και ενός πολυμορφισμού στο εξόνιο 4. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος και θα μπορούσαν να μεταβάλλουν τη συγγένεια της γελσολίνης για την ακτίνη ή τα PIP₂, θέσεις δέσμευσης των οποίων εντοπίζονται στα σημεία των αμινοξικών αλλαγών αντίστοιχα, οδηγώντας πιθανόν σε αναστολή της αποπολυμεριστικής δράσης της γελσολίνης στον κυτταροσκελετό επιβεβαιώνοντας την υπόθεση του σημαντικού της ρόλου στη ΡΑ.

Για να επιβεβαιωθεί αυτός ο ισχυρισμός, λόγω του ότι ο πληθυσμός της παρούσας μελέτης ήταν πολύ μικρός, κρίνεται αναγκαίο να γίνουν μελέτες συσχέτισης σε μεγαλύτερο δείγμα πληθυσμού υγιών ατόμων και ασθενών με ΡΑ ώστε να διευκρινιστεί εάν υπάρχει σημαντική συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την ασθένεια. Επίσης, η γελσολίνη είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από πλήθος εξονίων, γι' αυτό θα πρέπει να μελετηθούν και τα υπόλοιπα εξόνια με σκοπό την αναζήτηση νέων πολυμορφισμών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενική Εισαγωγή

Όλα τα κληρονομικά χαρακτηριστικά ελέγχονται από γονίδια. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η κληρονόμηση ενός χαρακτηριστικού ελέγχεται από ένα μόνο γονίδιο. Ωστόσο τα νοσήματα που απαντώνται συχνότερα είναι αποτέλεσμα πολλών γονιδίων που δρουν συνεργιστικά συνεισφέροντας λίγο ή πολύ στην εκδήλωση της ασθένειας ή/και αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους. Ο καθορισμός του τρόπου κληρονόμησης αυτών των περιπτώσεων βρίσκεται ακόμα στα πρώτα στάδια, δεδομένου ότι δεν είναι εύκολο να καθοριστεί ο βαθμός συνεισφοράς στην εκδήλωση του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (διατροφή, στρες, κάπνισμα, καθιστική ζωή, έκθεση σε χημικές ουσίες ή μολυσματικούς παράγοντες).¹ Σε αυτού του είδους τις ασθένειες γίνεται προσπάθεια για εύρεση μεταλλάξεων και ταυτοποίηση νέων αλληλομόρφων οι συχνότητες των οποίων διαφέρουν ανάμεσα στο φυσιολογικό πληθυσμό και τους ασθενείς. Το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων SNPs (single nucleotide polymorphisms). SNPs είναι οι παραλλαγές σε μια αλληλουχία DNA η οποία εντοπίζεται σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο στα χρωμοσώματα του ίδιου ατόμου ή ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα.² Στο ανθρώπινο γονιδίωμα συναντάται κατά μέσο όρο ένα SNP ανά 1000 ζεύγη βάσεων. Εμφανίζονται σε συχνότητα μεγαλύτερη του 1% στους πληθυσμούς αποτελώντας το 0,1% του γονιδιώματος και μπορεί να διαφέρουν στη συχνότητα εμφάνισης τους ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς.³ Βρίσκονται διάσπαρτα πάνω στο γονιδίωμα και ανάλογα με την θέση τους μπορεί να επηρεάσουν το βαθμό έκφρασης ενός γονιδίου, τη λειτουργικότητά του, το μάτισμα, την πρόσδεση ρυθμιστικών παραγόντων ή να τροποποιήσουν ένα αμινοξύ οδηγώντας σε αλλαγή της λειτουργικότητας μιας πρωτεΐνης. Στην πλειοψηφία τους εντοπίζονται σε μη λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος γεγονός που τα καθιστά ουδέτερα χωρίς καμία επίδραση στο φαινότυπο. Όσα είναι λειτουργικά είναι σε θέση να επηρεάσουν την ανταπόκριση του οργανισμού σε παθογόνα, αλλεργιογόνα, εμβόλια ή φάρμακα και να προδιαθέσουν το άτομο για την εμφάνιση κάποιας πάθησης.^{2,4} Η ελπίδα πρόληψης αυτών των καταστάσεων βασίζεται στον προσδιορισμό των ατόμων που θεωρείται ότι διατρέχουν κίνδυνο με στόχο την καθοδήγησή τους προς αποφυγή των συνθηκών που προδιαθέτουν για την εκδήλωση ασθένειας.

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια φλεγμονώδης νόσος που συνίσταται σε διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και ανήκει στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Οι παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση της κατατάσσονται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς. Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες έχουν οδηγήσει στην ανάδειξη του TNFα ως κύριου παράγοντα ενορχήστρωσης της φλεγμονώδους απάντησης και στην παρασκευή φαρμάκων που στοχεύουν σε αυτόν. Ωστόσο ένα ποσοστό ασθενών γύρω στο 50% δεν ανταποκρίνεται όπως θα αναμενόταν στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες. Ταυτόχρονα η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αυτών οδήγησε σε ραγδαία αύξηση του κόστους θεραπείας, κάτι που έχει δυσβάστακτες συνέπειες στα ασφαλιστικά ταμεία και το σύστημα υγείας των κρατών.⁵ Επομένως, η μελέτη άλλων πιθανών παραγόντων παθογένειας και η ταυτοποίηση πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν για αυτούς κρίνεται απαραίτητη για τη στόχευση νέων θεραπευτικών στόχων.

1.2 ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

1.2.1 Γενικές πληροφορίες



Εικόνα 1 : Ασθενής με ρευματοειδή αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μια αυτοάνοση, χρόνια, συστηματική, φλεγμονώδης νόσος που προσβάλλει τις αρθρώσεις αλλά μπορεί να έχει και εξωαρθρικές εκδηλώσεις όπως ρευματικά οζίδια, αγγειίτιδα (Εικόνα 1). Είναι η πιο συχνή φλεγμονώδης αρθροπάθεια και εμφανίζεται περίπου στο 1% του παγκόσμιου πληθυσμού με συχνότητα τρεις φορές μεγαλύτερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Ωστόσο, δεν έχουν προσδιορισθεί φυλοσύνδετα γονίδια ως γονίδια κινδύνου για τη νόσο. Μπορεί να εμφανιστεί σε νεανική ηλικία αλλά συνήθως στο γυναικείο φύλο έχει την τάση να εμφανίζεται πιο πρόωρα στις ηλικίες μεταξύ 40 και 60 ετών, ενώ στους άνδρες η ηλικία εμφάνισης εκτιμάται γύρω στα 60 έτη. Παρόλο που οι άνδρες έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τις γυναίκες εμφανίζουν συμπτώματα πιο βαριάς μορφής. Μειώνει το προσδόκιμο ζωής 5-10 χρόνια σε σχέση με την αναμενόμενη ηλικία.⁶

1.2.2 Συχνότητα εμφάνισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Ο επιπολασμός της ΡΑ στους Καυκάσιους των αναπτυγμένων χωρών (ΗΠΑ, Ευρώπη) κυμαίνεται στο 0,5-1,1%.⁷ Σε αντίστοιχη έρευνα με ερωτηματολόγια (3.928 άτομα) και αναδρομή σε ιατρικά αρχεία στο Halmstad της Σουηδίας, ο επιπολασμός της ΡΑ ήταν 0,51%.⁸ Στην Ισπανία, ο επιπολασμός υπολογίστηκε σε 0,3-0,5% του αστικού και αγροτικού πληθυσμού και αναλογία γυναικών:ανδρών 4:1.⁹ Στη μελέτη στο νομό Μαγνησίας, ο επιπολασμός της ΡΑ υπολογίστηκε σε 0,58% και είναι μεταξύ του ποσοστού (0,35%) που βρέθηκε σε αναδρομική μελέτη¹⁰ και του ποσοστού (0,68%) διαξονικής μελέτης από την Ελλάδα.^{11,12}

1.2.3 Κλινικά χαρακτηριστικά

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της αρθρίτιδας είναι:

- πόνος στην άρθρωση
- διόγκωση της άρθρωσης
- αύξηση της τοπικής θερμοκρασίας της άρθρωσης
- ευαισθησία στην πίεση της άρθρωσης
- πρωινή δυσκαμψία, δηλαδή η δυσκολία στις κινήσεις της άρθρωσης

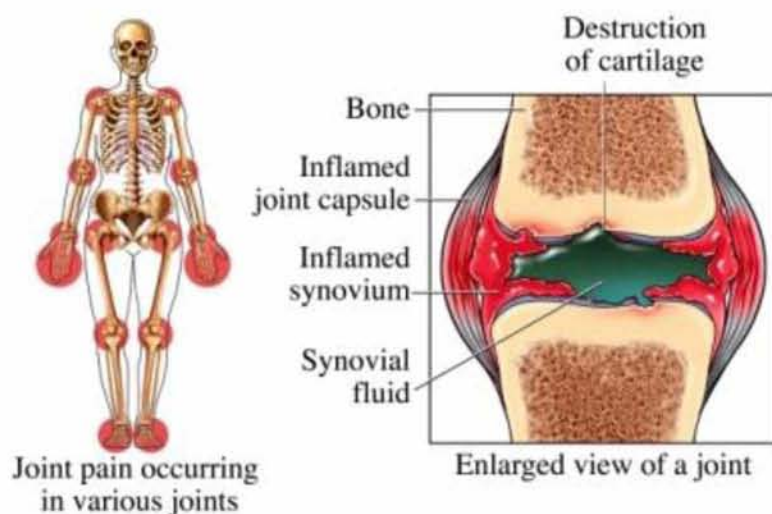
Η αρθρίτιδα συνήθως αφορά πολλές αρθρώσεις, είναι δηλαδή πολυαρθρίτιδα, και είναι συμμετρική, δηλ. εντοπίζεται στις ίδιες αρθρώσεις στις δύο πλευρές του σώματος. Οποιαδήποτε άρθρωση των άνω και κάτω άκρων μπορεί να προσβληθεί από ρευματοειδή αρθρίτιδα, αλλά πιο συχνά προσβάλλονται οι πηχεοκαρπικές αρθρώσεις, οι αρθρώσεις των δακτύλων των χεριών και οι αρθρώσεις των ποδιών και των γονάτων (Εικόνα 2).¹³



Εικόνα 2: Αρθρώσεις που προσβάλλονται από ΡΑ

1.2.4 Παθολογική ανατομία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ΡΑ συχνά αρχίζει με πρόδρομα συμπτώματα όπως κακουχία, εύκολη κόπωση, ανορεξία και μυϊκή αδυναμία, γενικευμένους πόνους και δυσκαμψία που δεν εντοπίζονται σαφώς στις αρθρώσεις. Προοδευτικά, τα παθολογοανατομικά ευρήματα της νόσου εντοπίζονται κυρίως στις αρθρώσεις και σε εξωαρθρικές εκδηλώσεις. Εκδηλώνεται κλινικά με πόνο, δυσκαμψία, περιορισμό της κινητικότητας και ενδείξεις φλεγμονής όπως διόγκωση, θερμότητα, ερυθρότητα και ευαισθησία ή πόνο με πίεση. Η επακόλουθη διόγκωση της άρθρωσης μεσολαβείται από υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των αρθρικών ινοβλαστών και διηθήσεις φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή (Εικόνα 3). Πολλές φορές υπάρχουν και γενικότερα σημεία όπως πυρετός, αυχενικός πόνος, αναιμία, ξηροφθαλμία-ξηροστομία (σύνδρομο Sjogren), φλεγμονή των αιμοφόρων αγγείων (αγγειίτιδα), του περιβλήματος των πνευμόνων (πλευρίτιδα) ή του σάκου της καρδιάς (περικαρδίτιδα), σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, σκληρίτιδα. Μερικοί πάσχοντες παρουσιάζουν ανώδυνα σκληρά εξογκώματα πάχους έως 2 εκ. (ρευματικά οζίδια) που εντοπίζονται υποδόρια σε μέρη του σώματος που υφίστανται πίεση πχ. αγκώνες και κάνουν την εμφάνισή τους κυρίως σε ασθενείς με οροθετική ΡΑ.²⁰ Η νόσος χαρακτηρίζεται από ένα απρόβλεπτο κύκλο εξάρσεων και υφέσεων. Σε μακροχρόνια βάση και κυρίως χωρίς τη στενή παρακολούθηση και αγωγή που επιβάλλεται, οι αρθρώσεις μπορούν να παραμορφωθούν μη αναστρέψιμα.¹⁴



Εικόνα 3: Αναπαράσταση άρθρωσης που έχει προσβληθεί από ΡΑ

1.2.5 Διάγνωση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η διάγνωση της ΡΑ σε προχωρημένο στάδιο γίνεται εύκολα με βάση την εξέταση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Στα πρώιμα στάδια όμως η διάγνωση μπορεί να είναι δύσκολη καθώς η ασθένεια μπορεί να μην εξελίσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. Όπως ισχύει από το 1987, σύμφωνα με το Αμερικανικό Κολέγιο Ρευματολογίας για να θεωρηθεί ένας ασθενής ότι πάσχει από ΡΑ θα πρέπει να πληρεί 4 από τα 7 ακόλουθα κριτήρια:

1. Εμφάνιση πρωϊνής δυσκαμψίας διάρκειας τουλάχιστον 1 ώρας
2. Αρθρίτιδα με διόγκωση ταυτόχρονα σε 3 ή περισσότερες αρθρώσεις
3. Αρθρίτιδα με διόγκωση στις άκρες χείρες
4. Συμμετρική αρθρίτιδα
5. Ρευματικά οζίδια
6. Ανίχνευση ρευματοειδούς παράγοντα (RF) στο αίμα
7. Ακτινολογικές αλλοιώσεις με διαβρώσεις στις αρθρώσεις καρπού και άκρων χειρών.

Για να είναι πιο αξιόπιστη η κλινική εικόνα, η διάγνωση επιβεβαιώνεται με λήψη και εξέταση αρθρικού υγρού ή/και βιοψία του αρθρικού υμένα.¹⁵

1.2.6 Ενεργότητα της νόσου και αξιολόγηση της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Οι εκδηλώσεις της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας ποικίλουν μεταξύ των ατόμων. Ορισμένοι ασθενείς έχουν μόνο ενοχλήσεις στις αρθρώσεις ενώ άλλοι πάσχουν και από εκδηλώσεις σε ολόκληρο το σώμα, γενικευμένη κόπωση και κατάπτωση της υγείας. Γι' αυτό το λόγο έχουν οριστεί κάποιες μεταβλητές ώστε να καθίσταται δυνατή η εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς με κριτήριο την ενεργότητα και την έκταση της νόσου.

Επινοήθηκε ο δείκτης DAS (Disease Activity Score) που συνδυάζει πληροφορίες του ακόλουθου πίνακα για να κατανέμει τους ασθενείς σε αυτούς με χαμηλή, μέτρια ή υψηλή ενεργότητα της νόσου.

Πίνακας 1: Κριτήρια βάση των οποίων αξιολογείται η ενεργότητα της νόσου¹⁶

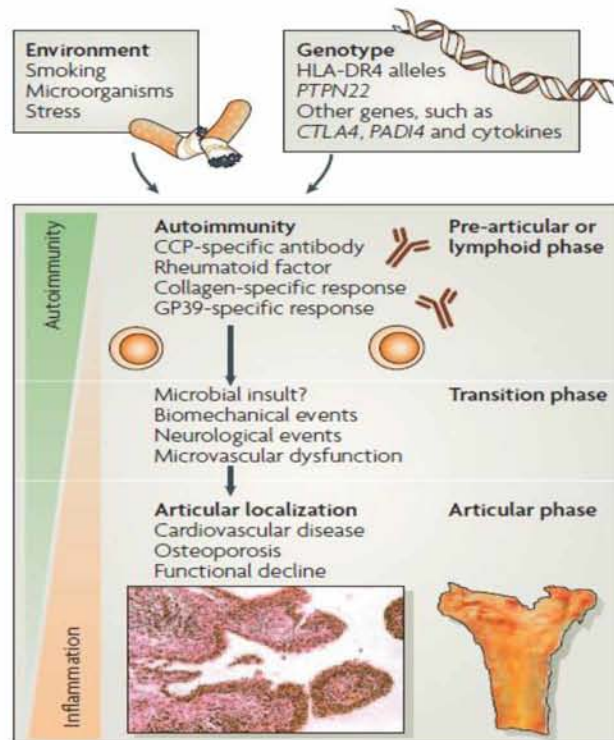
ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ			
	Ελάχιστη	Μέτρια	Μέγιστη
Διάρκεια πρωινής δυσκαμψίας σε ώρες	0	1,5	>5
Αριθμός επώδυνων αρθρώσεων	<2	12	>34
Αριθμός διογκωμένων αρθρώσεων	0	7	>23
Δύναμη συσφίξεως των άκρων χεριών			
Άνδρες, mM Hg	>250	140	<55
Γυναίκες, mM Hg	>180	100	<45
Χρόνος βαδίσσεως 50 βημάτων σε δευτερόλεπτα	<9	13	>27
Ταχύτητα καθιζήσεως ερυθρών αιμοσφαιρίων (mM την πρώτη ώρα)	<11	41	>92

Ο δείκτης DAS28 διαφέρει από το δείκτη DAS στο γεγονός ότι αναφέρεται μόνο σε 28 αρθρώσεις και γίνεται αποτίμηση της κατάστασης αυτών σε μία κλίμακα από 0-28. Το επίπεδο ενεργότητας της ασθένειας μπορεί να ερμηνευτεί με βάση το δείκτη αυτό ως χαμηλό ($DAS28 \leq 3.2$), μέτριο ($3.2 < DAS28 \leq 5.1$) και υψηλό ($DAS28 > 5.1$). Εάν ο δείκτης DAS28 είναι μικρότερος του 2,6 τότε η ασθένεια πιθανότατα βρίσκεται σε ύφεση.¹⁶

1.2.7 Γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ακριβής αιτιολογία της παραμένει ακόμα άγνωστη, καθώς κατατάσσεται στα πολυπαραγοντικά νοσήματα. Τα αίτια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας οφείλονται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους πυροδοτώντας τους μηχανισμούς αυτοανοσίας. Είναι μια ασθένεια η οποία όπως έχουν δείξει μελέτες βασισμένες σε μονοζυγωτικούς διδύμους έχει γενετικό υπόβαθρο 30-50 %. Ένα 30% αυτού πιστεύεται ότι οφείλεται στα HLA γονίδια, κυρίως στο αλληλόμορφο HLA-DRB1 στο χρωμόσωμα 6p και στο HLA-DR4, ενώ το υπόλοιπο σε γονιδιακούς τόπους που δεν σχετίζονται με την αντιγονοπαρουσίαση - PTPN22 στο χρ.1p13, PADI4 στο χρ.1p36, STAT4, TNFAIP3, FCRL3, SLC22A4, CTLA4, FcγRs και γονιδιακοί τόποι που κωδικοποιούν για TNF, IL-1, IL-10, IL-18 (Εικόνα 4).^{17,18,19} Πολλές μελέτες τονίζουν τη συσχέτιση της ασθένειας με συγκεκριμένους πολυμορφισμούς στην περιοχή q33.2 του χρωμοσώματος 9. Σε γονιδιακό επίπεδο η περιοχή αυτή οριοθετείται σε μήκος 668 kb από το MEGF9 έως το STOM και 525 kb από το FBXW2 έως το GSN. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο πολυμορφισμός rs10985196 (2547 C/A) στο γονίδιο GSN έδειξε συνεχόμενη συσχέτιση με την ασθένεια σε όλες τις ομάδες που αναλύθηκαν. Σε νεότερη

μελέτη εντοπίστηκε μια ακόμη ενδιαφέρουσα περιοχή η οποία εκτείνεται σε μήκος 70 kb, από το τρίτο ιντρόνιο του PHF19 έως το TRAF1, καθώς και στη διαγονιδιακή περιοχή TRAF1-C5, εξαιρώντας την C5 κωδική περιοχή. Σε συνδυασμό με τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου, HLA-DRB1 και PTPN22, οι πολυμορφισμοί αυτοί αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης PA έως και 45 φορές.¹⁹ Παρόλα αυτά η πολυμορφικότητα στους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την ασθένεια παρουσιάζει ετερογένεια στο βαθμό επίδρασης σε κάθε πληθυσμό, μπορεί επίσης να μην έχει καμία επίδραση στην προδιάθεση για την ασθένεια σε κάποιον από αυτούς.¹⁹ Σε καυκάσιους πληθυσμούς η παρουσία του αντιγόνου HLA-DR4 ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη συχνότητα (60-70%) στους ασθενείς σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (20-25%) και ιδιαίτερα στους θετικούς για το ρευματοειδή παράγοντα. Μελέτες σε οικογένειες καθώς και σε μονοζυγωτικούς/διζυγωτικούς διδύμους στηρίζουν την άποψη ότι γενετικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για την προδιάθεση στη PA. Ωστόσο, η PA δεν εκδηλώνεται συχνά σε μέλη ίδιων οικογενειών. Πολλά διαφορετικά γονίδια, καθένα εκ των οποίων παρέχει μόνο μικρή συνεισφορά στην επιδεκτικότητα της νόσου, φαίνεται να εμπλέκονται. Έρευνες βασισμένες στη μελέτη διζυγωτικών διδύμων ή αδερφών έχουν δείξει ότι εάν ο ένας αδερφός πάσχει από ρευματοειδή αρθρίτιδα τότε ο κίνδυνος να εμφανίσει και ο δεύτερος κάποια στιγμή στη ζωή του είναι 5 με 10 φορές αυξημένος σε σχέση με ένα τυχαίο άτομο στον πληθυσμό. Η αναλογία σύμπτωσης της PA σε μονοζυγωτικούς διδύμους είναι 15%-30%, υπογραμμίζοντας σαφώς τη συμμετοχή μη γονιδιακών παραγόντων στην παθογένεια της PA. Στα περιβαλλοντικά αίτια της PA συγκαταλέγονται το στρες, η προσβολή από βακτήρια και ιούς, έκθεση σε φάρμακα και χημικές ουσίες, ο τρόπος ζωής και η διατροφή, η έλλειψη άσκησης και η χειρωνακτική εργασία.⁶ Τελευταίες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το κάπνισμα είναι παράγοντας κινδύνου σε HLA-DR4 θετικά άτομα.^{20,21}



Εικόνα 4: Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση PA¹⁷

1.2.8 Αυτοαντισώματα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

Πίνακας 2: Αυτοαντισώματα που έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα²²

