



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Με θέμα:

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ
C104R ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΑCΙ ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΛΕΜΦΟΎΠΕΡΠΛΑΣΙΩΝ
ΧΑΜΗΛΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

*The role of C104R polymorphism of gene TACI to the pathogenesis of low-grade
malignant Lymphoproliferative Diseases*

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Φεβρουαρίου 2014- Ιουνίου 2014 υπό την επίβλεψη του **κ. Κουρέτα**, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, του **κ. Γερμενή**, καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, και του **κ. Σπελέτα**, αναπληρωτή καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας.

Από την φοιτήτρια:

Παρασκευή Συκουτρή

Λάρισα, Οκτώβριος 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημητρίος Κουρέτας

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών

Αναστάσιος Γερμενής

Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Ματθαίος Σπελέτας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ: Γενετικές παραλλαγές του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) έχουν περιγραφεί στο 10-15% των ασθενών με CVID (κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια). Μεταξύ αυτών, η μετάλλαξη C104R (rs34557412) έχει συσχετισθεί ισχυρά, περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη, τόσο με την παθογένεση της νόσου, όσο και με αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών νεοπλασιών σε ασθενείς με CVID. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας της C104R σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, όπως Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) και Non-Hodgkin λεμφώματα (NHL) και η ανάδειξη του πιθανού ρόλου της στην παθογένεσή τους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ: Αναλύθηκαν 103 ασθενείς χωρίς ιστορικό πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας, 86 με ΧΛΛ (Α/Γ: 47/39, μέση ηλικία: 60,79 έτη, εύρος: 48-87) και 17 με NHL (Α/Γ: 11/6, μέση ηλικία: 73,77 έτη, εύρος: 54-97). Από τους ασθενείς με NHL, 8 έπασχαν από μακροσφαιριναιμία Waldenstrom, 7 από SLVL, 1 από MCL και 1 από HCL. Γενωμικό DNA απομονώθηκε από ολικό αίμα ή μυελό των οστών με κλασσικές μεθόδους, ενώ η ανίχνευση του πολυμορφισμού TACI-C104R έγινε με PCR-RFLP, με πρωτόκολλο που έχει προτυποποιηθεί στο Εργαστήριό μας. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν Έλληνες ασθενείς με CVID που έφεραν τον ως άνω πολυμορφισμό, ενώ ως ομάδα ελέγχου θεωρήθηκε ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων που έχει πρόσφατα δημοσιευτεί (και αφορά την επίπτωση μεταλλάξεων του γονιδίου *TNFRSF13B/TACI* στον Ελληνικό πληθυσμό: Speletas et al. J Clin Immunol 2011).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η συχνότητα αλληλίου του πολυμορφισμού TACI-C104R στον Ελληνικό πληθυσμό ήταν 0.19%, ωστόσο κανένας ασθενής με ΧΛΛ ή NHL δεν έφερε τον ως άνω πολυμορφισμό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Από την παρούσα μελέτη δε διαφαίνεται αιτιοπαθογενετική σχέση του πολυμορφισμού TACI-C104R με λεμφοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας, σε ασθενείς χωρίς υποκείμενη πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια.

ABSTRACT

PURPOSE: Genetic mutations of the gene TNFRSF13B/TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor) have been described to the 10-15% of CVID (common variable immunodeficiency) patients. Among them, the mutation C104R (rs34557412) has been strongly related to the pathogenesis of the disease and to increased impacts of lymphoproliferative neoplasms to CVID patients. The purpose of this study was the identification of the C104R frequency in patients with low-grade malignant lymphoproliferative diseases, such as B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and Non-Hodgkin lymphomas (NHL), and the revelation of its possible role to their pathogenesis.

METHODS AND MATERIALS: 103 patients, with no history of primary immunodeficiency, were analysed, 86 with B-CLL (Male/Female: 47/39, Average age: 60,79 years, Range: 48-87) and 17 with NHL (Male/Female: 11/6, Average age: 73,77 years, Range: 54-97). From the NHL patients, 8 of them suffered from Waldenstrom macroglobulinemia, 7 from SLVL, 1 from MCL and 1 from HCL. Genomic DNA was extracted from peripheral blood or bone marrow with classic methods, while the detection of the TACI-C104R polymorphism was done with PCR-RFLP, using a protocol that was standardized to the lab of Immunology and Histocompatibility. As positive controls we used Greek patients with CVID, who also had the above polymorphism, and as a control group we used a group of normal people, that was recently published (and concerns the effects of TACI mutations to the Greek population: Speletas et al. J Clin Immunol 2011).

RESULTS: The frequency of the allele of TACI-C104R polymorphism to the Greek population was 0,19%, however none of the B-CLL or NHL patients carried the above polymorphism.

CONCLUSIONS: This study doesn't reveal any causative relation of the TACI-C104R polymorphism with the low-grade malignant lymphoproliferative neoplasms, to patients with no subjective primary immunodeficiency.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή.....	7
1.1.	Το Β-κύτταρο.....	7
1.1.1.	Η πρόωγη ανάπτυξη των Β-κυττάρων στον μυελό των οστών.....	8
1.1.2.	Η έξοδος και η πορεία στα δευτερογενή λεμφικά όργανα.....	9
1.1.3.	Τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης.....	10
1.1.4.	Η επιβίωση των Β-κυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα.....	10
1.2	Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family member 13b (TNFRSF13B ή TACI).....	11
1.2.1	Οι προσδέτες του TACI.....	15
1.3	Μεταλλάξεις του TACI και CVID.....	17
1.4	Ο πολυμορφισμός του TACI-C104R.....	18
1.5	Λεμφοϋπερπλασία και TACI.....	19
2.	Σκοπός.....	20
3.	Υλικά και μέθοδοι.....	21
4.	Αποτελέσματα.....	34
5.	Συμπεράσματα.....	38
	Βιβλιογραφία.....	40

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας.

Η ολοκλήρωση της προπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια των υπεύθυνων καθηγητών μου από το τμήμα της Ιατρικής, τον κ.Γερμενή, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας, καθώς και τον κ. Σπελέτα, Αναπληρωτή Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις ευχαριστίες μου που με δέχτηκαν στο εργαστήριο έτσι ώστε να διεκπεραιώσω την εργασία μου και μου πρόσφεραν τις πολύτιμες γνώσεις τους και την βοήθειά τους. Χρωστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Εύα Γραμμουστιανού για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα, αλλά και για την προθυμία και την βοήθεια, που ποτέ δεν δίστασε να μου δώσει.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου στο τμήμα της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών για την επίβλεψη, την συνεργασία και τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαιτέρως την οικογένεια μου για την κατανόηση και την ηθική, ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν όχι μόνο κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και κατά την διάρκεια όλων των σπουδών μου.

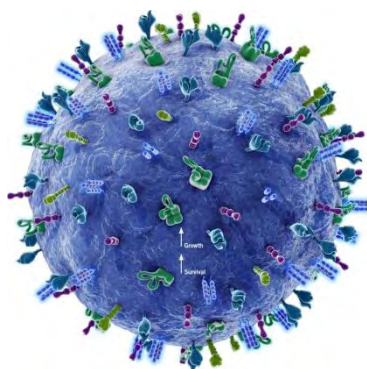
Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την παρέα μου, για την βοήθεια, την υπομονή και τις όμορφες στιγμές που μου προσέφερε.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το Β-κύτταρο

Τα Β-κύτταρα ή Β-λεμφοκύτταρα είναι ένας τύπος λεμφοκυττάρων στην χυμική ανοσία του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα Β-κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν από λεμφοκύτταρα, όπως τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ (Natural Killer) κύτταρα, από την παρουσία μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου και ονομάζεται υποδοχέας Β-κυττάρου (BCR). Αυτός ο εξειδικευμένος πρωτεϊνικός υποδοχέας επιτρέπει στο Β-κύτταρο να συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Ο κύριος ρόλος των Β-κυττάρων είναι να παράγουν αντισώματα εναντίον αντιγόνων, να διαδραματίζουν τον ρόλο των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και να αναπτύσσονται σε Β-κύτταρα μνήμης μετά από ενεργοποίηση από αντιγόνα. Τα Β-κύτταρα μπορούν επίσης να εκκρίνουν κυτοκίνες που χρησιμοποιούνται ως σήματα στις ρυθμιστικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα Β-κύτταρα και τα αντισώματά τους είναι τα βασικά στοιχεία της χυμικής ανοσίας και προστατεύουν εναντίον μιας σχεδόν ατέλειωτης ποικιλίας παθογόνων. Βλάβες στην ανάπτυξη, στην επιλογή και στην λειτουργία των Β-κυττάρων οδηγούν σε αυτοανοσία, κακοήθεια, ανοσοανεπάρκειες και αλλεργίες.¹

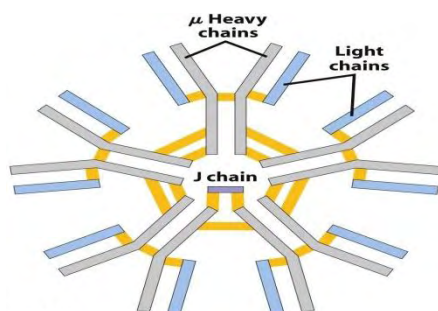


Εικ.1. Το Β-κύτταρο και οι επιφανειακοί υποδοχείς του.

