

[Type here]



Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

«Ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τη σηματοδότηση των ιντερλευκινών, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση»

“SNPs association analysis on interleukin signaling genes on patients with Systemic Sclerosis”

Αθανασία Παπαδοπούλου | Λάρισα 2018

Τριμελής επιτροπή :

- Ζήσης Μαμούρης (επιβλέπων) : Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Θεολογία Σαραφίδου : Επίκ. Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μπόγδανος Δημήτριος : Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



[Type here]

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την τριμελή επιτροπή μου : τον κ. Ζήση Μαμούρη, την κα. Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Δημήτριο Μπόγδανο που μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την παρούσα μελέτη στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Π.Θ καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφεραν. Επίσης, τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Πλαγερά, για την συνεργασία, τις συμβουλές και όλα αυτά που μου έμαθε, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και βοήθεια.

[Type here]

Περίληψη : Η συστηματική σκλήρυνση (ή σκληρόδερμα) είναι μια πολύπλοκη διαταραχή που επηρεάζει τόσο το δέρμα όσο και άλλα συστήματα του οργανισμού, οδηγώντας, τελικά, στο θάνατο του πάσχοντος ατόμου. Πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, το οποίο προσβάλλει, ως επί το πλείστον, γυναίκες και σε μικρότερο βαθμό τους άντρες. Είναι μια αυτοάνοση διαταραχή, καθώς χαρακτηρίζεται, μεταξύ άλλων, και από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων, διαφορετικών για κάθε υπότυπο της νόσου. Έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα πολλές γενετικές μελέτες και σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες και έχουν εντοπιστεί διάφορες περιοχές του γονιδιώματος, «παραλλαγές» στις οποίες συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου. Αυτές οι «παραλλαγές» μπορεί να είναι ακόμη και ένα νουκλεοτίδιο (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), η παρουσία του οποίου να συμμετέχει στην εμφάνιση του σκληροδέρματος. Έτσι λοιπόν, στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκαν δυο SNPs σε γονιδιακούς τόπους όπου εδράζονται γονίδια του ανοσοποιητικού. Μελέτες σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς έχουν δείξει ότι η παρουσία των πολυμορφισμών αυτών συσχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου. Στόχος της εργασίας ήταν να αναλυθεί κατά πόσο συσχετίζονται ή όχι αυτά τα δυο SNPs με τη νόσο, στον ελληνικό πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν μια ομάδα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και μια ομάδα υγιών ατόμων ελέγχου, στις οποίες έγινε σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης των παραπάνω γονοτύπων. Τα αποτελέσματα της παραπάνω ανάλυσης δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση του SNP στο γονίδιο της IRAK-1, ούτε στο γονίδιο της ιντερλευκίνης 10, στους ασθενείς υπό μελέτη.

Abstract : Systemic sclerosis (or scleroderma) is a complex disorder that affects both the skin and other organs and systems of the body, leading to death. This is a multifactorial disease, which mostly affects women. It is an autoimmune disorder, as long as it is characterized, among other things, by the production of autoantibodies, different for each subtype of the disease. Many genetic studies have been carried out in different population groups and various genome regions have been identified, "variants" in which they contribute to the onset of the disease. These "variants" may even be a single nucleotide (SNP), the presence of which is involved in the appearance of scleroderma. In this paper, we investigated two SNPs in genes with important role for immune system. Studies in European populations have shown that the presence of these polymorphisms is correlated with the onset of the disease. The aim of the work was to analyze whether or not these two SNPs are associated with the disease in the Greek population. For this purpose a group of patients with systemic sclerosis and a group of healthy control subjects were analyzed, in which the frequency of occurrence of the above genotypes was compared. The results of the analysis prove no statistically significant association between these two SNPs and the disease.

[Type here]

Περιεχόμενα :

1. Εισαγωγή

- 1.1. Γενικά στοιχεία για τη νόσο
- 1.2. Παθοφυσιολογία της νόσου
- 1.3. Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος
- 1.4. Ο ρόλος της IRAK1
- 1.5. Ο ρόλος της ιντερλευκίνης 10
- 1.6. Γενετικές μελέτες
- 1.6.α) Προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου
- 1.6.β) GWAS ανάλυση
- 1.7. Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

2. Πειραματικό μέρος (υλικά και μέθοδοι)

- 2.1. Συλλογή δειγμάτων – Απομόνωση DNA
- 2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη
- 2.4. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) :
Single-strand conformation polymorphism
- 2.5. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

- 3.1. Απομόνωση DNA
- 3.2. και 3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη
- 3.4. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) :
Single-strand conformation polymorphism
- 3.5. και 3.6. Αλληλούχηση προϊόντων PCR και Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης :

4. Βιβλιογραφία

[Type here]

Εισαγωγή :

1.1. Γενικά στοιχεία για τη νόσο

Η συστηματική σκλήρυνση ή, αλλιώς, σκληρόδερμα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή η οποία προσβάλλει τόσο το δέρμα, όσο και τα εσωτερικά όργανα. Πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα καθώς έχει δειχθεί ότι η εκδήλωση της νόσου προϋποθέτει την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε ένα κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο. Η σοβαρότητά της νόσου διαφέρει από ασθενή σε ασθενή και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εξελιχθεί ταχύτατα και να οδηγήσει στο θάνατο του πάσχοντος ατόμου, συνήθως λόγω εμφάνισης επιπλοκών από το αναπνευστικό. Συχνά κατά την κλινική πορεία της νόσου παρατηρούνται επιπλοκές σε διάφορα συστήματα του οργανισμού, κυρίως το αγγειακό και το ανοσοποιητικό σύστημα.[1], [2], [3], [4]

Για παράδειγμα, συχνά εντοπίζεται αγγειοπάθεια στους ασθενείς με σκληρόδερμα. Επίσης, μια από τις πιο κοινές εκδηλώσεις προσβολής του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η παρουσία ανώμαλων επιπέδων αυτοαντισωμάτων, όπως αντισώματα ενάντια στον πυρήνα των κυττάρων (αντι-πυρηνικά αντισώματα ή “ANA”) που εμφανίζονται σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Σχεδόν όλα τα άτομα με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν επιπλοκές στο δέρμα, όπως ουλές, πρησμένο, σφιχτό ή σκληρό δέρμα στα δάχτυλά τους. Επιπλέον, πολλοί έχουν πρησμένο ή/και σκληρό δέρμα σε άλλα σημεία του σώματος, ιδιαίτερα το πρόσωπο και τα χέρια. Ιδιαίτερα ως προς το πρόσωπο είναι χαρακτηριστική η ανάπτυξη του “ σκληροδερματικού προσωπείου”.

Παρά την φαινοτυπική ετερογένεια, η γενετική συμβολή στην ανάπτυξη του σκληροδέρματος υποστηρίζεται από την αυξημένη αναλογία κινδύνου υποτροπής του αδελφού (risk ratio) μεταξύ των ασθενών με σκληρόδερμα και του υψηλότερου βαθμού συσχέτισης για την παρουσία αντιπυρηνικών αυτοαντισωμάτων σε μονοζυγωτικά από ότι σε διζυγωτικά δίδυμα. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι υπάρχει γενετική συνιστώσα όσον αφορά την προδιάθεση για συστηματική σκλήρυνση. Καθώς το νόσημα είναι πολυπαραγοντικό, η «συνεισφορά» του κάθε γονιδιακού τόπου είναι πολύ μικρή και απαιτείται ο συνδυασμός πολλών γονιδιακών και μη παραγόντων για την εκδήλωσή του. Αυτό με άλλα λόγια σημαίνει πως εάν ένα άτομο φέρει μια παραλλαγή που έχει συσχετιστεί με τη συστηματική σκλήρυνση δε σημαίνει απαραίτητα πως θα νοσήσει. [10], [11]

Κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της νόσου παίζει το κολλαγόνο, μια από τις πιο θεμελιώδεις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού. Για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί, η κανονική πρωτεΐνη του κολλαγόνου αποτίθεται στο

[Type here]

δέρμα των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση σε υψηλότερες ποσότητες από ότι στο δέρμα των ατόμων που δεν πάσχουν. Αυτή η διαδικασία ευθύνεται για την προοδευτική ίνωση και σκλήρυνση του δέρματος. Σε ορισμένα άτομα, η απόθεση αυτή του κολλαγόνου περιορίζεται στο πρόσωπο ή τα χέρια. Σε άλλα μπορεί να επεκτείνεται σε διάφορες περιοχές κατά μήκος του σώματος. Για το λόγο αυτό, οι ασθενείς με σκληρόδερμα ταξινομούνται σε δύο επιπλέον υποομάδες με βάση την έκταση των βλαβών του δέρματος. Αυτές οι υποομάδες είναι το διάχυτο δερματικό (“diffuse cutaneous”) σκληρόδερμα και περιορισμένο δερματικό (“limited cutaneous”) σκληρόδερμα. **[4]**

Στην περίπτωση του διάχυτου δερματικού σκληροδέρματος η εξάπλωση της νόσου στις διάφορες περιοχές του σώματος συχνά πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα (εβδομάδες έως μήνες). Σε αυτή τη μορφή της, η νόσος συχνά χαρακτηρίζεται από : αντισώματα ενάντια στην τοποϊσομεράση I (ένζυμο που διατηρεί «ξετυλιγμένο» το μόριο του DNA και συμμετέχει στη μεταγραφή και το διπλασιασμό του) και την RNA πολυμεράση (ένζυμο που συμμετέχει στη μεταγραφή του DNA). Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε αυξημένη προδιάθεση για σοβαρή πνευμονική ίνωση και εκδήλωση της ασθένειας σε νεαρότερη ηλικία. **[7]**

Στα άτομα με την περιορισμένη μορφή της νόσου η πάχυνση του δέρματος αναπτύσσεται συνήθως σταδιακά (μήνες και χρόνια) και είναι σχετικά διακριτική. Οι αλλαγές στο δέρμα είναι συνήθως ελάχιστες, ακόμα και σε ασθενείς που έχουν εκδηλώσει τη νόσο εδώ και πολλά χρόνια. Ο υπότυπος αυτός χαρακτηρίζεται γενικά από : αντισώματα ενάντια στα κεντρομερή των χρωσωμάτων και πνευμονική υπέρταση, αλλά γενικά συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τον διάχυτο υπότυπο. **[9]**

Ένας τρίτος υπότυπος της νόσου, που είναι πιο σπάνιος σε σχέση με τους άλλους δυο, είναι το sine σκληρόδερμα. Αυτό χαρακτηρίζεται από μερική ή ολική απουσία δερματικών αλλοιώσεων, αλλά παραγωγή αυτοαντισωμάτων και επιπλοκές στα εσωτερικά όργανα. **[3]**

Παρά τις διαφορές τους, οι δυο βασικοί υπότυποι της νόσου μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά όπως :

- Το φαινόμενο Raynaud : Αυτό συμβαίνει περίπου στο 90 % των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Είναι μια κατάσταση που προκαλεί αποχρωματισμό των δακτύλων ή και των δακτύλων μετά από έκθεση σε αλλαγές θερμοκρασίας. Ο αποχρωματισμός του δέρματος συμβαίνει επειδή ένας μη φυσιολογικός σπασμός των αιμοφόρων αγγείων προκαλεί μειωμένη παροχή αίματος στους τοπικούς ιστούς.

[Type here]

- Προβλήματα στον οισοφάγο, ιδιαίτερα προβλήματα στην κατάποση τροφίμων.
- Οι πληγές του δέρματος είναι συχνές, κυρίως στα δάχτυλα. Μερικοί ασθενείς εμφανίζουν πληγές στο δέρμα του καρπού, των αγκώνων ή των αστραγάλων.
- Κοιλιακές συσπάσεις, πρήξιμο στην κοιλιακή χώρα, ιδιαίτερα μετά το φαγητό και προβλήματα στο γαστρεντερικό σύστημα με χαρακτηριστική τη προσβολή του οισοφάγου.
- Περίπου το 10-15% των ασθενών μπορεί να αναπτύξουν σοβαρή πνευμονική ίνωση, που οδηγεί σε δύσπνοια και τελικά θάνατο από ασφυξία.
- Περίπου το 10-20% των ασθενών μπορεί να εκδηλώσει πνευμονική υπέρταση, η οποία οφείλεται στην υψηλή πίεση του αίματος στις αρτηρίες που τροφοδοτούν τους πνεύμονες. **[2]**

Όσον αφορά τον επιπολασμό, δηλαδή τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, φαίνεται πως εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Για παράδειγμα, στη Βόρεια Ευρώπη και την Ιαπωνία έχουν παρατηρηθεί χαμηλές συχνότητες εμφάνισης της νόσου (< 10 ανά εκατομμύριο το χρόνο), σε σχέση με τη Νότια Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία (14-21 ανά εκατομμύριο το χρόνο). Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω, η πληθυσμιακή ομάδα στην οποία ανήκει το άτομο είναι ένας από τους παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση ευαισθησίας προς τη νόσο.