A summary of well-characterised autoantigens in RA

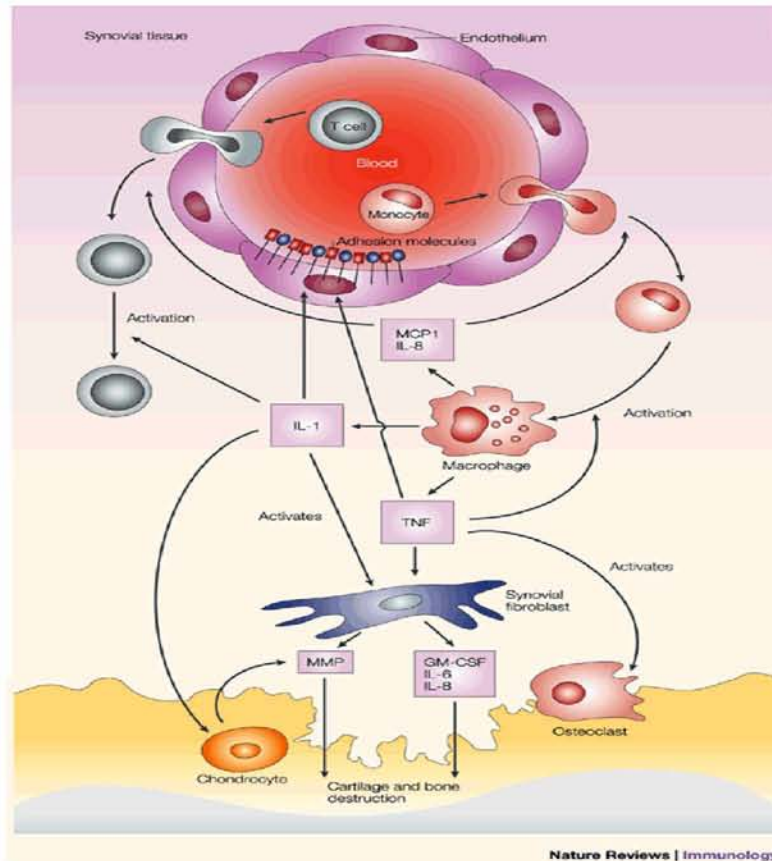
Citrullinated proteins and peptides	CCP-1 and -2, fibrinogen, fibrin, vimentin, filaggrin, citrullinated peptides of collagen II, citrullinated alpha-enolase, citrullinated translation initiation factor 4G1
Components of articular cartilage	Collagen II, IX and XI
Circulating serum proteins	RFs, fibrinogen, plasminogen, ferritin
Nuclear components	RA33/hnRNP A2, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
Stress proteins	HSP-65, -70 and -90, BiP
Inflammatory/immune factors	B7-H1, IL-1 alpha, IL-8
Enzymes	Calpastatin, alpha-enolase, aldolase-A, dipeptidyl peptidase, osteopontin, glucose-6-phosphate isomerase
Receptors	Lipocortin 1
Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies	

Η ύπαρξη του ρευματοειδούς παράγοντα στον ορό μαρτυρά ότι η ΡΑ είναι αυτοάνοσο νόσημα. Ανιχνεύονται κυρίως αντισώματα έναντι του Fc τμήματος της ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης, αντισώματα έναντι πρωτεϊνών του πυρήνα (40%), αντισώματα εναντίον κερατίνης.²² Ειδικά αντιγόνα του χόνδρου, όπως το κολλαγόνο τύπου II και η πρωτεϊνογλυκάνη 39(GP39), έχουν ενοχοποιηθεί (Πίνακας 1).¹⁷ Στην πλειοψηφία των ασθενών έχει παρατηρηθεί κιτρουλίωση της φμπρονεκτίνης. Η φμπρονεκτίνη εμπλέκεται στις διαδικασίες κυτταρικής προσκόλλησης μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς ιντεγκρινών και αυξητικούς παράγοντες. Η κιτρουλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της αργινίνης σε κιτρουλίνη που καταλύεται από την απαμινάση της αργινίνης (PADI4). Η τροποποίηση αυτή οδηγεί στην εμφάνιση αυτοαντιδρώντων αντισωμάτων (αντι-CCP) και ίσως μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις φμπρονεκτίνης-υποδοχέων και αυξητικών παραγόντων συνεισφέροντας στην παθογένεια της ΡΑ.^{23,24} Βρέθηκε στατιστική συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων με το ακτινογραφικό αρθρικό σκορ. Σε μελέτες μακρόχρονης παρακολούθησης παρατηρήθηκε συσχέτιση των αντι-CCP αντισωμάτων μόνων ή σε συνδυασμό με τον κοινό επίτοπο του HLA-DRB1 με ταχύτερη ακτινογραφική αρθρική βλάβη. Σε ανάλυση πολλαπλής εξάρτησης (multiple regression analysis), τα αντι-CCP αντισώματα βρέθηκε ότι είναι προγνωστικός δείκτης της βλάβης των αρθρώσεων.²⁵

1.2.9 Αιτιολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πολυαρθρίτιδα αυτοάνοσης φύσεως που οφείλεται σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και συνδέεται με βλάβες του αρθρικού χόνδρου και των οστών, έκπτωση της λειτουργικότητας και τελικά εγκατεστημένη αναπηρία. Το κύριο χαρακτηριστικό που τη συνοδεύει είναι η επώδυνη και παρατεταμένη φλεγμονή της αρθρικής μεμβράνης που περιβάλλει την άρθρωση.²⁶ Η ενεργοποίηση διάφορων κυτταρικών τύπων και η τοπική παραγωγή πλήθους προφλεγμονωδών κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας διογκωμένης μάζας κυττάρων που εισβάλλει στο χόνδρο και τα οστά. Ο επονομαζόμενος "πάννος" αποτελείται από ινοβλάστες, μακροφάγα, T και B λεμφοκύτταρα. Ιστική διήθηση από T κύτταρα, συγκεκριμένα CD4⁺ και CD8⁺, NKT, NK, B, σιτευτικά, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα, είναι ένα σταθερό χαρακτηριστικό της ρευματοειδούς υμενίτιδας. Καθώς η ρευματοειδής αρθρίτιδα εξελίσσεται, τα κύτταρα που διηθούν τον αρθρικό υμένα επεκτείνονται, εισβάλλουν και διαβρώνουν τους αρθρικούς ιστούς καταστρέφοντας τους χόνδρους και τα οστά. Οι περιβάλλοντες μύες, σύνδεσμοι και τένοντες, που ενισχύουν και σταθεροποιούν την άρθρωση, εξασθενούν και αδυνατούν να λειτουργήσουν φυσιολογικά. Έτσι προκαλείται πόνος και δυσμορφία των αρθρώσεων, που παρατηρούνται συχνά στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Στο 30% περίπου των ασθενών με RA αναπτύσσεται στον αρθρικό υμένα τριτοταγής λεμφικός ιστός, συμπεριλαμβανομένων και κλασικών βλαστικών κέντρων. Τα βλαστικά κέντρα είναι οι θέσεις έναρξης μιας αντιγονο-ειδικής ανοσιακής απάντησης, στην οποία τα B κύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο στα λεμφοξυδιακά δένδριτικά κύτταρα και υποβοηθούνται από αντιγονο-ειδικά T κύτταρα. Εξάλλου, τα T κύτταρα παρουσιάζουν ολιγοκλωνικό πολλαπλασιασμό στο ρευματοειδή αρθρικό υμένα και T κύτταρα, που εκφράζουν ακριβώς τους ίδιους αντιγονικούς υποδοχείς βρίσκονται σε διάφορες αρθρώσεις. Η εξήγηση είναι ότι αυτά έχουν αναπτυχθεί στα πλαίσια ανοσιακής απάντησης σε ένα αντιγόνο. Τα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος που στρατολογούνται στην περιοχή εκκρίνουν ποικιλία κυτταροκινών που έχει ως συνέπεια την καταστροφή του χόνδρου και των οστών και τη μη αναστρέψιμη βλάβη της άρθρωσης σε δομικό και λειτουργικό επίπεδο.²⁶

1.2.10 Παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας



Εικόνα 5: Μηχανισμός παθογένειας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας²⁷

Σύμφωνα με την αρχική υπόθεση τον κύριο ρόλο στην παθογένεια της ΡΑ κατείχαν τα στοιχεία της προσαρμοστικής ανοσίας. Παρατηρήθηκε όμως ότι η χορήγηση αντικυτταροκινικών φαρμάκων ήταν πιο αποτελεσματική από τη χορήγηση αντιλεμφοκυτταρικών φαρμάκων.²⁸ Έτσι η προσοχή στράφηκε σε άλλους τύπους κυττάρων που κυριαρχούν στην προσβεβλημένη άρθρωση και κυρίως στα μακροφάγα που είναι μια σημαντική πηγή κυτταροκινών.²⁹ Τα μακροφάγα διεγείρονται για παραγωγή TNFα είτε μέσω σύνδεσης σε TLRs που αναγνωρίζουν μικροβιακά τμήματα ή ενδογενείς συνδέτες, είτε μέσω αλληλεπίδρασης με T λεμφοκύτταρα.³⁰ Αυτή η κυτταροκίνη εμπλέκεται σε πλήθος διαδικασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και η πήξη του αίματος. Η επιβεβαίωση για την ανάμειξη του TNFα στην παθογένεια της νόσου ήρθε μέσω μιας σειράς πειραμάτων που έδειξαν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αντι-TNF σε κλινικές δοκιμές. Στο πρώτο πείραμα, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν τον ανθρώπινο παράγοντα TNFα εμφάνισαν χρόνια, συμμετρική, αποσαρθρωτική πολυαρθρίτιδα που προσομοίαζε την κλινική εκδήλωση της ανθρώπινης ΡΑ. Επίσης, knock out ποντίκια για την περιοχή (ARE) του γονιδίου TNFα πλούσια σε AU εμφάνισαν παρόμοιο κλινικό φαινότυπο. Η περιοχή ARE

εντοπίζεται στο 3' άκρο του γονιδίου και ελέγχει το ρυθμό αποδόμησης του mRNA. Χωρίς την παρουσία της περιοχής ARE αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής του mRNA και συνεπώς και ο χρόνος δράσης του TNFα.³⁰ Γενικά, ο TNFα διεγείρει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, τη συσώρευση λευκοκυττάρων, και την έκφραση μορίων προσκόλλησης και χημειοκινών στο ενδοθήλιο των αγγείων με αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό διήθησης στοιχείων της ανοσίας. Ακομη, παρεμποδίζει τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και αυξάνει την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών που αποικοδομούν το κυτταρικό δίκτυο. Η αύξηση του VEGF προάγει την αγγειογένεση ενώ στα ηπατοκύτταρα η διέγερση της οξειάς φάσης απόκρισης οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και άλλων δεικτών φλεγμονής.³¹ Με την ανακάλυψη της εμπλοκής του TNFα στη ΡΑ σχεδιάστηκαν φάρμακα που έχουν ως στόχο την παρεμπόδιση του.

Εκτός από τον TNFα και η IL-1 επιβεβαιώθηκε με τη χρήση ζωικού μοντέλου ποντικού ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη της ΡΑ. Η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της IL-1 σε ποντίκια που έπασχαν από Ρευματοειδή αρθρίτιδα έδειξαν βελτίωση της κλινικής εικόνας και ύφεση των συμπτωμάτων.³² Άλλες κυτταροκίνες που έχουν ανιχνευτεί σε αξιοσημείωτα επίπεδα είναι οι IL-1β, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23. Παρόλο που ο TGFβ έχει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως θεραπευτικός παράγοντας έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Δεν ήταν δυνατό να καταστούν ανιχνεύσιμα κάποια αξιοσημείωτα επίπεδα IL-4, IL-5, IL-13, στις οποίες έχει αποδοθεί αντιφλεγμονώδης ρόλος, στο αρθρικό υγρό ασθενών. Αντιθέτως η IL-10 έχει εντοπιστεί στον αρθρικό υμένα σε μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από αρθρικό ιστό ΡΑ ενισχύοντας την πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση της στη ρευματοειδή αρθρίτιδα.³³

Ο αρθρικός υμένας, που επεκτείνεται και εισβάλλει στον αρθρικό χόνδρο και το οστό, είναι γνωστός ως πάννος (pannus). Είναι πλούσιος σε κύτταρα καταγωγής μακροφάγων, που μπορεί να διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες υπό την επίδραση φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως IL-1, TNF-α, IL-6 και IL-17 (Πίνακας 3). Αυτός εισβάλλει ενεργητικά και καταστρέφει το χόνδρο και το παρα-αρθρικό οστό στα όρια μεταξύ αρθρικού υμένα και οστού. Οι ιδιότητες ιστικής καταστροφής του πάννου σχετίζονται στενά με την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών και άλλων πρωτεϊνών (Πίνακας 3), που προκαλούν εκφύλιση του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών (Εικόνα 5). Ένα από τα πρώτα βήματα στη δημιουργία των εστιακών οστικών διαβρώσεων είναι η κινητοποίηση και διαφοροποίηση των κυττάρων σε πολυπύρηνια κύτταρα, που έχουν γονιδιακή έκφραση ίδια ακριβώς με τους κλασικούς οστεοκλάστες (εκφράζουν ολο το φάσμα γονιδίων των ώριμων οστεοκλαστών, περιλαμβανομένων της όξινης φωσφατάσης, της καθεψίνης K και του υποδοχέα καλσιτονίνης). Τα κύτταρα που διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες έχουν προέλευση από την σειρά των μονοκύτταρων-μακροφάγων του μυελού. Μετά τη φάση επαναπορρόφησης η επιφάνεια του οστού αποικίζεται εκ νέου από οστεοβλάστες ή προοστεοβλάστες που ωριμάζουν σε οστεοβλάστες. Αφού ολοκληρώσουν τη δράση τους οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες υφίστανται απόπτωση. Υπο κανονικές συνθήκες το οστό που απομακρύνεται αντικαθίσταται πλήρως από εκείνο που δημιουργήθηκε κατά τη φάση σχηματισμού. Η ανισοροπία των κυτταροκινών στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης οδηγεί σε αστάθεια του μηχανισμού αποδόμησης και σχηματισμού οστού και σε τοπική προοδευτική απώλεια οστού. Η κύρια κυτταροκίνη που ευθύνεται για αυτό είναι η IL-1 που αφ' ενός αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών του εξωκυτταρικού δικτύου, αφ' ετέρου προάγει τη

διαφοροποίηση σε οστεοκλάστες και την παραγωγή MMPs (1,3,8,13,14). Άλλα μόρια που ευθύνονται για την προαγωγή της οστεοκλαστογένεσης είναι ο TNFα και ο RANKL. Ο RANKL είναι ένας συνδέτης της οικογένειας του TNF και εκφράζεται σε προγονικά κύτταρα των οστεοκλαστών, στους οστεοκλάστες, σε δενδριτικά κύτταρα και σε χονδροκύτταρα. Η αλληλεπίδραση RANKL-RANK αποτελεί το κρίσιμο γεγονός στην προαγωγή της οστεοκλαστογένεσης. Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB ο οποίος προωθεί τη μεταγραφή γονιδίων που συμβάλλουν στην ενίσχυση της οστικής επαναπορρόφησης. Ποντίκια knock out για γονίδια που επάγουν τη διαφοροποίηση σε οστεοκλάστες ή χορήγηση οστεοπροτεγερίνης, ενός διαλυτού αναστολέα της RANKL επέδειξαν λιγότερα στοιχεία οστικής καταστροφής.³⁴

Πίνακας 3: Μηχανισμοί αποδόμησης του κυτταρικού δικτύου στη PA³⁴

Mechanism of destruction	Examples of factors involved in destruction
Indirect Release of pannus-derived cytokines that induce chondrocytes to release products that degrade the matrix	IL-1, TNFα
Direct Release of products from the pannus that directly degrade the cartilage matrix	MMPs, cathepsins

1.3 Θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Η θεραπεία ορισμένες φορές είναι δύσκολο να επιλεγεί σωστά λόγω της ποικιλίας των κυτταρικών τύπων που συνεισφέρουν στην παθογένεια της PA και λόγω της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών μονοπατιών με διαφορετικό τρόπο μεταξύ των ασθενών. Μέχρι σήμερα για την αντιμετώπιση της PA είναι διαθέσιμη ποικιλία φαρμάκων τα οποία διαχωρίζονται με βάση τον στόχο στον οποίο ασκούν την παρεμποδιστική τους δράση. Στους κύριους στόχους της θεραπευτικής αντιμετώπισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας περιλαμβάνονται:

- Πλήρης ύφεση, δηλαδή σταμάτημα, της νόσου (κύριος στόχος)
- Ανακούφιση από τον πόνο και γενικά έλεγχο όλων των συμπτωμάτων της νόσου
- Πρόληψη των βλαβών των αρθρώσεων και, επομένως, πρόληψη των παραμορφώσεων των αρθρώσεων, των λειτουργικών κινητικών διαταραχών και της αναπηρίας
- Βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών¹³

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας εμπίπτουν σε πέντε ομάδες:

- **Αναλγητικά**
- **Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ):** ασπιρίνη, ιμπουπροφένη, ναπροξένη, δικλοφενάκη, ινδομεθακίνη και άλλα.
- **Κορτικοστεροειδή** (πχ. κορτιζόνη, πρεδνιζόνη, μεθυλπρεδνιζολόνη), μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη Α, κυκλοφωσφαμίδη, αζαθειοπρίνη, χλωραμβουκίλη και άλλα. Τα φάρμακα αυτά μπορεί να χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό.
- **Τροποποιητικά της νόσου αντιρευματικά φάρμακα (DMARDs):** μεθοτρεξάτη, λεφλουνομίδα, κυκλοσπορίνη, σουλφασαλαζίνη, υδροξυχλωροκίνη, άλατα χρυσού, πενικιλλαμίνη
- **Βιολογικοί παράγοντες:** Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Anakinra, Rituximab, Abatacept, Tocilizumab, Golimumab, Certolizumab ^{13,35}

1.3.1 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Έχουν αναλγητικές, αντιπυρετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μειώνοντας τη φλεγμονή. Παρόλα αυτά δεν αναστέλλουν ούτε περιορίζουν την εξέλιξη της νόσου και την επακόλουθη καταστροφή των αρθρώσεων. Οι παρενέργειές τους εντοπίζονται κυρίως στο δέρμα με τη μορφή αντιδράσεων υπερευαισθησίας, στο γαστρεντερικό, στα νεφρά και πιο σπάνια στο αιμοποιητικό και στο ήπαρ. Προκαλούν στομαχικές διαταραχές, δυσπεψία, αίσθημα καύσου (εντοπίζεται πίσω από το στέρνο), πονοκέφαλο και δυσκολία στην αναπνοή. Μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στο βλεννογόνο (εσωτερικό τοίχωμα) του στομάχου και να υπάρξει αιμορραγία (γαστρορραγία), ειδικά αν λαμβάνονται σε μεγάλη δόση ή για μεγάλο χρονικό διάστημα. ³⁵

1.3.2 Κορτικοστεροειδή

Έχουν άμεση αντιφλεγμονώδη δράση και ίσως επιβραδύνουν την οστική αποδόμηση. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες συγκαταλέγονται ο διαβήτης, η υπέρταση, η αύξηση του βάρους, ο καταρράκτης, η οστεοπόρωση, η μυοπάθεια, η οστεονέκρωση και η ευαισθησία σε λοιμώξεις. ³⁶

1.3.3 Φάρμακα τροποποιητικά της εξέλιξης της νόσου

Αζαθειοπρίνη: είναι αντιμεταβολίτης ανάλογος της πουρίνης με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Οι παρενέργειες της είναι η ναυτία, η καταστολή του μυελού των οστών, η διαταραχές στο ήπαρ, η ευαισθησία σε λοιμώξεις, διάρροια, εξανθήματα στο δέρμα, απώλεια της όρεξης ή απώλεια των μαλλιών. Σήμερα έχει αντικατασταθεί ως επί το πλείστον από τη μεθοτρεξάτη. ³⁷

Μεθοτρεξάτη (MTX): σήμερα χρησιμοποιείται σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα. Η δράση της αρχίζει μετά 2-4 εβδομάδες θεραπείας και βασίζεται στην αναστολή της διυδροφυλικής αναγωγής. Η MTX είναι δυνατόν να προκαλέσει παρενέργειες που εκδηλώνονται στο αίμα, το ήπαρ, το γαστρεντερικό σωλήνα (ναυτία-ανορεξία) και τους πνεύμονες.³⁸

Κυκλοσπορίνη Α: είναι ένα πεπτίδιο που παράγεται από μύκητες με ανοσοκατασταλτική δράση που ασκείται κυρίως στα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης με την κυκλοφιλίνη που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της καλσινευρίνης. Στις παρενέργειες της περιλαμβάνονται οι γαστρεντερικές διαταραχές, η υπερτρίχωση, η υπέρταση και η νεφροτοξικότητα.³⁹

Λεφλουνομίδη: αναστέλλει τη σύνθεση πυριμιδινών με δράση παρόμοια της μεθοτρεξάτης μέσω αναστολής της διυδροοροτικής αφυδρογονάσης. Οι παρενέργειες της περιλαμβάνουν διάρροια, εξάνθημα, αλωπεκία, ηπατοτοξικότητα, υπέρταση³⁸

Κυκλοφωσφαμίδη: αλκυλιωτικός παράγοντας και γι' αυτό είναι ιδιαίτερα δραστική σ' αυτά τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται πολύ έντονα όπως τα αιμοσφαίρια, οι τρίχες και τα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος με ανεπιθύμητες δράσεις όπως ναυτία, εμετός, μυελοτοξικότητα, στείρωση, τριχόπτωση, καρκινογένεση.⁴⁰

1.3.4 Βιολογικοί Παράγοντες

Οι βιολογικοί παράγοντες στρέφονται κατά των κυτταροκινών που πυροδοτούν τη φλεγμονή και κυρίως κατά του TNFα και της IL-1. Οι πιο διαδεδομένοι βιολογικοί παράγοντες σήμερα είναι το **Adalimumab** (Humira, Abbott), το **Infliximab** (Remicade, Schering – Plough) και το **Etanercept** (Enbrel, Wyeth). Η δράση και των τριών παραγόντων εστιάζεται στην παρεμπόδιση της σύνδεσης του TNFα στον ενδογενείς υποδοχείς του.⁴¹

- **Etanercept:** ήταν ο πρώτος παράγοντας που εγκρίθηκε για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Είναι μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη-διαλυτός υποδοχέας που προκύπτει από τη συγχώνευση του υποδοχέα του TNFα (p75 υποδοχείς) με την σταθερή Fc περιοχή ενός αντισώματος της τάξης IgG1. Το etanercept όταν συνδυάζεται με μεθοτρεξάτη είναι πιο αποτελεσματικό σε σχέση με τη θεραπεία μόνο με μεθοτρεξάτη. Η χορήγηση του μπορεί να σχετίζεται με την υπερευαισθησία σε μολύνσεις, με φυματίωση, με λεμφώματα ή καρδιακή ανεπάρκεια λόγω της εξασθενημένης άμυνας που έχει ως επακόλουθο η χορήγηση του φαρμάκου.⁴¹

