



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: Πρότυπα μεθυλίωσης των CpG νησιδίων στην πολλαπλή και
υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας**

Σωκράτους Μαρία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας, Επιβλέπων
- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Ειδική Μονάδα Νευροεπιστημών - (Νευρολογική Κλινική).

Λάρισα, Οκτώβριος, 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

CpG island methylation patterns in relapsing-remitting multiple sclerosis

By

Sokratous Maria

Three - member comittee:

- Hadjigeorgiou Georgios, Professor of Neurology, supervisor
- Dardiotis Efthimios, Associate Professor of Neurology
- Germanis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partially fulfillment of the requirements for the degree of Master in the Department of Neurology.

Larisa, October, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	10
3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....	11
4. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	14
5. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ	15
6. Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA	18
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ	19
8. ΣΚΟΠΟΣ.....	29
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	31
9.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΗΘΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.....	31
9.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	31
9.3 MS-MLPA.....	32
9.4 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	33
1.5 COFFALYSER	35
10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	36
11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της οποίας δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Η κλασική γενετική, από μόνη της, δεν μπορεί να εξηγήσει τους διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους της νόσου ακόμη και μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες παρεμβαίνουν επίσης στην παθοφυσιολογία της νόσου. Η επιγενετική προτείνεται ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των παραπάνω παραγόντων, που προδιαθέτουν στη νόσο.

Η μεθυλίωση του DNA, ο καλύτερα μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός, λαμβάνει χώρα στα CpG νησίδια, στους υποκινητές των γονιδίων και οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης των γονιδίων αυτών. Διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης έχουν παρατηρηθεί σε γονίδια που σχετίζονται με αρκετές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας. Ωστόσο, η μεθυλίωση δεν έχει αναγνωριστεί ως βιοδείκτης για τη νόσο, καθώς περεταίρω μελέτες είναι απαραίτητες, ώστε να επικυρώσουν τη διαγνωστική αξία των προτύπων μεθυλίωσης των γονιδίων που σχετίζονται με αυτή.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Νευρογενετικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στη Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος: «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Στόχος της μελέτης αυτής είναι να εκτιμήσει τα πρότυπα μεθυλίωσης 8 γονιδίων στην πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας, τα περισσότερα εκ των οποίων δεν έχουν προηγουμένως συσχετιστεί με τη νόσο και να διακρίνει διαφορές τόσο μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων όσο και μεταξύ ασθενών με έξαρση και ύφεση της νόσου. Η μελέτη διακρίνεται σε γενικό και ειδικό μέρος. Το γενικό μέρος αναφέρεται στη φυσική ιστορία της νόσου, στους επιγενετικούς μηχανισμούς και πιο συγκεκριμένα στη μεθυλίωση, παραθέτοντας νεότερα δεδομένα από πρόσφατες μελέτες. Στο ειδικό μέρος περιγράφεται η μεθοδολογία, παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα και περεταίρω προοπτικές της έρευνας επί του θέματος.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου, για την καθοδήγησή του στο σχεδιασμό αυτής της έρευνας και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Ευθύμιο Δαρδιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, για τη συμπαράσταση και την αμέριστη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της παρούσας μελέτης. Ακόμη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την παρότρυνση, όσον αφορά την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος.

Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Αναστάσιο Γερμενή, Διευθυντή του εν λόγω Μεταπτυχιακού Προγράμματος, που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα και να εργαστώ πάνω σ' αυτό το ερευνητικό αντικείμενο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την κα Μαρία Δαρδιώτη, μέλος του Εργαστηρίου Νευρογενετικής, για τη βοήθειά της, ώστε να εγκλιματιστώ και να εξοικειωθώ με το εργαστήριο και τον κ. Δημήτρη Ρίκο, ειδικευόμενο Νευρολογίας, για τη βοήθειά του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το προσωπικό της Νευρολογικής Κλινικής και τους άλλους μεταπτυχιακούς φοιτητές, Ζήση Τσούρη και Αμαλία Μιχαλοπούλου, για το όμορφο κλίμα συνεργασίας όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας είναι ναι σύνθετη, αυτοάνοση, νευροεκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου, καθώς η παθοφυσιολογία της νόσου περιλαμβάνει γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η μεθυλίωση του DNA, ο πλέον ευρέως γνωστός επιγενετικός μηχανισμός πιθανώς προδιαθέτει για τη νόσο, καθώς η ανώμαλη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων ολόκληρου του γονιδιώματος φαίνεται να ενέχεται σε αρκετές διαδικασίες που σχετίζονται με την έναρξη και την πορεία της νόσου. Η παρούσα μελέτη διεξήχθη, προκειμένου να προσδιορίσει το επίπεδο μεθυλίωσης ενός αριθμού γονιδίων σε ασθενείς με πολλαπλή και υποροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας.

Μέθοδοι: Ειδική για μεθυλίωση ενίσχυση πολλαπλού συνδέτη (MS-MLPA), χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει το επίπεδο μεθυλίωσης 31 CpG νησιδίων, ευρισκόμενα σε 8 γονίδια (RUNX3, MLH1, NEUROG1, IGF2, SOCS1, CDKN2A, CACNA1G and CRABP1) σε 33 υγιή άτομα και σε 66 ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, 33 εκ των οποίων σε έξαρση και 33 σε ύφεση της νόσου. Τα αμπλικόνια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) διαχωρίστηκαν με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και αξιολογήθηκαν μέσω του λογισμικού Coffalyser.

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα μεθυλίωσης στους υπό μελέτη probes διακυμάνθηκαν από 0% έως 31%. Η θετικότητα ως προς τη μεθυλίωση για τα γονίδια RUNX3 και CDKN2A διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων (chi-square test, $p=0.017$ και $p=0.032$, αντίστοιχα). Επιπλέον, η μέγιστη μεθυλίωση στα CpG νησίδια των γονιδίων RUNX3 και CDKN2A διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων (t-test, $p=0.021$ και $p=0.01$, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα από τις καμπύλες Roc έδειξαν ότι τα καταλληλότερα σημεία cut-off, για το διαχωρισμό των ασθενών από τους υγιείς ήταν το 2% για το γονίδιο RUNX3 (OR:3.316, CI:1.207-9.107, $p=0.024$) και το 3% για το γονίδιο CDKN2A (OR:3.077, CI:1.281-7.39, $p=0.018$). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη μεθυλίωση μεταξύ των ασθενών σε έξαρση και σε ύφεση στα γονίδια που μελετήθηκαν.

Συμπεράσματα: Τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων RUNX3 και CDKN2A ίσως μπορούν να διακρίνουν τους ασθενείς από τους υγιείς αλλά όχι τους ασθενείς με έξαρση από αυτούς με ύφεση της νόσου. Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες, για να επιβεβαιώσουν εάν τα συγκεκριμένα πρότυπα μεθυλίωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικοί τοποειδικοί βιοδείκτες για την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας.

ABSTRACT

Background: Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system. There is evidence that epigenetic mechanisms are involved in the development of MS, as the pathophysiology of the disease involves both genetic and environmental factors. DNA methylation, the most commonly known epigenetic modification, may predispose to MS, as aberrant methylation in the promoter regions across genome seems to underlie several processes involved in the onset and course of MS. The present study was conducted to determine the methylation status of a number of genes in patients with relapsing-remitting MS.

Methods: Methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification (MS-MLPA), was used to determine the status of 31 CpG islands located across 8 genes (RUNX3, MLH1, NEUROG1, IGF2, SOCS1, CDKN2A, CACNA1G and CRABP1) in 33 healthy controls and 66 MS patients, 33 of whom in relapse and 33 in remission. Polymerase chain reaction (PCR) amplicons were separated by capillary electrophoresis and were evaluated using the Coffalyser software.

Results: The methylation levels in the tested probes ranged from 0% to 31%. Methylation positivity for RUNX3 and CDKN2A differed significantly between MS patients and healthy controls (chi-square test, $p=0.017$ and $p=0.032$, respectively). In addition, maximum methylation in the tested CpG islands across RUNX3 and CDKN2A genes were significantly different between patients and controls (t-test, $p=0.021$ and $p=0.01$, respectively). Results from Roc curves demonstrated that the appropriate cut-offs to distinguish patients from healthy controls were 2% for RUNX3 (OR: 3.316, CI: 1.207-9.107, $p=0.024$) and 3% for CDKN2A (OR: 3.077, CI: 1.281-7.39, $p=0.018$). No difference in methylation was observed between relapses and remissions in any of the genes.

Conclusion: Methylation patterns of RUNX3 and CDKN2A genes may be able to distinguish between MS patients and healthy controls, but not between MS patients in relapse and in remission. Further studies are needed to confirm if these methylation patterns can serve as important site-specific biomarkers for MS.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis, MS) είναι μια σύνθετη, φλεγμονώδης και εκφυλιστική νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που σχετίζεται με αρκετούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, οι οποίοι δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι περιβαλλοντικοί αλλά και γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης [1]. Η επιγενετική έχει προταθεί ότι αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ γονοτύπων, περιβαλλοντικών παραγόντων και παθολογικών φαινοτύπων [1,2].

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι αναστρέψιμες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, η οποίες εξαρτώνται από βιολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες [3]. Ο καλύτερα μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA, η οποία μελετήθηκε, αρχικά, εξαιτίας της συσχέτισής της με τον καρκίνο [4]. Αποτελεί ουσιαστικής σημασίας διαδικασία για την ακεραιότητα του γονιδιώματος, τον πολλαπλασιασμό και τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη [5]. Η διαδικασία της μεθυλίωσης, συνήθως λαμβάνει χώρα στα CpG νησίδια, στους υποκινητές των γονιδίων, μεσολαβούμενη από ένζυμα, που ονομάζονται DNA μεθυλτρανσφεράσες (DNMTs). Η υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων, οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου, αποτρέποντας τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων, ενώ η υπομεθυλίωση, αντιθέτως, οδηγεί σε υπερέκφραση του γονιδίου [6].

Μεγάλη προσπάθεια έχει καταβληθεί, την τελευταία δεκαετία, ώστε να προσδιοριστεί το γενετικό υπόβαθρο που προδιαθέτει στη νόσο. Μέχρι τώρα, συνεργατικές μελέτες έχουν υποδείξει αρκετούς HLA γενετικούς τόπους και άλλους 110 γενετικούς τόπους, οι οποίοι δεν ανήκουν στα HLA μόρια και σχετίζονται με αυξημένη εμφάνιση της πολλαπλής σκλήρυνσης [7]. Ωστόσο, αυτές οι παράμετροι ευθύνονται μόνο για περίπου 27% της κληρονομικότητας της νόσου [8] κι έχουν αποτύχει να εξηγήσουν το διαφορετικό φαινότυπο της νόσου μεταξύ [9]. Έτσι, φαίνεται ότι ο πιθανός ρόλος της επιγενετικής στην πολλαπλή σκλήρυνση είναι καίριας σημασίας [10].

Διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης έχουν παρατηρηθεί σε κλινικούς φαινοτύπους της νόσου. Αφορούν αρκετούς γενετικούς τόπους, οι οποίοι ρυθμίζουν τη λειτουργία των ολιγοδενδροκυττάρων, των MHC αλληλίων τάξης II και των CD4+/CD8+ T λεμφοκυττάρων [10-12], προτείνοντας ότι η μεθυλίωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης για τη νόσο [13]. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, κάθε γονίδιο ακολουθεί το δικό του πρότυπο κι έτσι, είναι δύσκολο να αποφασίσουμε εάν το πρότυπο

αυτό καθ' εαυτό καταλήγει σε νόσο ή αν άλλοι παράγοντες θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπ' όψιν [14].

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Όπως συμβαίνει και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, η νόσος προσβάλλει τις γυναίκες δύο έως τρεις φορές περισσότερο από ότι τους άνδρες. Συνήθως, τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στη νεαρή ενήλικη ζωή. Είναι η πιο συχνή νευρολογική διαταραχή στους νεαρούς και μέσους ενήλικες. Εκδηλώνεται συνήθως στο τέλος της δεύτερης δεκαετίας της ζωής τους ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις εκδηλώνεται στην παιδική ηλικία ή και μετά την ηλικία των 50 ετών [15]. Προσβάλλει περισσότερο από ένα εκατομμύριο ανθρώπους παγκοσμίως [15], με επίπτωση (πρόσφατα διαγνωσμένες περιπτώσεις ανά έτος) 7/100.000 / έτος, επιπολασμό (ο αριθμός των ασθενών σε μια δεδομένη χρονική στιγμή) 120/100.000 και κίνδυνο εμφάνισης 0.25% , σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή της ζωής ενός ατόμου [16].

Παρά τη διακύμανση, ως προς τις τιμές του επιπολασμού, είναι, γενικώς, αποδεκτό ότι η επίπτωση της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας αυξάνει με το γεωγραφικό πλάτος και η συχνότητα της νόσου αυξάνει με την ηλικία. Συγκεκριμένα, η επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη στη Β. Ευρώπη, στη Ν. Αυστραλία και στο μεσαίο τμήμα της Β. Αμερικής και μικρότερη σε χώρες που βρίσκονται κοντά στον ισημερινό [17].

Οι αιτίες της παρατηρούμενης διακύμανσης, ως προς την επίπτωση και τον επιπολασμό της νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητές ενώ έχει προταθεί η εμπλοκή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων [10].

3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια του Mc Donald, 2010 (**Πίνακας 3.1**) [18].