Ακόμα ένα επιχείρημα που υποστηρίζει την παραπάνω παρατήρηση είναι το γεγονός πως μελέτες σε Αφροαμερικάνους ασθενείς έδειξαν πως η συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα χαρακτηρίζεται από μικρότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου και μεγαλύτερη πιθανότητα να παράγουν αντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης I και επομένως, μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνιση διάχυτου σκληροδέρματος σε σχέση με ασθενείς που ανήκουν σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες. **[3]**

[Type here]

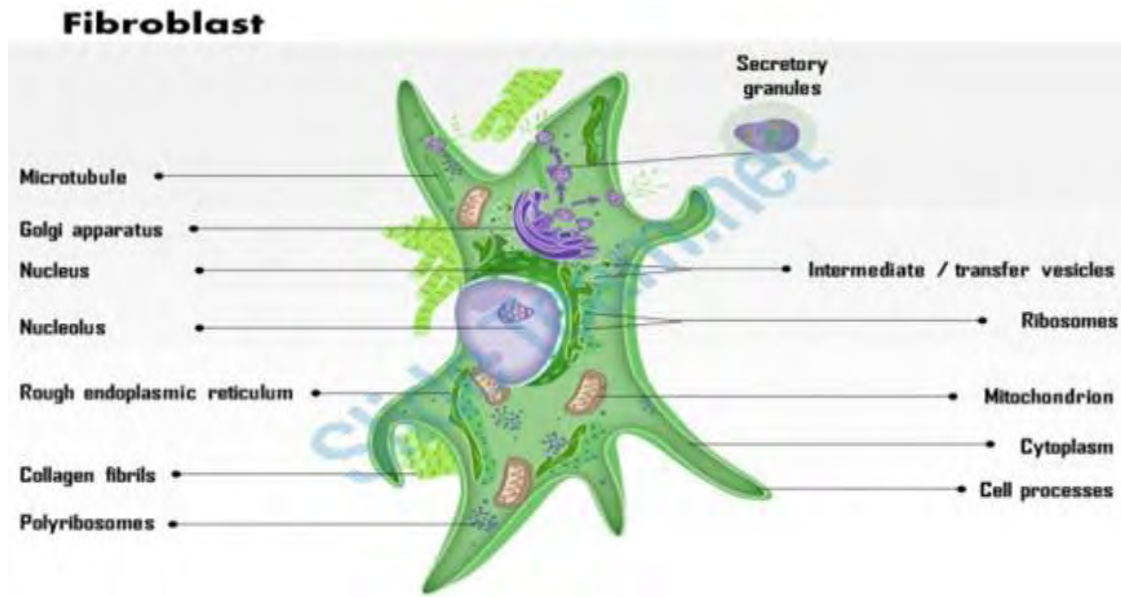
1.2. Παθοφυσιολογία της νόσου

Όσον αφορά τους μηχανισμούς παθογένειας της διαταραχής, κυρίαρχο ρόλο στην ίνωση φαίνεται πως κατέχουν οι ινοβλάστες. Οι ινοβλάστες είναι μεσεγχυματικά κύτταρα με ατρακτοειδές σχήμα (**Εικόνα 1**) και βρίσκονται διασκορπισμένοι σε ολόκληρο το σώμα. Αποτελούν θεμελιώδη «συστατικά» του συνδετικού ιστού. Μια πολύ βασική λειτουργία των ινοβλαστών είναι να διατηρούν την ομοιόσταση του ιστού μέσω της ρύθμισης τόσο της παραγωγής όσο και της διατήρησης των συστατικών της εξωκυτταρικής ουσίας (ECM) η οποία αναφέρεται παρακάτω. Επιπλέον, έχουν υποστηρικτικό ρόλο στις διαδικασίες της αγγειογένεσης, της φλεγμονής, της επούλωσης πληγών και άλλες. **[6]**

Όστόσο, σε περιπτώσεις υπερλειτουργίας των ινοβλαστών και επακόλουθης παραγωγής περίσσειας εξωκυτταρικής ουσίας, λόγω κάποιας παθολογικής κατάστασης, μπορεί να προκληθεί ίνωση στα διάφορα όργανα, όπως ο πνεύμονας ή το δέρμα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ίνωση αποτελεί ένα από τα βασικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τη συστηματική σκλήρυνση και για αυτό το λόγο τα γονίδια που σχετίζονται με τους ινοβλάστες και τις λειτουργίες τους, θεωρήθηκαν εξ αρχής ιδανικοί υποψήφιοι για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης της αιτιοπαθογένειας της νόσου.

Οι ινοβλάστες αναγνωρίζονται γενικά με συνδυασμό διάφορων δεικτών, καθώς δεν υπάρχει κανένας μοναδικός δείκτης που να χρησιμοποιείται με ακρίβεια για την ταυτοποίηση των ινοβλαστών. Σε μεγάλο βαθμό, οι ινοβλάστες εκφράζουν : βιμεντίνη, ειδική για ινοβλάστες πρωτεΐνη-1 (FSP), πρωτεΐνη θερμικού σοκ 47 (HSP47 σε δερματικούς ινοβλάστες), Thy1 / CD90 και προλυλ-4-υδροξυλάση β (σε ενεργοποιημένους ινοβλάστες) , ενώ μερικές επίσης εμφανίζουν δείκτες μεσεγχυματικών κυττάρων (CD9, CD39, CD44, CD105, κλπ.). **[8]**

[Type here]



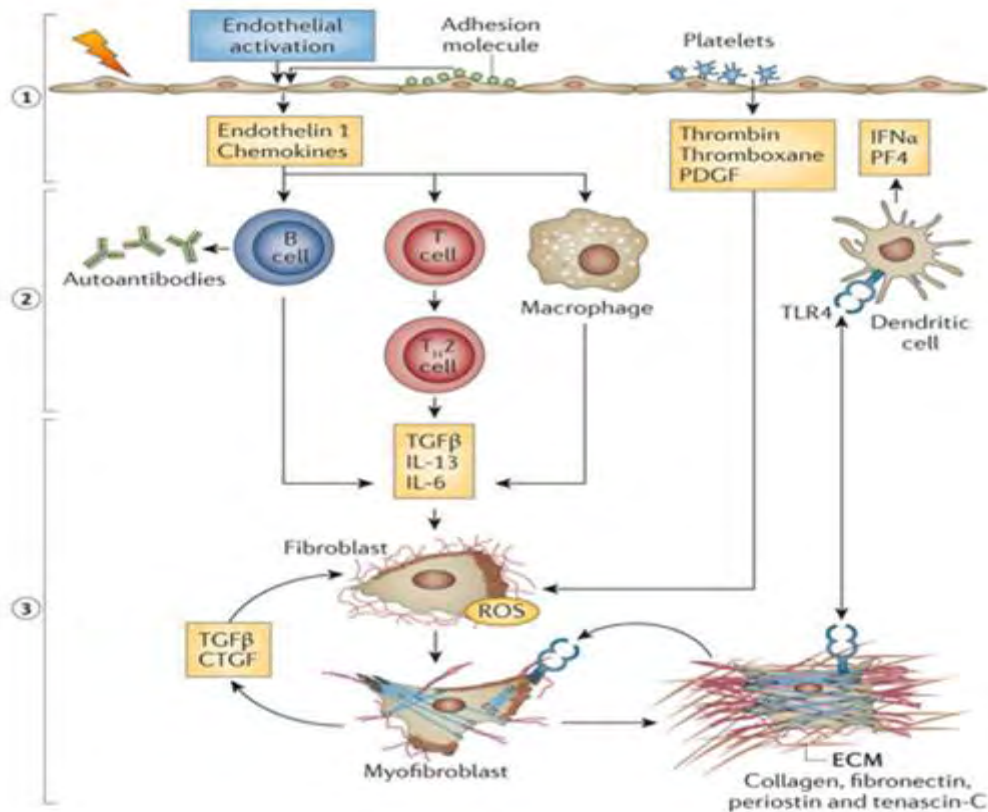
Εικόνα 1: Δομή ινοβλάστη. Πηγή : [5]

Κατά την εξέλιξη της διαταραχής λοιπόν, η ενεργοποίηση των ινοβλαστών και η ίνωση που χαρακτηρίζουν τη συστηματική σκλήρυνση ξεκινούν από την αγγειακή βλάβη που μπορεί να προκληθεί από διάφορα αίτια και την επακόλουθη ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, οδηγώντας σε μια ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση. Αναλυτικότερα :

Αρχικά, η απόκριση στον τραυματισμό του αγγείου συνίσταται σε : εκτεταμένη ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, παραγωγή ενδοθηλίνης 1 και χημειοκινών, δηλαδή μεσολαβητών της φλεγμονής, αυξημένη έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Σε δεύτερο στάδιο, ως απόκριση στις χημειοκίνες προσελκύνονται αρκετοί τύποι κυττάρων της φλεγμονής. Τα ενεργοποιημένα T- βοηθητικά λεμφοκύτταρα τύπου 2 (TH2) εκκρίνουν TGFβ (Transforming Growth Factor β), μέλος της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων και ιντερλευκίνη 13 (IL-13). Τα B κύτταρα παράγουν αυτοαντισώματα και IL-6 ενώ τα μακροφάγα απελευθερώνουν TGFβ. Για τα κύτταρα των ινοβλαστών ο TGFβ αποτελεί το κύριο σηματοδοτικό μόριο για την εκκίνηση της ίνωσης. Παράλληλα με αυτόν, τα δένδριτικά κύτταρα εκκρίνουν ιντερφερόνη-α (IFNα) και παράγοντα αιμοπεταλίου 4 (PF4). Ως απόκριση σε όλα τα παραπάνω «ερεθίσματα» οι ινοβλάστες παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) και διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι ευθύνονται για την παραγωγή υπερβολικής ποσότητας συστατικών της εξωκυτταρικής ουσίας (ECM). Ως εξωκυτταρική ουσία ορίζεται το σύνολο από εξωκυτταρικά μόρια (όπως οι ίνες κολλαγόνου) τα οποία εκκρίνονται από βοηθητικά κύτταρα και προσδίδουν δομική και βιοχημική στήριξη στα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα 4 τύπου Toll (TLR4) σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μυοϊνοβλάστες από την ECM ενισχύει

[Type here]

περαιτέρω αυτή την αντίδραση. Ο CTGF είναι ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού, ενώ ο PDGF είναι ο προερχόμενος από αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας. Ολόκληρη η διαδικασία συνοψίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2). [8]



Εικόνα 2 : Η πορεία της ανάπτυξης της ίνωσης στη συστηματική σκλήρυνση. Αρχικά παρατηρείται μια φλεγμονώδης φάση την οποία διαδέχεται η ίνωση του δέρματος και των εσωτερικών οργάνων. Τα (κύρια) είδη κυττάρων που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή είναι : ενδοθηλιακά, B- και T- λεμφοκύτταρα καθώς και ινοβλάστες. Η διαταραχή ξεκινά με την εμφάνιση ανωμαλιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία οδηγεί σε μικροαγγειακό τραύμα και κατ' επέκτασιν στην ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί στην προσκόλληση λευκοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος, τα οποία με τη σειρά τους προσελκύουν και ενεργοποιούν B- και T-λεμφοκύτταρα. Η έκκριση κυτοκινών, χημειοκινών και αυτοαντισωμάτων από τα κύτταρα αυτά έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ινοβλαστών, η οποία είναι υπεύθυνη για την ίνωση. [3] Πηγή : [5]

1.3. Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος

Η ανοσία, δηλαδή η προστασία από μολυσματικές ασθένειες, διαθέτει τόσο ειδικά όσο και μη ειδικά στοιχεία. Ο λιγότερο ειδικός «κλάδος» της, η έμφυτη ανοσία, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις μολύνσεις. Οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας περιλαμβάνουν κυτταρικά και μοριακά

[Type here]

συστατικά τα οποία αναγνωρίζουν τάξεις μορίων που απαντώνται στα συνήθη παθογόνα. **[12]**

Οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας αναγνωρίζουν και εξαλείφουν ειδικά συγκεκριμένους ξένους μικροοργανισμούς και μόρια. Πολλοί σημαντικοί για την έμφυτη ανοσία είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like Receptors ή TLRs) Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες αναγνωρίζουν μια ευρεία ποικιλία από μόρια που είναι συντηρημένα στα διάφορα παθογόνα, όπως ιοί, βακτήρια, μύκητες, ακόμη και μερικά πρωτόζωα. Οι TLRs που αναγνωρίζουν εξωκυτταρικούς προσδέτες βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, ενώ αυτοί που αναγνωρίζουν ενδοκυτταρικούς προσδέτες (όπως ιικό RNA ή θραύσματα βακτηριακού DNA) εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. **[13]**

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από πολλά κύτταρα, όργανα και ιστούς, που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε σημείο του σώματος. Στην ανοσολογική απόκριση συμμετέχουν διάφορα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα, τα οποία εντοπίζονται σε μεγάλους αριθμούς στα λεμφοειδή όργανα. Από αυτά, μόνο τα αντιγόνο-ειδικά λεμφοκύτταρα διαθέτουν τις ιδιότητες της ποικιλομορφίας, της εξειδίκευσης, της μνήμης και της διάκρισης του εαυτού από το μη εαυτό, που αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της επίκτητης, δηλαδή μη ειδικής ανοσίας. **[14]**

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν έναν τύπο λευκοκυττάρων του αίματος που παράγονται στο μυελό των οστών με τη διαδικασία της αιμοποίησης. Συνθέτουν και εκφράζουν ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς οι οποίοι δεσμεύουν το ξένο αντιγόνο και για αυτό είναι πολύ αποτελεσματικοί στην αναγνώριση και εξάλειψή του. Οι δυο κύριοι πληθυσμοί λεμφοκυττάρων είναι τα B- και τα T- λεμφοκύτταρα. **[15]**

Όσον αφορά τα B λεμφοκύτταρα, αυτά ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Όταν τον εγκαταλείπουν, το καθένα από αυτά εκφράζει πάνω στη μεμβράνη του ένα μοναδικό υποδοχέα δέσμευσης αντιγόνου. Ο υποδοχέας του B-λεμφοκυττάρου είναι ένα μεμβρανικό μόριο αντισώματος. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες. Όταν ένα παρθένο B κύτταρο έρχεται πρώτη φορά σε επαφή με το αντιγόνο που ταιριάζει στο μεμβρανικό υποδοχέα του, το αντιγόνο δεσμεύεται από αυτόν και επάγεται ταχύτατος πολλαπλασιασμός του κυττάρου. Τα κύτταρα που προκύπτουν διαφοροποιούνται σε B κύτταρα μνήμης και σε πλασματοκύτταρα. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν τεράστιες ποσότητες αντισώματος, ειδικές για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Αυτό στη συνέχεια θα οδηγήσει στην εξάλειψη του αντιγόνου, μέσω μιας σειράς διαδοχικών γεγονότων. **[15]**

Τα T λεμφοκύτταρα προέρχονται, επίσης, από το μυελό των οστών, όμως μεταναστεύουν και ωριμάζουν στο θύμο αδένι. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης το T λεμφοκύτταρο εκφράζει στη μεμβράνη του ένα αντιγόνο-

[Type here]

συνδεδεμένο μόριο, τον υποδοχέα του T κύτταρου (T-cell receptor, TCR). Οι βασικοί υπότυποι των T λεμφοκυττάρων είναι : τα T βοηθητικά (TH), τα T κυτταροτοξικά (TC) και τα T ρυθμιστικά (Treg), τα οποία διακρίνονται με βάση τις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που εκκρίνουν. Σε αντίθεση με τον υποδοχέα του B κυττάρου, ο TCR αναγνωρίζει το αντιγόνο μόνον εάν αυτό είναι συνδεδεμένο με μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Όταν ένα παρθένο T λεμφοκύτταρο έρθει σε επαφή με αντιγόνο συνδεδεμένο σε ένα μόριο MHC πάνω σε ένα κύτταρο, τότε πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε T κύτταρα μνήμης και δραστικά T κύτταρα.