- **Infliximab:** είναι ένα τεχνητό χημειρικό μονοκλωνικό αντίσωμα που αποτελείται από 75% ανθρώπινη πρωτεΐνη και 25% πρωτεΐνη ποντικού. Σε αρχικό στάδιο παράχθηκε σε ποντίκια αλλά λόγω των αλλεργικών αντιδράσεων που εμφάνισε στον άνθρωπο κρίθηκε αναγκαία η μετατροπή του σε εξανθρωπισμένο αντίσωμα. Λόγω του γεγονότος ότι αποτελεί συνδυασμό μεταβλητών περιοχών ανθρώπινου και σταθερών περιοχών αντισώματος ποντικού καλείται χημειρικό. Δρά μέσω πρόσδεσης στον TNFα

εμποδίζοντας την σύνδεση και ενεργοποίηση του υποδοχέα του. Η χορήγηση του βελτιώνει την ποιότητα ζωής των ασθενών εμποδίζοντας την καταστροφή των αρθρώσεων και ίσως ενισχύοντας την αναδόμησή τους. Τα μειονεκτήματα του περιλαμβάνουν μολύνσεις, κίνδυνο λεμφώματος, φυματίωση και καρδιακή ανεπάρκεια.⁴¹

-Adalimumab: τεχνητό αντίσωμα το οποίο κατασκευάστηκε με βάση ένα πλήρως ανθρώπινο αντίσωμα και το οποίο προσδένεται στον TNFα εμποδίζοντας την πρόσδεση στους υποδοχείς του, TNFR1 και TNFR2. Μπορεί να χορηγείται μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα DMARDs. Η αντίδραση στη θεραπεία είναι άμεση και κυμαίνεται από 24 ώρες μέχρι μία εβδομάδα μετά τη χορήγηση. Προκαλεί μικρότερη αντίδραση του ανοσοποιητικού σε σχέση με τους άλλους παράγοντες γι' αυτό το λόγο χορηγείται σε πιο αραιά χρονικά διαστήματα. Επειδή ο TNFα είναι ένα από τα κυριότερα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος που προστατεύει από μολύνσεις, η καταστολή του από το adalimumab μπορεί να οδηγήσει σε θανατηφόρες μολύνσεις και αυτό είναι το κυριότερο μειονέκτημα που καθιστά τη χρήση του προβληματική. Οι λοιπές τοξικές δράσεις είναι όμοιες με εκείνες των άλλων δυο: εξασθένιση του ανοσοποιητικού, φυματίωση, καρδιακή ανεπάρκεια, αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη λεμφώματος κ.ά. Εάν κάποιος ασθενής εμφανίσει μόλυνση κατά τη διάρκεια της θεραπείας με το συγκεκριμένο παράγοντα θα πρέπει η χορήγηση του να διακόπτεται άμεσα.⁴¹

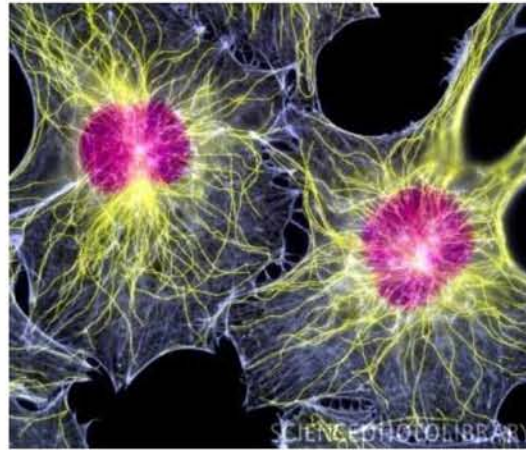
Οι παραπάνω βιολογικοί παράγοντες έφεραν επανάσταση στη θεραπευτική προσέγγιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ταυτόχρονα όμως, αυξήθηκε δραματικά το κόστος θεραπείας. Σε πολλές περιπτώσεις η θεραπεία με ένα μόνο παράγοντα δεν επιφέρει καμία βελτίωση στην υγεία του ασθενούς με συνέπεια τη συχνή εναλλαγή στον τύπο φαρμάκων προς χορήγηση, γεγονός που είναι πολύ πιθανό να επιβαρύνει περισσότερο την κατάσταση της υγείας του. Ακόμη, οι συγκεκριμένοι παράγοντες δεν είναι ικανοί να βελτιώσουν την εικόνα όλων των ασθενών.⁵

Για να καλυφθούν και οι ανάγκες αυτών των ασθενών σχεδιάστηκαν νέοι βιολογικοί παράγοντες με εναλλακτικούς μηχανισμούς δράσης όπως: **Anakinra**-ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1, **Rituximab**-ανταγωνιστής CD20 υποδοχέα στα Β-κύτταρα, **Abatacept**- ανταγωνιστής CD28 υποδοχέα στα Β-κύτταρα, είναι πρωτεΐνη συγχώνευσης ανάμεσα στο εξωκυτταρικό τμήμα του CTLA-4(ανθρώπινο κυτταροτοξικό Τ-λεμφοκυτταρικό αντιγόνο 4) και στην Fc περιοχή ενός αντισώματος της τάξης IgG1, **Tocilizumab**-εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-6.⁴¹

Παρόλα αυτά ένα ποσοστό των ασθενών γύρω στο 50% δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες. Αν και οι αντι-TNFα παράγοντες είναι αποτελεσματικοί στον έλεγχο της αρθρικής φλεγμονής, η νόσος υποτροπιάζει μετά τη διακοπή της θεραπείας.⁴² Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι εμμονή της αρθρικής φλεγμονής στη ΡΑ δεν προκαλείται από αυτοκρινή επανατροφοδότηση της παραγωγής του TNF-α. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η στροφή σε άλλους παθοφυσιολογικούς παράγοντες των οποίων η επίδραση στην εμφάνιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη πλήρως.

1.4 Οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό ως πιθανός μηχανισμός στην παθογένεια της Ρευματοειδούς αρθρίτιδας

1.4.1 Οι αρθρικοί ινοβλάστες



Εικόνα 6: Αρθρικοί ινοβλάστες

Ένας από τους πρόσφατα υπό μελέτη τύπους κυττάρων που φαίνεται να κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας είναι οι αρθρικοί ινοβλάστες (Εικόνα 6). Οι αρθρικοί ινοβλάστες (SFs) μαζί με τα μακροφάγα είναι οι κύριοι τύποι κυττάρων που απαντώνται στην άρθρωση. Παράγουν όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες (ελαστίνη, κολλαγόνο, φμπρονεκτίνη) για το σχηματισμό του εξωκυτταρικού δικτύου καθώς και πρωτεογλυκάνες που λιπαίνουν την άρθρωση. Μέσω μορίων ιντεγκρίνης προσκολλώνται στο εξωκυτταρικό δίκτυο και ελέγχουν την έξοδο και την είσοδο από και προς το αρθρικό υγρό. Αποτελούν πληθυσμό με ετερογενή ιστική τοποθέτηση που προέρχεται από το μεσέγχυμα με διαφορετικές ιδιότητες ενεργοποίησης και διαφοροποίησης.^{42,43} Μοιάζουν με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών καθώς και οι δύο τύποι κυττάρων προέρχονται από τον ίδιο πρόγονο και έχουν παρόμοια πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Ίσως χειρίζονται τη μεταβίβαση ερεθισμάτων τοπικών ή προερχόμενων από το αίμα κυττάρων στην ρευματοειδή άρθρωση. Φυσιολογικά οι SFs έρχονται σε ελάχιστη επαφή με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτός ο τοπογραφικός διαχωρισμός ίσως παρέχει μια πρώτου βαθμού προστασία σε βλαβερές αλληλεπιδράσεις SFs-κυττάρων της ανοσίας. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα η τοποθέτηση και οι αλληλεπιδράσεις των SFs με τα λεμφοκύτταρα αλλάζουν με αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονώδους απάντησης.⁴⁴

1.4.2 Χαρακτηριστικά των αρθρικών ινοβλαστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

Ο πολλαπλασιασμός των αρθρικών ινοβλαστών είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής, κατά την επούλωση πληγών και στον καρκίνο.⁴⁵ Η αυξημένη επιβίωση μάλλον οφείλεται είτε σε αδυναμία ολοκλήρωσης προαποπτωτικών μονοπατιών είτε σε μερική αντίσταση στα αποπτωτικά ερεθίσματα και όχι σε αυξημένο πολλαπλασιασμό. Μελέτες ενσωμάτωσης ³H-θυμιδίνης σε αρθρικούς ινοβλάστες αποκάλυψαν μόνο 1-5% αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού με γεγονότα μίτωσης να συμβαίνουν σπάνια στον αρθρικό ιστό PA.⁴⁸ Η επίκτητη αντίσταση στους αποπτωτικούς μηχανισμούς έχει προταθεί λόγω της εύρεσης μεταλλάξεων p53 σε ινοβλάστες του αρθρικού υμένα και απουσία έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN στο 60% αυτών. Φαίνεται ότι οι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 απορρέουν από οξειδωτική βλάβη, μια συνέπεια του οξειδωτικού μεταβολισμού στις φλεγμονώδεις περιοχές και της παραγωγής ελεύθερων ριζών.⁴⁸ Έχει αποδειχθεί ότι στην περίπτωση της PA παρουσιάζουν μια μη φυσιολογική συμπεριφορά που μοιάζει με εκείνη των καρκινικών κυττάρων. Η δυνητική εισβολή του αρθρικού υμένα υποδεικνύει την υπόθεση ότι οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα έχουν αναπτύξει σήματα ή μηχανισμούς για να αποφεύγουν τη ρύθμιση, όπως συμβαίνει σε μια κακοήθη εξαλλαγή. Χαρακτηρίζονται από ανώμαλη έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, παραγωγή προ-αγγειογενών παραγόντων και έλλειψη της αναστολής εξ επαφής.⁴⁵ Η ταυτόχρονη εμφύτευση ινοβλαστών από άρθρωση με PA (RASFs) και υγιούς χόνδρου στο γόνατο υγιών ποντικών με συνδυαστική ανοσοανεπάρκεια έδωσε φαινότυπο PA οδηγώντας στην υπόθεση ότι εφόσον οι SFs ενεργοποιηθούν μπορούν να διατηρούνται στην κατάσταση αυτή και χωρίς την επίδραση συνεχούς εξωτερικού ερεθίσματος από το προφλεγμονώδες περιβάλλον.⁴⁶ RASFs που εμφυτεύθηκαν από αρθρικό ποντίκι (με έλλειψη B, T κυττάρων) σε άρθρωση συμβατού υγιούς ποντικού δέκτη, μετανάστευσαν σε άλλα σημεία του σώματος δίνοντας φαινότυπο παρόμοιο με εκείνο του δότη.⁴⁷

Χαρακτηριστικά των ενεργοποιημένων RASFs:

- αντίσταση στην απόπτωση (μειωμένη σηματοδότηση από μόρια όπως PTEN, SENTRIN, p16, c-myc)
- υπερπολλαπλασιασμός
- αύξηση ανεξάρτητη της αγκυροβόλησης
- έλλειψη αναστολής από επαφή
- επιμηκυμένο σχήμα, διογκωμένα μιτοχόνδρια
- έκκριση κυτταροκινών
- έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs)
- έκκριση χημειοκινών
- καταστροφή οστού και χόνδρου μέσω 2 πιθανών μηχανισμών:
 - άμεσα με αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και έκκριση MMPs
 - έμμεσα με διαφοροποίηση μακροφάγων σε οστεοκλάστες
- ιδιόσυστατη ενεργοποίηση ανεξάρτητη από ερεθίσματα
- προαγωγή αγγειογένεσης μέσω έκκρισης IL-18, VEGF, bFGF, TGFβ, ογκοστατίνης M
- αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνες β1:VLA-3,4,5)⁴⁸ και πρόσδεση σε μόρια του εξωκυτταρικού δικτύου.^{44, 49}

1.4.3 Λειτουργίες που αποδιοργανώνονται στους ινοβλάστες

Σε μελέτη η οποία στόχευε στον εντοπισμό των γονιδίων που απορρυθμίζονται στους αρθρικούς ινοβλάστες ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι των αφαιρετικών βιβλιοθηκών και των μικροσυστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων συγκρίθηκαν και βρέθηκε η έκφραση 46 γονιδίων να απορρυθμίζεται με αυξημένη στατιστική σημαντικότητα. Τα γονίδια αυτά αντιστοιχίστηκαν σε 26 λειτουργίες, οι 5 από τις οποίες αφορούσαν διαταραχές στον κυτταροσκελετό. Όπως ήταν αναμενόμενο οι λειτουργίες που εντοπίστηκαν απορρυθμισμένες στους αρθρικούς ινοβλάστες σχετίζονταν με το καταβολισμό του κολλαγόνου, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ανοσολογικές και άλλου είδους αποκρίσεις ως απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα.⁵⁰ Όλοι οι διαφορεικά εκφραζόμενοι γενετικοί τόποι χαρτογραφήθηκαν σε χρωμοσώματα μαζί με γνωστούς QTLs (quantitative trait loci), χρωμοσωμικές περιοχές που συνδέονται με ένα ποσοτικό χαρακτηριστικό, για ένα ζωικό μοντέλο πρόκλησης αρθρίτιδας μετά από ανοσοποίηση με κολλαγόνο(CIA).^{50,51}

1.4.4 Μορφολογικές αλλαγές των αρθρικών ινοβλαστών

Η F-ακτίνη παρατηρήθηκε μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε αγρίου τύπου και σε αρθρικούς ινοβλάστες ποντικών. Οι ινοβλάστες των ποντικών με αρθρίτιδα επιδεικνύουν εντονο σχηματισμό ινιδίων στρες ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι ινοβλαστες στα αρθρικά άτομα έχουν αναδιοργανωμένο κυτταροσκελετό που τους προσδίδει διαφορετικές ιδιότητες προσκόλλησης στο εξωκυτταρικό δίκτυο. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ικανότητα προσκόλλησης είναι σημαντική για την επιβίωση τους και γίνεται μέσω σύνδεσης των ιντεγκρινών στα μόρια λαμινίνης, κολλαγόνου και φιμπρονεκτίνης του εξωκυτταρικού δικτύου και καθορίζει το σχήμα, τη συμπεριφορά και τη μοίρα τους.⁵⁰ Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα η προσκόλληση των ινοβλαστών στο εξωκυτταρικό δίκτυο είναι αυξημένη και το σχήμα τους πιο επιμηκυμένο δίνοντάς τους τη δυνατότητα να προσκολλώνται ισχυρότερα στο εξωκυτταρικό δίκτυο. Η έκφραση των ενδοθηλιακών σελεκτινών και των ICAM-1 αυξάνεται λόγω της συνεχόμενης παρουσίας προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNFα. Με την χορήγηση DMARDs (κυρίως μεθοτρεξάτης και αλάτων χρυσού ενδομυϊκά) είναι δυνατή η τροποποίηση της έκφρασης ορισμένων, αλλά όχι όλων των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στην αρθρική μεμβράνη. Τα κύρια μόρια προσκόλλησης που υπο-ρυθμίζονται μετά από θεραπεία είναι: E-σελεκτίνη, VCAM-1 και ICAM-1.⁵² Σε συνδιασμό με το γεγονός αυξημένου σχηματισμού ινιδίων στρες σε ινοβλάστες αρθρικών ατόμων τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν μεταβολές στον κυτταροσκελετό και στις ιδιότητες προσκόλλησης στο εξωκυτταρικό δίκτυο. Επιπλέον, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εκπομπής παρατηρήθηκε ότι οι αρθρικοί SFs διαθέτουν διεσταλμένο ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια. Φαίνεται ότι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς της παθογένειας της ρευματοειδούς αρθρίτιδας είναι ο πολυμερισμός της ακτίνης και η επακόλουθη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που καταλύεται από ειδικές πρωτεάσες.⁵⁰

1.5 Η ανάδειξη της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού των ινοβλαστών από τη γελσολίνη ως πιθανού παράγοντα παθογένειας

1.5.1 Το γονίδιο Gsn

Ένα από τα 5 γονίδια που έδειξαν απορρυθμισμένη έκφραση στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και αφορούν λειτουργίες του κυτταροσκελετού είναι το γονίδιο Gsn.⁵⁰ Το γονίδιο Gsn έχει μήκος 70kb, αποτελείται από 17 εξόνια και εδράζεται στο χρωμόσωμα 9.^{53,54} Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη γελσολίνη και βρέθηκε να υποεκφράζεται σε αρθρικούς ινοβλάστες ατόμων που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁵⁰ Η γελσολίνη είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 82-84 kDa και έχει βρεθεί να κατέχει ρόλο σε πολλές διαφορετικές λειτουργίες του ενήλικου οργανισμού, αν και ο ρόλος της δεν φαίνεται να είναι σημαντικός στην εμβρυική ηλικία. Μπορεί να υπάρξει σε δύο εναλλακτικές ισομορφές, την πλασματική και την κυτταροπλασματική. Οι δύο διαφορετικές ισομορφές προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα μορίων mRNA που κωδικοποιούνται από ένα μοναδικό γονίδιο. Το mRNA της πλασματικής ισομορφής κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο σήματος 27 αμινοξέων το οποίο δεν εντοπίζεται στην ώριμη πρωτεΐνη. Οι αλληλουχίες τους είναι σχεδόν ταυτόσημες, διαφοροποιούνται μόνο στο αμινοτελικό άκρο. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η πλασματική ισομορφή είναι παρόμοια με την κυτταροπλασματική, εκτός του ότι περιέχει μια επέκταση 25 αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο που φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη διαφορά 3kDa που εμφανίζεται κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε gel SDS-πολυακρυλαμιδίου. Εκφράζονται ταυτόχρονα σε πολλούς τύπους κυττάρων σε διαφορετικές ποσότητες και ρυθμούς.⁵³

1.5.2 Γενικές λειτουργίες της γελσολίνης

Η γελσολίνη είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση, τη μορφολογία, την κίνηση του κυττάρου και τη μετακίνηση κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα. Στον πυρήνα ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με υποδοχείς ανδρογόνων, την αντιγραφή του DNA, τη διατήρηση της δομής του και έχει την ικανότητα σύνδεσης με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.⁵⁵ Συμμετέχει στο σχηματισμό ποδοσωμάτων στους οστεοκλάστες και του νευρικού κώνου στα κύτταρα της νευρογλοίας. Ρυθμίζει την επιμήκυνση ή την απόσυρση των λαμελλιποδίων/φιλοποδίων. Στα φαγοκύτταρα διαδραματίζει ρόλο στη φαγοκυττάρωση μέσω Fc υποδοχέα ή ιντεγκρινών μεσολαβόντας στην ταχύτερη αλλαγή της μορφολογίας των φαγοσωμάτων.⁵⁶ Κατά τη φαγοκύτωση του κολλαγόνου ενισχύει την διαμεσολαβούμενη από το κολλαγόνο εισροή ιόντων Ca^{2+} που προηγείται των κυτταροσκελετικών αναδιαμορφώσεων που συμβαίνουν μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της Rac.⁵⁷ Ακόμα και η έκφραση της Rac φαίνεται ότι ρυθμίζεται από τα επίπεδα της γελσολίνης.⁵⁸ Η έλλειψη της φαίνεται ότι επιδρά στην ομαλή λειτουργία πολλών κυτταρικών διαδικασιών. Knock out του γονιδίου της γελσολίνης οδηγεί σε αυξημένο χρόνο πήξης του αίματος, μείωση της κινητικότητας των αιμοπεταλίων, μείωση της κινητικότητας των ουδετερόφιλων και των ινοβλαστών και σε καθυστέρηση της επούλωσης πληγών. Επίσης

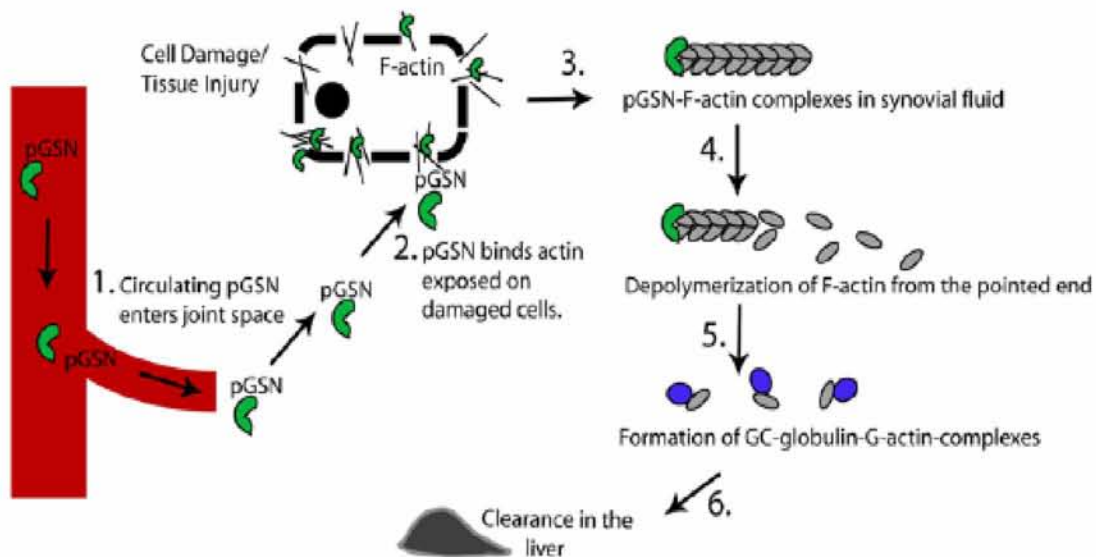
παρατηρείται μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων καθώς αυτά προκύπτουν με αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού των μεγακαρυοκυττάρων.⁵⁶

Η γελσολίνη συμμετέχει και στη σωστή μεταβίβαση των μηνυμάτων που δέχονται οι υποδοχείς ανδρογόνων (AR). Συνδέεται στον υποδοχέα παρουσία της ορμόνης-αγωνιστή και μέσω αλληλεπίδρασης με την ακτίνη του κυτταροσκελετού βοηθά στη μετακίνησή του στο εσωτερικό του πυρήνα. Δεν μπορούμε όμως να περιορίσουμε τη δράση της στο ρόλο του μεταφορέα, ούτε να αποκλείσουμε και την πιθανότητα να κατέχει άμεσο ρόλο μεταγραφικού παράγοντα.⁵⁹

