



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«Ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών των γονιδίων
CTGF και PXC, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση»**

**«An association study of SNPs on the CTGF and PXC genes
on patients with systemic sclerosis»**

Αθηνά Ταβερναράκη-Τριανταφύλλου

Λάρισα 2018

Τριμελής επιτροπή :

Ζήσης Μαμούρης Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών (επιβλέπων)

Θεολογία Σαραφίδου Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής
Ζωικών Οργανισμών

Λάζαρος Ι. Σακκάς Καθηγητής Παθολογίας και Ρευματολογίας Τμήματος
Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μια σπάνια αυτοάνοση ασθένεια του συνδετικού ιστού που επηρεάζει κυρίως γυναίκες. Χαρακτηρίζεται από ίνωση και φλεγμονή του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων. Ως πολυπαραγοντικό νόσημα εκδηλώνεται σε άτομα με επιτρεπτικό γενετικό υπόβαθρο κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Έρευνες έχουν αναδείξει γενετικούς τόπους και μεταλλαγές που σχετίζονται με την ασθένεια. Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής επιλέχθηκαν τα γονίδια CTGF και PXC τα οποία εμπλέκονται σε μονοπάτια σχετικά με την ίνωση και μελετήθηκαν δύο SNPs των γονιδίων αυτών, που έχουν συσχετιστεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς με την ασθένεια. Απώτερος σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την εμφάνιση καθώς και με τους διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους της νόσου σε ελληνικό πληθυσμό ασθενών

Abstract

Systemic sclerosis is a rare autoimmune disease of the connective tissue that affects mostly women. It is characterized by fibrosis and inflammation of the skin, blood vessels and internal organs. Being a multifactorial disease, it is believed to occur in genetically susceptible individuals after the effect of various environmental triggers. Studies have shown mutations on specific genetic loci connected with the disease pathogenesis. In this study, two genes involved in fibrosis pathways were chosen to be studied. Two specific mutations (SNPs) on these genetic loci, that have been previously associated with the disease were selected from the existing literature. The aim of this study was to investigate the association of these specific SNPs with the disease, as well with its different clinical phenotypes in a Greek population with systemic sclerosis.

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με θέμα «Ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών των γονιδίων CTGF και ΡΧΚ, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση» εκπονήθηκε στο εργαστήριο γενετικής και εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μαμούρη Ζήση, την κα. Σαραφίδου Θεολογία και τον κ. Σακκά Λάζαρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν με την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα Πλαγερά Δημήτριο για την άριστη συνεργασία, την υπομονή και την πολύτιμη καθοδήγηση.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω τους όλους τους καθηγητές, τους υποψήφιους διδάκτορες και το προσωπικό του εργαστηρίου για την υποστήριξη, τη βοήθεια και τις ουσιώδεις συμβουλές.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract	2
1 Εισαγωγή	6
1.1 Συστηματική Σκλήρυνση	6
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	6
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά.....	6
1.1.3 Παθοφυσιολογία.....	8
1.1.4 Επιδημιολογία.....	10
1.1.5 Γενετικό υπόβαθρο	11
1.2 Έρευνες	14
1.3 Γενετικοί τόποι συσχετιζόμενοι με την συστηματική σκλήρυνση 16	
1.3.1 Περιοχή μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας-MHC.....	16
1.3.2 Γονίδια έμφυτης ανοσίας	17
1.3.3 Γονίδια επίκτητης ανοσίας	17
1.3.4 Γονίδια που εμπλέκονται στην διακυτταρική επικοινωνία..	17
1.3.5 Γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή και την αποικοδόμηση εξωκύτταριου υλικού	18
1.3.6 Γονίδια που εδράζονται στο Χ χρωμόσωμα	18
1.3.7 Ιντρόνια και διαγονιδιακές περιοχές.....	19
1.3.8 Επιγενετικοί Παράγοντες	19
1.3.9 miRNAs και lnc-RNA	20
1.3.10 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων.....	20
1.4 Πολυμορφισμοί υπό μελέτη	20
1.4.1 CTGF	21
1.4.2 ΡΧΚ	23
2 Μέθοδοι.....	25
2.1 Δείγματα.....	25
2.2 Απομόνωση DNA	25
2.3 Φωτομέτρηση.....	25
2.4 BLAST Basic Local Alignment Search Tool	26
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	26
2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	28

2.7	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	30
2.8	Αλληλούχηση προϊόντων PCR.....	33
2.9	Ανάλυση χρωματογραφημάτων αλληλούχησης	33
3	Αποτελέσματα.....	35
3.1	Απομόνωση DNA	35
3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	35
3.3	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	36
3.4	Αλληλούχηση προϊόντων PCR.....	37
3.5	Στατιστική ανάλυση.....	40
4	Συζήτηση	48
5	Βιβλιογραφία.....	50

1 Εισαγωγή

1.1 Συστηματική Σκλήρυνση

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η συστηματική σκλήρυνση (SSc, σκληρόδερμα) είναι ένα σπάνιο πολυπαραγοντικό αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού με προσβολή του δέρματος και εσωτερικών οργάνων. Εκδηλώνεται συνήθως κατά τη μέση ηλικία. Θεωρείται πως εμφανίζεται σε άτομα με γενετική προδιάθεση, μετά από έκθεση σε κατάλληλο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Το ακριβές περιβαλλοντικό ερέθισμα, παραμένει άγνωστο, ωστόσο εικάζεται ότι μολύνσεις από κυτταρομεγαλοϊό, ιό epstein barr, toxoplasma gondii και rhodotogula ίσως να αποτελούν περιβαλλοντικούς παράγοντες που παίζουν καταλυτικό ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας (Pattanaik et al). Επίσης έχει προταθεί πως η έλλειψη βιταμίνης D είναι πιθανό να οδηγεί σε απορρύθμιση του ανοσοποιητικού και συνεπώς στην αυτοανοσία (Yangyang et al).

1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά

Κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας αποτελεί η φλεγμονή και ίνωση του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων ως απάντηση σε ιστική βλάβη. Εμφανίζεται σταδιακά σκλήρυνση και ίνωση του δέρματος ενώ παράλληλα επηρεάζονται το ανοσοποιητικό και το μικραγγειακό σύστημα (Pattanaik et al). Ο ακριβής μηχανισμός της αγγειοπάθειας δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί, ωστόσο ως πιθανοί μηχανισμοί βλάβης των αγγείων αναφέρονται ενδεικτικά: οι ρίζες NO, μολυσματικοί παράγοντες και αυτοαντισώματα που προκαλούν κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντίσωμα μέσω των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (Pattanaik et al).