1.1.1 Η πρώιμη ανάπτυξη των B-κυττάρων στον μυελό των οστών

Τα B-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στον μυελό των οστών (Bone Marrow, BM) από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα. Κατά την εμβρυϊκή ζωή, ο μυελός των οστών δημιουργείται από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα που αναπτύσσονται στο εμβρυϊκό ήπαρ. Τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των B-κυττάρων που εξαρτώνται από τον μυελό των οστών βασίζονται στην αναδιάταξη τμημάτων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Οι αναδιατάξεις των τμημάτων V_H , D_H και J_H της βαριάς αλυσίδας και των τμημάτων V_L - J_L των ελαφριών αλυσίδων δίνουν την δυνατότητα στα B-κύτταρα να παράγουν μεγάλη ποικιλία αντισωμάτων που αναγνωρίζουν πολλά αντιγόνα. Σύμφωνα με την αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας, ορίζονται τρία αναπτυξιακά στάδια. Στο πρώτο αναπτυξιακό στάδιο, πρώιμα B-κύτταρα αναδιατάσσουν τα D και J τμήματα της ελαφριάς αλυσίδας, και στη συνέχεια γίνεται μια δεύτερη αναδιάταξη όπου ενώνεται η ανοδική περιοχή V με το αναδιαταγμένο τμήμα DJ.¹

Η λειτουργική αναδιάταξη των γονιδιακών τμημάτων μ της ελαφριάς αλυσίδας επάγει την είσοδο στο επόμενο στάδιο, το προ-B-κύτταρο. Αυτά τα κύτταρα κάνουν μια ή δυο κυτταρικές διαιρέσεις και αναδιατάσσουν τα γονιδιακά τμήματα που κωδικοποιούν τις κ και λ αλυσίδες. Σε συνδυασμό με την μ αλυσίδα, ένα μόριο IgM διαμορφώνεται και εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικ.2). Αυτά τα κύτταρα ορίζονται ως ανώριμα B-κύτταρα. Τα ανώριμα κύτταρα αφήνουν τον μυελό των οστών και μεταναστεύουν στον σπλήνα, όπου τερματίζουν την πρώιμη ανάπτυξη με την διαφοροποίηση σε «αφελή», θυλακιώδη και B-κύτταρα οριακής ζώνης (MZ).¹

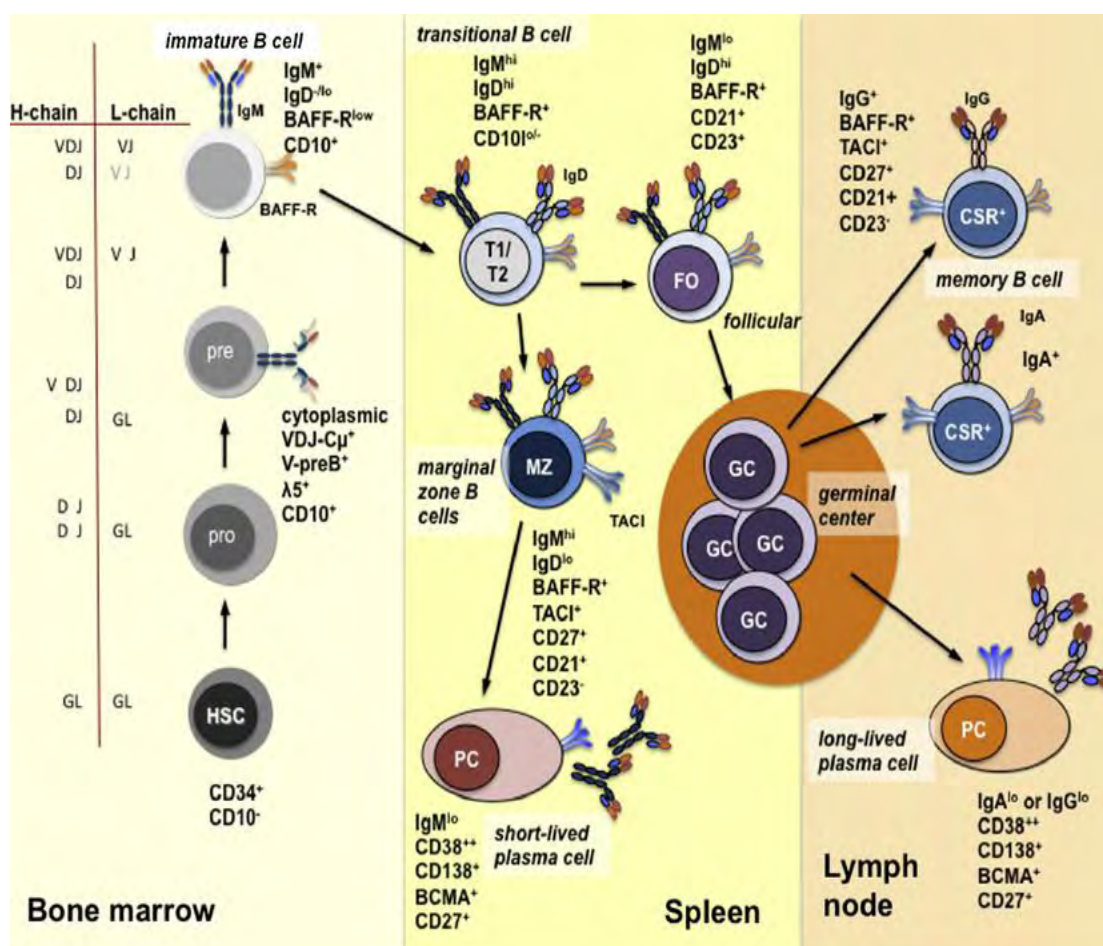


Εικ.2. Δομή αντισώματος IgM

Figure 5-23
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

1.1.2 Η έξοδος και η πορεία στα δευτερογενή λεμφικά όργανα

Κυκλοφορώντας στο σώμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου, τα Β-κύτταρα συχνά επισκέπτονται δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως τον σπλήνα, τους λεμφαδένες, τις αμυγδαλές και βλεννογόνους ιστούς. Στα θυλάκια των Β-κυττάρων, σχηματίζονται τα βλαστικά κέντρα (GC) και Β-κύτταρα απομακρύνονται από τους ιστούς και μεταφέρονται πίσω στην κυκλοφορία, και ρυθμίζονται από μόρια-προσκόλλησης και από την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών υποδοχέων G πρωτεϊνών. Μετά την απομάκρυνση από τον μυελό των οστών, τα Β-λεμφοκύτταρα μεταφέρονται στον σπλήνα. Εδώ τα Β-κύτταρα σχηματίζουν την οριακή ζώνη και το τμήμα των θυλακοειδών Β-κυττάρων.¹



Εικ.3. Η ανάπτυξη των Β-κυττάρων και οι υπο-ομάδες των Β-κυττάρων.¹

1.1.3 Τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης

Οι ανεξάρτητες των Τ-κυττάρων χυμικές απαντήσεις οργανώνονται από τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης και του βλεννογόνου. Στον σπλήνα, τα κύτταρα της οριακής ζώνης είναι η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στους αιματογενώς μεταδιδόμενους παθογόνους. Τα ανθρώπινα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης εκφράζουν IgM που έχουν υποστεί σωματική υπερμετάλλαξη (SHM) στις μεταβλητές περιοχές, τα οποία επανακυκλοφορούν στο σώμα. Μελέτες έχουν δείξει πως τα κύτταρα της οριακής ζώνης αναπτύσσονται και μεταλλάσσονται κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, ανεξαρτήτως ανοσολογικών αποκρίσεων.¹