Τα προϊόντα καταστροφής της από την κασπάση 3 δρουν ως εναρκτές της απόπτωσης.⁵⁶ Σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF (Michigan cancer foundation) έγινε σίγηση του γονιδίου με μεταφορά και ένθεση ιικού φορέα στο εξόνιο 2 και παρατηρήθηκε δραματική μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών που προκαλεί η ενεργοποίηση του TNF και αυξημένη επιβίωση. Επομένως, η έλλειψή της προκαλεί αντίσταση στην TNF-μεσολαβούμενη απόπτωση.⁶⁰ Αντίθετα, η υπερέκφρασή της αναστέλλει την απόπτωση εμποδίζοντας τη δράση της κασπάσης 3 είτε μέσω της σύνδεσης με PIP₂ είτε με παρεμπόδιση της αλλαγής του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω σύνδεσης σε VDACs (voltage dependent anion channels).⁵⁶ Η απόπτωση είναι μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες στη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Διαταραχές στο μηχανισμό της απόπτωσης ή στα σήματα που κανονικά διεγείρουν την αποπτωτική διαδικασία είναι σε θέση να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μη φυσιολογικού αριθμού νευρώνων και σε παθολογική νευρωνική ανάπτυξη.⁶¹

Υπόεκφρασή της έχει παρατηρηθεί στον καρκίνο, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η γελσολίνη έχει ογκοκατασταλτική δράση. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η υποέκφραση της προκαλεί την αυξημένη μεταναστευτικότητα των καρκινικών κυττάρων.⁴⁵

1.5.2.1 Δράση της γελσολίνης στη φλεγμονή

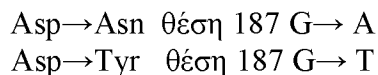


Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης της γελσολίνης στον τραυματισμό⁶²

Κατά τη διάρκεια τραυματισμού ενισχύεται η αντιφλεγμονώδης δράση της καθώς δεσμεύεται είτε στα ινίδια F-ακτίνης που απελευθερώνονται από τραυματισμένα ή γηρασμένα κύτταρα είτε σε διάφορους φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές και είναι εμφανής η αυξημένη παρουσία συμπλόκων ακτίνης-γελσολίνης στο πλάσμα (Εικόνα 7). Η αντιφλεγμονώδης δράση της γελσολίνης ενισχύεται από το γεγονός ότι είναι σε θέση να δεσμεύεται σε βακτηριακές ενδοτοξίνες και συγκεκριμένα σε λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που προέρχονται από το τοίχωμα gram αρνητικών βακτηρίων.⁶³

1.5.2.2 Αμυλοείδωση Ισλανδικού τύπου (Finnish type amyloidosis)

Μετάλλαξη του γονιδίου Gsn προκαλεί την αμυλοείδωση ισλανδικού τύπου, μια οικογενή επικρατή ασθένεια που οδηγεί σε δυστροφία του κερατοειδούς, εγκεφαλική και περιφερική νευροπάθεια και υπερελαστικό δερματικό επιθήλιο. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη καταστρέφει τη θέση δέσμευσης του ιόντος ασβεστίου και προκαλεί αστάθεια στην περιοχή G2 της γελσολίνης που εντοπίζεται στο N τελικό άκρο του μορίου μέσα σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή δέσμευσης της ακτίνης. Απαντάται και στις δυο εναλλακτικές ισομορφές της γελσολίνης, καθιστώντας την πολύ ευάλωτη σε πρωτεόλυση από τη φουρίνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγώντας σε δημιουργία μιας β πτυχωτής επιφάνειας με μη σωστή αναδίπλωση, και επακόλουθη συσσώρευση αμυλοειδούς μήκους 71-αμινοξικών καταλοίπων. Οι συνηθέστερες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί αφορούν αλλαγές:

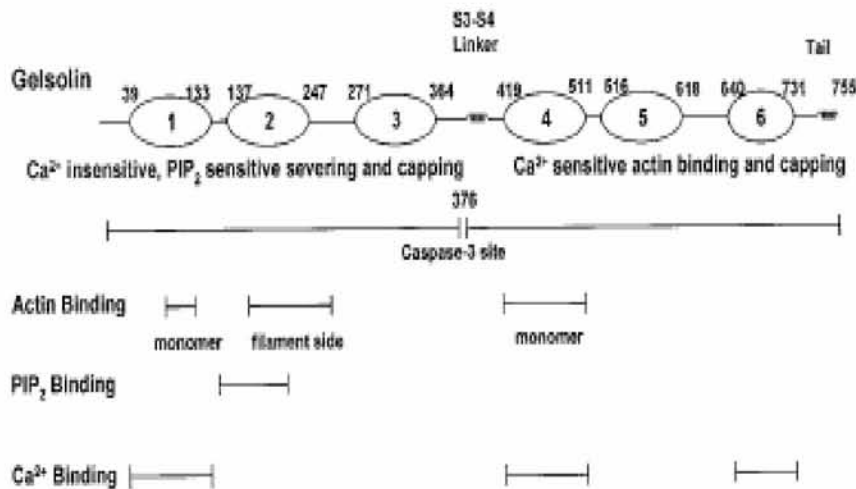


Ένα όξινο αμινοξύ υποκαθίσταται από ένα ουδέτερο με αποτέλεσμα μεταβολές στη δευτεροταγή δομή.⁶⁴

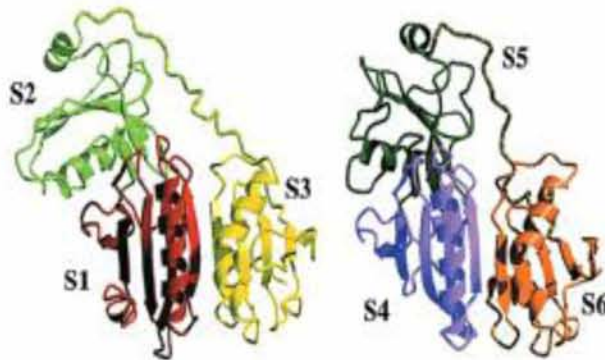
1.5.3 Μηχανισμός δράσης της γελσολίνης

Η γελσολίνη αποτελείται από 6 παρόμοιες δομικές περιοχές G1-G6 που στην ανενεργή της κατάσταση σχηματίζουν μια συμπαγή δομή. Οι περιοχές αυτές ανα τρεις, G1-G3 και G4-G6, σχηματίζουν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κομμάτι αντίστοιχα (Εικόνα 9). Συνολικά η γελσολίνη διαθέτει 8 θέσεις δέσμευσης ιόντων ασβεστίου. Οι θέσεις τύπου 2 είναι 6 και είναι υπεύθυνες για τη σταδιακή ενεργοποίηση του μορίου τοποθετημένες σε όλες τις δομικές περιοχές, ενώ 2 επιπλέον θέσεις τύπου 1 εντοπίζονται στις περιοχές G1 και G4 και σχετίζονται με τη συγγένεια προς την ακτίνη. Παρόλα αυτά οι περιοχές G1, G4, G6 εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια για το Ca^{2+} .⁶⁵ Το κρίσιμο γεγονός της ενεργοποίησης είναι η δέσμευση ενός Ca^{2+} στην περιοχή G2 που αποσταθεροποιεί τις επιδράσεις που προϋπάρχουν με την περιοχή G6 και την C-τελική ουρά.⁶⁶ Η γελσολίνη ασκεί τη δράση της με τη συμμετοχής της στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού μέσω της αλληλεπίδρασης της με τα ινίδια ακτίνης συνεργιστικά με την

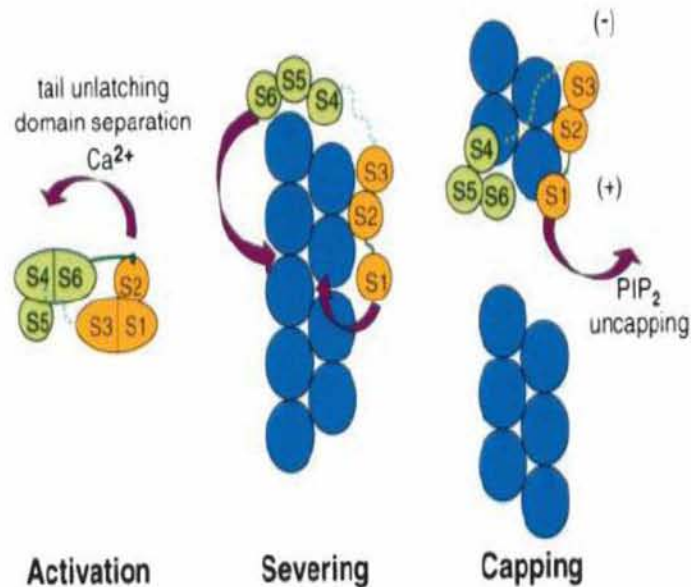
παρουσία ιόντων Ca^{2+} που προκαλούν σταδιακές αλλαγές στη διαμόρφωσή της. Οι περιοχές G1,G2,G4 έχουν ικανότητα δέσμευσης μονομερών ακτίνης με τη G2 να είναι η μόνη με επιπλέον ικανότητα δέσμευσης μορίων F-ακτίνης και PIP_2 ⁶⁷ (Εικόνα 8). Η γελσολίνη ουσιαστικά αποτελεί αναστολέα του πολυμερισμού της ακτίνης. Επιδρώντας πάνω στα ινίδια F-ακτίνης έχει την ικανότητα να τα διασπά σε ινίδια μικρότερου μήκους επικαλύπτοντας τα ελεύθερα άκρα τους (Εικόνα 10). Αποκόπτει στοιχειομετρικά με σχεδόν 100% επάρκεια. Συνδέεται ταχύτατα αλλά τα διασπά αργά, διότι απαιτείται κάποιος χρόνος για να γίνουν οι απαραίτητες αναδιατάξεις στο μόριο της γελσολίνης ώστε να γίνει η διάσπαση. Μετά από αυτό η γελσολίνη παραμένει στα ελεύθερα άκρα των κομμένων ινιδίων ως κάλυμα με αποτέλεσμα εκείνα να μην μπορούν να επανασυνδεθούν και να επιμηκυνθούν. Με αυτό τον τρόπο το κυτταροσκελετικό δίκτυο αποδιοργανώνεται. Ταυτόχρονα έχει και ανακατασκευαστικές ιδιότητες καθώς η αποδέσμευσή της από τα μικρά ινίδια σηματοδοτεί τον πολυμερισμό ανάμεσα σε ανταγωνιζόμενα άκρα από τα οποία ο κυτταροσκελετός μπορεί να επανασυσταθεί δημιουργώντας νέες διαμορφώσεις.⁶⁷



Εικόνα 8: Δομή γελσολίνης - λειτουργικές περιοχές, σημειώνονται τα σημεία στα οποία αλληλεπιδρά με ακτίνη, PIP_2 και Ca^{2+} αντίστοιχα.⁶⁷



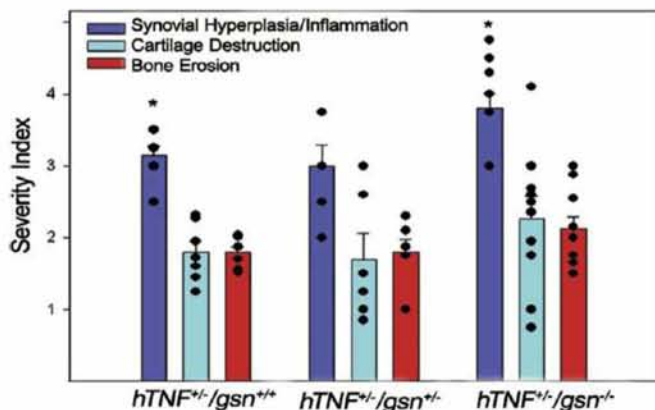
Εικόνα 9: Δομικό μοντέλο γελσολίνης, C και N τελικά άκρα.⁶⁷



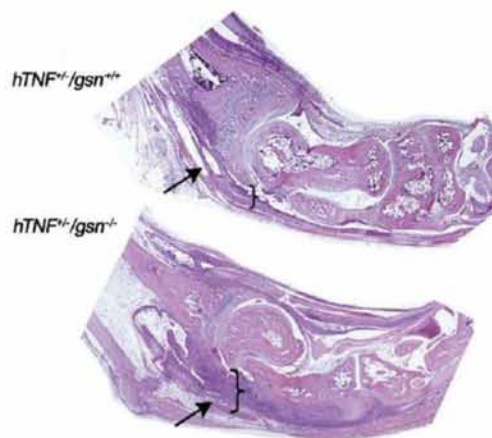
Εικόνα 10: Σχηματικό μοντέλο για την δέσμευση, διάσπαση και επικάλυψη ενός ινιδίου ακτίνης από γελσολίνη⁶⁷

1.5.4 Μοντέλο ποντικού knock out για το γονίδιο Gsn

Το γονίδιο Gsn έχει δείχθει ότι υποεκφράζεται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα με τη χρήση real-time PCR σε δείγματα ποντικού και ανθρώπου και με Western Blot σε αθανатоποιημένους αρθρικούς ινοβλάστες οδηγώντας σε ογκογένεση που μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras. Φαίνεται ότι η έκφραση της γελσολίνης δρα καθοδικά της Rac προάγοντας την κινητικότητα και το δυναμικό μετανάστευσης των μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών. Αντιθέτως, μεταλλάγματα υπερέκφρασης της γελσολίνης καταστέλλουν τον μετασχηματισμό προκαλούμενο από τη Ras. Knock out ινοβλάστες για το γονίδιο Gsn επιδεικνύουν σχηματισμό ινιδίων στρες, όμοια με εκείνα που παρατηρούνται σε αρθρικούς ινοβλάστες. Επίσης διασταύρωση αρθρικού ποντικού (Tg197, hTNF+/-) με Gsn knock out ποντίκι (gsn -/-) έδωσε απογόνους που παρουσίαζαν σημαντική επιδείνωση στη RA σε σχέση με το φαινότυπο των γονέων. Προφανώς, η μείωση της γελσολίνης συμβάλλει στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας μέσω μείωσης της διασπαστικής της δράσης πάνω στην ακτίνη συμβάλλοντας στον καρκινικού τύπου φαινότυπο των αρθρικών ινοβλαστών (Εικόνα 11).⁵⁰



a



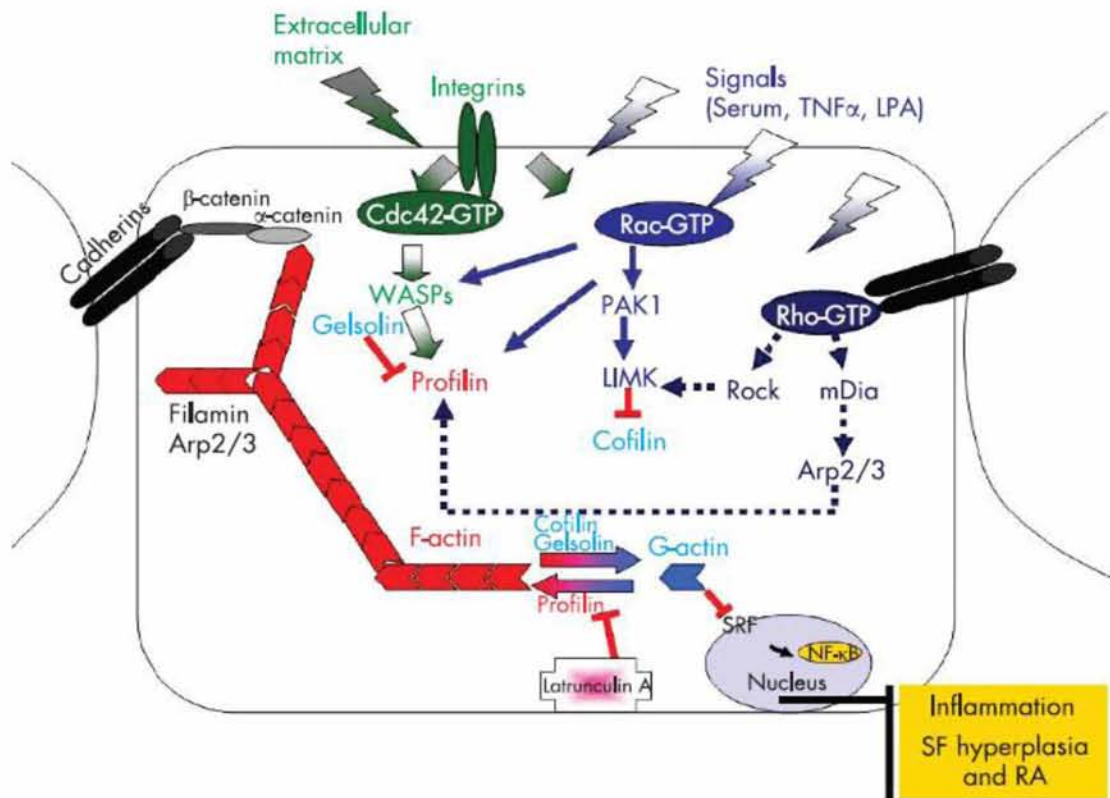
b

Εικόνα 11: Η επίδραση του knock out της gsn στην επιδείνωση της ασθένειας, α) ιστοπαθολογικά σκορ, β) ιστοπαθολογική ανάλυση με haematoxylin-eosin μιας άρθρωσης gsn^{-/-50}

1.5.5 Προτεινόμενο μοντέλο πρόκλησης ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Συμπερασματικά οι ερευνητές έχουν καταλήξει στο ακόλουθο προτεινόμενο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο αρχικά ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα (LPA) από το εξωκυτταρικό δίκτυο (ή από το πλάσμα) ενεργοποιεί τον υποδοχέα των ιντεγκρινών, είτε ένα ανοσολογικό ερέθισμα (πχ. TNFα) ενεργοποιούν με τη σειρά τους μικρές GTPάσες (Rho, Rac, Cdc42) που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την προσκόλληση των αρθρικών ινοβλαστών. Οι μικρές αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν GDP με GTP (ή το αντίστροφο) μεταπίπτοντας στην ενεργή τους κατάσταση. Οι Rac, Cdc42 σχετίζονται κυρίως με το σχηματισμό λαμελλιποδίων ή φιλοποδίων ενώ η ενεργοποίηση της Rho έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινιδίων ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα.^{68,69} Αυτές ενεργοποιούν καθοδικούς τελεστές οι οποίοι στοχεύουν με τη σειρά τους πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού. Επειδή αυτό το γεγονός είναι κρίσιμο για την ομοίωση και επιβίωση του κυττάρου είναι λογικό ότι κάθε βήμα ελέγχεται από περισσότερες από μια πρωτεΐνες. Η προφιλίνη, η θυμοσίνη β1, η α-ακτινίνη και η VASP συμμετέχουν στον πολυμερισμό της ακτίνης, ενώ η κοφιλίνη, η γελσολίνη και η κασπάση 11 είναι απαραίτητες στον αποπολυμερισμό και οι φιλαμίνη, Agr 2/3 χειρίζονται τη δημιουργία του πυρήνα από τον οποίο επεκτείνονται τα νέα ινίδια ακτίνης.⁷⁰ Όπως φαίνεται, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, η γελσολίνη και η κοφιλίνη που διαθέτουν αποπολυμεριστική δράση αναστέλλονται, αντίθετα, η προφιλίνη που δρα συνεργιστικά με την Agr 2/3 ενεργοποιείται συμμετέχοντας στο σχηματισμό ενός πυρήνα από τον οποίο ξεκινά ο σχηματισμός νέων ινιδίων ακτίνης υπό γωνία 70° σε σχέση με τα αρχικά.⁷⁰ Καθώς τα μονομερή G-ακτίνης πολυμερίζονται από την προφιλίνη, ο ρυθμιστικός παράγοντας MaI (και συνενεργοποιητής του μεταγραφικού παράγοντα SRF) που ήταν προηγουμένως

δεσμευμένος πάνω στα μονομερή G-ακτίνης στο κυτταρόπλασμα είναι πλέον ελεύθερος να μεταναστεύσει στον πυρήνα όπου καθιλώνεται από ενδοπυρηνικά μόρια ακτίνης και να ενεργοποιήσει τον SRF.⁷¹ Ο SRF (serum response factor) είναι μια πρωτεΐνη της οικογένειας MADS μεταγραφικών παραγόντων.⁷² Προσδένεται στο στοιχείο SRE στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων στόχων και ενεργοποιεί γονίδια πρώιμης απόκρισης όπως το c-fos,⁷² μπορεί όμως μέσω της αλληλεπίδρασης με τον NF-κB⁷³ να ενεργοποιήσει και γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την αύξηση και τη διαφοροποίηση καθώς και φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών, επανατροφοδοτώντας την ενεργοποίηση του TNFα και άλλων παραγόντων φλεγμονής συντηρώντας την παθολογία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Εικόνα 12).⁵⁰



Εικόνα 12: Αναπαράσταση του υποθετικού μηχανισμού πρόκλησης ρευματοειδούς αρθρίτιδας στο οποίο συμμετέχει η γελσολίνη.⁴⁵

1.6 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη του γονιδίου της γελσολίνης, εστιάζοντας στα εξόνια 5 και 6 με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση πολυμορφισμών σε δείγματα φυσιολογικών ατόμων και ατόμων που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα στον ελληνικό πληθυσμό. Η μελέτη αυτή εντάσσεται στα πλαίσια μιας γενικότερης μελέτης που αποσκοπεί στην αναζήτηση πολυμορφισμών σε όλα τα εξόνια του γονιδίου της γελσολίνης και στη διερεύνηση της συσχέτισής τους με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Απομόνωση γενωμικού DNA από επιθήλιο ομάδας ελέγχου και περιφερικό αίμα ασθενών.
- Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης σε πηκτή αγαρόζης 1%
- Ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών με κατάλληλα ζεύγη εκκινητών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και έλεγχος της απόδοσης σε πηκτή αγαρόζης 1,5%
- Αποδιάταξη του DNA και ανάλυση των προτύπων σε πηκτή ακρυλαμίδης 10% με την τεχνική SSCP
- Καθαρισμός των δειγμάτων που φέρουν διαφορετικό πρότυπο με ειδικό kit της Invitrogen
- Κυκλική αλληλούχηση για ταυτοποίηση πολυμορφισμών
- Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με υπολογιστικό πρόγραμμα και σύγκριση των αλληλουχιών

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 30 δείγματα ασθενών από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα που έχουν διαγνωστεί με ενεργό ρευματοειδή αρθρίτιδα, οριζόμενη με τη βαθμολογία DAS28 ≥ 3.2 , κατά την εισαγωγή τους σε θεραπεία. Υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν επιθηλιακά κύτταρα από το στοματικό επίχρισμα ομάδας ελέγχου και το περιφερικό αίμα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα από την Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα. Τα δείγματα τα οποία προσφέρθηκαν έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς, προέρχονται από τη Ρευματολογική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και από το Ρευματολογικό Τμήμα της Α' Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Λάρισας και από το Ρευματολογικό Τμήμα της Α' Παθολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης. Αντίστοιχα τα δείγματα ελέγχου προέρχονται από εθελοντές υγιείς δότες οι οποίοι εφόσον πληρούσαν τις προϋποθέσεις απουσίας άλλου νοσήματος συμμετείχαν στη μελέτη ανώνυμα έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση.