Όταν ένα T βοηθητικό κύτταρο αναγνωρίσει και αλληλεπιδράσει με το σύμπλεγμα αντιγόνο-MHC, ενεργοποιείται, υφίσταται μεταβολικό μετασχηματισμό και αρχίζει να εκκρίνει μόρια που ονομάζονται κυτταροκίνες. Αυτές με τη σειρά τους οδηγούν στην ενεργοποίηση πολλών κυτταρικών τύπων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, όπως μακροφάγα και Tc. **[15]**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή καθώς, μεταξύ άλλων, χαρακτηρίζεται και από την παραγωγή αυτο-αντισωμάτων, εκτεταμένη απόθεση κολλαγόνου και αγγειοπάθεια. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούν να προκληθούν από την παρατεταμένη και μη ελεγχόμενη ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων. **[16]**

Γενικά τα αυτοάνοσα νοσήματα (με εξαίρεση τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα) είναι σπάνια , αλλά συνολικά προσβάλλουν το 5% του πληθυσμού στις Δυτικές χώρες. Όπως και πολλά άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, έτσι και η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί μια πολύπλοκη διαταραχή στην οποία πολλά γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος αλληλεπιδρούν με επιγενετικά φαινόμενα και περιβαλλοντικούς παράγοντες με αποτέλεσμα την εκδήλωση και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Πολύ συχνά, οι διάφορες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος μοιράζονται κοινά γενετικά στοιχεία, το οποίο σημαίνει ότι οι διάφορες παραλλαγές που συναντώνται σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο συνδέονται με περισσότερες από μία γενετικές ασθένειες. Δεν είναι σπάνιο το φαινόμενο να συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο ή σε μια οικογένεια περισσότερα από ένα αυτοάνοσα νοσήματα. [2] Για παράδειγμα, πολλοί γενετικοί τόποι που έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση παίζουν, επίσης, ρόλο και στην εμφάνιση του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, μια άλλη αυτοάνοση διαταραχή με διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς. **[17]**

Ένα επιπλέον σύνθημα στοιχείο αυτοάνοσης διαταραχής που χαρακτηρίζει το σκληρόδερμα είναι η αυξημένη εμφάνισή της νόσου σε γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Σε ορισμένους πληθυσμούς οι γυναίκες αποτελούν έως και το 90% των πάσχοντων ατόμων. Τα αίτια για την «προτίμηση» αυτή δεν είναι

[Type here]

πλήρως διευκρινισμένα, αλλά θεωρείται πως σημαντικό ρόλο επιτελούν οι διαφορές των δυο φύλων ως προς τις αναπαραγωγικές ορμόνες καθώς και ως προς τα μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε γενικές γραμμές έχει δειχτεί πως το γυναικείο φύλο φέρει μεγαλύτερο τίτλο αντισωμάτων από το αντρικό. Ως τίτλος ορίζεται η μεγαλύτερη αραίωση του ορού του ατόμου στην οποία ανιχνεύονται τα ειδικά αντισώματα με ορολογικές μεθόδους.

Όσον αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι κύριοι γενετικοί τόποι που συνεισφέρουν στην προδιάθεση και κατ' επέκταση την εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης είναι αυτοί του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) αλλά και γονίδια του εμπλέκονται σε κεντρικές διεργασίες της ανοσολογικής απόκρισης, όπως για παράδειγμα η επεξεργασία του αντιγόνου, η ενεργοποίηση των T- λεμφοκυττάρων καθώς και διάφοροι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας. Ειδικά ως προς την έμφυτη ανοσία, μελέτες σε Καυκάσιους πληθυσμούς έδειξαν ότι, σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της διαταραχής φαίνεται να κατέχουν τα μόρια ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και NF- κ B. [17]

Οι κυτοκίνες είναι μόρια πρωτεϊνών κυτταρικής σηματοδότησης τα οποία συνιστούν μια μεγάλη και ποικιλόμορφη οικογένεια. Αποτελούνται από ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες όπως οι ιντερλευκίνες και οι ιντερφερόνες. Ουσιαστικά όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα (τα κύτταρα που διαθέτουν πυρήνα) του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά τα ενδο-επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα, είναι ισχυροί παραγωγοί IL-1, IL-6 και TNF-α. Η οικογένεια της IL-1 είναι μια ομάδα κυτοκινών που παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Όσον αφορά το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB έχει ως στόχους πολλά γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος όπως : κυτοκίνες / χημειοκίνες, υποδοχείς ανοσοσφαιρινών, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παρουσίαση του αντιγόνου, καθώς και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Έτσι λοιπόν γίνεται εύκολα αντιληπτό το γεγονός ότι οι παραλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση ή τη λειτουργικότητα αυτού του μορίου έχουν αντίκτυπο και στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού.

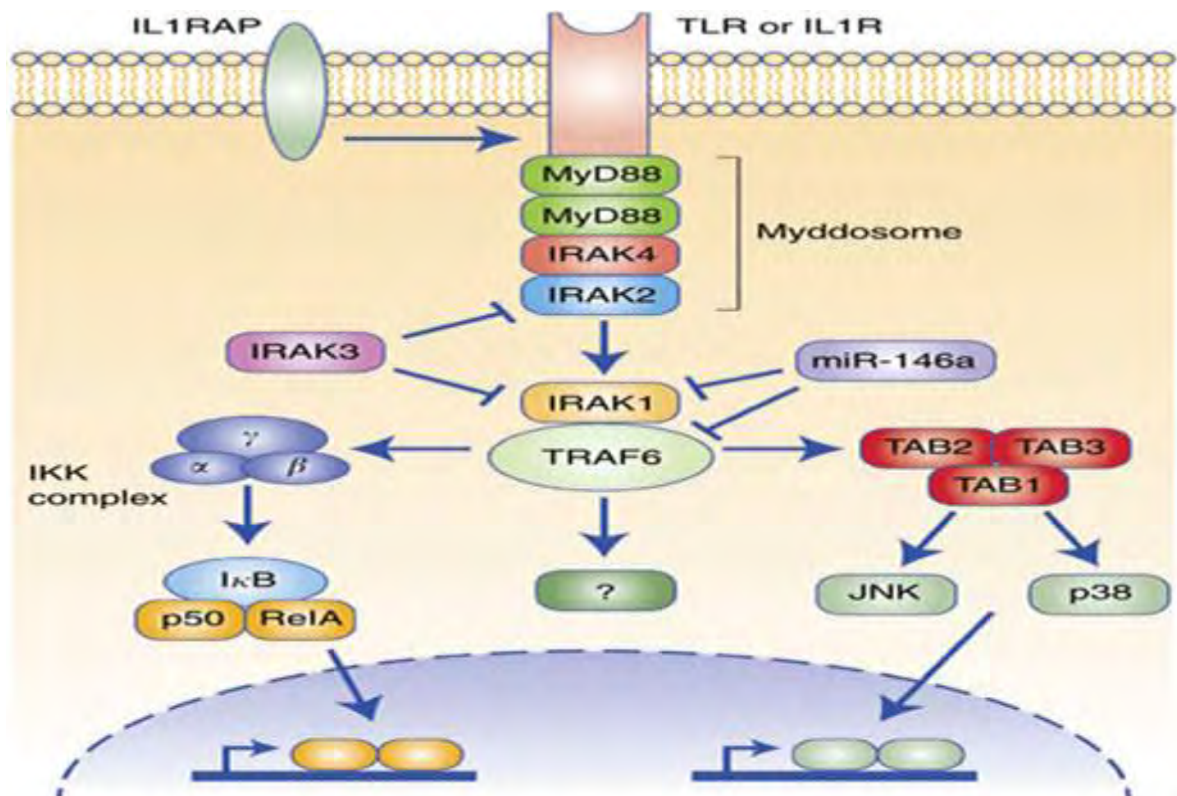
Μεταξύ των ρυθμιστικών μορίων που ελέγχουν τη σηματοδότηση του NF- κ B είναι και η πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία σχετίζεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IRAK-1). Ο γενετικός τόπος της IRAK-1 βρίσκεται στην περιοχή Xq28. Άλλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει το σηματοδοτικό αυτό μόριο είναι η επαγωγή της έκφρασης IFNα και IFNγ, δυο μορίων με κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των φλεγμονωδών διεργασιών.

Η κινάση Ser/Thr που σχετίζεται με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 η οποία είναι ένας από τους μεσολαβητές της σηματοδότησης TLR/IL1R. Οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που παίζουν βασικό ρόλο

[Type here]

στην έμφυτη (μη ειδική) ανοσία. Οι TLRs είναι ένας τύπος υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRR) και αναγνωρίζουν μόρια που είναι ευρέως κοινά στα παθογόνα, αλλά διακρίνονται από τα μόρια του ξενιστή, τα οποία ονομάζονται «σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα». Οι TLRs μαζί με τους υποδοχείς της ιντερλευκίνης-1 σχηματίζουν μια υπεροικογένεια υποδοχέων, γνωστή ως "υπεροικογένεια υποδοχέων TLR/IL-1R", με κοινούς μηχανισμούς σηματοδότησης. [18] Αναλυτικότερα :

Η ενεργοποίηση του TLR / IL1R από κάποιο πρόσδεμα καταλήγει στη συναρμολόγηση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση της IRAK-1. Η IRAK-1 συνδέεται με μια E3 λιγάση της ουβικουιτίνης, TRAF6, η οποία μεσολαβεί στην ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK, με αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων NF-κB. Ο NF-κB, ο οποίος είναι τώρα ελεύθερος, μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων-στόχων, δηλαδή κυτοκινών που προάγουν τη φλεγμονή. Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικόνα 3**. [19]



Εικόνα 3 : Η σηματοδότηση της IRAK-1. [18]

Έτσι λοιπόν, στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε να μελετηθούν πολυμορφισμοί οι οποίοι σχετίζονται με το προϊόν του γονιδίου IRAK-1, λόγω του κεντρικού ρόλου που κατέχει στο ανοσοποιητικό σύστημα.

[Type here]

1.4. Ο ρόλος της IRAK1 στη συστηματική σκλήρυνση

Όσον αφορά τη συσχέτιση του γονιδίου αυτού με τη συστηματική σκλήρυνση, μελέτες σε Καυκάσιες γυναίκες ασθενείς έχουν δείξει πως η παρουσία δυο μη συνώνυμων SNPs (IRAK1 196Phe/Ser [rs 1059702] και 532Leu/Ser [rs 1059703]) έχει λειτουργικές συνέπειες, όπως η αυξημένη ενεργότητα του NF-κ B. Στην πρώτη περίπτωση, το συχνό στον πληθυσμό νουκλεοτίδιο είναι η γουανίνη (G) στη θέση αυτή, ενώ το σπάνιο είναι η αδενίνη (A). Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος από φαινυλαλανίνη σε σερίνη. Στη δεύτερη περίπτωση, το συχνό αλληλόμορφο είναι η κυτοσίνη (C) και το σπάνιο η θυμίνη (T), η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος λευκίνη με σερίνη. Αυτές οι «παραλλαγές» επηρεάζουν τη δομή και, κατ' επέκτασιν τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα. [18]

Γενικά με τον όρο “λειτουργικοί” αναφερόμαστε σε πολυμορφισμούς που μπορεί να επηρεάζουν :

A) Την ακεραιότητα του γονιδιακού προϊόντος, εάν υπάρχουν μη συνώνυμες σημειακές μεταλλαγές στα εξώνια του γονιδίου ή παραλλαγές οι οποίες να έχουν ως αποτέλεσμα το εναλλακτικό μάτισμα του RNA του γονιδίου

B) Την ποσότητα του γονιδιακού προϊόντος, εάν οι μεταλλαγές εντοπίζονται στα ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου (λόγου χάριν υποκινητές, ενισχυτές και άλλα)

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι λειτουργικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της IRAK-1 συνιστούν λιγότερους απλοτύπους από όσους θα αναμέναμε με βάση την τυχαία κληρονόμησή τους. Αυτό υποδεικνύει πως οι πολυμορφισμοί αυτοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, δηλαδή κληροδοτούνται από γενιά σε γενιά ως ενιαίο σύνολο και όχι ανεξάρτητα. Αυτή τους η ιδιαιτερότητα μας επιτρέπει να μελετήσουμε έναν από αυτούς τους πολυμορφισμούς και να αποφανθούμε για ολόκληρο τον απλότυπο.

Τα δεδομένα για τα συγκεκριμένα SNPs αντλούνται από τη βάση δεδομένων του HarMap Project, όπου υπάρχουν καταχωρημένα όλα τα SNPs και οι απλότυποι που έχουν βρεθεί ως σήμερα.

Αναλυτικότερα, στην παραπάνω έρευνα συμπεριλήφθηκαν γυναίκες από τρεις διαφορετικούς Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Ιταλία, Γερμανία και Γαλλία) και τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή σύνδεση μεταξύ της παρουσίας του rs 1059702

[Type here]

και του διάχυτου σκληροδέρματος. Η ανάλυση συσχέτισης γονοτύπου – φαινοτύπου και για τους τρεις πληθυσμούς έδειξε ότι η παρουσία του παραπάνω πολυμορφισμού και μάλιστα σε ομοζυγωτία διαχωρίζει τους ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα από αυτούς με το περιορισμένο. Επιπλέον διαχωρίζει τα άτομα με πνευμονική ίνωση και χωρίς καθώς και τα άτομα που παράγουν αντισώματα ενάντια στην τοποϊσομεράση I από αυτά που διαθέτουν αντισώματα ενάντια στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις αυτού του SNP με τους άλλους υπότυπους της διαταραχής. Συμπερασματικά λοιπόν, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί συσχετίζονται με την εκδήλωση ενός ειδικού φαινοτύπου της νόσου. [18]

1.5. Ο ρόλος της ιντερλευκίνης 10 (IL-10) στη συστηματική σκληρυνση

Η ιντερλευκίνη 10 είναι μια ανοσορρυθμιστική κυτοκίνη με πλειοτρόπο δράση. Συμμετέχει σε φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις. Εκτός από τα Β κύτταρα, η κυτοκίνη αυτή εκκρίνεται και από τα βοηθητικά TH2 κύτταρα και αναστέλει τη μετατροπή τους σε TH1, καθώς και τις λειτουργίες των μονοκυττάρων. Επομένως έχει και αντιφλεγμονώδη δράση. Μια επιπλέον διαδικασία στην οποία συμμετέχει είναι η αναστολή της απόπτωσης των T κυττάρων και η επακόλουθη εξάπλωση των κλώνων των T κυττάρων (**Εικόνα 4**). [16]

Σε επίπεδο γονιδιώματος, η γονιδιακή περιοχή στην οποία εδράζεται το γονίδιο της ιντερλευκίνης 10 είναι η 1q32 και είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι 5' περιοχές που πλαισιώνουν το γονίδιο της ιντερλευκίνης 10 είναι υψηλά πολυμορφικές. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασής της ιντερλευκίνης 10 σχετίζονται με πολυμορφισμούς στην περιοχή αυτή. [27]

Η ιντερλευκίνη 10, όπως και όλες οι ιντερλευκίνες, παράγονται από τα Β κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μια υποκατηγορία των Β κυττάρων, τα Β ρυθμιστικά (Bregs) αναστέλουν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων του ανοσοποιητικού προς TH1 και την επέκταση των T ρυθμιστικών. Ωστόσο, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των Β ρυθμιστικών κυττάρων που παράγουν ιντερλευκίνη 10 είναι μειωμένος και όσο μειώνεται ο αριθμός των κυττάρων αυτών, τόσο αυξάνει η παραγωγή των αυτοαντισωμάτων. [16], [24]

Ειδικότερα ως προς τη συστηματική σκληρυνση, έχουν πραγματοποιηθεί ανάλυσεις κυρίως τριών πολυμορφισμών στις θέσεις -1082, -819 και -3575, δηλαδή ανοδικά του γονιδίου. Οι αντίστοιχοι πολυμορφισμοί αφορούν σε μια υποκατάσταση γουανίνης από αδενίνη στη θέση -1082, στη θέση -819 η κυτοσίνη υποκαθιστάται από T και τέλος, στη θέση -3575 η T που είναι πιο

[Type here]