Το 80% των ασθενών, περίπου, παρουσιάζει τη μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις (relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS). Τυπικά, η νόσος εμφανίζεται με περιόδους έξαρσης, είτε με πλήρη αποκατάσταση είτε με υπολειπόμενη νευρολογική σημειολογία, καθώς επίσης και με τη δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή της (Secondary progressive multiple sclerosis, SPMS). Στο ένα τέταρτο, περίπου, των ασθενών, η νόσος δεν επηρεάζει τις καθημερινές δραστηριότητές τους ενώ σε ποσοστό 15%, οι ασθενείς εμφανίζουν βαριά αναπηρία σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα επεισόδια εμφανίζονται τυχαία, αρχικά ένα, κατά μέσο όρο, ανά έτος, με φθίνουσα συχνότητα, καθώς εξελίσσεται η νόσος. Στο 20% των ασθενών, η νόσος είναι εξαρχής προοδευτική και η μορφή αυτή περιγράφεται ως πρωτοπαθώς προϊούσα (Primary progressive multiple sclerosis, PPMS). Αυτή προσβάλλει συχνότερα τον νωτιαίο μυελό ενώ λιγότερο συχνά προσβάλλει το οπτικό νεύρο, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια και την παρεγκεφαλίδα.

Συνήθως, η πολλαπλή σκλήρυνση ξεκινά την τρίτη ή τέταρτη δεκαετία της ζωής. Σε ποσοστό 5% των ασθενών, η νόσος εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 16 ετών και σε 2%, πριν από την ηλικία των 10 ετών.

Το προσδόκιμο επιβίωσης εκτιμάται σε τουλάχιστον 25 έτη από την έναρξη της νόσου ενώ οι περισσότεροι ασθενείς καταλήγουν από άλλες αιτίες, μη σχετιζόμενες με τη νόσο [16]. Ένα ποσοστό 10% των ασθενών βρίσκεται σε καλή κατάσταση, για πάνω από 20 έτη από την έναρξη της νόσου και θεωρούνται ότι πάσχουν από καλοήγη μορφή της νόσου (καλοήγη πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, benign multiple sclerosis).

Πίνακας 3.1. Αναθεωρημένα Διαγνωστικά Κριτήρια Mc Donald (2010)	
Κλινική εικόνα	Επιπλέον απαραίτητα στοιχεία
<ul style="list-style-type: none"> * 2 ή περισσότερες εξάρσεις (relapses) * 2 ή περισσότερες αντικειμενικές βλάβες 	Κανένα
<ul style="list-style-type: none"> * 2 ή περισσότερες εξάρσεις * 1 αντικειμενική κλινική βλάβη 	<p>Διασπορά στο χώρο, αποδεδειγμένη από:</p> <ul style="list-style-type: none"> * MRI * ή περισσότερες κλινικές εξάρσεις που αφορούν διαφορετική τοποθεσία <p>Νέα κριτήρια: Η διασπορά στο χώρο μπορεί να αποδειχθεί από την παρουσία 1 ή περισσότερων T2 βλαβών σε τουλάχιστον 2 από τις 4 απ' τις ακόλουθες περιοχές του ΚΝΣ: Περικοιλιακά, Παραφλοιωδώς, Υποσκηνιδιακά, ή στο Νωτιαίο Μυελό.</p>
<ul style="list-style-type: none"> * 1 έξαρση * 2 ή περισσότερες αντικειμενικές κλινικές βλάβες 	<p>Διασπορά στο χρόνο, αποδεδειγμένη από:</p> <ul style="list-style-type: none"> * MRI * ή δεύτερη κλινική έξαρση <p>Νέα κριτήρια: Όχι πλέον απαραίτητες ξεχωριστές MRIs, διασπορά στο χρόνο, επιδεικνυόμενη από: ταυτόχρονη παρουσία ασυμπτωματικών βλαβών βελτιούμενων ή μη από γαδολίνιο, σε οποιαδήποτε στιγμή, ή μια νέα T2 και/ή βλάβη(ες) βελτιούμενη(ες) από γαδολίνιο σε επακόλουθες MRI, ανεξάρτητες μεταξύ τους, ή αναμονή για δεύτερη κλινική έξαρση. [Αυτό επιτρέπει γρηγορότερη διάγνωση, ειδικότητα, μεγαλύτερη ευαισθησία].</p>

<p>* 1 έξαρση * 1 αντικειμενική κλινική βλάβη (κλινικά απομονωμένο σύνδρομο)</p>	<p>Νέα κριτήρια: Διασπορά στο χώρο και στο χρόνο, επιδεικνυόμενη από:</p> <p>Διασπορά στο χώρο: 1 ή περισσότερες T2 βλάβες σε τουλάχιστον 2 από τις 4 τυπικές για τη νόσο περιοχές του ΚΝΣ (περικοιλιακά, παραφλοιωδώς, υποσκηνιδιακά, νωτιαίο μυελό), ή αναμονή για δεύτερη κλινική έξαρση που να εμπλέκει διαφορετική περιοχή του ΚΝΣ. second clinical attack implicating a different CNS site; and For Διασπορά στο χρόνο: Ταυτόχρονη παρουσία ασυμπτωματικών βλαβών βελτιούμενων ή μη από γαδολίνιο σε οποιαδήποτε στιγμή, ή μια νέα T2 και/ή βλάβη(ες) βελτιούμενη(ες) από γαδολίνιο σε επακόλουθες MRI, ανεξάρτητες μεταξύ τους, ή αναμονή για δεύτερη κλινική έξαρση.</p>
<p>Ύπουλη νευρολογική εξέλιξη υποδηλωτική πολλαπλής σκλήρυνσης (πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή)</p>	<p>Νέα κριτήρια: Ένας χρόνος εξέλιξης της νόσου (αναδρομικά ή προοπτικά) και δύο ή τρία από τα ακόλουθα:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Στοιχεία διασποράς στο χώρο, στον εγκέφαλο, βασιζόμενα σε 1 ή περισσότερες T2 βλάβες-σε χαρακτηριστικές περιοχές (περικοιλιακά, παραφλοιωδώς ή υποσκηνιδιακά) 2. Στοιχεία για διασπορά στο χώρο, στο Νωτιαίο Μυελό, βασιζόμενα σε 2 ή περισσότερες T2 βλάβες 3. Θετικό ENY (ολιγοκλωνικές ζώνες ή αυξημένος δείκτης IgG)

4. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Jean Martin Charcot, καθηγητή Νευρολογίας στο νοσοκομείο Salpêtrière στο Παρίσι, το 1868, ο οποίος παρατήρησε σε ιστολογικά παρασκευάσματα εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού ασθενών περιφερειακές αθροίσεις κυττάρων φλεγμονής στη λευκή ουσία [19].

Το κύριο ιστολογικό γνώρισμα της χρόνιας πολλαπλής σκλήρυνσης είναι η απομυελινωτική πλάκα. Αυτή, συνίσταται από μία καλά αφοριζόμενη περιοχή, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία λίγων κυττάρων και την απώλεια της μυελίνης, μικρή διατήρηση των αξόνων και αστροκυτταρική ουλή [17]. Οι βλάβες εντοπίζονται, κυρίως, στο οπτικό νεύρο, στην περικοιλιακή λευκή ουσία, στην παρεγκεφαλίδα, στο στέλεχος και στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού. Συχνά περιβάλλουν ένα ή περισσότερα αγγεία μεσαίου μεγέθους.

Στις ενεργές βλάβες, τα κύτταρα της φλεγμονής ($CD4+/CD8+$ α/β και γ/δ T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα και σπάνια πλασματοκύτταρα) διηθούν περιφερειακά [20]. Τα μακροφάγα επικρατούν στο κέντρο των πλακών, περιέχοντας προϊόντα αποδόμησης της μυελίνης, τα οποία είναι ενδεικτικά οξείας βλάβης. Ο αριθμός των ολιγοδενδροκυττάρων είναι ελαττωμένος. Στις χρόνιες βλάβες που είναι ενεργές, η διήθηση είναι λιγότερο έντονη και περιορίζεται στην περιφέρεια της βλάβης.

Πρόσφατες μελέτες μεγάλου αριθμού ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, που βασίζονται σε βιοψίες εγκεφάλου, προτείνουν τέσσερις μηχανισμούς πρόκλησης της νόσου, με βάση την απομυελίνωση, την εντόπιση και έκταση των βλαβών, την καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων, καθώς και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος [21].

5. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί αποτελούν κληρονομήσιμες, αναστρέψιμες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες δεν επηρεάζουν την αλληλουχία του γονιδίου. Εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες κι έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετική γονιδιακή απόκριση [3]. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί συνίστανται από: μεθυλίωση του γενετικού υλικού, μεταβολές σε επίπεδο ιστονών και micro-RNAs.

Η μεθυλίωση του DNA στοχεύει στη παρεμπόδιση των μεταγραφικών παραγόντων από την πρόσδεσή τους στον υποκινητή του γονιδίου, αποσιωπώντας, κατ'αυτόν τον τρόπο, τη γονιδιακή έκφραση. Αυτή η διαδικασία αποτυγχάνεται μέσω ενζύμων, των DNA μεθυλτρανσφερασών (DNMTs), οι οποίες μετατρέπουν την κυτοσίνη των CpG νησιδίων σε 5-μεθυλκυτοσίνη.

Οι μεταβολές σε επίπεδο ιστονών περιλαμβάνουν αρκετές διαδικασίες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή, όπως ακετυλίωση και φωσφορυλίωση. Η ακετυλίωση του N-τελικού άκρου των ιστονών οδηγεί σε αποσυσπείρωση της χρωματίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής [22].

Τα micro-RNAs αποτελούν μονόκλωνες, μικρές σε αριθμό νουκλεοτιδίων αλληλουχίες RNA, οι οποίες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μπορούν να επηρεάσουν τη γονιδιακή τη γονιδιακή έκφραση, δρώντας μετά τη μεταγραφή του γονιδίου και η έκφρασή τους εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με τους δύο προαναφερθέντες μηχανισμούς [23]. Τα micro-RNAs καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση, μέσω της πρόσδεσής τους σε μια συγκεκριμένη ή σε πολλαπλές αλληλουχίες mRNA, μέσα σε μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που ονομάζεται RISC (RNA associated silencing complex). Ακόμη, η ίδια αλληλουχία mRNA μπορεί να ρυθμιστεί από πολλά micro-RNAs που μπορούν να προσδεθούν σ'αυτή [24].

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη πολυάριθμων ασθενειών, όπως του Συστηματικού Ερυθηματώδους Λύκου, του καρκίνου, της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας και του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 1 [25-27].

Στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, μεγάλος αριθμός συνεργατικών μελετών έχουν πραγματοποιηθεί την τελευταία δεκαετία, προκειμένου να προσδιορίσουν τη γενετική αρχιτεκτονική της νόσου. Οι μελέτες αυτές έχουν αναδείξει, μέχρι στιγμής, 110 γενετικούς τόπους που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας [13]. Ωστόσο, αυτές οι παράμετροι, μαζί με τους γενετικούς τόπους των HLA ευθύνονται μόνο για περίπου 27% της υποφαινόμενης κληρονομικότητας της νόσου [26], αναδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο της αλληλεπίδρασης μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων [10].

Επιπλέον, μόνο οι γενετικοί παράγοντες δεν μπορούν να εξηγήσουν τη χαμηλή συνάφεια μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, ως προς την ανάπτυξη της νόσου [9].

Η «διάκριση λόγω φύλου», η οποία εκφράζεται με μεγαλύτερη εμφάνιση της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας στις γυναίκες, θα μπορούσε να αποδοθεί είτε σε ελαττωματική ρύθμιση του X χρωμοσώματος μέσω επιγενετικών διεργασιών ή στο φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης. Οι παρατηρήσεις που έγιναν, σύμφωνα με την τελευταία θεωρία έδειξαν ότι οι απόγονοι ασθενών μητέρων έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας σε συγκριτικά με απογόνους ασθενών πατέρων. Αυτό προκύπτει, πιθανώς, λόγω επιγενετικών μηχανισμών, οι οποίοι εμπλέκονται στο φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης [28].

Επιπροσθέτως, η επιγενετική είναι πιθανότατα ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων και της επιρρέειας ως προς την πολλαπλή σκλήρυνση. Τα αποτελέσματα από μελέτες μετανάστευσης πληθυσμών έδειξαν ότι η γεωγραφική κατανομή της νόσου εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες [29]. Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό του αίματος, η οποία επηρεάζει την πορεία και το βαθμό αναπηρίας της νόσου, φαίνεται ότι επιδρά στην έκφραση των μετατρεπτικών ενζύμων των ιστονών [30]. Το κάπνισμα, το οποίο σχετίζεται πιθανώς με την πολλαπλή σκλήρυνση κατά ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο [31], έχει συνδεθεί με τη μεθυλίωση του DNA και άλλες επιγενετικές τροποποιήσεις [32]. Ακόμη, ο επιγενετικός έλεγχος των στοιχείων του ανθρώπινου ενδογενούς ρετροϊού οικογενούς τύπου W (HERV-W) και του ιού Epstein-Barr (EBV), τα οποία υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα, είναι πιθανότατα κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας [33, 34].