2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση πρέπει να εξασφαλίζει DNA καλής ποιότητας, δηλαδή μη αποικοδομημένο και επαρκούς ποσότητας. Υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα απομόνωσης με βάση το είδος του DNA που πρέπει να απομονωθεί (πυρηνικό, μιτοχονδριακό, πλασμιδιακό) και την προέλευση του εξεταζόμενου πρωτογενούς υλικού.

2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από επιθηλιακά κύτταρα ατόμων ελέγχου

Υλικά και διαλύματα:

- οξικό νάτριο (NaOAc) 0,2M: βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA
- SDS 5%: είναι ένα ισοτονικό απορρυπαντικό που διασπά την κυτταρική μεμβράνη και γαλακτωματοποιεί πρωτεΐνες και λιπίδια. Το αποτέλεσμα είναι να σχηματίζονται πολύπλοκες δομές λιπιδίων και πρωτεϊνών οι οποίες κατακρημνίζονται προστατεύοντας το DNA από νουκλεάσες.
- πρωτεΐνάση K 20 ng/μl: προκαλεί την πέψη των πρωτεϊνών. Το ένζυμο παραμένει ενεργό παρά την παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών.
- φαινόλη: αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διαχωρίζει πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Η φαινόλη είναι εξισορροπημένη σε pH > 7 ώστε το DNA να παραμένει στην υδατική φάση.
- χλωροφόρμιο (24/1 v/v χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη): η προσθήκη χλωροφορμίου έχει ως στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας. Προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών και απομάκρυνση της περίσσειας φαινόλης από την υδατική φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί την ενδιάμεση φάση μεταξύ υδατικής και οργανικής στην οποία συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες.
- Ισοπροπανόλη, παγωμένη αιθανόλη 70%: το DNA αρχικά κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και ακολουθεί πλύση με παγωμένη αιθανόλη 70%. Το DNA λόγω της ιονικής του φύσης παραμένει αδιάλυτο ως ίζημα σε αυτούς τους οργανικούς διαλύτες.
- ddH₂O για επαναδιάλυση
- ψυχόμενη φυγόκεντρος
- vortex
- φούρνος επώασης
- αναδευτήρας

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από στοματικό επίχρισμα, για τη συλλογή του οποίου χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα βουρτσάκια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

1. Σε eppendorfs των 2 ml που περιέχουν τα βουρτσάκια προστίθεται 0,5 ml NaOAc 0,2M, γίνεται vortex και στη συνέχεια προστίθενται 50μl SDS 5% και 5μL πρωτεϊνάσης K. Γίνεται επώαση για 1 ώρα στους 55° C με συνεχή ανακίνηση τοποθετώντας τα eppendorfs στον αναδευτήρα.
2. Αφαιρούνται τα βουρτσάκια με τσιμπίδα που απολυμαίνεται με αιθανόλη μετά από κάθε δείγμα και προστίθενται 0,5 ml φαινόλη και 0,5 ml χλωροφόρμιο. Γίνεται ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 10 min.
3. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs των 2 ml και προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιο. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min.

4. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs των 2 ml και προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλη. Γίνεται ανακίνηση και επώαση στους -20°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min.
5. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml παγωμένη αιθανόλη 70%. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 min.
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα δείγματα αφήνονται για ξήρανση.
7. Αφού το δείγμα ξηρανθεί πλήρως γίνεται επαναδιάλυση σε 100 μl ddH₂O.
8. Τα δείγματα αφήνονται για ολονύκτια επαναδιάλυση στους 4°C .
9. Την επόμενη μέρα αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

2.3 Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της απόδοσης του πρωτοκόλλου απομόνωσης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με φωτομέτρηση, ενώ ο ποιοτικός με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%:

- **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%:** με τη διαδικασία αυτή επιβεβαιώσαμε την ύπαρξη DNA αλλά και την ακεραιότητά του. Εάν παρατηρηθούν πολλές ζώνες σημαίνει ότι το DNA έχει αποικοδομηθεί. Το γενωμικό DNA πρέπει να βρίσκεται μέσα στα πηγάδια ή ελάχιστα κάτω από το ύψος τους, ειδικά η απομόνωση δεν είναι αποδοτική. Η πηκτή κατασκευάστηκε με διάλυση 0,5 gr αгарόζης σε 50 ml TAE 1x όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια.
- **Φωτομέτρηση:** βασίζεται στην απορρόφηση των νουλεϊκών οξέων στα 260 nm, λόγω της ύπαρξης αρωματικών βάσεων. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή του αλλά και ο βαθμός καθαρότητάς του. Κατά τη διαδικασία λήφθηκαν 2ml από το προϊόν της απομόνωσης και αραιώνονται σε 98 μl ddH₂O. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα και φωτομετρήθηκε. Η τιμή απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχήθηκε στη συγκέντρωση του DNA. Η τιμή του λόγου 260/280 δίνει την καθαρότητα από πρωτεΐνες και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.80-2.00.

2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που ενισχύει ένα τμήμα DNA σε πολλές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες ως εκατομμύρια αντίτυπα μιας συγκεκριμένης ακολουθίας του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στη θερμική κυκλοποίηση, αποτελούμενη από κύκλους επαναλαμβανόμενης θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης για αποδιάταξη και ενζυμική αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς μια περιοχή του στόχου, μαζί με την Taq DNA πολυμεράση είναι τα κύρια στοιχεία που επιτρέπουν επιλεκτική και συνεχόμενη ενίσχυση. Όπως εξελίσσεται η PCR, το παραγόμενο DNA χρησιμοποιείται εκ νέου ως πρότυπο για την αντιγραφή, θέτοντας σε κίνηση μια αλυσιδωτή αντίδραση με την οποία το πρότυπο DNA ενισχύεται εκθετικά. Σχεδόν όλες οι εφαρμογές PCR αφορούν μια θερμο-σταθερή πολυμεράση DNA, όπως η Taq πολυμεράση, ένα ένζυμο που αρχικά απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η πλειοψηφία των μεθόδων PCR

χρησιμοποιεί θερμική κυκλοποίηση απαραίτητη για το διαχωρισμό των δύο ελίκων του DNA σε υψηλή θερμοκρασία με μια διαδικασία που ονομάζεται τήξη. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία, κάθε έλικα χρησιμοποιείται ως πρότυπο στη σύνθεση του DNA από τη DNA πολυμεράση για επιλεκτική ενίσχυση του DNA στόχου. Η επιλεκτικότητα της PCR είναι το αποτέλεσμα της χρήσης εκκινητών που είναι συμπληρωματικοί προς την περιοχή του DNA που στοχεύεται για ενίσχυση υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης.

Η PCR χρησιμοποιείται σε ιατρικά και βιολογικά ερευνητικά εργαστήρια για μια ποικιλία εφαρμογών. Αυτές περιλαμβάνουν την κλωνοποίηση του DNA για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας, DNA-φυλογένεση, λειτουργική ανάλυση γονιδίων, διάγνωση κληρονομικών ασθενειών, εντοπισμός γενετικών αποτυπωμάτων στην ιατροδικαστική, test πατρότητας και διάγνωση λοιμωδών νόσων.⁷⁴

2.4.1 Υλικά για προετοιμασία της PCR

Μια PCR για να συσταθεί απαιτεί διάφορα υλικά και αντιδραστήρια τα οποία περιλαμβάνουν:

- Θερμικό κυκλοποιητή
- DNA εκμαγείο που περιέχει την περιοχή του DNA (στόχος) που θα ενισχυθεί
- Δύο εκκινητές που σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να συνδέονται βάσει συμπληρωματικότητας στο 5' άκρο ενός τμήματος εκατέρωθεν του DNA στόχου αφήνοντας το 3' άκρο τους ελεύθερο για να δράσει η πολυμεράση. Έχουν μήκος 18-22 βάσεις και η θερμοκρασία πρόσδεσης εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε GC,AT. Συνήθως περιέχουν 45-55% GC και δεν εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους ή σχηματισμό εσωτερικών δευτεροταγών δομών (θηλιές, βρόγχους).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4: Αλληλουχίες των εκκινητών με βάση τη γενωμική θέση της γελσολίνης (NC_000009.11)

Εξόνιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' - 3')	Μέγεθος προϊόντος
5	GSN pr_F (34721-34740)	AGT GCT GGG GTT CCT CCT CC	370 bp
	GSN pr_R (35011-35030)	GCC TGA GTG AGC CCT GTT AC	
6	GSN pr_F (42491-42513)	GAA TTT CCT TTA CCT CAA TTC TG	310 bp
	GSN pr_R (42841-42860)	GGT CCC TGT GGT TTG CCC AC	

- Ταq πολυμεράση με βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 72°C.

- Τριφωσφορικά δεσοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), δομικά στοιχεία με τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει μια νέα αλυσίδα του DNA.
- Ρυθμιστικό διάλυμα, παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την καλύτερη δυνατή δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης.
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), συμπαραάγοντας απαραίτητος για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης. Αν η ποσότητα Mg^{2+} δεν είναι αρκετή στην αντίδραση τότε έχουμε μειωμένη παραγωγή προϊόντος, αντίθετα αν είναι αυξημένη παρατηρείται μη ειδική αντίδραση και εμφάνιση παραπροϊόντων.

2.4.2 Στάδια της θερμικής κυκλοποίησης

Η PCR αποτελείται συνήθως από μια σειρά 30-40 επαναλαμβανόμενων αλλαγών θερμοκρασίας που ονομάζονται κύκλοι. Κάθε κύκλος αποτελείται συνήθως από 2-3 διακριτά στάδια θερμοκρασίας. Συνηθέστερα η PCR πραγματοποιείται με κύκλους που έχουν τρία στάδια θερμοκρασίας. Πριν την κυκλοποίηση προηγείται συνήθως ένα βήμα σε υψηλή θερμοκρασία ($> 90^\circ C$), και ακολουθείται από μία θερμοκρασία για την επέκταση του τελικού προϊόντος. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται και το χρονικό διάστημα της εφαρμογής τους σε κάθε κύκλο εξαρτώνται από μια σειρά παραμέτρων. Αυτές περιλαμβάνουν το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων και των dNTPs στην αντίδραση, και τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών.

- Αρχικό βήμα: Το βήμα αυτό αποτελείται από την αποδιάταξη σε θερμοκρασία $95^\circ C$ η οποία πραγματοποιείται για 5 λεπτά.
- Αποδιατακτικό βήμα: Αυτό το βήμα είναι το πρώτο γεγονός κυκλοποίησης και αποτελείται από τη θέρμανση της αντίδρασης στους $95^\circ C$ για 45 δευτερόλεπτα. Προκαλεί τήξη του DNA μέσω διατάραξης των δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων, παράγοντας μονόκλωνες αλυσίδες DNA.
- Βήμα υβριδοποίησης: Η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται στους $62^\circ C$ για 45 δευτερόλεπτα επιτρέποντας την προσκόλληση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA πρότυπο. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι περίπου $3-5^\circ C$ κάτω από το T_m των εκκινητών. Η πολυμεράση συνδέεται με το υβρίδιο εκκινητή-προτύπου και αρχίζει τη σύνθεση DNA.
- Επέκταση/βήμα επιμήκυνσης: Η θερμοκρασία κατά τη φάση αυτή εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται. Η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία $72^\circ C$. Σε αυτό το βήμα, η DNA πολυμεράση συνθέτει μια νέα έλικα DNA συμπληρωματική της έλικας του DNA προτύπου με την προσθήκη dNTPs που είναι συμπληρωματικά προς το πρότυπο με κατεύθυνση 5' προς 3'. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από τη χρησιμοποιούμενη DNA πολυμεράση όσο και από το μήκος του DNA που ενισχύεται. Στη βέλτιστη θερμοκρασία της, η DNA πολυμεράση υποβάλλει σε πολυμερισμό χίλιες βάσεις ανά λεπτό. Υπό βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή, εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί, λόγω περιορισμού υποστρώματος ή αντιδραστηρίων, σε κάθε βήμα επέκτασης, το ποσό του DNA στόχου διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση.

- Τελική επιμήκυνση: Αυτό το βήμα γίνεται σε θερμοκρασία 72 ° C για 10 λεπτά μετά τον τελευταίο κύκλο PCR για να διασφαλιστεί ότι τυχόν εναπομείνουσες μονόκλωνες έλικες DNA θα επεκταθούν πλήρως.
- Τελική διατήρηση: Αυτό το βήμα στους 4 ° C μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μικρής διάρκειας συντήρηση της αντίδρασης.⁷⁴

Πίνακας 5: Ποσότητες αντιδραστηρίων PCR για κάθε αντίδραση

Αντιδραστήρια	εξόνια 5 και 6	
	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dH ₂ O		18 μl
PCR buffer 10x	1x	2,5 μl
MgCl ₂ 25mM	2 mM	0,5 μl
dNTPs 40mM	0,8 mM	0,5 μl
forward primer (50pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl
reverse primer (50pmol/μl)	1 pmol/μl	0,5 μl
Taq polymerase (5U/ml)	1 U/ml	0,5 μl
DNA		2 μl (50ng/μl)
Τελικός όγκος		25 μl

Αρχικά προετοιμάστηκε ένα κύριο διάλυμα (mix) το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια υπολογισμένα σε ποσότητες που καλύπτουν όλες τις αντιδράσεις εκτός από το DNA. Στη συνέχεια μοιράστηκαν 23μl από το mix σε κάθε eppendorf. Η ποσότητα τροποποιείται ανάλογα με την ποσότητα του DNA που απαιτεί κάθε αντίδραση. Συνήθως υπολογίζονται τις ποσότητες του mix για ένα δείγμα παραπάνω ώστε σε περίπτωση που η πιπέτα χάσει ποσότητα να μείνει αρκετή για να τοποθετηθεί ως αρνητικός έλεγχος.

Για να προσδιοριστούν οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση για κάθε εξόνιο έγινε PCR με διαβάθμιση θερμοκρασίας κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δείγμα για αντίδραση σε 54-62°C και σε συγκεντρώσεις Mg²⁺ 1,5 mM και 2mM. Οι συνθήκες που προδιόρισθηκαν για την υβριδοποίηση των εκκινητών παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 6: Συνθήκες PCR για κάθε εξόνιο

εξόνιο	συνθήκες PCR	συγκέντρωση MgCl ₂
5+6	95°C για 5 min 95°C για 45 sec 62°C για 45 sec 72°C για 45 sec 72°C για 10 min hold 4°C	2 mM

2.5 Έλεγχος της PCR



Εικόνα 13: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Για να ελεγχθεί αν η PCR ενίσχυσε το αναμενόμενο τμήμα DNA και όχι κάποιο άλλο, διεξάχθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για το διαχωρισμό των προϊόντων με βάση το μέγεθος. Αυτό επιτυγχάνεται με την κίνηση αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊκών οξέων μέσω ενός πηκτώματος αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια μεταναστεύουν πιο γρήγορα σε σχέση με τα πιο μεγάλα. Το μέγεθος των προϊόντων PCR καθορίστηκε μέσω σύγκρισης με ένα δείκτη μοριακού βάρους (DNA ladder), ο οποίος περιέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους και τρέχει στο πήκτωμα, παράλληλα με τα προϊόντα της PCR.

Υλικά:

- αγαρόζη (0,75 gr/50ml TAE)
Τα πιο πολλά πηκτώματα περιέχουν 0,7% (καλός διαχωρισμός τμημάτων 5-10 kb) έως 2% (καλός διαχωρισμός μικρών τμημάτων μεγέθους 0,2-1kb) αγαρόζη η οποία διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Ρυθμιστικό διάλυμα - TAE 1.0X pH 8.0
Υπάρχει ποικιλία buffers που χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη. Τα πιο κοινά είναι Tris/Acetate/EDTA (TAE), Tris/Borate/EDTA (TBE). Το TAE έχει τη μικρότερη ρυθμιστική ικανότητα αλλά παρέχει καλύτερη ανάλυση για μεγαλύτερα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει χαμηλότερη τάση και περισσότερος χρόνος αλλά καλύτερο προϊόν.
- Ζυγός ακριβείας
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ηλεκτροφορητική συσκευή (Εικόνα 13)
- Loading buffer (μπλε της βρωμοφαινόλης) 3μl/δείγμα
Το loading buffer είναι ορατό στο φως και μεταναστεύει μαζί με το DNA. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι από τα πιο κοινά και κινείται με την ίδια ταχύτητα με τμήματα DNA που έχουν μέγεθος 300 ζεύγη βάσεων περίπου.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr-UV φθορίζουσα χρωστική) 2μl/50 ml TAE

- Πιατάκι για πήκτωμα
- Ταινία
- Χτενάκια
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή

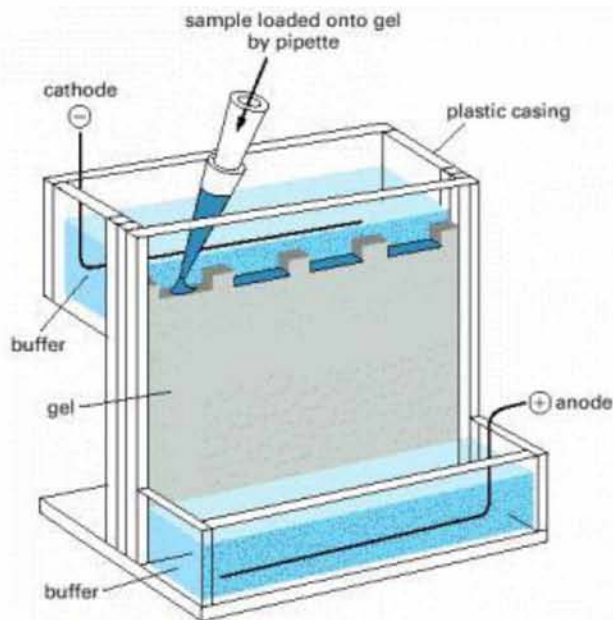
Για την κατασκευή του πήκτωματος ηλεκτροφόρησης καθώς και για το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε 1x TAE το οποίο παρασκευάστηκε με αραιώση 20 ml TAE 50x (121 gr Tris base, 28,5 ml οξικό οξύ, 50 ml EDTA 0,5 M σε τελικό όγκο 500 ml) σε 980 ml ddH₂O.

Ζυγίστηκε 0,5 gr αγαρόζης και προστέθηκε σε κωνική φιάλη η οποία περιείχε 50 ml διαλύματος TAE 1x. Το μίγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη να διαλυθεί καλά. Ανά μερικά δευτερόλεπτα η κωνική αναδεύεται. Μετά την απομάκρυνση από το φούρνο μικροκυμάτων προστέθηκαν 2 ml βρωμιούχου αιθιδίου με ταυτόχρονη ανάδευση της κωνικής. Το διάλυμα αποχύθηκε σε ειδικό καλούπι του οποίου οι άκρες σφραγίστηκαν με ταινία ώστε να σχηματιστεί το πήκτωμα και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν τα χτενάκια που σχημάτισαν τα πηγάδια. Το πήκτωμα αφέθηκε να σταθεροποιηθεί για περίπου 20 λεπτά. Αφού στέγνωσε το πήκτωμα αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και η ταινία από το καλούπι και τοποθετήθηκαν μαζί με το πήκτωμα στο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε TAE 1x. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για τοποθέτηση στις θέσεις του gel αναμειχθηκαν 5μl από το προϊόν PCR με 2 μl loading buffer και τοποθετήθηκαν διαδοχικά στις θέσεις του πήκτωματος που σχημάτισαν τα χτενάκια αλλάζοντας tip ανάμεσα σε κάθε δείγμα. Υπάρχει δυνατότητα τοποθέτησης μέχρι και 22 δειγμάτων. Στην πρώτη θέση τοποθετήθηκαν 5μl DNA Ladder BstU. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 150 V και αφέθηκε για ηλεκτροφόρηση μέχρι η χρωστική να διανύσει τα 2/3 της απόστασης του πήκτωματος για περίπου 25 λεπτά. Το πήκτωμα αφαιρέθηκε από το ρυθμιστικό διάλυμα και μεταφέρθηκε σε συσκευή UV όπου παρατηρήθηκε η ύπαρξη ή η απουσία ανιχνεύσιμης ποσότητας προϊόντος PCR.

Η πιο κοινή χρωστική ηλεκτροφόρησης είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Φθορίζει κόκκινο-πορτοκαλί κάτω από ακτινοβολία UV στην ύπαρξη προϊόντος PCR καθώς ενσωματώνεται στο DNA. Τρέχοντας DNA μέσα από ένα gel και μετά από παρατήρηση σε UV φως, κάθε μπάντα που περιέχει πάνω από 20 ng DNA γίνεται διακριτή. Το EtBr είναι γνωστό μεταλλαξιγόνο γι' αυτό είναι διαθέσιμες και άλλες εναλλακτικές.⁷⁵

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτίστηκε με μια συσκευή ακτινοβολίας UV για την παρατήρηση της ύπαρξης ή απουσίας ζωνών. Εκτός από την παρουσία ή απουσία προϊόντος ανιχνεύθηκε και η ύπαρξη παραπροϊόντος ή επιμόλυνσης.

2.6 Η μέθοδος SSCP- Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας



Εικόνα 14: Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Τα δείγματα που ενισχύθηκαν υποβλήθηκαν στην ανάλυση SSCP (Εικόνα 14) που βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων ακόμα και με ελάχιστες διαφορές στην αλληλουχία (συνήθως σε μόνο μία βάση) που οδηγούν σε διαφορετική δευτεροταγή δομή και μια συγκρίσιμη διαφορά στην κινητικότητα κατά μήκος μιας πηκτής.

