



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανίχνευση GLA μεταλλάξεων σε ασθενείς με πιθανό Οικογενή
Μεσογειακό Πυρετό (FMF)**

Ζωή-Ειρήνη Χριστώνη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» με εξειδίκευση στη Ανοσολογία.

Λάρισα, Οκτώβριος, 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Detection of GLA mutations in patients with possible Familial
Mediterranean Fever (FMF)**

By

Zoi-Eirini Christoni

Three-member examining committee:

- Mathaios Speletas, Associate Professor of Laboratory Immunology, Supervisor
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology
- Efthimia Peteinaki, Associate Professor of Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in “Clinical Applications of Molecular Medicine” with specialization in Immunology.

Larissa, October, 2015

~ 1 ~

*Στους γονείς μου γιατί μου έμαθαν να πιστεύω σε εμένα,
στο σύζυγο μου για την αγάπη και την υπομονή του,
στην κορούλα μου για όλη τη δύναμη που μου δίνει*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ-KEYWORDS.....	9
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1. ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ (ΟΜΠ).....	11
1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	11
1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF.....	12
1.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	13
1.3.1 Το γονίδιο MEFV.....	13
1.3.2 Η πρωτεΐνη πυρίνη.....	16
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	18
1.4.1 Συχνότητα.....	18
1.4.2 Φύλο.....	19
1.4.3 Ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα.....	19
1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF.....	21
1.6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF.....	24
1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF.....	28
1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF.....	30
2. ΝΟΣΟΣ FABRY.....	32
2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	32
2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	33
2.2.1 Το γονίδιο GLA.....	33
2.2.2 Το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση Α.....	35
2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY.....	36
2.3.1 Συχνότητα.....	36
2.3.2 Φύλο.....	36
2.3.3 Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος.....	37
2.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY.....	38
2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY.....	39
2.5.1 Ιστολογική διάγνωση.....	39
2.5.2 Βιοχημική διάγνωση.....	41

2.5.3	Μοριακή διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου GLA.....	41
2.6	ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY.....	42
3.	ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ	44
4.	ΣΚΟΠΟΣ	45
	Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
5.	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	47
5.1.	ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	47
5.2.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	47
5.2.1	Απομόνωση (εξαγωγή) DNA.....	47
5.2.2	Γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του MEFV.....	49
5.2.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων του GLA γονιδίου.....	54
5.2.4	Αλληλούχιση DNA.....	62
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
6.1	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ MEFV.....	63
6.2	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GLA.....	66
7.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο «Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας», Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Μου δίνεται η ευκαιρία με την περάτωση αυτής της εργασίας να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου όλους όσους με στήριξαν και υπήρξαν συνοδοιπόροι μου σε αυτό το «ταξίδι» για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού. Είναι αδύνατο να φέρνεις εις πέρας ένα τέτοιο πόνημα χωρίς θυσίες και συμπαράσταση. Θα ήθελα να τονίσω με κάθε ειλικρίνεια ότι χωρίς την βοήθεια αυτών των ανθρώπων δε θα βρισκόμουν τώρα σε θέση να τους ευχαριστώ!

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Ματθαίο Σπελέτα, επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή για την ευκαιρία που μου έδωσε να υπάρξω μέλος του εργαστηρίου του και για τη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Εύα Γραμμουστιάννου για όλα όσα μου δίδαξε, στην Ευαγγέλια Καραμούτη που ήταν πάντα δίπλα μου ότι και να χρειάστηκα, στη Ζωή Φλώρου και την Ειρήνη Σεβδαλή για τις γνώσεις τους στην αλληλούχιση, στους Γεδεών Λουλέ και Λουκία Ποταμιάνου για τη βοήθειά τους στην αλληλούχιση DNA κατά Sanger, και τέλος στη Φαίδρα Παρσοπούλου, Αδάμ Μολυβδά και Γερασιμίνα Τσιντή για την άψογη καθόλα συνεργασία.

Τα λόγια και οι ευχαριστίες δεν είναι φυσικά αρκετά για να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου, στους γονείς μου Βικτώρια και Χρήστο, στο σύζυγό μου Ραφαήλ και στην κορούλα μου Ραφαέλα. Τους ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου για τη στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη που μου προσέφεραν απλόχερα όλο αυτό το διάστημα, και υπόσχομαι να αναπληρώσω όσο καλύτερα μπορώ αυτές τις ατέλειωτες ώρες απουσίας μου!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος FMF (Familial Mediterranean Fever) ονομάζεται οικογενής μεσογειακός πυρετός (ΟΜΠ) και ανήκει στην ομάδα των συνδρόμων του κληρονομούμενου περιοδικού πυρετού (Hereditary periodic fever), και πιο συγκεκριμένα στα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα. Είναι μία σπάνια μονογενής διαταραχή και χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού, που μπορεί να διαρκέσουν από λίγες ημέρες έως λίγες εβδομάδες, ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλονται απύρετα χρονικά διαστήματα ποικίλης χρονικής διάρκειας.

Η νόσος Fabry είναι μία σπάνια φυλοσύνδετη γενετική διαταραχή που οφείλεται στην ανεπάρκεια του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α και χαρακτηρίζεται από υπερβολική συσσώρευση του λιπιδίου GL-3 (σφαιροτριοζυλοκεραμίδιο) στους ιστούς του οργανισμού.

Τόσο η νόσος FMF όσο και η νόσος Fabry είναι κληρονομικές διαταραχές οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητες στην περίοδο έναρξης των συμπτωμάτων και στις κλινικές εκδηλώσεις τους. Πιο συγκεκριμένα, και στα δύο νοσήματα καταγράφονται στην παιδική ηλικία επαναλαμβανόμενα εμπύρετα επεισόδια, κοιλιακό άλγος, πόνος στις αρθρώσεις, γαστρεντερικές διαταραχές και νεφρική ανεπάρκεια.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η νόσος Fabry είναι μία λυσοσωματική ενζυμοπάθεια που συχνά υποδιαγιγνώσκεται, καθώς οι κλινικές της εκδηλώσεις συμπίπτουν με τη συμπτωματολογία διαφόρων άλλων συστημικών και ρευματικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του οικογενή μεσογειακού πυρετού (FMF). Ο Zizzo και οι συνεργάτες του στην εργασία με τίτλο "Misdiagnosis of Familial Mediterranean Fever in patients with Anderson-Fabry disease" έθεσαν ως στόχο την ταυτοποίηση περιστατικών με λανθασμένη FMF κλινική διάγνωση και / ή υποδιάγνωση της νόσου Fabry. Από το σύνολο των 42 ασθενών με FMF κλινική διάγνωση, ανιχνεύθηκαν σε 3 από αυτούς μεταλλάξεις στο γονίδιο GLA, ενισχύοντας την υπόθεση της υποδιάγνωσης της νόσου Fabry. Επιπροσθέτως στους δύο από τους τρεις ασθενείς ανίχνευσαν μία μονή ετερόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο MEFV, ενώ στον ένα δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο MEFV.

Η εργασία του Zizzo και των συνεργατών του έδωσε το έναυσμα για την παρούσα διπλωματική εργασία, της οποίας ο στόχος ήταν η ανίχνευση πιθανών GLA μεταλλάξεων σε ετερόζυγους FMF ασθενείς που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο «Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας», Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 2012-2015.

ABSTRACT

FMF disease (Familial Mediterranean Fever) belongs to the group of syndromes of hereditary periodic fever. FMF is a rare inherited autosomal recessive autoinflammatory disorder, characterized by recurrent fever attacks that may last from a few days up to a few weeks. However, between those attacks afebrile intervals of varying duration are reported. Fabry disease is a rare X-linked genetic disorder caused by the deficiency of the enzyme alpha-galactosidase A, and is characterized by the excessive accumulation of lipid GL-3 (globotriasylceramide) in the tissues of the body.

Both diseases are hereditary disorders that exhibit similarities in their onset of symptoms and their clinical manifestations. More specifically, during childhood in both diseases there are records of recurrent febrile episodes, abdominal pain, joint pain, gastrointestinal disorders and kidney failure. According to the literature, Fabry disease is a lysosomal enzymopathy often underdiagnosed because the symptomatology of the disease overlaps with the clinical manifestations of other systemic and rheumatic disorders, including familial Mediterranean fever (FMF). In the article "Misdiagnosis of Familial Mediterranean Fever in patients with Anderson-Fabry disease" Zizzo and his colleagues have set the objective of identifying cases with incorrect FMF clinical diagnosis and/or underdiagnosis of Fabry disease. From a total of 42 patients with FMF clinical diagnosis, 3 patients were detected to have GLA mutations, reinforcing the hypothesis of underdiagnosis of Fabry disease. In addition, in two out of three patients a single heterozygous mutation in the MEFV gene was detected, while in the third patient no mutation in the MEFV gene was detected.

The work of Zizzo and his associates triggered the present study, whose aim was the detection of possible GLA mutations in the heterozygous FMF patients of the laboratory "Immunology-Histocompatibility" School of Health Sciences Medical School, University of Thessaly during the period 2012-2015.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

bZIP	(Basic Leucine Zipper Domain) Βασική περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα
CAPS	(Cryopyrin Associated Periodic Syndrome) Σχετιζόμενα με την κρυοπυρίνη περιοδικά σύνδρομο
DNA	(Deoxy- Ribonucleic Acid) Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ERT	(Enzyme Replacement Therapy) Θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης
FCAS	(Familial Cold-induced Autoinflammatory Syndrome) Οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο εκ ψύχους
FD	(Fabry Disease) Νόσος Fabry
FMF	(Familial Mediterranean Fever) Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός
GL-3	(Globotriaosylceramide) Σφαιροτριαοζυλοκεραμίδιο
GLA	(Galactosidase alpha) Γαλακτοσιδάση Α
HIDS	(HyperImmunoglobulinemia D syndrome) Σύνδρομο υπερέκκρισης IgD με περιοδικό πυρετό
IFN-γ	(Interferon-γ) Ιντερφερόνη-γ
IL	(Interleukin) Ιντερλευκίνη
IL-1β	(Interleukin 1β) Ιντερλευκίνη 1β
MEFV	(Mediterranean Fever gene) Γονίδιο MEFV
NALP3	(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) Πρωτεΐνη Κρυοπυρίνη
NF-Κβ	(Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) Μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας Κβ
NLRs	(Nucleotide-binding Oligomerization Domain Receptors, NOD-like receptors) Υποδοχείς τύπου NOD
PAS	(Periodic Acid Schiff) Χρώση Υπεριωδικού Οξέος
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PYD	(Pyrin Domain) Περιοχή πυρίνη
RAPS	(Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome) Σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του TNF περιοδικό σύνδρομο
SNPs	(Single nucleotide polymorphisms) Απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί
SPRY	(SP1a and Ryanodine Receptor) Υποδοχέας SP1a και ριανοδίνης
WT	(Wild type) Άγριος τύπος

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Fabry, FMF, GLA, MEFV, PCR. α-γαλακτοσιδάση Α, Αλληλούχιση DNA, Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος, Αυτοσωματικό, Αυτοφλεγμονώδες Νόσημα, Εξόνιο, Επιδημιολογία, Κληρονομούμενος Περιοδικός Πυρετός, Κολχικίνη, Αμυλοείδωση, Κρυοπυρίνη, Μετάλλαξη, Νεφρική Ανεπάρκεια, Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός, Ορογονίτιδα, Παιδική ηλικία, Ποδοκύτταρο, Πολυμορφισμός, Πρωτεϊνουρία, Πυρετός, Πυρίνη, Σύνδρομο, Σφαιροτριοζυλοκεραμίδιο (GL3), Υβριδισμός, Υποδοχείς, Υπολειπόμενο, Φλεγμονή, Φλεγμονόσωμα, Φολιδωτά έγκλειστα λιπίδια, Φυλοσύνδετο, Ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα.

KEYWORDS

a-galactosidase A, Amyloidosis, Autoimmune diseases, Autosomal, Child, Colchicine, Colchicine, Cryopyrin, Diagnosis, DNA, Enzyme Replacement Therapy, Epidemiology, Fabry, Familial Mediterranean Fever, Familial Mediterranean Fever, Fever, FMF, GLA, Globotriaosylceramide, Hereditary periodic fever, Hybridization, Inflammasome, Inflammation, Receptors, Kidney diseases, MEFV, Misdiagnosis, Mutation, Nephropathy, PCR, Podocyte, Polymorphism, Pseudodominant inheritance, Recessive, Renal disease, Syndrome, Tumor Necrosis Factor, X-linked, Pyrin, Zebra bodies.

ΤΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ (ΟΜΠ)

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (ΟΜΠ) ανήκει στην ομάδα των συνδρόμων του κληρονομούμενου περιοδικού πυρετού (Hereditary periodic fever), και πιο συγκεκριμένα στα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα (1–3). Ο περιοδικός πυρετός χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού, που μπορεί να διαρκέσουν από λίγες ημέρες έως λίγες εβδομάδες, ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλονται απύρετα χρονικά διαστήματα ποικίλης χρονικής διάρκειας (2,3).

Τα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα αποτελούν μία ομάδα γενετικώς καθοριζόμενων διαταραχών που χαρακτηρίζονται από φαινομενικά απρόκλητα επεισόδια φλεγμονής, και σε αντίθεση με τα αυτοάνοσα νοσήματα, παρουσιάζουν έλλειψη αυτοαντισωμάτων υψηλού τίτλου ή αντιγονο-ειδικών T κυττάρων. Επιπροσθέτως, το πρόθεμα «αυτό» υποδηλώνει την απουσία εξωγενούς αιτιολογίας (2).

Οι διαταραχές των αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων εκδηλώνονται συχνά με πυρετό καθώς και φλεγμονώδη προσβολή των ορογόνων υμένων (ορογονίτιδα) με πόνο στην αντίστοιχη περιοχή (αρθρίτιδα, περικαρδίτιδα, περιτονίτιδα, πλευρίτιδα). Επίσης παρατηρείται φλεγμονή συγκεκριμένων οργάνων, όπως του δέρματος, του εντέρου και των οφθαλμών (2).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα σύνδρομα κληρονομικού περιοδικού πυρετού ανήκουν το σύνδρομο του οικογενούς μεσογειακού πυρετού (FMF-Familial Mediterranean Fever), το σύνδρομο υπερέκκρισης IgD με περιοδικό πυρετό (HIDS-HyperImmunoglobulinemia D syndrome), το σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του TNF περιοδικό σύνδρομο (TRAPS-Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Periodic Syndrome), το σύνδρομο πυογενούς στείρας αρθρίτιδας, γαγγραινώδους πυοδέρματος και ακμής (Papa-pyogenic Arthritis, Pyoderma gangrenosum, and Acne) και τέλος τα σχετιζόμενα με την κρυοπυρίνη περιοδικά σύνδρομα-(CAPS).

Στα σχετιζόμενα με την κρυοπυρίνη περιοδικά σύνδρομα-(CAPS) ανήκουν το οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο εκ ψύχους (FCAS- Familial Cold-induced Autoinflammatory Syndrome), το σύνδρομο Muckle-Wells (MWS) και το Χρόνιο Φλεγμονώδες Νευρολογικό Δερματικό Αρθρικό Σύνδρομο (CINCA- Chronic Infantile Neurologic, Cutaneous, Articular Syndrome), γνωστό και ως πολυσυστηματική

φλεγμονώδης νόσος νεογνικής έναρξης (Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease– NOMID) (4,5). Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων συνδρόμων κληρονομούμενου περιοδικού πυρετού (Πίνακας 1).

Σύνδρομο κληρονομικού περιοδικού πυρετού	Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Κληρονομικότητα	Πρωτεΐνη
FMF (OMIM 249100)	MEFV	(16p13.3)	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Πυρίνη/μαρενοστρίνη
TRAPS (OMIM 142680)	TNFRSF1A	(12p13)	Αυτοσωμική επικρατής	Υποδοχέας TNF 1
HIDS (OMIM 260920)	MVK	(12p24)	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Μεβαλονική κινάση
FCAS (CAPS) (OMIM 120100)	CIAS1	(1q44)	Αυτοσωμική επικρατής	Κρυοπυρίνη/NALP3/PYPAF1
MWS (CAPS) (OMIM 176270)	CIAS1	(1q44)	Αυτοσωμική επικρατής	Κρυοπυρίνη/NALP3/PYPAF1
CINCA/NOMID (CAPS) (OMIM 607115)	CIAS1	(1q44)	Αυτοσωμική επικρατής	Κρυοπυρίνη/NALP3/PYPAF1
PAPA (OMIM 604416)	CD2BP1	(15q24)	Αυτοσωμική επικρατής	CD2BP1/PSTPIP1 (CD2-binding protein 1)

Πίνακας 1: Σύνοψη των βασικών χαρακτηριστικών των κυριότερων συνδρόμων κληρονομούμενου περιοδικού πυρετού.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF

Συμφώνα με τους Drenth και van der Meer (1) φαίνεται ότι πρώτοι οι Janeway και Mosenthal περιέγραψαν το 1908 το περιστατικό ενός κοριτσιού εβραϊκής καταγωγής με υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού και κοιλιακό άλγος, συμπτώματα γνωστά πλέον στην ιατρική κοινότητα ως χαρακτηρίστηκα της νόσου FMF (6). Από το 1908 και για μισό περίπου αιώνα αργότερα καταγράφηκαν αρκετά παρόμοια περιστατικά, παρόλα αυτά η διαταραχή αυτή χαρακτηρίστηκε επισημά ως σύνδρομο οικογενούς μεσογειακού πυρετού ή νόσος FMF το 1958 από τον Heller και τους συνεργάτες του (7).

Σε αυτά τα 50 έτη που μεσολάβησαν δόθηκαν αρκετά ονόματα στη νόσο, όπως για παράδειγμα «πυρετός άγνωστης προέλευσης». Η πρώτη περιγραφή του μοντέλου που ακολουθούσε τα συμπτώματα της νόσου δόθηκε το 1949 από τον Siegal, ο οποίος ονόμασε τη νόσο «καλοήγη παροξυσμική περιτονίτιδα-Benign paroxysmal peritonitis» (8). Η νόσος

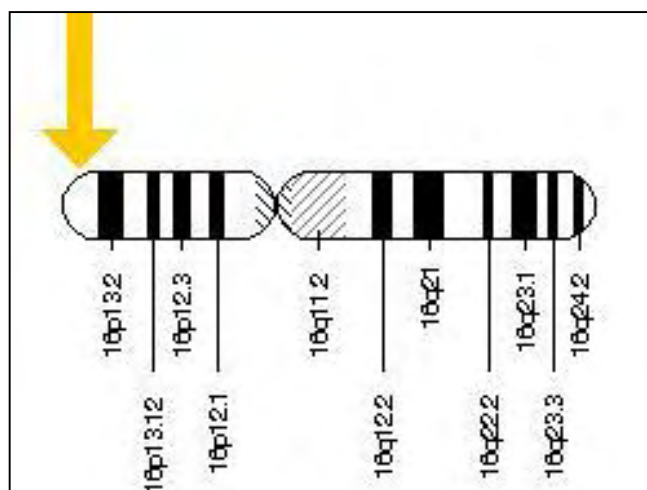
επίσης ονομάστηκε «Περιοδική Ασθένεια (Periodic disease)» τόσο από τον Reimann το 1949 (9), όσο και από τους Cattani και Mamou το 1951 (10). Μέχρι σήμερα ιστορικά η νόσος FMF ονομάζεται ακόμη και «σύνδρομο Siegal-Cattani-Mamou» ή ακόμη και «Περιοδική νόσος ή σύνδρομο του Reimann» ως φόρος τιμής σε όλους τους επιστήμονες που συνέβαλλαν στην ταυτοποίηση της νόσου αυτής (11).

Το 1997 ανακοινώθηκε μία μελέτη, η οποία μετά από ανάλυση μεταλλάξεων και συσχέτισμό απλοτύπων, κατέληξε στη χρονολόγηση της νόσου FMF 2500 χρόνια πριν, όταν οι σημερινοί πληθυσμοί ζούσαν μαζί στη λεκάνη της ανατολικής Μεσογείου. Από τότε συνεχείς μεταναστεύσεις πληθυσμών οδήγησαν σε εξάπλωση των μεταλλάξεων του γονιδίου MEFV και επομένως σε μεγαλύτερη διάδοση της νόσου FMF. Σήμερα η νόσος δεν περιορίζεται πλέον σε χώρες της ανατολικής Μεσογείου (12).

1.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

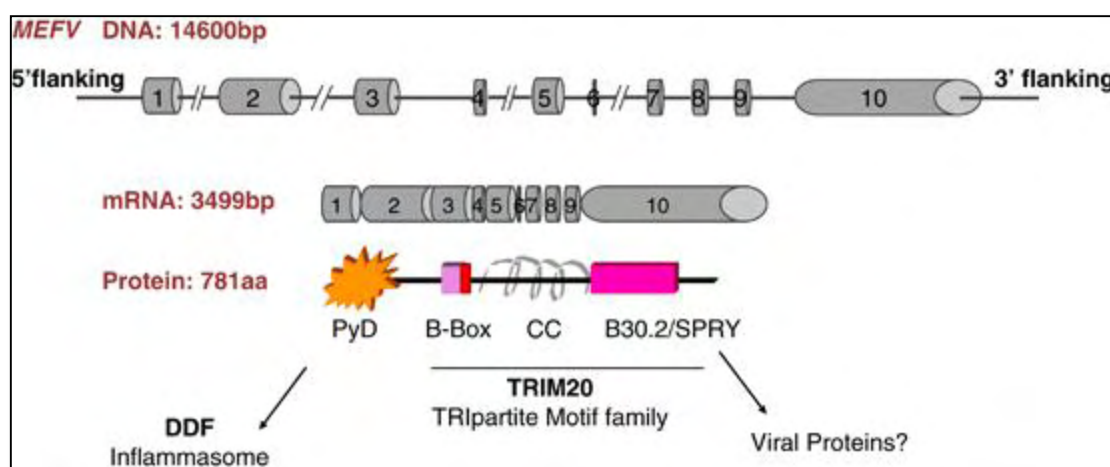
1.3.1 Το γονίδιο MEFV

Η νόσος FMF προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου FMF, γνωστό ως MEFV γονίδιο (Mediterranean Fever). Το γονίδιο αυτό έχει μέγεθος 14.6kb και εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16, και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή 16p13.3 (Εικ. 1). Αποτελείται από 10 εξόνια στη χρωμοσωμική περιοχή 16p13.3 (Εικ. 2) και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, την πυρίνη (pyrin, η οποία ονομάστηκε Marenostin το 1997 από τη γαλλική κοινοπραξία της FMF), η οποία εκφράζεται σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα (2).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της χρωμοσωμικής περιοχής της εντόπισης του **MEFV** γονιδίου. Το κίτρινο βέλος προσδιορίζει την περιοχή εντόπισης του MEFV γονιδίου πάνω στο χρωμόσωμα 16.

(Πηγή: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEFV>)



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου **FMF (MEFV)** και των προϊόντων έκφρασής του σε πρωτεϊνικά επίπεδα και επίπεδα RNA. Τα εξόνια παρουσιάζονται ως κύλινδροι, ενώ τα ιντρόνια ως γραμμές. Οι πρωτεϊνικές περιοχές απεικονίζονται μαζί με τις πιθανές λειτουργίες τους. Η αναδίπλωση της περιοχής θανάτου στην N-τελική περιοχή εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονής, μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων με φλεγμονοσώματα (inflammasomes). Η SPRY περιοχή είναι παρούσα σε πολλές πρωτεΐνες της οικογένειας του τριμερούς μοτίβου (TRIPartite motif family), η οποία πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με ιικά συστατικά.