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να αναστραφούν από θεραπείες που παρεμβαίνουν στη μεθυλίωση του DNA, την απακετυλίωση των ιστονών και την αποσιώπηση των miRNAs [35, 36]. Η έρευνα για επιγενετικές θεραπείες, ωστόσο, βρίσκεται σε αρχικό στάδιο. Η τρέχουσα προσέγγιση εστιάζει στη στοχοποίηση ενζύμων-κλειδιών, για τις διαδικασίες της μεθυλίωσης του DNA και της απακετυλίωσης των ιστονών. Φάρμακα που αναστέλλουν τις DNMT και την απακετυλάση των ιστονών (όπως, η 5-αζακυτιδίνη και το βαλπροϊκό οξύ, αντίστοιχα) έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά στους καρκίνους του αίματος. Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας έχουν καθυστερήσει, καθώς οι προαναφερθείσες διαδικασίες δεν έχουν εγκαθιδρυθεί ως βιοδείκτες για την ανάπτυξη και τη σοβαρότητα της νόσου. Ένα ακόμη εμπόδιο θα μπορούσε να είναι η έλλειψη ειδικότητας τέτοιων φαρμάκων, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για παρενέργειες στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Παρ' ότι μελέτες *in vitro* και δοκιμές σε ποντίκια-μοντέλα της πολλαπλής σκλήρυνσης δείχνουν ενθαρρυντικά, όσον αφορά τη θεραπευτική δυνατότητα των αναστολέων των DNMT και της

απακετυλάσης των ιστονών, οι αντενδείξεις που αναφέρονται παραπάνω θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπ' όψιν [37]. Περεταίρω μελέτη της επιγενετικής πάνω στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας είναι αναγκαία, προκειμένου να αποσαφηνίσει πλευρές παθοφυσιολογίας και να επιδείξει πιο αποτελεσματικές, ασφαλείς και εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

6. Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μεθυλίωση του DNA θεωρείται ένας από τους καλύτερα μελετημένους επιγενετικούς μηχανισμούς. Αρχικά μελετήθηκε, λόγω της αυξημένης συσχέτισής της με τον καρκίνο, όπου ρυθμίζει την έκφραση των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [4]. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία, μεγάλη προσπάθεια έχει καταβληθεί, προκειμένου να αναλυθεί ο ρόλος της μεθυλίωσης του γενετικού υλικού στην ανοσία και την αυτοανοσία. Κατ' αρχάς, η μεθυλίωση του DNA είναι μια ζωτικής σημασίας διαδικασία, για τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό τους και την ακεραιότητα του γονιδιώματος [5]. Είναι μεσολαβούμενη από έναν αριθμό ενζύμων που αποκαλούνται DNA μεθυλτρανσφεράσες (DNMTs), οι σημαντικότερες εκ των οποίων είναι η DNMT1, η DNMT3a και η DNMT3b. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για την τοποθέτηση μιας μεθυλομάδας στη θέση του 5'-άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης, μετατρέποντάς την σε 5'-μεθυλκυτοσίνη. Το πρώτο ένζυμο σχετίζεται με τη διατήρηση της μεθυλίωσης στις θυγατρικές αλυσίδες του DNA, κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αντιγραφής. Τα άλλα δύο ένζυμα συνθέτουν τη *de novo* μεθυλίωση κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της ζωής του κυττάρου. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει κυρίως σε περιοχές, όπου μια γουανίνη συνοδεύει μια κυτοσίνη, σχηματίζοντας ένα δινουκλεοτίδιο. Εκατοντάδες επαναλαμβανόμενα τέτοια δινουκλεοτίδια βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων, αποκαλούμενα CpG νησίδια. Η υπερμεθυλίωση αυτών των νησιδίων οδηγεί σε αποσιώπηση της έκφρασης ενός γονιδίου, αποτρέποντας τους μεταγραφικούς παράγοντες να προσδεθούν στον υποκινητή του γονιδίου. Απεναντίας, η υπομεθυλίωση των CpG νησιδίων οδηγεί στη μεταγραφή και συνήθως στην έκφραση του υποκείμενου γονιδίου [6].

Η απομεθυλίωση αυτών των περιοχών μπορεί να συμβεί είτε με ενεργητικό είτε με παθητικό τρόπο. Ο παθητικός ευνοείται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA ενώ ο ενεργητικός πραγματοποιείται από άλλα ένζυμα, όχι απαραίτητα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Τα πρότυπα μεθυλίωσης συνήθως κληρονομούνται από την επόμενη γενιά, μέσω της διαδικασίας της μείωσης. Επίσης, λαμβάνουν μέρος στο σχηματισμό της δομής της χρωματίνης, επηρεάζοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την κυτταρική λειτουργία [38].

7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

Η πλειοψηφία των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί, για να διακρίνουν αλλαγές ως προς τη μεθυλίωση του γενετικού υλικού, μπορούν να ενταχθούν σε δύο κατηγορίες: α) στις μελέτες που αφορούν υποψήφια γονίδια (candidate-gene), κατά τις οποίες συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι επιλέγονται και εξετάζονται για διαφορές στη μεθυλίωση και β) σ' αυτές που μελετούν τη μεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιώματος. Επίσης, μπορούν να εφαρμοστούν συνδυασμοί των δύο αυτών των προσεγγίσεων [39]. Η επίδραση της μεθυλίωσης του DNA έχει μελετηθεί σε πειραματόζωα, συγκεκριμένα σε ποντίκια με αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE), τα οποία αποτελούν πειραματικό μοντέλο της πολλαπλής σκλήρυνσης. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έχουν αποδειχθεί πολλά υποσχόμενα ως προς την επέκτασή τους σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [40]. Αρκετές μελέτες έχουν επίσης αναλύσει της επίδραση της ανώμαλης μεθυλίωσης σε κλινικούς φαινοτύπους της νόσου, χρησιμοποιώντας ποικίλες προσεγγίσεις ως προς το μέγεθος του δείγματος, τους ορισμούς, τη μεθοδολογία και τη στατιστική ανάλυση κι έχουν καταλήξει σε ποικίλα αποτελέσματα. Οι μελέτες αυτές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.1**.

Πίνακας 7.1 Βασικά χαρακτηριστικά των μελετών σχετικά με τη μεθυλίωση του DNA και την πολλαπλή σκλήρυνση

Συγγραφέας (έτος)	Ιστός	Δείγμα	Τύπος μελέτης	Αποτελέσματα
Mastronardi (2007)	Λευκή ουσία εγκεφάλου και θύμου	υγιείς (n=4) ασθενείς (n=12)	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	30% απομεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου PAD2 μόνο στους ασθενείς
Ramagopala n (2008)	RBMCs	50 ζεύγη μονοζυγωτικών διδύμων (68% RRMS)	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	Όχι συσχέτιση μεταξύ νόσου και μεθυλίωσης του υποκινητή IV του γονιδίου MCH2TA
Baranzini (2010)	CD4+T λεμφοκύτταρα	3 ζεύγη διδύμων (2 RRMS and 1 SPP)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	Όχι επιγενετικές διαφορές

Handel (2010)	PBMCs	καλοήθη MS (n=48) κακοήθη MS (n=20)	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	Όχι συσχέτιση μεθυλίωσης των HLA-DRB1*1501, HLA-DRB5 και βαρύτητας νόσου
Liggett (2010)	cfpDNA	RRMS(ύφεση) (n=30) RRMS(έξαρση) (n=29) υγιείς (n=30)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	Διαφορές στη μεθυλίωση: σε 15 υποκινητές μεταξύ RRMS(ύφεση) και υγιών σε 14 υποκινητές μεταξύ RRMS (έξαρση) και υγιών ατόμων σε 5 υποκινητές μεταξύ RRMS(ύφεση) και RRMS(έξαρση) CDKN2B το πιο διαφοροποιημένο [71.0% μεθυλίωση σε RRMS(ύφεση) και 22.6% σε υγιείς].
Janson (2011)	CD4+T λεμφοκύτταρα	7 υγιείς (n=7) 10 RRMS ασθενείς (n=17) [υπό natalizumab (n=10), Χωρίς θεραπεία (n=2), Υπό οξική γλατιραμέρη (n=3), Υπό IFN-1b (n=2)]	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	υπομεθυλίωση στα γονίδια FOXP3 και IL-17, σε ασθενείς που δεν έπαιρναν natalizumab, συγκριτικά με τους υγιείς
Calabrese (2012)	PBMCs	υγιείς (n=30) ασθενείς με MS (n=32) [RRMS (n=31), SPMS (n=1)]	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	Υπομεθυλίωση και υπερέκφραση του γονιδίου PAD2 Όχι συσχέτιση με διάρκεια νόσου, EDSS, MRI, στο συνολικό δείγμα και ανά φύλο Ήπια συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης PAD2 στο περιφερικό αίμα και EDSS, στο

				63% των ασθενών Όχι σημαντικά αποτελέσματα για το PAD4.
Kumagai (2012)	Περιφερικό αίμα λευκοκύτταρα (293T κύτταρα)	υγιείς (n=19) ασθενείς με MS (n=69) [PPMS (n=7), RRMS (n=50), SPMS (n=12)]	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	Αυξημένη μεθυλίωση στον υποκινητή 2 του SHP-1 στους ασθενείς με MS Όχι συσχέτιση μεθυλίωσης του SHP-1 και τύπου MS, διάρκειας νόσου, EDSS
Calabrese (2014)	PBMCs	υγιείς (n=40) ασθενείς (n=40)	Μεθυλίωση υποψήφιου γονιδίου	Καταστολή έκφρασης των γονιδίων TET2 και DNMT1 σε ασθενείς, λόγω ελαττωματικής μεθυλίωσης
Graves (2014)	CD4+T λεμφοκύτταρα	υγιείς (n=28) ασθενείς με RRMS (n=30)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	Διαφορές στη μεθυλίωση σε 38 διαφορετικά γονίδια (19 μεσα στη MHC περιοχή, 55 δεν ανήκουν στους HLA γενετικούς τόπους) Μεγαλύτερο σήμα στο 6p21.32 του HLA-DRB1. Ισχυρή συσχέτιση μεθυλίωσης του HLA-DRB1 και HLA-DRB1 απλότυπου.
Huynh (2014)	Ιστός εγκεφάλου	υγιείς (n=19) ασθενής (n=28)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	220 υπομεθυλιωμένες DMRs (περιέχουν 1,235 CpGs) και 319 υπερμεθυλιωμένες DMRs (περιέχουν 1,292 CpGs), με γονίδια που ελέγχουν λειτουργία και επιβίωση ολιγοδενδροκυττάρων μεταξύ

					τους
Bos(2015)	Ολικό αίμα, CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα	υγιείς (n=14) ασθενείς με RRMS (n=14) όλοι γυναίκες	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	Διαφορές μεταξύ CD4+, CD8+ και λευκοκυττάρων στη συνολική μεθυλίωση Όχι εμμένουσες διαφορές στη μεθυλίωση μεταξύ ασθενών και υγιών Διαφορές στη μεθυλίωση 40 CpGs μεταξύ ασθενών και υγιών Οι περιοχές με τη σημαντικότερη συσχέτιση: Ένας probe κοντά στη θέση έναρξης μεταγραφής του γονιδίου TMEM48, Ένας probe στο πρώτο εξόνιο του APC2 και αρκετά CpGs μέσα στο γονίδιο DNHD1 Αυξημένη υπερμεθυλίωση στα CD8+ κύτταρα σε ασθενείς με διάρκεια νόσου 7 έτη ή λιγότερα, σε σύγκριση μ' αυτούς με διάρκεια νόσου πάνω από 8 έτη	
Maltby (2015)	CD8+ T λεμφοκύτταρα	υγιείς (n=28) ασθενείς με RRMS (n=30)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος	79 μεθυλιωμένα CpGs σε γονίδια έξω από το MHC locus, δε σχετιζόταν προηγουμένως με MS Όχι επικάλυψη θέσεων με αλλαγές μεθυλίωσης μεταξύ CD4+ και CD8+ T κυττάρων (σύγκριση με προηγούμενα αποτελέσματα) Ισχυρή συσχέτιση μεταξύ αλλαγών στη μεθυλίωση των	

Neven (2016)	Ολικό αίμα	υγιείς (n=137) ασθενείς με RRMS (n=51)	Μεθυλίωση όλου του γονιδιώματος (επαναλαμβανόμενα στοιχεία)	Υπερμεθυλιωμένα Alu, LINE-1 and SAT-α στους ασθενείς, συγκριτικά με υγιείς Μεγαλύτερη αναπηρία, σχετιζόμενη με υπομεθυλίωση στο LINE-1 και στο Alu. Όχι σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης και πορείας νόσου, ηλικία έναρξης νόσου, πολυσυστηματικές διαταραχές, παρουσία/ποσότητα ολιγοκλωνικών ζωνών και υποτροπή στο νωτιαίο μυελό
-----------------	------------	---	---	--

MS : πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, PPMS: πρωτοπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση, SPMS: δευτεροπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση multiple, RRMS: πολλαπλή σκλήρυνση με εξάρσεις και υφέσεις, MRI: μαγνητική τομογραφία, cfDNA: DNA πλάσματος, IFN: ιντερφερόνη

Η απαμινάση της πεπτιδυλαργινίνης 2 (PAD2) και 4 (PAD4) είναι ένζυμα που εκφράζονται στον εγκέφαλο και στα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η έκφραση των PAD2 και PAD4 γονιδίων πιθανότατα έχει ως αποτέλεσμα την απαμίνωση της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP) και κατά συνέπεια, σε απώλεια της ανοσιακής αντοχής των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση [41, 42]. Υπομεθυλίωση του γονιδίου PAD2 σε ποσοστό 30% των κυτοσινών έχει βρεθεί στη λευκή ουσία των ασθενών, εξαιτίας της αυξημένης δραστηριότητας της απομεθυλάσης του DNA [14]. Επιπλέον, προτάθηκε ότι η παρατηρούμενη απομεθυλίωση είναι ιστοειδική (στη λευκή ουσία) και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική υπομεθυλίωση στο θύμο αδένων των ασθενών ή στη λευκή ουσία ασθενών με άλλες νευρολογικές παθήσεις (Alzheimer, Huntington και Parkinson) [14]. Ωστόσο, το γονίδιο PAD2 έχει, επίσης, βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση, γεγονός

που σχετίζεται με υπομεθυλίωση στα CpG νησίδια του υποκινητή του PAD2 γονιδίου [43]. Η υπερέκφραση του PAD2 δεν έχει συσχετιστεί με τη διάρκεια της νόσου, το φύλο, την κλίμακα εκτίμησης του βαθμού αναπηρίας (EDSS) και τις απεικονίσεις μαγνητικού συντονισμού (MRI). Ωστόσο, σ' ένα ποσοστό 63% των υπό μελέτη ασθενών, μια ασθενής συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του PAD2 και του βαθμού EDSS βρέθηκε στο περιφερικό αίμα [43]. Η έρευνα σχετικά με το γονίδιο PAD4 δεν έχει δείξει σημαντική αλλαγή στο επίπεδο μεθυλίωσης του PAD4 στο περιφερικό αίμα ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [43]. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση του υποκινητή του PAD2 ίσως οδηγούν σε υπερέκφραση του γονιδίου και σε αυξημένη παραγωγή της PAD2 πρωτεΐνης, η οποία, με τη σειρά της, ρυθμίζει της παραγωγή της κιτρουλινοποιημένης MBP. Αυτή η λιγότερο σταθερή μορφή της MBP οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της μυελίνης και ενεργοποίηση της ανοσιακής απάντησης κατά την πορεία της νόσου [14].