Εξαιτίας της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού, παράγονται αυτοαντισώματα και ενεργοποιούνται οι ινοβλάστες (Pattanaik et al). Η δυσλειτουργία των ινοβλαστών οδηγεί στην υπέρμετρη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριου υλικού το οποίο αποτελείται από κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες (Allanore et al). Η σταδιακά αυξανόμενη εναπόθεση εξωκυττάριου υλικού ονομάζεται

ίνωση. Έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ουλώδους ιστού και συνεπώς την πρόκληση αγγειοπάθειας που περιλαμβάνει: μείωση διαπερατότητας των αγγείων και του αγγειακού τόνου παράλληλα με την εμφάνιση τηλεαγγειεκτασίας. Έτσι δημιουργούνται αλλαγές στα τριχοειδή αγγεία των νεφρών, των πνευμόνων, της καρδιάς και των μυών που τα καθιστούν δυσλειτουργικά καθώς χάνουν την ελαστικότητά τους λόγω της εναπόθεσης κολλαγόνου. Η ίνωση σε ζωτικά όργανα όπως αυτά έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών (Allanore et al, Pattanaik et al).

Η SSc είναι μια ιδιαίτερα ετερογενής νόσος με άγνωστη αιτιολογία και ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις αναλόγως το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο. Γενικά οι ασθενείς διαχωρίζονται σε δύο βασικούς υποτύπους (ομάδες), σε ασθενείς με εστιασμένη συστηματική σκλήρυνση και ασθενείς με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση. Ο διαχωρισμός γίνεται βάση των διαφορετικών κλινικών χαρακτηριστικών των υποτύπων, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά υποτύπων της συστηματικής σκλήρυνσης προσαρμοσμένος από Allanore et al, Pattanaik et al, Salazar et al.

Υπότυπος Συμπτώματα	Εστιασμένη Συστηματική Σκλήρυνση	Διάχυτη Συστηματική Σκλήρυνση
Στόχοι αυτοαντισωμάτων	Πρωτεΐνες του κεντρομερούς (ACA)	RNA πολυμεράσηIII ΤοποϊσομεράσηI (ATA)
Δέρμα	Εντοπισμένη/ Περιφερική αλλοίωση	Ταχύτατη ίνωση
Πνεύμονες	Πνευμονική υπέρταση	Πνευμονική ίνωση
Πρόγνωση	Καλή	Φτωχή
Γενικά χαρακτηριστικά	Φαινόμενο Raynaud Σκληροδακτυλία	Επιπλοκές σε: Νεφρούς, Καρδιά, Πνεύμονες

1.1.3 Παθοφυσιολογία

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μία χρόνια ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, λόγω απορύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και υπερπαραγωγής αυτοαντισωμάτων, βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων και ανεξέλεγκτη παραγωγή εξωκυττάριου υλικού, που οδηγεί στην ίνωση (Allanore et al).

Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων είναι αποτέλεσμα της παρατεταμένης και απορυθμισμένης ενεργοποίησης T και B λεμφοκυττάρων του οργανισμού. Επιπλέον στοιχεία που συμμετέχουν στην αυτοανοσία είναι η παρουσία φλεγμονωδών μορίων στους ασθενείς (Allanore, Simms et al).

Στους κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου συμπεριλαμβάνονται ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, B και T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Σημαντικοί μεσολαβητές της κυτταρικής ενεργοποίησης είναι ο TGF- β (transforming growth factor- β), οι ιντερλευκίνες IL-6 και IL-13, η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη 2 και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Allanore, Simms et al).

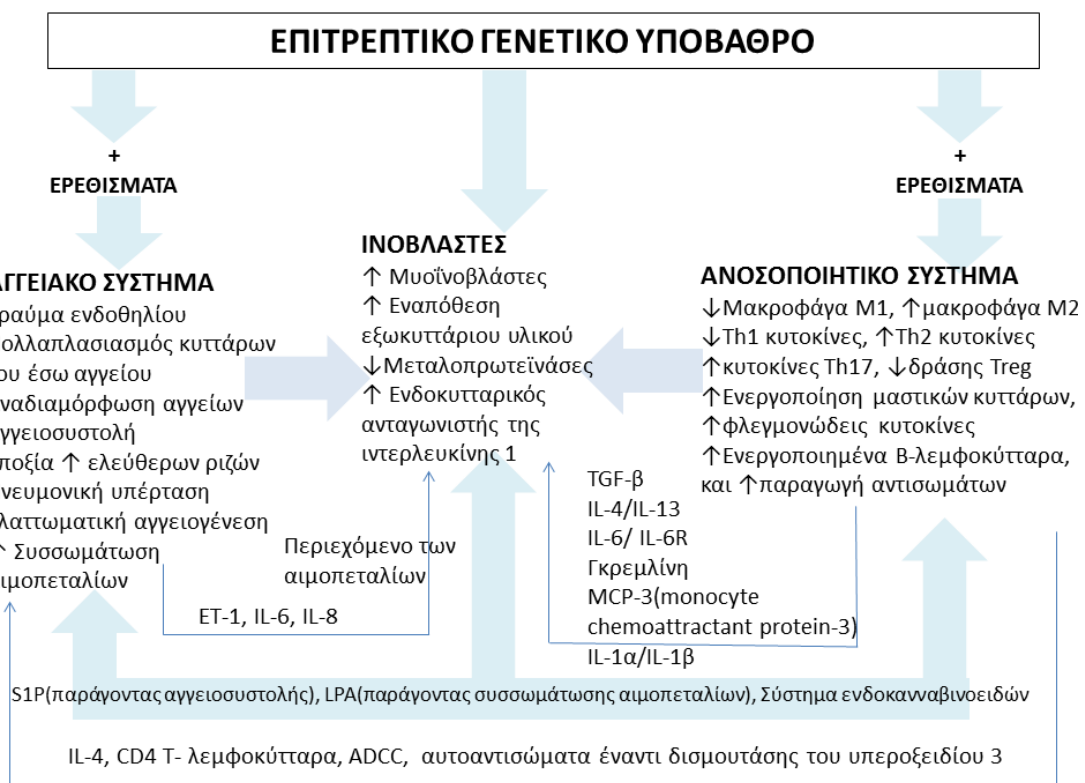
Ο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένα από τα αρχικά κεντρικά γεγονότα στην εξέλιξη της ασθένειας. Ως πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης μικροαγγειακής βλάβης έχουν προταθεί διάφοροι ιοί (π.χ. CMV) καθώς και η δραστή κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, διαμεσολαβούμενη από αυτό-αντίσωμα (Pattanaik et al).