(Πηγή: Grandemange et al., 2011)

Η χαρτογράφηση του FMF στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 ολοκληρώθηκε το 1992 (13), ενώ η κλωνοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου (MEFV) έλαβε χώρα το 1997 ξεχωριστά από τη γαλλική κοινοπραξία της FMF και τη διεθνή κοινοπραξία της FMF (12,14).

Το εξόνιο 2 και το εξόνιο 10 είναι οι μεγαλύτερες και οι πλέον πλούσιες σε μεταλλάξεις περιοχές του γονιδίου MEFV. Παρόλα αυτά, μεταλλάξεις έχουν επίσης αναφερθεί στα εξόνια 3, 5 και 9. Οι περισσότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι παρανοηματικές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο στο προϊόν του γονιδίου MEFV, η οποία είναι η πρωτεΐνη πυρίνη (pyrin/marenostrin).

Οι πιο κοινές μεταλλάξεις στο γονίδιο MEFV, οι οποίες μάλιστα εντοπίζονται στο εξόνιο 10, είναι η M694V (αντικατάσταση της μεθειονίνης από τη βαλίνη στο κωδικόνιο 694), η V726A (αντικατάσταση της βαλίνης από αλανίνη στο κωδικόνιο 726) και η M680I (αντικατάσταση της της μεθειονίνης από την ισολευκίνη στο κωδικόνιο 680). Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται περίπου στο 85% των πασχόντων από FMF. Ασθενείς που είναι ομόζυγοι για μία ή περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν βαρύτερες κλινικές εκδηλώσεις και έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση (15,16).

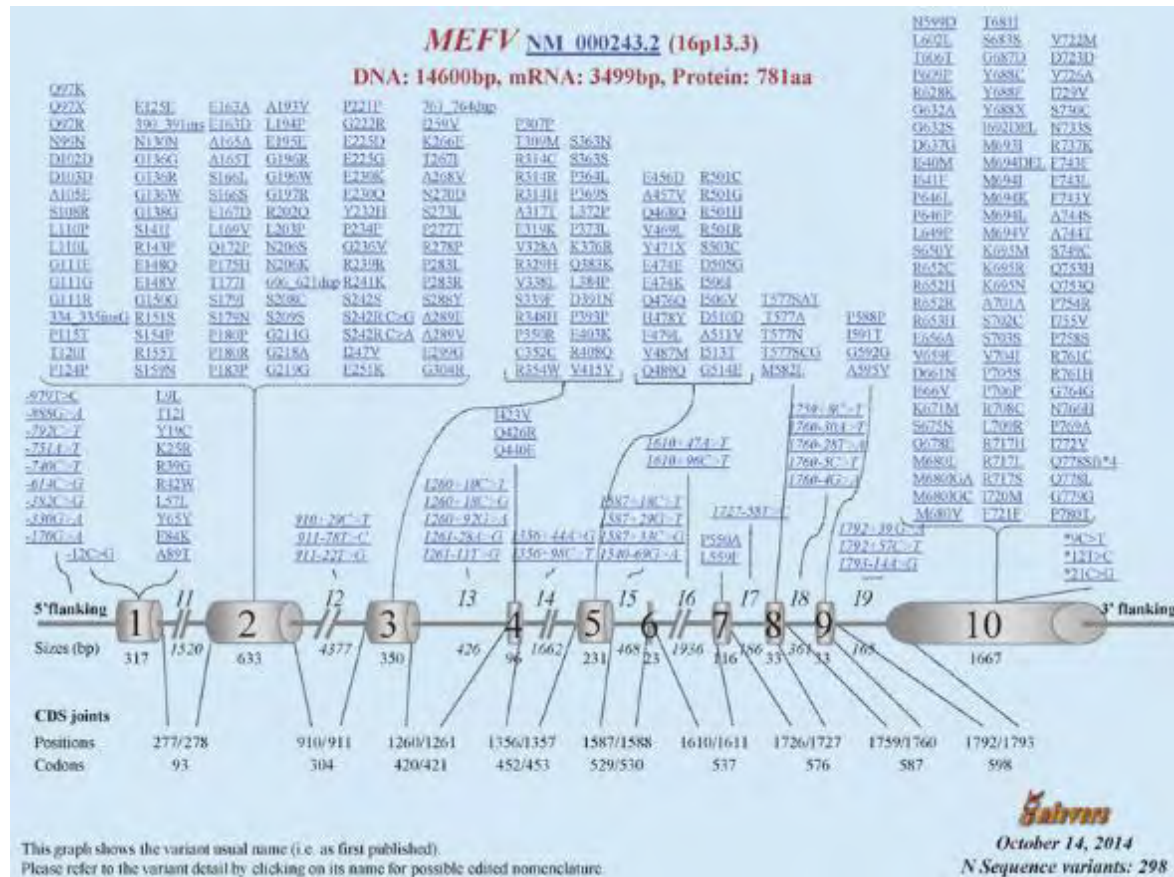
Μία ακόμη συχνή μετάλλαξη, η οποία βρίσκεται στο εξόνιο 2, είναι και η μετάλλαξη E148Q (αντικατάσταση της γλουταμίνης από το γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 148) (11,17). Για αυτό το λόγο τα περισσότερα εργαστήρια γενετικής ελέγχουν τους ασθενείς για τις πιο κοινές μεταλλάξεις στο εξόνιο 10, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις διενεργείται έλεγχος και για τη μετάλλαξη E148Q στο εξόνιο 2 (11). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τρεις από αυτές τις μεταλλάξεις, η E148Q, η V726A και η M694V, είναι πολύ αρχαίες και εμφανίστηκαν για πρώτη φορά πριν από 2500 χρόνια στη Μεσοποταμία (18).

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από 308 παραλλαγές αλληλουχίας (sequence variants) του γονιδίου MEFV στο Infervers database (19). Η κατανομή αυτών των παραλλαγών στα 10 εξόνια του γονιδίου παρουσιάζεται στην εικόνα 3. Αρκετές από αυτές τις παραλλαγές είναι παθογόνες μεταλλάξεις, παρόλα αυτά οι περισσότερες είναι είτε μη επιβεβαιωμένες παθογόνες είτε εμφανίζονται να είναι μη παθογόνες παραλλαγές (20).

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 90 μεταλλάξεις του MEFV που σχετίζονται με τη εμφάνιση της νόσου FMF, εκ των οποίων οι περισσότερες εντοπίζονται στο εξόνιο 10 (19,21). Πέντε από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μεταλλάξεις ανιχνεύονται στο 65%–95% των πασχόντων από FMF σε ομάδες διαφορετικών

εθνικοτήτων. Αυτές οι πέντε μεταλλάξεις είναι η p.M680I (c.2040G > C), p.M694V (c.2080A > G), p.M694I (c.2082G > A), and p.V726A (c.2177T > C), and p.E148Q (c.442G > C) (22).

Η FMF είναι μία νόσος σχετικά συχνή σε πληθυσμούς της Μεσόγειου, και το υψηλό ποσοστό φορέων που εμφανίζουν μη-νοσηματικές μεταλλάξεις υποδεικνύουν ότι αυτές οι παραλλαγές προσφέρουν ένα πλεονέκτημα επιβίωσης (23,24).



Εικόνα 3: Κατανομή των παραλλαγών αλληλουχίας του γονιδίου MEFV.

(Πηγή: <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=1>)

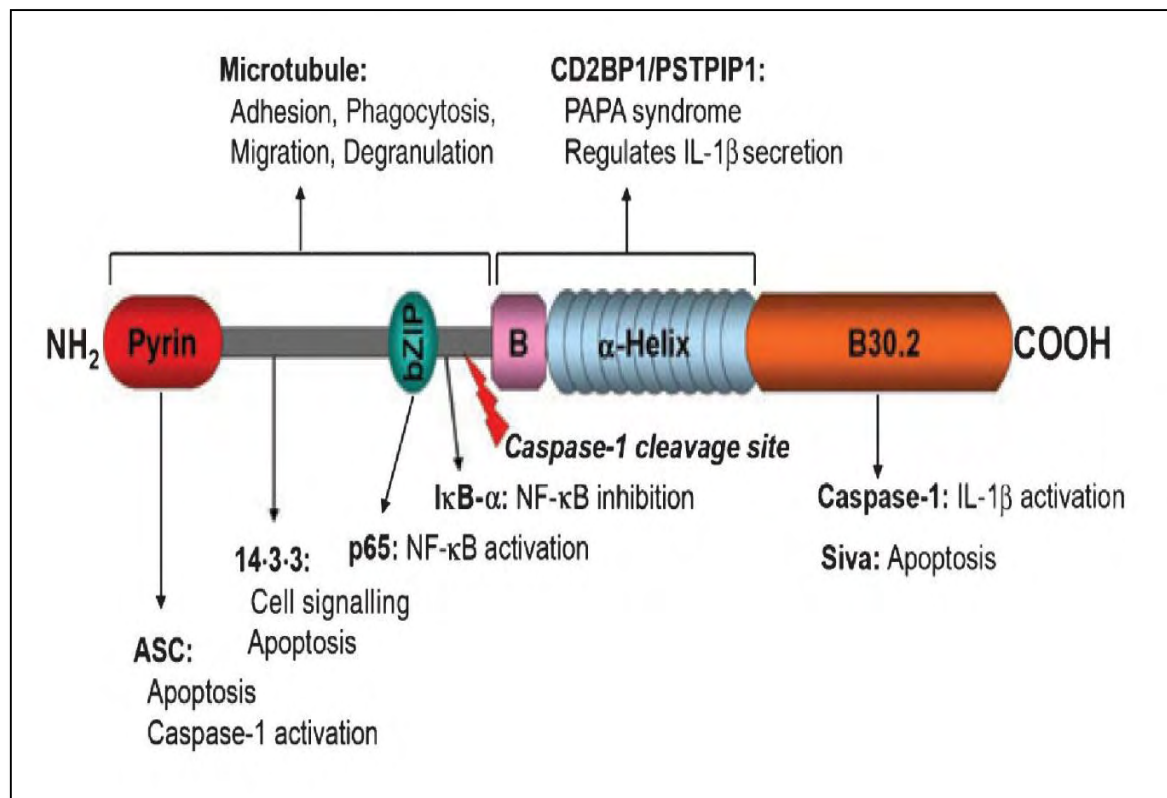
1.3.2 Η πρωτεΐνη πυρίνη

Η πυρίνη έχει μοριακό βάρος 86.000Da και αποτελείται από 781 αμινοξέα. Συγκεκριμένα η ανθρώπινη πρωτεΐνη πυρίνη αποτελείται από πέντε διακριτές περιοχές με ιδιαίτερη σημασία (2,25,26), οι οποίες εμφανίζονται στην εικόνα 4.

1. Την περιοχή πυρίνη (PYD) (κατάλοιπα 1-95), μία ειδική περιοχή που βρίσκεται στην N-τερματική περιοχή και ορίζει μία νέα κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζεται οικογένεια πυρινών. Η PYD έχει βρεθεί σε περισσότερες από 20 πρωτεΐνες με πιθανή συμμετοχή στη ρύθμιση της απόπτωσης και της φλεγμονής (27)
2. Τη βασική περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα bZIP (κατάλοιπα 266- 280)
3. Μία περιοχή με δάκτυλο ψευδαργύρου (B-box zinc-finger) (κατάλοιπα 375-407)
4. Μία περιοχή α-υπερέλικας (coiled-coil) (κατάλοιπα 408-594)
5. Μία περιοχή που ονομάζεται B30.2 ή SPRY και βρίσκεται στην C-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης (κατάλοιπα 698-774) και περιέχει τις συχνότερες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την νόσο FMF (28).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κάθε μία περιοχή της έχει ένα ξεχωριστό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης πυρίνης με άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη φλεγμονή μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου, στην έκκριση κυτταροκινών, στη μεταγραφική ρύθμιση και σηματοδότηση. Η ταυτοποίηση πολλαπλών «συνεργατών» που εμπλέκονται στην ικανότητα δέσμευσής της υποδεικνύει ότι η πυρίνη συμμετέχει σε αρκετά μοριακά μονοπάτια. Ωστόσο, καθώς έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη πυρίνη εμφανίζει περιορισμένη έκφραση σε κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, θεωρείται ότι ο σημαντικότερος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η ρύθμιση της φλεγμονής (26).

Η πυρίνη εκφράζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των ώριμων ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων και πιστεύεται ότι ρυθμίζει την εξαρτώμενη από τα ουδετερόφιλα φλεγμονή. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι η πυρίνη εμπλέκεται στις εκδηλώσεις που συνδέονται με το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο εμπλέκεται στην πρωτογενή άμυνα εναντίον βλαβερών παραγόντων και εξωγενών παθογόνων παραγόντων (29).



Εικόνα 4: Η δομή της πρωτεΐνης πυρίνης και οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά κάθε περιοχή της.

(Πηγή: Chae et al., 2009).

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

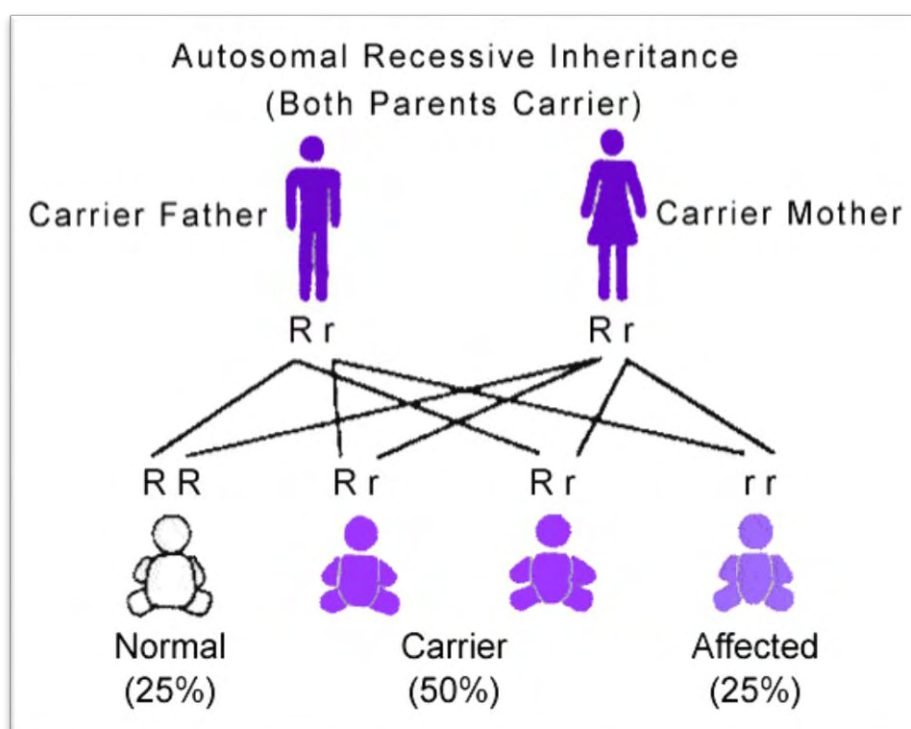
1.4.1 Συχνότητα

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός είναι ένα αυτοσωματικό υπολειπόμενο γενετικό νόσημα που εμφανίζεται σε πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, ενώ φαίνεται να προσβάλλει κυρίως Τούρκους, Άραβες, Εβραίους και Αρμένιους. Η συχνότητα της νόσου στους πληθυσμούς αυξημένου κινδύνου είναι περίπου 1–3 στους 1000 κατοίκους.

Την τελευταία δεκαετία έχει καταγραφεί ότι μεταλλάξεις του γονιδίου MEFV αποτελούν πλέον ένα κοινό γενετικό χαρακτηριστικό ανάμεσα στον Ελληνικό πληθυσμό (30,31). Πλέον η νόσος FMF παρατηρείται σε όλους τους πληθυσμούς (32).

1.4.2 Φύλο

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο οικογενής μεσογειακός πυρετός είναι ένα αυτοσωματικό υπολειπόμενο νόσημα που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου MEFV, και για αυτό το λόγο η ανάπτυξη της νόσου FMF έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την εμφάνιση δύο μεταλλαγμένων αλληλομόρφων του γονιδίου MEFV. Επίσης ο όρος αυτοσωματικό υποδηλώνει ότι η μετάδοση του ελαττωματικού γονιδίου είναι ανεξάρτητη του φύλου, καθώς υπάρχει η ίδια πιθανότητα μετάδοσης σε αγόρι και σε κορίτσι (Εικ. 5).



Εικόνα 5: Μετάδοση της νόσου FMF. Από ετερόζυγους γονείς για τη νόσο FMF υπάρχει 50% πιθανότητα να γεννηθεί ετερόζυγο παιδί για τη νόσο και 25% πιθανότητα να γεννηθεί παιδί που να έχει τη νόσο FMF (ανεξαρτήτου φύλου).

(Πηγή: http://www.retinaaustralia.com.au/genetic_inheritance.htm)

1.4.3 Ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός θεωρείται μία υπολειμματική νόσος, καθώς στην πλειοψηφία των ασθενών και τα δυο αλληλία (αλληλόμορφα) είναι μεταλλαγμένα. Παρόλα αυτά υπάρχουν αποδείξεις ότι η νόσος μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς που έχουν μόνο ένα μεταλλαγμένο αλληλίο (33). Επίσης έχει βρεθεί ότι περίπου το 20-25% των ασθενών

που εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά της FMF δεν έχουν κάποια από τις υπεύθυνες ταυτοποιημένες μεταλλάξεις (23,34).

Ο Marek-Yagel και οι συνεργάτες του, αλλά και πολλοί άλλοι επιστήμονες, αρχικά υπέθεσαν ότι οι ασθενείς που εμφανίζουν τη νόσο FMF αλλά δεν έχουν καμία γνωστή MEFV μετάλλαξη φέρουν λιγότερο συχνές MEFV μεταλλάξεις στο δεύτερο αλληλίο του MEFV. Παρόλα αυτά πολλοί ερευνητές απέτυχαν να ανιχνεύσουν τέτοιες μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή, στα όρια εξονίων-ιντρονίων ή στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου αυτών των ασθενών, ακόμη και όταν πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου MEFV (34,35).

Έχουν γίνει αρκετές υποθέσεις με στόχο την αποσαφήνιση της εμφάνισης κλινικών συμπτωμάτων σε άτομα που φέρουν μία μόνο μετάλλαξη στο γονίδιο MEFV, σε μία νόσο που θεωρείται υπολειπόμενη. Αυτές περιλαμβάνουν την ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα κάποιων μεταλλάξεων και την πιθανή συμμετοχή άλλων γονιδίων που ενδεχομένως συμβάλλουν στη μεταβλητότητα της κλινικής εικόνας των ετερόζυγων ασθενών. Επιπλέον αυτή η ποικιλιότητα στη συμπτωματολογία μπορεί να οφείλεται στην αλληλοεπικάλυψη των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου με τις κλινικές εκδηλώσεις άλλων συστημικών διαταραχών (36).

Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα μπορεί να οφείλεται και σε περιπτώσεις απώλειας του γενετικού υλικού από ένα ομόλογο που φέρει το κυρίαρχο αλληλόμορφο. Η ετερόζυγη κατάσταση επομένως χάνεται στη συγκεκριμένη θέση και ο υπολειπόμενος φαινότυπος εμφανίζεται ως κυρίαρχος. Παρόλα αυτά, κάποιοι ερευνητές που προσπάθησαν να το αποδείξουν απέτυχαν. Ίσως χρειάζεται να γίνουν εκτενέστερες έρευνες σε οικογένειες που αποτελούνται από μέλη που πάσχουν από τη νόσο FMF (37,38).

Η νόσος FMF είναι ένα αυτοσωματικό υπολειπόμενο γενετικό νόσημα και επομένως αναμένεται η εμφάνιση της μονό σε μία γενιά των μελών μίας οικογένειας. Ωστόσο, τα υψηλά ποσοστά αιμομιξίας σε πληθυσμούς με φέρουσες συχνότητες μέχρι και 1:5 μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου FMF σε δύο ή περισσότερες διαδοχικές γενιές (κάθετη κληρονομικότητα), ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζεται από τους επιστήμονες σαν ψευδοκυρίαρχη κληρονομικότητα (pseudodominant inheritance). Στη βιβλιογραφία είναι καταγεγραμμένη η περίπτωση ψευδοκυρίαρχης κληρονομικότητας σε μία τουρκική οικογένεια που ζει στη Δανία (37,38).

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF

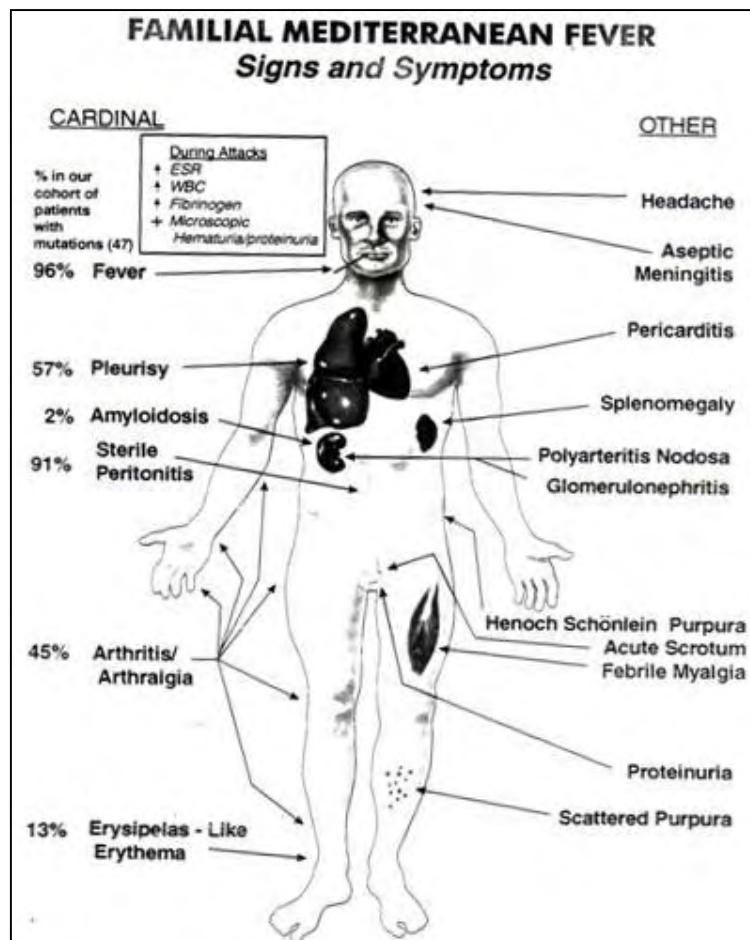
Η νόσος εμφανίζεται συνήθως στην παιδική ή στην εφηβική ηλικία. Περίπου το 65% των περιστατικών εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου σε ηλικία μικρότερη των δέκα ετών, ενώ το 90% των περιστατικών εμφανίζουν συμπτώματα σε ηλικία μικρότερη των είκοσι ετών. Η τυπική εκδήλωση της νόσου αφορά σε τουλάχιστον τρία επαναλαμβανόμενα εμπύρετα επεισόδια μικρής διάρκειας, συνήθως ένα μέχρι και τρία εικοσιτετράωρα, με επακόλουθο έντονο άλγος λόγω ορογονίτιδας σε μία ή περισσότερες περιοχές, συνήθως όμως στην κοιλιακή χώρα. Έχει βρεθεί ότι περισσότεροι από το 85% των ασθενών που πάσχουν από FMF εμφανίζουν περιτονίτιδα (3).