Ένας σημαντικός αριθμός ερευνών υποστηρίζει τη συσχέτιση μεταξύ του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II και της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας [10]. Επιπλέον, η έκφραση των μορίων του MHC ρυθμίζεται από τον MHC2TA trans-ενεργοποιητή, ο οποίος, με τη σειρά του, επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του υποκινητή IV του γονιδίου του [44]. Πραγματοποιήθηκε, ακόμη, μια μελέτη που στόχευε να αποσαφηνίσει την πιθανή συνεισφορά της μεθυλίωσης του υποκινητή IV του γονιδίου MHC2TA στην πολλαπλή σκλήρυνση, χωρίς, όμως να αποκαλύψει σημαντική συσχέτιση [45]. Σε μια προσπάθεια να προσδιοριστεί η συμβολή των επιγενετικών τροποποιήσεων (απενεργοποίηση) των HLA-DRB5 και HLA-DRB1 στη σοβαρότητα της νόσου, οι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου, η οποία βασιζόταν στο βαθμό της κλίμακας EDSS και στον τύπο της νόσου [46]. Μια ακόμη κατηγοριοποίηση έγινε ανάλογα με την ομοζυγωτία ή την ετεροζυγωτία για το HLA-DRB 1*1501 [46]. Ωστόσο, η μελέτη δεν έδειξε διαφορά στη μεθυλίωση των CpG δινουκλεοτιδίων των HLA-DRB1*1501 and HLA-DRB5, ούτε μεταξύ των ασθενών με κακοήθη ή καλοήθη πολλαπλή σκλήρυνση, ούτε μεταξύ των θετικών ως προς το HLA-DRB1*1501 ασθενών με κακοήθη νόσο και των θετικών ως προς το HLA-DRB1*1501 με καλοήθη νόσο [46]. Όμως, μια οριακά υψηλότερη αναλογία ως προς τη μεθυλίωση παρατηρήθηκε, μεταξύ HLA-DRB1*1501 ετερόζυγων ασθενών με κακοήθη φαινότυπο, σε σύγκριση με αυτούς που εμφάνιζαν καλοήθη φαινότυπο. Αντιθέτως, στους ομοζυγώτες για το HLA-DRB1*1501, χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με κακοήθη φαινότυπο, σε σχέση με τους ασθενείς με καλοήθη φαινότυπο της νόσου [46].

Σε μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη, ο Baranzini και οι συνάδελφοί του εξέτασαν 3 ζευγάρια διδύμων με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, που παρουσίαζαν ανόμοιο φαινότυπο, για

πιθανές αλλαγές στο βαθμό της μεθυλίωσης των CD4+T λεμφοκυττάρων, μελετώντας τη μεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιώματος. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, οφειλόμενες σε επιγενετικές τροποποιήσεις [47].

Μια ακόμη μελέτη πραγματοποιήθηκε, η οποία στόχευε στον προσδιορισμό του ρόλου της μεθυλίωσης στην πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας. Γι' αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε DNA που βρίσκεται στο πλάσμα, ελεύθερο κυττάρων (Cell-free plasma DNA), με τη μορφή ετερογενών πολυνουκλεοτιδίων [48]. Διαφορές ως προς τη μεθυλίωση παρατηρήθηκαν σε πολλούς υποκινητές γονιδίων και πιο συγκεκριμένα : Σε 15 υποκινητές, όταν ασθενείς σε ύφεση (remission) συγκρίθηκαν με υγιείς, σε 14 υποκινητές, όταν ασθενείς με έξαρση (relapse) συγκρίθηκαν με υγιείς και σε 5 υποκινητές, όταν ασθενείς με ύφεση της νόσου συγκρίθηκαν με ασθενείς σε έξαρση. Το πιο διαφοροποιημένο ως προς τη μεθυλίωση γονίδιο ήταν το γονίδιο του 2B αναστολέα της κινάσης, εξαρτώμενου από κυκλίνη (CDKN2B) (71.0% μεθυλίωση σε ασθενείς με ύφεση της νόσου και 22.6% σε υγιείς) [48].

Η απομεθυλίωση του DNA μελετήθηκε, επίσης στα γονίδια IFNG, FOXP3, IL-13 και IL-17 που αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της ανοσιακής απάντησης και της διαφοροποίησης των T βοηθητικών κυττάρων [49]. Οι ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, που δε βρίσκονταν υπό θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα natalizumab, παρουσίαζαν υπομεθυλίωση των γονιδίων FOXP3 και IL-17 σε απομονωμένα CD4+ T λεμφοκύτταρα, συγκρινόμενοι με υγιή πληθυσμό. Ωστόσο, αυτό το εύρημα δεν παρουσιάστηκε σε ασθενείς υπό θεραπεία με natalizumab. Προτάθηκε ότι η υπερμεθυλίωση που παρατηρήθηκε στους ασθενείς υπό natalizumab πιθανώς να μην αποτελεί αποτέλεσμα της λήψης του φαρμάκου [49].

Η φωσφατάση καταλοιπίων τυροσίνης των πρωτεϊνών (SHP-1) εμπλέκεται, πιθανότατα, στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη φλεγμονώδη απομυελίνωση, στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [50]. Στους ασθενείς βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή 2 του SHP-1 γονιδίου και, συνεπώς, μειωμένη έκφραση του SHP-1 και αυξημένη φλεγμονή, μεσολαβούμενη από λευκοκύτταρα [50]. Ο υποκινητής του SHP-1 γονιδίου έχει, προηγουμένως, αναφερθεί να καταστέλλει τη μεταγραφή του SHP-1 γονιδίου σε λεμφοβλαστοειδή κύτταρα [51]. Ωστόσο, δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του υποκινητή του SHP-1 και του τύπου της πολλαπλής σκλήρυνσης, της διάρκειας της νόσου ή του βαθμού της κλίμακας EDSS [50]. Υπερμεθυλίωση σε ένα CpG νησίδιο του SHP-1 παρατηρήθηκε, επίσης, με μελέτη της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος [52].

Η ρύθμιση και η έκφραση των γονιδίων DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 and TET3 επηρεάζουν τη λειτουργία των αντίστοιχων ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στη μετατροπή της 5-μεθυλκυτοσίνης (5mC) σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη (5hmC) [53, 54]. Ο Calabrese και οι συνεργάτες του μελέτησαν το επίπεδο της μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων

στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, απομονώνοντας μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς και υγιείς. Ανίχνευσαν αλλαγές στο επίπεδο της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων DNMT1 και TET2 [53]. Αυτές οι αλλαγές συνοδεύονταν από καταστολή της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων στους ασθενείς. Επιπλέον, αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου TET2 και της διάρκειας της νόσου [53]. Σημαντική καταστολή του γονιδίου TET3 παρατηρήθηκε, επίσης, σε ασθενείς με δευτερογενώς προϋούσα πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [55].

Μια ανάλυση της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος αποκάλυψε 19 CpG νησίδια μέσα στην περιοχή MHC. Ο γενετικός τόπος 6p21.32 του HLA-DRB1 βρέθηκε να είναι ο πλέον ισχυρά συσχετιζόμενος με την πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας [52]. Επιπλέον, η μεθυλίωση του HLA-DRB1 φαίνεται να εξαρτάται από τον απλότυπο του HLA-DRB1*1501 [52]. Η μελέτη αποκάλυψε, επίσης, σημαντικές διαφορές στο βαθμό μεθυλίωσης 55 CpG νησιδίων από γενετικούς τόπους που δεν ανήκουν στα HLA μόρια και η πλειονότητα των οποίων (30 από τους 55) είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [56]. Ωστόσο, οι περισσότεροι από αυτούς τους γενετικούς τόπους δεν παρουσίασαν διαφορά, ως προς τη μεθυλίωσή τους [52].

Το επίπεδο μεθυλίωσης σε γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία των ολιγοδενδροκυττάρων και την ανοσιακή απάντηση σε περιοχές του εγκεφαλικού παρεγχύματος, χωρίς φλεγμονή και απομυελίνωση, έχει συσχετιστεί με την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας. Σε μια μελέτη της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος, η διάρκεια της νόσου συσχετίστηκε με διαφοροποιημένα μεθυλιωμένες περιοχές (DMRs). Η ανάλυση αποκάλυψε 220 υπομεθυλιωμένες DMRs (περιέχουν 1,235 CpG νησίδια) και 319 υπερμεθυλιωμένες DMRs (περιέχουν 1,292 CpG νησίδια), λαμβάνοντας υπ' όψιν παράγοντες που επηρεάζουν το επίπεδο μεθυλίωσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι η υπομεθυλίωση του DNA στα CpG νησίδια καταναεμήθηκε κυρίως σε γειτονικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, ενώ τα υπομεθυλιωμένα CpG νησίδια βρίσκονταν κυρίως μέσα στο σώμα των γονιδίων. Μεταξύ των αυτοσωματικών γονιδίων, αρκετά γονίδια που ρυθμίζουν τη λειτουργία και την επιβίωση των ολιγοδενδροκυττάρων παρουσίασαν υπερμεθυλίωση, όπως: το γονίδιο της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP), η περιοχή καθορισμού του άρρενος φύλου - πλαίσιο 8 (SOX8), ο γενετικός τόπος της N-myc πρωτεΐνης 1 που ρυθμίζεται αρνητικά από το οξυγόνο (NDRG1) και το γονίδιο της bcl-2 πρωτεΐνης (BCL2L2), η οποία είναι ρυθμιστής της απόπτωσης. Προς αποφυγή παρανοήσεων, εξαιτίας της απενεργοποίησης του X χρωμοσώματος, πραγματοποιήθηκε, επίσης, μια ανάλυση του X χρωμοσώματος, με ειδικότητα ως προς το φύλο των ασθενών. Η ανάλυση, αυτή, έδειξε διαφορετική ομαδοποίηση μιας υποομάδας γυναικών ασθενών, ως προς την υπερμεθυλίωση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β1 των γειτονικών

χασματοσυνδέσεων (GJB1). Το γονίδιο, αυτό, σχετίζεται, πιθανώς, με τη λειτουργία των ολιγοδενδροκυττάρων. Επίσης, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των γονιδίων της καθεψίνης Z (CTSZ) και της λεγκουμίνης (LGMN), τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και σε βιολογικές λειτουργίες των νευρικών κυττάρων. Καταστολή της έκφρασης παρατηρήθηκε στο γονίδιο του κρυπτοχρώματος του κικκάδιου ρυθμού 2 (CRY2), το οποίο επηρεάζει τον κικκάδιο ρυθμό, καθώς επίσης και στο γονίδιο BCL2L2, το οποίο πιθανώς ρυθμίζει το θάνατο των νευρώνων και την επιβίωση των ολιγοδενδροκυττάρων. Η διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA (υπερ- ή υπο-) και ο μέσος όρος της διαφοράς μεταξύ ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και υγιών, επικυρώθηκε με ένα ανεξάρτητο δείγμα. Αποδείχτηκε ότι το γονίδιο CTSZ και το γονίδιο της υδρολάσης της γλουταθειόνης (HAGHL) εκφράζονταν διαφορετικά στους ασθενείς απ' ότι στους υγιείς. Σε μια Τρίτη ανεξάρτητη υποομάδα, η διαφορά ως προς την έκφραση του γονιδίου BCL2L2 δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικώς σημαντικά [12].

Μια ακόμη προσέγγιση της μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος ανίχνευσε διαφορές στη συνολική μεθυλίωση του DNA, μεταξύ των CD4+ T λεμφοκυττάρων, των CD8+ και των κυττάρων του ολικού αίματος, παρ' ότι δεν παρατηρήθηκε συστηματική διαφορά μεταξύ ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και υγιών ατόμων [11]. Διαφορά ως προς το επίπεδο της μεθυλίωσης παρατηρήθηκε σε 40 CpG περιοχές, μεταξύ ασθενών και υγιών. Η ισχυρότερη συσχέτιση με τη νόσο παρατηρήθηκε σε έναν ανιχνευτή DNA αλληλουχίας (probe) κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης 48 (TMEM48), στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου της πρωτεΐνης 2 της αδενωματώδους πολυποδίασης (APC2) και σε αρκετές CpG περιοχές μέσα στο γονίδιο του πεδίου 1 της βαριάς αλυσίδας της δυνεΐνης [11]. Στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, στο DNA των CD8+ T λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση σε κάποιες CpG περιοχές. Επιπλέον, υψηλότερη υπερμεθυλίωση στα CD8+ T λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε σε ασθενείς με διάρκεια νόσου μικρότερη ή ίση με 7 χρόνια, σε σχέση με εκείνους που είχαν διάρκεια νόσου μεγαλύτερη από 8 χρόνια [11].