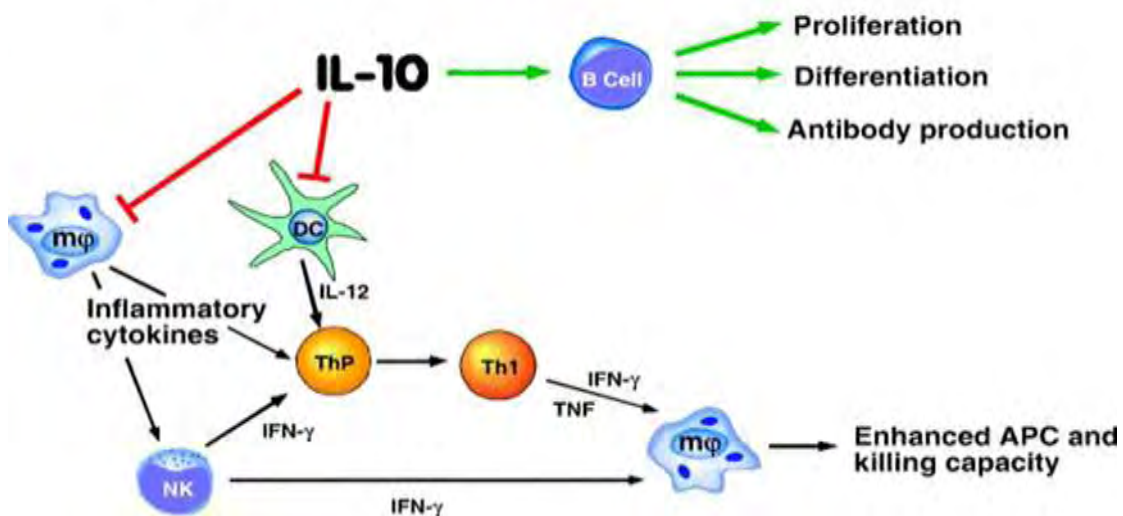
συχνή στο γενικό πληθυσμό μετατρέπεται σε Α. Οι πολυμορφισμοί αυτοί δε φαίνεται να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, επομένως κληρονομούνται ανεξάρτητα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δε φάνηκε οι πολυμορφισμοί αυτοί να σχετίζονται άμεσα με την εκδήλωση της νόσου. Από μια μετα-ανάλυση, η οποία περιελάμβανε 21 ανεξάρτητες μελέτες, προέκυψε πως το SNP -3575 (T/A) συσχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης διάχυτου λεμφώματος των Β-κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, συχνά οι διάφορες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος μοιράζονται κοινό γενετικό υπόβαθρο. Έτσι λοιπόν, καθώς και στη συστηματική σκλήρυνση παρατηρείται εκτεταμένη δυσλειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ιντερλευκίνης 10, η παρουσία αυτού του πολυμορφισμού στο γονιδίωμα των ασθενών αξίζει να μελετηθεί. Αξίζει να σημειωθεί πως ο πολυμορφισμός αυτός δε συσχετίστηκε με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, στα οποία δεν εμπλέκεται η λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων. [29]

Επιπλέον, από μια ακόμη μετα-ανάλυση σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, με συνολικά 1034 ασθενείς με σκληρόδερμα και 1815 άτομα ελέγχου και διάστημα εμπιστοσύνης 95%, προέκυψε πως το σπάνιο αλληλόμορφο (Α) στη θέση -3575 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου, κυρίως σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Έτσι λοιπόν, αφενός λόγω της σύνδεσης του με την απορρύθμιση των Β-λεμφοκυττάρων και αφετέρου λόγω της συσχέτισής του με το νόσημα σε άτομα ευρωπαϊκών πληθυσμών, το SNP -3575 (T/A) αναδείχθηκε ως το «καλύτερο» για περαιτέρω μελέτη, οπότε αυτό εξετάσαμε στην παρούσα διπλωματική εργασία. [26]

Inhibitory and stimulatory activities of IL-10



Εικόνα 4: Η πλειοτρόπος δράση της ιντερλευκίνης 10. [24]

[Type here]

1.6. Γενετικές μελέτες :

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για την κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου της νόσου είναι δυο προσεγγίσεων:

1.6. α) Προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου (Candidate Gene Approach ή CGA) : Η επιλογή του υποψήφιου προς μελέτη γονιδίου μπορεί να γίνει με δυο τρόπους. Η μια εκδοχή είναι να έχει δειχθεί ότι το προϊόν του συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που, πιθανώς, σχετίζονται με τη νόσο. Στην περίπτωση του σκληροδέρματος η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων υποδεικνύει το γενετικό τόπο του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας ως μια καλή αρχική προσέγγιση. Η άλλη εκδοχή βασίζεται στο γεγονός ότι συχνά «συνυπάρχουν» διαφορετικές αυτοάνοσες διαταραχές μέσα στην ίδια οικογένεια. Αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει πως υπάρχει κοινό γενετικό υπόβαθρο στις διαταραχές αυτές. Έτσι λοιπόν, πολυμορφισμοί οι οποίοι έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην εκδήλωση κάποιας άλλης αυτοάνοσης διαταραχής αποτελούν καλούς υποψήφιους για τη μελέτη του σκληροδέρματος.

1.6. β) Genome Wide Association Studies (GWAS) :

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται σε tag SNPs, δηλαδή SNPs που να είναι αντιπροσωπευτικά για μια περιοχή του γονιδιώματος. [2], [3] Αυτά βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με μια ομάδα από SNPs που όλα μαζί συνιστούν έναν απλότυπο. Κατά αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι γενετικές παραλλαγές και η συσχέτισή τους με φαινοτύπους χωρίς να μελετηθεί κάθε SNP σε μια χρωμοσωμική περιοχή. Αυτό μειώνει το κόστος και το χρόνο της χαρτογράφησης των περιοχών γονιδιώματος που σχετίζονται με την ασθένεια, καθώς εξαλείφει την ανάγκη μελέτης κάθε μεμονωμένου SNP. Τα tag SNPs είναι χρήσιμα σε μελέτες GWAS. [20]

Τα tag SNPs δεν εντοπίζονται μόνο εντός των γονιδίων, αλλά και σε μη μεταγραφόμενες περιοχές. Έτσι λοιπόν, στη μελέτη αυτή ελέγχεται με σάρωση ολόκληρο το γονιδίωμα ώστε να ανιχνευτούν SNPs που να συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου (**Εικόνα 5**). Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι αμερόληπτη (δηλαδή δεν υπάρχει κάποια αρχική υπόθεση που αναμένεται να επιβεβαιωθεί ή να απορριφθεί) και δεν απαιτείται προϋπάρχουσα γνώση για τη διεξαγωγή της. Ωστόσο καλύπτει περίπου το 80% των SNPs και δεν περιλαμβάνει σπάνια αλληλόμορφα.

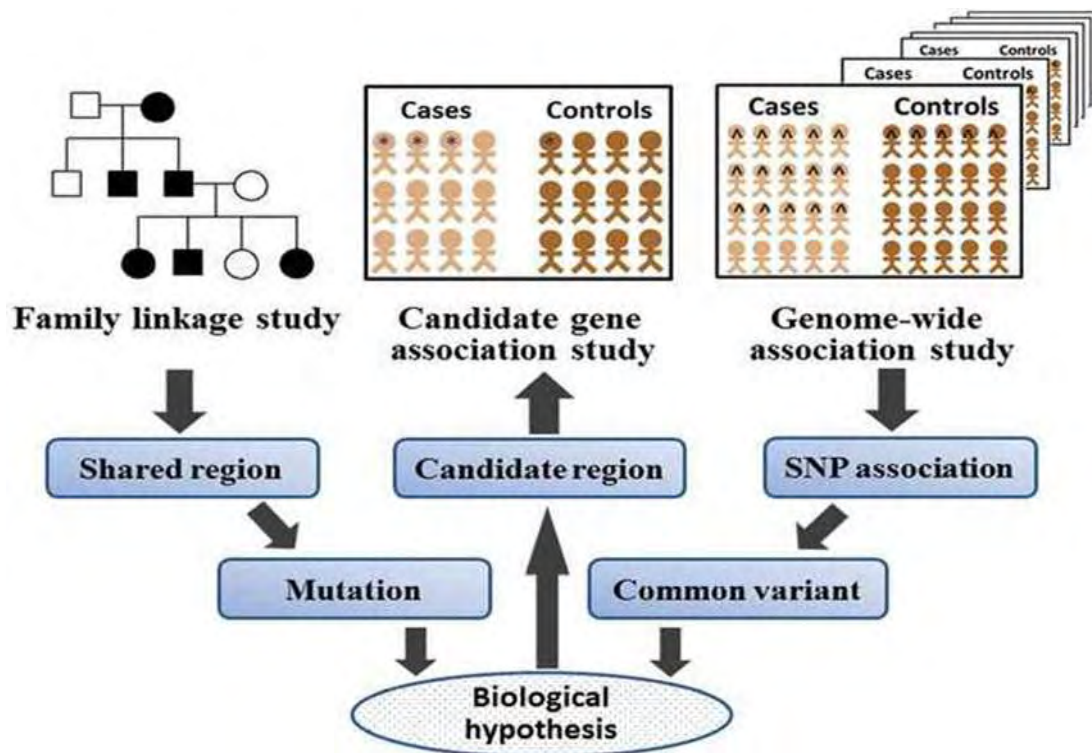
Είναι σημαντικό να τονιστεί πως μια GWAS αναγνωρίζει μια περιοχή ανισορροπίας σύνδεσης που περιέχει παραλλαγές που πιθανώς σχετίζονται με τη νόσο. Συχνά, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες για να περιοριστεί η

[Type here]

ακριβής περιοχή σύνδεσης και να προσδιοριστεί η αιτιώδης παραλλαγή, δηλαδή αυτή που πραγματικά συνεισφέρει στην ευαισθησία για τη νόσο. [21]

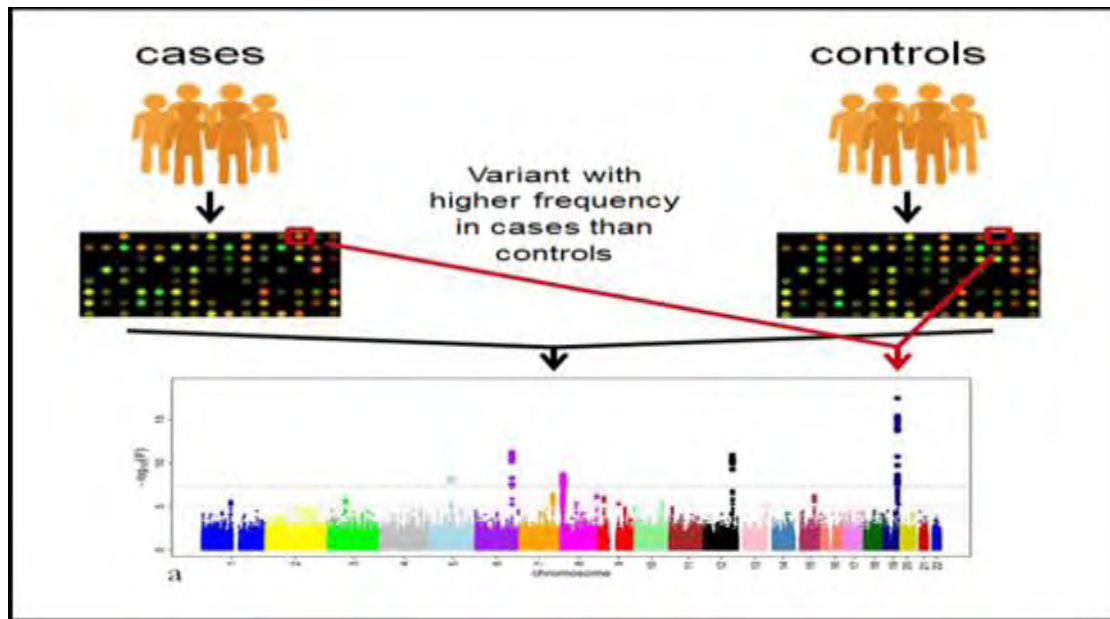
Τέλος, μια μετα-GWAS ανάλυση μπορεί να συγκεντρώσει όλα τα δεδομένα από τις διάφορες GWAS και να οδηγήσει στην ανίχνευση πολλών γενετικών τόπων, πέρα από τους γνωστούς. [2]

Συνοψίζοντας, και οι δυο μελέτες γενετικής σύνδεσης προσπαθούν να εντοπίζουν τους πολυμορφισμούς οι οποίοι έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί παράγοντες ευαισθησίας που εμπλέκονται : στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην αγγειακή βλάβη, καθώς και σε ινωτικές διεργασίες. [2], [3]



Εικόνα 5 : Σχηματική αναπαράσταση των σχέσεων που συνδέουν τις επιμέρους μελέτες [28]

[Type here]



Εικόνα 6 : Διάγραμμα που αντιπροσωπεύει την ταυτοποίηση παραλλαγών σε ασθενείς και άτομα ελέγχου χρησιμοποιώντας μια μέθοδο βασισμένη σε συστοιχία. Τα αποτελέσματα υποβάλλονται σε στατιστικές αναλύσεις για να προσδιοριστεί μία τιμή p (p -value) σε κάθε παραλλαγή. [21]

1.7. : Στόχοι της διπλωματικής εργασίας

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μια σοβαρή πολυπαραγοντική διαταραχή που επηρεάζει και τον ελληνικό πληθυσμό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας πληθυσμός 80 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και πληθυσμός 60 υγιών μαρτύρων, οι οποίοι αναλύθηκαν ως προς την παρουσία των πολυμορφισμών IRAK-1 196 (A/G) [rs 1059702] και IL-10 -819 (C/T) [rs1800890].

2) Υλικά και μέθοδοι

1. Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από 80 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και 60 υγιείς μάρτυρες. Η απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με kit της εταιρίας Invitrogen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την απομόνωση το DNA ηλεκτροφορεύεται σε πηκτή αγαρόζης και ελέγχεται ως προς τη καθαρότητα με φωτομέτρηση.

[Type here]

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) :

Αρχή της μεθόδου : Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis στη δεκαετία του '80. Η PCR βασίζεται στη χρήση της ικανότητας της DNA πολυμεράσης να συνθέτει νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς έναν κλώνο-εκμαγείο. Επειδή το ένζυμο αυτό μπορεί να προσθέτει νουκλεοτίδια μόνο σε μια προεξέχουσα 3'-OH ομάδα, χρειάζεται ένας εκκινητής (primer) στον οποίο μπορεί να προσθέσει το πρώτο νουκλεοτίδιο και στη συνέχεια να συντεθεί ο υπόλοιπος κλώνος.