Ο ασθενής που πάσχει από τη νόσο FMF συχνά παρουσιάζει, σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 95%, πλευρίτιδα, αρθρίτιδα και περικαρδίτιδα. Αρκετά σπανιότερες εκδηλώσεις της νόσου είναι το ερυσιπελατοειδές εξάνθημα των κάτω άκρων (Εικ. 6), η μυαλγία, η οζώδης πολυαρτηρίτιδα, η πορφύρα τύπου Henoch-Schönlein, η ορχίτιδα, καθώς και η ωοθηκίτιδα και η σαλπινγίτιδα, με πιθανό επακόλουθο την υπογονιμότητα ή και την στειρότητα. Η σημαντικότερη επιπλοκή της νόσου FMF είναι η ανάπτυξη της νεφρικής αμυλοείδωσης AA (renal amyloidosis AA), που περιγράφεται παρακάτω (39). Στην εικόνα 7 απεικονίζονται κάποιες ενδείξεις και συμπτώματα της νόσου FMF.



Εικόνα 6: Τυπικό αλλά σπάνιο εξάνθημα της νόσου FMF.

(Πηγή: Lachmann, 2011)



Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει τα σημεία του ανθρώπινου σώματος όπου εμφανίζονται οι σημαντικότερες ενδείξεις και συμπτώματα της νόσου FMF.

(Πηγή: Samuels et al., 1998).

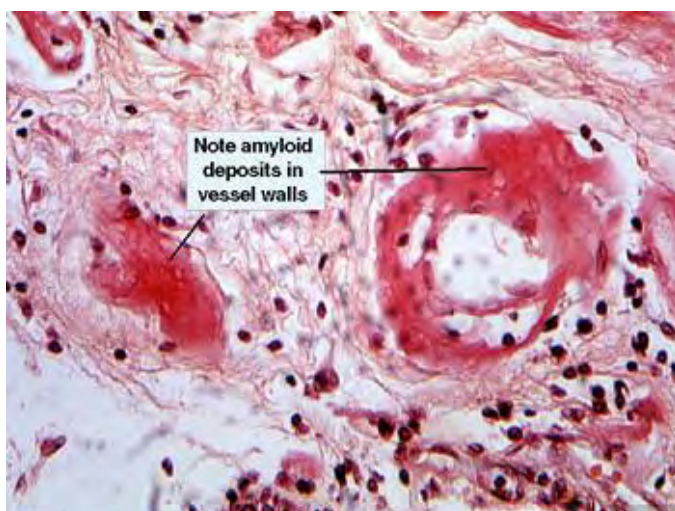
Αμυλοείδωση

Μία σοβαρή, αν όχι η σοβαρότερη, επιπλοκή της νόσου FMF είναι η ανάπτυξη αμυλοείδωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια (40). Συγκεκριμένα η εμφάνιση νεφρικής αμυλοείδωσης τύπου AA είναι η πλέον καταστροφική εμφάνιση της νόσου, καθώς πριν από τη χορήγηση της κολχικίνης, η αμυλοείδωση ευθυνόταν σε μεγάλο βαθμό για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των ασθενών που έπασχαν από FMF (34).

Η αμυλοείδωση είναι μία αρκετά σπάνια νόσος, η οποία εμφανίζεται όταν συσσωρεύονται ινίδια αμυλοειδούς σε διάφορα όργανα. Τα ινίδια αμυλοειδούς είναι μία μη-φυσιολογική πρωτεΐνη που παράγεται συνήθως από τα κύτταρα του μυελού των οστών, η οποία εναποτίθεται σε οποιοδήποτε ιστό ή όργανο.

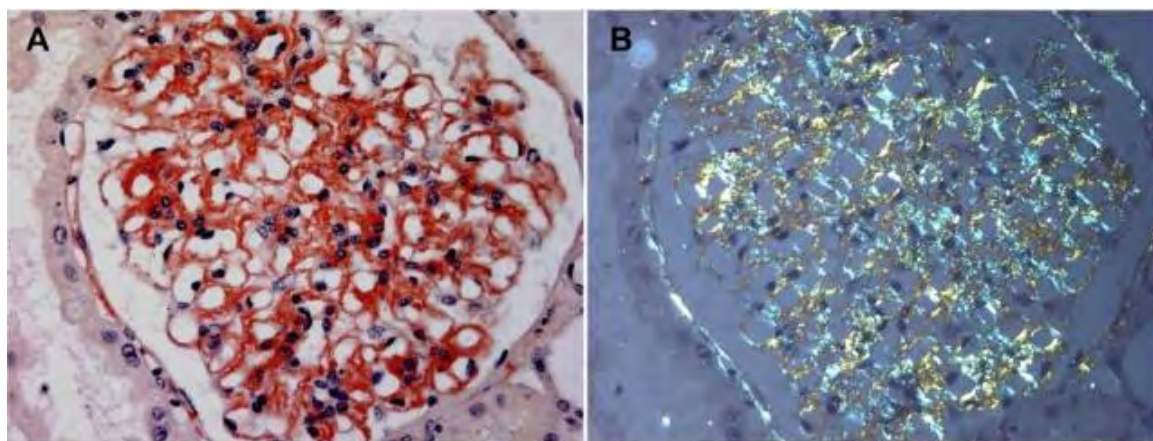
Υπάρχουν τρεις κατηγορίες αμυλοείδωσης, η πρωτοπαθής, η δευτεροπαθής και η κληρονομική. Από αυτές τις κατηγορίες, η πρωτοπαθής αμυλοείδωση δεν συνδέεται με άλλες νόσους, εκτός από κάποια μορφή καρκίνου του μυελού των οστών, το πολλαπλούν μυέλωμα.

Η νόσος FMF, όπως και αρκετές άλλες φλεγμονώδεις παθήσεις, μπορεί να οδηγήσουν στη δευτεροπαθή μορφή της αμυλοείδωσης. Για κάθε τύπο της νόσου οι πρωτεΐνες αυτές είναι μοναδικές. Παρόλα αυτά, μετά από χρώση με τη χρωστική «ερυθρά του Κονγκό», η χρωστική δεσμεύεται στα ινίδια του αμυλοειδούς, εμφανίζοντας στο οπτικό μικροσκόπιο πορτοκαλί/κόκκινες εναποθέσεις (Εικ. 8), ενώ οι εναποθέσεις της χρωστικής αυτής εκπέμπουν πράσινη απόχρωση κάτω από το μικροσκόπιο πολωμένου φωτός (Εικ. 9). Χαρακτηριστικά, σε μία βιοψία νεφρού η χρωστική αυτή (Congo red) χρωματίζει κόκκινο το μεσάγγειο, τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων και την κάψα του Bowman των νεφρικών σπειραμάτων (Εικ. 5) (41).



Εικόνα 8: Χρωστική «ερυθράς του Κονγκό» σε αγγεία. Η χρωστική εναποτίθεται στα τοιχώματα των αγγείων του χορίου (ινώδες κόκκινο).

(Πηγή: <http://medsci.indiana.edu/c602web/602/c602web/skin/slide169.htm>)



Εικόνα 9: Βιοψία νεφρού με τη χρωστική «ερυθράς του Κονγκό» σε οπτικό μικροσκόπιο (x400). (Α) Εναποθέσεις της χρωστικής της ερυθράς του Κονγκό στο μεσάγγειο, στα τριχοειδικά τοιχώματα και στην κάψα Bowman του σπειράματος. (Β) Τυπική πράσινη διπλοδιαθλαστικότητα κάτω από πολωμένο φως.
(Πηγή: Desport et al., 2012).

Η δευτεροπαθής αμυλοείδωση που προκαλείται από τη νόσο FMF μπορεί να παρουσιάσει μία ποικιλία επακόλουθων συμπτωμάτων, οι οποίες αντανακλούν τη σοβαρότητα της νεφρικής εμπλοκής, όπως είναι η πρωτεϊνουρία, το νεφρωσικό σύνδρομο, και η νεφρική δυσλειτουργία με νεφρωσικά χαρακτηριστικά (40).

1.6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF

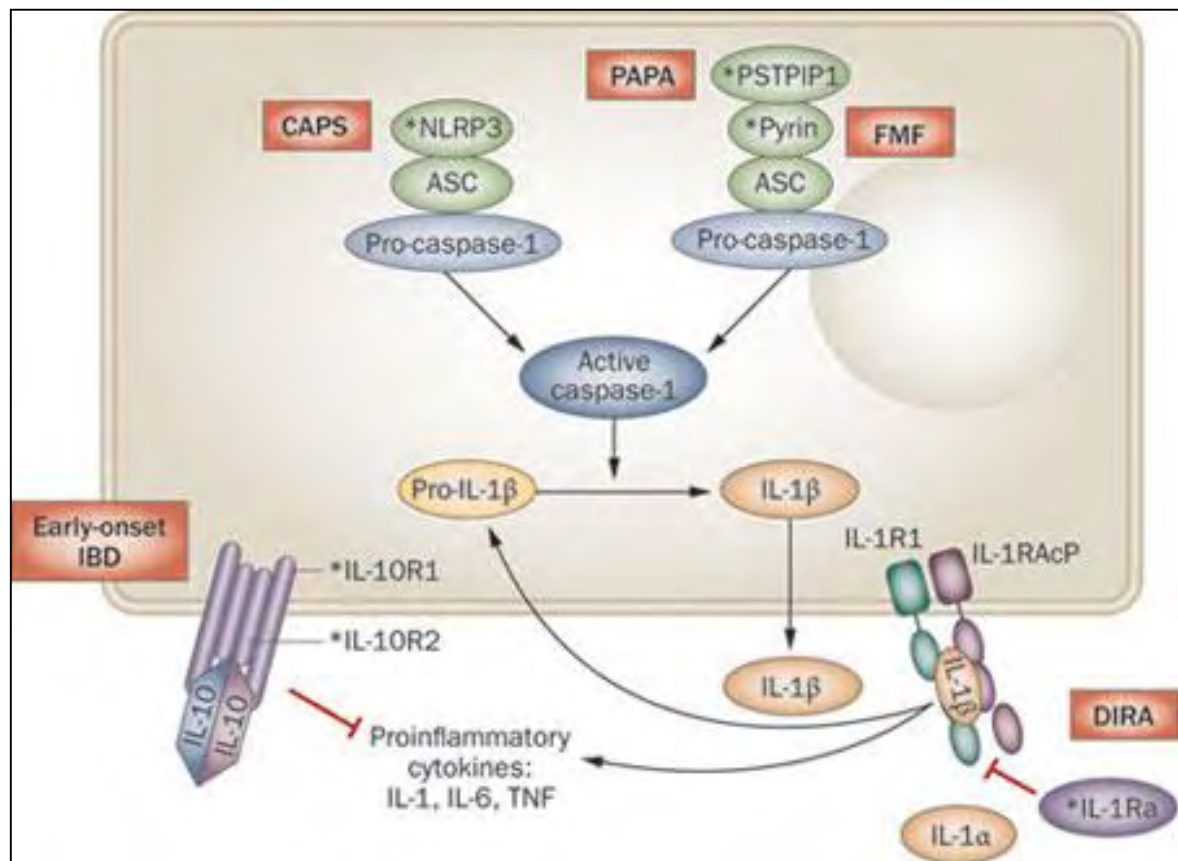
Μέχρι σήμερα η λειτουργία της πυρίνης παραμένει ακόμη άγνωστη, παρόλα αυτά έχει προταθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του φλεγμονοσώματος (inflammasome). Τα τελευταία χρόνια μελέτες πάνω στη φλεγμονή έχουν καταδείξει ότι η φλεγμονή περιλαμβάνει νέες βιολογικές διεργασίες. Μία από αυτές είναι και το φλεγμονόσωμα, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στο μη ειδικό ανοσιακό σύστημα (innate immunity).

1.6.1 Ο ρόλος της πυρίνης στη διαδικασία της φλεγμονής (Εικ. 10)

Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη πυρίνη δρα ως ανασταλτής της φλεγμονής μέσω καταστολής της παραγωγής IL-1 β , και ως πιθανός επαγωγέας της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης της οδού των κασπασών (κασπάση 1). Η προ-ιντερλευκίνη-1 β (Pro-IL-1 β) παρουσία της κασπάσης-1 δημιουργεί την ενεργό ιντερλευκίνη-1 β . Από μελέτες έχει

βρεθεί ότι η πρωτεΐνη πυρίνη αναστέλλει την ενεργοποίηση της ιντερλευκίνης-1β και του παράγοντα NF-κΒ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), ο οποίος παράγοντας είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ρυθμίζει τη μεταγραφή του DNA (16). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη πυρίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με ASC (apoptotic speck protein) μέσω της ομότυπης περιοχής της πυρίνης. Η ASC μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της NF-κΒ και της προ-κασπάσης-1, με αποτέλεσμα την έκκριση της ιντερλευκίνης IL-1β και την απόπτωση (2).

Ανεπάρκεια της λειτουργίας της πυρίνης, εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδίου MEFV, οδηγεί σε ανεξέλεγκτη παραγωγή της ενεργούς ιντερλευκίνης-1β και τελικά στη δημιουργία φλεγμονής (Εικ. 10). Η φλεγμονή αυτή οδηγεί σε υποτροπιάζοντα φλεγμονώδη εμπύρετα επεισόδια και στην εμφάνιση των κλασικών κλινικών χαρακτηριστικών της FMF (16).



Εικόνα 10: Η συμμετοχή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης πυρίνης στην ενεργοποίηση της ιντερλευκίνης IL-1β. Ο αστερίσκος υποδηλώνει τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.

(Πηγή: <http://www.nature.com/nrrheum/journal/v7/n8/images/nrrheum.2011.94-f3.jpg>)

1.6.2 Ο ρόλος της πυρίνης στο σχηματισμό του φλεγμονοσώματος (Εικ. 11)

Το φλεγμονόσωμα είναι ένα κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο (μοριακή πλατφόρμα) το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και στην παραγωγή και έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL1β), και εμπλέκεται στην παθογένεια διαφόρων αυτοφλεγμονωδών ασθενειών (29). Το φλεγμονόσωμα αποτελείται από μία NLR πρωτεΐνη (nucleotide-binding oligomerization domain receptor, ή περιφραστικά NOD-like receptor) (sensor), μία ή περισσότερες ASC πρωτεΐνες (adaptor) και μία ή περισσότερες κασπάσες (effector). Σημαντικοί υποδοχείς NLR είναι οι NACHT, LRR, ICE protease-activating factor (IPAF) και οι πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχή πυρίνης (pyrin domain-containing protein). Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν οι NLRP1 (ή NALP1), NLRP2, NLRP3 (27).

Έχουν προταθεί αρκετά φλεγμονοσώματα, βασισμένα στις διάφορες περιοχές σύνδεσης (ligand sensing domains) που περιέχουν. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τρία βασικά φλεγμονοσώματα (NALP1, IPAF, NALP3) (42,43). Πρόσφατα ένα μέλος της επαγώγιμης ιντερφερόνης (interferon-inducible) HIN-200, η AIM2 (η οποία απουσιάζει στο μελάνωμα 2) έχει καταδειχθεί ότι αποτελεί συστατικό ενός νέου φλεγμονοσώματος που ενεργοποιείται από κυτταροπλασματικό DNA (44).

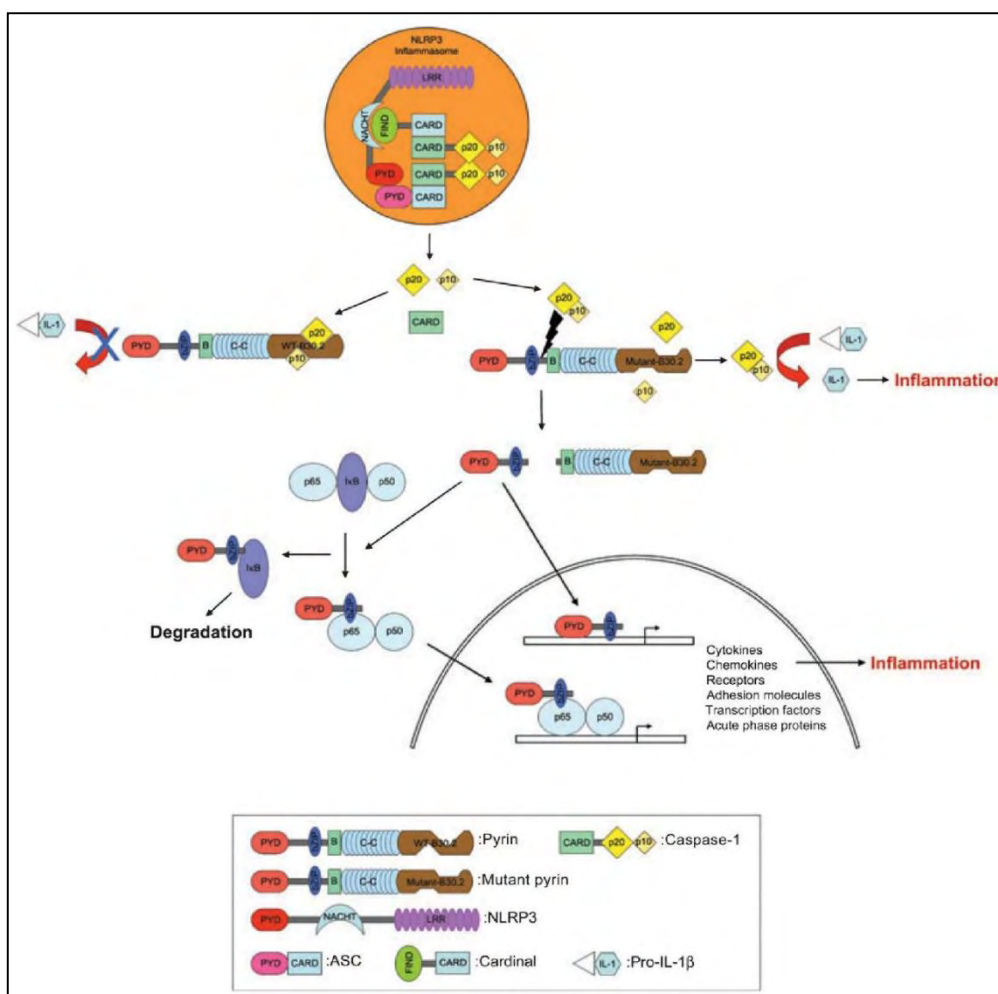
Το φλεγμονόσωμα NLRP3 είναι το πιο μελετημένο και το πιο αμφιλεγόμενο φλεγμονόσωμα. Το NLRP3 είναι μοναδικό καθώς είναι το μόνο φλεγμονόσωμα που έχει περιγράψει μέχρι σήμερα το οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί εξίσου από μη-μικροβιακά ερεθίσματα (25,45), όπως επίσης και από μικρόβια (46).

Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη πυρίνη ρυθμίζει το φλεγμονόσωμα αλληλεπιδρώντας τόσο με την περιοχή της πυρίνης όσο και με την περιοχή B30.2. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε πρόσφατα σε FMF μοντέλα ζώων (2). Άλλες έρευνες υποστηρίζουν ότι η πυρίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσολογική απόκριση, πιθανώς δρώντας σαν ASC (29). Ο Nalbantoglu και οι συνεργάτες του υποστηρίζουν ότι η πυρίνη, και η ASC μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ενισχυτές είτε ως καταστολείς της κυτταρικής φλεγμονώδους αντίδρασης (47).

Η ASC αποτελείται από μία N-τερματική περιοχή πυρίνης και μία C-τερματική CARD (caspase activation-recruitment domain) και έχει αποδειχθεί ότι ολιγομερίζεται και κατά συνέπεια μεσολαβεί την πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-1 σε κυτταροπλασματικά πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα (τα φλεγμονοσώματα), τα οποία είναι

απαραίτητα για την ωρίμανση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β , IL-18, and IL-33 (48,49).

Οι κασπάσες είναι μία οικογένεια πρωτεασών (cysteine-aspartic proteases) οι οποίες διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία όχι μόνο της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), αλλά της φλεγμονής και της νέκρωσης. Μερικές κασπάσες είναι επίσης απαραίτητες για την ωρίμανση των κυτταροκινών στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η ονομασία τους προέκυψε από την ειδικότητα τους να διασπούν τα πρωτεϊνικά υποστρώματα στο ασπαρτικό οξύ (caspase: cysteine-dependent aspartate-directed protease) (50,51). Οι κασπάσες είναι ενδοπεπτιδάσες, δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες αποδομούν κυτταρικές δομές μέσω της διαδικασίας της πρωτεόλυσης. Οι πρωτεάσες αυτές υπάρχουν μέσα στο κύτταρο ως ανενεργές μορφές που ονομάζονται προ-ένζυμα (zymogens). Αυτά τα προένζυμα ενεργοποιούνται κατά την απόπτωση μετά από πρωτεολυτική διάσπαση, δημιουργώντας διμερή (52).



Εικόνα 11: Πιθανός ρόλος της πυρίνης στην παθογένεση της νόσου FMF.

(Πηγή: Chae et al., 2009).

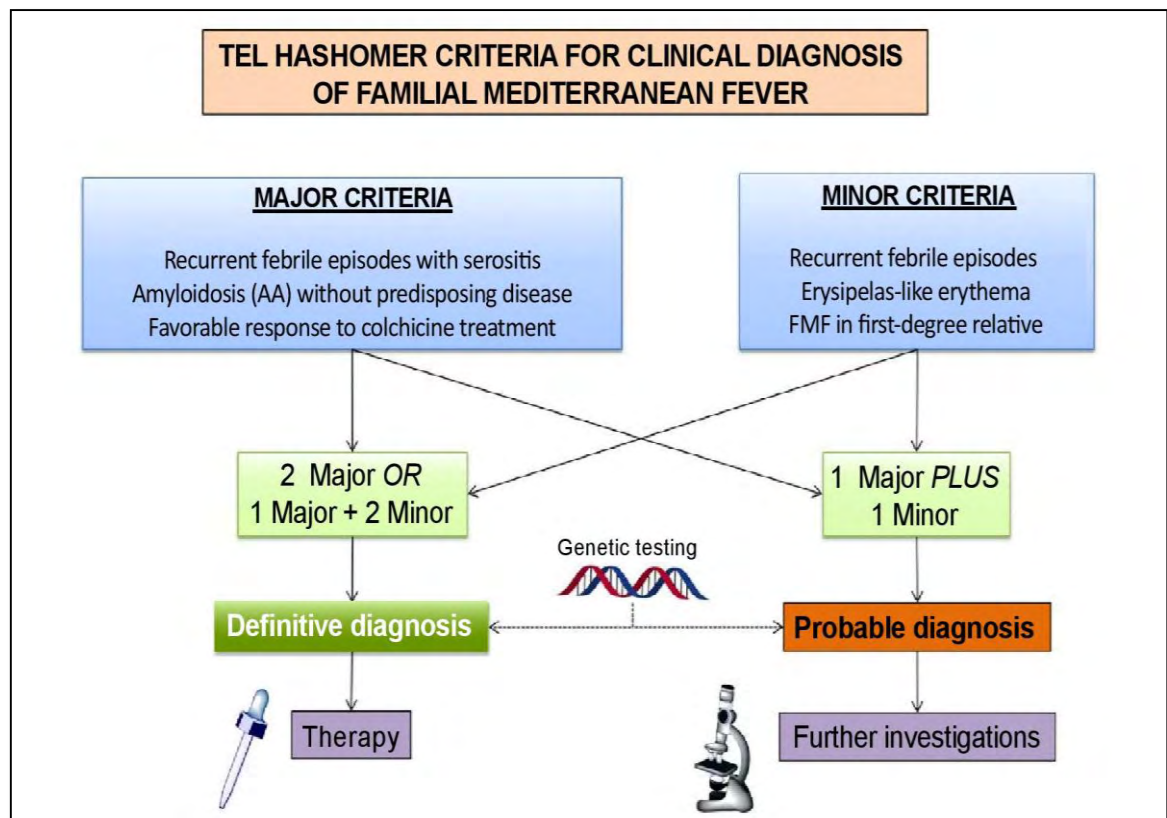
Μερικά αυτοφλεγμονώδη σύνδρομα, όπως και η νόσος FMF, συνδέονται με υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού και συστηματική φλεγμονή που προκαλούνται από την απορυθμισμένη ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και την παραγωγή της ιντερλευκίνης (IL) -1β (25).