Η πιο πρόσφατη μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος αποκάλυψε 79 μεθυλωμένα CpG νησίδια σε γονίδια, τα οποία δεν ανήκουν στο γενετικό τόπο του MHC και δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας. Τα CD4+ και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση σε ένα CpG νησίδιο, στο γονίδιο της πρωτεΐνης 1 που περιέχει αντίγραφο MORN (MORN1) αλλά σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους του γονιδίου. Στο γονίδιο της ελαφριάς αλυσίδας της φερριτίνης (FTL) παρατηρήθηκε στατιστικά μεγαλύτερη υπομεθυλίωση στον υποκινητή, στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Επιπροσθέτως, το ETS-σχετιζόμενο γονίδιο (ERG) και το γονίδιο του DDB1- και CUL4-συσχετιζόμενου παράγοντα 4 (DCAF4) παρουσίαζαν υπερμεθυλίωση στους ασθενείς με

πολλαπλή σκλήρυνση σε σχέση με τους υγιείς [57]. Οι αλλαγές στην έκφραση του FTL γονιδίου θα μπορούσε να επηρεάσει το φορτίο των αποθεμάτων σιδήρου στη φαιά ουσία των ασθενών με υποτροπιάζουσα πολλαπλή σκλήρυνση ενώ η απορρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου ERG θα μπορούσε να επηρεάσει την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τις διαδικασίες της φλεγμονής. Ακόμη, η ελαττωματική λειτουργία του γονιδίου DCAF4 θα μπορούσε να εμπλέκεται στη νευροεκφύλιση [57].

Διαφοροποιημένα επίπεδα μεθυλίωσης των επαναλαμβανόμενων στοιχείων Alu, LINE-1 και SAT-α, τα οποία είναι ευρέως γνωστά ως εκτιμητές της συνολικής μεθυλίωσης του DNA, ίσως να συνεισφέρουν, επίσης, στον κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας [58]. Η υπερμεθυλίωση όλων αυτών των δεικτών μεθυλίωσης ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς, συγκριτικά με υγιή πληθυσμό. Χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 συσχετίστηκαν με χαμηλότερους βαθμούς της κλίμακας EDSS στους ασθενείς, ενώ στο Alu παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στην ομάδα των ασθενών με χαμηλό βαθμό EDSS [58]. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των επιπέδων μεθυλίωσης στον αριθμό των υποτροπών, στην εμφάνιση βλαβών στο νωτιαίο μυελό, στην ηλικία έναρξης νόσου και στην ύπαρξη ολιγοκλωνικών ζωνών [58]. Η γνώση για αυτά τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία είναι πολύ περιορισμένη, παρ' ότι έχει προταθεί ότι η υπερμεθυλίωση του LINE-1 θα μπορούσε να είναι συνέπεια της υπερέκφρασης των DNMTs [59].

8. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθούν τα πρότυπα μεθυλίωσης 8 γονιδίων, των: RUNX3, MLH1, NEUROG1, IGF2, SOCS1, CDNK2A, CACNA1G και CRABP1 σε ασθενείς με πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας σε σύγκριση με υγρή πληθυσμό. Τα πρότυπα μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων έχουν μελετηθεί διαξοδικά στον ορθοκολικό καρκίνο από τους Ogino et al, οι οποίοι πρότειναν ότι τα παραπάνω γονίδια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως «πάνελ» γι' αυτό τον τύπο καρκίνου, βασιζόμενοι σε μελέτες διαλογής, που διεξήχθησαν πάνω σε δείγματα από μεγάλο αριθμό ατόμων. Εκτός από το γονίδιο SOCS1, δεν έχει μελετηθεί ξανά η συσχέτιση των προαναφερθέντων γονιδίων με την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, παρ' ότι υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν τη συμμετοχή τους στη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων, των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και στη φλεγμονή των νευρώνων [60, 61]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια ευρίσκονται σε μεγάλα ποσοστά σε ενεργές και χρόνιες εστίες σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση [60, 62, 63].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

9.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΗΘΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Σύνολο, 66 ασθενείς με πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας (66.6% γυναίκες), οι οποίοι εισήχθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και 33 υγιή άτομα, στρατολογήθηκαν γι' αυτή τη μελέτη. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους, όπως το φύλο, η ηλικία επί του παρόντος, η ηλικία έναρξης νόσου, η διάρκεια της νόσου και ο βαθμός αναπηρίας, σύμφωνα με την κλίμακα EDSS (Expanded Disability Status Scale), συλλέχθηκαν. Το δείγμα περιφερικού αίματος που χρησιμοποιήθηκε από υγιή άτομα, ανήκε σε μη σχετιζόμενα συγγενικά με τους ασθενείς υγιή άτομα, τα οποία ήταν, κυρίως, σύζυγοι των ασθενών, ενήλικες επισκέπτες στο νοσοκομείο και προσωπικό του νοσοκομείου. Επιλέχθηκαν με αναλογία φύλου, έτσι ώστε να ταιριάζουν με το δείγμα των ασθενών ως προς την ηλικία. Τα κριτήρια καταλληλότητας, για το δείγμα των υγιών ατόμων, ήταν το ελεύθερο ιατρικό ιστορικό, για προηγούμενες νευρολογικές και αυτοάνοσες παθήσεις. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και γραπτή συναίνεση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, λήφθηκε από όλους τους συμμετέχοντες.

9.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των συμμετεχόντων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της εξαλάτωσης [64]. Περιφερικό αίμα 10ml αραιώθηκε με ddH₂O, σε τελικό όγκο 12ml και φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 3500 rpm, για να απομονωθούν τα εμπύρνα κύτταρα. Έπειτα, προστέθηκαν τα διαλύματα Lysis I and II, προκειμένου να σπάσουν οι πυρηνικές μεμβράνες των λευκοκυττάρων και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 750μl SDS (10% w/v) και 100 μl Πρωτεΐνάσης K, έτσι ώστε να καταστραφούν οι πυρηνικές μεμβράνες και οι πρωτεΐνες που βρίσκονται συνδεδεμένες με το DNA. Το δείγμα επώαστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Ακολούθως, προστέθηκαν 2 ml NaCl 6M, για να κατακρημνιστούν οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες και μετά από φυγοκέντρωση, το καθαρό από πρωτεΐνες και ιστόνες DNA, στο υπερκείμενο, καταβυθίστηκε με απόλυτη ΕΤΟΗ. Μετά από δεύτερη επώαση overnight και την εξάτμιση της αιθανόλης, συλλέχθηκε το γενωμικό DNA. Η ποιότητα του DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ορατού με τη χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο.

Μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA σε μήκος κύματος 260nm (για το DNA) και 280 nm (για τις πρωτεΐνες) σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με βάση το λόγο OD_{260}/OD_{280} . Τιμές μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν επαρκώς καθαρό DNA ενώ τιμές μικρότερες του 1,7 υποδηλώνουν ότι στο διάλυμα του DNA περιέχονται πρωτεΐνες και τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

9.3 MS-MLPA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με τη μέθοδο της ειδικής για μεθυλίωση-ενίσχυσης πολλαπλού συνδέτη (MS-MLPA) χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τον αριθμό των αντιγράφων και το επίπεδο μεθυλίωσης, περισσότερων από 50 αλληλουχιών DNA, με μία και μόνο αντίδραση. Από κάθε αντίδραση προκύπτει ένα σύνολο PCR προϊόντων, αμπλικονίων (amplicons), που αποτελούνται μόνο από probes που υβριδοποιούνται με το DNA του δείγματος. Προκειμένου να προσδιοριστούν και ο αριθμός των αντιγράφων και το επίπεδο της μεθυλίωσης, συμπεριλαμβάνονται αρκετοί probes, ειδικοί για μεθυλίωση. Αυτοί έχουν σχεδιαστεί, προκειμένου να στοχοποιούν αλληλουχίες DNA που περιέχουν θέσεις για το ένζυμο περιορισμού HhaI, το οποίο είναι ευαίσθητο στη μεθυλίωση. Μετά την υβριδοποίηση του probe, η αντίδραση MS-MLPA χωρίζεται σε δύο μέρη. Το ένα μέρος υπόκειται στην αντίδραση της κανονικής αντίδρασης MLPA, παρέχοντας πληροφορίες για τον αριθμό των αντιγράφων, ενώ το άλλο μέρος, υπόκειται σε πέψη από το ένζυμο HhaI, υποδεικνύοντας το επίπεδο μεθυλίωσης της DNA αλληλουχίας-στόχου.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το εξής προϊόν: SALSA MLPA Probemix ME042-C1 CIMP, το οποίο περιέχει ένα σύνολο probes για την MS-MLPA, με ένα επιπλέον δείγμα DNA, το SALSA Binnig DNA SD029-SO2, για τον έλεγχο της ποιότητας της διαδικασίας, σύμφωνα με τις συστάσεις της εταιρείας απ' όπου τα προμηθευτήκαμε, την MRC-Holland, Άμστερνταμ, Ολλανδία).

Από καθένα από τα 99 δείγματα DNA και από το SD029, 200ng DNA αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 5μl Tris-EDTA και τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή για 5 min στους 98°C, προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη. Έπειτα, 3μl hybridization master-mix, προστέθηκε σε κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν ξανά στο θερμοκυκλοποιητή, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της υβριδοποίησης, για 17 ώρες στους 60°C. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα χωρίστηκε σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες, τύπου eppendorf, ο ένας εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων και ο άλλος για τον έλεγχο της μεθυλίωσης. Καθένας

περιείχε 10μl όγκο προϊόντος. Στους 48°C, 10μl Ligase-65 master mix προστέθηκαν σε κάθε eppendorf για τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των probes και 10μl Ligase-Digestion master mix προστέθηκαν σε κάθε eppendorf για τον έλεγχο της μεθυλίωσης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των probes και η πέψη από το ένζυμο Hha1. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν στο θερμοκυκλοποιητή για 30 min στους 48°C, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις της σύνδεσης και της σύνδεσης-πέψης, αντίστοιχα. Επίσης, επώαστηκαν για 5 min στους 98°C, ώστε να απενεργοποιηθεί το ένζυμο από τη θερμότητα. Τέλος, για την αντίδραση της PCR, 5μl master-mix πολυμεράσης προστέθηκαν σε κάθε eppendorf και όλα τα δείγματα επώαστηκαν στο θερμοκυκλοποιητή, ώστε να ολοκληρώσουν 35 κύκλους, για 30sec στους 98°C, για 30sec στους 60°C και για 1 min at 72°C. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε μετά από 20min επιπλέον στους 72°C.

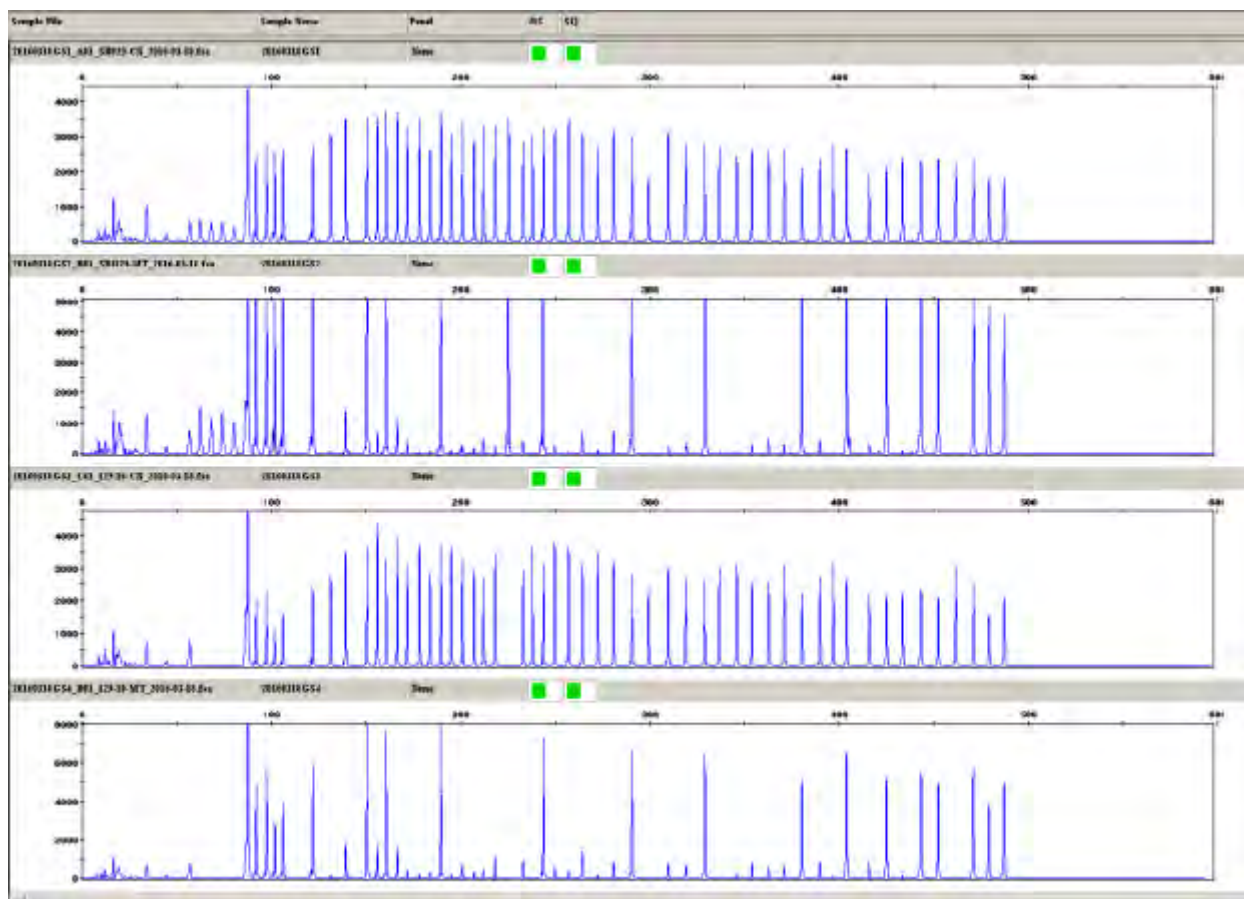
Τα προϊόντα της PCR για τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων και για τον έλεγχο της μεθυλίωσης υποβλήθηκαν σε ανάλυση των θραυσμάτων του DNA (fragment analysis) με τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν τα amplicons. Η διαδικασία της προετοιμασίας για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει την προσθήκη 10μl Hidi και 0.5μl LIZ, οι οποίες είναι φθορίζουσες χρωστικές, σε 1μl PCR προϊόν, για 3 min στους 86°C και για 2 min στους 4°C κι έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε plate με τη σειρά που θέλουμε να απεικονιστούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.