1.1.4 Η επιβίωση των Β-κυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα

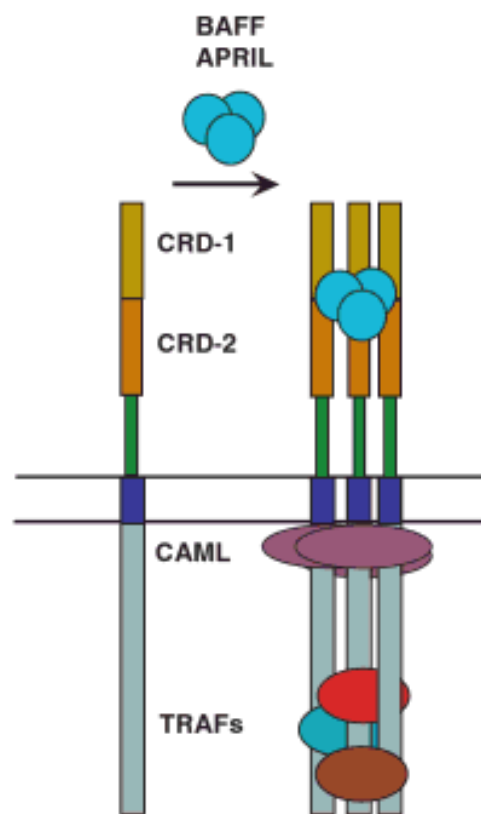
Η επιβίωση των Β-κυττάρων στην περιφέρεια βασίζεται στην έκφραση ενός λειτουργικού BCR και σε σήματα που δημιουργούνται από την σύνδεση του ενεργοποιητή των Β-κυττάρων (BAFF), που είναι μέλος της οικογένειας TNF-α, στον υποδοχέα του (BAFF-R). Κατά την ωρίμανση των Β-κυττάρων ο BAFF-R εκφράζεται πρώτα από ανώριμα Β-κύτταρα στον μυελό των οστών. Εκτός από τον BAFF-R, ο BAFF συνδέεται σε δύο επιπλέον υποδοχείς, τον διαμεμβρανικό ενεργοποιητή, μετατροπέα ασβεστίου και παράγοντα αλληλεπίδρασης με τον προσδέτη κυκλοφιλίνης (TACI), και τον παράγοντα ωρίμανσης των Β-κυττάρων (BCMA). Αυτοί οι τρεις υποδοχείς διαμορφώνουν ένα σύστημα προσδέτη-υποδοχέα που περιλαμβάνει και τον ομόλογο προσδέτη, έναν προσδέτη που επάγει τον πολλαπλασιασμό (APRIL). Ο APRIL, σε αντίθεση με τον BAFF, συνδέεται μόνο με τον TACI και τον BCMA αλλά δεν αλληλεπιδρά καθόλου με τον BAFF-R. Η έκφραση του BAFF-R αυξάνεται όταν μεταβατικά Β-κύτταρα διαφοροποιούνται σε Β-κύτταρα οριακής ζώνης και σε θυλακοειδή Β-κύτταρα. Η κύρια λειτουργία του BAFF-R είναι να παρέχει σήματα επιβίωσης σε ανώριμα και ώριμα Β-κύτταρα.¹

1.2 Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family member 13b (TNFRSF13B ή TACI)

Το προϊόν έκφρασης του γονιδίου TACI είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη υποδοχέας, που εντοπίζεται κυρίως στην επιφάνεια των Β-κυττάρων. Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και έχει μήκος 42,584 bp και αποτελείται από 5 εξόνια. Η εξωκυτταρική αμινοτελική δομή του υποδοχέα χαρακτηρίζεται από δυο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (CRDs). Η πρώτη περιοχή CRD (CRD1) εκτείνεται από το αμινοξύ 32 έως το 67, ενώ η δεύτερη περιοχή CRD (CRD2) εκτείνεται από το αμινοξύ 68 έως το αμινοξύ 106, και ευθύνεται για την ισχυρή σύνδεση του BAFF και του APRIL.



Εικ.4. Η πρωτεΐνη TACI



Εικ.5. Ο υποδοχέας TACI και οι περιοχές του.

Vassil St. Georgiev, Karl Western, John J. McGowan, National Institute of Allergy and Infectious Diseases

Το TACI ελέγχει:

- Την αντισωματική απόκριση των Β-κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα ελέγχει την ανεξάρτητη των Τ-κυττάρων αντισωματική απόκριση των Β-κυττάρων. Από πειράματα βρέθηκε μια στενή σχέση μεταξύ των Toll-like υποδοχέων (TLR) και της έκφρασης του TACI. Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στα Β-κύτταρα, που αναγνωρίζουν καλά διατηρημένα μόρια που προέρχονται από μικρόβια και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα. Με αυτόν τον τρόπο λοιπόν πραγματοποιείται η ανοσολογική απόκριση χωρίς την μεσολάβηση των Τ-κυττάρων
- Την μεταστροφή τάξης. Δυο προσδέτες του υποδοχέα TACI (BAFF, APRIL) μπορούν να προκαλέσουν την μεταστροφή τάξης από IgG σε IgA, μέσω ενεργοποίησης της απαμινάσης της κυστιδίνης (AID), το οποίο συμβαίνει μέσω του μονοπατιού NF-κΒ
- Τη Β-κυτταρική ομοιόσταση. Ο υποδοχέας TACI μεταδίδει άμεσα ανασταλτικά ή αποπτωτικά σήματα στα Β-κύτταρα, και έμμεσα ρυθμίζει τον αριθμό των Β-κυττάρων ελέγχοντας την ποσότητα μιας πρωτεΐνης που επιτρέπει την επιβίωση των Β-κυττάρων (BAFF), και των TRAFs, που είναι πρωτεϊνικοί προσδέτες κάποιων επιφανειακών υποδοχέων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων²

1.2.1 Οι προσδέτες του TACI

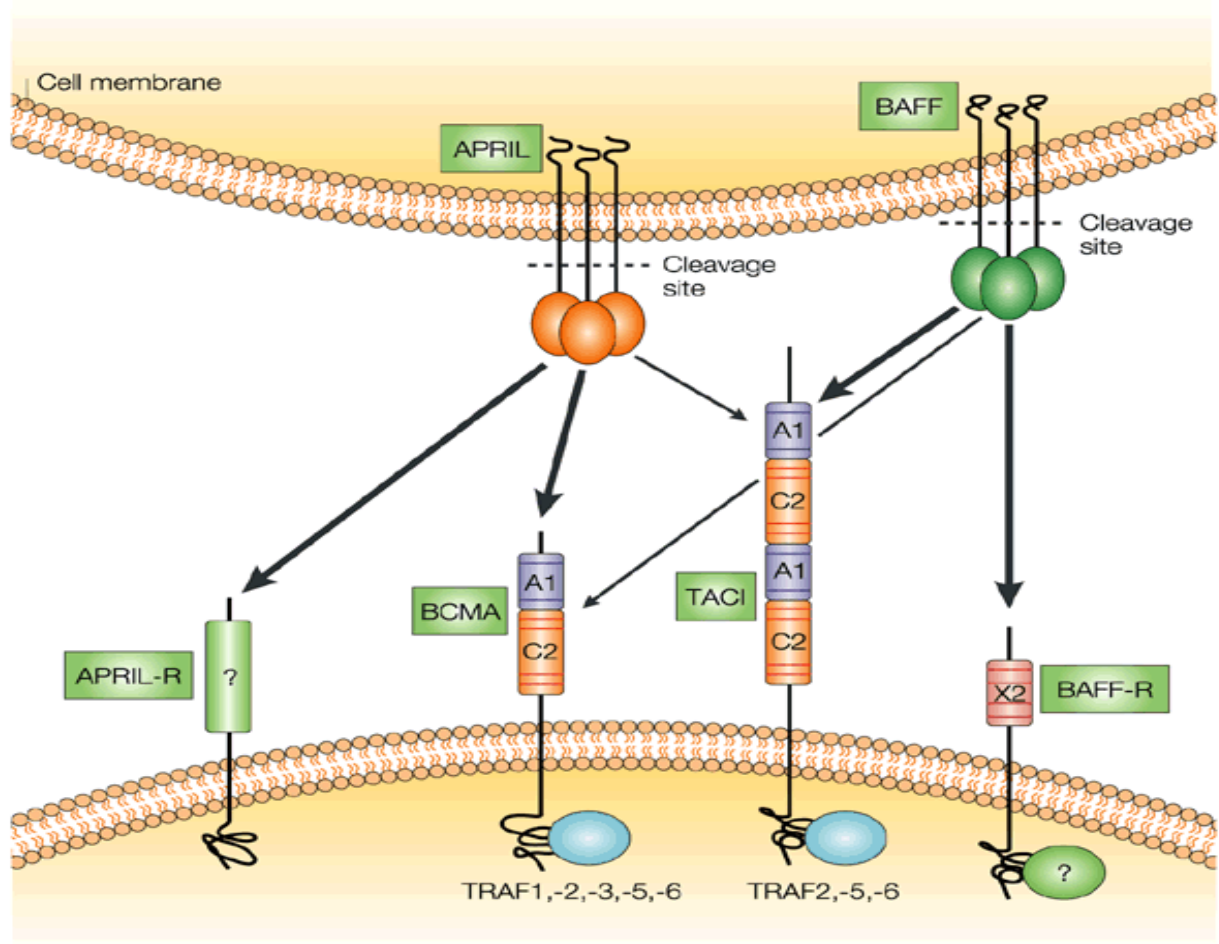
Ο υποδοχέας TACI έχει τους εξής προσδέτες:

- B-cell activating Factor (BAFF): Είναι μια κυτοκίνη που σχετίζεται με την επιβίωση και την ωρίμανση των B-κυττάρων
- A Proliferation-including Ligand (APRIL): Είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια TNF. Ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων²

Η σηματοδότηση μέσω BAFF σχετίζεται ισχυρά με την επιβίωση των περιφερικών B-κυττάρων σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης. Η σηματοδότηση μέσω TACI γίνεται και μέσω του κανονικού και μέσω του μη κανονικού μονοπατιού NF-κB, τα οποία ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες TRAF. Το μη κανονικό μονοπάτι NF-κB είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο που συμμετέχει στη σηματοδότηση μέσω BAFF. Το κανονικό μονοπάτι NF-κB μπορεί επίσης να μιμηθεί την σηματοδότηση μέσω BAFF.²

Ο APRIL ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων και την επιβίωση των πλασμοκυττάρων, αν και το δεύτερο γίνεται και με σηματοδότηση μέσω BCMA. Τόσο ο APRIL όσο και ο BAFF μπορούν να επάγουν την μεταστροφή τάξης σε IgG και IgA μέσω ενεργοποίησης του AID, κάτι το οποίο φαίνεται να ενεργοποιείται και μέσω του TACI και μέσω του BAFF-R. Ο άξονας APRIL-TACI είναι κρίσιμος για την μεταστροφή τάξης σε IgA.²

Ο TACI αναγνωρίζει τους BAFF και APRIL, μόνο όταν αυτοί τριμεριστούν.