Το κύριο χαρακτηριστικό της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η σταδιακή συσσώρευση στους ιστούς ινώδους εξωκυτταρικού υλικού αποτελούμενο από κολλαγόνο, ελαστίνη, γλυζαμινογλυκάνες και φμπρονεκτίνη. Η διαδικασία αυτή είναι αποτέλεσμα της βλάβης στη λειτουργία των ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Η οποία οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση εξωκυττάριου υλικού, που σε συνδυασμό με την ελαττωματική αποικοδόμησή του οδηγεί προοδευτικά στην εμφάνιση ίνωσης και ουλώδους ιστού (Allanore et al).

Οι ινοβλάστες και μυοϊνοβλαστών του ινώδους ιστού χαρακτηρίζονται ανθεκτικότητα στην απόπτωση και παραγωγή εκτός από εξωκυττάριο υλικό και TGF-β (αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης), συμβάλλοντας έτσι στην επιπλέον συσσώρευσή του. Έχουν βρεθεί σε αυτούς ισομορφές μορίων του εξωκυττάρου υλικού όπως είναι η φιβρονεκτίνη που έχουν προκύψει από εναλλακτικό μάτισμα. Οι ισομορφές αυτές έχει δειχθεί ότι προσδένονται άμεσα σε υποδοχείς TLR4 (toll-like receptor υποδοχείς που αναγνωρίζουν πρότυπα σε παθογόνα) στην επιφάνεια στρωματικών κυττάρων και επάγουν την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών (Pattanaik et al).

Οι ιντερφερόνες τύπου I και II εκτός από γνωστοί ανοσορυθμιστές, ρυθμίζουν και την παραγωγή κολαγόνου. Επομένως είναι πιθανόν να έχουν κύριο ρόλο στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης.

Η αλληλεπίδραση των παραγόντων που συνεισφέρουν στην εμφάνιση και την πρόοδο της ασθένειας συνοψίζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1: Παθογένεση της συστηματικής σκλήρυνσης και αλληλεπιδράσεις ορισμένων παραγόντων. προσαρμοσμένο από Pattanaik et al

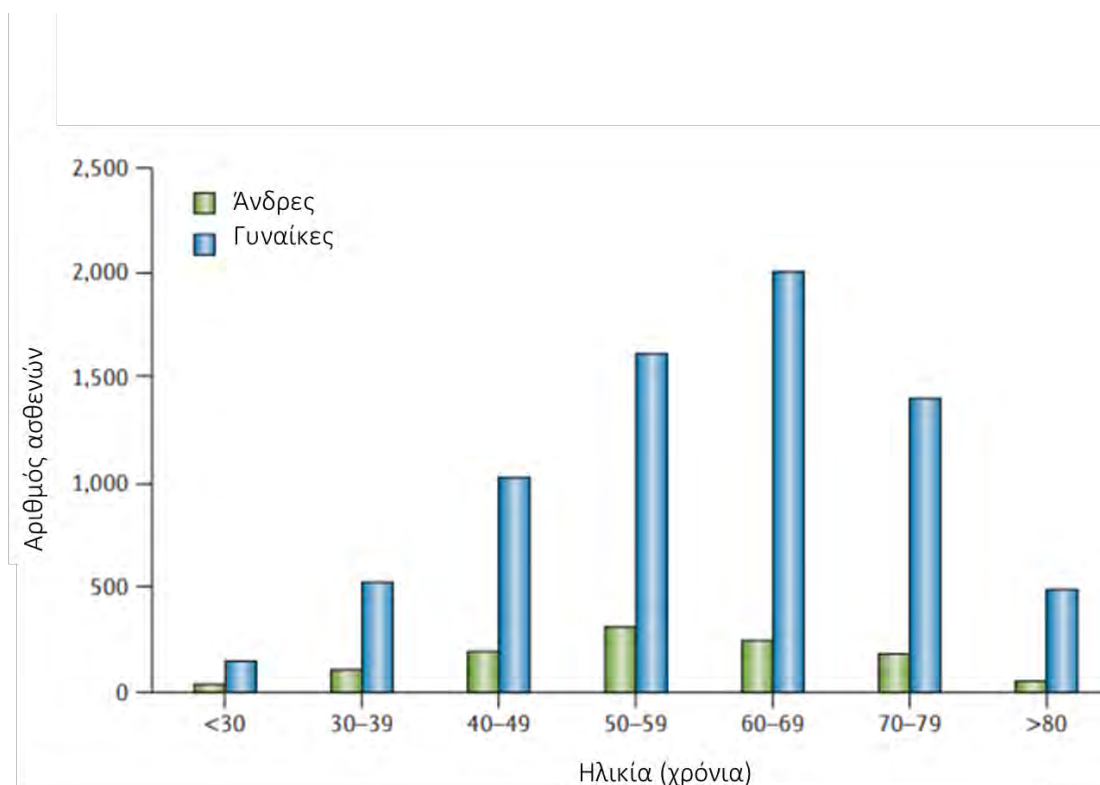
1.1.4 Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός και η επίπτωση της ασθένειας ποικίλουν ανάμεσα σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται περίπου σε 150 ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού και η επίπτωση σε 10 νέα περιστατικά/εκατομμύριο πληθυσμού το χρόνο σε Ιαπωνικούς και βόριο-Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ οι αντίστοιχες τιμές εκτιμώνται από 276 μέχρι 443 ασθενείς/εκατομμύριο και από 14 μέχρι 21 νέες περιπτώσεις/εκατομμύριο το χρόνο σε νότιο-Ευρωπαϊκούς, βόριο-Αμερικανικούς και Αυστραλιανούς πληθυσμούς (Allanore, Simms et al).

Η νόσος, όπως και τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε γυναίκες σε σχέση με άντρες. Αναφέρονται χαρακτηριστικά στοιχεία επιπολασμού της συστηματικής σκλήρυνσης από Σουηδικό πληθυσμό : 88 άντρες ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού και 514 γυναίκες ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού. Ταυτόχρονα έχει δειχτεί πως οι άντρες ασθενείς εμφανίζουν βαρύτερη κλινική εικόνα, επομένως το άρρεν φύλο θεωρείται φτωχός προγνωστικός παράγοντας (Allanore, Simms et al, Salazar et al).