Η κινητικότητα του δίκλωνου DNA στην ηλεκτροφόρηση εξαρτάται από το μέγεθος και το μήκος της αλυσίδας αλλά είναι σχετικά ανεξάρτητη από τη συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Η κινητικότητα μονόκλωνων αλυσίδων παρόλα αυτά, επηρεάζεται σημαντικά από μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο από πολλές εκατοντάδες. Οι μικρές αλλαγές είναι παρατηρήσιμες λόγω της σχετικά ασταθούς κατάστασης του μονόκλωνου DNA. Στην απουσία μίας συμπληρωματικής αλυσίδας η μονόκλωνη αλυσίδα αναδιπλώνεται σχηματίζοντας εσωτερικά ζεύγη βάσεων που οδηγούν σε θηλιές και πτυχώσεις που προσδίδουν στη μονόκλωνη αλυσίδα μια μοναδική τρισδιάστατη δομή ανεξάρτητα του μήκους της. Είναι οικονομική και ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση της γενετικής ποικιλότητας. Έχει την ικανότητα να ανιχνεύει μεταλλάξεις σε πολλαπλές θέσεις αλλά συνήθως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε ένα γενετικό τόπο στην διάγνωση ασθενειών. Κάτω από βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική SSCP είναι σε θέση να ανιχνεύσει το 80 με 90% των πιθανών μεταλλάξεων στην αλληλουχία.⁷⁴

Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της τεχνικής και θα πρέπει να ελέγχονται. Η κινητικότητα των μονόκλωνων αλυσίδων DNA εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει να διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία. Επιπλέον, η ευαισθησία

του SSCP εξαρτάται από το pH. Τα δίκλιωνα μόρια DNA συνήθως αποδιατάσσονται σε βασικές συνθήκες και αυξημένο pH. Η προσθήκη γλυκερόλης στο πήκτωμα ακρυλαμίδης χαμηλώνει το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης-συγκεκριμένα του TBE και το αποτέλεσμα είναι αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου και πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα το μέγεθος των τμημάτων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 150-300bp.⁷⁶

2.6.1 Παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης

Υλικά

- ζυγός
- ακρυλαμίδη
- Bis-ακρυλαμίδη
- γλυκερόλη 50%
- TBE 10X
- APS (Ammonium Persulfate) 20%
- TEMED (Tetramethylethylenediamine)
- κωνική φιάλη
- ποτήρι ζέσεως
- ογκομετρικός κύλινδρος
- φίλτρο
- μαγνήτης
- ηλεκτροφορητική συσκευή

Πριν την προετοιμασία του διαλύματος τοποθετήθηκαν τα τζάμια τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με τη χρήση spacers 2 χιλιοστών τα οποία προηγουμένως επικαλύφθηκαν με μικρή ποσότητα βαζελίνης και προσαρμόστηκαν σε ειδική συσκευή.

Για την προετοιμασία του πηκτώματος ακρυλαμίδης πυκνότητας 10% , ζυγίστηκαν 6,25 gr ακρυλαμίδης , 0,16 gr bis-ακρυλαμίδης και αναμειχθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Τοποθετήθηκε για ανάδευση ενώ προστέθηκαν παράλληλα 6,5 ml γλυκερόλη 50% και 5ml TBE 10x με μικρό ογκομετρικό κύλινδρο. Αφού αφέθηκε για ομογενοποίηση διηθήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώθηκε νερό μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 62,5ml. Το διήθημα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και προστέθηκαν 62,5 μl TEMED και 325 μl APS 20%. Το περιεχόμενο της κωνικής αναδεύθηκε με γρήγορες κινήσεις και αποχύθηκε ανάμεσα στα τζάμια. Τοποθετήθηκαν κατάλληλα χτενάκια 20 ή 15 θέσεων που σχημάτισαν τα «πηγαδάκια» του πηκτώματος. Το διάλυμα αφέθηκε για περίπου μισή ώρα να πήξει. Όσο αναμέναμε να πήξει, προετοιμάστηκαν τα δείγματα που τοποθετήθηκαν στο πήκτωμα. Μέσα σε νέα erpendorfs 1,5 ml προστέθηκαν 5 μl από το προϊόν PCR και 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος για SSCP. Η χρωστική αυτή βοηθάει το DNA να αποκτήσει βάρος ώστε να παραμείνει στη βάση του πηγαδιού. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο έως ότου το πήκτωμα να στερεοποιηθεί.

Μόλις το διάλυμα έπηξε τα τζάμια απομακρύνθηκαν από την υποστηρικτική συσκευή, αφαιρέθηκαν τα χτενάκια και καθαρίστηκαν τα πηγάδια για να απομακρυνθούν τα υπολείματα ακρυλαμίδης. Τα τζάμια στερεώθηκαν στη συσκευή και συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x.

Τα δείγματα που διατηρήθηκαν στο ψυγείο τοποθετήθηκαν για αποδιάταξη ώστε να αποδιαταχθούν οι κλώνοι μεταξύ τους και να έχω τελικά μονόκλιωνα μόρια DNA. Η αποδιάταξη ακολούθησε το εξής πρότυπο θερμοκρασιών: 95°C για 2 min, 97°C για 2 min και 99°C για 7 min. Η αποδιάταξη διήρκησε 5 min στους 99°C ώστε να έχει διαχωριστεί το μεγαλύτερο ποσοστό των κλώνων και τα δείγματα τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο για να μην επαναυβριδοποιηθούν οι κλώνοι. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν ξεπλένοντας το tip ανάμεσα τους και αλλάζοντας tip ανάμεσα στα δείγματα ελέγχου - ασθενών. Η συσκευή ρυθμίστηκε στα 230 V και το πήκτωμα αφέθηκε να τρέξει για περίπου 21 ώρες.

2.7 Χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Για να είναι ανιχνεύσιμο το πρότυπο των ζωνών πρέπει η πηκτή να βαφτεί με νιτρικό άργυρο. Ο νιτρικός άργυρος δεσμεύεται στο DNA και αντιδρώντας με φορμαλδεύδη, παρουσία βάσης, οι ζώνες βάφονται σκούρο καφέ, ενώ αντίθετα το φόντο παραμένει κίτρινο.⁷⁷ Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρέθηκαν τα τζάμια από τη συσκευή και διαχωρίστηκαν μεταξύ τους. Το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη και τοποθετήθηκε στον αναδευτήρα.

Η συνολική διαδικασία αποτελείται από τρία στάδια:

- Προετοιμασία του πρώτου διαλύματος για τη χρώση:
Μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 10 ml αιθανόλη 100%, 0,5 ml οξικό οξύ και τέλος ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 400 ml. Ρίχθηκαν στο πήκτωμα τα 200 ml και επώαστηκε για 3min, έπειτα αφαιρέθηκε το υγρό και προστέθηκαν τα υπόλοιπα 200 ml για άλλα 3min. Ξεπλύθηκε μία φορά με ddH₂O για 1 min.
- Προετοιμασία του δεύτερου διαλύματος για τη χρώση:
Σε ογκομετρικό κύλινδρο διαλύθηκαν 0,2 gr νιτρικού αργύρου σε 200ml ddH₂O. Στη συνέχεια ρίχθηκε το διάλυμα στο πήκτωμα για επώαση για 15min. Ξεπλύθηκε 2 φορές με ddH₂O για 1min.
- Τέλος παρασκευάστηκε και το τρίτο διάλυμα:
Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200 ml ddH₂O. Ζυγίστηκαν 3 gr NaOH και 0,01 gr NaBH₄, τοποθετήθηκαν στο ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε 1ml φορμαλδεύδη. Το διάλυμα μεταφέρθηκε στο πήκτωμα και αφέθηκε για επώαση. Το υγρό αφαιρέθηκε όταν το πήκτωμα είχε βαφτεί στον επιθυμητό βαθμό. Ξεπλύθηκε 2 φορές με ddH₂O για 1min. Αφαιρέθηκε από το πήκτωμα η περίσσεια υγρού και τοποθετήθηκε ανάμεσα σε ναύλον μεμβράνη.

2.8 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο στην SSCP συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν εκ νέου σε PCR με τελικό όγκο 50μl. 7μl από το προϊόν PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,5% η οποία παρατηρήθηκε σε UV για να διαπιστωθεί εάν το επιθυμητό τμήμα ενισχύθηκε. Στη συνέχεια το προϊόν που απέμεινε καθαρίστηκε με kit της Invitrogen για ανάκτηση καθαρού PCR προϊόντος. Ο καθαρισμός έγινε με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.8.1 Κατακρήμιση του καθαρού προϊόντος

Υλικά:

- παγωμένη αιθανόλη 70%
- CH₃COONa (sodium acetate) 3M
- φυγόκεντρος
- φούρνος επώασης

Το καθαρό προϊόν υποβλήθηκε σε κατακρήμιση με προσθήκη 300 μl παγωμένης αιθανόλης 100% και 10 μl CH₃COONa 3M. Η αιθανόλη είναι πολύ λιγότερο πολική σε σχέση με το νερό, επομένως αν γίνει προσθήκη αρκετής, η έλξη μεταξύ DNA και κατιόντων που περιέχονται στο διάλυμα γίνεται αρκετά ισχυρή ώστε να σχηματίσει σταθερούς ιονικούς δεσμούς με αποτέλεσμα το DNA να κατακρυμνίζεται.⁷⁸ Το CH₃COONa είναι νιτρικό άλας του οξικού οξέος. Διευκολύνει την κατακρήμιση του DNA προσφέροντας τα ιόντα που χρειάζονται για να αλληλεπιδράσουν με το DNA παρεμποδίζοντας τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών.⁷⁹

Τα eppendorfs αναδεύθηκαν ελαφρά για να εξαφανιστούν οι υφές και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C για 20 λεπτά διότι η χρήση του DNA που περιείχαν ήταν άμεση. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 25 min, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και αφέθηκαν στο φούρνο για ξήρανση. Τα δείγματα μαζί με τους εκκινητές C= 20 pmol/μl που τα συνόδευαν αποστάληκαν για αλληλούχηση.

2.9 Επεργασία αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων που στάλθηκαν προς αλληλούχηση επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής BioEdit. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν υπό μορφή ηλεκτροφοροεγράμματος με έγχρωμα “peaks” που αντιστοιχήθηκαν στα γράμματα της αλληλουχίας.^{74,80} Στη συνέχεια οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν μεταξύ τους για τον εντοπισμό των διαφορών με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ClustalW2.

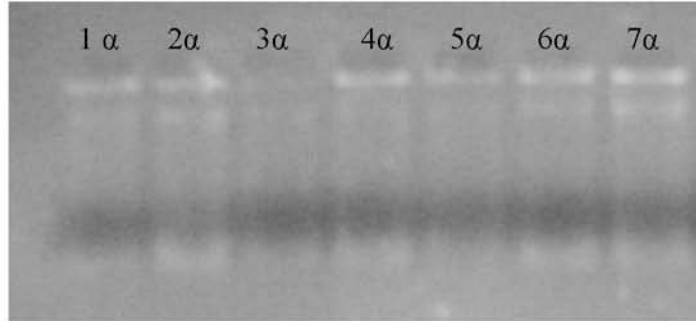
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προέλευση δειγμάτων ομάδων ελέγχου - ασθενών

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 30 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα από τη Βόρεια Ελλάδα και τη Θεσσαλία, και 30 εθελοντές υγιείς δότες οι οποίοι εφόσον πληρούσαν τις προϋποθέσεις απουσίας άλλου νοσήματος συμμετείχαν στη μελέτη ανώνυμα έπειτα από έγγραφη συγκατάθεση. Στόχος της εργασίας ήταν ο εντοπισμός της πιθανής ύπαρξης πολυμορφισμών στο γονίδιο της γελσολίνης με εστίαση στα εξόνια 5 και 6 του γονιδίου και στόχο τη συσχέτισή τους με την παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας στον ελληνικό πληθυσμό.

3.2 Απομόνωση DNA

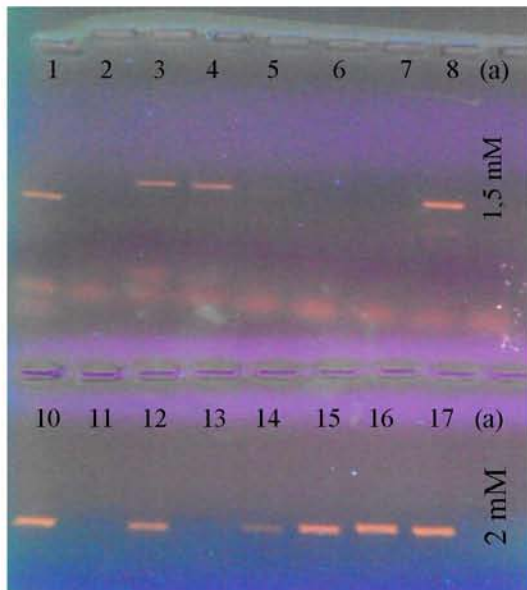
Αρχικά έγινε απομόνωση του DNA 30 δειγμάτων ελέγχου (Εικόνα 15). Το DNA από τα δείγματα των ασθενών ήταν ήδη απομονωμένο. Στη συνέχεια ακολούθησε φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% για να εκτιμηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του DNA που απέδωσε το πρωτόκολλο.



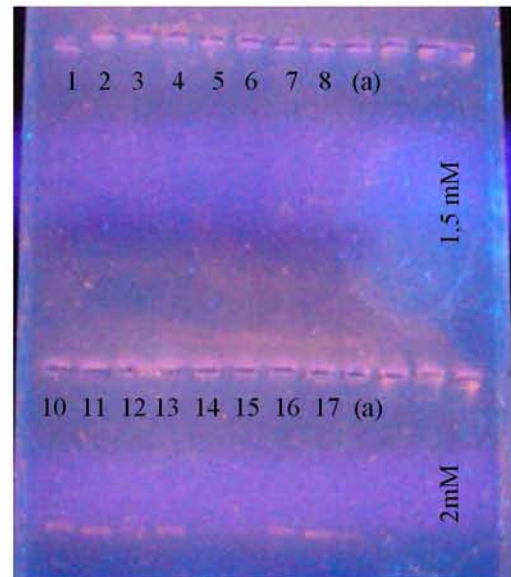
Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση της απομόνωσης των δειγμάτων ελέγχου 1α – 7α

3.3 PCR

Ακολούθησε PCR με διαβάθμιση θερμοκρασιών 54 – 62°C (θέσεις 1-8, 10-17 στο πήκτωμα) σε δοκιμαστικό δείγμα με στόχο να προσδιοριστούν οι συνθήκες ενίσχυσης κάθε εξονίου:



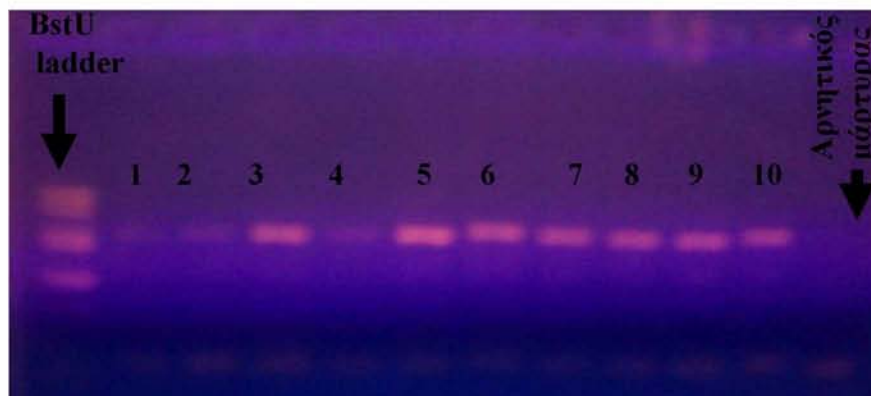
Εικόνα 16: PCR διαβάθμισης θερμοκρασιών για το εξόνιο 5



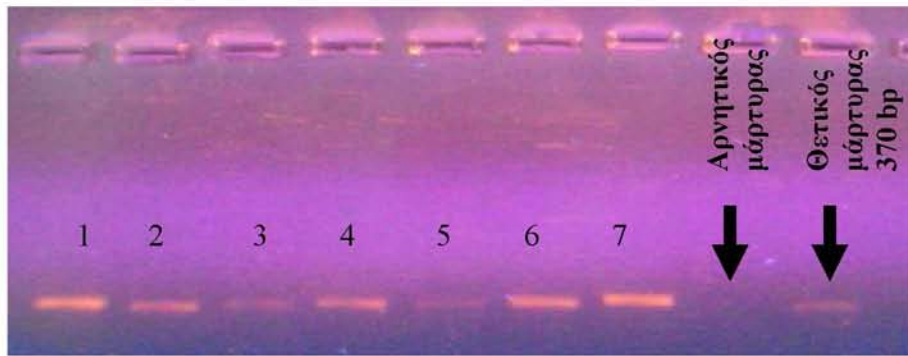
Εικόνα 17: PCR διαβάθμισης θερμοκρασιών για το εξόνιο 6

Επιλέχθηκαν οι συνθήκες 62°C και $C_{MgCl_2} = 2 \text{ mM}$ και για τα δύο εξόνια

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με τους εκκινητές που επιλέξαμε (Πίνακας 4) :



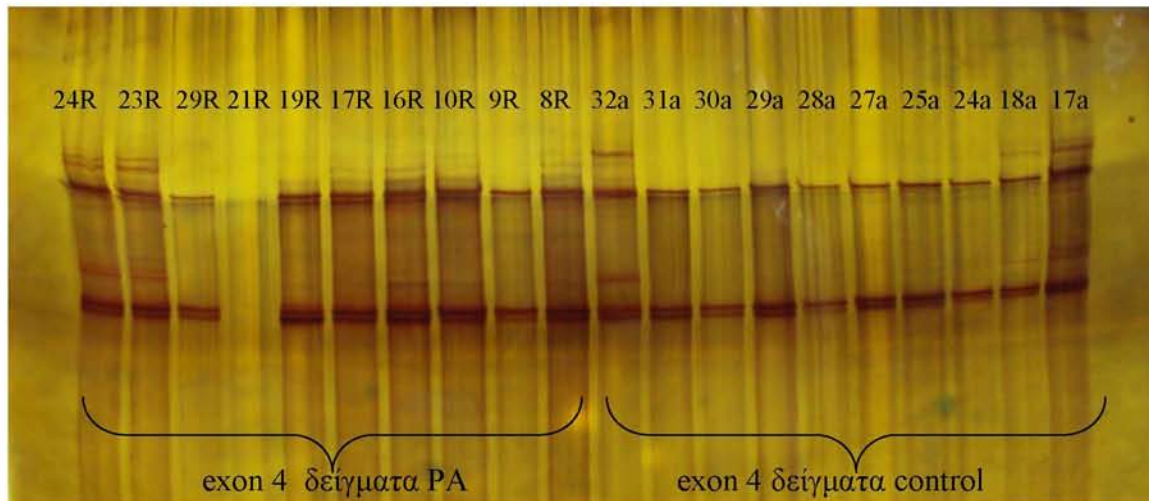
Εικόνα 18: Προϊόντα PCR εξονίου 6, 310bp, 1-10: δείγματα ασθενών. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε είναι BlueScript που κόπηκε με BstU. Κάθε ζώνη του μάρτυρα μοριακού βάρους αντιστοιχεί στα ακόλουθα μεγέθη: 1^η ζώνη: 581bp, 493bp, 2^η ζώνη: 376bp, 332bp, 330bp, 3^η ζώνη: 206 bp, 200bp, 4^η ζώνη: 166bp, 131bp. Τα προϊόντα PCR του εξονίου 3 φαίνονται στις 310 bp κάτω από την 3^η ζώνη του μάρτυρα.



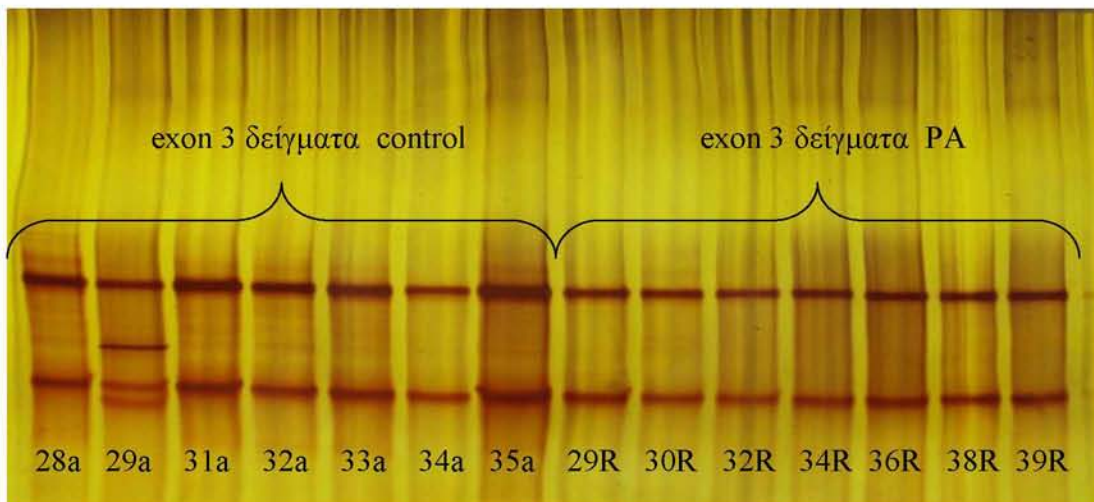
Εικόνα 19: Προϊόντα PCR του εξονίου 5, με τους αριθμούς 1-7 σημειώνονται τα δείγματα των ασθενών. Στη θέση 8 τοποθετήθηκε ο αρνητικός έλεγχος ενώ στη θέση 9 ένας θετικός μάρτυρας 370bp για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA

3.4 Ανάλυση προτύπων σε gel ακρυλαμίδης 10%

Τα προϊόντα PCR των δειγμάτων που ενισχύθηκαν υποβλήθηκαν σε SSCP ανάλυση με στόχο την παρατήρηση του προτύπου βάσει διαφορών στην αλληλουχία. Τα δείγματα αφέθηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% για περίπου 21 ώρες (Εικόνα 20, 21).

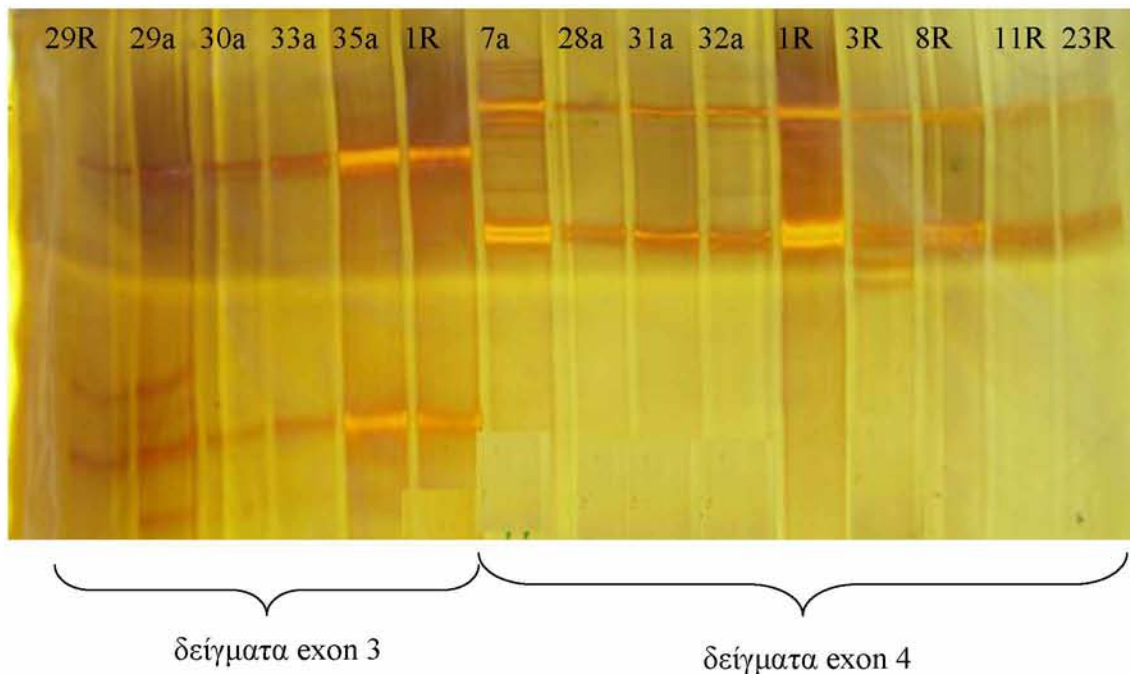


Εικόνα 20 : Πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% όπου φαίνονται τα πρότυπα των δειγμάτων του εξονίου 6. Τα δείγματα 24R, 23R, 32a, 18a και 17a εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο τεσσάρων ζωνών και φαίνεται πως είναι ετερόζυγα για αυτό αλληλόμορφο. Τα υπόλοιπα άτομα εμφανίζουν μόνο 2 ζώνες και είναι ομόζυγα ως προς το επικρατέστερο αλληλόμορφο



Εικόνα 21: Πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% όπου παρουσιάζονται τα πρότυπα των ζωνών που έδωσαν κάποια από τα δείγματα του εξονίου 5. Το δείγμα 29α εμφανίζει πρότυπο 4 ζωνών που υποδηλώνει ότι είναι ετερόζυγο για αυτό το αλληλόμορφο. Τα υπόλοιπα άτομα εμφανίζουν πρότυπο με δύο μόνο ζώνες και προφανώς είναι ομόζυγα για το επικρατέστερο αλληλόμορφο.