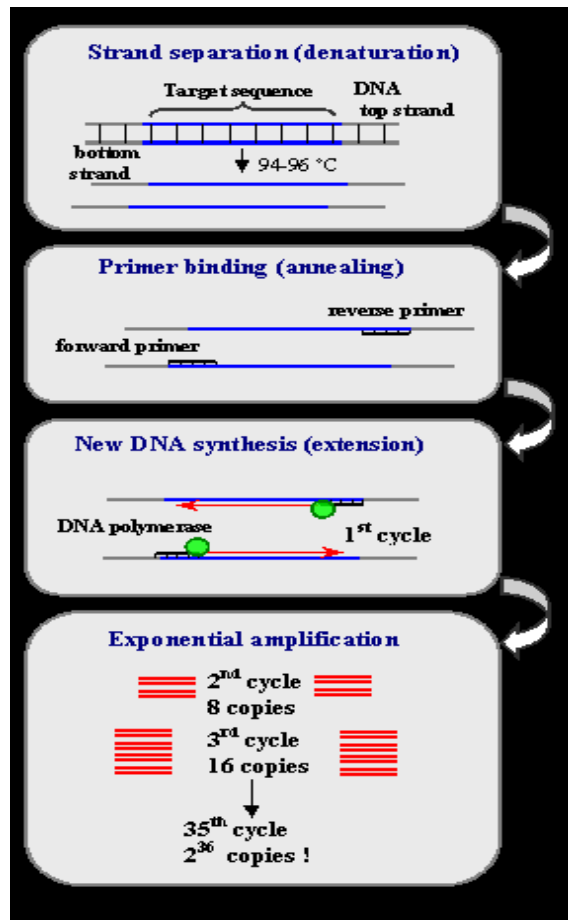
Κατά την PCR προστίθενται στην αντίδραση δυο εκκινητές, δηλαδή δυο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συνήθως 20 έως 24 νουκλεοτίδια, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς τα άκρα της αλληλουχίας DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. [22]

Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της τεχνικής είναι η υπό μελέτη αλληλουχία DNA να υπάρχει σε πολλά αντίγραφα. Συγκεκριμένα, σε κάθε κύκλο (στάδιο) της PCR το κάθε αντίγραφο διπλασιάζεται. Έτσι λοιπόν, αν για παράδειγμα η PCR που πραγματοποιούμε είναι 35 κύκλοι, στο τελικό διάλυμα θα υπάρχουν 2^{35} πανομοιότυπες μεταξύ τους αλληλουχίες, σύμφωνα με τον τύπο 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Η ενίσχυση, αυτή, του αρχικού τμήματος DNA είναι πολύ σημαντική για όλες τις τεχνικές που θα ακολουθήσουν, καθώς όλες προϋποθέτουν την ύπαρξη αυξημένης συγκέντρωσης του DNA – στόχου ώστε να είναι αποτελεσματικές.

Έτσι λοιπόν, για την ενίσχυση των τμημάτων DNA που περιλαμβάνουν τα υπό μελέτη SNPs πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για κάθε δείγμα. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές, έτσι ώστε μετά την αντίδραση να προκύπτει τμήμα DNA περίπου 200 στο μέσον του οποίου να βρίσκεται ο υπό μελέτη πολυμορφισμός. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος primer BLAST του ncbi.

[Type here]



Εικόνα 7: Τα στάδια της PCR. (NCBI)

Η αλληλουχία των τεσσάρων εκκινητών (forward και reverse για το κάθε τμήμα DNA) φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 1 : Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία
IRAK-1 [rs 1059702] (F)	CCTTGGGCAGAAGGGAAGAGA
IRAK-1 [rs 1059702] (R)	CCGGTACACGCACCCAA
IL – 10 [rs1800890] (F)	TCAGGTTTTCTTCATTTGCAGC
IL - 10 [rs1800890] (R)	CAGCCTGGGCACAATTTAGTC

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ειδικά PCR tubes, κάθε ένα από τα οποία περιείχε γενωμικό DNA από ένα δείγμα. Συστατικά της αντίδρασης PCR :

DNA εκμαγείο 1 μl

dNTPs/νουκλεοτίδια (10mM από το κάθε ένα) 1 μl

Buffer/ρυθμιστικό διάλυμα (10x) 5 μl

Εκκινητής Fw 50pmol/μl? 1 μl

[Type here]

Εκκινητής Rn 50pmol/μl? 1 μl

Taq DNA Polymerase 5 U/μl 0,2 μl

ddH₂O 39,8μl

Συνολικός όγκος 50 μl

Συνθήκες PCR :

Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min

Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec
Υβριδοποίηση: 60° C για 40sec
Επιμήκυνση: 72° C για 1.30 min
Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

} 35 κύκλοι

3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης :

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder). **[23]** Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή είναι τα εξής:

TAE 50x (500ml)
Tris Base 121gr
Acetic Acid 28,5ml
EDTA 0,5M 50ml
ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)
Bromophenol blue 1ml 1% w/v
TBE 20x 0,5ml
Glycerol 5ml
ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το διάλυμα stock 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύουμε 0,8 gr αγαρόζης σε 40 ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προσθέτουμε 1 μl χρωστική SERVA . Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Η SERVA, όπως και το βρωμιούχο αιθίδιο, προστίθεται για να είναι εμφανείς οι

[Type here]

ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται. Στο καλούπι είναι τοποθετημένα, επίσης, ειδικά χτενάκια τα οποία όταν πολυμεριστεί η αгарόζη αφαιρούνται και προκύπτουν οπές.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer σε αυτά. 5μl PCR προϊόντος αναμειγνύονται με 3μl loading buffer και στη συνέχεια τοποθετούνται στις οπές που έχουν σχηματιστεί.

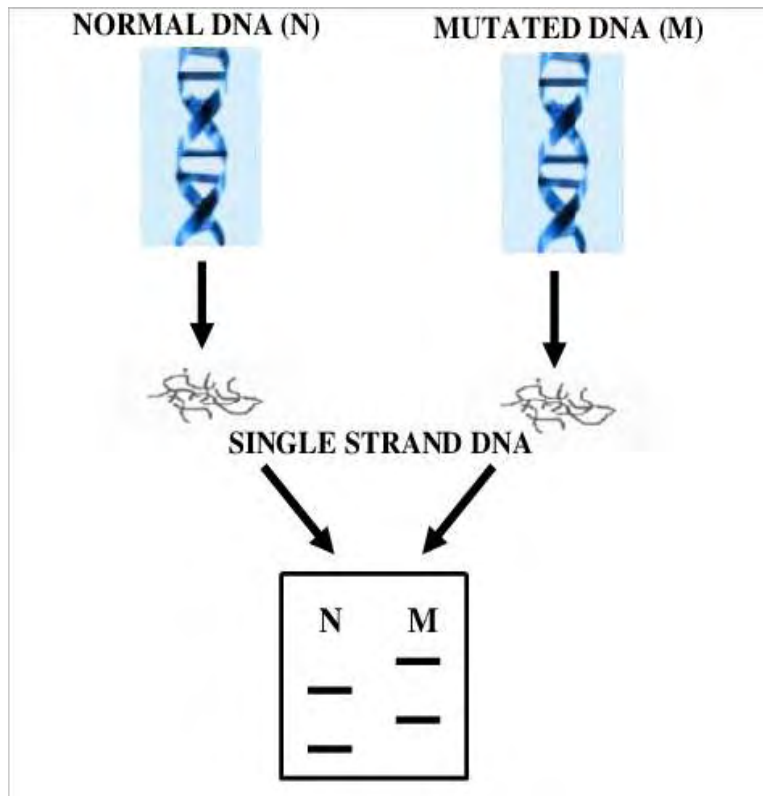
Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μεγέθους γνωστών τμημάτων DNA, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το τμήμα DNA που ενισχύθηκε έχει το μέγεθος που αναμέναμε, δηλαδή αν υπήρχε ειδική ενίσχυση και όχι κάποιο τυχαίο προϊόν. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts για περίπου 25 λεπτά και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

4. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που επιτρέπει την ταυτοποίηση διαφορών ανάμεσα σε δυο ή περισσότερα τμήματα DNA (από ένα πλήθος δειγμάτων) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορα είδη, μέχρι και τον άνθρωπο. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να ανιχνευτούν διαφορές ακόμη και σε ένα νουκλεοτίδιο (SNPs) ανάμεσα στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

Αρχή της μεθόδου : Η ανίχνευση των σημειακών μεταλλαγών βασίζεται στη διαφορετική κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων DNA (λόγου χάριν wild type και mutant) σε gel πολυακριλαμίδης κατάλληλης συγκέντρωσης, υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Δυο μόρια DNA που διαφέρουν ως προς τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία έστω και κατά ένα νουκλεοτίδιο, θα έχουν μια ανιχνεύσιμη διαφορά στην κινητικότητά τους, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. [25]

[Type here]



Εικόνα 8: Διαχωρισμός δυο μορίων DNA με τη μέθοδο SSCP. [25]

Ευαισθησία της μεθόδου : Μειώνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του προϊόντος της PCR. Ιδανικά, το μήκος του προϊόντος της PCR δεν πρέπει να ξεπερνά τις 300 βάσεις. Αν τα τμήματα DNA είναι μεγαλύτερα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σετ αλληλοεπικαλυπτόμενων εκκινητών κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή να γίνει πέψη τους με ένζυμο περιορισμού (RFLP) προκειμένου να διαπιστωθούν οι διαφορές στις αλληλουχίες τους.

Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό διάλυμα (denaturation buffer), η σύσταση του οποίου είναι η εξής:

Denaturation buffer

95% formamide

0,05% Bromophenol blue

0,05% Xylene Cyanol

10mM NaOH

[Type here]

Σε PCR tubes 8 μl προϊόντος PCR και 10μl denaturation buffer αναμειγνύονται και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση ώσπου να ηλεκτροφορηθούν.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR-SSCP χρησιμοποιείται πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 10% για τα προϊόντα IRAK-1 και 12% για τα προϊόντα IL-10.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 10% και 12% αναγράφονται στους πίνακες :

Πίνακες 2 και 3 : Οι ποσότητες των συστατικών των πηκτών πολυακρυλαμίδης

Glycerol 50%	6,4 ml
TBE (10x)	6 ml
ddH ₂ O	55 ml
TEMED	70 μl
APS 20%	400 μl
Συνολικός όγκος	65 ml

Gel 10%	gel 12%
6,5 gr ακρυλαμίδη	7,8 gr ακρυλαμίδη
0,16 gr Bis- ακρυλαμίδη	0,25 gr Bis- ακρυλαμίδη

Αρχικά, ζυγίζονται και προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως υπό ανάδευση όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το TEMED και το APS 20%. Όταν το διάλυμα ομογενοποιηθεί διηθείται σε ογκομετρικό σωλήνα μέχρι τα 65 ml περίπου. Ακολούθως το διήθημα τοποθετείται σε κωνική φιάλη στην οποία προστίθεται τελευταία το TEMED και το APS 20%. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται ανάμεσα σε δυο τζάμια τα οποία σχηματίζουν ένα καλούπι. Αφού αποχυθεί το διάλυμα προστίθενται ειδικά χτενάκια , πρώτου ξεκινήσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, προκειμένου όταν πήξει το διάλυμα να σχηματιστούν ειδικά «πηγαδάκια», δηλαδή οπές.

[Type here]

Αφού πολυμεριστεί η ακρυλαμίδα, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες στην περίπτωση των IRAK-1 και 20 ώρες στην περίπτωση των IL-10.

Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining) :

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml) :

Acetic Acid 1 ml

ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml) :

Διάλυμα AgNO₃ 0,2 gr

200 ml ddH₂O

Διάλυμα 3 (200ml) :

NaOH 3gr

NaBH₄ 0,01gr

Formaldehyde 1ml

ddH₂O έως τα 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200 ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα AgNO₃ και οι πηκτές αναδεύονται για 8-10 min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και

[Type here]

πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές. Κατά μέσο όρο, οι ζώνες είναι εμφανείς στα 30 περίπου λεπτά. Μετά τα 40 περίπου λεπτά ανάδευσης με το διάλυμα 3 η εμφάνιση ζωνών φτάνει σε ένα πλατώ.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών ατόμων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων, επιλέγονται 1 αντιπροσωπευτικό άτομο από κάθε πρότυπο, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

5) Αλληλούχηση προϊόντων PCR :

Για το σκοπό αυτό, τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit ώστε να απαλλαγούν από την παρουσία παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και, γωνρίζοντας τη θέση του πολυμορφισμού που μελετάμε μέσα στην αλληλουχία, να διαπιστώσουμε αν είναι όπως παρών. Αυτό γίνεται με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (Bioedit, MEGA) και με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST του ncbi.

6) Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης :

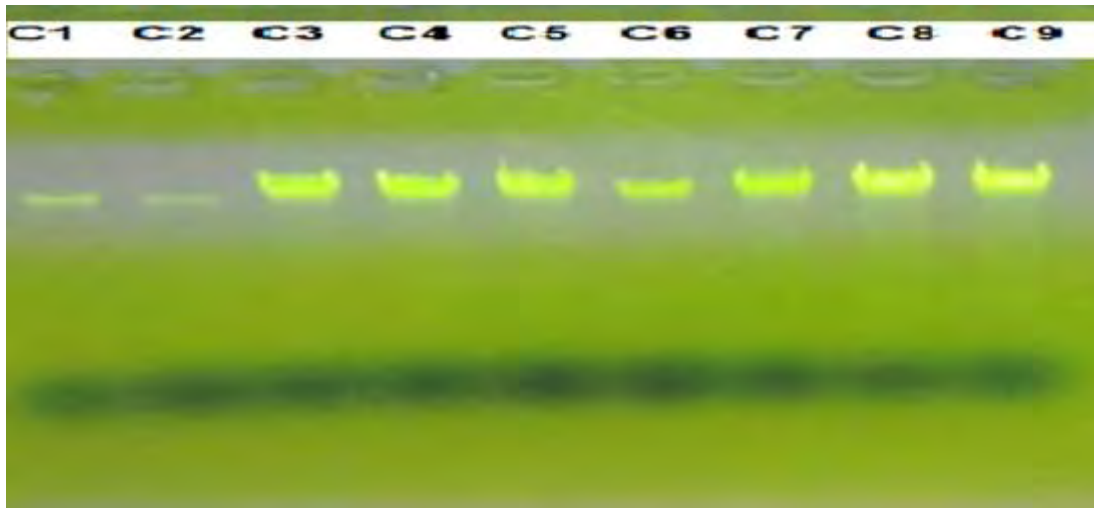
Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή. Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, προκύπτει η πλήρης, δίκλωνη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

[Type here]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :

1) Απομόνωση DNA :

Η απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα παρείχε υψηλής καθαρότητας DNA. Αυτό έγινε αντιληπτό μέσω φωτομέτρησης των δειγμάτων DNA και μέτρηση της απορρόφησής τους στα 260 nm (όπου είναι γνωστό ότι απορροφούν οι βάσεις του DNA) και στα 280 nm (όπου απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των πρωτεϊνών). Έτσι λοιπόν, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν λόγο απορροφήσεων (A) : A_{260} / A_{280} κοντά στο 1,8 και τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl . Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτική αγαρόζης 1% εμφάνισε μία ζώνη, η οποία υποδήλωνε την επιτυχή απομόνωση του πυρηνικού DNA.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA σε πηκτική αγαρόζης 0,6%

2) και 3) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης :

Αφού σχεδιάστηκαν, (μέσω της χρήσης του προγράμματος BLAST του ncbi) οι κατάλληλοι εκκινητές, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με στόχο την ενίσχυση των τμημάτων που περιέχουν τα υπό μελέτη SNPs.