Πέρα από το φύλο, έχει φανεί ότι και η εθνικότητα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αλλά και την εκδήλωση της ασθένειας. Για παράδειγμα, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας είναι αυξημένη στους Ευρωπαϊκούς σε σχέση με τους Ασιατικούς πληθυσμούς ενώ στους Αφροαμερικάνους η νόσος εμφανίζεται συχνότερα και ταυτόχρονα παρατηρείται μεγαλύτερη νοσηρότητα, καθώς στον συγκεκριμένο πληθυσμό έχει παρατηρηθεί μειωμένη ηλικία εμφάνισης της νόσου και αυξημένη παραγωγή ακόμα και διαφορετικού τύπου αυτοαντισωμάτων (π.χ. αντι-τοποϊσομεράσης). Ακόμα ένα στοιχείο που φαίνεται να υποστηρίζει την συχνότερη εκδήλωση βαρύτερου κλινικού φαινοτύπου σε Αφροαμερικάνους είναι το γεγονός πως το ποσοστό των Καυκάσιων ασθενών με εστιασμένο σκληρόδερμα (δηλαδή τον ηπιότερο υπότυπο της νόσου) είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στους Αφροαμερικανικούς πληθυσμούς (Allanore, Simms et al).

Με βάση λοιπόν τα ευρήματα των επιδημιολογικών μελετών, διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες φαίνεται να διαθέτουν χαρακτηριστικά φαινοτυπικά προφίλ. Τα ευρήματα αυτά, υποδεικνύουν ότι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν εν μέρει στην εμφάνιση και την παθογένεια της ασθένειας (Salazar et al).



Διάγραμμα 1: Στοιχεία κλινικής έρευνας της EUSTAR το 2013 στην Ευρώπη προσαρμοσμένο από Allanore, Simms et al.

1.1.5 Γενετικό υπόβαθρο

Για καιρό υπήρχαν υποψίες ότι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τις επιβεβαίωσαν, καθώς έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε οικογένειες με ιστορικό, κυμαίνεται από 1,5% έως 1,7% σε σύγκριση με 0,026% στον γενικό πληθυσμό (Yangyang et al). Επιπλέον έρευνες σε οικογένειες έδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι 3.07 (95% ΔΕ, 1.25-7.57) σε συγγενείς 1^{ου} βαθμού ασθενών και 2.14 σε συγγενείς σε 3^{ου} βαθμού (95% ΔΕ, 1.16-3.95). Είναι πιθανό όμως αυτή η οικογενής συσχέτιση να σχετίζεται με την έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Allanore et al).

Όσον αφορά τη δράση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση της νόσου, έχει προταθεί ότι αυτοί διαταράσσουν τη φυσιολογική ανοσολογική ανοχή του οργανισμού μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και επάγουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων μέσω του μοριακού μιμητισμού (Yangyang et al). Ο μοριακός μιμητισμός είναι ένας προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο οι λοιμώξεις μπορούν να πυροδοτήσουν την αυτοανοσία (Cusick et al). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη θεωρία, το ανοσοποιητικό σύστημα, λόγω της ομοιότητας εξωγενών αντιγόνων με ενδογενείς πρωτεΐνες και άλλα μόρια, καταλήγει να δημιουργεί αντισώματα που στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών του ίδιου του οργανισμού (αυτό-αντιγόνα) (Cusick et al, Yangyang et al).

Η συστηματική σκλήρυνση, ως πολυπαραγοντικό νόσημα δεν ακολουθεί Μενδελική κληρονομικότητα. Είναι μία πολύπλοκη ασθένεια, η εμφάνιση και οι κλινικές εκδηλώσεις της οποίας επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών τόπων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Θεωρείται πως κάθε γονίδιο που εμπλέκεται στην εκδήλωση της νόσου ασκεί μικρή δράση στο φαινότυπο και δρα αθροιστικά με τα υπόλοιπα (Allanore et al).



Εικόνα 2: Επίδραση παραγόντων στην εκδήλωση ενός πολυπαραγοντικού νοσήματος

Ρόλο στην εκδήλωση και πρόοδο της ασθένειας έχειδειχθεί πως διαδραματίζουν γονίδια της επίκτητης και έμφυτης ανοσίας, όπως για παράδειγμα γονίδια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) και γονίδια ιντερφερονών, αλλά και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διεργασία της ίνωσης (π.χ. TGF) και της φλεγμονής, γονίδια αυξητικών παραγόντων (π.χ. CTGF), γονίδια που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών (π.χ. PXX) καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διακυτταρική σηματοδότηση (π.χ. NOTCH4). Επιπλέον σημαντικός αριθμός μεταλλαγών που σχετίζονται με τη νόσο έχουν βρεθεί σε περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστική δράση, δηλαδή περιοχές που δέχονται επιγενετική τροποποίηση ή συμμετέχουν σε αυτή όπως για παράδειγμα γενετικές περιοχές που μεταγράφονται σε ρυθμιστικά RNAs (π.χ. miRNA, lncRNA) (Salazar et al, Pattanaik et al, Yangyang et al).

Συνολικά, μέχρι σήμερα, περίπου το 88% των μεταλλαγών σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση έχουν βρεθεί σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος όπως ρυθμιστικά στοιχεία (υποκινητές, ενισχυτές, αποσιωπητές) και ιντρόνια που επιδέχονται εναλλακτικό μάτισμα (Salazar et al).

Έχειδειχθεί ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα μοιράζονται κοινές μεταλλαγές γονιδίων, καθώς πολλές από τις διάφορες παραλλαγές που συναντώνται σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο εμφανίζονται σε παραπάνω από μία αυτοάνοσες διαταραχές. Η εμφάνιση διαφορετικών αυτοάνοσων νοσημάτων σε οικογένειες αλλά και η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων αυτοάνοσων νοσημάτων σε ένα άτομο είναι παράγοντες που υποστηρίζουν την ύπαρξη κοινού γενετικού υπόβαθρου (Salazar et al).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, διαπιστώθηκε ότι 38% των ασθενών είχαν δύο ή παραπάνω αλληλεπικαλυπτόμενα αυτοάνοσα νοσήματα, με τα συχνότερα απαντώμενα να είναι η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο του Sjorgen. Όσον αφορά την οικογενή ομαδοποίηση των αυτοάνοσων ασθενειών το 36% των συγγενών 1^{ου} βαθμού είχαν τουλάχιστον ένα αυτοάνοσο νόσημα. Τα

αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι αυτοάνοσες ασθένειες μοιράζονται κοινούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου (Allanore et al).