Η πυρίνη ανιχνεύεται στα πολυμορφοπύρρηνα και ρυθμίζει τη συμμετοχή τους στη φλεγμονή. Ανεπάρκεια της πυρίνης λόγω μετάλλαξης οδηγεί σε εκσεσημασμένη ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρρηνων και έκκριση των φλεγμονωδών κυτταροκινών, με αποτέλεσμα την πρόκληση πυρετού και άλλων κλινικών εκδηλώσεων της FMF (53).

Έχει βρεθεί ότι στον οικογενή μεσογειακό πυρετό (FMF) μία μετάλλαξη στο γονίδιο MEFV, που εκφράζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, οδηγεί σε μία μόνιμα ενεργό οξείας φάσης ανταπόκριση και προκαλεί εμπύρετες καταστάσεις, αρθραλγία, περιτονίτιδα και τελικά αμυλοείδωση. Στην ίδια μελέτη ανιχνευτήκαν αυξημένα επίπεδα ASC σε ασθενείς με FMF (47).

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF

1. Κλινική διάγνωση. Για να διαγνωσθεί κλινικά ένας ασθενής ότι πάσχει από τη νόσο FMF πρέπει να εμφανίσει τουλάχιστον τρία σποραδικά εμπύρετα επεισόδια διάρκειας 1-3 ημερών, καθώς και πόνο, συμπεριλαμβανομένης ανεξήγητης περιτονίτιδας, αρθρίτιδας ή οποιασδήποτε άλλης ορογονίτιδας (33). Επίσης ο ασθενής θα πρέπει να υποβληθεί σε εξετάσεις αίματος για να εξακριβωθεί η παρουσία φλεγμονής. Τέλος πρέπει να ληφθεί ένα λεπτομερές ιστορικό του ασθενούς αλλά και συγγενών που εμφάνισαν παρόμοια συμπτώματα. Από το 1997 μέχρι σήμερα η κλινική διάγνωση γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια Tel-Hashomer, τα οποία χωρίζονται σε μείζονα και ελάσσονα. Στα μείζονα κριτήρια εντάσσονται τα επαναλαμβανόμενα βραχείας διάρκειας εμπύρετα επεισόδια συνοδευόμενα από ορογονίτιδα, η αμυλοείδωση AA τύπου χωρίς άλλη αιτία και η ευνοϊκή ανταπόκριση σε θεραπεία με κολχικίνη. Στα ελάσσονα κριτήρια ανήκουν τα μεμονωμένα εμπύρετα επεισόδια, το ερυσιπελοειδές ερύθημα κάτω άκρων και η εμφάνιση οικογενή μεσογειακού πυρετού σε άτομα 1^{ου} βαθμού συγγένειας. Για να τεθεί οριστική διάγνωση πρέπει να συνυπάρχουν τουλάχιστον δύο μείζονα ή ένα μείζον και δύο ελάσσονα κριτήρια (54). Στην εικόνα 12 παρουσιάζονται τα κριτήρια κατά Tel-Hashomer.



Εικόνα 12: Κλινικά κριτήρια (Tel-Hashomer) για τη διάγνωση της νόσου FMF. Η κλινική διάγνωση για τη νόσο θεωρείται οριστική με την εμφάνιση δύο τουλάχιστον μειζόνων (major) κριτηρίων ή ενός μείζονος κριτηρίου και δύο ελασσόνων (minor).
(Πηγή: Wang et al., 2014)

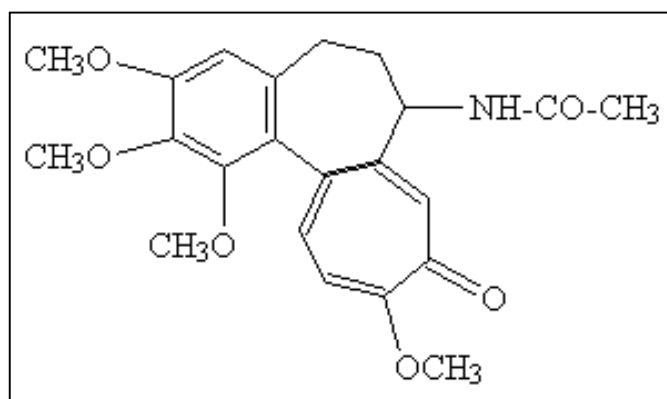
2. Απάντηση στη θεραπεία με κολχικίνη. Συνήθως χορηγείται κολχικίνη για περίπου 6 μήνες και εκτιμάται η απάντηση του ασθενούς. Αν ο ασθενής πραγματικά έχει τη νόσο FMF, τότε μετά τη χορήγηση της κολχικίνης είτε θα μειωθεί η διάρκεια και η βαρύτητα των εμπύρετων επεισοδίων και γενικότερα των συμπτωμάτων της νόσου, είτε θα εξαφανιστούν τελείως τα συμπτώματα. Αν τα συμπτώματα παραμείνουν τα ίδια μετά τη χορήγηση κολχικίνης, τότε ο ασθενής δεν πάσχει από τη νόσο FMF.

3. Γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του MEFV. Διεξάγεται γενετική ανάλυση των ασθενών για να αποδειχθεί τυχόν παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου MEFV που θεωρείται ότι ευθύνονται για την εκδήλωση της FMF. Η γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου MEFV παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιβεβαιωμένη διάγνωση της νόσου.

1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FMF

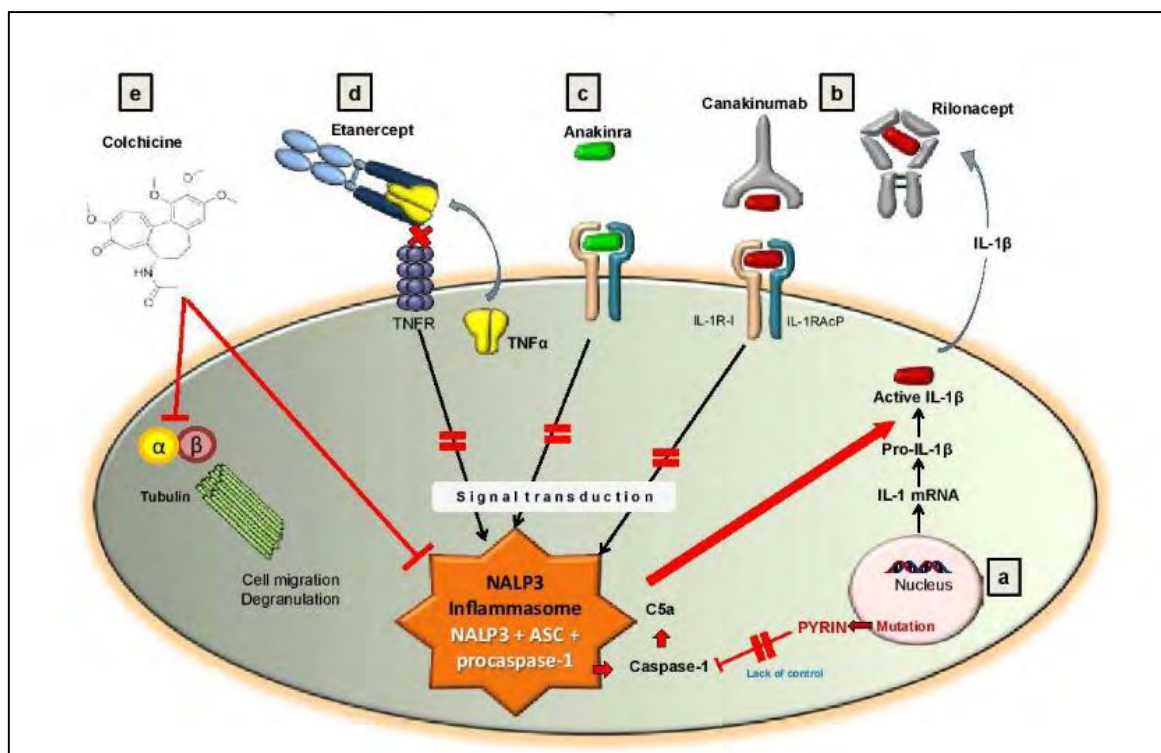
Σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο FMF συνήθως συνταγογραφείται προληπτική θεραπεία με κολχικίνη. Ο στόχος της φαρμακευτικής αυτής αγωγής είναι η ελάττωση της διάρκειας και της βαρύτητας των εμπύρετων επεισοδίων, η μείωση του αριθμού των κρίσεων (εμπύρετων επεισοδίων) ανά έτος και φυσικά η παρεμπόδιση της εμφάνισης της αμυλοείδωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια, καταστροφή άλλων οργάνων, ακόμη και σε επερχόμενο θάνατο (32).

Η κολχικίνη (Εικ. 13) παράγεται από το αλκαλοειδές φυτό *Colchicum autumnale* (autumn crocus/meadow saffron). Παρότι δοκιμάστηκαν και άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα, η κολχικίνη από το 1972 μέχρι σήμερα αποτελεί τη βάση όλων των θεραπευτικών προσεγγίσεων της νόσου FMF (Εικ. 14) (54,55). Η θεραπεία της νόσου FMF με κολχικίνη προλαμβάνει την εμφάνιση οξέων επεισοδίων, ενώ ταυτόχρονα συντελεί στην πρόληψη της ανάπτυξης δευτεροπαθούς αμυλοείδωσης.



Εικόνα 13: Η δομή της κολχικίνης. Συντακτικός τύπος: C₂₂H₂₅NO₆, Μοριακό βάρος: 399,4 g/mol

(Πηγή: <http://www.medicallook.com/reviews/Colchicine.html>)



Εικόνα 14: Η δοκιμή πολλών φαρμακευτικών προσεγγίσεων στην θεραπεία της νόσου FMF. (Πηγή: Wang et al., 2014)

2. ΝΟΣΟΣ FABRY

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η νόσος Fabry είναι μία λυσοσωματική ενζυμοπάθεια η οποία περιγράφηκε συγχρόνως και ανεξάρτητα το 1898 από δύο δερματολόγους, τον Fabry (Fabry Johannes, 1898) στη Γερμανία και τον Anderson (Anderson WWilliam, 1898) στην Αγγλία (Εικ. 15) (56).



Εικόνα 15: Αριστερά εικονίζεται ο δερματολόγος Fabry Johannes, ενώ δεξιά ο Anderson Williams.

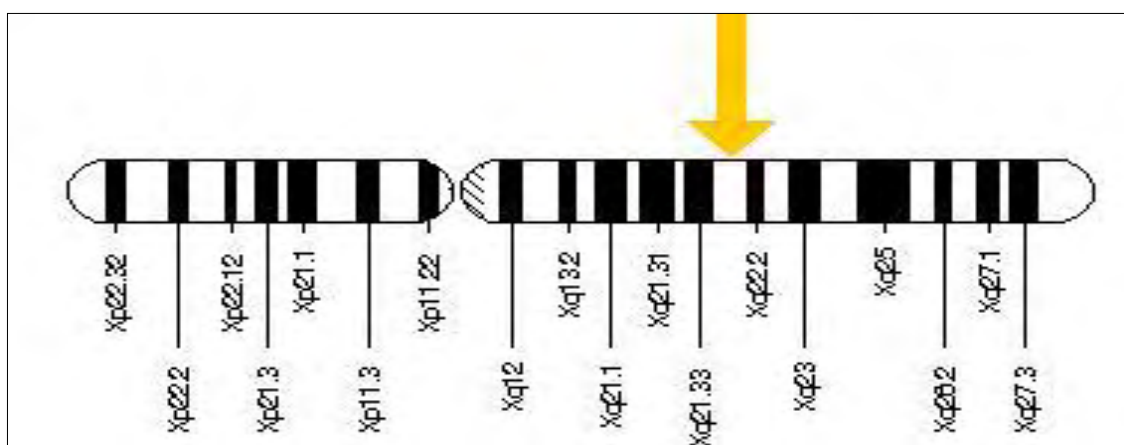
(Πηγή: <http://fabry.com.au/what-is-fabry-disease/>)

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί αρκετές συνώνυμες ονομασίες της νόσου Fabry, όπως νόσος Anderson-Fabry, ανεπάρκεια α-γαλακτοσιδάσης, ανεπάρκεια GLA, ανεπάρκεια τριεξοσιδάσης κεραμιδίου (ceramide trihexosidase), angiokeratoma corporis diffusum universal, κληρονομική δυστοπική λιπίδωση (hereditary dystopic lipidosi) (57).

2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

2.2.1 Το γονίδιο GLA

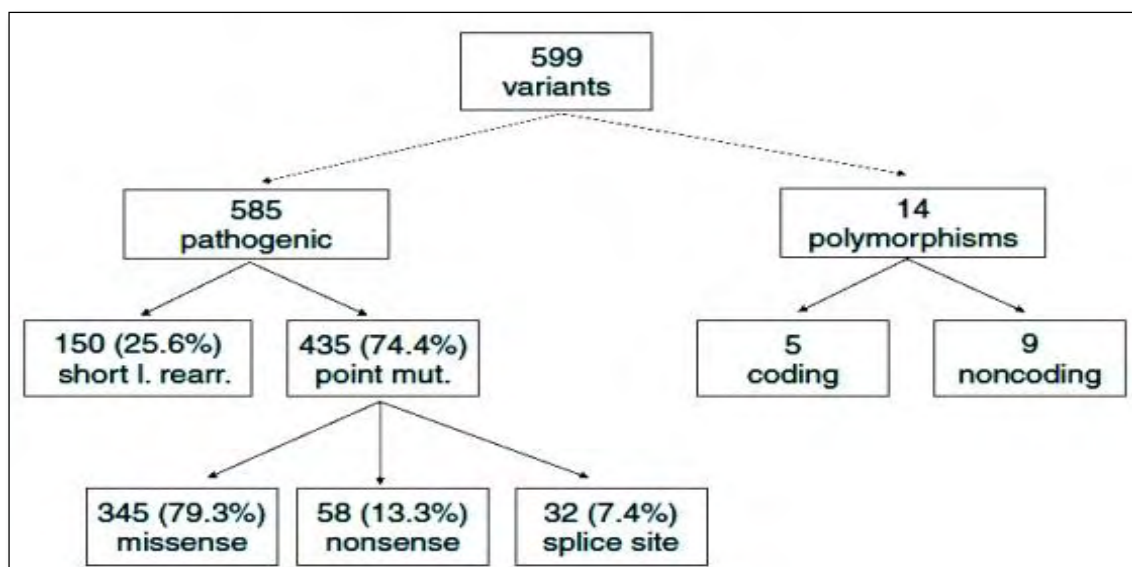
Η νόσος Fabry είναι ένα σπάνιο φυλοσύνδετο νόσημα που σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο GLA. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή Xq21.3-q22 (Εικ. 16). Η κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου α-γαλακτοσιδάση Α (GLA) αποτελείται από 1290 ζεύγη βάσεων, διαιρείται σε επτά εξόνια και κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 429 αμινοξέων. Το γονίδιο GLA κωδικοποιεί το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση Α, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση της γαλακτόζης από τα γλυκολιπίδια και τις γλυκοπρωτεΐνες (58,59).



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της χρωμοσωμικής περιοχής εντόπισης του GLA γονιδίου. Το κίτρινο βέλος προσδιορίζει την περιοχή εντόπισης του GLA γονιδίου πάνω στο X χρωμόσωμα.

(Πηγή: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GLA>)

Έχει βρεθεί ότι η νόσος FD προκαλείται από μία ποικιλία παρανοηματικών ή σημειακών μεταλλάξεων, μεταλλάξεων ματίσματος, μικρών ή μεγάλων ελλείψεων, ενθέσεων στο γονίδιο GLA (60–62). Έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία περισσότερες από 600 παραλλαγές στο γονίδιο GLA. Όπως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα, υπάρχουν πάνω από 585 τεκμηριωμένες παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο GLA, οι οποίες καθιστούν το ένζυμο μη λειτουργικό (63).



Εικόνα 17: Υπάρχουν περισσότερες από 600 παραλλαγές του γονιδίου GLA, εκ των οποίων οι 585 είναι τεκμηριωμένες ως παθογόνες μεταλλάξεις.

(Πηγή: <https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTXUDWUUiIloyz1HfKhJUE7O4H-9F0XWRSwiKH1AyGtJjcETCQ52-A>)

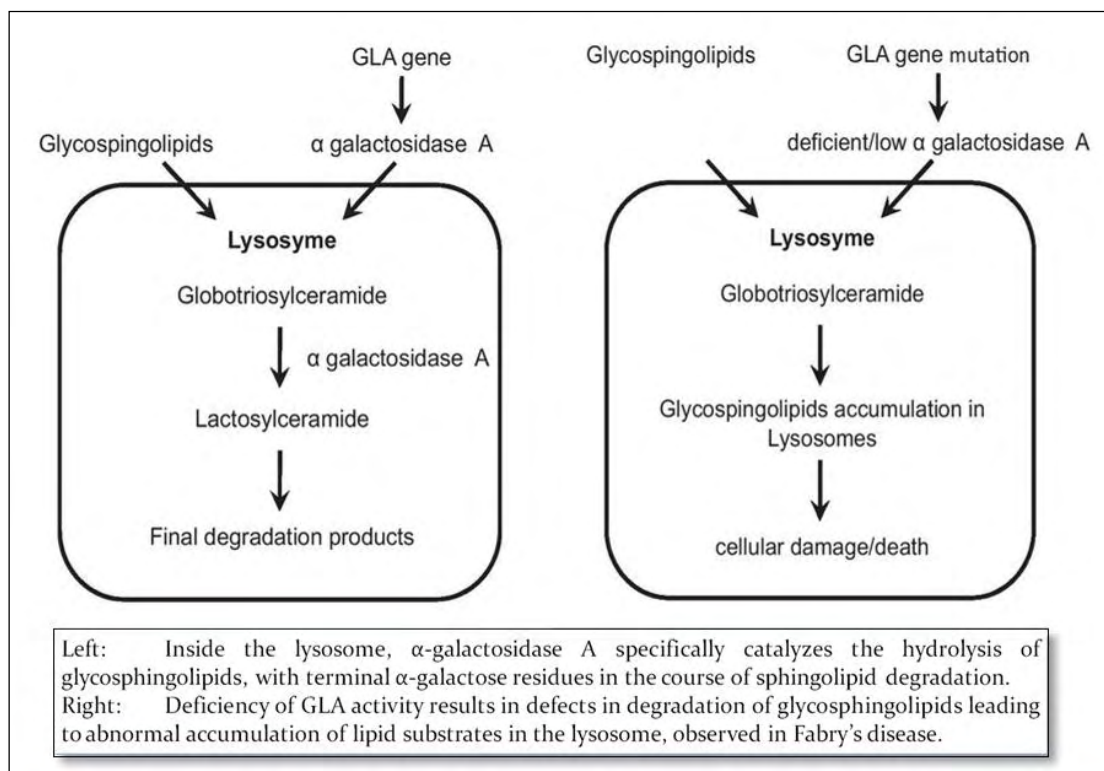
Μεταλλάξεις που ευθύνονται για την πλήρη απώλεια της λειτουργίας του ενζύμου οδηγούν στον κλασσικό (βαριάς μορφής) FD φαινότυπο. Μεταλλάξεις που μειώνουν αλλά δεν εξαφανίζουν τη δραστικότητα του ενζύμου συνήθως προκαλούν τις ηπιότερες μορφές της νόσου Fabry, οι οποίες εμφανίζονται αργότερα στην ζωή (late onset) και επηρεάζουν ως επί των πλείστων μόνο την καρδιά ή τους νεφρούς (58). Η σοβαρότητα της νόσου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την εναπομένουσα δραστηριότητα της α-γαλακτοσιδάσης A. Η συσσώρευση των λιπιδίων GL3 λαμβάνει χώρα συνήθως στο αγγειακό ενδοθήλιο και στα λεία μυϊκά κύτταρα, οδηγώντας σε προοδευτική απόφραξη των αγγείων, ισχαιμία και τελικά σε δυσλειτουργία των οργάνων. Ασθενείς που νοσούν και δεν λαμβάνουν την κατάλληλη θεραπεία θα υποστούν οργανική ανεπάρκεια (62).

Κάποιες μελέτες αποκάλυψαν έναν απρόσμενα υψηλό αριθμό ατόμων με μεταλλάξεις ή γενετικές παραλλαγές αγνώστου σημασίας (mutations or genetic variants of unknown significance, GVUS) στο γονίδιο GLA και / ή μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση A (64–66).

2.2.2 Το ένζυμο α-γαλακτοσιδάση Α

Η α-γαλακτοσιδάση Α είναι μία λυσοσωματική υδρολάση, η οποία καταλύει την υδρόλυση των γλυκοσφιγγολιπιδίων, ιδιαίτερα του σφαιροτριαοζυλοκεραμιδίου (globotriaosylceramide, GL-3), σε τελική γαλακτόζη και διεξοζίτη του κεραμιδίου (59).

Ανεπάρκεια ή έλλειψη του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α, εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδίου GLA, οδηγεί σε υπερβολική συσσώρευση των υποστρωμάτων του ενζύμου, κυρίως του λιπιδίου GL-3 (globotriaosylceramide-3, σφαιροτριαοζυλοκεραμίδιο ή γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κεραμίδιο) στα λυσοσώματα διάφορων τύπων κυττάρων και οργάνων (Εικ. 18). Αυτή η συσσώρευση έχει σαν επακόλουθο ένα καταρράκτη κυτταρικών γεγονότων, καθώς εναποτίθεται ιδιαίτερα στα κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων, του δέρματος και των κυττάρων των νεφρών, της καρδιάς και του νευρικού συστήματος (58).



Εικόνα 18: Απεικόνιση των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα στο λυσόσωμα όταν δεν υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο GLA (αριστερά) και όταν υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο GLA (δεξιά).

(Πηγή: Τροποποιημένη εικόνα από El-Abassi et al., 2014) .

2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

2.3.1 Συχνότητα

Το ποσοστό εμφάνισης της νόσου Fabry θεωρείται ότι είναι μία περίπτωση σε 40.000 γεννήσεις αρρένων. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου το ποσοστό αυτό εμφανίζεται να είναι αρκετά υψηλότερο από το αναμενόμενο. Χαρακτηριστικά, μελέτες σε νεογνικό έλεγχο καταδεικνύουν ότι τα τελευταία χρόνια η εμφάνιση της νόσου Fabry είναι μία περίπτωση σε 1250 γεννήσεις αρρένων, 30 φορές υψηλότερη από ό,τι υπολογιζόταν στο παρελθόν (64–66).

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι μετά από έλεγχο σε ασθενείς σε αιμοκάθαρση τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου Fabry ανέρχονται στο 0,16% και φτάνουν ακόμη και στο 1,2% (56,64). Στις ΗΠΑ σύμφωνα με το σύστημα ανάλυσης USRDS (United States Renal Data System), η νόσος Fabry διαγιγνώσθηκε στο 0,0167% των ασθενών που άρχισαν θεραπεία νεφρικής αναπλήρωσης στην διάρκεια των ετών 1995-1998 (67).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία του Πανελλήνιου συλλόγου ασθενών και φίλων με λυσοσωμικά νοσήματα "αλληλεγγύη", μέχρι το 2013 είχαν καταγραφεί περίπου 25 περιστατικά σε 12 διαφορετικές οικογένειες.