Μετά τη χρώση με νιτρικό άργυρο τα πρότυπα που επιλέχθηκαν για αλληλούχηση παρουσιάζονται στο παρακάτω συγκριτικό πήκτωμα (Εικόνα 22):



Εικόνα 22: Συγκριτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% με βάση το οποίο επιλέχθηκαν τα πρότυπα προς αλληλούχηση. Από το συγκριτικό πήκτωμα επιλέχθηκαν για αλληλούχηση τα δείγματα 1R, 29α, 29R του εξονίου 3 και τα δείγματα 28α, 31α, 3R, 7α του εξονίου 6. Τα

δείγματα αυτά επιλέχθηκαν βάσει των διαφορετικών ζωνών που εμφάνισαν στην SSCP ανάλυση στο συγκριτικό πήκτωμα.

3.5 Αποτελέσματα αλληλούχησης για το εξόνιο 5

Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος BioEdit (Εικόνες 24,25) και υποβλήθηκαν σε ομοπαράθεση με το πρόγραμμα ClustalW2 (Εικόνα 23). Το δείγμα 29α με βάση την αλληλούχηση βρέθηκε να είναι όντως πολυμορφικό όπως φαίνεται και από την ακόλουθη στοίχιση των αλληλουχιών.

```

29a-GsnExon3 -----TCCTCCTCCACCTCCTCTCCTCAGGGTCTGGGATACTTCTGGAAAG 48
29R-GsnExon3 TAGTGCTGGGGTTCCCTCCTCCACCTCCTCTCCTCAGGGTCTGGGATACTTCTGGAAAG 60
*****

29a-GsnExon3 CCAGGCTCATATTGCTCTGATGTCCCGTAGGCAATGAGTGCAGCCAGGATGAGAGCGGGG 108
29R-GsnExon3 CCAGGCTCATATTGCTCTGATGTCCCGTAGGCAATGAGTGCAGCCAGGATGAGAGCGGGG 120
*****

29a-GsnExon3 CGGCCNCCATCTTTACCGTGCAGCTGGATGACTACCTGAACGGCCGGGCCGTGCAGCACC 168
29R-GsnExon3 CGGCCGCCATCTTTACCGTGCAGCTGGATGACTACCTGAACGGCCGGGCCGTGCAGCACC 180
*****

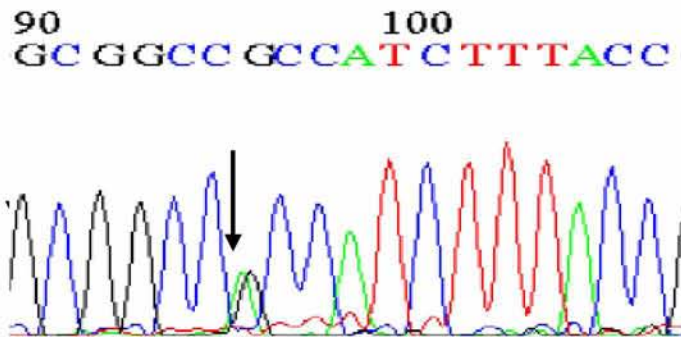
29a-GsnExon3 GTGAGGTCCAGGGCTTCGAGTCGGCCACCTTCCTAGGCTACTTCAAGTCTGGCCTGAAGT 228
29R-GsnExon3 GTGAGGTCCAGGGCTTCGAGTCGGCCACCTTCCTAGGCTACTTCAAGTCTGGCCTGAAGT 240
*****

29a-GsnExon3 ACAAGGTGGGTTGGGCCCCACCTTGCTTGAGCGGTAGGGACAGATGCACCAGTAACAGGG 288
29R-GsnExon3 ACAAGGTGGGTTGGGCCCCACCTTGCTTGAGCGGTAGGGACAGATGCACCAGTAACAGGG 300
*****

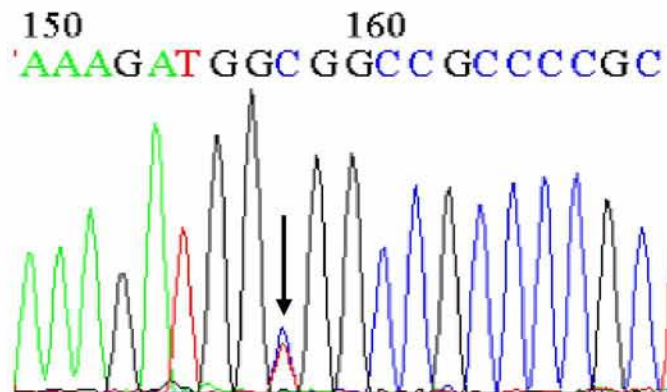
29a-GsnExon3 CTCACTCAGGCA 296
29R-GsnExon3 CTCACTCAGGCA 312
*****

```

Εικόνα 23: Στοίχιση και σύγκριση των αλληλουχιών του εξονίου 5 που αλληλουχήθηκαν. Ο πολυμορφισμός σημειώνεται με κίτρινο και αντιστοιχεί σε G ή A ($N = G$ ή A). Η αλληλούχηση έδειξε ότι δείγμα 1R δεν είχε καμία διαφορά με το 29R. Με στερίσκο σημειώνονται τα νουκλεοτίδια που είναι όμοια και στις δύο αλληλουχίες. Με υπογράμμιση φαίνονται ο forward (επάνω) και ο reverse (κάτω) εκκινήτες.



Εικόνα 24: Ανάγνωση της αλληλουχίας με τον **forward** εκκινητή
Με βέλος υποδεικνύεται η ετεροζυγωτία (G ή A)



Εικόνα 25: Ανάγνωση της αλληλουχίας με τον **reverse** εκκινητή.
Με βέλος υποδεικνύεται η ετεροζυγωτία

Το δείγμα 19α ήταν το μοναδικό που εμφάνισε το ίδιο πρότυπο με το 29α στην ανάλυση SSCP. Επομένως τα δείγματα που εμφάνισαν πολυμορφισμό ήταν 2 στα 60.

Η αλληλουχία του εξονίου 5 εμφανίζεται με κόκκινο:

```

agtgacgctg aggaacggaa atctgcagta tgacctccac tactggctgg gcaatgagtg
cagccaggat gagagcgggg cggccgcat ctttaccgtg cagctggatg actacctgaa
cggccgggcc gtgcagcacc gtgaggtcca gggettccgag tcggccacct tcctaggcta
cttcaagtct ggcctgaagt acaagaaagg aggtgtggca tcaggattca agcacgtggt

```

Η βάση που διαφοροποιείται σε G ή A εντοπίζεται στη θέση 34845 (G34845A) στην αλληλουχία της γελσολίνης στο γονιδίωμα (NC_000009.11). Η βάση G αντιστοιχεί στην πρώτη θέση του κωδικονίου GCC που κωδικοποιεί για αλανίνη, εναλλακτικά η βάση A αντιστοιχεί στην πρώτη θέση του κωδικονίου ACC που κωδικοποιεί για θρεονίνη. Έτσι γίνεται αντικατάσταση της αλανίνης (A), ενός υδρόφοβου αμινοξέος από τη θρεονίνη (T), ένα πολικό αμινοξύ.

Το τμήμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από την αλληλουχία του εξονίου 5 αποτελείται από την παρακάτω αμινοξική ακολουθία και το αμινοξύ που αντικαθίσταται λόγω της αλλαγής G→A σημειώνεται με κίτρινο:

GNECSQDESGAAAI FTVQLDDYLNGRAVQHREVVQGFESATFLGYFKSGLKYK
 GNECSQDESGAATI FTVQLDDYLNGRAVQHREVVQGFESATFLGYFKSGLKYK

Το αμινοξικό κατάλοιπο που αντικαθίσταται εντοπίζεται στη θέση 102 της ώριμης πρωτεΐνης (NP_000168.1) και ανήκει στην καταλυτική περιοχή G1.

3.6 Αποτελέσματα αλληλούχησης για το εξόνιο 6

Οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος BioEdit (Εικόνα 27) και υποβλήθηκαν σε ομοπαράθεση με το πρόγραμμα ClustalW2(Εικόνα 26). Με βάση την αλληλούχηση το δείγμα 3α βρέθηκε να είναι πολυμορφικό όπως φαίνεται και από τη στοίχιση των αλληλουχιών:

```

31a-GsnExon4   TGAATTCCTTTACCTCAATCTGTCCCCTTCTTCCATATCTGCTTCCCTGGGCCTTCTC 60
3R-GsnExon4   -----CCTCAATCTGTCCCCTTCTTCCATATCTGCTTCCCTGGGCCTTCTC 47
                *****

31a-GsnExon4   CCCTGGGCTAATGCTGTCTCTTTGGCCCCACAGAAAGGAGGTGTGGCATCAGGATCAAG 119
3R-GsnExon4   CCCTGGGCTAATGCTGTCTCTTTGGCCCCACAGAAAGGAGGTGTGGCATCAGGATCAAG 107
                *****

31a-GsnExon4   CACGTGGTACCCAACGAGGTGGTGGTGCAGAGACTCTTCCAGGTCAAAGGGCGGCGTGTG 179
3R-GsnExon4   CACGTGGTACCCAACGAGGTGGTGGTGCAGAGACTCTTCCAGGTCAAAGGGCGGCGTGTG 167
                *****

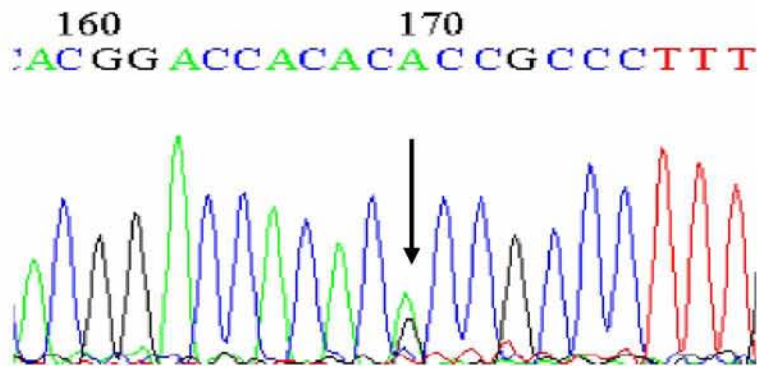
31a-GsnExon4   GTCCGTGCCACCGAGGTACCTGTGTCTTGGGAGAGCTTCAACAATGGCGACTGCTTCATC 239
3R-GsnExon4   GTCCGTGCCACCGAGGTACCTGTGTCTTGGGAGAGCTTCAACAATGGCGACTGCTTCATC 227
                *****

31a-GsnExon4   CTGGACCTGGGCAACGTGAGTCCTGCTTTCTCTTTCCCAGGAGCCACTGAGGTGCTCCT 299
3R-GsnExon4   CTGGACCTGGGCAACGTGAGTCCTGCTTTCTCTTTCCCAGGAGCCACTGAGGTGCTCCT 287
                *****

31a-GsnExon4   GGTCTGACCAGGGACTTGGGTACATCCACGTGAACAAATGCATAGATGCAGGTGGGCAA 359
3R-GsnExon4   GGTCTGACCAGGGACTTGGGTAC----- 310
                *****
  
```


Εικόνα 26: Στοιχισμός και σύγκριση των αλληλουχιών του εξονίου 4 που αλληλουχήθηκαν. Ο πολυμορφισμός σημειώνεται με κίτρινο και αντιστοιχεί σε C ή T (N = C ή T). Με βάση την αλληλούχηση τα δείγματα 28α, 7α δεν είχαν καμία διαφορά στην αλληλουχία σε σχέση με το 31α γι' αυτό και δεν παροσιάζονται στην εικόνα. Με υπογράμμιση φαίνονται ο *forward* (πάνω) και *reverse* (κάτω) εκκινητές.

Η αλληλουχία με τον *forward* εκκινητή δεν ήταν καλής ποιότητας επομένως βασιστήκαμε στον *reverse* εκκινητή για την ανάγνωσή της.



Εικόνα 27: Ανάγνωση της αλληλουχίας με τον *reverse* εκκινητή. Με βέλος υποδεικνύεται η ετεροζυγωτία (C ή T)

Τα δείγματα που εμφάνισαν πολυμορφισμό είναι 1 στα 60 καθώς το μοναδικό δείγμα που εμφάνισε πολυμορφισμό ήταν του ασθενούς με τον κωδικό 3R. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός παρατηρήσαμε πως δεν είναι καταχωρημένος σε κάποια βάση δεδομένων και συναντάται 1^η φορά.

Η αλληλουχία του εξονίου 6 σημειώνεται με κόκκινο:

cttcaagtct ggcctgaagt acaagaaagg aggtgtggca tcaggattca agcacgtggc
 acccaacgag gtggtggtgc agagactctt ccagggtcaaa gggcggcgtg tggtcctgtc
 caccgaggta cctgtgtcct gggagagctt caacaatggc gactgcttca tcctggacct
 gggcaacaac atccaccagt ggtgtggttc caacagcaat cggtatgaaa gactgaaggc

Η βάση που διαφοροποιείται σε C ή T εντοπίζεται στη θέση 42612 (C42612T) της γελσολίνης στο γονιδίωμα (NC_000009.11). Η βάση C αντιστοιχεί στην πρώτη θέση του κωδικονίου CGU που κωδικοποιεί για αργινίνη, εναλλακτικά η βάση T αντιστοιχεί στην πρώτη θέση του κωδικονίου UGU που κωδικοποιεί για κυστεΐνη. Έχουμε αντικατάσταση της αργινίνης (R), ενός θετικά φορτισμένου και πολικού αμινοξέος από κυστεΐνη (C), ένα μη πολικό, ουδέτερο αμινοξύ.

Το τμήμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από την αλληλουχία του εξονίου 4 αποτελείται από την ακόλουθη αμινοξική ακολουθία και το αμινοξύ που αντικαθίσταται λόγω της αλλαγής C→T σημειώνεται με κίτρινο:

KGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPPVSWESFNNGDCFILDNLGN
KGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRCVVRATEVPPVSWESFNNGDCFILDNLGN

Το αμινοξικό κατάλοιπο που αντικαθίσταται εντοπίζεται στη θέση 169 της ώριμης πρωτεΐνης (NP_000168.1) και ανήκει στην καταλυτική περιοχή G2 της γελσολίνης.

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPN**SMVVEHPEFLKAGKEPGLQI**
WRVEKFDLVPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLRNGNLQYDLHYWLGN**EC**SQDESGAA**I**FTVQLDDYLN
GRAVQHRENVQGFESATFLGYFKSGLKYK**KGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGR**VVRATEVPPVSWESF
NNGDCFILDNLGN**NIHQWCGSNSNRYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEEGTEPEAMLQVLGPKPAL**
PAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGTMSVSLVADENPF**AQ**GALKSEDCFILDHGKDGKI**FVWK**GQA
NTEERKAALKTASDFITKMDY**PKQTQ**VSVLPEGGETPLFKQFFKNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERV
PFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDG**TGQKQ**I**WRI**EGSNKVPVDPATY**GQFYGGDSYIILYN**YRHGGRQ**GQII**
YNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQ**SRV**Q**GKEPAH**LSLFGGK**PMI**IYKGGTSREGGQTAP
ASTRL**FQVRANSAGATRAVE**VLPKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVGTGASEAEKTGAQELLRVLRAQPV
QVAEGSE**PDGFWEALGGKAAYRTSPRLKDKKMDAHP**PRL**FAC**SNKI**GRFVI**EEVPGELMQEDLATDDV**ML**
LDTWDQ**VFVWVGKDSQ**EE**EKTEAL**TS**AKRYI**ETDPANRDRRTPITVVKQGFEP**PSFVGW**FLGWDDDYWSV
DPLDRAMAELAA

Εικόνα 28: Αμινοξική ακολουθία της ισομορφής της γελσολίνης με το πληρέστερο μήκος (NP_000168.1). Με κίτρινο φαίνονται τα αμινοξέα που αλλάζουν στο μετάγραφο της γελσολίνης, με μπλε και μαύρο τα εναλλασσόμενα εξόνια ενώ με κόκκινο σημειώνονται τα αμινοξέα που δημιουργούνται από νουκλεοτίδια που συρράπτονται στις θέσεις ματίσματος. Κατά την αρίθμηση των καταλοίπων δεν λαμβάνονται υπόψη τα πρώτα 27 κατάλοιπα τα οποία συνιστούν το πεπτίδιο συνθήματος που απουσιάζει από την ώριμη πρωτεΐνη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που προσβάλλει το 1% του πληθυσμού προκαλώντας σταδιακή παραμόρφωση και απώλεια της λειτουργικότητας των αρθρώσεων μειώνοντας μάλιστα το προσδόκιμο ζωής των ασθενών έως και 10 χρόνια.⁶ Τα τελευταία χρόνια η χρήση των βιολογικών παραγόντων έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, παρόλα αυτά ένα ποσοστό ασθενών γύρω στο 50% δεν έχει την αναμενόμενη ανταπόκριση.^{5,42} Για την κάλυψη των αναγκών των ασθενών αυτών η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων. Οι έρευνες προσανατολίζονται στους αρθρικούς ινοβλάστες, ένα από τους επικρατέστερους τύπους κυττάρων στην άρθρωση, που στη ρευματοειδή αρθρίτιδα φαίνεται να επιδεικνύει φαινότυπο καρκινικού τύπου.⁴⁵ Μια από τις λειτουργίες των αρθρικών ινοβλαστών που φαίνεται να αποδιοργανώνεται είναι η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού.⁵⁰ Υπεύθυνες για τη διαδικασία αυτή είναι οι πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού που προσδίδουν στο κύτταρο νέες διαμορφώσεις ανάλογα με τις ανάγκες του. Ορισμένες από αυτές διαθέτουν πολυμεριστική ενώ άλλες αποπολυμεριστική ιδιότητα.⁵⁶ Η γελσολίνη που κατέχει αποπολυμεριστική δράση ανήκει σε αυτή την κατηγορία των πρωτεϊνών και πρόσφατα έχει αποτελέσει ένα από τους υπό μελέτη παράγοντες που φαίνεται να εμπλέκονται στην ασθένεια. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται στην περιοχή 9q33 η οποία έχει συσχετιστεί με βάση μελέτες προηγούμενων ετών με την εμφάνιση RA.⁵⁴ Την υπόθεση εμπλοκής της γελσολίνης σε αυτή ενισχύει το πειραματικό μοντέλο διασταύρωσης Tg197, h TNF +/- ποντικού με ποντίκι knock out για το γονίδιο της γελσολίνης που δίνει απογόνους με σημαντική επιδείνωση της ασθένειας σε σχέση με τους γονικούς φαινοτύπους.⁵⁰ Η υπόθεση ενισχύεται περαιτέρω από την εύρεση μειωμένων επιπέδων της ισομορφής της γελσολίνης που εντοπίζεται στο πλάσμα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.⁶²

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ταυτοποίηση πολυμορφισμών στον γενετικό τόπο της γελσολίνης, υποψηφίου για συνεισφορά στην παθογένεια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η μελέτη επικεντρώθηκε στις κωδικές περιοχές των εξονίων 3 και 4. Αναλύθηκαν 30 δείγματα υγιών ατόμων και 30 δείγματα ασθενών με την τεχνική SSCP. Στο τέλος του πειραματικού μέρους, τα επιλεγμένα πρότυπα στάλθηκαν προς αλληλούχηση και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός πολυμορφισμού σε κάθε εξόνιο. Στο εξόνιο 3 εντοπίστηκε μια αλλαγή G→A στη θέση 34845 της γενωμικής αλληλουχίας της γελσολίνης. Ο πολυμορφισμός έχει καταταθεί ήδη στη βάση δεδομένων HarMap για SNPs. Οι πληθυσμιακές συχνότητες σύμφωνα με το Har Map με forma Illumina και εμφανίζεται με συχνότητα 1% στους Ευρωπαίους, 0,983 %, στους Eurobans, 0,864% στους Ιάπωνες και 0,844% στους Κινέζους. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του αμινοξέος 102 αλανίνη σε θρεονίνη. Παρατηρούμε ότι ένα υδρόφοβο μη πολικό αμινοξύ αντικαθίσταται από ένα αμινοξύ πολικού χαρακτήρα. Το αμινοξύ που μεταβάλλεται βρίσκεται στη G1 καταλυτική περιοχή⁸¹ του μορίου της γελσολίνης που διαθέτει θέσεις με ικανότητα δέσμευσης Ca²⁺ και μονομερών G-ακτίνης.⁶⁵ Επίσης, η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για τη διαδικασία της διάσπασης των ινιδίων F-ακτίνης σε μόρια μικρότερου μήκους κατά τον αποπολυμερισμό του κυτταροσκελετού.⁶⁵ Αυτή η αμινοξική αλλαγή βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης της ακτίνης. Πολλές από τις αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζει το σύμπλοκο γελσολίνης –ακτίνης εντοπίζονται στην μακριά έλικα που αποτελείται από τα κατάλοιπα 100-113 συμπεριλαμβανομένου του

μοτίβου LDDYL που εμφανίζεται σε πολλές πρωτεΐνες που προσδέουν ακτίνη.⁸¹ Έτσι, η αλλαγή αυτή θα μπορούσε να μειώνει τη συγγένεια της γελσολίνης προς την ακτίνη με αποτέλεσμα να εξασθενεί η αποπολυμεριστική της δράσης στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αντίθετα, ο πολυμερισμός της ακτίνης θα συνεχιζόταν απρόσκοπτα συμβάλλοντας στη διατήρηση των αρθρικών ινοβλαστών (SFs) σε ενεργοποιημένη κατάσταση που στη ρευματοειδή αρθρίτιδα φαίνεται να συνοδεύεται από την εμφάνιση φαινοτύπου που προσομοιάζει εκείνο των καρκινικών κυττάρων.⁴⁵ Η ενεργοποίησή των SFs συμπίπτει με την εμφάνιση νέων χαρακτηριστικών όπως είναι το διεσταλμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, το επιμηκυμένο σχήμα, τα διογκωμένα μιτοχόνδρια με παραμορφωμένες ακρολοφίες,⁵⁰ ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού καθώς και η αντίσταση στα αποπτωτικά σήματα.⁴⁵ Ο χαρακτηρισμός τους ως μετασχηματισμένων κυττάρων ενισχύεται από την παρατήρηση των αλλαγών στο πρότυπο της γονιδιακής τους έκφρασης. Οι αλλαγές αυτές αφορούν ογκογονίδια, πρωτοογκογονίδια, γονίδια που σχετίζονται με την προαγωγή της αγγειογένεσης, γονίδια μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και γονίδια σχετιζόμενα με αυξημένη προσκόλληση στο εξωκυτταρικό δίκτυο (ECM).⁵⁰ Επιπλέον, όπως συμβαίνει και σε μία κακοήγη εξάλλαγή, έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν ανεξέλεγκτα προσβάλλοντας παρακείμενες υγιείς αρθρώσεις.⁴⁵ Εφόσον οι SFs επέλθουν στην ενεργοποιημένη τους κατάσταση είναι σε θέση να τη διατηρούν χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία συνεχούς διέγερσης από το προφλεγμονώδες περιβάλλον.⁴⁵ Οι μεταβολές του κυτταροσκελετού που επάγονται από την αναδιαμόρφωση της ακτίνης είναι ζωτικής σημασίας για όλες αυτές τις διεργασίες του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της προσκόλλησης και της απόπτωσης που απορρυθμίζονται στους SFs επομένως, βασιζόμενοι σε αυτές τις ενδείξεις, υποθέτουμε ότι ίσως κάποιοι γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της γελσολίνης επιφέρουν αξιοσημείωτες αλλαγές στη δομή της οδηγώντας σε αλλαγή της δυναμικής του κυτταροσκελετού προς την κατεύθυνση του υπερπολυμερισμού της ακτίνης με συνέπεια της διατήρηση του ενεργοποιημένου φαινότυπου των SFs.