1.2 Έρευνες

Λόγω των πολλαπλών γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην εκδήλωση της ασθένειας και της φαινοτυπικής ετερογένειας είναι δύσκολη η επανάληψη αποτελεσμάτων μελετών σύνδεσης (Allanore et al). Ένα άλλο στοιχείο που δυσκολεύει τις έρευνες για την κατανόηση της ασθένειας είναι η έλλειψη ζωικού μοντέλου (Pattanaik et al).

Η συστηματική σκλήρυνση δεν ακολουθεί μενδελική κληρονομηση, όμως θετικό οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης της αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο (RR) 15-19 φορές στα αδέρφια και 13-15 στους συγγενείς 1^{ου} βαθμού. Επιπλέον μελέτες σε οικογένειες έδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι 3.07 (95% ΔΕ, 1.25-7.57) σε συγγενείς σε 1^{ου} βαθμού ασθενών οι οποίοι είχαν προδιάθεση εμφάνισης του φαινομένου του Reynaud και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων και 2.14 σε συγγενείς σε 3^{ου} βαθμού (95% ΔΕ, 1.16-3.95) (Yangyang et al).

Έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής μία μελέτη σε δίδυμα, όπου η συχνότητα εμφάνισης της νόσου δεν διέφερε σημαντικά σε μονοζυγωτικά (4,2%) και διζυγωτικά (5,6%). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση για την ασθένεια, που όμως δεν είναι όμως ικανή από μόνη της να οδηγήσει στην εμφάνισή της (Allanore et al).

Ως επί το πλείστον η πιο συχνή παραλλαγή στο DNA αφορά την αντικατάσταση μίας νουκλεοτιδικής βάσης με άλλη. Η αλλαγή αυτή έχει καθιερωθεί να αναφέρεται ως SNP (single nucleotide polymorphism) πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου. Η διαφορετική αλληλουχία που προκύπτει μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στο τελικό προϊόν του γονιδίου ή στην έκφρασή του (Salazar et al).

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ασθένεια ακολουθήθηκαν δύο ειδών προσεγγίσεις που βασίζονται στο

χαρακτηρισμό SNP και προσδιορίζουν την πιθανότητα εμφάνισης του στους ασθενείς σε σχέση με την υγιή ομάδα ελέγχου (Salazar et al).

Ο πρώτος τύπος μελέτης, **Genome Wide Association Studies (GWAS)** αφορά τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος ασθενών. Αρχικά, δημιουργείται το γενετικό προφίλ ασθενών, πάντα σε σχέση με υγιείς, ελέγχοντάς το για μεγάλους αριθμούς (500.000-2.000.000) SNPs χωρίς να υπάρχει εκ των προτέρων υπόθεση για το αν σχετίζονται με την ασθένεια. Συνεπώς, είναι μια αντικειμενική μέθοδος η οποία παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης νέων γονιδίων για τα που δεν υπήρχαν υποψίες συσχέτισης τους με την ασθένεια (Salazar et al). Όμως με την προσέγγιση αυτή μελετώνται και SNPs σε ανισσοροπία σύνδεσης (LD) με άλλα, οπότε υπάρχει δυσκολία στην ταυτοποίηση του αιτιατού και του ψευδούς SNP (Salazar et al). Η ανισσοροπία σύνδεσης αναφέρεται στην περίπτωση που η συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων συνδυασμών αλληλομόρφων σε φάση σύζευξης, σε δύο ή περισσότερους γενετικούς τόπους, είναι μεγαλύτερη από την τυχαίως αναμενόμενη βάση της συχνότητας των αλληλομόρφων στον πληθυσμό (ιατρική γενετική Thomson and Thomson). Οπότε, είναι πιθανό γονίδια που δεν σχετίζονται με την ασθένεια να εμφανίζουν θετική συσχέτιση επειδή βρίσκονται σε ανισσοροπία σύνδεσης με εκείνα που όντως σχετίζονται με τη νόσο (ιατρική γενετική Thomson and Thomson). Άλλα μειονεκτήματα της προσέγγισης αυτής είναι η ανάγκη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων, επίσης είναι πιθανόν να μην συμπεριληφθούν στη μελέτη σπάνια αλληλόμορφα λόγω της κάλυψης που παρέχει κάθε πλατφόρμα που χρησιμοποιείτε για την ανάλυση (Salazar et al).

Ο δεύτερος τύπος μελέτης, **Candidate Gene Approach** (μελέτη υποψηφίου γονιδίου), αφορά την εξέταση συγκεκριμένου SNP (Salazar et al). Τα γονίδια που μελετώνται έχουν επιλεγεί βάση της συσχέτισης τους με άλλα αυτοάνοσα ή γιατί είναι μέρος μονοπατιών σημαντικών στην παθογένεια της ασθένειας (Salazar et al). Από αυτό πηγάζει ένα από τα πλεονεκτήματα της προσέγγισης, το ότι είναι δυνατή η μελέτη SNP με γνωστή λειτουργία. Με αυτή τη μέθοδο έχουν ταυτοποιηθεί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για την συστηματική σκλήρυνση και έχουν συσχετιστεί με κλινικούς τους φαινότυπους (Salazar et al). Οι

μελέτες αυτές όμως περιορίζονται από το μικρό αριθμό δειγμάτων γεγονός που συμβάλει στη μικρή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που προκύπτουν (Salazar et al).

Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένοι γενετικοί τόποι για τους οποίους έχει φανεί συσχέτιση με την συστηματική σκλήρυνση.

1.3 Γενετικοί τόποι συσχετιζόμενοι με την συστηματική σκλήρυνση

1.3.1 Περιοχή μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας-MHC

1.3.1.1 Γονίδια HLA

Ισχυρότερη σύνδεση με την SSc έχει παρατηρηθεί στα γονίδια HLA του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας. Αυτά εδράζονται στη θέση 6p21.31 η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη πολυμορφικότητα αλληλομόρφων των γονιδίων HLA και άλλων ανοσορυθμιστικών γονιδίων (Salazar et al).