Nature Reviews | Immunology

Εικ. 7. Η σύνδεση των τριμερών APRIL/BAFF στον υποδοχέα TACI.

Mackay et al, 2002, *J.Clin. Investigation*

1.3 Μεταλλάξεις του TACI και CVID

Η κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID) είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπογαμμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής ειδικών αντισωμάτων, υποτροπιάζουσες ή και χρόνιες λοιμώξεις και αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών και κοκκιωματωδών βλαβών, αυτοάνοσων φαινομένων και κακοήθων νοσημάτων. Η σημαντική ελάττωση της συγκέντρωσης IgG στον ορό αποτελεί προϋπόθεση για τη διάγνωση της CVID. Στους περισσότερους ασθενείς μειωμένη ανευρίσκεται επίσης και η συγκέντρωση της IgA, ενώ τα επίπεδα της IgM είναι μειωμένα στις μισές περίπου των περιπτώσεων.³

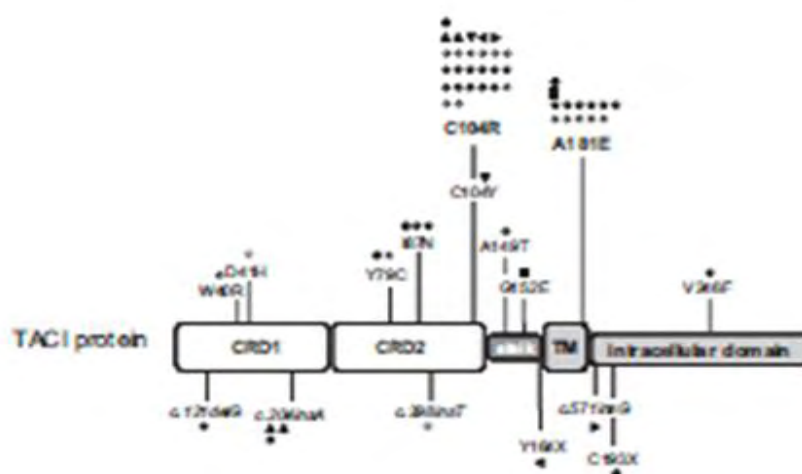
Έχουν βρεθεί διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου TACI σε ασθενείς με CVID. Μάλιστα, η ανακάλυψη μεταλλάξεων στα γονίδια TACI, ICOS και CD19 παρείχαν τα πρώτα μονογονιδιακά μοντέλα που σχετίζονται με την CVID.⁴ Μεταλλάξεις του TACI έχουν βρεθεί στο 8% του πληθυσμού που πάσχει CVID, αλλά και στο 1% του φυσιολογικού πληθυσμού ελέγχου. Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με την CVID σε τρεις περιπτώσεις:

- Όταν τα δύο αλληλόμορφα του TACI φέρουν μεταλλάξεις
- Όταν το ένα αλληλόμορφο του TACI παρουσιάζει την μετάλλαξη C104R (rs34557412), που διαταράσσει την θέση πρόσδεσης του προσδέτη
- Όταν το ένα αλληλόμορφο του TACI φέρει την μετάλλαξη A181E, που εντοπίζεται στην διαμεμβρανική περιοχή, της οποίας όμως οι λειτουργικές επιπτώσεις είναι άγνωστες²

Το γεγονός πως μεταλλάξεις του TACI βρέθηκαν όχι μόνο σε ασθενείς με CVID, αλλά και σε υγιείς, υποδεικνύει πως οι μεταλλάξεις του TACI αποτελούν μια προδιάθεση, και όχι την κύρια αιτία εμφάνισης CVID. Προφανώς, ο ακριβής φαινότυπος της ανοσοανεπάρκειας δεν βασίζεται μόνο στον τύπο μετάλλαξης του TACI, αλλά και σε άλλα περιβαλλοντικά και γενετικά ερεθίσματα.²

1.4 Ο πολυμορφισμός TACI-C104R

Ο πολυμορφισμός C104R βρίσκεται στο εξόνιο 3, όπου στην θέση 104 μια κυστεΐνη γίνεται αργινίνη. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται στην εξωκυτταρική πλευρά του υποδοχέα, και όπως φαίνεται και στην Εικ.8., βρίσκεται συγκεκριμένα στην περιοχή CRD2. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η περιοχή CRD2 είναι πολύ σημαντική για την σύνδεση των προσδετών BAFF και APRIL. Λόγω λοιπόν του πολυμορφισμού αυτού, δεν ευνοείται η σύνδεση των προσδετών στον υποδοχέα, και έτσι δεν γίνεται μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μην πραγματοποιούνται οι διαδικασίες που ευνοούν αυτοί οι προσδέτες, και έτσι να μην λειτουργεί σωστά το Β-κύτταρο.



Εικ.8. Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα TACI

1.5 Λεμφοϋπερπλασία και TACI

Προς το παρόν, δεν έχει γίνει κάποια συγκεκριμένη συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου TACI και της εμφάνισης λεμφοϋπερπλασίας. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις που κινούν το ενδιαφέρον για περεταίρω διερεύνηση του θέματος. Καταρχάς, σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, βρέθηκε πως τα ποντίκια TACI^{-/-} παρουσίαζαν υπερπλασία B-κυττάρων. Ο πολυμορφισμός C104R είναι ο πιο συχνός, και έχει ως αποτέλεσμα την μη λειτουργία του υποδοχέα. Ταυτόχρονα, μελετήθηκαν 4 οικογένειες στην Ελλάδα που έφεραν τον πολυμορφισμό TACI/C104R. Οι 3 από αυτές τις οικογένειες είχαν ιστορικό λεμφοϋπερπλασίας. Μήπως λοιπόν η μετάλλαξη αυτή είναι προδιαθεσικός παράγοντας;

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση του πολυμορφισμού C104R του γονιδίου TACI σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, όπως το Non-Hodgkin Λέμφωμα (NHL) και την Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Υλικά

Χημικά Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και ήταν από τις εταιρείες Invitrogen και New England BioLabs. Από την εταιρεία Invitrogen ήταν όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR και την ηλεκτροφόρηση, ενώ από την New England BioLabs ήταν τα αντιδραστήρια για την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο.

Δείγματα

Για την διερεύνηση αυτού του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε μια ομάδα ατόμων που παρουσίαζαν λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 17 ασθενείς με NHL (Non- Hodgkin λέμφωμα) και 86 ασθενείς με CLL (χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία). Η διάγνωση των ασθενών έγινε με βάση διεθνή κριτήρια.

Οι πληροφορίες που αφορούν τους ασθενείς με NHL συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ασθενείς NHL

Ηλικία (Διάμεση/εύρος, έτη)	73,77/ 54-97
Φύλο (άντρες/γυναίκες)	11/6
Ασθένεια	Μακροσφαιριναιμία Waldenstrom:8 B-NHL-SLVL:7 MCL:1 HCL:1

Η Μακροσφαιριναιμία Waldenstrom είναι ένα λεμφοϋπερπλαστικό νόσημα που εμφανίζεται στα Β κύτταρα. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα IgM και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τελικώς διαφοροποιημένων Β κυττάρων. Η SLVL (splenic lymphoma with villous lymphocytes) χαρακτηρίζεται από σπληνομεγαλία, μειωμένη λεμφοκυττάρωση και λαχνώδη λεμφοκύτταρα στο περιφερικό αίμα. Τα κύτταρα MCL (mantle cell lymphoma) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα κυκλίνης D1 λόγω χρωμοσωμικής μετατόπισης. Η κυκλίνη D1 είναι πολύ σημαντική για τον κυτταρικό κύκλο, άρα η αυξημένη της συγκέντρωση οδηγεί σε μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων. Η HCL (hairy cell leukemia) μπορεί να διαγνωστεί μετά από εξέταση στο μικροσκόπιο. Στην HCL, υπερβολικός αριθμός αρχέγονων ερυθροειδών κυττάρων γίνονται Β λεμφοκύτταρα. Τα τελευταία

εξελίσσονται σε μη υγιή, μη αφήνοντας χώρο για τα υγιή λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, και για τα αιμοπετάλια.