Όσον αφορά το SNP που εντοπίζεται στο γονίδιο της IRAK-1 ενισχύθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 60 PCR προϊόντα από ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και 40 PCR προϊόντα από την ομάδα των υγιών μαρτύρων,

Αντίστοιχα ,για το SNP που εντοπίζεται ανοδικά του γονιδίου il-10, ο αριθμός των PCR προϊόντων από ασθενείς ανέρχεται σε 68 και ο αριθμός των PCR προϊόντων από την ομάδα των υγιών μαρτύρων σε 51.

[Type here]

Ενδεικτικά, στην εικόνα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR για ορισμένα από τα παραπάνω δείγματα, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, συγκέντρωσης 1%. Στα αριστερά της εικόνας υπάρχει ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder), ο οποίος προστίθεται με σκοπό να μπορούμε να εκτιμήσουμε αν το γονιδιακό προϊόν που προέκυψε από την αντίδραση έχει το μέγεθος που αναμένουμε ή αν πρόκειται για κάποιο άλλο παραπροϊόν που προέκυψε τυχαία. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, οι ζώνες που προκύπτουν αντιστοιχούν περίπου στις 200 – 250 βάσεις DNA, όσο δηλαδή είναι και το προϊόντα που αναμέναμε.



Εικόνα 10 : Ενδεικτικά αποτελέσματα PCR για το τμήμα στο γονίδιο irak -1 (αριστερά) και για το τμήμα ανοδικά του γονιδίου της ιντερλευκίνης 10 (δεξιά). Σημείωση : Στην εικόνα της ιντερλευκίνης 10 απουσιάζει ο μάρτυρας μοριακών βαρών καθώς μετά από πολλές αντιδράσεις δεν υπήρχε κάποιο άλλο προϊόν σε διαφορετικό μέγεθος από το αναμενόμενο, επομένως εφόσον εμφανίζεται μόνο μια ζώνη, αυτή αντιστοιχεί στο επιθυμητό μέγεθος προϊόντος

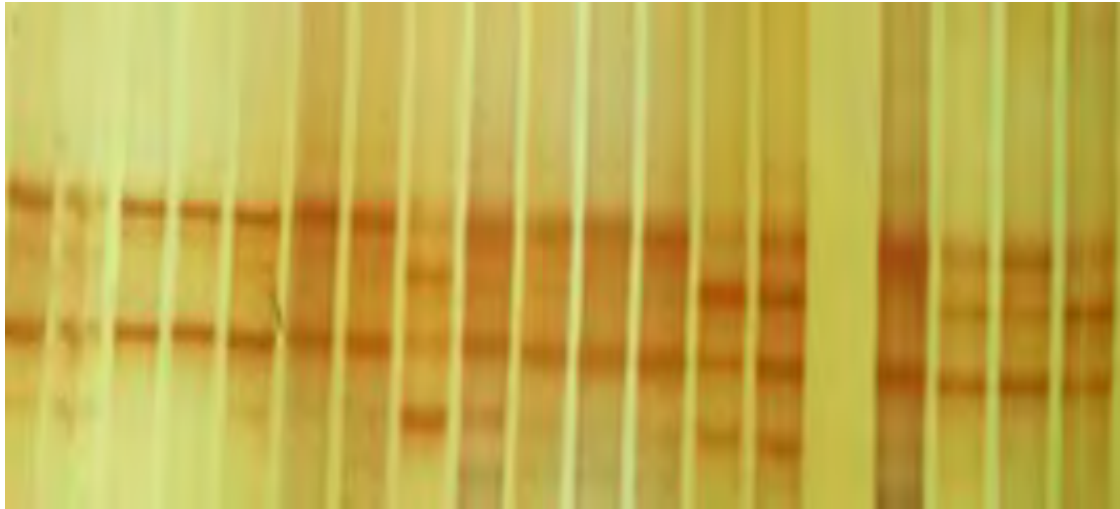
4) Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) : Single-strand conformation polymorphism

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα των SSCPs, μια πηκτή πολυακρυλαμίδης για κάθε γονίδιο και σε κάθε δείγμα από πάνω σημειώνεται ο αριθμός του προτύπου στο οποίο αντιστοιχούν.

Όπως γίνεται αντιληπτό από τις δυο εικόνες, για κάθε ένα από τα δυο τμήματα DNA εμφανίζονται περισσότερα από ένα πρότυπα στις πηκτές πολυακρυλαμίδης. Με βάση τις αρχές της μεθόδου, η παρουσία διαφορετικών προτύπων υποδηλώνει σημειακές διαφορές στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αντίστοιχων δειγμάτων. Παρατηρούμε πως, αν και διαφορετικά τα πρότυπα, δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα μεγάλες αποκλίσεις στην κινητικότητά τους, καθώς είναι όλα προϊόντα PCR ίδιων συνθηκών, επομένως ως επί το πλείστον αναμένεται να έχουν ομοιότητες στην αλληλουχία τους.

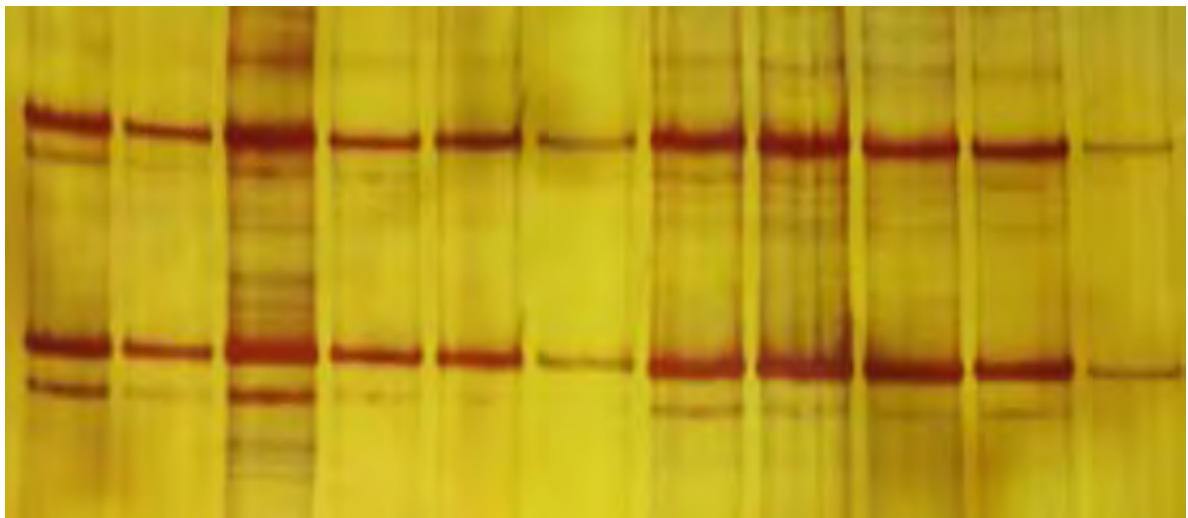
[Type here]

3 3 1 1 4 4 4 3 4 4 4 4 3 3 1 2 2 2



Εικόνα 11 : Αποτελέσματα SSCP για το SNP του γονιδίου της IL – 10

3 1 2 1 1 1 2 2 1 1 1



Εικόνα 12: Αποτελέσματα SSCP για το SNP του γονιδίου της irak-1

Αξίζει να σημειωθεί πως μέσω αυτής της τεχνικής δε μπορούμε να γνωρίζουμε με βεβαιότητα σε ποιο σημείο της αλληλουχίας διαφέρουν τα τμήματα DNA. Αυτό σημαίνει πως η διαφορετική κινητικότητα δεν είναι απαραίτητα αποτέλεσμα της ύπαρξης ή της απουσίας του υπό μελέτη πολυμορφισμού. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η αλληλούχηση των PCR προϊόντων.

Για το λόγο αυτό, αφού πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις σε πηκτές πολυακρυλαμίδης όλων των προϊόντων PCR, κάθε δείγμα αντιστοιχήθηκε σε ένα πρότυπο. Έτσι λοιπόν, θεωρώντας ότι τα ίδια πρότυπα αντιστοιχούν στην ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία προετοιμάστηκαν και στάλθηκαν για

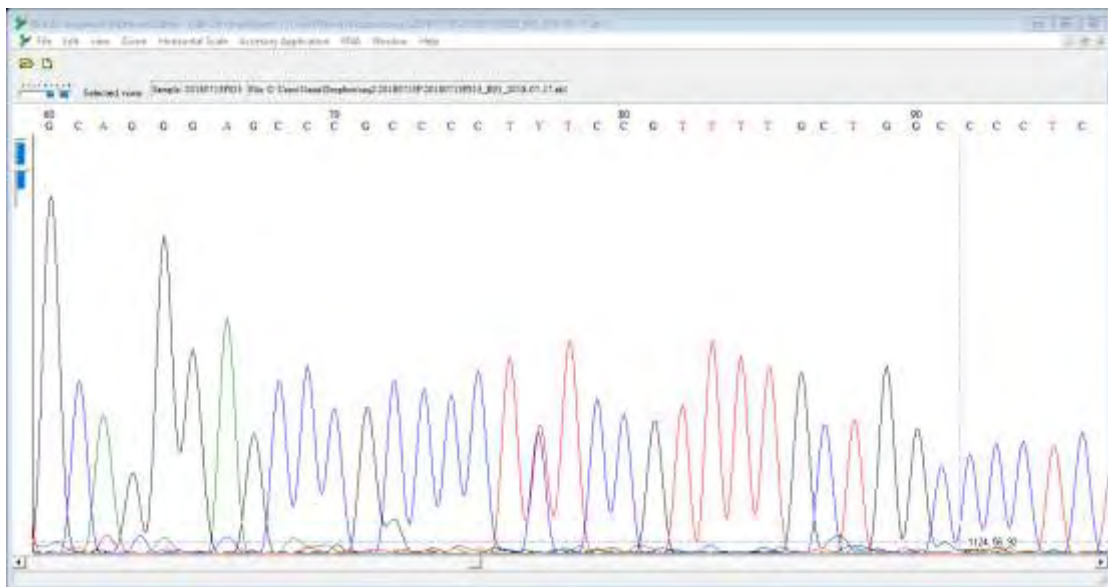
[Type here]

αλληλούχηση ενδεικτικά ένα δείγμα για κάθε πρότυπο. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά το PCR προϊόν της ιντερλευκίνης διακρίναμε πέντε διαφορετικά πρότυπα, ενώ όσον αφορά το PCR προϊόν του IRAK-1 παρατηρήσαμε έξι διαφορετικά πρότυπα.

Για κάθε ένα από τα διαφορετικά πρότυπα επιλέξαμε από ένα δείγμα το οποίο με επαρκή ποσότητα και αυξημένη συγκέντρωση DNA (περίπου 200 ng/ml). Σε κάθε ένα από αυτά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του προϊόντος με ειδικό kit και στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όπου και διαπιστώθηκε η επιτυχία του καθαρισμού. Στη συνέχεια τα συγκεκριμένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των γονοτύπων.

5) Αλληλούχηση προϊόντων PCR και 6) Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης :

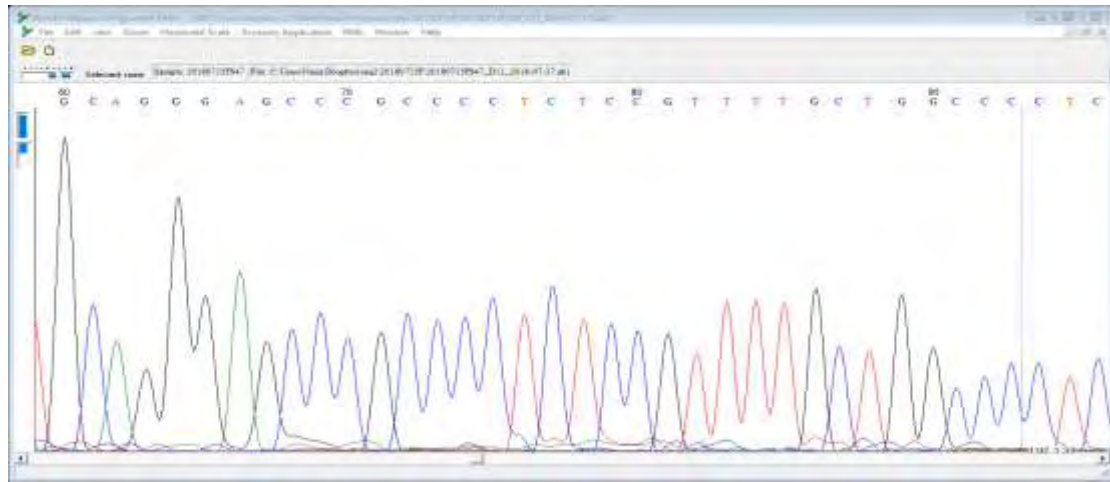
Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την αλληλούχηση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Bioedit. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται, ενδεικτικά, ένα χρωματογράφημα για ένα κάθε γονότυπο ως προς τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς.



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 3 του γονιδίου της IRAK-1, το οποίο αντιστοιχεί σε άτομο που είναι ετερόζυγο. Με βέλος σημειώνεται η θέση του πολυμορφισμού. Παρατηρούνται δύο καμπύλες διαφορετικού χρώματος στο ίδιο ύψος και η συγκεκριμένη θέση χαρακτηρίζεται ως Y.

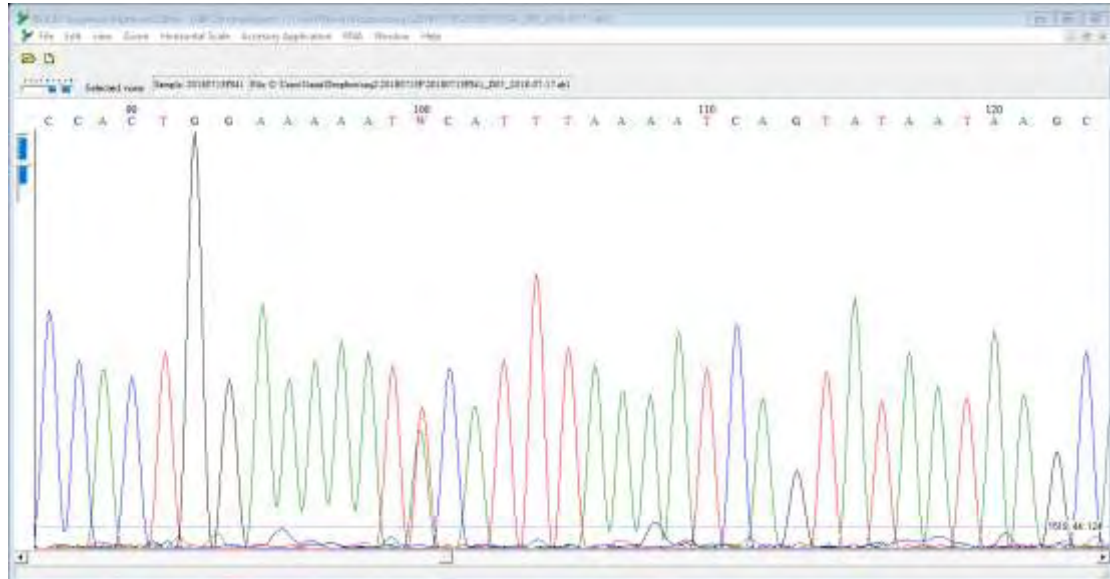
Σημείωση: Το συγκεκριμένο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στην «ανάγνωση» από την 3' προς την 5' αλυσίδα

[Type here]



Εικόνα 14: Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 2 του γονιδίου της IRAK-1, που αντιστοιχεί σε άτομο ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (G/G). Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού .

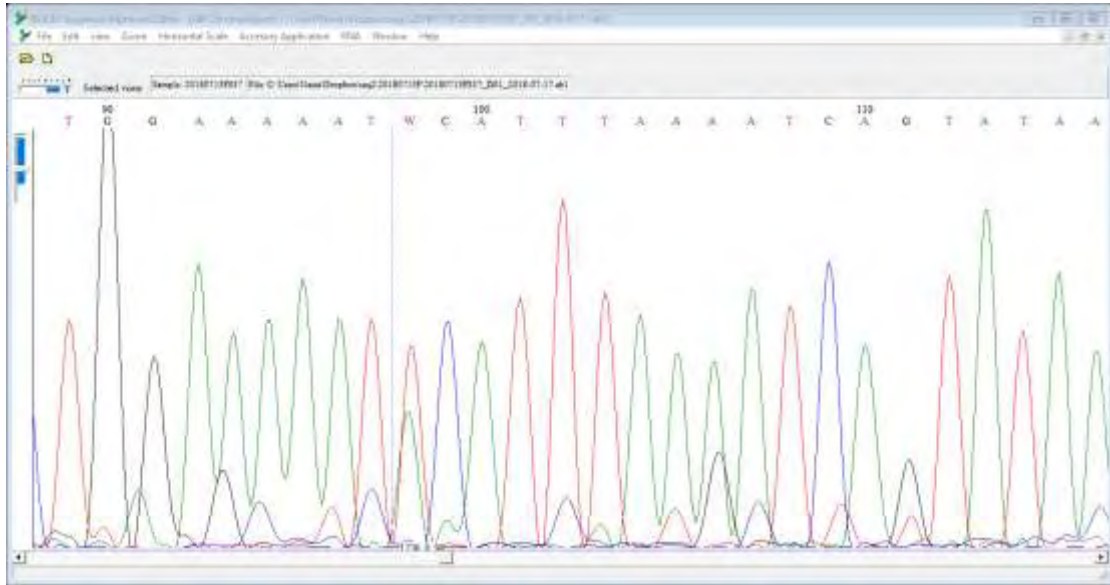
Σημείωση : Το συγκεκριμένο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στην «ανάγνωση» από την 3' προς την 5' αλυσίδα επομένως παρατηρούμε την συμπληρωματική αλληλουχία.



Εικόνα 15 : Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 4 του γονιδίου της ιντερλευκίνης 10, το οποίο αντιστοιχεί σε άτομο που είναι ετερόζυγο. Με βέλος σημειώνεται η θέση του πολυμορφισμού.

Σημείωση : Το συγκεκριμένο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στην «ανάγνωση» από την 5' προς την 3'.

[Type here]



Εικόνα 16 : Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στην αλληλούχηση του προτύπου 1 του γονιδίου της ιντερλευκίνης 10, που αντιστοιχεί σε άτομο που είναι ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο (A/A). Με βέλος σημειώνεται η θέση του υπό μελέτη πολυμορφισμού.

Σημείωση : Το συγκεκριμένο χρωματογράφημα αντιστοιχεί στην «ανάγνωση» από την 5' προς την 3' αλυσίδα.

Στους δυο παρακάτω πίνακες συνοψίζονται : ο αριθμός των δειγμάτων, το φύλο, η μορφή της νόσου, το πρότυπο που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και οι γονότυπος στον οποίο αντιστοιχεί ως προς το υπό μελέτη SNP στον γενετικό τόπο IRAK-1 μετά την αλληλούχηση.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ασθενών με σκληρόδερμα για το SNP στο γονίδιο της IRAK-1

Αριθμός δειγμάτων	Φύλο	Μορφή νόσου	Πρότυπο	Γονότυπος
1	Άρρεν	Διάχυτο	4	G/G
1	Άρρεν	Περιορισμένο	2	G/G
5	Θήλυ	Διάχυτο	1	G/G
4	Θήλυ	Διάχυτο	2	G/G
4	Θήλυ	Διάχυτο	3	Ετερόζυγοι
2	Θήλυ	Διάχυτο	4	G/G
1	Θήλυ	Διάχυτο	5	Ετερόζυγοι
3	Θήλυ	Διάχυτο	6	G/G

[Type here]

18	Θήλυ	Περιορισμένο	1	G/G
6	Θήλυ	Περιορισμένο	2	G/G
10	Θήλυ	Περιορισμένο	3	Ετερόζυγοι
1	Θήλυ	Περιορισμένο	4	G/G
4	Θήλυ	Περιορισμένο	5	Ετερόζυγοι
1	Θήλυ	Περιορισμένο	6	G/G

Πίνακας 5: Αποτελέσματα για τα άτομα ελέγχου για το SNP στο γονίδιο της IRAK-1

Αριθμός δειγμάτων	Φύλο	Πρότυπο	Γονότυπος
13	Θήλυ	1	G/G
5	Θήλυ	2	G/G
0	Θήλυ	3	Ετερόζυγοι
14	Θήλυ	4	G/G
6	Θήλυ	5	Ετερόζυγοι
0	Θήλυ	6	G/G

Ομοίως, για το υπό μελέτη SNP στο γενετικό τόπο της ιντερλευκίνης 10 εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία.

Στους δυο παρακάτω πίνακες συνοψίζονται : ο αριθμός των δειγμάτων, το πρότυπο που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και οι γονότυπος του υπό μελέτη SNP στο γενετικό τόπο της IL-10 στον οποίο αντιστοιχεί, όπως προέκυψε μετά από την αλληλούχηση.

[Type here]

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ασθενών με σκληρόδερμα για το SNP στο γονίδιο της IL-10

Αριθμός δειγμάτων	Φύλο	Μορφή της νόσου	Πρότυπο	Γονότυπος
1	Αρσενικό	Διάχυτο	1	A/A
1	Άρρεν	Περιορισμένο	2	A/A
7	Θήλυ	Διάχυτο	1	A/A
7	Θήλυ	Διάχυτο	2	A/A
2	Θήλυ	Διάχυτο	3	A/A
5	Θήλυ	Διάχυτο	4	Ετερόζυγοι
1	Θήλυ	Διάχυτο	5	Ετερόζυγοι
21	Θήλυ	Περιορισμένο	1	A/A
11	Θήλυ	Περιορισμένο	2	A/A
2	Θήλυ	Περιορισμένο	3	A/A
9	Θήλυ	Περιορισμένο	4	Ετερόζυγοι
4	Θήλυ	Περιορισμένο	5	Ετερόζυγοι

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ατόμων ελέγχου για το SNP στο γονίδιο της IL-10

Αριθός δειγμάτων	Φύλο	Πρότυπο	Γονότυπος
8	Άρρεν	1	A/A
4	Άρρεν	2	A/A
21	Θήλυ	1	A/A
4	Θήλυ	2	A/A
4	Θήλυ	3	A/A
2	Θήλυ	4	Ετερόζυγοι
9	Θήλυ	5	Ετερόζυγοι

Συνοψίζοντας, όσον αφορά τον πολυμορφισμό στο γονίδιο της IRAK-1, ο συνολικός αριθμός των ασθενών που ήταν ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G) ήταν ίσος με 42, ενώ 19 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι (G/A). Όσον αφορά τα άτομα ελέγχου, 32 άτομα ήταν ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο και 6 ήταν ετερόζυγοι, ως προς τον υπό μελέτη πολυμορφισμό.

[Type here]

Στην περίπτωση του SNP της ιντερλευκίνης 10, συνολικά 52 ασθενείς έφεραν το συχνό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία (A/A) και 19 ήταν ετερόζυγοι. Από τα άτομα ελέγχου, 41 ήταν ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο και 11 ήταν ετερόζυγοι.

Συζήτηση :

Η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί μια αυτοάνοση διαταραχή, καθώς ένα από τα συμπτώματά που τη χαρακτηρίζουν είναι η παραγωγή αυτοαντισωμάτων, δηλαδή αντισώματα ενάντια σε αντιγόνα που υπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό, όπως τα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων και συστατικά του πυρήνα των κυττάρων. Καθώς αποτελεί ταυτόχρονα ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που εμπλέκει πληθώρα διαφορετικών συστημάτων, δεν είναι εύκολη η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου.

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της παρουσίας πολυμορφισμών σε ένα νουκλεοτίδιο (SNPs) οι οποίοι εντοπίζονται στους γονιδιακούς τόπους όπου εδράζονται τα γονίδια της IRAK-1 και της ιντερλευκίνης 10. Τα προϊόντα των δυο αυτών γονιδίων συμμετέχουν σε μονοπάτια σηματοδότησης των ιντερλευκινών, οι οποίες αποτελούν κεντρικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι λοιπόν μπορούμε να υποθέσουμε ότι δυσλειτουργία των συγκεκριμένων μορίων εξαιτίας παρουσίας μεταλλάξεων στους γονιδιακούς τους τόπους μπορεί να οδηγήσει σε απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και αυξημένη προδιάθεση για την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η συστηματική σκλήρυνση.

Ανατρέχοντας στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν δυο συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στους παραπάνω γονιδιακούς τόπους για τους οποίους έχει δειχτεί στο παρελθόν συσχέτιση με την εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπούσε στη διερεύνηση της συχνότητας εμφάνισης αυτών των πολυμορφισμών στον ελληνικό πληθυσμό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση.

Με αυτόν τον στόχο, αρχικά έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με σκληρόδερμα, καθώς και από υγιή άτομα που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια ενισχύθηκαν μέσω PCR οι γονιδιακοί τόποι υπό μελέτη και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, από την οποία αναδείχθηκαν 6 διαφορετικά πρότυπα για το γονιδιακό τόπο της IRAK-1 και 5 για το γονίδιο της IL-10. Στη συνέχεια τα διαφορετικά πρότυπα αλληλουχήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαφορετικοί γονότυποι και ακολούθησε ανάλυση των αλληλουχιών με χρήση του προγράμματος Bioedit. Με βάση την στατιστική ανάλυση που ακολούθησε

[Type here]

έγινε αντιληπτό ότι όσον αφορά τα υπό μελέτη δείγματα, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του νοσήματος με τους δυο αυτούς πολυμορφισμούς.

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του SNP στο γονιδιακό τόπο IRAK-1, οι 42 από τους 61 ασθενείς βρέθηκε πως ήταν ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G), ενώ οι 19 ασθενείς βρέθηκαν ετερόζυγοι (G/A). Από τους υγιείς μάρτυρες της ομάδας ελέγχου, οι 34 από τους 40 βρέθηκε πως ήταν ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο, ενώ οι υπόλοιποι 6 ήταν ετερόζυγοι. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ούτε στα άτομα ελέγχου αλλά ούτε και στους ασθενείς δεν εντοπίστηκε ο γονότυπος A/A, δηλαδή ομοζυγωτία για το σπάνιο αλληλόμορφο, πιθανώς λόγω της σπανιότητας του συγκεκριμένου πολυμορφισμού στον γενικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 8.

Στην περίπτωση του SNP στον γονιδιακό τόπο της IL-10, από τους 71, συνολικά ασθενείς οι 52 έφεραν το συχνό αλληλόμορφο σε ομοζυγωτία, δηλαδή είχαν γονότυπο A/A, ενώ οι υπόλοιποι 19 ασθενείς βρέθηκε πως ήταν ετερόζυγοι, με γονότυπο A/T. Όσον αφορά τους υγιείς μάρτυρες της ομάδας ελέγχου, οι 41 από τα 52 βρέθηκε πως ήταν ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο, με γονότυπο A/A ενώ οι υπόλοιποι 11 ήταν ετερόζυγοι, με γονότυπο A/T. Και σε αυτήν την περίπτωση αξίζει να τονιστεί ότι δε διαπιστώσαμε την ύπαρξη του γονοτύπου T/T, δηλαδή ομοζυγωτία για το σπάνιο αλληλόμορφο. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 9.

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί, με βάση τη τρέχουσα βιβλιογραφία, την πρώτη προσέγγιση για τη συσχέτιση των γονιδιακών αυτών τόπων με το σκληρόδερμα στον ελληνικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αντίστοιχων μεγαλύτερων μελετών σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, πιθανώς λόγω του περιορισμένου αριθμού των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Απαιτείται, επομένως, αύξηση του αριθμού των δειγμάτων, τόσο ασθενών όσο και ατόμων ελέγχου και περαιτέρω έρευνα ώστε να γίνει αντιληπτό εάν όντως η ύπαρξη των πολυμορφισμών αυτών στο γονιδίωμα προσδίδει στο άτομο που τους φέρει ευαισθησία ως προς την εμφάνιση τους σκληροδέρματος.

Τέλος, είναι σημαντικό να διερευνηθούν περαιτέρω οι συγκεκριμένοι γονιδιακοί τόποι και να προσδιοριστεί η συχνότητα και άλλων πολυμορφισμών, η ύπαρξη των οποίων διαπιστώθηκε τόσο μέσω της εμφάνισης διαφορετικών προτύπων στη διαδικασία SSCP όσο και από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η πληθυσμιακή ομάδα στην οποία ανήκει το άτομο είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση της νόσου. Επομένως είναι πιθανό στον ελληνικό πληθυσμό η εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών γενετικών «παραλλαγών» από αυτές που έχουν εντοπιστεί σε Ευρωπαίους. Για το λόγο αυτό, η παρούσα έρευνα

[Type here]

ανοίγει νέες προοπτικές για τη μελέτη της συστηματικής σκλήρυνσης σε επίπεδο γονιδιώματος. Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη νόσο μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά τη βάση για τη θεραπεία αυτής της σοβαρής διαταραχής η οποία επηρεάζει και τα άτομα του ελληνικού πληθυσμού.

Πίνακας 8 : Σύνοψη γονοτύπων ασθενών και ατόμων ελέγχου, ως προς το SNP στο γονίδιο της IRAK-1

Γονότυπος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ατόμων ελέγχου	Σύνολο
G/G	42	34	76
G/A	19	6	25
A/A	0	0	0
Σύνολο	61	40	101

Πίνακας 9 : Σύνοψη γονοτύπων ασθενών και ατόμων ελέγχου, ως προς το SNP στο γονίδιο της IL-10

Γονότυπος	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ατόμων ελέγχου	Σύνολο
A/A	52	41	93
T/T	0	0	0
A/T	19	11	30
Σύνολο	71	52	123

Σημείωση : Μετά την ενότητα «βιβλιογραφία» υπάρχει παράρτημα, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά ο αριθμός του κάθε δείγματος, το φύλο του ατόμου, η μορφή της νόσου, το πρότυπο που προέκυψε από την

[Type here]

ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ο γονότυπος στον οποίο αντιστοιχεί ως προς τον υπό μελέτη πολυμορφισμό.