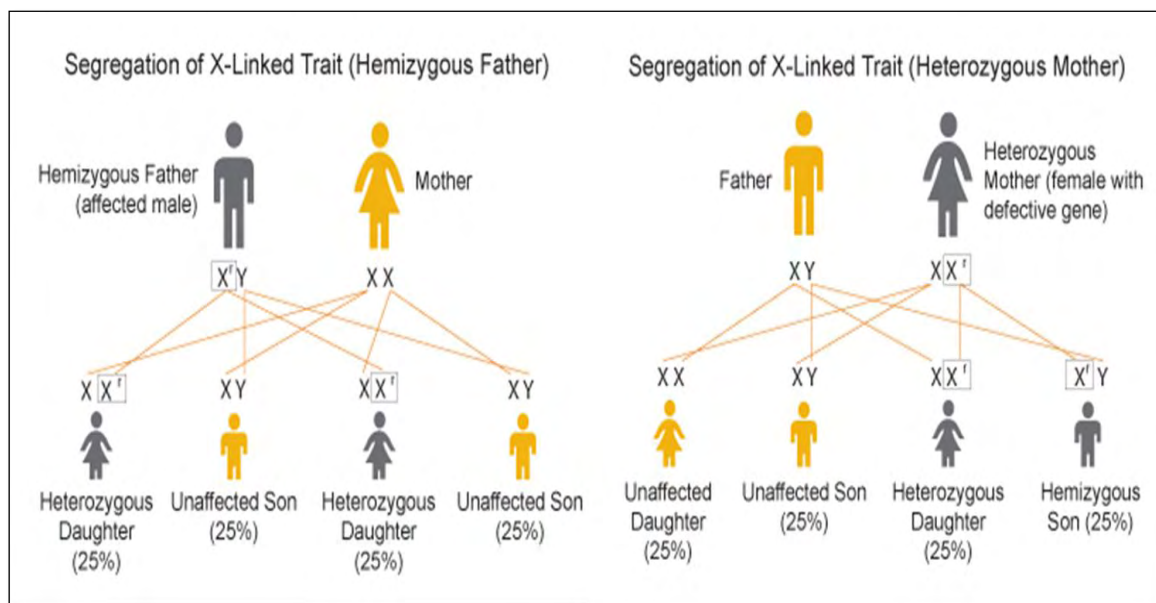
2.3.2 Φύλο

Η νόσος Fabry κληρονομείται κατά τον φυλοσύνδετο υπολειπόμενο χαρακτήρα, με αποτέλεσμα οι ημιζυγώτες άντρες (φέρουν το ελαττωματικό γονίδιο στο X χρωμόσωμά τους) να μεταδίδουν το ελαττωματικό γονίδιο σε όλες τις κόρες τους και σε κανένα από τους γιους τους, ενώ οι ετεροζυγώτες γυναίκες (φέρουν το ελαττωματικό γονίδιο σε ένα από τα δύο X χρωμοσώματά τους) έχουν 50% πιθανότητα μετάδοσης (ανεξαρτήτου φύλου) του ελαττωματικού γονιδίου σε κάθε εγκυμοσύνη (Εικ. 19).

Η νόσος Fabry προσβάλλει κυρίως τους άνδρες (φυλοσύνδετη κληρονομικότητα). Συχνά και οι ετερόζυγες γυναίκες (φορείς) μπορεί να εμφανίσουν μερική ή πλήρη κλινική έκφραση της νόσου (λόγω τυχαίας απενεργοποίησης ενός X χρωμοσώματος) (68,69). Κατά κανόνα οι ετερόζυγες γυναίκες έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής και τα συμπτώματά τους καταπραΰνονται περισσότερο με την ενζυμική υποκατάσταση σε σχέση με τους άνδρες με νόσο FD (70).

Η νόσος Fabry συσχετίζεται με σημαντικές μειώσεις του προσδόκιμου ζωής και στα δύο φύλα (71). Παρόλα αυτά, όπως συμβαίνει και με άλλες φυλοσύνδετες νόσους, οι

επιπλοκές στις γυναίκες είναι λιγότερο συχνές και πιο ποικίλες σε σοβαρότητα (69), αν και μπορεί να είναι εξίσου σοβαρές όπως και σε άντρες ασθενείς (Wang et al., 2007). Το 40% των γυναικών ασθενών εμφανίζουν νεφροπάθεια και πρωτεϊνουρία (72), ενώ το 15% σοβαρά νεφρικά προβλήματα (69).



Εικόνα 19: Μετάδοση της νόσου Fabry. Οι ημιζυγώτες άντρες μεταδίδουν το ελαττωματικό γονίδιο σε όλες τις κόρες τους και σε κανένα από τους γιους τους. Οι ετεροζυγώτες γυναίκες έχουν 50% πιθανότητα μετάδοσης σε κάθε εγκυμοσύνη (ανεξαρτήτου φύλου).

(Πηγή: Τροποποιημένη εικόνα από <http://www.fabrycommunity.com/Healthcare/About/Genetics.aspx>)

2.3.3 Απενεργοποίηση X χρωμοσώματος

Γυναίκες ετεροζυγώτες έχουν περιγράψει παλιότερα ως «φορείς» του ελαττωματικού γονιδίου, ωστόσο τελευταίες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα ετερόζυγα θηλυκά μπορεί να εμφανίσουν ένα μεγάλο εύρος εκδηλώσεων της νόσου. Αυτό οφείλεται στην τυχαία απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος (69). Η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος (X-chromosome inactivation, XCI) είναι μία διαδικασία που εξελίχθηκε στα θηλαστικά για να πραγματοποιηθεί αντιστάθμιση της δόσης (dosage compensation) των X-συνδεδεμένων γονιδίων στις γυναίκες (XX) σε σχέση με τους αρρενες (XY) που διαθέτουν μόνο ένα αντίγραφο του χρωμοσώματος X (73,74).

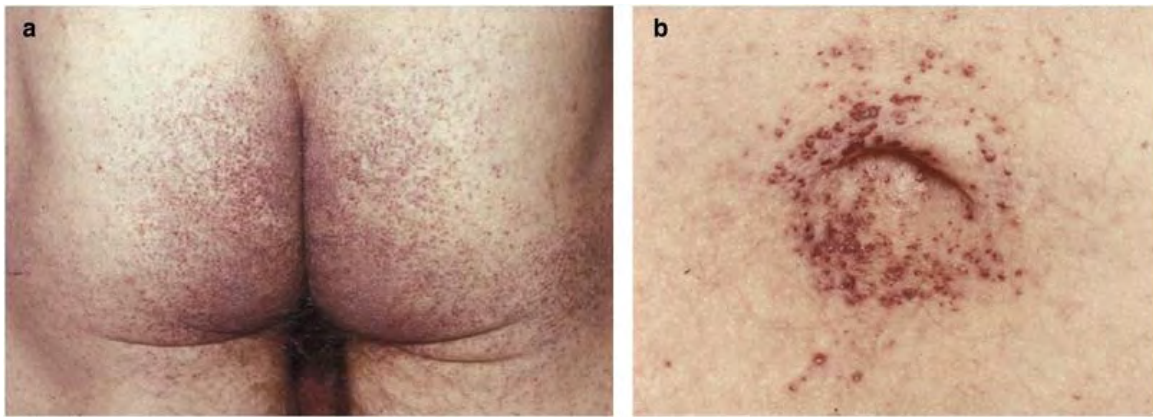
Δεν είναι ακόμη γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος. Η X-αδρανοποίηση (ονομάζεται επίσης Lyonization ή υπόθεση του Lyon) είναι μία τυχαία διαδικασία κατά την οποία απενεργοποιείται ένα από τα δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος X που υπάρχουν στα θηλυκά θηλαστικά. Από εκείνη τη στιγμή και έπειτα η απενεργοποίηση του ενός X χρωμοσώματος παραμένει σταθερή και κληρονομήσιμη σε όλες τις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις, αποτελώντας έτσι ένα κλασσικό παράδειγμα επιγενετικής ρύθμισης (68,74,73). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα περισσότερα γονίδια του ανενεργού X χρωμοσώματος συνήθως παραμένουν ανενεργά σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα, και έτσι το μοτίβο αδρανοποίησης κληρονομείται κλωνικά (70).

Η απενεργοποίηση του ενός X χρωμοσώματος μπορεί να οφείλεται στο «πακετάρισμά» του σε ετεροχρωματίνη, μία μεταγραφικά ανενεργή χρωμοσωμική περιοχή που έχει συμπαγή δομή, με αποτέλεσμα τα γονίδια που περιέχει να μην μπορούν να μεταγραφούν εύκολα (68,74,73). Ένα άλλος προτεινόμενος μηχανισμός είναι η σύνθεση ενός ειδικού τύπου μη κωδικοποιού μορίου RNA που προέρχεται από τον ανενεργό τόπο μεταγραφής στο X χρωμόσωμα (*X inactive transcript*, XIST). Καθώς μετακινούνται αυτά τα μόρια κατά μήκος του χρωμοσώματος, τροποποιούν το υποκείμενο χρωμόσωμα και προκαλούν μεταγραφική απενεργοποίηση (70).

2.4 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα κλινικά συμπτώματα της νόσου Fabry, τα σοβαρότερα εκ των οποίων είναι η χρόνια νεφρική νόσος και η καρδιακή ανεπάρκεια (75).

1. Πρωτεϊνουρία (Λευκωματουρία, **χρόνια νεφρική νόσος**)
2. Καρδιακές αρρυθμίες, **καρδιακή ανεπάρκεια**
3. Αγγειοκερατώματα (76) (Εικ. 20)
4. Αδιαφάνειες κερατοειδούς και φακού
5. Ακροπαραισθησίες, κρίσεις γενικευμένου άλγους
6. Διαταραχές εφίδρωσης (υποϊδρωσία)
7. Πυρετός, απώλεια βάρους
8. Διάρροια, άτυπα κοιλιακά άλγη
9. Μείωση της ακουστικής οξύτητας, εμβοές ώτων
10. Υπερτροφία αριστερής κοιλίας, βαλβιδοπάθεια, στηθάγχη
11. Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια



Εικόνα 20: Αγγειοκερατώματα. Οι κόκκινο-μωβ κηλιδοβλατιδώδεις δερματικές αλλοιώσεις είναι χαρακτηριστικές της νόσου Fabry. α) δερματικές βλάβες στα οπίσθια και β) δερματικές βλάβες στον ομφαλό.

(Πηγή : Fervenza et al., 2008).

2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

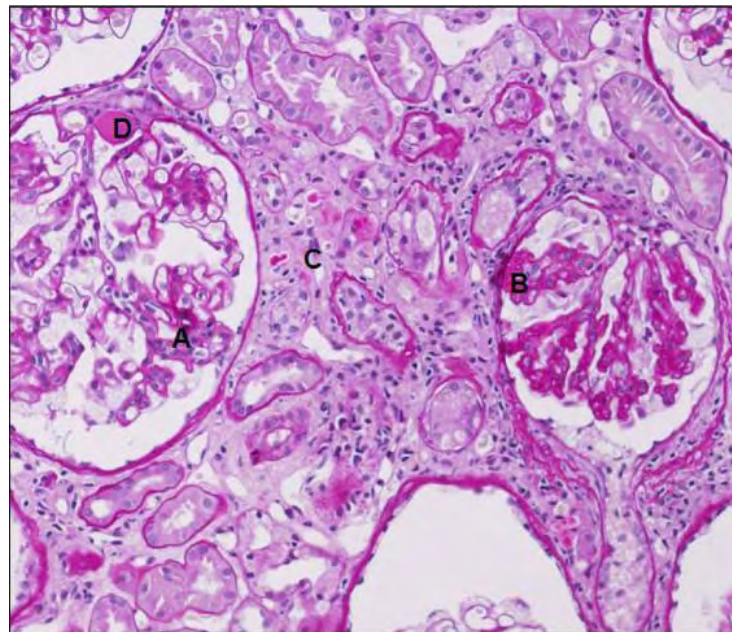
Μία επιβεβαιωμένη διάγνωση της νόσου Fabry επιτυγχάνεται είτε ιστοπαθολογικά, αποδεικνύοντας τη συσσώρευση των γλυκοσφιγγολιπιδίων (κυρίως του GL3) στους ιστούς, είτε βιοχημικά αποδεικνύοντας μειωμένη δράση της α-γαλακτοσιδάσης Α, είτε γενετικά αποδεικνύοντας γενετική μετάλλαξη του γονιδίου GLA (56).

2.5.1 Ιστολογική διάγνωση

Η ιστολογική διάγνωση πραγματοποιείται μετά από χρώση βιοψίας νεφρού είτε με τη χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, είτε με ειδικές χρώσεις, όπως είναι η χρώση PAS (Periodic acid Schiff) (Εικ. 21). Με τη χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη η χρωστική αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες των κυττάρων με βαθύ μπλε χρώμα, ενώ η χρωστική εωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα των κυττάρων με πορτοκαλί έως ροδόχροο (ροζ) χρώμα (77). Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας παρατηρούνται φολιδωτά έγκλειστα λιπίδια (zebra bodies) στο κυτταρόπλασμα των ποδοκυττάρων του σπειράματος (περισπλάχνια επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού που έχουν πολλαπλές μικρολάχνες-αποφυάδες γύρω από την βασική μεμβράνη) των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο Fabry (Εικ. 22) (78).

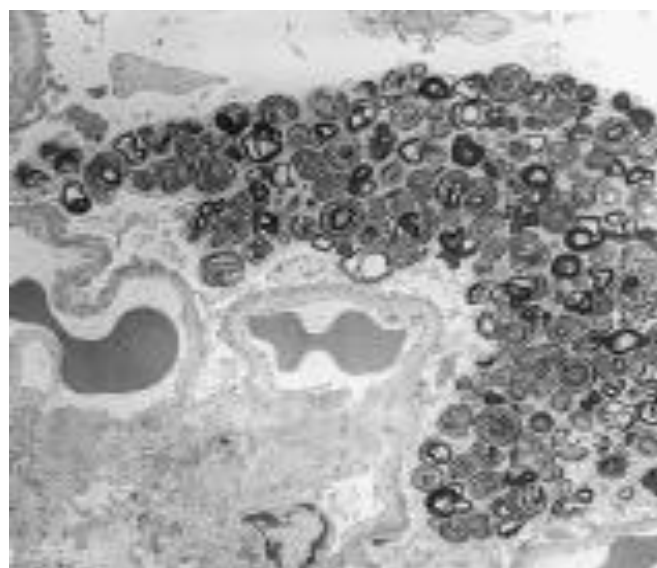
Είναι κατανοητό πως η σημαντικότερη κλινική εκδήλωση της νόσου είναι η νεφρική ανεπάρκεια. Ακριβώς για αυτό το λόγο τις περισσότερες φορές η διάγνωση

πραγματοποιείται από νεφρολόγο, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό των ερευνητών που δημοσιεύουν για τη νόσο Fabry είναι επίσης νεφρολόγοι.



Εικόνα 21: Βιοψία νεφρού με χρώση PAS. Η ιστολογική εξέταση των νεφρών με χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της νεφροπάθειας Fabry. Τμηματική σπειραματική σκλήρυνση (A), προσκόλληση και αναδιπλασιασμός της κάψας του Bowman (B), ατροφία των σωληνοειδών και ίνωση που συνδέεται με σωληνοειδή κύτταρα (πεπαχυσμένες βασικές μεμβράνες) (C), και υαλίνωση των αρτηριδίων (D). Αρχική μεγέθυνση 63x.

(Πηγή: Weidemann et al., 2013)



Εικόνα 22: Ιστολογική διάγνωση της νόσου Fabry. Υπερδομική εικόνα (ηλεκτρονική μικροσκοπία) του σπειράματος στη νόσο Fabry όπου παρατηρούνται φολιδωτά έγκλειστα λιπίδια (zebra bodies) στο κυτταρόπλασμα των ποδοκυττάρων (6.000x, Χρώση UrPb).

(Πηγή: Walden and Feriozzi, 2014)

~ 40 ~

2.5.2 Βιοχημική διάγνωση

Η βιοχημική διάγνωση της νόσου Fabry πραγματοποιείται με μέτρηση των επιπέδων της α-γαλακτοσιδάσης Α στο πλάσμα, σε περιφερικά λευκά αιμοσφαίρια και / ή σε καλλιεργημένους ινοβλάστες του δέρματος (Πίνακας 2). Σε άντρες με τον κλασικό FD φαινότυπο τα επίπεδα της α-γαλακτοσιδάσης Α είναι μικρότερα από 1%.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μέτρηση των επιπέδων της α-γαλακτοσιδάσης Α σε γυναίκες ετεροζυγώτες δεν είναι αξιόπιστη, γιατί σε μερικές περιπτώσεις η δραστηριότητα του ενζύμου είναι φυσιολογική.

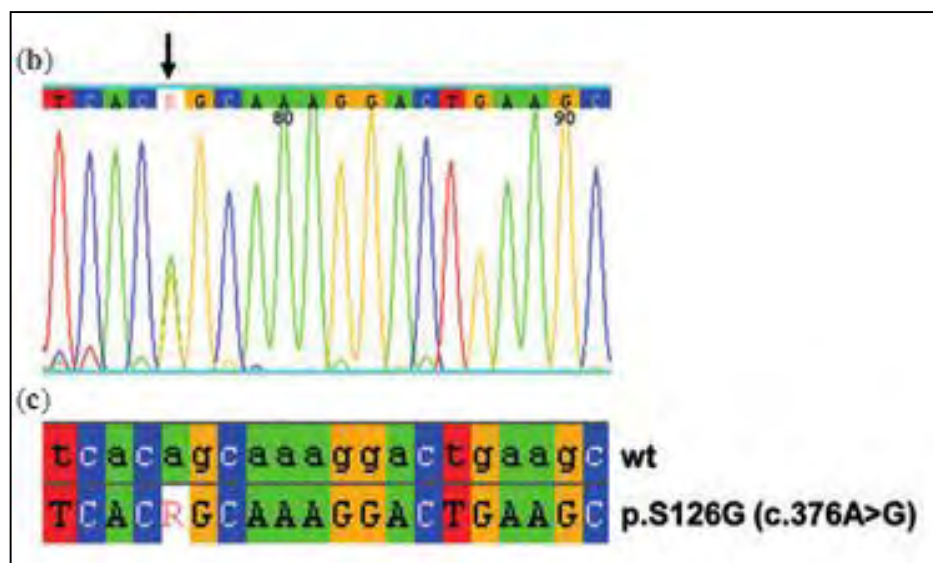
α-galactosidase A activity (mmol / L blood / h)	
Fabry disease (n=22) Range	0-0.24
Fabry obligate carriers (n=11) Range	0.67-2.94
Healthy adults (n=65) Range	1.38-4.43
Healthy newborns (n=45) Range	1.32-10.30
Sheep (n=1)	3.76
Mouse (n=3)	15.6-22.7

Πίνακας 2: Τα επίπεδα της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης Α.

(Πηγή: http://patentimages.storage.googleapis.com/WO2002018539A2/imgf000034_0001.png)

2.5.3 Μοριακή διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου GLA

Η μοριακή διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου GLA πραγματοποιείται με ενίσχυση με PCR και των 7 επτά εξονίων (συμπεριλαμβανομένων των ορίων εξονίων-ιντρονίων) του GLA γονιδιωματικού DNA. Στη συνέχεια ακολουθεί αλληλούχιση των προϊόντων των PCR αντιδράσεων για να γίνει ο έλεγχος για πιθανές μεταλλάξεις του γονιδίου GLA στις περιοχές που ενισχύθηκαν. Στην εικόνα 23 παρουσιάζεται η ανίχνευση της ετερόζυγης μετάλλαξης c.376A>G (S126G) στο εξόνιο 3 του γονιδίου GLA.



Εικόνα 23: Αποτέλεσμα αλληλούχισης για μεταλλάξεις στο γονίδιο GLA. Το βέλος υποδεικνύει την c.376A>G ετερόζυγη μετάλλαξη (S126G) στο εξόνιο 3.

(Πηγή: Zizzo et al, 2013)

2.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

Η νόσος Fabry προκαλείται από ανεπάρκεια της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης Α και συσσώρευση του λιπιδίου GL3 (σφαιροτριοζυλοκεραμίδιο), με αποτέλεσμα τη νεφρική ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια, υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και πρόωρο θάνατο. Η θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης (enzyme replacement therapy, ERT) αποδεδειγμένα σταματάει την εξέλιξη της νόσου και συμβάλει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο του Fabry, καθώς μπορεί να αντιστρέψει την αποθήκευση του υποστρώματος GL3, όπως και άλλων λιπιδίων, στα λυσοσώματα (79).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη α-γαλακτοσιδάση Α από ιστό πλακούντα, η οποία χορηγείτο στην κυκλοφορία του αίματος και μείωνε αποτελεσματικά τα επίπεδα των λιπιδίων GL3. Η εξέλιξη όμως της γενετικής μηχανικής (τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA) οδήγησε στην παρασκευή ανασυνδυασμένων ενζύμων υποκατάστασης ως εναλλακτική λύση. Αυτά ήταν η α-γαλακτοσιδάση βήτα (Fabrazyme®, Genzyme - Sanofi, Cambridge, MA, USA), η οποία λαμβάνεται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (CHO) και η α-γαλακτοσιδάση άλφα (Replagal®, Shire, Lexington, MA, USA) από γενετικά τροποποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών. Η αλληλουχία αμινοξέων των ανασυνδυασμένων ενζύμων (καθώς και η νουκλεοτιδική

αλληλουχία τους που κωδικοποιείται) είναι ταυτόσημη με αυτή της φυσικής α-γαλακτοσιδάσης Α. Η χορήγηση τους γίνεται ενδοφλεβίως και η χρήση τους έχει κριθεί ασφαλής από την επιστημονική κοινότητα (80,81).

Ωστόσο, τα δύο αυτά φαρμακευτικά σκευάσματα έχουν περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αστάθειάς τους σε ουδέτερο pH, το σύντομο χρόνο ημιζωής τους, τη μη αποτελεσματική τους πρόσληψη από κάποιους τύπους κυττάρων και ιστών και φυσικά το γεγονός ότι εφόσον προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών εγείρουν ανησυχίες για το ενδεχόμενο μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών από τα θηλαστικά. Σήμερα ένα νέο ένζυμο, το PRX-102 (Protalix, Carmiel, Israel), το οποίο παράγεται από την BY2 κυτταρική σειρά του καπνού (σύστημα ProCellEx®) ξεπερνάει αυτούς τους περιορισμούς (81).

Μέχρι σήμερα η αποτελεσματικότητα της ενζυμικής θεραπείας (Enzyme Replacement Therapy, ERT) είναι γνωστή μόνο για τους ασθενείς με τον κλασσικό FD φαινότυπο, ενώ είναι ακόμη άγνωστη για τους υπόλοιπους ασθενείς με FD (66). Η έγκαιρη διάγνωση ασθενών με τον κλασσικό (βαριάς μορφής) FD φαινότυπο έχει ως αποτέλεσμα την έγκαιρη θεραπεία και συμβουλευτική και είναι σημαντική, καθώς ασθενείς με τον κλασσικό FD φαινότυπο που δεν λαμβάνουν θεραπεία θα υποστούν κάποια στιγμή οργανική ανεπάρκεια (62).

3. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η νόσος Fabry (FD) είναι μία λυσοσωματική ενζυμοπάθεια που συχνά υποδιαγιγνώσκεται καθώς η συμπτωματολογία της συμπίπτει με τη συμπτωματολογία διαφόρων άλλων συστημικών και ρευματικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου του οικογενή μεσογειακού πυρετού (FMF). Σε αυτό προστίθεται και το γεγονός ότι η νόσος Fabry (FD) προκαλείται από ένα μεγάλο αριθμό (τουλάχιστον 585) μεταλλάξεων του γονιδίου GLA (63). Ο υψηλός αυτός αριθμός μεταλλάξεων ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την ετερογένεια των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου, γεγονός που κάνει ακόμη δυσκολότερη τη διάγνωση της νόσου. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι από τη στιγμή που η νόσος Fabry έχει φυλοσύνδετο υπολειπόμενο χαρακτήρα, οι γυναίκες που πάσχουν από τη νόσο αυτή είναι συνήθως ετεροζυγώτες με τυχαία απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν λιγότερο προφανή συμπτώματα, κάνοντας με αυτό το τρόπο ακόμα δυσχερέστερη τη διάγνωση της νόσου (36).

Ο Zizzo και οι συνεργάτες του στην εργασία με τίτλο "Misdiagnosis of Familial Mediterranean Fever in patients with Anderson-Fabry disease" έδειξαν ότι η νόσος Fabry υποδιαγιγνώσκεται, ειδικά σε ασθενείς που παρουσιάζουν αμφιβόλου προέλευσης συμπτωματολογία, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μοριακή ανάλυση των γονιδίων MEFV και GLA αποτελεί βασικό εργαλείο για τη σωστή και έγκαιρη διάγνωση, αλλά και θεραπεία, της κάθε νόσου (36).

Τα νοσήματα FMF και Fabry σχετίζονται με σημαντικές μειώσεις του προσδόκιμου ζωής και στα δύο φύλα και εμφανίζουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας αν δε διαγνωστούν και αντιμετωπιστούν έγκαιρα. Επομένως η σωστή και έγκαιρη διάγνωση θα οδηγήσει στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Συνεπώς επιβάλλεται οι ασθενείς με FD να ακολουθήσουν ενζυμική θεραπεία και στους ασθενείς με FMF να χορηγηθεί κολχικίνη.

4. ΣΚΟΠΟΣ

Η εργασία του Zizzo και των συνεργατών του υπήρξε το κίνητρο για τη διερεύνηση περιστατικών με FMF κλινική διάγνωση και ταυτόχρονη υποδιάγνωση της νόσου Fabry. Όπως ήδη αναφέρθηκε, το γονίδιο MEFV είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της νόσου FMF. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η γενετική διάγνωση της νόσου FMF είναι θετική κατά την παρουσία μίας ομόζυγης μετάλλαξης ή δύο διαφορετικών ετερόζυγων μεταλλάξεων (συνδυασμένη ετεροζυγωτίας) στο γονίδιο MEFV (82). Βάσει των δεδομένων αυτών και με στόχο την ανίχνευση περιστατικών όπου η νόσος Fabry έχει υποδιαγνωσθεί, από την παρούσα μελέτη αποκλείστηκαν όλοι οι ασθενείς που έχουν γενετικά διαγνωσθεί για τη νόσο FMF, καθώς μέχρι σήμερα δεν έχουν καταγραφεί περιστατικά στα οποία ένας ασθενής νοσεί ταυτόχρονα από FMF και Fabry. Επίσης αποκλείστηκαν από τη μελέτη οι μονά ετερόζυγοι ασθενείς των οποίων ένας από τους δυο γονείς πάσχει από τη νόσο FMF.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση πιθανών GLA μεταλλάξεων σε ετερόζυγους για τη νόσο FMF ασθενείς και επομένως η ταυτοποίηση περιστατικών όπου η νόσος Fabry έχει υποδιαγνωσθεί.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το υλικό της μελέτης περιλαμβάνει συνολικά 24 περιστατικά τα οποία προέρχονται από το εργαστήριο «Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας», Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Από το σύνολο των δειγμάτων που αποστάλθηκαν στο εργαστήριο με κλινική εικόνα «οικογενούς μεσογειακού πυρετού», επιλέχθηκαν τα δείγματα στα οποία, μετά από γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του MEFV, βρέθηκε μία μονή ετερόζυγη μετάλλαξη για το γονίδιο MEFV.

Σε κάθε δείγμα που έχει βρεθεί μία ετερόζυγη μετάλλαξη για το γονίδιο MEFV ακολουθεί η ενίσχυση με PCR (συνολικά 5 αντιδράσεις) και των 7 επτά εξονίων (συμπεριλαμβανομένων των ορίων εξονίων-ιντρονίων) του GLA γονιδιωματικού DNA.

5.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.2.1 Απομόνωση DNA

Κατά την διαδικασία απομόνωσης του DNA ακολουθείται ελαφρώς τροποποιημένο το πρωτόκολλο που περιλαμβάνεται στο επίσημο εγχειρίδιο της εταιρείας Invitrogen υπό τον τίτλο «Blood Lysate» (αιμόλυμα) από το «PureLink® Genomic DNA Kits» της εταιρείας Invitrogen, καθώς το αρχικό δείγμα που είχε συλλεχθεί και αποσταλεί στο εργαστήριο ήταν ολικό περιφερικό αίμα.

Λύση του αίματος (Blood Lysate)

1. Μεταφορά 200 μ l περιφερικού αίματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης των 1.5 ml (eppendorf).
2. Προσθήκη 20 μ l πρωτεϊνάσης K (διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών).
3. Προσθήκη 20 μ l RNase A (την απομάκρυνση του RNA).
4. Ανάδευση του δείγματος με σύντομη περιδίνηση σε συσκευή vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

5. Προσθήκη 200 µl διαλύματος λύσης PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer και ανάδευση με περιδίνηση (vortex) για να ληφθεί ένα ομογενές διάλυμα.
6. Επώαση στους 55 ° C για 20 λεπτά για την ολοκλήρωση της πέψης των πρωτεϊνών.
7. Προσθήκη 200 µl αιθανόλης 96-100 % στο προϊόν λύσης. Ανάδευση με περιδίνηση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα για να επιτευχθεί ένα ομοιογενές διάλυμα.

Δέσμευση DNA (Binding DNA)

8. Μεταφορά του λύματος (προϊόν λύσης) σε μία PureLink® Spin στήλη.
9. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000×g (~13.000rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση της στήλης καθαρισμού (spin) σε καθαρό σωλήνα συλλογής PureLink®.

Καθαρισμός DNA (Washing DNA)

11. Προσθήκη 500 µl του διαλύματος Wash Buffer 1 (περιέχει αιθανόλη) στη στήλη.
12. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000×g (~13.000rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση της στήλης καθαρισμού (spin) σε καθαρό σωλήνα συλλογής PureLink®.
14. Προσθήκη 500 µl του διαλύματος Wash Buffer 2 (περιέχει αιθανόλη) στη στήλη.
15. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (~13.400rpm) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (για ελαχιστοποίηση τυχόν υπολειμμάτων από το διάλυμα Wash Buffer 2, καθώς είναι γνωστό ότι η ύπαρξη αιθανόλης μπορεί να αναστείλει τις ενζυμικές αντιδράσεις).
16. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής

Εκχύλιση DNA (Eluting DNA)

17. Τοποθέτηση της στήλης spin σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης (eppendorf).
18. Εκχύλιση του DNA με την προσθήκη 100 µl του διαλύματος PureLink® Genomic Elution Buffer, που προηγουμένως είχε θερμανθεί στους 55° C.
19. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
20. Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (~13.400rpm) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Αποθήκευση DNA (Storing DNA)

21. Αποθήκευση του δείγματος DNA στους -20 °C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση ή στους 4 °C για άμεση χρήση.

5.2.2 Γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του MEFV

Πραγματοποιείται γενετική ανάλυση για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων του MEFV γονιδίου, βασισμένη στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και στον αντίστροφο υβριδισμό. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια:

5.2.2.1 Ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου MEFV με την τεχνική της PCR εντός δοκιμαστικού σωλήνα (in vitro).

Μετά από την απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου MEFV, στις οποίες βρίσκονται οι 12 μεταλλάξεις που ανιχνεύει η τυποποιημένη συσκευασία (kit) FMF StripAssay της ViennaLab Diagnostics, με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας βιοτινυλισμένους εκκινητές.

❖ Προετοιμασία διαλυμάτων

A. Προετοιμασία αραιωμένης Taq DNA πολυμεράσης (0.2 U/μl): 50 μl αποστειρωμένου-απεσταγμένου νερού και 2.2 μl πυκνής (5 U/μl) DFS-Taq DNA πολυμεράσης της εταιρείας Bioron.

B. Προετοιμασία ενός σωληνάριου PCR για κάθε ένα δείγμα. Επιπροσθέτως σε κάθε δοκιμή ετοιμάζεται ακόμη ένα σωληνάριο PCR σαν αρνητικός μάρτυρας που περιλαμβάνει το μείγμα ενίσχυσης, την αραιωμένη Taq DNA πολυμεράση, χωρίς όμως την προσθήκη DNA.

Γ. Σε κάθε σωληνάριο PCR τοποθετούνται 15 μl του έτοιμου μείγματος ενίσχυσης (κίτρινο καπάκι), 5 μl αραιωμένης Taq DNA πολυμεράσης (1unit), 3 μl αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και 2 μl του δείγματος DNA. Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 25μl.

❖ Προθέρμανση του θερμοκυκλοποιητή στους 94°C. Τοποθέτηση των PCR σωληνάρων στον θερμοκυκλοποιητή και έναρξη του παρακάτω προγράμματος:

➤ Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94°C για 2 λεπτά

➤ **35 κύκλοι** από τα παρακάτω τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	94°C για 15 δευτερόλεπτα
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	58°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C για 30 δευτερόλεπτα

➤ Τελική επιμήκυνση των εκκινητών (extension): 72°C για 3 λεπτά

❖ Τα προϊόντα της PCR τοποθετούνται στους -20 °C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση ή στους 4 °C για άμεση χρήση.

5.2.2.2 Έλεγχος των προϊόντων της PCR αντίδρασης

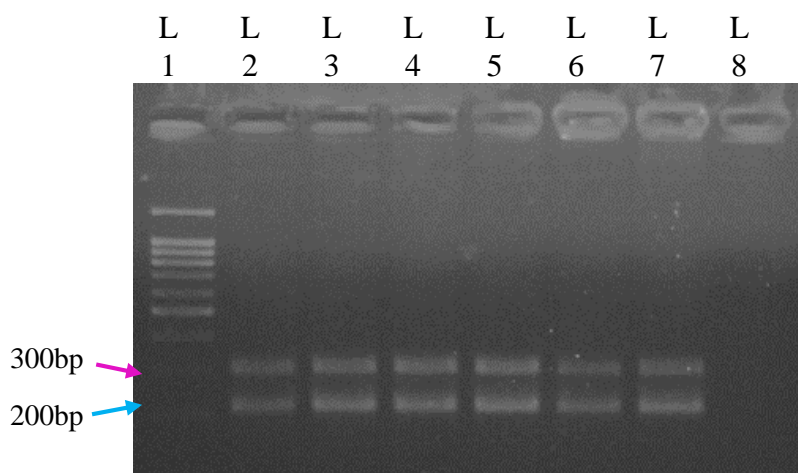
Πραγματοποιείται έλεγχος των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε γέλη (πήκτωμα) αгарόζης 2%.

Το πήκτωμα αгарόζης 2% παρασκευάζεται με:

- 2 γραμμάρια αгарόζης UltraPure™ Agarose της εταιρείας Invitrogen
- 10 ml UltraPure™ TBE 10x (Tris/Borate/EDTA) της εταιρείας Invitrogen
- 90 ml απεσταγμένο νερό
- 5 μl (0.5 mg/ml) βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

1. Στο πρώτο φρεάτιο του πηκτώματος τοποθετούνται 3 μl από τον DNA Ladder 100bp (μάρτυρα μοριακών βαρών DNA ανά 100bp), και 2 μl της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Loading Dye). Στα υπόλοιπα φρεάτια τοποθετούνται 5μl του προϊόντος της PCR αντίδρασης και 2 μl της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.
2. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2% σε τάση 120V και ένταση 400 mA για 30 λεπτά. Με την ηλεκτροφόρηση διαχωρίζονται τα τμήματα DNA ανάλογα με το μέγεθός τους.
3. Το πήκτωμα φωτογραφείται υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και με το λογισμικό 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems).
4. Τα αναμενόμενα θραύσματα της ενίσχυσης του γονιδίου MEFV έχουν μοριακό βάρος 206, 236, 295 και 318 bp. Μετά από εμφάνιση κάποιου ή κάποιων θραυσμάτων αυτών των μεγεθών ακολουθεί αντίστροφος υβριδισμός των PCR προϊόντων. Στην παρακάτω φωτογραφία είναι εμφανές ότι έχει πραγματοποιηθεί

ενίσχυση των προϊόντων στα φρεάτια (lanes) 2, 3, 4, 5, 6, και 7, ενώ στο φρεάτιο 8, όπου βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας, δεν πραγματοποιήθηκε ενίσχυση (επιθυμητό αποτέλεσμα).



Εικόνα 24: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση του MEFV. Τα δυο βέλη υποδεικνύουν το μέγεθος των DNA θραυσμάτων του μάρτυρα.

Lane 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών DNA ανά 100bp
 Lane 2: Προϊόν PCR
 Lane 3: Προϊόν PCR
 Lane 4: Προϊόν PCR
 Lane 5: Προϊόν PCR
 Lane 6: Προϊόν PCR
 Lane 7: Προϊόν PCR
 Lane 8: Αρνητικό control της PCR

5.2.2.3 Αντίστροφος υβριδισμός των προϊόντων της PCR αντίδρασης

Ο αντίστροφος υβριδισμός των PCR προϊόντων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός test strip (ταινίας υβριδισμού), πάνω στο οποίο βρίσκονται ακινητοποιημένοι ειδικοί (συμπληρωματικοί ως προς τις 12 προς ανίχνευση μεταλλάξεις) μη σημασμένοι ιχνηθέτες, τοποθετημένοι πάντα στην ίδια θέση. Οι δεσμευμένες βιοτινυλισμένες αλληλουχίες ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη-αλκαλική φωσφατάση και υποστρώματα χρώματος. Η τυποποιημένη αυτή συσκευή (FMF StripAssay) ανιχνεύει 12 μεταλλάξεις στο γονίδιο MEFV, οι οποίες είναι: **E148Q, P369S, F479L, M680I (E / K), M680I (Z / A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H.**

Ο υβριδισμός πραγματοποιείται στο μηχάνημα TwinCubator® (11660) της εταιρείας HAIN Lifescience. Το μηχάνημα είναι ένας θέρμο-αναδευτήρας (thermoshaker), ο οποίος περιλαμβάνει μία πλάκα υβριδισμού.

A. Προετοιμασία υλικών

- Το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (Hybridization Buffer) και το διάλυμα πλύσεων A (Wash Solution A) τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 45°C, προκειμένου να διαλυθούν όλα τα ιζήματα που σχηματίζονται σε αυτά τα διαλύματα στους 2-8°C όπου φυλάσσονται.
- Οι ταινίες υβριδισμού, το DNAT, το Conjugate Solution, το Wash Solution B and το Color Developer πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους.
- Για κάθε ένα δείγμα χρησιμοποιείται μία ταινία υβριδισμού και ένα ξεχωριστό φρεάτιο υβριδισμού.

B. Διαδικασία υβριδισμού

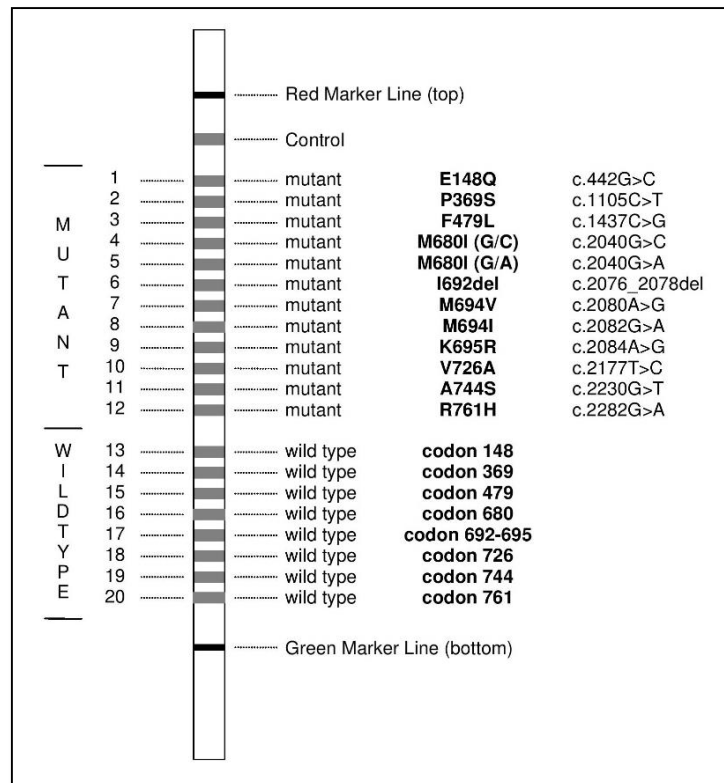
1. Τοποθετούνται 10 µl DNAT (μπλε καπάκι) στη μία άκρη σε κάθε ένα φρεάτιο υβριδισμού.
2. Σε κάθε φρεάτιο υβριδισμού τοποθετούνται 10 µl του προϊόντος της PCR πάνω στην ήδη τοποθετημένη σταγόνα DNAT.
3. Απαιτείται καλή ανάμειξη με τη βοήθεια πιπέτας. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού Hybridization Buffer (από τους 45°C) σε κάθε φρεάτιο. Πραγματοποιείται απαλή ανάδευση των φρεατίων.
5. Εισαγωγή και πλήρες βύθισμα της μαρκαρισμένης ταινίας υβριδισμού στο αντίστοιχο φρεάτιο (με το αντίστοιχο δείγμα).
6. Επώαση για 30 λεπτά στους 45°C στην πλατφόρμα ανάδευσης (~50 rpm) του μηχανήματος υβριδισμού (με κλειστό καπάκι, για διατήρηση σταθερής της θερμοκρασίας των διαλυμάτων).
7. Απομάκρυνση του διαλύματος υβριδισμού, χωρίς να στεγνώσουν οι ταινίες υβριδισμού.

Γ. Εκπλύσεις

8. Προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης Wash Solution A (45°C). Γίνεται ανακίνηση του περιεχομένου σε κάθε φρεάτιο για 10 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση των υγρών.
9. Προσθήκη 1 ml Wash Solution A και επώαση για 15 λεπτά στους 45°C στην πλατφόρμα ανάδευσης. Απομάκρυνση των υγρών.
10. Προσθήκη 1 ml Wash Solution A και επώαση για 15 λεπτά στους 45°C στην πλατφόρμα ανάδευσης. Απομάκρυνση των υγρών.

Δ. Εμφάνιση χρώματος στις ταινίες

11. Προσθήκη 1 ml διαλύματος σύζευξης Conjugate Solution και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στην πλατφόρμα ανάδευσης. Απομάκρυνση των υγρών.
12. Προσθήκη 1 ml διαλύματος έκπλυσης Wash Solution B. Γίνεται ανακίνηση του περιεχομένου σε κάθε φρεάτιο για 10 δευτερόλεπτα. Απομάκρυνση των υγρών.
13. Προσθήκη 1 ml διαλύματος έκπλυσης Wash Solution B και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στην πλατφόρμα ανάδευσης. Απομάκρυνση των υγρών.
14. Προσθήκη 1 ml διαλύματος έκπλυσης Wash Solution B και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στην πλατφόρμα ανάδευσης. Απομάκρυνση των υγρών.
15. Προσθήκη 1 ml διαλύματος Color Developer (εμφάνιση χρώματος). Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι στην πλατφόρμα ανάδευσης. Έκπλυση της ταινίας υβριδισμού αρκετές φορές με απεσταγμένο νερό.
16. Η ταινία υβριδισμού τοποθετείται να στεγνώσει πάνω σε διηθητικό χαρτί στο σκοτάδι.
17. Κάθε ταινία υβριδισμού συγκρίνεται με την παρακάτω πρότυπη ταινία υβριδισμού (Εικ. 25) με στόχο την ταυτοποίηση πιθανών μεταλλάξεων του MEFV γονιδίου.



Εικόνα 25: Πρότυπη ταινία υβριδισμού. Πάνω στην ταινία φαίνονται οι 12 ζώνες των μεταλλάξεων (mutant), οι 8 ζώνες των αγρίων τύπων (wild type) και η ζώνη του θετικού μάρτυρα (control).

Πηγή: FMF StripAssay της ViennaLab Diagnostics

5.2.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων του GLA γονιδίου

5.2.3.1 Ενίσχυση των πέντε περιοχών του γονιδίου GLA με την τεχνική της PCR εντός δοκιμαστικού σωλήνα (in vitro).

Σε κάθε δείγμα που έχει βρεθεί μία ετερόζυγη μετάλλαξη για το γονίδιο MEFV πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (συνολικά 5 αντιδράσεις) και των 7 επτά εξονίων (συμπεριλαμβανομένων των ορίων εξονίων-ιντρονίων) του γονιδίου του GLA. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εξόνιο/α, όπως και το μέγεθος του κάθε PCR προϊόντος που προκύπτει, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Primers for region A (exon 1) :	391bp
Sense: 5'- CCCAGTTGCCAGAGAAAACAATAAC-3'	
Antisense: 5'-AGACTCTCCAGTTCCCCAAACAC-3'	
Primers for region B (exon 2) :	337bp
Sense: 5'-CCCAAGGTGCCTAATAAATGG-3'	
Antisense: 5'-CCATGAGGGCTGTTTCTAA-3'	
Primers for region C (exon 3) :	323bp
Sense: 5'-CGCAGCCTGGAATGGTTCTCTC-3'	
Antisense: 5'-CTCAGCTACCATGGCCTCA-3'	
Primers for region D (exon 4) :	212bp
Sense: 5'-AGCTGGAAATTCATTTCTTT-3'	
Antisense: 5'-TTGGTTTCCTTTGTTGTCA-3'	
Primers for region E (exons 5-7) :	1280bp
Sense: 1392oF 5'-AAACTCAAGAGAAGGCTACAAGT-3'	
Antisense: 15175R 5'-AAAAAGGTGGACAGGAAGTAGTAGT-3'	

Πίνακας 3: Τα ζεύγη των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του εξονίου/εξονίων του GLA καθώς και το μέγεθος των προϊόντων που προκύπτουν.

A. Προετοιμασία αραιωμένης Taq DNA πολυμεράσης (0.2 U/μl): 50 μl δις απεσταγμένου νερού και 2.2 μl πυκνής (5 U/μl) Taq DNA πολυμεράσης. Για τις περιοχές A, B, C και D χρησιμοποιείται η DFS-Taq DNA πολυμεράση (5 U/μl) της εταιρείας Bioron (101005). Για την περιοχή E χρησιμοποιείται η MyTaq™ DNA πολυμεράση (5 U/μl) της εταιρείας Bioline (BIO-21105).

B. Προετοιμασία ενός σωληνάριου PCR για κάθε ένα δείγμα. Επιπροσθέτως σε κάθε δοκιμή ετοιμάζεται ακόμη ένα σωληνάριο PCR σαν αρνητικός μάρτυρας που περιλαμβάνει το μείγμα ενίσχυσης, την αραιωμένη Taq DNA πολυμεράση, χωρίς όμως την προσθήκη DNA. Τελικός όγκος αντίδρασης 30 μl.