Οι πληροφορίες που αφορούν τους ασθενείς με CLL συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ασθενείς CLL

Ηλικία (Διάμεση/εύρος, έτη)	60,79/48 – 87
Φύλο (άντρες/γυναίκες)	47/39
Ασθένεια	B-CLL:86

Η B-CLL είναι ο πιο κοινός τύπος λευχαιμίας στους ενήλικες. Σε αυτούς τους ασθενείς τα B κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και συσσωρεύονται στον μυελό των οστών και στο αίμα, όπου εκτοπίζουν τα υγιή κύτταρα του αίματος. Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται χωρίς συμπτώματα, σαν αποτέλεσμα μιας γενικής εξέτασης αίματος, η οποία παρουσιάζει υψηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων. Όμως, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, παρουσιάζει πρησμένους λεμφαδένες, σπλήνα και ήπαρ, και τέλος αναιμία και λοιμώξεις.

Ως control χρησιμοποιήθηκε ασθενής ο οποίος είχε βρεθεί πως είναι ετερόζυγος, τόσο με την τεχνική που θα εξηγηθεί παρακάτω, όσο και με αλληλούχηση.

B. Μέθοδοι

Για την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκε DNA που είχε απομονωθεί από περιφερικό αίμα των παραπάνω ασθενών. Η τεχνική που έγινε είναι PCR-RFLP.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους μοριακής βιολογίας. Παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1986 (Mullis *et al*, 1986). Μέσω αυτής της μεθόδου μπορούμε να ενισχύσουμε ένα ή μερικά αντίγραφα μορίων DNA σε εκατοντάδες αντίγραφα συγκεκριμένης αλληλουχίας. Αυτές οι επιλεγμένες αλληλουχίες DNA πολλαπλασιάζονται ενζυμικά, μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων με εναλλαγές στη θερμοκρασία. Σε κάθε κύκλο, ο νεοσυντιθέμενος κλώνος λειτουργεί ως «εκμαγείο» για τη σύνθεση νέων, πολλαπλασιάζοντας εκθετικά την αλληλουχία στόχο.

Μια βασική αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα εξής συστατικά και αντιδραστήρια:

- ✓ Το υπόστρωμα DNA που περιέχει την περιοχή που θα ενισχυθεί
- ✓ Ένα ζεύγος εκκινητών, έμπροσθεν (forward) και ανάστροφος (reverse), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ο καθένας στο 3' άκρο της κωδικής και της μη κωδικής αλυσίδας αντίστοιχα του DNA στόχου
- ✓ Ένζυμο Taq πολυμεράση ή οποιαδήποτε άλλη πολυμεράση με ιδεατή θερμοκρασία περίπου στους 70°C
- ✓ Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), που αποτελούν τους δομικούς λίθους με τους οποίους η πολυμεράση συνθέτει τη νέα αλυσίδα
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο προσφέρει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη μέγιστη δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου
- ✓ Δισθενή ιόντα, συνήθως Mg^{2+} , τα οποία δρουν ως συμπράγοντες του ενζύμου, απαραίτητα για την εύρυθμη δραστηριότητά του

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

1. **Το στάδιο της αποδιάταξης.** Στο στάδιο αυτό αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA στις δύο μονόκλωνες αλυσίδες του, σε υψηλή θερμοκρασία 94-95°C
2. **Το στάδιο της υβριδοποίησης.** Στο στάδιο αυτό υβριδοποιούνται οι εκκινητές (primers) στις αποδιαταγμένες αλυσίδες. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Η T_m υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: $T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων G+C}) + (\text{αριθμός βάσεων A+T})$, ενώ η T_a ισούται με $T_m - 5$
3. **Το στάδιο της επιμήκυνσης.** Στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο Taq πολυμεράση, το οποίο αναγνωρίζοντας τους εκκινητές επιμηκώνει την επιθυμητή αλληλουχία. Η θερμοκρασία για την αντίδραση επιμήκυνσης είναι 72-74°C

Στην παρούσα εργασία, η αντίδραση PCR έγινε με σκοπό την ενίσχυση του εξονίου 3 του γονιδίου TACI, καθώς σε αυτό εμφανίζεται ο πολυμορφισμός C104R.

➤ Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

94°C for 30 sec

94°C for 30 sec

55°C for 30 sec

72°C for 45 sec

72°C for 5 min

} × 32 cycles

➤ Taq Polymerase: "My Taq DNA Polymerase"

1. Taq Mix: Add 50μl H₂O and 2.2μl Taq
2. 6μl added to 22μl of the PCR Mastermix

➤ PCR Mastermix

REAGENT	VOLUME (μl)
Ultrapure water	225
MyTaq 5xReaction Buffer	96
Forward primer (20pmol)	17
Reverse primer (20pmol)	17

Για κάθε δείγμα προσθέτουμε στο PCR tube 22μl από το Mastermix, 6μl από το My Taq Mix (στον απαγωγό) και 2μl από το DNA (εκτός απαγωγού). Ακόμη, κάνουμε και ένα «τυφλό» δείγμα το οποίο αντί για τα 2 μl DNA έχει 2μl νερό. Αυτό θα μας δείξει αν έγινε κάποια επιμόλυνση.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ο C104R (5' – GCT CCT GAG CTT GTT CCC AC – 3') και ο TACI 3S (5' – ATC AAA ATG CAA TGC AGC TAA A – 3'), με σκοπό την ενίσχυση του εξονίου 3 του γονιδίου TACI. Ο reverse υποκινητής (C104R) τροποποιήθηκε στο 3' άκρο του, έτσι ώστε να δημιουργεί θέση κοπής στο γονιδίωμα από το περιοριστικό ένζυμο BtgI, σε περίπτωση που υπάρχει ο πολυμορφισμός.

Με gel αγαρόζης 2% επιβεβαιώνεται πως δεν έχει γίνει κάποια επιμόλυνση και πως υπάρχει το επιθυμητό προϊόν (337bp).

Ανάλυση-ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης μορίων με εφαρμογή στη μοριακή βιολογία, τη βιοχημεία, την πρωτεϊνική χημεία κ.α. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος καθώς και το διαχωρισμό μιγμάτων μορίων τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές, όπως φυγοκέντρηση με βαθμίδωση πυκνότητας. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει κάθε μόριο το οποίο φέρει φορτίο – από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα κλπ.

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα, μετανάστευση). Η απεικόνιση των μορίων γίνεται με την βοήθεια φθορίζοντων χρωστικών, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο ενσωματώνεται εντός των βάσεων του DNA και προσδίδει μπλε χρώμα όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως (UV light). Οι διάφορες μπάντες που εμφανίζονται, στην ουσία απεικονίζουν τα διαφορετικά νουκλεϊκά οξέα με διαφορετικά μοριακά βάρη. Η «μονάδα μέτρησης» που χρησιμοποιείται είναι τα ζεύγη βάσεων (bp) ή κιλοβάσεις (kb). Ο καθορισμός του μεγέθους πραγματοποιείται με βάση κάποιο εμπορικά διαθέσιμο μοριακό δείκτη (DNA marker), περιέχει ευθύγραμμα τμήματα DNA γνωστού μεγέθους.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του τμήματος που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA καθορίζεται από τις εξής παραμέτρους:

- ✓ **Το μέγεθος του DNA.** Δίκλωνα γραμμικά μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους
- ✓ **Τη συγκέντρωση της αгарόξης.** Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αгарόξης
- ✓ **Τη στερεοδιάταξη του DNA.** Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή, η ανοικτή κυκλική μορφή και γραμμικό DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αгарόξης
- ✓ **Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται.** Σε χαμηλή τάση ρεύματος ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης, ενώ όσο αυξάνεται η τάση η κινητικότητα τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για το κάθε τμήμα
- ✓ **Την παρουσία χρωστικών.** Το βρωμιούχο αιθίδιο μειώνει την ηλεκτροφορητική ικανότητα των γραμμικών μορίων περίπου κατά 15%, λόγω του γεγονότος ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το μήκος τους και καθιστώντας τα πιο άκαμπτα
- ✓ **Τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (buffer).** Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη με αποτέλεσμα το DNA να κινείται με αργό ρυθμό, ενώ υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να οδηγήσει σε τήξη του πηκτώματος και αποδιάταξη του DNA λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που προκαλείται από την αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η διαδικασία δημιουργίας ενός gel περιεκτικότητας 2% σε αгарόξη είναι η εξής:

Ζυγίζονται 2gr αгарόξης τα οποία προστίθενται σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθενται 100ml 1×TBE (Invitrogen). Η κωνική στη συνέχεια τοποθετείται στα μικροκύματα μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αгарόξη. Μόλις κρυώσει το μείγμα προστίθενται 8ml βρωμιούχου αιθιδίου και γίνεται καλή ανάδευση. Το διάλυμα, έπειτα, μεταφέρεται σε ειδικό καλούπι ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο σχήμα μέχρι να πολυμεριστεί η αгарόξη και να πήξει. Μετά την απόχυση του μείγματος στο καλούπι, τοποθετήθηκαν μια σειρά από «χτενάκια»,

ώστε να δημιουργηθούν οι χαρακτηριστικοί υποδοχείς (wells, πηγαδάκια) για την φόρτωση των δειγμάτων. Μόλις πήξει το πήκτωμα, τα χτενάκια αφαιρούνται και το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, η οποία ήταν γεμάτη με διάλυμα 1×TBE. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως η εταιρεία παρέχει 10× TBE, το οποίο περιέχει 1M Tris, 0,9M βορικό οξύ και 0,01M EDTA. Προκειμένου να πάρουμε 1×TBE προσθέτουμε 50ml 10×TBE και 450ml νερό.