9.4 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Κατά την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis), μόρια των αμπλικονίων της PCR διαπερνούν τα τριχοειδή, τα οποία περιέχουν το κατάλληλο πολυμερές και μεταναστεύουν προς το άλλο άκρο των τριχοειδών. Τα μικρότερα τμήματα μετακινούνται γρηγορότερα σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα τμήματα DNA. Κατά την ανίχνευση των τμημάτων του DNA, μια δέσμη διέγερσης προκαλεί το φθορισμό της χρωστικής που περιέχει το κάθε τμήμα DNA. Ο φθορισμός καταγράφεται από μια οπτική συσκευή ανίχνευσης, μια CCD κάμερα, η οποία μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρονικό σήμα, το οποίο μεταφέρεται σε έναν συνδεδεμένο ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), όπου συσχετίζεται η συγκέντρωση των χρωστικών (Hidi και LIZ) που χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των DNA τμημάτων (άξονας ψ) με τον χρόνο (άξονας χ). Κάθε κορυφή στο ηλεκτροφερόγραμμα αντιπροσωπεύει το μέγεθος ενός μόνο τμήματος DNA

(Εικόνα 9.4). Η θέση και το σχήμα των κορυφών του ηλεκτροφερογράμματος χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν την αλληλουχία των βάσεων ή το προφίλ των DNA τμημάτων, ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης που επιλέχθηκε σε αρχικό στάδιο της διαδικασίας.



Εικόνα 9.4 Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφερογράμματος των 2 πρώτων ζευγών δειγμάτων (άπεπτο-πάνω και μετά από πέψη με Hha1-κάτω, σε κάθε ζεύγος).

Η συσκευή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εξής: ABI 3730 Genetic Analyser. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης fragment απεικονίστηκαν μέσω του λογισμικού GeneMapper software version 5.0. Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω του Coffalyser.Net, το οποίο έχει σχεδιαστεί από την MRC Holland.

1.5 COFFALYSER

Το λογισμικό Coffalyser.NETTM Software, beta version, (MRC-Holland, Άμστερνταμ, Ολλανδία) με ρυθμίσεις default, χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογήσουμε τα δεδομένα μας, που υποβλήθηκαν σε ανάλυση fragment και συγκριτική ανάλυση (comparative analysis), έτσι ώστε να αξιολογήσουμε τη μεθυλίωση σε κάθε probe. Όλες οι παράμετροι ήταν μέσα σε ικανοποιητικά όρια και πραγματοποιήθηκε ομαλοποίηση εντός των δειγμάτων (intra sample normalization). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας, το σήμα κάθε probe διαιρέθηκε από το σήμα καθενός από τους probes αναφοράς και ο μέσος όρος των αναλογιών που προέκυψαν είναι η σταθερά της διαδικασίας για κάθε probe. Η μεθυλίωση του DNA methylation για κάθε probe (αναλογία του ύψους της κορυφής του δείγματος που έχει πεφθεί προς το ύψος της κορυφής του δείγματος που δεν έχει υποστεί πέψη) υπολογίστηκε διαιρώντας τη σταθερά του probe του δείγματος που έχει υποστεί πέψη με τη σταθερά του αντίστοιχου probe του δείγματος που δεν έχει υποστεί πέψη. Το αποτέλεσμα αποδόθηκε ως ποσοστό.

10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ελέγξαμε διαφορές μεταξύ ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση και υγιών ατόμων κι επίσης, μεταξύ ασθενών σε έξαρση και ασθενών σε ύφεση της νόσου, ως προς τη θετικότητα για μεθυλίωση και ως προς τη μέγιστη μεθυλίωση, σε κάθε γονίδιο. Η θετικότητα ως προς τη μεθυλίωση ορίστηκε ως επίπεδο μεθυλίωσης $\geq 1\%$ σε τουλάχιστον έναν από τους υπό μελέτη probes για κάθε γονίδιο. Η μέγιστη μεθυλίωση ορίστηκε ως το υψηλότερο παρατηρούμενο ποσοστό μεθυλίωσης σε οποιονδήποτε από τους probes, σε κάθε γονίδιο.

Οι διαφορές ως προς τη θετικότητα για τη μεθυλίωση ελέγχθηκαν, χρησιμοποιώντας το τεστ χ^2 (chi-square test). Οι συγκρίσεις, για να παρατηρήσουμε αν υπάρχουν διαφορές ως προς τη μέγιστη μεθυλίωση μεταξύ όλων των ασθενών και των υγιών και μεταξύ των ασθενών σε έξαρση και των ασθενών σε ύφεση (δύο ομάδες), υπολογίστηκαν με t-test. Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών σε ύφεση, των ασθενών σε έξαρση και των υγιών ατόμων (τρεις ομάδες), υπολογίστηκαν με one-way ANOVA, με διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις. Τα θετικά αποτελέσματα από την ANOVA υποβλήθηκαν σε ανάλυση post hoc, έτσι ώστε να προσδιορίσουμε τις ομάδες που διέφεραν στατιστικά. Η ανάλυση ROC πραγματοποιήθηκε, για να προσδιορίσουμε σημεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως cut-offs στα επίπεδα της μεθυλίωσης, όπου παρατηρήθηκε η υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα, για τον κίνδυνο ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης. Η σημαντικότητα των cut-offs εκτιμήθηκε με ανάλυση διασταυρούμενης πινακοποίησης (cross tabulation). Επιπλέον, ελέγξαμε το δείγμα των ασθενών για γραμμική διόρθωση (Pearson's R) μεταξύ των μέγιστων επιπέδων μεθυλίωσης κάθε γονιδίου και της ηλικίας, του φύλου, του βαθμού αναπηρίας EDSS και της διάρκειας της νόσου. Για όλες τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, ο επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 95%. Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS v21.

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του δείγματος παρατίθενται στον **Πίνακα 11.1**.

Τα επίπεδα της μέσης και της μέγιστης μεθυλίωσης, για κάθε ομάδα του δείγματος (ασθενείς σε ύφεση της νόσου, ασθενείς σε έξαρση και υγιείς) ανά probe φαίνονται στον **Πίνακα 11.2**. Τα επίπεδα μεθυλίωσης κυμαίνονταν από 0% έως 31% και κατανέμονταν ως εξής στις ομάδες του δείγματος: στους υγιείς από 0% έως 12% και στους ασθενείς από 0% έως 31%. Η μέγιστη τιμή μεθυλίωσης για τους υγιείς παρατηρήθηκε στον 3^ο probe του γονιδίου CRABP1 και για τους ασθενείς στον 2^ο probe του γονιδίου SOCS1. Ο αριθμός των θετικών για μεθυλίωση probes (μεθυλίωση >1%) κυμαίνονταν από 10 (από τους 31), σε ένα δείγμα υγιούς ατόμου έως 27, σε έναν ασθενή σε έξαρση. Δύο θέσεις στο γονίδιο SOCS1 (probes 1 και 4) και μία στο γονίδιο MLH1 (probe 2) δε μεθυλιώνονταν καθόλου, σε κανένα δείγμα ασθενούς ή υγιούς.

Πίνακας 11.1	Σύνοψη των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων				
Μεταβλητή	Υγιείς	Σύνολο ασθενών	Ασθενείς σε έξαρση	Ασθενείς σε ύφεση	
n (%)	33 (33.3%)	66 (66.6%)	33 (33.3%)	33 (33.3%)	
Γυναίκες, n (%)	22 (66.6%)	44 (66.6%)	22 (66.6%)	22 (66.6%)	
Άντρες, n (%)	11 (33.3%)	22 (33.3%)	11 (33.3%)	11 (33.3%)	
Ηλικία έναρξης νόσου, μέσος όρος (διακύμανση)	NA	33.18 (17-56)	33.33 (17-49)	33.03 (17-56)	
Ηλικία δειγματοληψίας, μέσος όρος (διακύμανση)	33.06 (20-67)	39.08 (21-65)	37.91 (21-58)	40.24 (23-65)	
Διάρκεια νόσου, μέσος όρος (διακύμανση)	ΌΧΙ	5.89 (1-15)	4.58 (1-14)	7.21 (1-15)	
EDSS, μέσος όρος (διακύμανση)	ΌΧΙ	2.39 (0-5)	2.61 (0-5)	2.00 (1-4)	

Πίνακας 11.2. Επίπεδο μεθυλίωσης μέσο και μέγιστο, σε κάθε ομάδα του δείγματος, για κάθε probe

Probes ανά γονίδιο	Υγιείς Μέσος όρος, μέγιστο (%)	Σύνολο ασθενών	Ασθενείς σε έξαρση	Ασθενείς σε ύφεση
RUNX3				
Probe 1 (01-025.128720)	0, 0	0.32, 6	0.36, 6	0.27, 5
Probe 2 (01-025.128920)	0.88, 9	2.71, 18	2.85, 18	2.58, 17
Probe 3 (01-025.129596)	0.52, 8	1.20, 9	1.52, 8	0.88, 9
MLH1				
Probe 1 (03-037.009361)	3.21, 7	4.67, 28	5.03, 28	4.30, 27
Probe 2 (03-037.009621)	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
Probe 3 (03-037.009769)	0.12, 4	0.27, 6	0.33, 6	0.21, 4
Probe 4 (03-037.010228)	0.09, 3	0.36, 6	0.55, 6	0.18, 3
NEUROG1				
Probe 1 (05-134.898938)	10.36, 12	11.89, 26	11.21, 24	12.58, 26
Probe 2 (05-134.899244)	8.73, 12	9.32, 17	8.82, 17	9.82, 16
Probe 3 (05-134.899351)	7.85, 25	7.56, 11	7.27, 11	7.85, 11
Probe 4 (05-134.899479)	8.48, 12	9.27, 19	9.09, 19	9.45, 18
Probe 5 (05-134.899537)	10.03, 15	9.79, 14	9.61, 12	9.97, 14
Probe 6 (05-134.899663)	1.55, 7	3.09, 18	3.48, 18	2.70, 14
CDNK2A				
Probe 1 (09-021.964676)	1.42, 8	4.11, 25	4.42, 25	3.79, 22
Probe 2 (09-021.965200)	0.12, 4	0.92, 13	1.09, 13	0.76, 9
Probe 3 (09-021.984269)	0, 0	0.08, 5	0.15, 5	0, 0
Probe 4 (09-021.985277)	0, 0	0.23, 5	0.33, 5	0.12, 2
IGF2				
Probe 1 (11-002.117590)	5.70, 11	5.36, 8	5.39, 8	5.33, 8
Probe 2 (11-002.118681)	7.30, 9	8.58, 30	8.45, 29	8.70, 30
Probe 3 (11-002.118895)	16.97, 30	16.38, 26	16.18, 26	16.58, 23
SOCS1				
Probe 1 (16-011.256544)	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
Probe 2 (16-011.256960)	4.39, 8	6.23, 31	6.55, 31	5.90, 27

Probe 3 (16-011.257200)	0, 0	0.17, 5	0.33, 5	0, 0
Probe 4 (16-011.257552)	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0
CRABP1				
Probe 1 (15-076.419820)	1.48, 5	1.80, 7	1.61, 7	2, 6
Probe 2 (15-076.420033)	0.76, 3	2.21, 24	2.21, 24	2.21, 24
Probe 3 (15-076.420493)	8.67, 15	9.72, 30	9.61, 30	9.85, 27
Probe 4 (15-076.420701)	4.64, 8	4.58, 10	4.70, 10	4.45, 8
CACNA1G				
Probe 1 (17-045.993509)	0.12, 4	0.18, 5	0.36, 5	0, 0
Probe 2 (17-045.993745)	2.70, 11	3.30, 12	3.91, 12	2.70, 12
Probe 3 (17-045.993972)	1.06, 7	3.35, 27	3.70, 27	3, 23

Η θετικότητα ως προς τη μεθυλίωση διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας και υγιών ατόμων στα γονίδια RUNX3 και CDNK2A (chi-square test, $p=0.017$ και $p=0.032$, αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη θετικότητα για μεθυλίωση και ως προς τα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ ασθενών σε έξαρση και ασθενών σε ύφεση της νόσου.