Πολυμορφισμοί στην περιοχή αυτή έχουν συσχετιστεί θετικά τόσο με την εκδήλωση της ασθένειας, όσο και με την εμφάνιση συγκεκριμένου υποτύπου, ενώ κάποιοι άλλοι όπως HLA-DRB1*07, HLA-B*57 και HLA-Cw*14 φαίνεται πως δρουν προστατευτικά (Salazar et al). Επιπλέον, ορισμένοι πολυμορφισμοί είναι κοινοί σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες και εθνικότητες. Ειδικότερα τα αλληλόμορφα DRB1*1104, DQA1*0501 και DQB1*0301 βρέθηκαν να συσχετίζονται σημαντικά με την SSc στους Καυκάσιους και Ισπανόφωνους ενώ στους Αφροαμερικάνους τα αλληλόμορφα DRB1*0804, DQA1*0501 και DQB1*0301 (Salazar et al). Το τελευταίο (QB1*0301) έδειξε την μεγαλύτερη συσχέτιση με ασθενείς στους οποίους ανευρίσκονταν αυτοαντισώματα για την τοποϊσομεράση (ATA), ενώ παράλληλα τα DQB1*0501 και DQB1*26.21 σχετίστηκαν με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων για το κεντρομερές (ACA) και τέλος τα HLA-B*62 και HLA-DRB1*07 συσχετίστηκαν με τον διάχυτο υπότυπο της νόσου (Salazar et al).

1.3.1.2 Γονίδια Non-HLA

Το γονίδιο NOTCH4 βρίσκεται στην περιοχή MHC αλλά δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες HLA. Το προϊόν της μεταγραφής του είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην σε μονοπάτια πρόκλησης πνευμονικής ίνωσης μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης Notch. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο αυτό έχουν συσχετιστεί με την παρουσία αυτοαντισωμάτων ATA και ACA (Salazar et al).

1.3.2 Γονίδια έμφυτης ανοσίας

Η ιντερφερόνη τύπου I (IFN), που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσιακής άμυνας, έχει συσχετιστεί θετικά με την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης και την αυξημένη θνητότητα στην SSc (Pattanaik et al). Και σε αυτή την περίπτωση τα διαφορετικά αλληλόμορφα φάνηκε πως συσχετίζονται με την παραγωγή διαφορετικών αυτοαντισωμάτων, την ανάπτυξη διαφορετικών κλινικών εκδηλώσεων και συνολικά με διαφορετικό υποτύπο της νόσου ρυθμίζοντας την μεταγραφή γονιδίων TLR (Pattanaik et al, Salazar et al).

1.3.3 Γονίδια επίκτητης ανοσίας

Έχει βρεθεί σχέση μεταξύ δυσλειτουργιών στοιχείων κυτταρικής σηματοδότησης των B και T λεμφοκυττάρων (Pattanaik et al). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την σχέση της επίκτητης ανοσίας με την ευαισθησία στην εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης (Pattanaik et al). Παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο PTPN22 κωδικοποιεί για μια φωσφατάση που ρυθμίζει την μεταγωγή σήματος στα T-λεμφοκύτταρα λειτουργώντας ως καταστολέας της. Η αντικατάσταση της C στη θέση 1858 σε T είναι μια μετάλλαξη κέρδους λειτουργίας, έτσι η παραγόμενη πρωτεΐνη δρα ως ισχυρότερος απενεργοποιητής των υποδοχέων TCR (Pattanaik et al).

1.3.4 Γονίδια που εμπλέκονται στην διακυτταρική επικοινωνία

Μεταλλαγές γονιδίων που κωδικοποιούν για κυττοκίνες και υποδοχείς τους έχουν φανεί να εμπλέκονται στη νόσο. Ο TNFSF4 είναι ένας προσδέτης του OX-40 των T-λεμφοκυττάρων που δρα συνδιεγερτικά για

την ενεργοποίησή τους. Πολλές μεταλλαγές του γονιδίου αυτού έχουν συσχετιστεί με την ύπαρξη ATA αυτοαντισωμάτων (Salazar et al).

1.3.5 Γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή και την αποικοδόμηση εξωκυτταρίου υλικού

Λόγω της αυξημένης ποσότητας εξωκυτταρίου υλικού στον οργανισμό ασθενών, έχουν προταθεί και μελετηθεί γονίδια που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την παραγωγή και αποικοδόμησή του. Κάποια από τα πιο χαρακτηριστικά γονίδια είναι τα παρακάτω.

CTGF (CCN2) Connective Tissue Growth Factor: Αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού, συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η κυτταρική προσκόλληση, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση ινοβλαστών. Αλλά και στην παραγωγή εξωκυτταρίου υλικού (Fonseca et al).

PXK PX Serine-Threonine Kinase : Μεταφορά και αποικοδόμηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR (Takeuchi et al).

CSK C-src Tyrosine Kinase : Απενεργοποιεί τις κινάσες c-Src που εμπλέκονται στη διαδικασία πρόκλησης ίνωσης (Salazar, Mayes).

Autophagy protein-5 (ATG5): Λιγάνση της ουβικουιτίνης που συμμετέχει στην απομάκρυνση άχρηστου κυτταροπλασματικού υλικού (Mayes et al). Παραλλαγές του γονιδίου έχουν συσχετιστεί και με το άσθμα (Mayes et al).

Deoxyribonuclease 1-Like 3 (DNASE1L3): Συμμετέχει στην αποικοδόμηση του DNA κατά την απόπτωση, δημιουργώντας παράλληλα δίκλωνες ρήξεις στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών (Pattanaik et al).

1.3.6 Γονίδια που εδράζονται στο X χρωμόσωμα

Γονίδια όπως το IRAK1 (υποδοχέας ιντερλευκίνης) ο οποίος επάγει την έκφραση IFN α και IFN γ και συμμετέχει στην ενεργοποίηση των φυσικών φονικών κυττάρων και των Β-λεμφοκυττάρων (Pattanaik et al). Αλλά και

το MECP2, μιας πρωτεΐνης που προσδένεται σε νησίδες CpG και ρυθμίζει την έκφραση μεθυλιωμένων γονιδίων, έχουν συσχετιστεί με την συστηματική σκλήρυνση και θεωρούνται σημαντικά για την παθοφυσιολογία της ασθένειας (Pattanaik et al).