Στο εξόνιο 4 εντοπίστηκε μια αλλαγή C→T στη θέση 647 της αλληλουχίας της γελσολίνης που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του αμινοξέος 169 αργινίνη σε κυστεΐνη. Παρατηρούμε ότι ένα πολικό αμινοξύ αντικαθίσταται από ένα αμινοξύ μη πολικού, ουδέτερου χαρακτήρα. Το αμινοξύ που μεταβάλλεται βρίσκεται στη G2 καταλυτική περιοχή⁸² του μορίου της γελσολίνης που διαθέτει 2 θέσεις με ικανότητα δέσμευσης ιόντων Ca^{2+} , μία για τη δέσμευση μορίων F-ακτίνης⁶⁵ και δύο περιοχές δέσμευσης 4,5-διφωσφορικών πολυφωσφοϊνοσιτιδίων (PIP_2).⁶⁷ Το αμινοξύ που αλλάζει εντοπίζεται σε μία από τις περιοχές δέσμευσης PIP_2 η οποία απαρτίζεται από τα κατάλοιπα 160-169.⁸² Τα PIP_2 έχει βρεθεί ότι ασκούν ανασταλτική δράση στο μόριο της γελσολίνης αποσταθεροποιώντας τη σύνδεσή της στα διασπασμένα ινίδια ακτίνης, εμποδίζοντας την επικάλυψή τους και επιτρέποντας τον επαναπολυμερισμό τους.⁵⁶ Με τη δέσμευση των PIP_2 η περιοχή αυτή που έχει τη μορφή τυχαίου σπειράματος παίρνει τη μορφή α-έλικας. Καθένα από τα πιθανά σημεία δέσμευσης PIP_2 παρουσιάζει το συντηρημένο μοτίβο KXXXKXXX ή KXXXXKXRR που αποτελείται από μια ακολουθία βασικών καταλοίπων που τοποθετούνται σχεδόν αντιδιαμετρικά.⁸² Επομένως, η αλλαγή του αμινοξέος στη θέση 169 θα μπορούσε να αλλάξει τη συγγένεια της γελσολίνης για τα PIP_2 οδηγώντας πιθανόν σε παρεμπόδιση της αποπολυμεριστικής της δράσης στα μόρια F-ακτίνης και σε προαγωγή του πολυμερισμού τους. Ο αυξημένος ρυθμός πολυμερισμού της ακτίνης θα μπορούσε να έχει τις ανάλογες επιπτώσεις στη μορφολογία και τη

συμπεριφορά των αρθρικών ινοβλαστών στη ρευματοειδή αρθρίτιδα με εκείνες που προαναφέρθηκαν.

Ωστόσο, όπως γνωρίζουμε η πλειοψηφία των πολυμορφισμών έχει ουδέτερο αποτέλεσμα στο φαινότυπο, γι' αυτό θα ήταν καλό η μελέτη να συνεχιστεί συγκριτικά σε μεγάλο πληθυσμό φυσιολογικών και ασθενών ατόμων ώστε να διαπιστωθεί εάν η συχνότητα του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στους ασθενείς είναι στατιστικά σημαντική, δηλαδή εάν ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με την ασθένεια. Σε επόμενο στάδιο, εφόσον ο πολυμορφισμός σχετίζεται με την ασθένεια, θα πρέπει να ανιχνευθεί η επίδραση που έχει η αμινοξική αντικατάσταση στη δομή της πρωτεΐνης με τη χρήση προγραμματών βιοπληροφορικής. Για περαιτέρω επιβεβαίωση της υπόθεσης μας, η μελέτη θα πρέπει να επεκταθεί και σε *in vitro* συστήματα στα οποία θα είναι εφικτή η διερεύνηση των επιδράσεων που επιφέρει η αλλαγή στη δραστηριότητα της γελσολίνης σε απομονωμένους αρθρικούς ινοβλάστες και να διαπιστωθεί κατά πόσο ο φαινότυπος που παρουσιάζουν συμφωνεί με εκείνο που επιδεικνύουν στη ρευματοειδή αρθρίτιδα..

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημάνουμε ότι περιοριστικό παράγοντα στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης αποτέλεσε ο πολύ μικρός πληθυσμός υγιών και ασθενών ατόμων που χρησιμοποιήθηκε και δεν αφήνει περιθώρια για την ανεύρεση σημαντικού αριθμού πολυμορφικών ατόμων. Ίσως σε μεγαλύτερο πληθυσμό να βρεθούν άτομα πολυμορφικά που να διαθέτουν τον ίδιο ή κάποιο νέο πολυμορφισμό για κάποιο από τα δύο εξόνια. Όπως έχει βρεθεί μετά από μελέτες σε διαφορετικούς οργανισμούς, η γελσολίνη ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών (Gelsolin-like proteins) με κυριότερους αντιπροσώπους τις FlightlessI, villin, severin, capG που μοιάζουν με τη γελσολίνη και κατέχουν παρόμοια οργάνωση με ελάχιστες διαφοροποιήσεις από το δομικό μοτίβο G1-G6.⁵⁵ Η οικογένεια αυτή παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα⁵⁵ γι' αυτό μια άλλη πιθανότητα είναι τα συγκεκριμένα εξόνια να έχουν παραμείνει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης πολύ συντηρημένα στον άνθρωπο, ώστε στον ελληνικό πληθυσμό να κυριαρχούν τα επικρατέστερα φυσιολογικά αλληλόμορφα και η παρατήρηση κάποιου πολυμορφισμού στα εξόνια αυτά να αποτελεί σπάνιο φαινόμενο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg, Αρχές Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2003
- 2) Alain Vignal, Denis Milan, Magali Sancristobal, André Eggen, A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, Genet. Sel. Evol. 34 (2002)
- 3) James D Watson, Amy A.Caudy, Richard M. Mayers, Jan A. Witkowski, Ανασυνδουασμένο DNA (γονίδια και γονιδιώματα, μια συνοπτική παρουσίαση), Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2007
- 4) Single nucleotide polymorphism-SNP: http://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism
- 5) Jeffrey G. Stoll and Uma Yasothan, Rheumatoid arthritis market, Nature Reviews, 2009
- 6) Ράπτης Σ.Α., Εσωτερική Παθολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισσιανού, Α.Ε., 2008
- 7) Mac Gregor AJ, Silman AJ. Rheumatoid arthritis and other synovial disorders: classification and epidemiology in Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, Rheumatology 3rd ed. Mosby 2003
- 8) Simonsson M, Bergman S, Jacobsson LTH, Petersson IF, Svensson B., The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden, Scand J Rheumatol 1999
- 9) Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain, Rheumatology 2002
- 10) Drosos AA, Alamanos I, Voulgari PV, Psychos DN, Katsaraki A, Papadopoulos I, et al. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis in northwest Greece, J Rheumatol. 1997
- 11) Andrianakos A, Trontzas P, Christoyiannis F, Kaskani E, Nikolia Z, Tavaniotou E, et al: Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece-the ESORDIG study, Rheumatology 2006
- 12) Ι. Αναγνωστόπουλος, Η. Ζιντζαράς, Ι. Αλεξίου, Α. Παπαθανασίου, Ε. Ντάβας, Α. Κουτρούμπας, Γ. Μπαρούτα, Λ. Ι. Σακκάς, Ο επιπολασμός της χρόνιας αρθρίτιδας στο γενικό πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας, ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑ 2008
- 13) Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών - [www. Elire.gr](http://www.Elire.gr)
- 14) Arthritis information sheet, Arthritis Australia 2007 http://www.rheumatology.org.au/downloads/GRK_Rheumatoidarthritis_100316.pdf
- 15) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum., 1988

- 16) Fransen J, van Riel PL., The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum Dis Clin North Am.*, 2009
- 17) Iain B. McInnes and Georg Schett, Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, Nature Publishing Group, 2007
- 18) Van der Helm-van Mil, A. H., Wesoly, J. Z. & Huizinga, T. W. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 17,2005
- 19) Monica Chang, Charles M. Rowland, Veronica E. Garcia, Steven J. Schrodi, Joseph J. Catanese, Annette H. M. van der Helm-van Mil, Kristin G. Ardlie, Christopher I. Amos, Lindsey A. Criswell, Daniel L. Kastner, Peter K. Gregersen, Fina A. S. Kurreeman, Rene E. M. Toes, Tom W. J. Huizinga, Michael F. Seldin, Ann B. Begovich, A Large-Scale Rheumatoid Arthritis Genetic Study Identifies Association at Chromosome 9q33.2, *PLoS Genetics*, June 2008, Volume 4, Issue 6
- 20) Klareskog, L., Padyukov, L. & Alfredsson, L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases, *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 2007
- 21) P Stolt ,C Bengtsson, B Nordmark,S Lindblad, I Lundberg, L Klareskog, L Alfredsson, Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases, *Ann Rheum Dis*, 2003
- 22) D. Mewar, A.G. Wilson Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60 (2006) 648–655
- 23) X. Chang, R. Yamada, A. Suzuki, Y. Kochi, T. Sawada and K. Yamamoto, Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue, *Rheumatology* 2005
- 24) Akari Suzuki, Ryo Yamada, Xiaotian Chang, Shinya Tokuhiko, Tetsuji Sawada, Masakatsu Suzuki, Miyuki Nagasaki, Makiko Nakayama-Hamada, Reimi Kawaida, Mitsuru Ono, Masahiko Ohtsuki, Hidehiko Furukawa, Shinichi Yoshino, Masao Yukioka, Shigeto Tohma, Tsukasa Matsubara, Shigeyuki Wakitani, Ryota Teshima, Yuichi Nishioka, Akihiro Sekine, Aritoshi Iida, Atsushi Takahashi, Tatsuhiko Tsunoda, Yusuke Nakamura, Kazuhiko Yamamoto, Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4 are associated with rheumatoid arthritis, 2003 Nature Publishing Group
- 25) Ι. Αλεξίου, Κ. Θεοδωρίδου, Α. Ζιωγας, Α. Κουτρούμπας, Α. Κοντογιαννη, Α. Γερμενης, Α. Ι. Σακκας, Αντισώματα έναντι του κυκλικού κιτρουλλινιωμένου πεπτιδίου σε έλληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, *Ελληνική Ρευματολογία*, 2007
- 26) Αλ. Α. Δρόσος, Η σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας , www.iatro.gr
- 27) Richard M. Pope, Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis , *Nature Reviews Immunology* 2, 527-535, 2002
- 28) Strand V, Kimberly R, Isaacs JD., Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions, *Nat Rev Drug Discovery*, 2007

- 29) Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R. & Gay, S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol.* 233, 2005
- 30) Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity*, 1999
- 31) Ravinder N Maini, Peter C Taylor, Ewa Paleolog, Peter Charles, Sundeep Ballara, Fionula Brennan and Marc Feldmann, The Role of TNF α in the Pathogenesis of Rheumatoid Synovitis, *Arthritis Res* 2000
- 32) S. B. Abramson and A. Amin, Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage, *Rheumatology* 2002;41:972–980
- 33) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN, Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397-440.
- 34) S. R. Goldring, Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis, *Rheumatology* 2003;42(Suppl. 2):ii11–ii16
- 35) Θεραπεία - Φάρμακα - Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, <http://www.arthritis.org.gr>
- 36) Κορτικοστεροειδή
<http://www.rheumatology.org.au/community/documents/MultiGREMedicines.pdf>
- 37) Αζαθειοπρίνη <http://www.arthritis.org.gr/>
- 38) Σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, X. Μουτσόπουλος, *Επιστημονικά Θέματα*
- 39) Panayi GS, Tugwell P. The use of cyclosporine-A in rheumatoid arthritis: conclusions of an international review. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 967-969
- 40) Κυκλοφωσφαμίδη: <http://www.printo.it/pediatric-rheumatology/information/Grecia/15.htm>
- 41) The use of Biological Agents in the treatment of Rheumatoid Arthritis, Peng-Thim Fan, Keng-Hong Leong, *Annals Academy of Medicine, Singapore* 2007
- 42) Vassilis Aidinis, David Plows, Sylva Haralambous, Maria Armaka, Petros Papadopoulos, Maria Zambia Kanaki, Dirk Koczan, Hans Juergen Thiesen and George Kollias Functional analysis of an arthritogenic synovial fibroblast, *Arthritis Res Ther* 2003, 5:R140-R157
- 43) Edwards JC, Fibroblast biology: Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis, *Arthritis Res* 2000, 2:344-347.
- 44) Dimitris Kontoyiannis and George Kollias, Fibroblast biology: Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line?, *Arthritis Res* 2000, 2:342–343

- 45) Y.Vasilopoulos, V.Gkretsi, M.Armaka, V.Aidinis and G.Kollias, Actin cytoskeleton dynamics linked to synovial fibroblast activation as a novel pathogenic principle in TNF-driven arthritis, *Ann Rheum Dis* 2007
- 46) Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice, *Am J Pathol* 1996;149:1607–15.
- 47) Stephanie Lefèvre, Anette Knedla, Christoph Tennie, Andreas Kampmann, Christina Wunrau, Robert Dinsler, Adelheid Korb, Eva-Maria Schnäker, Ingo H Tarner, Paul D Robbins, Christopher H Evans, Henning Stürz, Jürgen Steinmeyer, Steffen Gay, Jürgen Schölmerich, Thomas Pap, Ulf Müller-Ladner & Elena Neumann, Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints, *Nature Medicine* 2009
- 48) Thomas Pap, Ulf Müller-Ladner, Renate E Gay and Steffen Gay, Fibroblast biology, Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res* 2000
- 49) L. C. Huber, O. Distler, I. Tarner, R. E. Gay, S. Gay and T. Pap, Synovial fibroblasts: key players in RA, *Rheumatology* 2006
- 50) Vassilis Aidinis, Piero Caminci, Maria Armaka, Walter Witke, Vaggelis Harokopos, Norman Pavelka, Dirk Koczan, Christos Argyropoulos, Maung-Maung Thwin, Steffen Müller, Waki Kazunori, Ponnampalam Gopalakrishnakone, Paola Ricciardi-Castagnoli, Hans-Jürgen Thiesen, Yoshihide Hayashizaki, George Kollias, Cytoskeletal Rearrangements in Synovial Fibroblasts as a Novel Pathophysiological Determinant of Modeled Rheumatoid Arthritis, *PLoS Genetics*, 2005
- 51) Trentham DE, Townes AS, Kang AH, Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis., *J Exp Med* 146: 857–868, 1977
- 52) M. D. Smith, J. Slavotinek, V. Au, H. Weedon, A. Parker, M. Coleman, P. J. Roberts-Thomson and M. J. Ahern, Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression, *Rheumatology* 2001
- 53) David J. Kwiatkowski, Rosemary Mehl, and Helen L. Yin, Genomic Organization and Biosynthesis of Secreted and Cytoplasmic Forms of Gelsolin, *The Journal of Cell Biology*, Volume 106, 1988
- 54) David J. Kwiatkowski, Carol A. Westbrook, Gail A. P. Bruns, and Cynthia C. Mortont, Localization of Gelsolin Proximal to ABL on Chromosome 9, *Am. J. Hum. Genet*, 1988
- 55) Stuart K. Archer, Charles Claudianos and Hugh D. Campbell, Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators, *BioEssays* 2005
- 56) P. Silaccia, L. Mazzolaib, C. Gaucia, N. Stergiopulos, H. L.Yinc and D. Hayozb, Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004)
- 57) Pamela D. Arora, Michael Glogauer, Andras Kapus, David J. Kwiatkowski, and Christopher A. McCulloch, Gelsolin Mediates Collagen Phagocytosis through a Rac-dependent Step, *Mol Biol Cell*. 2004 February; 15(2): 588–599.

- 58) Toshifumi Azuma, Walter Witke, Thomas P. Stossel, John H. Hartwig and David J. Kwiatkowski, Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility, *The EMBO Journal*, 1998
- 59) Stuart K. Archer, Charles Claudianos and Hugh D. Campbell, Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators, *BioEssays* 27:388–396, 2005.
- 60) Qinxi Li, Zhiyun Ye, Jun Wen, Lin Ma, Ying He, Guili Lian, Zhen Wang, Luyao Wei, Di Wu, Bin Jiang, Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385 (2009) 284–289
- 61) Z.R. Xi, W. Qin, Y.F. Yang, G. He, S.H. Gao, M.S. Ren, Y.W. Peng, Z. Zhang, L. He, Transmission disequilibrium analysis of the GSN gene in a cohort of family trios with schizophrenia, *Neuroscience Letters* 372 (2004) 200–203
- 62) Teresia M Osborn, Margareta Verdrengh, Thomas P Stossel, Andrej Tarkowski and Maria Bokarewa, Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 2008
- 63) Namiot, Thomas Hartung and Paul A. Janmey, Margaret E. McCormick, Wieslaw Drozdowski, Zbigniew Robert Bucki, Fitzroy J. Byfield, Alina Kulakowska, Extracellular Gelsolin Binds Lipoteichoic Acid and Modulates Cellular Response to Proinflammatory Bacterial Wall Components, *J. Immunol.* 2008;181;4936-4944
- 64) Albert de la Chapelle, Ritva Tolvanen, Gudrun Boysen, Jiri Santavy, Liesbeth Bleeker-Wagemakers, C.P.J. Maury & Juha Kere, Gelsolin-derived familial amyloidosis caused by asparagine or tyrosine substitution for aspartic acid at residue 187, 1992, Nature Publishing Group
- 65) Edward Irobia, Leslie D. Burtnick, Dunja Urosev, Kartik Narayan, Robert C. Robinson, From the first to the second domain of gelsolin: a common path on the surface of actin? *FEBS Letters*, Volume 552, Issue 2, Pages 86-90
- 66) Leslie D Burtnick, Dunja Urosev, Edward Irobi, Kartik Narayan, and Robert C Robinson, Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF, *The EMBO Journal* (2004) 23, 2713–2722
- 67) Hui Qiao Sun, Masaya Yamamoto, Marisan Mejillano, and Helen L. Yin, Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein, *The journal of Biological Chemistry*, 1999
- 68) Bishop A, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348:241–55
- 69) Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K., The lamellipodium: where motility begins, *Trends Cell Biol* 2002;12:112–20
- 70) Disanza A, Steffenc A, Hertzoga M, Frittoli E, Rottnerd K, Scitaa G., Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement, *Cell Mol Life Sci* 2005;62:955–70
- 71) http://en.wikipedia.org/wiki/Serum_response_factor

- 72) Xu H, Liu P, Liang L, Danesh FR, Yang X, Ye Y, et al. RhoA-mediated, tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin, *Arthritis Rheum* 2006;54:3441–51
- 73) Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 2007;316:1749–52
- 74) Μοριακή διαγνωστική, George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιανού, 2008
- 75) Ethidium Bromide - http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide
- 76) Single Strand Conformation Polymorphism-
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Parker/method.html>
- 77) Silver Nitrate- http://en.wikipedia.org/wiki/Silver_nitrate
- 78) Ethanol Precipitation, Wikipedia,the free encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_precipitation
- 79) Sodium Acetate, Wikipedia,the free encyclopedia http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_acetate
- 80) Cycle sequencing,
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01licohen/sequencin.html>
- 81) Deconstructing gelsol in: identifying sites that mimic or alter binding to actin and phosphoinositides, Paul A Janmey, Thomas P Stossel and Philip G Allen, *Chemistry & Biology* April 1998,5:R81 -R85
- 82) Identification of a Polyphosphoinositide-binding Sequence in an Actin Monomer-binding Domain of Gelsolin, Fu-Xin Yu, Hui-Qiao Sun, Paul A. Janmeyg, and Helen L. Ying, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No. 21, Issue of July 25, pp. 14616-14621, 1992
- 83) Hap Map DB_SNP

Βιβλιογραφία εικόνων

- εικόνα 1*: <http://www.sciencenewsdn.com/2006/howcanidenticaltwinsbegeneticallydifferent.shtml>
- εικόνα 2* : iahealth.net/.../12/arthritis_osteoarthritis.jpg
- εικόνα 3*: www.beliefnet.com/.../rheumatoid%20arthritis.jpg
- εικόνα 5*: www.bio.davidson.edu/.../Super/jointandcells.gif
- εικόνα 6*: www.repairstemcell.wordpress.com/2009/10/ - the stem cell Blog
- εικόνα 13*: <https://.../claire-addis/gel-electrophoresis>
- εικόνα 14* :<http://www.moleculardetective.org/TutorialProteomics/GelElectrophoresis02.JPG>