Για να γίνει η φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα αгарόζης, είναι απαραίτητη η ανάμιξη του δείγματος με το διάλυμα φόρτωσης ή loading buffer. Το loading buffer αποτελείται από χρωστικές (π.χ. μπλε της βρωμοφαινόλης) οι οποίες είναι ορατές με γυμνό μάτι, και βοηθούν στην παρακολούθηση τόσο της φόρτωσης όσο και της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Εκτός από τις χρωστικές, περιέχει γλυκερόλη, που βοηθάει ώστε το DNA να καθιζάνει στο βάθος του πηγαδιού. Για την φόρτωση στο πήκτωμα αναμειγνύονται 5μl από το δείγμα και 3μl από το loading buffer. Μόλις γίνει η φόρτωση, η συσκευή συνδέεται στην παροχή εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Το πήκτωμα τοποθετείται έτσι ώστε τα δείγματα να κινηθούν προς την άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 30' στα 120V. Μόλις εξακριβωθεί πως δεν έχει γίνει επιμόλυνση και πως έχουμε πάρει σωστά προϊόντα, γίνεται πέψη με περιοριστικό ένζυμο σε κάθε προϊόν PCR.

Πέψη με περιοριστικό ένζυμο

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA.

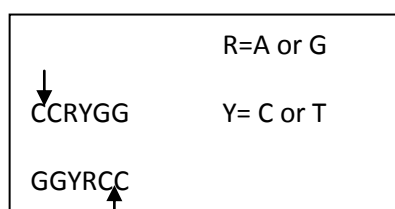
Λόγω του επαναλήψιμου τρόπου πέψης, τα ένζυμα αυτά επιτρέπουν

1. Τη χαρτογράφηση των αλληλουχιών DNA
2. Την πέψη (τεμαχισμό) μιας αλληλουχίας DNA σε μικρά τμήματα τα οποία είναι δυνατόν να μελετηθούν χωριστά
3. Την επανασύνδεση των τμημάτων αυτών είτε για την επανασυγκρότηση της αρχικής αλληλουχίας είτε για τη δημιουργία νέων ανασυνδυασμένων αλληλουχιών

Τα ένζυμα περιορισμού απομονώνονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, στα οποία ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να παρέχουν προστασία έναντι της εισβολής βακτηριοφάγων. Τα ένζυμα περιορισμού διακρίνονται σε τρεις τύπους. Τα ένζυμα τύπου I αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA σε απόσταση 1000 έως 5000 νουκλεοτιδίων, τα ένζυμα τύπου II αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA εσωτερικά της αλληλουχίας αυτής, ενώ τα ένζυμα τύπου III αναγνωρίζουν την αλληλουχία και τέμνουν το DNA σε απόσταση 20 περίπου νουκλεοτιδίων. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται μόνο ένζυμα περιορισμού τύπου II. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού αφήνουν 5' μονόκλωνα άκρα, ενώ υπάρχουν και άλλα που δημιουργούν 3' μονόκλωνα άκρα ή άλλα που κόβουν ακριβώς στην ίδια θέση στο δίκλωνο DNA δημιουργώντας τυφλά άκρα. Δεδομένου ότι το DNA αποτελείται από επαναλήψεις τεσσάρων διαφορετικών νουκλεοτιδίων, η πιθανότητα μια αλληλουχία DNA να παρουσιάζει θέσεις για ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν τετρανουκλεοτίδια είναι $(1/4)^4$.

Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης και τη σύσταση του ρυθμιστικού τους διαλύματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα καθορίζει το pH και την ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος, στο οποίο θα δράσει το ένζυμο. Το pH του διαλύματος διατηρείται σταθερό από την παρουσία Tris-HCl, ενώ η ιοντική ισχύς καθορίζεται κυρίως από τα ιόντα Mg^{+2} και Na^{+} που περιέχονται σε αυτό. Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητας του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.

Στην παρούσα μελέτη σαν ένζυμο περιορισμού χρησιμοποιήθηκε το BtgI από την εταιρεία New England Biolabs. Η συσκευασία περιέχει εκτός από το ένζυμο, το CutSmart buffer το οποίο είναι απαραίτητο για την δημιουργία του BtgI mix. Το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει και κόβει την εξής αλληλουχία:



Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως ο reverse εκκινητής (C104R) τροποποιήθηκε στο 3' άκρο του, έτσι ώστε να δημιουργείται θέση αναγνώρισης από το BtgI σε περίπτωση που υπάρχει ο πολυμορφισμός.

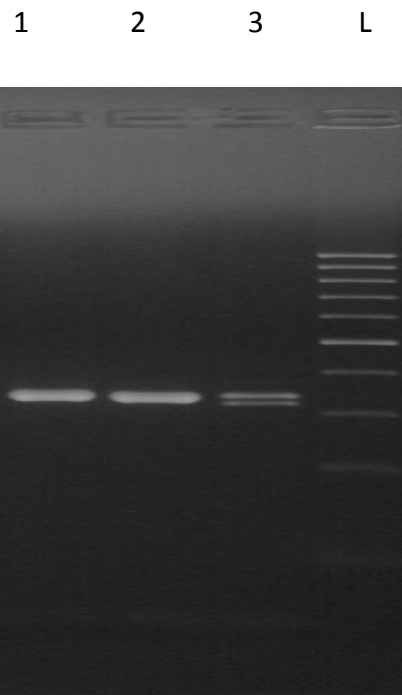
Τα συστατικά του BtgI mix είναι:

dH ₂ O	150μl
CutSmart buffer 10×	30μl
BtgI enzyme	5μl

Το CutSmart buffer 10× περιέχει 500mM οξικό κάλιο, 200mM τρις-οξικό, 100mM οξικό μαγνήσιο και 1000μg/ml BSA.

Για την πέψη τοποθετούμε 9μl από το BtgI mix και 6μl από το προϊόν της PCR σε ένα PCR tube. Στη συνέχεια κάνουμε μια σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες σε υδατόλουτρο. Για την οπτικοποίηση του αποτελέσματος γίνεται ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 3%. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε gel αγαρόζης 3% διότι είναι απαραίτητη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Η διαδικασία απεικόνισης είναι ίδια με αυτή που ήδη αναφέρθηκε, μόνο που σε αυτή τη περίπτωση φορτώνονται 8μl από το προϊόν της πέψης και 3μl από την χρωστική. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 90'. Σε κάθε πέψη χρησιμοποιείται ένα control, το οποίο έχει ταυτοποιηθεί ως θετικό και με αλληλούχηση.

Τα ετερόζυγα θετικά στον πολυμορφισμό δείγματα παρουσιάζουν μια μπάντα 337 bp και μια 316bp, ενώ η μπάντα των 21bp δεν είναι ορατή στο gel. Παρακάτω φαίνεται ένα gel, όπου κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν φέρει τον πολυμορφισμό.