Όσον αφορά τα επίπεδα της μέγιστης μεθυλίωσης, η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι το γονίδιο RUNX3 ήταν σημαντικά πιο μεθυλιωμένο στους ασθενείς, σε σχέση με τους υγιείς (μέση μέγιστη μεθυλίωση, αντίστοιχα: 2.83% έναντι 0.88%, $p=0.021$). Ομοίως, για το γονίδιο CDNK2A, η μέγιστη μεθυλίωση ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων (μέση μέγιστη μεθυλίωση, αντίστοιχα: 4.11% έναντι 1.42%, $p=0.01$). Τα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου CDNK2A διέφεραν επίσης μεταξύ υγιών ατόμων, ασθενών σε ύφεση και ασθενών σε έξαρση, όταν πραγματοποιήθηκε τεστ ANOVA ($p=0.033$). Ωστόσο, σύμφωνα με ανάλυση post-hoc, αυτή η διαφορά προέκυψε από τη διαφορά μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών σε έξαρση ($p=0.039$). Η ανάλυση με καμπύλη ROC αποκάλυψε ότι το μέγιστο επίπεδο μεθυλίωσης του γονιδίου RUNX3 θα μπορούσε να διακρίνει ους υγιείς από τους ασθενείς ($p=0.036$, περιοχή κάτω από την καμπύλη=63%), με καταλληλότερο σημείο cut-off στο 2%. Χρησιμοποιώντας αυτό το σημείο ως cut-off, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών και ασθενών (OR:3.316, CI:1.207-9.107, $p=0.024$). Επιπλέον, το μέγιστο επίπεδο μεθυλίωσης του CDNK2A μπορεί επίσης να διαχωρίσει τους υγιείς από τους ασθενείς επαρκώς ($p=0.005$, περιοχή κάτω από την καμπύλη=67.5%), με καταλληλότερο σημείο cut-off στο 3%. Χρησιμοποιώντας αυτό το σημείο ως cut-off, παρατηρήθηκε, επίσης, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων του δείγματος που προαναφέρθηκαν (OR: 3.077.CI: 1.281-7.39, $p=0.018$).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια (MLH1, NEUROG1, IGF2, GRABP1, SOCS1, CACNA1G), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα μέγιστα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ ασθενών σε ύφεση και ασθενών σε ύφεση της νόσου. Επιπλέον, ελέγχοντας τα μέγιστα επίπεδα μεθυλίωσης όλων των ασθενών σε κάθε γονίδιο, δεν παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ αυτών και της ηλικίας των ασθενών, του φύλου, της διάρκειας της νόσου και του βαθμού αναπηρίας της κλίμακας EDSS. Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις t-test, anova, post-hoc, roc και cross-tabs παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11.3**.

Πίνακας 11.3: Αναλύσεις T-test, ANOVA, ROC και crosstabs συγκρίνοντας τα μέγιστα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας και υγιών ατόμων

	t-test	ANO VA	post- hoc	ROC	Cross Tabulation				
	p- value	p- value	p-value	Περιοχή κάτω απ' την καμπύλη	p-value	Cut-off	p-value	risk	95%CI
RUNX3	0.021	0.061		0.63	0.036	1.5	0.024	3.316	1.207-9.107
MLH1	0.153	0.287		0.557	0.355				
NEUROG 1	0.123	0.115		0.584	0.177				
CDKN2A	0.01	0.033	0.039*	0.675	0.005	2.5	0.018	0.007	1.281-7.39
IGF2	0.068 5	0.681		0.44	0.335				
GRABP1	0.254	0.51		0.485	0.806				
SOCS1	0.75	0.177 8		0.632	0.033	4.5	0.088		
CACNA1 G	0.108	0.17		0.572	0.245				

Οι στατιστικά σημαντικές τιμές παρουσιάζονται με έντονα γράμματα

*Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα από την ANOVA μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών σε έξαρση παρατηρήθηκαν επίσης με post hoc ανάλυση

12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιγενετική έχει προταθεί ότι είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των γονιδίων, των περιβαλλοντικών παραγόντων και του κινδύνου ανάπτυξης πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας [1]. Οι μελέτες πάνω στη μεθυλίωση του DNA στη συγκεκριμένη νόσο, παρ' ότι είναι σχετικά λίγες και ορισμένες με ασύμφωνα αποτελέσματα, έχουν αποκαλύψει σημαντικούς γενετικούς τόπους, οι οποίοι δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με τη νόσο [65].

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων RUNX3 και CDNK2A διέφεραν σημαντικά μεταξύ των υγιών και των ασθενών αλλά όχι μεταξύ ασθενών σε ύφεση και σε έξαρση. Επιπλέον, τα επίπεδα μεθυλίωσης των γονιδίων RUNX3 και CDNK2A μπορούν να διακρίνουν τους υγιείς από τους ασθενείς. Με σημείο cut-off στο 2% για το γονίδιο RUNX3, ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου είναι 3.316, ενώ με σημείο cut-off στο 3% για το γονίδιο CDNK2A, ο αντίστοιχος σχετικός κίνδυνος είναι 3.077.

Το γονίδιο RUNX3 βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα 1. Κωδικοποιεί τον Runt-σχετιζόμενο μεταγραφικό παράγοντα 3 και λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Συνήθως, παρατηρείται αποσιώπηση της έκφρασής του ή διαγραφή του γονιδίου στον καρκίνο. Ρυθμίζει πολλά μοριακά μονοπάτια, τα καλύτερα χαρακτηρισμένα εκ των οποίων είναι το Wnt/Hedgehog/Notch and και το μονοπάτι διαφοροποίησης της κυτταρικής σειράς των δενδριτικών κυττάρων [66]. Το γονίδιο RUNX3 εκφράζεται, κυρίως, στα Τ λεμφοκύτταρα και στα κύτταρα NK [67]. Στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, ο μεταγραφικός παράγοντας RUNX3 έχει υποδειχτεί ότι ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των CD4+/CD8+ Τ λεμφοκυττάρων και η απορρυθμισμένη έκφρασή του στα λεμφοκύτταρα υποτίθεται ότι προδιαθέτει για τη νόσο. Ο πολυμορφισμός rs11129295 του γονιδίου EOMES, το οποίο ανήκει στους 110 γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την εμφάνιση πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας και δεν ανήκουν στα μόρια MHC, βρίσκεται πολύ κοντά στο γονίδιο RUNX3 κι έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη μεταγραφή του. Ο Parnell και οι συνεργάτες του έχουν παρατηρήσει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο υποεκφράζεται στους ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση [68]. Ωστόσο, στη δική μας μελέτη, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη θετικότητα ως προς τη μεθυλίωση και υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης στους ασθενείς απ' ότι στους υγιείς.

Το γονίδιο CDNK2A (αναστολέας 2A της κινάσης εξαρτώμενος από κυκλίνη) βρίσκεται πάνω στο χρωμόσωμα 9. Κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες, την p16 και την p14arf, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και λειτουργούν ως καταστολείς των όγκων. Η πρώτη πρωτεΐνη αναστέλλει τη λειτουργία των κινασών CDK4 και CDK6, ενώ η δεύτερη ενεργοποιεί την

ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 [69]. Η υπερέκφραση του p53 έχει παρατηρηθεί ότι επάγει την απόπτωση των ολιγοδενδροκυττάρων σε ενεργείς εστίες, στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [70]. Μια μελέτη έδειξε, ακόμη, ότι το γονίδιο CDKN2B, το οποίο είναι προσκείμενο στο CDKN2A, ήταν το πιο διαφοροποιημένο, ως προς τη μεθυλίωσή του μεταξύ ασθενών σε ύφεση της πολλαπλής σκλήρυνσης και υγιών ατόμων. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του εν λόγω γονιδίου προάγει την αναστολή της ανάπτυξης, μέσω του μηχανισμού της ογκοκαταστολής της κυτταρικής γήρανσης. Μελέτες σε όλα τα είδη θηλαστικών έχουν δείξει αυξημένη έκφραση του γονιδίου CDKN2A με τη γήρανση [62].

Όσον αφορά τα υπόλοιπα γονίδια, για τα οποία δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα πρότυπα μεθυλίωσής τους, τόσο μεταξύ ασθενών και υγιών όσο και μεταξύ ασθενών σε ύφεση και ασθενών σε έξαρση, έχουν βρεθεί τα εξής, σχετικά με τη λειτουργία τους και τον πιθανό τρόπο δράσης τους στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας:

Το γονίδιο MLH1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3. Κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη επιδιόρθωσης αταίριαστου ζευγαρώματος Mlh1. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη είναι μέλος των επτά πρωτεϊνών αταίριαστου ζευγαρώματος βάσεων του DNA (MMRs). Οι πρωτεΐνες αυτές συντονίζονται σε διαδοχικά στάδια, για να ξεκινήσουν την επιδιόρθωση των αταίριαστων νουκλεοτιδίων στο ανθρώπινο DNA. Τα ετεροδιμερή αυτού του γονιδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση της DNA πολυμεράσης III, στη σηματοδότηση της καταστροφής του DNA, στη μείωση και στην απάντηση στο στρες [71]. Μελέτες πάνω σε ενεργές βλάβες προκαλούμενες από την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας έχουν δείξει κυρίαρχη καταστροφή μιτοχονδριακού DNA, προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA στην ανάπτυξη της νόσου [63]. Περεταίρω μελέτη έδειξε διαφορετική έκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης σε βλάβες και στα λεμφοκύτταρα των σθενών, σε σχέση με υγιείς ιστούς [72].

Το γονίδιο NEUROG1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5. Κωδικοποιεί τη Νευρογενίνη 1, η οποία δρα ως ρυθμιστής της μεταγραφής, μέσω της πρόσδεσής της στο E-box (5'-CANNTG-3'). Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται, επίσης, στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης των νευρώνων και στην έκφραση βασικών ρυθμιστών της μεταγραφής, κατά τη νευρογένεση. Όταν η Νευρογενίνη 1 εκφράζεται σε εμβρυικό νευρικό ιστό, η γλοιογένεση αναστέλλεται, λόγω της πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο σύμπλεγμα συνενεργοποίησης της μεταγραφής CBP/p300/Smad1, αποτρέποντάς το από την πρόσδεσή του στο μεταγραφικό παράγοντα STAT1/3. Το γονίδιο NEUROG1 σχετίζεται με σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την πλειοδυναμία των βλαστοκυττάρων και το δίκτυο ρύθμισης της μεταγραφής των εμβρυικών βλαστοκυττάρων [73]. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, η νευρογένεση και η γλοιογένεση συμβαίνουν ως μια έμφυτη διαδικασία αυτό-επισκευής. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία δεν επιτυγχάνεται εξ ολοκλήρου και για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως προέκυψε από το

εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ασθενών με πρωτοπαθώς προϊούσα πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας [74].

Το γονίδιο IGF-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11. Κωδικοποιεί τον ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα 2 (IGF-2), μια πεπτιδική ορμόνη, όμοια στη δομή με την ινσουλίνη. Μόνο το πατρικό αντίγραφο αυτού του γονιδίου εκφράζεται στους ανθρώπους, ενώ το μητρικό αντίγραφο υποβάλλεται σε μεθυλίωση, ώστε να αποσιωπηθεί. Το γονίδιο αυτό σχετίζεται με μοριακά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την p70S6K σηματοδότηση και την ενδοχόνδρια οστεοποίηση [60]. Ο Mohan και οι συνεργάτες του επέδειξαν τη σημαντικότητα του IGF-2 στη διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων και στη επαναμυελίνωση, στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας. Παρατήρησαν ότι το γονίδιο IGF-2 υπερεκφραζόταν σε χρόνιες, απομυελινωμένες, ανενεργές βλάβες, οι οποίες αποτύγχαναν στην επαναμυελίνωσή τους [75]. Το επίπεδο μεθυλίωσης του γονιδίου IGF-2 επηρεάζεται από το προσκείμενο επαναλαμβανόμενο στοιχείο LINE-1, το οποίο είναι υπομεθυλιωμένο σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κι έχει, επίσης, συσχετιστεί με χαμηλότερους βαθμούς EDSS [58,76].

Το γονίδιο SOCS1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16. Κωδικοποιεί τον καταστολέα 1 της σηματοδότησης των κυτταροκινών (SOCS1), μια πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας SOCS. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι επαγόμενες από κυτταροκίνες και λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των κυτταροκινών, μέσω του μονοπατιού των JAK-STAT κινασών. Το γονίδιο SOCS1 ρυθμίζει, επίσης, την επιβίωση των αισθητήριων νευρώνων που μεσολαβείται από ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και είναι αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού σηματοδότησης του IGF-1 υποδοχέα [77]. Συνεπώς, ο ρόλος του SOCS1 στην αυτοανοσία είναι καίριας σημασίας. Το γονίδιο, αυτό, έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με πολλαπλή και υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας και έχει στοχοποιηθεί ως προδιαθεσικός παράγοντας για τη νόσο [78].