Για τις περιοχές **A, B, C** και **D** προετοιμάζεται ένα μείγμα Mastermix (για περίπου 16 αντιδράσεις) με τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα DNA πολυμεράσης 10x	50
MgCl ₂ (100 mM)	7.5
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια-dNTPs (100 mM)	40
Εμπρόσθιος (forward) εκκινητής (20pmol)	10
Οπίσθιος (reverse) εκκινητής (20pmol)	10
Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (dH ₂ O)	242.5

Για την περιοχή **E** προετοιμάζεται ένα μείγμα Mastermix (για περίπου 16 αντιδράσεις) με τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα myTaq πολυμεράσης 5x	96
Εμπρόσθιος (forward) εκκινητής (20pmol)	17
Οπίσθιος (reverse) εκκινητής (20pmol)	17
Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (dH ₂ O)	225

Σε κάθε σωληνάριο PCR τοποθετούνται:

- 22 μl του έτοιμου Mastermix
- 6 μl αραιωμένης Taq DNA πολυμεράσης
- 2 μl του δείγματος DNA

Παρακάτω παρουσιάζονται οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR στο θερμοκυκλοποιητή για τις πέντε περιοχές ενίσχυσης του γονιδίου GLA.

Περιοχές A, B και C

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94°C για 2 λεπτά
- **30 κύκλοι** από τα παρακάτω τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	94°C για 30 δευτερόλεπτα
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	58°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C για 30 δευτερόλεπτα

- Τελική επιμήκυνση των εκκινητών (extension): 72°C για 5 λεπτά

Περιοχή D

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94°C για 2 λεπτά
- **32 κύκλοι** από τα παρακάτω τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	94°C για 30 δευτερόλεπτα
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	54°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C για 30 δευτερόλεπτα

- Τελική επιμήκυνση των εκκινητών (extension): 72°C για 5 λεπτά

Περιοχή E

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 94°C για 2 λεπτά
- **32 κύκλοι** από τα παρακάτω τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)	94°C για 30 δευτερόλεπτα
2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)	54°C για 30 δευτερόλεπτα
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)	72°C για 75 δευτερόλεπτα

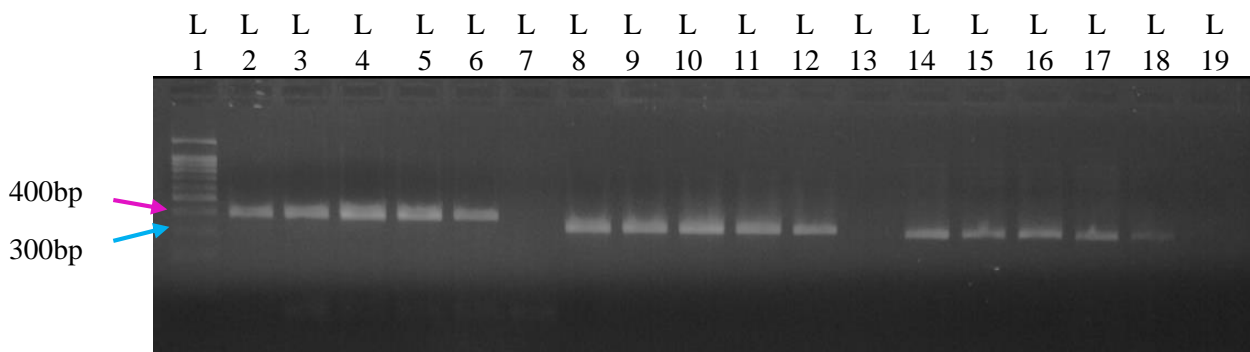
- Τελική επιμήκυνση των εκκινητών (extension): 72°C για 5 λεπτά

5.2.3.2 Έλεγχος των αποτελεσμάτων της PCR αντίδρασης

Ακολουθείται ακριβώς η διαδικασία η οποία περιγράφεται στην ενότητα 5.2.2.2 με στόχο την επιβεβαίωση της παρουσίας των προϊόντων της PCR για κάθε δείγμα και τον καθορισμό της μεθόδου καθαρισμού του προϊόντος της PCR. Αναλυτικότερα:

1. Όταν μετά από ηλεκτροφόρηση το προϊόν έχει μόνο μία ζώνη, στο αναμενόμενο μέγεθος (και ύψος), τότε ακολουθεί ο άμεσος καθαρισμός των PCR προϊόντων (Εικόνες 26 και 27).
2. Σε περίπτωση που εμφανίζονται περισσότερες από μία ζώνες (συμπεριλαμβανομένου και της επιθυμητής ζώνης), τότε ακολουθεί καθαρισμός των PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης (Εικ. 28).
3. Από τις παρακάτω φωτογραφίες είναι εμφανές ότι για τις περιοχές A, B, C και D πρέπει να πραγματοποιηθεί άμεσος καθαρισμός των PCR προϊόντων, ενώ για την περιοχή E καθαρισμός των PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης.

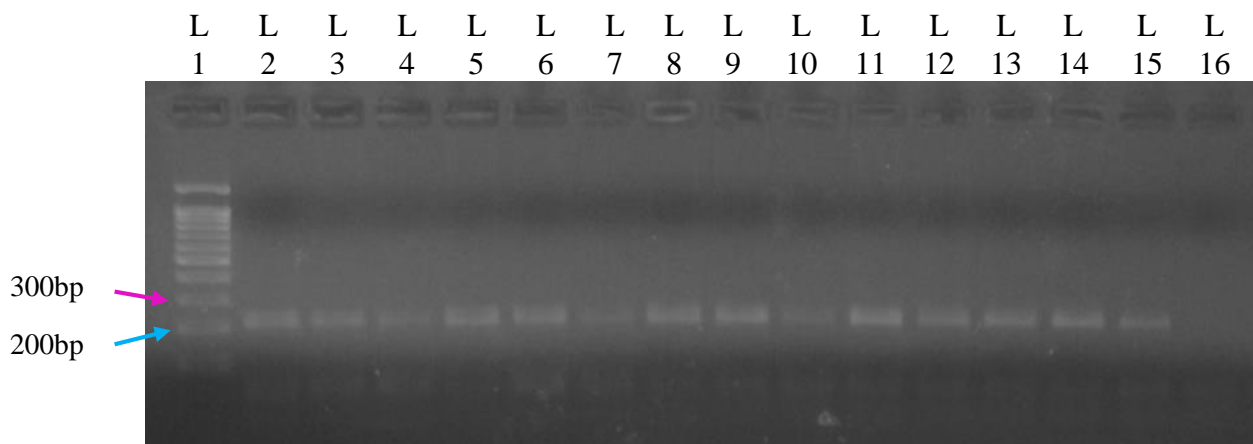
➤ Περιοχές A (391bp), B (337bp) και C (323 bp)



Εικόνα 26: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση των περιοχών A, B και C του GLA. Τα δυο βέλη υποδεικνύουν το μέγεθος των DNA θραυσμάτων του μάρτυρα. Παρατηρείται μόνο μια ζώνη προϊόντος σε κάθε lane.

Lane 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών DNA ανά 100bp
 Lane 2-6: Προϊόν PCR για την περιοχή A
 Lane 7: Αρνητικό control της PCR (για την περιοχή A)
 Lane 8-12: Προϊόν PCR για την περιοχή B
 Lane 13: Αρνητικό control της PCR (για την περιοχή B)
 Lane 14-18: Προϊόν PCR για την περιοχή C
 Lane 19: Αρνητικό control της PCR (για την περιοχή C)

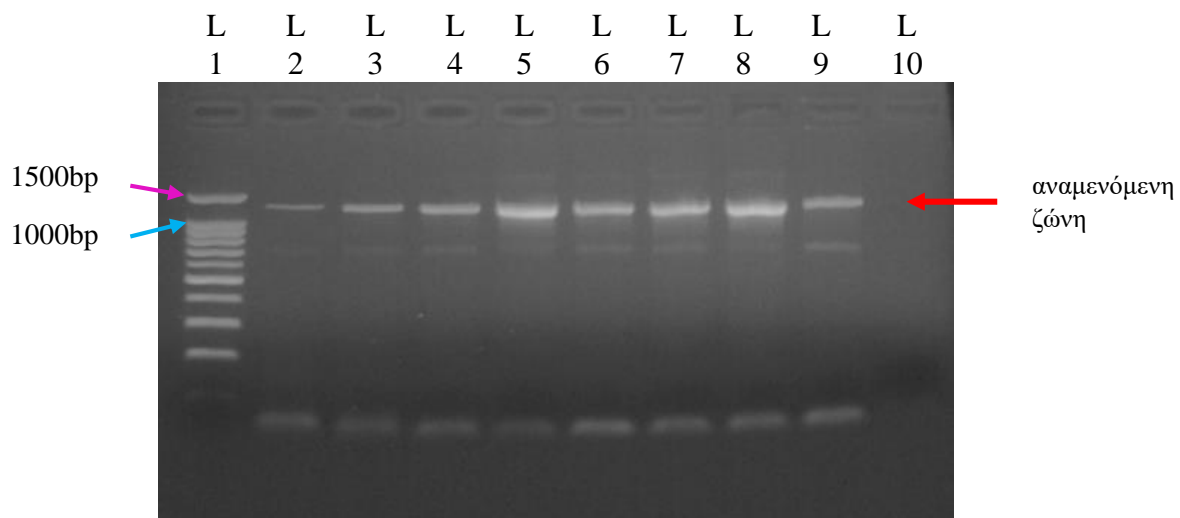
➤ Περιοχή D (212bp)



Εικόνα 27: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση της περιοχής D του GLA. Τα δυο βέλη υποδεικνύουν το μέγεθος των DNA θραυσμάτων του μάρτυρα. Παρατηρείται μόνο μια ζώνη προϊόντος σε κάθε lane.

Lane 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών DNA ανά 100bp
 Lane 2-15: Προϊόν PCR για την περιοχή D
 Lane 16: Αρνητικό control της PCR (για την περιοχή D)

➤ Περιοχή E (1280bp)



Εικόνα 28: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση της περιοχής E του GLA. Τα δυο βέλη αριστερά υποδεικνύουν το μέγεθος των DNA θραυσμάτων του μάρτυρα. Παρατηρούνται περισσότερες από μία ζώνες προϊόντος σε κάθε lane.

Lane 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών DNA ανά 100bp
Lane 2-9: Προϊόν PCR για την περιοχή E
Lane 10: Αρνητικό control της PCR (για την περιοχή E)

5.2.3.2 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

5.2.3.3.1 Άμεσος καθαρισμός PCR προϊόντων (PureLink® PCR Purification Kit, Invitrogen)

Δέσμευση DNA

1. Προσθήκη 100 μl του ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης Buffer PureLink® Binding B2 (περιέχει ισοπροπανόλη) στο διάλυμα του προϊόντος της PCR αντίδρασης. Ακολουθεί καλή ανάμειξη.
2. Μεταφορά του διαλύματος (προϊόν PCR+ρυθμιστικό διάλυμα) σε στήλη PureLink® Spin.
3. Φυγοκέντρηση της στήλης σε 10.000×g (~13.000rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από τη στήλη και επανατοποθέτηση της στήλης spin μέσα στο σωλήνα συλλογής.

Καθαρισμός DNA

5. Προσθήκη 650 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (με αιθανόλη) στη στήλη spin.
6. Φυγοκέντρωση της στήλης σε $10.000\times g$ (~ 13.000 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από τη στήλη και επανατοποθέτηση της στήλης spin μέσα στο σωλήνα συλλογής.
8. Φυγοκέντρωση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (~ 13.400 rpm) για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση του εναπομείναντος ρυθμιστικού διαλύματος. Απόρριψη τους σωληνάριου συλλογής.

Eluting DNA (εκχύλιση DNA)

9. Τοποθέτηση της στήλης spin σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο έκπλυσης των 1,7 ml (PureLink® Elution Tube).
10. Προσθήκη 30 μ l ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) στο κέντρο της στήλης.
11. Επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
12. Φυγοκέντρωση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα (~ 13.400 rpm) για 2 λεπτά.
13. Αφαίρεση και απόρριψη της στήλης. Το σωληνάριο περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR ($\sim 26\mu$ l).

Αποθήκευση DNA

14. Αποθήκευση του καθαρισμένου DNA στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για μακροπρόθεσμη αποθήκευση ή στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για άμεση χρήση.

5.2.3.3.2 Καθαρισμός PCR προϊόντος από γέλη αгарόζης (PureLink® Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen)

Ηλεκτροφόρηση της PCR αντίδρασης

1. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στο σκοτάδι όλης της ποσότητας της PCR αντίδρασης σε πήκτωμα αгарόζης 2% (5.2.2.2) σε τάση 120V και ένταση 400 mA για 50 λεπτά για να διαχωριστούν επαρκώς τα τμήματα του DNA που ενισχύθηκαν στη συγκεκριμένη PCR αντίδραση.

Τομή και διάλυση του πηκτώματος

2. Γίνεται τομή της περιοχής του πηγματος που περιέχει το προϊόν DNA που πρόκειται να καθαριστεί (κάτω από UV ακτινοβολία)
3. Τοποθέτηση της τομής του πηγματος σε αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης.
4. Προσθήκη 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος διάλυσης Gel Solubilization Buffer (L3) στο σωληνάριο φυγοκέντρωσης,
5. Τοποθέτηση του σωληναρίου (πήκτωμα+L3) σε υδατόλουτρο στους 50°C και επώαση για 20 λεπτά. Προτείνεται αναποδογύρισμα του σωληναρίου κάθε 3 λεπτά για καλύτερη ανάμειξη και διασφάλιση της διάλυσης του πηκτώματος.
6. Προσθήκη 100 μl ισοπροπανόλης στο διάλυμα (για τη βέλτιστη απόδοση του DNA) και καλή ανάδευση.

Καθαρισμός DNA

7. Μεταφορά του διαλύματος σε μία στήλη Quick Gel Extraction μέσα σε σωλήνα συλλογής.
8. Φυγοκέντρωση της στήλης σε 12.000×g για 1 λεπτό (δέσμευση DNA).
9. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από τη στήλη και επανατοποθέτηση της στήλης spin μέσα στο σωλήνα συλλογής.
10. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (περιέχει αιθανόλη) Wash Buffer (W1) στη στήλη.
11. Φυγοκέντρωση της στήλης σε 12.000×g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Απόρριψη του υγρού που πέρασε από τη στήλη και επανατοποθέτηση της στήλης spin μέσα στο σωλήνα συλλογής.
13. Φυγοκέντρωση της στήλης σε μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής.
15. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρωσης,
16. Προσθήκη 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης Elution Buffer E5 στο κέντρο της στήλης.
17. Επώαση της στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
18. Φυγοκέντρωση της στήλης σε 12.000×g για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάριο περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR (~26μl).
19. Αφαίρεση και απόρριψη της στήλης.

Αποθήκευση DNA

20. Αποθήκευση του καθαρισμένου DNA στους -20 °C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση ή στους 4 °C για άμεση χρήση.

5.2.3.4 Αλληλούχιση DNA

Η άμεση αλληλούχιση των PCR προϊόντων απαιτεί την προσθήκη 40 ng του καθαρισμένου PCR προϊόντος, 2.4μl του κατάλληλου για την αλληλούχιση εκκινητή (Πίνακας 4) (τελική συγκέντρωση 1 pmol/μl) και αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 12μl. Η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων έγινε με τη χρήση ειδικής τυποποιημένης συσκευασίας (Applied Biosystems, Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing kit) στον γενετικό αναλυτή ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Εμπρόσθιος εκκινητής αλληλούχισης για την περιοχή A (εξόνιο 1):

Sense: 5'- CCCAGTTGCCAGAGAGAAACAATAAC-3'

Εμπρόσθιος εκκινητής αλληλούχισης για την περιοχή B (εξόνιο 2):

Sense: 5'-CCCAAGGTGCCTAATAAATGG -3'

Εμπρόσθιος εκκινητής αλληλούχισης για την περιοχή C (εξόνιο 3):

Sense: 5'-CGCAGCCTGGAATGGTTCTCTC -3'

Οπίσθιος εκκινητής αλληλούχισης για την περιοχή D (εξόνιο 4):

Antisense: 5'-TTGGTTTCCTTTGTTGTCA -3'

Εκκινητές αλληλούχισης για την περιοχή E (εξόνια 5-7):

Εμπρόσθιος: 13920F 5'-AAACTCAAGAGAAGGCTACAAGT -3'

Οπίσθιος: SEQ 7F 5'-TGAATGCCAAACTAACAGG -3'

Πίνακας 4: Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αλληλούχιση των πέντε περιοχών του γονιδίου GLA.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ MEFV

Από το σύνολο των περιστατικών που απεστάλησαν στο εργαστήριο «Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας», Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα 2012-2015, βρέθηκαν 24 περιστατικά ετερόζυγα με μονή μετάλλαξη για το γονίδιο MEFV. Στον πίνακα 5 αναφέρεται η μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε σε κάθε δείγμα, ενώ στον πίνακα 6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σύμφωνα με το ποσοστό εμφάνισής τους.

Κωδικός	FMF RESULT
1	E148Q heterozygous
2	M694V heterozygous
3	M694V heterozygous
4	P369S heterozygous
5	P369S heterozygous
6	V726A heterozygous
7	M694V heterozygous
10	E148Q heterozygous
8	P369S heterozygous
9	V726A heterozygous
11	E148Q heterozygous
12	E148Q heterozygous
13	E148Q heterozygous
14	P369S heterozygous
15	P369S heterozygous
16	P369S heterozygous
17	P369S heterozygous
18	P369S heterozygous
19	K695R heterozygous
20	M694V heterozygous
21	M694V heterozygous
22	M694V heterozygous
23	M694V heterozygous
24	V726A heterozygous

Πίνακας 5: Αποτελέσματα της μετάλλαξης του γονιδίου MEFV που ανιχνεύθηκε σε κάθε δείγμα.

Είδος μετάλλαξης	Αριθμός περιστατικών	Ποσοστό εμφάνισης
P369S heterozygous	8	33.33%
M694V heterozygous	7	29.17%
E148Q heterozygous	5	20.83%
V726A heterozygous	3	12.50%
K695R heterozygous	<u>1</u>	<u>4.17%</u>
	24	100%

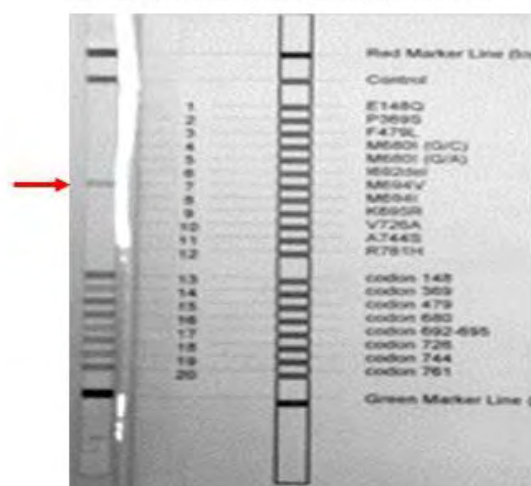
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μεταλλάξεων του γονιδίου MEFV που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα. Οι μεταλλάξεις είναι οι: P369S, M694V, E148Q, V726A και K695R.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο MEFV ανιχνεύονται πάνω στις ταινίες υβριδισμού και ταυτοποιούνται μετά από σύγκριση με μία πρότυπη ταινία που παρέχει η τυποποιημένη συσκευασία (kit) FMF StripAssay της ViennaLab Diagnostics. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από αυτές τις πέντε μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα. Στις φωτογραφίες το βέλος υποδεικνύει τη μετάλλαξη.

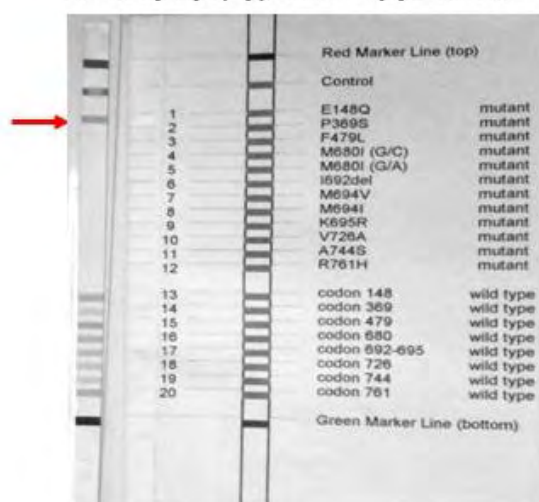
1. Ετερόζυγη μετάλλαξη P369S



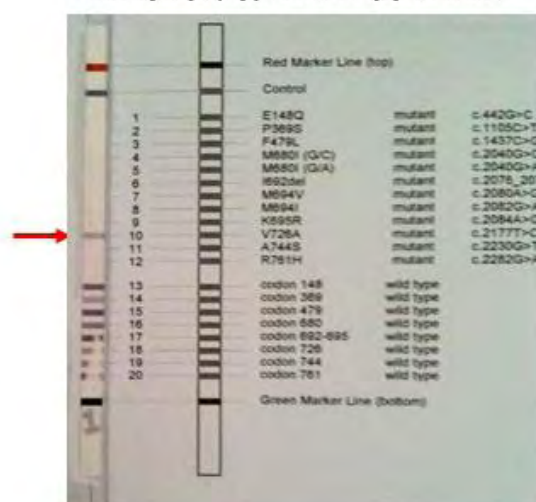
2. Ετερόζυγη μετάλλαξη M694V



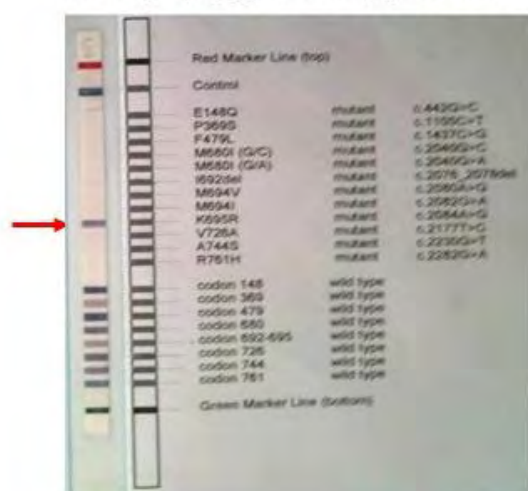
3. Ετερόζυγη μετάλλαξη E148Q



4. Ετερόζυγη μετάλλαξη V726A



5. Ετερόζυγη μετάλλαξη K695R



Εικόνα 29: Αποτελέσματα αντίστροφου υβριδισμού για τις πέντε μεταλλάξεις του γονιδίου **MEFV** που βρέθηκαν στα δείγματα. Οι μεταλλάξεις είναι οι: P369S, M694V, E148Q, V726A και K695R.