1: Negative sample for the mutation

2: Negative sample for the mutation

3: Positive sample for the mutation

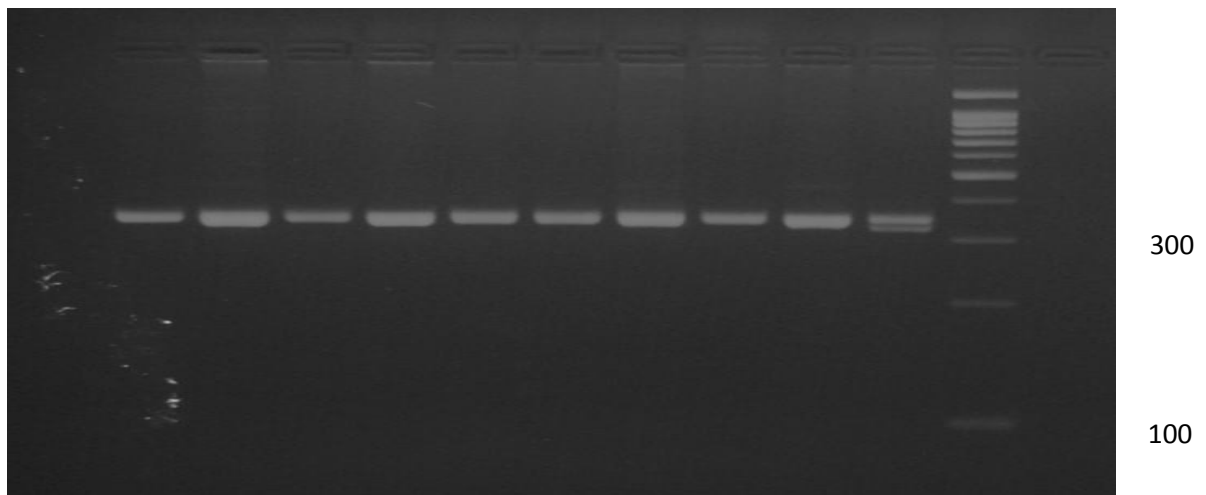
L: Ladder

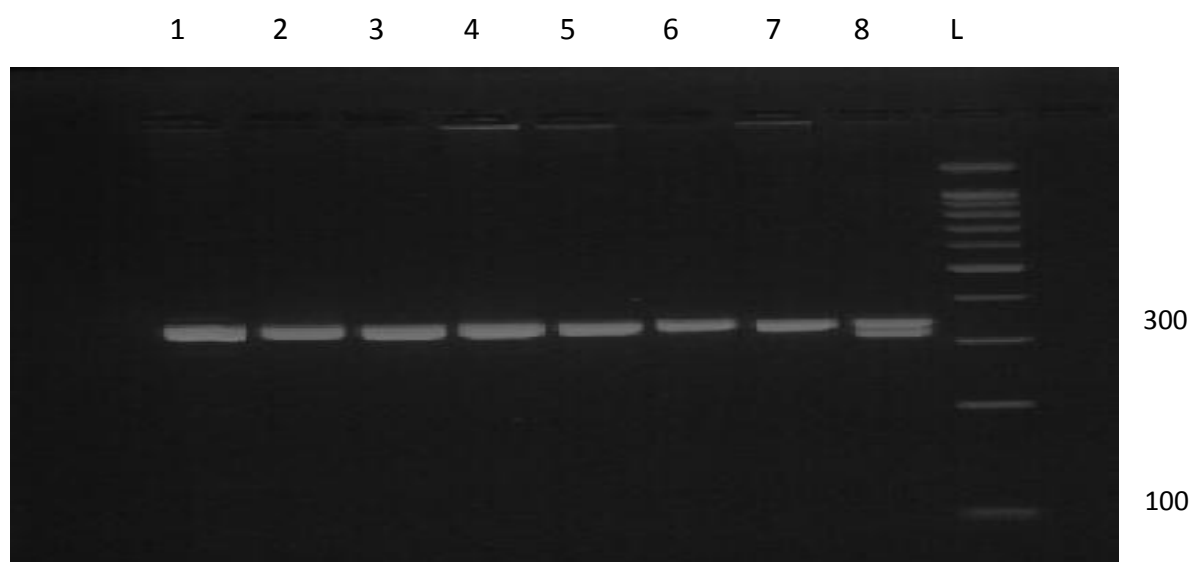
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος ανίχνευσης της μετάλλαξης C104R που αναφέρθηκε παραπάνω εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα, χωρίς όμως να ανιχνευθεί η μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά. Παρακάτω φαίνονται οι εικόνες από τα gel των πέψεων, οι οποίες επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα. Σε όλες τις εικόνες το δείγμα αριστερά του δείκτη είναι το control.

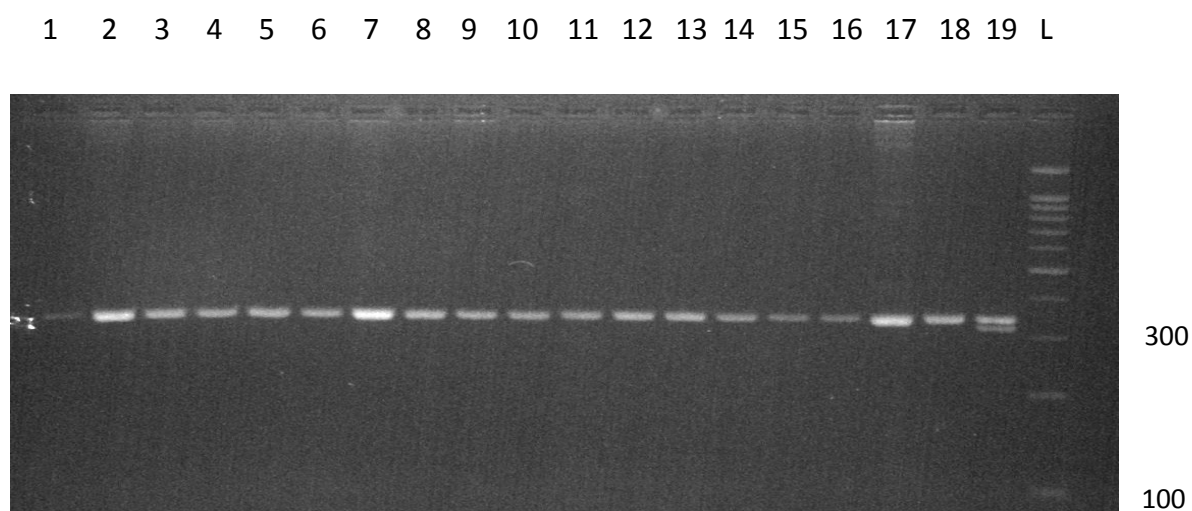
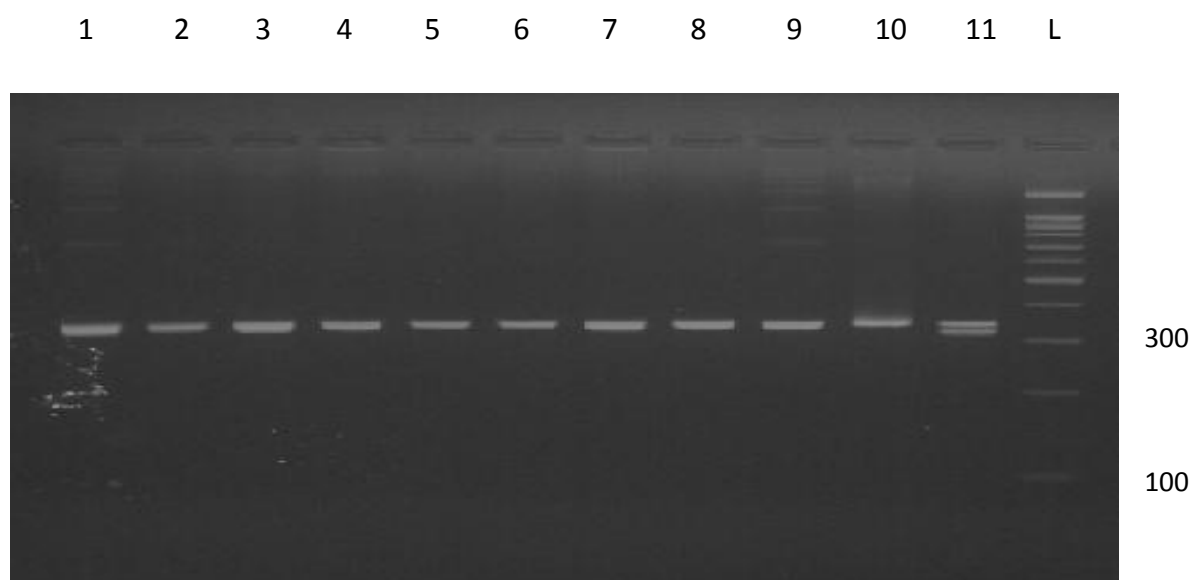
Δείγματα NHL:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 L

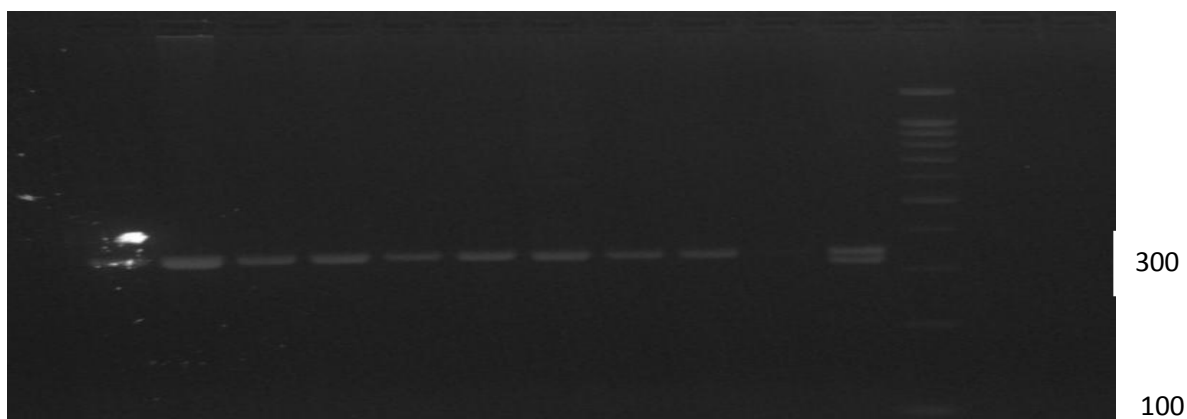




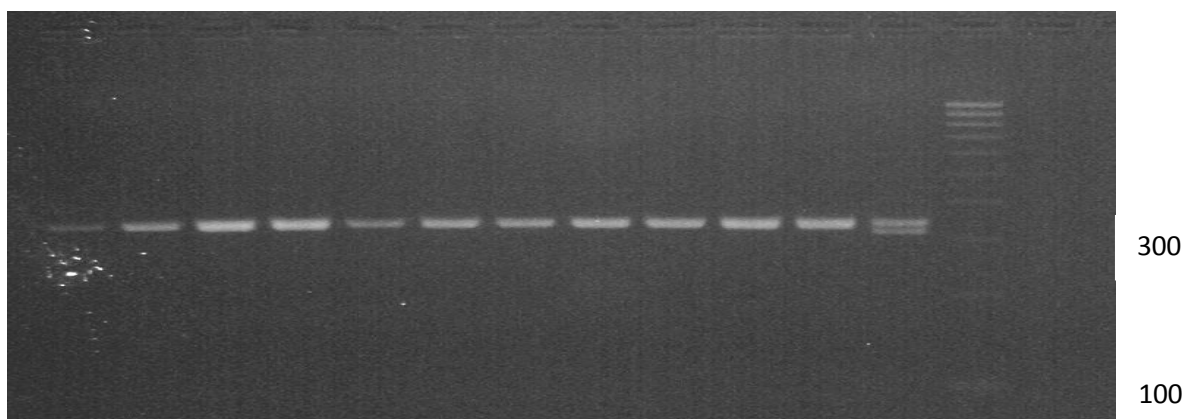
Δείγματα CLL:



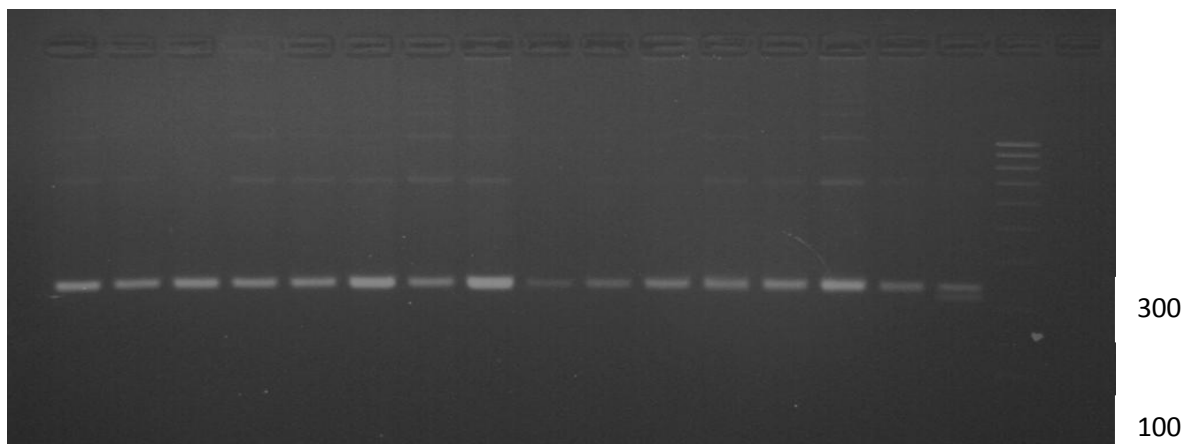
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 L



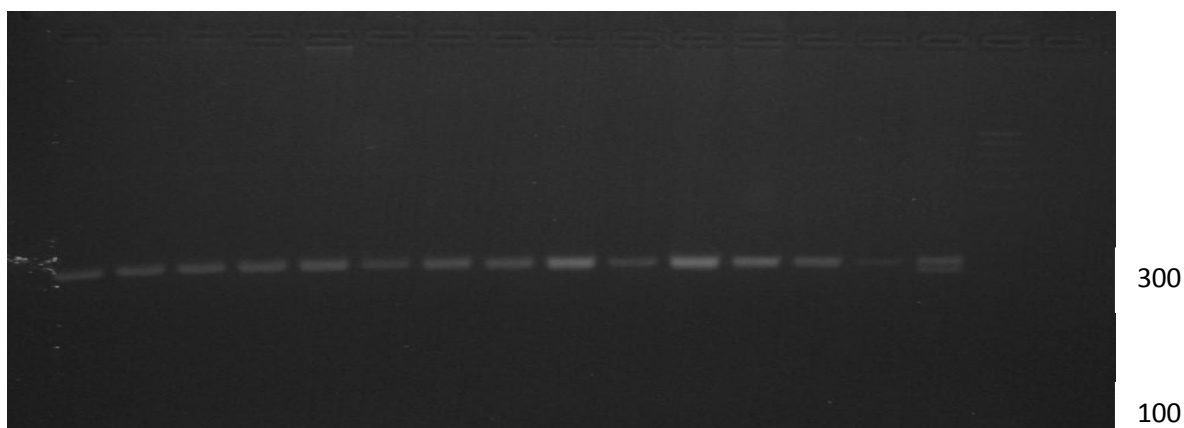
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 L



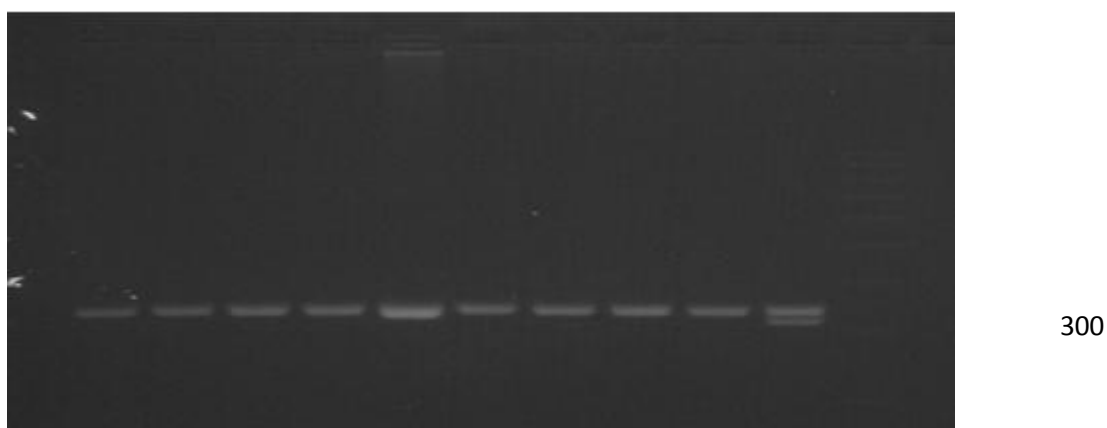
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 L



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 L



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 L



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση του πολυμορφισμού C104R του γονιδίου TACI σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, όπως το Non-Hodgkin Λέμφωμα (NHL) και την Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (CLL). Μετά το πέρας του πειραματικού μέρους τελικά δεν βρέθηκε ο πολυμορφισμός σε κανένα από τα 103 δείγματα. Αυτό υποδηλώνει πως ίσως δεν υπάρχει κάποια σύνδεση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.

Αν και ο αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν ήταν ικανοποιητικός στατιστικά, περεταίρω μελέτες που θα συμπεριλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών θα διευκρινίσουν πιο αποτελεσματικά τον ρόλο του πολυμορφισμού C104R του γονιδίου TACI στα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν εμφανίζεται συχνά στον πληθυσμό, οπότε θα ήταν πιο αντιπροσωπευτικό να αυξηθεί ο αριθμός των ασθενών με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.

Επίσης, η μελέτη έγινε σε ασθενείς που έπασχαν από χαμηλού βαθμού κακοήθειας λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Στο μέλλον, θα ήταν ωφέλιμο να εξεταστούν ασθενείς που πάσχουν από υψηλού βαθμού κακοήθειας λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, διότι είναι πιθανό να φέρουν αυτοί τον πολυμορφισμό, και να αποτελεί τελικά προδιαθεσικό παράγοντα.

Όπως προαναφέρθηκε, ο πολυμορφισμός C104R βρίσκεται στο εξωκυτταρικό μέρος του υποδοχέα, και αναστέλλει την σύνδεση των προσδετών BAFF και APRIL στον υποδοχέα, και έτσι δεν πραγματοποιείται η μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Η παρούσα εργασία, μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για μελλοντικές μελέτες, ώστε να μελετηθούν άλλοι πολυμορφισμοί στο εξωκυτταρικό μέρος του υποδοχέα σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Μπορεί, λοιπόν, να αποτελεί άλλος πολυμορφισμός του TACI προδιαθεσικό παράγοντα για την εμφάνιση λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων.

Ολοκληρώνοντας, αν και η παρούσα μελέτη δεν υπέδειξε κάποιο συγκεκριμένο συσχετισμό ανάμεσα στον πολυμορφισμό C104R και στην παθογένεια λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων χαμηλού βαθμού κακοήθειας, αποτελεί αφετηρία για την μελέτη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε λεμφοϋπερπλασίες υψηλού βαθμού κακοήθειας, αλλά και άλλων πολυμορφισμών που εμφανίζονται στον υποδοχέα σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kathrin Pieper, Bodo Grimbacher, Hermann Eibel. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013;131:959-971.
2. Fabienne Mackay, Pascal Schneider, TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Elsevier* 2008;19:263-276.
3. Μ.Γ. Σπελέτας, Α.Ε. Γερμενής. Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες στους ενήλικες: Σύγχρονη κλινική προσέγγιση. *Archives of Hellenic Medicine* 2013;30(4):420-435.
4. Ulrich Salzer, Bodo Grimbacher. Common variable immunodeficiency: The power of co-stimulation. *Seminars in immunology* 2006;18:337-346.