1.3.7 Ιντρόνια και διαγονιδιακές περιοχές

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η πλειοψηφία των μεταλλαγών που σχετίζονται με την συστηματική σκλήρυνση βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA. Αυτές οι περιοχές μπορεί να είναι: α)ιντρόνια, δηλαδή περιοχές εντός γονιδίων που δεν συμπεριλαμβάνονται στο τελικό προϊόν του γονιδίου λόγω αφαίρεσης τους κατά το μάτισμα, β)αλληλουχίες DNA ανάμεσα σε γονίδια όπου υπάρχουν ρυθμιστικά στοιχεία όπως υποκινητές γονιδίων ή γ)περιοχές εναλλακτικού ματίσματος (Salazar, Mayes). Κατά το εναλλακτικό μάτισμα, γίνεται αποκοπή ιντρονίων από το pre-mRNA και συρραφή εξωνίων μεταξύ τους. Μεταλλαγές σε περιοχές εναλλακτικού ματίσματος είναι πιθανό να οδηγήσουν σε αλλαγμένα όρια και διαφορετικό από το φυσιολογικό τελικό γονιδιακό προϊόν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό, της Lysyl hydroxylase 2 (LH2), ενός ενζύμου που συμμετέχει στο εναλλακτικό μάτισμα στη βιοσύνθεση του κολλαγόνου. Αλλαγές στο μοτίβο ματίσματος του γονιδίου LH2 ευνοούν την εισαγωγή παραπάνω εξωνίου και την παραγωγή ενός μεγαλύτερου του κανονικού μεταγράφου που έχει συσχετιστεί με την συστηματική σκλήρυνση (Seth et al).

1.3.8 Επιγενετικοί Παράγοντες

Αν αναλογιστεί κανείς την μεγάλη ετερογένεια της νόσου και την χαμηλή διεισδυτικότητα της μπορεί να συμπεράνει ότι μόνο με γενετικά κριτήρια δεν μπορεί να εκτιμηθεί ο κίνδυνος εκδήλωσης της ασθένειας (Salazar et al). Η παρατήρηση αυτή έστρεψε της έρευνες προς το πεδίο της επιγενετικής (Sing et al). Οι επιγενετικές αλλαγές κληρονομούνται χωρίς να είναι απαραίτητα μέρος της αλληλουχίας του DNA. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν την γενετική ποικιλότητα λόγω του ρόλου τους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Salazar, Mayes). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν

μεθυλίωση DNA, τροποποιήσεις ιστονών, miRNAs και lnc-RNAs (Salazar, Mayes).

Η μεθυλίωση DNA λαμβάνει χώρα σε περιοχές που ονομάζονται νησίδες CpG και συνήθως συναντώνται σε υποκινητές. Η προσθήκη μεθυλο-ομάδας θετικού φορτίου στο αρνητικά φορτισμένο DNA έχει σαν αποτέλεσμα την συμπύκνωση του, γεγονός που καθιστά την μεθυλιωμένη περιοχή μη προσβάσιμη σε μεταγραφικούς παράγοντες. Συνεπώς, καταστέλλεται η μεταγραφή του γονιδίου (Salazar et al).

1.3.9 miRNAs και lnc-RNA

Τα miRNA είναι μικρά RNA (19-23bp) που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες αλλά ρυθμίζουν την έκφραση άλλων γονιδίων, στοχεύοντας στο μετάγραφο-στόχο και εποικοδομώντας το με τη βοήθεια πρωτεϊνών. Φαίνεται ότι ρυθμίζουν μονοπάτια φλεγμονής, ίνωσης και αγγειογένεσης. Τα lnc-RNA (>20 bp) εικάζεται ότι ρυθμίζουν διαδικασίες της ανοσιακής απάντησης (Broen et al).

1.3.10 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων

Αξίζει να τονιστεί, ότι η επίδραση που ασκεί κάθε γονίδιο στον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας είναι μικρή. Όπως έχει δειχθεί, οι πολλαπλοί γενετικοί τύποι που σχετίζονται με την ασθένεια, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αυξάνοντας την πιθανότητα εκδήλωσης της ασθένειας ή προστατεύοντας από αυτή. Αυτό διαφαίνεται από το γεγονός ότι τα προϊόντα πολλών από τα πιθανά εμπλεκόμενα γονίδια συμμετέχουν στα ίδια βιολογικά μονοπάτια (Salazar et al).

1.4 Πολυμορφισμοί υπό μελέτη

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιλέχθηκαν και εξετάστηκαν οι πολυμορφισμοί rs6918698 του γονιδίου CTGF και rs4681851 του PXC στον ελληνικό πληθυσμό. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση και ο προσδιορισμός της συχνότητας εμφάνισης των παραπάνω πολυμορφισμών, ειδικών για τη νόσο και για τους διαφορετικούς φαινοτύπους στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και η

συσχέτιση τους με την πρόγνωση και την κλινική πορεία των υπό μελέτη ασθενών.

1.4.1 CTGF

Όσον αφορά τους αγγειακούς παράγοντες της ίνωσης το γονίδιο που συσχετιστεί με ινώδεις νόσους και ειδικότερα με την συστηματική σκλήρυνση είναι αυτό του CTGF, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 (Bhattacharyya et al, Zhou et al). Ο πολυμορφισμός -945C στον υποκινητή του γονιδίου έχει συσχετιστεί με την ασθένεια σε μελέτη που έχει γίνει σε Βρετανικό πληθυσμό 1000 ατόμων (Fonseca et al). Όμως σε άλλες έρευνες παρόλο που η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού στους ασθενείς ήταν παρόμοια υπήρξαν διαφορές στην ομάδα ελέγχου, οπότε δεν υπήρξε συσχέτιση (Allanore et al).