6.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GLA

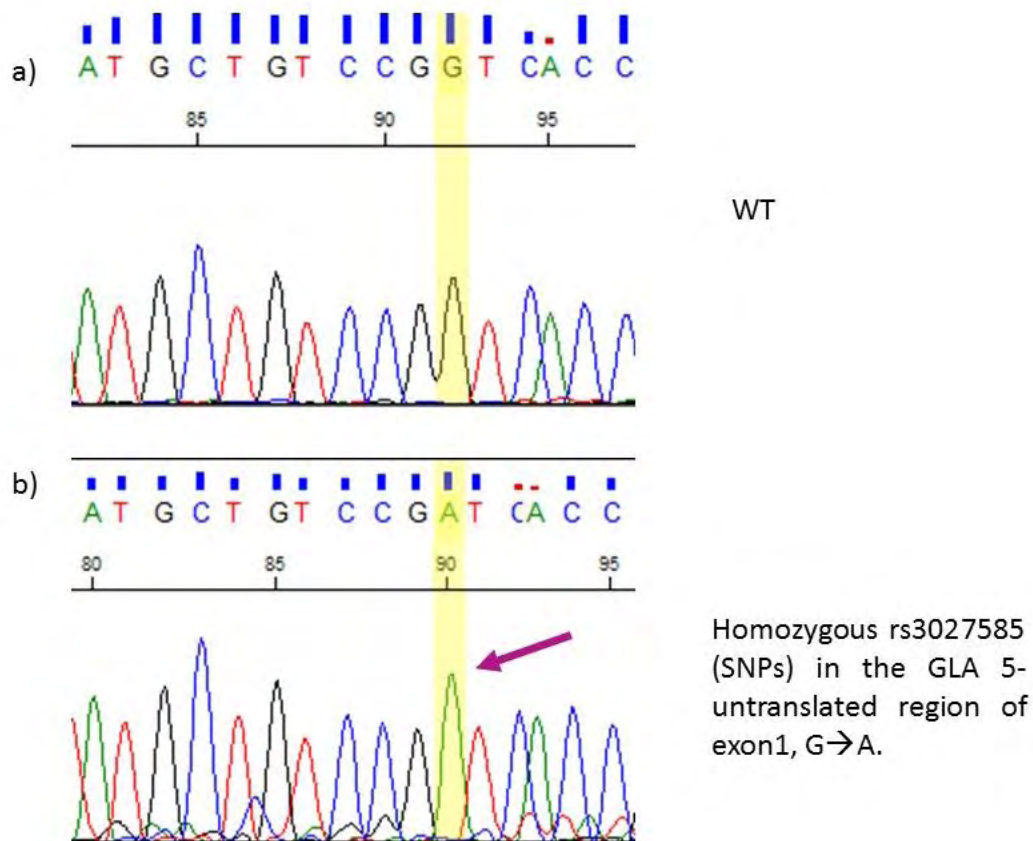
Μετά την αλληλούχιση και των πέντε περιοχών του γονιδίου GLA για όλα τα δείγματα δε βρέθηκε καμία μετάλλαξη σε καμία από τις πέντε περιοχές του γονιδίου που μελετήθηκαν σε κανένα από τα 24 δείγματα που αναλύθηκαν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

A/A	Fabry εξόνιο 1 (Περιοχή A)	Fabry εξόνιο 2 (Περιοχή A)	Fabry εξόνιο 3 (Περιοχή A)	Fabry εξόνιο 4 (Περιοχή A)	Fabry εξόνια 5-7 (Περιοχή A)
1	WT	WT	WT	WT	WT
2	WT	WT	WT	WT	WT
3	WT	WT	WT	WT	WT
4	Ομόζυγος rs3027585 (SNPs in the GLA 5 -untranslated region)	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	WT
6	WT	WT	WT	WT	WT
7	WT	WT	WT	WT	WT
8	WT	WT	WT	WT	WT
9	WT	WT	WT	WT	WT
10	WT	WT	WT	WT	WT
11	WT	WT	WT	WT	WT
12	WT	WT	WT	WT	WT
13	WT	WT	WT	WT	WT
14	WT	WT	WT	WT	WT
15	WT	WT	WT	WT	WT
16	WT	WT	WT	WT	WT
17	WT	WT	WT	WT	WT
18	WT	WT	WT	WT	WT
19	WT	WT	WT	WT	WT
20	WT	WT	WT	WT	WT
22	WT	WT	WT	WT	WT
23	WT	WT	WT	WT	WT
24	WT	WT	WT	WT	WT

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης DNA για τις πέντε περιοχές του γονιδίου GLA για τα 24 δείγματα της μελέτης.

WT= wild type, άγριος τύπος, rs= refSNP, SNP=Single Nucleotide Polymorphism

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 5, μετά από αλληλούχιση βρέθηκε μόνο ένας πολυμορφισμός στο δείγμα 4 στο εξόνιο 1. Συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός αυτός είναι ο ομόζυγος rs3027585 (SNPs) στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5-untranslated region) του εξονίου 1 του γονιδίου GLA, όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από μια αδενίνη (G→A) (Εικ. 30). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει καταγραφεί ως μη παθογόνος για τη νόσο Fabry (Εικ. 31) (83,84).



Εικόνα 30: Περιοχή του εξονίου 1 του γονιδίου GLA. a) WT περιοχή μαρκαρισμένη με κίτρινο χρώμα. b) Ομόζυγος πολυμορφισμός rs3027585 (SNPs) στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5-untranslated region) του εξονίου 1 του γονιδίου GLA. Το μωβ βέλος προσδιορίζει την αλλαγή της βάσης από γουανίνη σε αδενίνη.

Table Presumably non-pathogenic sequence variations listed as SNPs in the NCBI database.		
Patient No.	Gene	Variants of unproven pathogenic significance
1	GBA	none
2	GBA	rs12034326
3	GAA	rs1800300,rs3816256,rs1042393,rs1800301,rs1042395,rs5822325,rs2252455,rs1800304,rs2304836,rs1800310,rs2304832,rs1126690,rs1042397,rs8132
4	GAA	rs1800300,rs2304836,rs2304832,rs1126690,rs1800314,rs1800315,rs1800317
5	GAA	rs1800300,rs3816256,rs1042393,rs1800301,rs28684874,rs2252455,rs1800304,rs2304836,rs1800310,rs2304832,rs1126690,rs1042397,rs8132
6	GAA	none
7	GLA	none
8	GLA	rs3027585
9	GLA	none
10	GLA	none
11	GLA	none
12	GLA	rs2071225,rs2071397,rs2071228
13	GLA	none
14	GLA	none
15	GLA	none

Εικόνα 31: Κατάλογος μη παθογόνων πολυμορφισμών που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων του NCBI. Ο πολυμορφισμός rs3027585 βρίσκεται στον κατάλογο αυτό (τυρκουάζ χρώμα).

(Πηγή: Supplement to: Mechtler TP, Stary S, Metz TF, et al. Neonatal screening for lysosomal storage

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Fabry (FD) είναι μία λυσοσωματική ενζυμοπάθεια, η οποία σήμερα υποδιαγιγνώσκεται, καθώς οι κλινικές εκδηλώσεις της συχνά παραπέμπουν σε άλλες συστηματικές διαταραχές, όπως στη νόσο FMF. Αυτό συνήθως συμβαίνει σε περιστατικά τα οποία δεν εμφανίζουν τον κλασικό FD φαινότυπο, με άλλα λόγια δεν εμφανίζουν την χαρακτηριστική βαριά κλινική εικόνα της νόσου. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο μεγάλος αριθμός παθογόνων μεταλλάξεων του γονιδίου GLA, σε συνδυασμό με το φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τρόπο κληρονομίησης, έχει ως αποτέλεσμα τη συχνή εμφάνιση ήπιων συμπτωμάτων, τη μεγάλη ετερογένεια των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου και επομένως τη δυσχερέστερη διάγνωση της νόσου Fabry (36,63).

Η νόσος Fabry και η νόσος FMF είναι κληρονομικές διαταραχές οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητες στην περίοδο έναρξης των συμπτωμάτων και στις κλινικές εκδηλώσεις τους. Συνήθως η περίοδος έναρξης των συμπτωμάτων και στις δύο περιπτώσεις είναι η παιδική ηλικία, κατά την οποία καταγράφονται επαναλαμβανόμενα εμπύρετα επεισόδια, κοιλιακό άλγος, πόνος στις αρθρώσεις, γαστρεντερικές διαταραχές και νεφρική ανεπάρκεια.

Είναι γνωστό ότι και τα δύο νοσήματα σχετίζονται με σημαντικές μειώσεις του προσδόκιμου ζωής και στα δύο φύλα, και για αυτό το λόγο κρίνεται σημαντική η σωστή και έγκαιρη διάγνωση της κάθε νόσου. Επιπροσθέτως, τα δύο αυτά νοσήματα εμφανίζουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας αν δε διαγνωστούν και αντιμετωπιστούν έγκαιρα. Επομένως η σωστή και έγκαιρη διάγνωση θα οδηγήσει στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, είναι απαραίτητο οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο FMF να ακολουθήσουν τη θεραπευτική προσέγγιση με βάση την κολχικίνη, για να μπορέσουν να αντιμετωπιστούν τα συμπτώματα της νόσου, να περιοριστούν στο ελάχιστο οι κρίσεις και πιθανώς να παρεμποδιστεί η εμφάνιση αμυλοείδωσης. Αντιστοίχως, οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Fabry και φέρουν τον κλασικό FD φαινότυπο πρέπει να ακολουθήσουν ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης προκειμένου να αυξηθεί το προσδόκιμο επιβίωσης, καθώς έχει αποδειχθεί ότι όσοι ασθενείς δε ακολουθήσουν ενζυμική θεραπεία θα υποστούν κάποια στιγμή οργανική ανεπάρκεια.

Παρότι η νόσος FMF είναι μία σπάνια νόσος, εντούτοις σε περιπτώσεις στις οποίες ο ασθενής παρουσιάζει επαναλαμβανόμενα εμπύρετα επεισόδια, κοιλιακό άλγος, πόνο στις αρθρώσεις, γαστρεντερικές διαταραχές και νεφρική ανεπάρκεια, απουσία άλλων

συμπτωμάτων ενδεικτικών κάποιας ειδικής συστημικής διαταραχής και παρουσία συγκεκριμένης καταγωγής του ασθενούς, οι κλινικοί ιατροί διαγιγνώσκουν νόσο FMF.

Επομένως, υπάρχει κίνδυνος ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Fabry να διαγνωσθούν κλινικά ότι πάσχουν από τη νόσο FMF (misdiagnosis). Αυτή η λανθασμένη διάγνωση μπορεί να προκαλέσει αρκετά σοβαρές επιπτώσεις στους ασθενείς. Η πρώτη επίπτωση είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς αυτοί θα ακολουθήσουν θεραπεία με κολχικίνη, η οποία αφενός δε θα βοηθήσει καθόλου στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, αφετέρου μπορεί να προκαλέσει κάποιες παρενέργειες ή ακόμη και επιπλοκές, καθώς δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της κολχικίνης σε ασθενείς με νόσο Fabry. Το κύριο όμως πρόβλημα που θα έχουν να αντιμετωπίσουν αυτοί οι ασθενείς είναι ότι στην πραγματικότητα δε λαμβάνουν την κατάλληλη θεραπεία, με άμεσο κίνδυνο εμφάνισης ανεπάρκειας σε σημαντικά όργανα, όπως είναι η καρδιά και οι νεφροί.

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την εύρεση πιθανών GLA μεταλλάξεων σε ασθενείς ετερόζυγους για τη νόσο FMF. Στα 24 δείγματα που αναλυθήκαν δε βρέθηκε καμία μετάλλαξη, πάρα μόνο ένας μη παθογόνος πολυμορφισμός σε ένα μόνο ασθενή, τον ασθενή με το αύξοντα αριθμό 4. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι ένας ομόζυγος rs3027585 (SNPs) πολυμορφισμός στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5-untranslated region) του εξονίου 1 του γονιδίου GLA, όπου η γουανίνη αντικαθίσταται από μια αδενίνη (G→A).

Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι δεν υπήρξε υποδιάγνωση της νόσου Fabry στα 24 περιστατικά που μελετήθηκαν. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα των ασθενών που μελετήθηκε ήταν μικρό. Επίσης, η διερεύνηση της παρουσίας GLA μεταλλάξεων μόνο σε ασθενείς ετερόζυγους για τη νόσο FMF και όχι σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί κλινικά ότι πάσχουν από τη νόσο FMF, μειώνει ίσως σημαντικά την πιθανότητά ανεύρεσης κάποιας μετάλλαξης του GLA. Αυτή η σκέψη προέκυψε από τη μελέτη του Zizzo και των συνεργατών του, οι οποίοι ανίχνευσαν μετάλλαξη του γονιδίου GLA σε έναν ασθενή που είχε διαγνωσθεί κλινικά για τη νόσο FMF, ο οποίος μετά από μοριακή ανάλυση δεν έφερε καμία από τις 12 γνωστές μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της νόσου FMF. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι στην ίδια μελέτη από τους 20 ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκε μία μονή ετερόζυγη μετάλλαξη, βρέθηκαν 2 ασθενείς που έφεραν ταυτόχρονα μετάλλαξη του GLA γονιδίου (36).

Εν κατακλείδι, η κλινική διάγνωση και η λήψη οικογενειακού ιατρικού ιστορικού παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της κατάστασης ενός ασθενούς. Παρόλα αυτά η κλινική διάγνωση σήμερα δεν αποτελεί πανάκεια, ειδικά σε ασθενείς που παρουσιάζουν

αμφιβόλου προέλευσης συμπτωματολογία. Σε αυτές τις περιπτώσεις η μοριακή ανάλυση των γονιδίων MEFV και GLA αποτελεί βασικό εργαλείο για τη σωστή και έγκαιρη διάγνωση, αλλά και θεραπεία, της κάθε νόσου.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001; 345 (24): 1748–57.
2. Federici S, Caorsi R, Gattorno M. The autoinflammatory diseases. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: 1–17.
3. Lachmann HJ. Clinical Immunology Review Series: An approach to the patient with a periodic fever syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011; 165 (3): 301–9.
4. Touitou I, Kone-Paut I. Autoinflammatory diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22 (5): 811–29.
5. Doria A, Zen M, Bettio S, Gatto M, Bassi N, Nalotto L, et al. Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. *Autoimmunity Reviews* 2012; p. 22–30.
6. Matsumoto S, Urayoshi S, Yoshida Y. Familial Mediterranean fever in which Crohn's disease was suspected: a case report. *BMC Res Notes* 2014; 7: 678.
7. Heller H, Sohar E SL. Familial Mediterranean fever. *AMA Arch Intern Med* 1958; 102 (1): 50–71.
8. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Gastroenterology* 1949; 12 (2): 234–47.
9. Reimann HA. Periodic disease; periodic fever, periodic abdominalgia, cyclic neutropenia, intermittent arthralgia, angioneurotic edema, anaphylactoid purpura and periodic paralysis. *J Am Med Assoc* 1949; 141 (3): 175–83.
10. Cattani R and Mamou H. 14 Cases of periodic disease, 8 of which are complicated by kidney diseases. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1951; 67 (25-26): 1104–7.
11. Kucuk A, Gezer IA, Ucar R, Karahan AY. Familial Mediterranean Fever. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2014; 57 (3): 97–104.
12. International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. *Cell* 1997; 90 (4): 797–807.
13. Gruberg L, Aksentijevich I, Pras E, Kastner DL, Pras M. Mapping of the familial Mediterranean fever gene to chromosome 16. *Am J Reprod Immunol* 1992; 28 (3-4): 241–2.
14. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 1997; 17 (1): 25–31.

15. De Sanctis S, Nozzi M, Del Torto M, Scardapane A, Gaspari S, de Michele G, et al. Autoinflammatory syndromes: diagnosis and management. *Ital J Pediatr* 2010; 36: 57.
16. Ayaz N a., Özen S, Bilginer Y, Ergüven M, Taşkıran E, Yilmaz E, et al. MEFV mutations in systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2009; 48 (1): 23–5.
17. Portincasa P, Scaccianoce G, Palasciano G. Familial mediterranean fever: A fascinating model of inherited autoinflammatory disorder. *Eur J Clin Invest* 2013; 43 (12): 1314–27.
18. Zadeh N, Getzug T, Grody WW. Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genet Med* 2011; 13 (3): 263–9.
19. Infevers - Tabular list [Internet]. [cited 2015 Sep 26]. Available from: <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=1>
20. Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, et al. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis* 2012; 71 (10): 1599–605.
21. MEFV - Mediterranean fever. US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Department of Health & Human Services; 2015 Sep 20 [cited 2015 Sep 26]; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MEFV>
22. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 (7): 473–83.
23. Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory Disease Reloaded: A Clinical Perspective. *Cell* 2010; p. 784–90.
24. Speletas M, Kalala F, Mitroulis I, Papadopoulos V, Merentiti V, Germenis AE, et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms in familial Mediterranean fever. *Hum Immunol* 2009; 70 (9): 750–3.
25. Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: Role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol* 2012; 167 (3): 382–90.
26. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British Journal of Haematology* 2009; p. 467–78.

27. Stehlik C. The PYRIN domain in signal transduction. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8 (3): 293–310.
28. Grandemange S, Aksentijevich I, Jeru I, Gul A, Touitou I. The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 2011; 12 (7): 497–503.
29. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003; 11 (3): 591–604.
30. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, Rafail S, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007; 71 (5): 458–67.
31. Konstantopoulos K, Kanta A. Familial Mediterranean fever seems to be not uncommon in Greece. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(2): 85–6.
32. Mikula M, Buller A, Sun W, Strom CM. Prevalence of known mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) in various carrier screening populations. *Genet Med* 2008; 10 (5): 349–52.
33. Hoffman HM, Simon A. Recurrent febrile syndromes: what a rheumatologist needs to know. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5 (5): 249–56.
34. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009; 60 (6): 1862–6.
35. Tchernitchko D, Moutereau S, Legendre M, Delahaye A, Cazeneuve C, Lacombe C, et al. MEFV analysis is of particularly weak diagnostic value for recurrent fevers in western European Caucasian patients. *Arthritis Rheum* 2005; 52 (11): 3603–5.
36. Zizzo C, Colomba P, Albeggiani G, Gallizzi R, Iemolo F, Nuzzo D, et al. Misdiagnosis of familial Mediterranean fever in patients with Anderson-Fabry disease. *Clin Genet* 2013; 83 (6): 576–81.
37. Booth D, Gillmore J, Lachmann H, Booth S, Bybee A, Soyuturk M, et al. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 2000; 93 (1): 217–21.
38. Tarp BD, Obel N. Familial Mediterranean fever with pseudodominant inheritance. *Ugeskrift for laeger* 2000; p. 6261–2.

39. Hama I, Ilham R, Ouzeddoun N, Alhamany Z, Bayahia R, Sefiani A. Renal amyloidosis due to familial mediterranean fever misdiagnosed. *Indian J Hum Genet* 2012; 18 (3): 363–5.
40. Ozen S. Renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Kidney Int* 2004; 65 (3): 1118–27.
41. Desport E, Bridoux F, Sirac C, Delbes S, Bender S, Fernandez B, et al. Al amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 54.
42. Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003; 42 (2): ii3–i10.
43. Drenth JPH, van der Meer JWM. The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med* 2006; 355 (7): 730–2.
44. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458 (7237): 514–8.
45. Cassel SL, Sutterwala FS. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *European Journal of Immunology* 2010; p. 607–11.
46. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Reimer T, Eigenbrod T, Núñez G. Inflammasomes as microbial sensors. *European Journal of Immunology* 2010; p. 611–5.
47. Nalbantoglu S, Tanyolac B, Berdeli a. Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) expression profiles in familial Mediterranean fever (FMF) patients with different MEFV mutation patterns. *Scand J Rheumatol* 2013; 42 (2): 159–62.
48. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 2002; 10 (2): 417–26.
49. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; 20 (3): 319–25.
50. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; p. 171.
51. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* 2005; p. 627–39.
52. Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 2004; 9 (1): 77–82.

53. Βαρελτζίδου Έ και Παρδαλός Γ. Νόσος του Crohn σε έφηβη με Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό. Παρουσιάσεις Παιδιατρικών Περιπτώσεων 1997; 17–23.
54. Wang D., Bonfrate L. de Bari O WT and PP. Familial Mediterranean Fever: From Pathogenesis to Treatment. J Genet Syndr Gene Ther 2014; 05 (05).
55. Goldfinger SE. Colchicine for familial Mediterranean fever. N Engl J Med 1972; 287 (25): 1302.
56. Kusano E, Saito O, Akimoto T, Asano Y. Fabry disease: Experience of screening dialysis patients for Fabry disease. Clin Exp Nephrol 2014; 18 (2): 269–73.
57. Linhart A, Elliott PM. The heart in Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. Heart 2007; 93 (4): 528–35.
58. El-Abassi R, Singhal D, England JD. Fabry's disease. J Neurol Sci 2014; 344 (1-2): 5–19.
59. Mauer M, Glynn E, Svarstad E, Tondel C, Gubler M-C, West M, et al. Mosaicism of podocyte involvement is related to podocyte injury in females with Fabry disease. PLoS One 2014; 9 (11): e112188.
60. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, et al. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. J Clin Invest 1989; 83 (4): 1390–9.
61. Kornreich R, Bishop DF, Desnick RJ. Alpha-galactosidase A gene rearrangements causing Fabry disease. Identification of short direct repeats at breakpoints in an Alu-rich gene. J Biol Chem 1990; 265 (16): 9319–26.
62. Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, Suyama T, Sakamoto F, Itoh M, et al. Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. Hum Mutat 2008; 29 (2): 331.
63. Garman SC. Structure-function relationships in alpha-galactosidase A. Acta Paediatr Suppl 2007; 96 (455): 6–16.
64. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet 2006; 79 (1): 31–40.
65. Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: Feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. Lancet 2012; 379 (9813): 335–41.

66. Van der Tol L, Smid BE, Poorthuis BJHM, Biegstraaten M, Deprez RHL, Linthorst GE, et al. A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *J Med Genet* 2014; 51 (1): 1–9.
67. Obrador GT, Ojo A, Thadhani R. End-stage renal disease in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (2): S144–6.
68. Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WR. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med* 2007; 9 (1): 34–45.
69. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, et al. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2008; 93 (2): 112–28.
70. Migeon BR. X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19 (11): 2052–9.
71. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia De Lorenzo A, Kampmann C, et al. Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest* 2004; 34 (3): 236–42.
72. Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero M-A, Hughes DA, Kampmann C, Beck M. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* 2006; 43 (4): 347–52.
73. Brockdorff N. Chromosome silencing mechanisms in X-chromosome inactivation: unknown unknowns. *Development* 2011; 138 (23): 5057–65.
74. Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvinova J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α -galactosidase a gene in the Czech and Slovak population. *J Mol Med* 2005; 83 (8): 647–54.
75. Ανδρίκος Α. Η νόσος του Fabry. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2009; 26 (1): 63–9.
76. Fervenza FC, Torra R, Lager DJ. Fabry disease: an underrecognized cause of proteinuria. *Kidney Int* 2008; 73 (10): 1193–9.
77. Weidemann F, Sanchez-Nino MD, Politei J, Oliveira J-P, Wanner C, Warnock DG, et al. Fibrosis: a key feature of Fabry disease with potential therapeutic implications. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 116.
78. Waldek S, Feriozzi S. Fabry nephropathy: a review - how can we optimize the management of Fabry nephropathy? *BMC Nephrol* 2014; 15 (1): 72.

79. Kampmann C, Kalkum G, Beck M, Whybra C. Successful long-term enzyme replacement therapy in a young adult with Fabry disease. *Clinical genetics* 2013; p. 395–6.
80. Goker-Alpan O, Gambello MJ, Maegawa GHB, Nedd KJ, Gruskin DJ, Blankstein L, et al. Reduction of Plasma Globotriaosylsphingosine Levels After Switching from Agalsidase Alfa to Agalsidase Beta as Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease. *JIMD Rep* 2015; (Epub ahead of print).
81. Kizhner T, Azulay Y, Hainrichson M, Tekoah Y, Arvatz G, Shulman A, et al. Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human α -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease. *Mol Genet Metab* 2015; 114 (2): 259–67.
82. Padeh S, Livneh A, Pras E, Shinar Y, Lidar M, Feld O, et al. Familial Mediterranean Fever in the first two years of life: a unique phenotype of disease in evolution. *J Pediatr* 2010; 156 (6): 985–9.
83. Mechtler TP, Stary S, Metz TF et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet, Suppl webappendix* 2011; 6736 (10): 1980–2008.
84. Samuelsson K, Kostulas K, Vrethem M, Rolfs A, Press R. Idiopathic small fiber neuropathy: phenotype, etiologies, and the search for fabry disease. *J Clin Neurol* 2014; 10 (2): 108–18.