Το γονίδιο CACNA1G βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί το κανάλι ασβεστίου, εξαρτώμενο από τάση, T τύπου, άλφα 1G υπομονάδας (ή Cav3.1), το οποίο είναι ένα κανάλι ασβεστίου, ενεργοποιούμενο από χαμηλή τάση. Αυτό το κανάλι, ρυθμίζει πολλές διαδικασίες εξαρτώμενες από ασβέστιο, όπως είναι η μυϊκή συστολή, η έκκριση ορμονών και νευροδιαβιβαστών, η γονιδιακή έκφραση, ο κυτταρικός κύκλος και η κυτταρική κινητικότητα. Η είσοδος ασβεστίου, μέσω ιοντικών καναλιών (store-operated) και T κυτταρικών υποδοχέων διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων [79]. Πρόσφατες μελέτες σε μοντέλα ποντικών έχει αποκαλύψει μια πρόσθετη είσοδο για το ασβέστιο μέσα στα T λεμφοκύτταρα, μέσω του καναλιού ασβεστίου Cav3.1. Ποντίκια με έλλειψη Cav3.1 ήταν ανθεκτικά στην επαγόμενη αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα και παρήγαγαν μειωμένο παράγοντα GM-CSF από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα 1 και 17. Η πυρηνική μετατόπιση του παράγοντα NFAT ήταν,

επίσης, μειωμένη σ' αυτά τα ποντίκια, υποδεικνύοντας μια πιθανή συσχέτιση των καναλιών ασβεστίου τύπου T με την αυτοανοσιακή απόκριση [80].

Το γονίδιο CRABP1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη πρόσδεσης ρετινοϊκού οξέος 1, η οποία είναι μια πρωτεΐνη μεταφορέας που προσδένεται μόνο στο ρετινοϊκό οξύ. Η πρωτεΐνη CRABP1 ρυθμίζει τις διαδικασίες διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού που διαμεσολαβούνται από το ρετινοϊκό οξύ [61]. Ο Mizee και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, ενεργοποιημένα αστροκύτταρα αντιδρούν στη φλεγμονή των νευρών, παράγοντας ρετινοϊκό οξύ, το οποίο προστατεύει τη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και εξασθενεί την επίδραση του οξειδωτικού στρες στη φλεγμονή των ενδοθηλιακών κυττάρων [81].

Η μεθυλίωση δεν έχει ακόμη καθιερωθεί ως βιοδείκτης για την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας, καθώς οι μελέτες τόσο συγκεκριμένων γονιδίων όσο και ολόκληρου του γονιδιώματος, έχουν καταλήξει σε ποικίλα αλλά και ασύμφωνα μεταξύ τους αποτελέσματα [82]. Είναι πλέον ξεκάθαρο, ότι η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση αλλά παραμένει ασαφές, σε ποιο επίπεδο ή πόσες θέσεις θα πρέπει να μεθυλιώνονται, ώστε να καταστέλλεται η έκφραση ενός γονιδίου. Επίσης, δεδομένου ότι υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες μέθοδοι, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο ποια τεχνική είναι η καταλληλότερη, για να ανιχνεύσει την ανώμαλη μεθυλίωση [83]. Ακόμη, τα σημεία cut-off θα πρέπει να τίθενται και να αξιολογούνται με προσοχή, έτσι ώστε να είναι ενδεικτικά της ανώμαλης μεθυλίωσης και ταυτόχρονα να διαχωρίζουν τους ασθενείς από τους υγιείς.

Συνοψίζοντας, η μελέτη μας υποδεικνύει ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων RUNX3 και CDNK2A ίσως μπορούν να διακρίνουν υγιή άτομα από ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Ωστόσο, περεταίρω μελέτη, με μεγαλύτερα δείγματα και σε περισσότερους γενετικούς τόπους εγγυάται να διευκρινίσει εάν αυτά τα πρότυπα μεθυλίωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικοί τοποειδικοί βιοδείκτες, για την πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*. 2010;9(7):727-39.
2. Sokratous M, Dardiotis E, Tsouris Z, Bellou E, Michalopoulou A, Siokas V, et al. Deciphering the role of DNA methylation in multiple sclerosis: emerging issues. *Auto- immunity highlights*. 2016;7(1):12.
3. Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *The Keio journal of medicine*. 2011;60(1):10-6.
4. Gonzalo S. Epigenetic alterations in aging. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2010;109(2):586-97.
5. Weber M, Schubeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(3):273-80.
6. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(2):89-97.
7. Hilven K, Goris A. Genetic burden mirrors epidemiology of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2015;21(11):1353-4.
8. Lill CM. Recent Advances and Future Challenges in the Genetics of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*. 2014;5:130.
9. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Bronnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2005;11(5):504-10.
10. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
11. Bos SD, Page CM, Andreassen BK, Elboudwarej E, Gustavsen MW, Briggs F, et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PloS one*. 2015;10(3):e0117403.
12. Huynh JL, Garg P, Thin TH, Yoo S, Dutta R, Trapp BD, et al. Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nature neuroscience*. 2014;17(1):121-30.
13. Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):700-9.

14. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA. Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(9):2006-16.
15. Longo DL, Harrison TR. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill; 2012.
16. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England). 2002;359(9313):1221-31.
17. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69(2):292-302.
19. Hafler DA. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(6):788-94.
20. Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA. Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10):4588-92.
21. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain research bulletin*. 2003;61(3):321-6.
22. Miyazaki Y, Niino M. Epigenetics in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2015;6:49-58.
23. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004;431(7006):338-42.
24. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
25. Koturbash I, Beland FA, Pogribny IP. Role of epigenetic events in chemical carcinogenesis--a justification for incorporating epigenetic evaluations in cancer risk assessment. *Toxicology mechanisms and methods*. 2011;21(4):289-97.
26. Sun B, Hu L, Luo ZY, Chen XP, Zhou HH, Zhang W. DNA methylation perspectives in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2016;164:21-7.
27. Wu H, Zhao M, Tan L, Lu Q. The key culprit in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: Aberrant DNA methylation. *Autoimmunity reviews*. 2016;15(7):684-9.
28. Lawson HA, Cheverud JM, Wolf JB. Genomic imprinting and parent-of-origin effects on complex traits. *Nature reviews Genetics*. 2013;14(9):609-17.
29. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(3):268-77.

30. Pereira F, Barbachano A, Singh PK, Campbell MJ, Munoz A, Larriba MJ. Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2012;11(6):1081-9.
31. Poorolajal J, Bahrami M, Karami M, Hooshmand E. Effect of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of public health (Oxford, England)*. 2016.
32. Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *American journal of human genetics*. 2011;88(4):450-7.
33. Niller HH, Wolf H, Minarovits J. Epigenetic dysregulation of the host cell genome in Epstein-Barr virus-associated neoplasia. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(3):158-64.
34. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2010;39(1):51-61.
35. Churov AV, Oleinik EK, Knip M. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: altered expression and diagnostic potential. *Autoimmunity reviews*. 2015;14(11):1029-37.
36. Rauniyar VK, Wu W, Yang H. MicroRNAs in autoimmune disease. *Autoimmunity Highlights*. 2011;2(2):59-65.
37. Koch MW, Metz LM, Kovalchuk O. Epigenetics and miRNAs in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(1):23-30.
38. Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(9):3642-7.
39. Levenson VV, Melnikov AA. DNA Methylation as Clinically Useful Biomarkers—Light at the End of the Tunnel. *Pharmaceuticals*. 2012;5(1):94.
40. Li X, Xiao B, Chen XS. DNA Methylation: a New Player in Multiple Sclerosis. *Molecular neurobiology*. 2016.
41. Wood DD, Ackerley CA, Brand B, Zhang L, Raijmakers R, Mastronardi FG, et al. Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88(4):354-64.
42. Mastronardi FG, Moscarello MA. Molecules affecting myelin stability: a novel hypothesis regarding the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research*. 2005;80(3):301-8.

43. Calabrese R, Zampieri M, Mechelli R, Annibali V, Guastafierro T, Ciccarone F, et al. Methylation-dependent PAD2 upregulation in multiple sclerosis peripheral blood. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2012;18(3):299-304.
44. Morris AC, Spangler WE, Boss JM. Methylation of class II trans-activator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2000;164(8):4143-9.
45. Ramagopalan SV, Dyment DA, Morrison KM, Herrera BM, Deluca GC, Lincoln MR, et al. Methylation of class II transactivator gene promoter IV is not associated with susceptibility to multiple sclerosis. *BMC medical genetics*. 2008;9:63.
46. Handel AE, De Luca GC, Morahan J, Handunnetthi L, Sadovnick AD, Ebers GC, et al. No evidence for an effect of DNA methylation on multiple sclerosis severity at HLA-DRB1*15 or HLA-DRB5. *Journal of neuroimmunology*. 2010;223(1-2):120-3.
47. Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*. 2010;464(7293):1351-6.
48. Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, et al. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2010;290(1-2):16-21.
49. Janson PC, Linton LB, Bergman EA, Marits P, Eberhardson M, Piehl F, et al. Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2011;186(1):92-102.
50. Kumagai C, Kalman B, Middleton FA, Vyshkina T, Massa PT. Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects. *Journal of neuroimmunology*. 2012;246(1-2):51-7.
51. Nakase K, Cheng J, Zhu Q, Marasco WA. Mechanisms of SHP-1 P2 promoter regulation in hematopoietic cells and its silencing in HTLV-1-transformed T cells. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85(1):165-74.
52. Graves MC, Benton M, Lea RA, Boyle M, Tajouri L, Macartney-Coxson D, et al. Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4+ T-Cells are associated with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2014;20(8):1033-41.
53. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, Ricigliano VA, et al. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(7):1130-6.

54. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(41):35334-8.
55. Fagone P, Mangano K, Di Marco R, Touil-Boukoffa C, Chikovan T, Signorelli S, et al. Expression of DNA methylation genes in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2016;290:66-9.
56. Patsopoulos NA, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Annals of neurology*. 2011;70(6):897-912.
57. Maltby VE, Graves MC, Lea RA, Benton MC, Sanders KA, Tajouri L, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CD8+ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4+ T cells in multiple sclerosis patients. *Clinical Epigenetics*. 2015;7:118.
58. Neven KY, Piola M, Angelici L, Cortini F, Fenoglio C, Galimberti D, et al. Repetitive element hypermethylation in multiple sclerosis patients. *BMC genetics*. 2016;17(1):84.
59. Bollati V, Galimberti D, Pergoli L, Dalla Valle E, Barretta F, Cortini F, et al. DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(6):1078-83.
60. de Pagter-Holthuizen P, Jansen M, van der Kammen RA, van Schaik FM, Sussenbach JS. Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. *Biochimica et biophysica acta*. 1988;950(3):282-95.
61. Flagiello D, Apiou F, Gibaud A, Poupon MF, Dutrillaux B, Malfoy B. Assignment of the genes for cellular retinoic acid binding protein 1 (CRABP1) and 2 (CRABP2) to human chromosome band 15q24 and 1q21.3, respectively, by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics*. 1997;76(1-2):17-8.
62. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(9):1299-307.
63. Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2000;177(2):95-103.
64. Dardiotis E, Siokas V, Zafeiridis T, Paterakis K, Tsivgoulis G, Dardioti M, et al. Integrins AV and B8 Gene Polymorphisms and Risk for Intracerebral Hemorrhage in Greek and Polish Populations. *NeuroMolecular Medicine*. 2016:1-12.

65. Maltby VE, Graves MC, Lea RA, Benton MC, Sanders KA, Tajouri L, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CD8⁺ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4⁺ T cells in multiple sclerosis patients. *Clinical epigenetics*. 2015;7:118.
66. Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*. 1994;23(2):425-32.
67. Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y, Milner JD, et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(5):1276-87.
68. Parnell GP, Gatt PN, Krupa M, Nickles D, McKay FC, Schibeci SD, et al. The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2014;151(1):16-24.
69. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368(6473):753-6.
70. Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Bruck W, Massie B, Nalbantoglu J. Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *Journal of neurochemistry*. 2003;85(3):635-44.
71. Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjold M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet*. 1993;5(3):279-82.
72. Briggs FB, Goldstein BA, McCauley JL, Zuvich RL, De Jager PL, Rioux JD, et al. Variation within DNA repair pathway genes and risk of multiple sclerosis. *American journal of epidemiology*. 2010;172(2):217-24.
73. Tamimi RM, Steingrimsson E, Montgomery-Dyer K, Copeland NG, Jenkins NA, Tapscott SJ. NEUROD2 and NEUROD3 genes map to human chromosomes 17q12 and 5q23-q31 and mouse chromosomes 11 and 13, respectively. *Genomics*. 1997;40(2):355-7.
74. Cristofanilli M, Cymring B, Lu A, Rosenthal H, Sadiq SA. Cerebrospinal fluid derived from progressive multiple sclerosis patients promotes neuronal and oligodendroglial differentiation of human neural precursor cells in vitro. *Neuroscience*. 2013;250:614-21.
75. Mohan H, Krumbholz M, Sharma R, Eisele S, Junker A, Sixt M, et al. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2010;20(5):966-75.
76. Ogino S, Lochhead P, Chan AT, Nishihara R, Cho E, Wolpin BM, et al. Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyze environment,

host, and disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(4):465-84.

77. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO Journal.* 1995;14(12):2816-26.

78. Pahlevan Kakhki M, Rakhshi N, Heidary M, Behmanesh M, Nikraves A. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) gene dramatically increases in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences.* 2015;350(1-2):40-5.

79. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, et al. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* 1998;391(6670):896-900.

80. Wang H, Zhang X, Xue L, Xing J, Jouvin MH, Putney JW, et al. Low-Voltage-Activated CaV3.1 Calcium Channels Shape T Helper Cell Cytokine Profiles. *Immunity.* 2016;44(4):782-94.

81. Mizee MR, Nijland PG, van der Pol SM, Drexhage JA, van Het Hof B, Mebius R, et al. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta neuropathologica.* 2014;128(5):691-703.

82. Levenson VV, Melnikov AA. DNA methylation as clinically useful biomarkers-light at the end of the tunnel. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland).* 2012;5(1):94-113.

83. Berg M, Hagland HR, Søreide K. Comparison of CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) Frequency in Colon Cancer Using Different Probe- and Gene-Specific Scoring Alternatives on Recommended Multi-Gene Panels. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e86657.