4. Βιβλιογραφία :

[1] : Yannick Allanore, Philippe Dieude and Catherine Boileau, 'Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage' RHEUMATOLOGY, 2010

[2] : Gloria Salazar, MD and Maureen D. Mayes, 'Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis' HHS Public Access, 2015

[3] : Yannick Allanore, Robert Simms, Oliver Distler, Maria Trojanowska, Janet Pope, Christopher P. Denton and John Varga 'Systemic sclerosis' PRIMER, 2015

[4] : Paula S. Ramos, Richard M. Silver, Carol A. Feghali – Bostwick 'Genetics of Systemic Sclerosis' Current Opinion, 2015

[5] : Fibroblast biology Medical Images For PowerPoint

[6] : Sara M. Garret, DeAnna Baker Frost, and Carol Feghali-Bostwick 'The mighty fibroblast and its utility in scleroderma research', HHS Public Access 2017

[7] : LeRoy EC1, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wollheim F. 'Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis', J Rheumatol. 2009

[8] : Cristiano Sacchetti, Yunpeng Bai, Stephanie M. Stanford, Paola Di Benedetto, Paola Cipriani, Eugenio Santelli, Sonsoles Piera-Velazquez, Vladimir Chernitskiy, William B. Kiosses, Arnold Ceponis, Klaus H. Kaestner, Francesco Boin, Sergio A. Jimenez, Roberto Giacomelli, Zhong-Yin Zhang & Nunzio Bottini 'PTP4A1 promotes TGF β signaling and fibrosis in systemic sclerosis', Nature 2017

[9] : Emma C. Derrett-Smith, Viktor Martyanov, Cecilia B. Chighizola⁴, Pia Moinzadeh, Corrado Campochiaro, Korsia Khan, Tammara A. Wood, Pier Luigi Meroni, David J. Abraham, Voon H. Ong, Robert Lafyatis, Michael L. Whitfield and Christopher P. Denton '

Limited cutaneous systemic sclerosis skin demonstrates distinct molecular subsets separated by a cardiovascular development gene expression signature' Arthritis Research & Therapy 2017

[10] : Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. 'Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts' Arthritis Rheum 2001

[Type here]

[11] : Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. 'Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies' *Arthritis Rheum* 2003

[12] : Γαϊτανάκη Αι., Μπαξεβάνης Κ. (επιμ.) (2013) 'ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ' (σ.10), Νικοσία, Κύπρος: Broken Hill Publishers LTD

[13] : Γαϊτανάκη Αι., Μπαξεβάνης Κ. (επιμ.) (2013) 'ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ' (σ.75-76), Νικοσία, Κύπρος: Broken Hill Publishers LTD

[14] : Γαϊτανάκη Αι., Μπαξεβάνης Κ. (επιμ.) (2013) 'ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ' (σ.27), Νικοσία, Κύπρος: Broken Hill Publishers LTD

[15] : Γαϊτανάκη Αι., Μπαξεβάνης Κ. (επιμ.) (2013) 'ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ' (σ.14-16), Νικοσία, Κύπρος: Broken Hill Publishers LTD

[16] : Lazaros I. sakkas MD DM PhD (london) FRCP (london) and Dimitrios P. Bogdanos MD PhD (london) 'The Role of B cells in the Pathogenesis of systemic sclerosis', Israel-Greece Meet InG, 2016

[17] : F. David Carmona, M Carmen Cénit, Lina-Marcela Diaz-Gallo, Jasper C A Broen, Carmen P Simeón, Patricia E Carreira, José-Luis Callejas-Rubio, Vicente Fonollosa, Francisco J López-Longo, Miguel A González-Gay, Nicolas Hunzelmann, Gabriela Riemekasten, Torsten Witte, Alexander Kreuter, Jörg H W Distler, Rajan Madhok, Paul Shiels, Jacob M van Laar, Annemie J Schuerwegh, Madelon C Vonk, Alexandre E Voskuyl, Carmen Fonseca, Christopher P Denton, Ariane Herrick, Jane Worthington, Frank C Arnett, Filemon K Tan, Shervin Assassi, Timothy R D J Radstake, Maureen D Mayes, Javier Martín, and Spanish Scleroderma Group 'New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis', NIH Public Access, 2013

[18] : P. Dieudé, M. Bouaziz, M. Guedj, G. Riemekasten, P. Airò, M. Muller, D. Cusi, M. Matucci-Cerinic, I. Melchers, W. Koenig, E. Salvi, H. E. Wichmann, G. Cuomo, E. Hachulla, E. Diot, N. Hunzelmann, 13 P. Caramaschi, 14 L. Mouthon, 15 V. Riccieri, 16 J. Distler, 17 I. Turner, 18 J. Avouac, 15 O. Meyer, 19 A. Kahan, G. Chiochia, C. Boileau, and Y. Allanore, 'Evidence of the Contribution of the X Chromosome to Systemic Sclerosis Susceptibility Association With the Functional IRAK1 196Phe/532Ser Haplotype' 2011

[19] : Anne Holtorf, Anja Conrad, Bernhard Holzmann & Klaus-Peter Janssen 'Cell-type specific MyD88 signaling is required for intestinal tumor initiation and progression to malignancy' *Oncolmmunology* 2018

[20] : Wojcik GL, Fuchsberger C, Taliun D, Welch R, Martin AR, Shringarpure S, Carlson CS, Abecasis G, Kang HM, Boehnke M, Bustamante CD, Gignoux CR, Kenny EE, 'Imputation-Aware Tag SNP Selection To Improve Power for Large-Scale, Multi-ethnic Association Studies' G3, 2018

[Type here]

[21] : Linda Broer, Cornelia M. van Duijn 'Advances in Experimental Medicine and Biology', κεφ. 'GWAS and Meta-Analysis in Aging/Longevity'(σ.107-125), Rotterdam, Netherlands, 2015

[22] : Polymerase Chain Reaction', MeSH, 1991

[23] : Maria S. Jimenez Jose M. Luque-Alled Teresa Gomez Juan R. Castillo, 'Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products', Electrophoresis, 2016

[24] : Amy M. Beebe, Daniel J Cua Rene de Waal Malefyt 'The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS)', ELSEVIER, 2002

[25] : Kakavas V. Konstantinos, Plageras Panagiotis E., Vlachos T. Antonios Papaioannou, Agelos Noulas, V. Argiris, 'PCR-SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases', Mol Biotechnol, 2008

[26] : Peng WJ, Wang BX, Pan HF, Tao JH, Zhang JQ, He Q, Xiao CC, Wang J. 'Association of the interleukin-10 1082G/A, 819C/T and 3575T/A gene polymorphisms with systemic sclerosis: a meta-analysis', Molecular Biology Reports, 2012

[27] : P. H. Salim, M. Jobim†, M. Bredemeier, J. A. B. Chies, J. C. T. Brenol, L. F. Jobim & R. M. Xavier, 'Interleukin-10 Gene Promoter and NFKB1 Promoter Insertion/Deletion Polymorphisms in Systemic Sclerosis', HUMAN IMMUNOLOGY, 2012

[28] : Meng-Shan Tan, Teng Jiang, Lan Tan, Jin-Tai Yu 'Genome-wide association studies in neurology', Review Article, 2013

[29] : Zhi-Ming Dai¹, Ai-Li He¹, Wang-Gang Zhang, Jie Liu¹, Xing-Mei Cao, Yin-Xia Chen, Xiao-Rong Ma, Wan-Hong Zhao, Zhi-Jun Dai, 'Association of the four common polymorphisms in interleukin-10 (rs1800890, rs1800896, rs1800871, and rs1800872) with non-Hodgkin's lymphoma risk: a meta-analysis', International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2014

[Type here]

Παράρτημα :

Αριθμός δείγματος	Φύλο	Μορφή νόσου	Πρότυπο SSCP για το SNP IRAK-1	Γονότυπος	Πρότυπο SSCP για το SNP IL-10	Γονότυπος
S1	Θήλυ	diffuse	1	G/G	2	A/A
S2	Θήλυ	limited	2	G/G	2	A/A
S3	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S4	Θήλυ	limited	1	G/G	2	A/A
S5	Θήλυ	diffuse	2	G/G	1	A/A
S6	Θήλυ	diffuse	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S7	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S8	Θήλυ	limited	1	G/G	2	A/A
S9	Θήλυ	limited	1	G/G	4	Ετερόζυγο
S12	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S13	Θήλυ	limited	2	G/G	4	Ετερόζυγο
S14	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S15	Θήλυ	limited	2	G/G	2	A/A
S16	Θήλυ	limited	1	G/G	4	Ετερόζυγο
S17	Θήλυ	diffuse	1	G/G	2	A/A
S18	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	4	Ετερόζυγο
S20	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S21	Θήλυ	limited	2	G/G	1	A/A
S22	Θήλυ	diffuse	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S23	Θήλυ	limited	1	G/G	4	Ετερόζυγο
S25	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S26	Θήλυ	diffuse	5	Ετερόζυγο	5	Ετερόζυγο
S27	Άρρεν	diffuse	4	G/G	1	A/A
S30	Θήλυ	limited	2	G/G	-	-
S32	Θήλυ	diffuse	2	G/G	3	A/A
S33	Θήλυ	diffuse	3	Ετερόζυγο	-	-
S36	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	-	A/A
S37	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	4	Ετερόζυγο
S39	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	2	A/A
S40	Άρρεν	limited	1	G/G	2	A/A
S41	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S42	Θήλυ	limited	4	G/G	3	A/A
S43	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S45	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S46	Θήλυ	limited	5	Ετερόζυγο	-	-
S47	Θήλυ	limited	5	Ετερόζυγο	2	A/A

[Type here]

S48	Θήλυ	limited	5	Ετερόζυγο	2	A/A
S49	Θήλυ	diffuse	4	G/G	2	A/A
S52	Θήλυ	limited	1	G/G	4	Ετερόζυγο
S53	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	1	A/A
S54	Θήλυ	diffuse	3	Ετερόζυγο	2	A/A
S55	Θήλυ	limited	3	Ετερόζυγο	2	A/A
S56	Θήλυ	diffuse	-	-	1	A/A
S57	Θήλυ	diffuse	-	-	1	A/A
S58	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S59	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S60	Θήλυ	limited	1	G/G	3	A/A
S61	Θήλυ	limited	-	-	4	Ετερόζυγο
S62	Θήλυ	limited	1	G/G	1	A/A
S65	Θήλυ	limited	1	G/G	2	A/A
S66	Θήλυ	limited	-	-	1	A/A
S67	Θήλυ	limited	2	G/G	2	A/A
S68	Θήλυ	limited	-	-	2	A/A
S69	Θήλυ	limited	-	-	4	Ετερόζυγο
S70	Θήλυ	limited	6	G/G	1	A/A
S71	Θήλυ	diffuse	2	G/G	1	A/A
S74	Θήλυ	limited	5	Ετερόζυγο	1	A/A
S75	Θήλυ	diffuse	1	G/G	2	A/A
S76	Θήλυ	diffuse	1	G/G	2	A/A
S78	Θήλυ	diffuse	1	G/G	2	A/A
S79	Θήλυ	limited	-	-	1	A/A
S82	Θήλυ	limited	-	-	5	Ετερόζυγο
S84	Θήλυ	limited	1	G/G	5	Ετερόζυγο
S85	Θήλυ	limited	1	G/G	5	Ετερόζυγο
S87	Θήλυ	limited	-	-	1	A/A
S91	Θήλυ	limited	-	-	5	Ετερόζυγο
S93	Θήλυ	limited	-	-	1	A/A
S94	Θήλυ	diffuse	6	G/G	1	A/A
S96	Θήλυ	limited	-	-	1	A/A
S97	Θήλυ	diffuse	6	G/G	4	Ετερόζυγο
S99	Θήλυ	diffuse	6	G/G	4	Ετερόζυγο
S100	Θήλυ	diffuse	1	G/G	3	A/A
S101	Θήλυ	diffuse	1	G/G	4	Ετερόζυγο
S102	Θήλυ	diffuse	2	G/G	4	Ετερόζυγο
S124	Θήλυ	diffuse	1	G/G	4	Ετερόζυγο
Άτομα ελέγχου						

[Type here]

M3	Άρρεν	-	4	G/G	2	A/A
M4	Άρρεν	-	1	G/G	2	A/A
M5	Άρρεν	-	1	G/G	3	A/A
M6	Άρρεν	-	4	G/G	1	A/A
M8	Άρρεν	-	1	G/G	5	Ετερόζυγο
M9	Άρρεν	-	1	G/G	1	A/A
M12	Άρρεν	-	1	G/G	1	A/A
C1	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	1	A/A
C2	Θήλυ	-	1	G/G	1	A/A
C3	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	1	A/A
C4	Θήλυ	-	1	G/G	1	A/A
C5	Θήλυ	-	2	G/G	1	A/A
C6	Θήλυ	-	2	G/G	1	A/A
C7	Άρρεν	-	1	G/G	1	A/A
C8	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	1	A/A
C9	Θήλυ	-	1	G/G	1	A/A
C10	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	1	A/A
C11	Θήλυ	-	2	G/G	1	A/A
C12	Θήλυ	-	2	G/G	1	A/A
C13	Θήλυ	-	4	G/G	1	A/A
C14	Θήλυ	-	4	G/G	1	A/A
C15	Θήλυ	-	1	G/G	1	A/A
C16	Θήλυ	-	4	G/G	4	A/A
C17	Θήλυ	-	4	G/G	4	A/A
C18	Θήλυ	-	4	G/G	1	A/A
C19	Θήλυ	-	2	G/G	5	Ετερόζυγο
C20	Θήλυ	-	1	G/G	3	A/A
C21	Θήλυ	-	1	G/G	1	A/A
C22	Θήλυ	-	-	-	5	A/A
C23	Θήλυ	-	4	G/G	3	A/A
C24	Θήλυ	-	4	G/G	3	A/A
C25	Θήλυ	-	4	G/G	5	Ετερόζυγο
C26	Θήλυ	-	4	G/G	5	Ετερόζυγο
C27	Θήλυ	-	4	G/G	5	Ετερόζυγο
C28	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	5	Ετερόζυγο
C29	Θήλυ	-	5	Ετερόζυγο	5	Ετερόζυγο
C30	Θήλυ	-	1	G/G	5	Ετερόζυγο
C31	Θήλυ	-	4	G/G	1	A/A
C32	Θήλυ	-	4	G/G	-	-
C33	Θήλυ	-	-	-	2	A/A
C35	Θήλυ	-	-	-	2	A/A
C41	Άρρεν	-	-	-	1	A/A

[Type here]

C42	Άρρεν	-	-	-	2	A/A
C43	Άρρεν	-	-	-	2	A/A
C44	Άρρεν	-	-	-	2	A/A
C45	Άρρεν	-	-	-	2	A/A
C46	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C47	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C48	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C49	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C50	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C51	Άρρεν	-	-	-	1	A/A
C52	Άρρεν	-	-	-	1	A/A