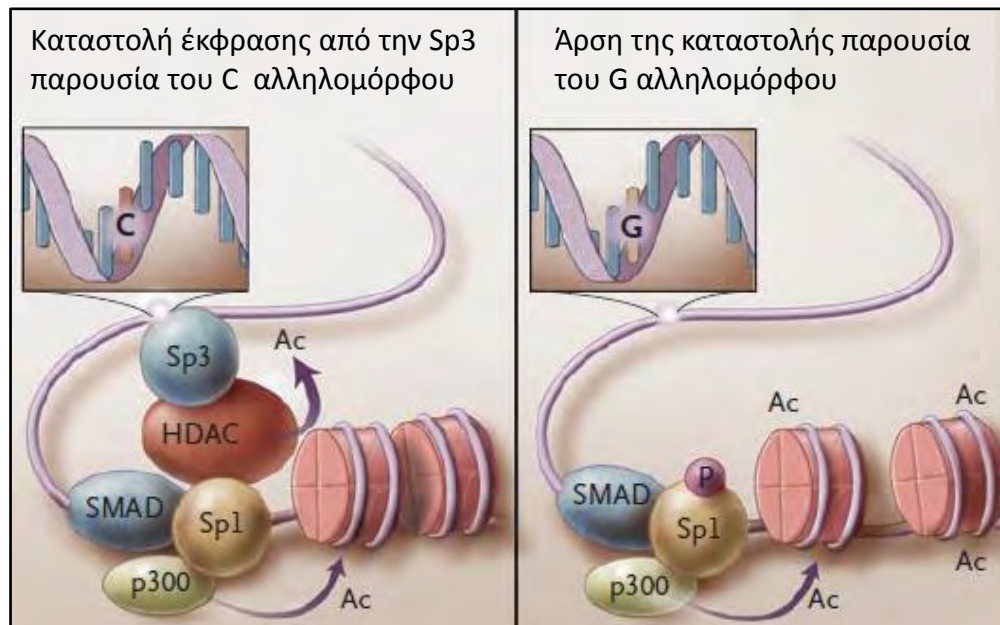
Ο CTGF ή αλλιώς CCN2 είναι αυξητικός παράγοντας. Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών CCN, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η κυτταρική προσκόλληση, η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, η ιστική αναδιαμόρφωση, ο πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση κυττάρων (ινοβλαστών) (Leask και Abraham). Ασκούν τη δράση τους μέσω του μονοπατιού ιντεργκρίνης και HSPG (πρωτεογλυκάνη), ρυθμίζοντας άμεσα την κυτταρική προσκόλληση και έμμεσα την δράση πρωτεϊνών και εξωκυττάριας προσδετών όπως είναι οι κυττοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, μορφογόνα και συστατικά του εξωκυττάριας υλικού (Leask et al).

Ο CTGF εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απάντηση σε ιστική βλάβη, παρόλο που δεν εκφράζεται σε μεσεγχυματικά κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες, κατά τη διαδικασία επιδιόρθωσης ιστού επάγεται ταχέως η παραγωγή του (Bradham et al, Karoor et al). Έχει βρεθεί ότι παράγοντες όπως η ενδοθυλίνηI, η αγγειοτενσίνηII, τα γλυκοκορτικοειδή, ο TGF β και η υποξία είναι επίσης επαγωγείς της έκφρασης του CTGF (Leask et al).

Απορρύθμιση του προτύπου έκφρασης του έχει βρεθεί σε ινώδεις ασθένειες, η συστηματική σκλήρυνση δεν αποτελεί εξαίρεση αφού, έχει

ανιχνευτεί σε αυξημένα επίπεδα του CTGF στον οργανισμό ασθενών (βιολογικά υγρά) (Fonseca et al).

Ο πολυμορφισμός υπό εξέταση βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου του CTGF, στη θέση -945(Fonseca et al). Η αντικατάσταση της αζωτούχου βάσης κυτοσίνης σε γουανίνη έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της συγγένειας πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα sp3 με ταυτόχρονη αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα sp1 (Fonseca et al). Το C αλληλόμορφο δημιουργεί μια θέση πρόσδεσης με υψηλή συγγένεια για τον μεταγραφικό παράγοντα sp3 (Fonseca et al). Ο παράγοντας sp3 έχει δείχθει ότι δρα ως μεταγραφικός απενεργοποιητής ή και ενεργοποιητής ασθενέστερος όμως από τον sp1, με τον οποίο ανταγωνίζεται για την ίδια θέσης πρόσδεσης (Suske et al).



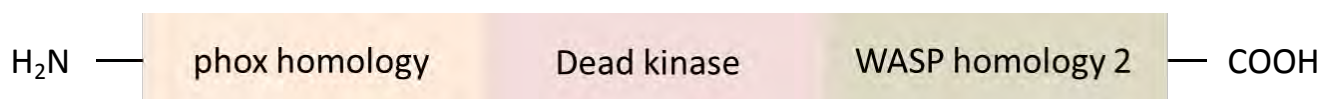
Εικόνα 3: Σύγκριση πρόσδεσης παραγόντων στην περίπτωση διαφορετικών αλληλομόρφων προσαρμοσμένη από Fonseca et al

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται το προτεινόμενο μοντέλο άρσης της μεταγραφικής καταστολής παρουσία του G αλληλομόρφου (Forenska et al). Σύμφωνα με τη μελέτη των Forenska et al, ο γονότυπος GG είναι συχνότερος στους ασθενείς από ότι στην ομάδα ελέγχου και έχει συσχετιστεί με ορισμένα υποσύνολα της ασθένειας και συγκεκριμένα με την παρουσία (αυτοαντισωμάτων αντι-τοποισομεράσης, έναντι πρωτεϊνών του κεντρομερούς) και με πνευμονική ίνωση (Forenska et

al). Η παρουσία αυτοαντισωμάτων αντι-τοποϊσομεράσης έχει συσχετιστεί με αγγειακές επιπλοκές και πνευμονική υπέρταση. Αυτή η συσχέτιση, είναι αναμενόμενη λόγω της δράσης του CTGF στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον έλεγχο της εναπόθεσης εξωκυττάρου υλικού (Forenska et al).

1.4.2 PXC

Το γονίδιο *pxk* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 και κωδικοποιεί για μια καλά συντηρημένη κινάση Ser/Thr με επικράτεια *phox* (PX) στο N τελικό της άκρο και μία περιοχή WASP2 (WH2) στο καρβοξυτελικό άκρο (Ellson et al, Takeuchi et al).



Εικόνα 4: διαγραμματική αποϊκόνηση της δομής της PXC

Η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του ενδοσώματος λόγω της αλληλεπίδρασής της περιοχής PX με την φωσφατίδιλο ινοσιτόλη (PtdIns3P). Συνεπώς εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Έχουν ταυτοποιηθεί 5 παραλλαγές της με διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό. Η πρωτεΐνη συμμετέχει στην διαδικασία ενδοκύττωσης και αποικοδόμησης του EGFR (υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αύξηση) (Takeuchi et al). Έχει δηχθεί ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης του EGFR σε κύτταρα που εξέφραζαν την PXC είναι αυξημένος (Takeuchi et al). Φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του EGFR μέσω ρύθμισης της ουβικιτινυλίωσης επαγόμενης από προσδέτη σε συνεργασία βέβαια με άλλα μόρια (Takeuchi et al).

Η περιοχή WH2 χρησιμεύει ως περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης, διαθέτει επίσης θέσεις πρόσδεσης παραγόντων αποπολυμερισμού και πολυμερισμού της ακτίνης. Όσον αφορά την περιοχή αυτή και τη λειτουργία της, εικάζεται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταφοράς

και αποικοδόμησης της αντλίας καλίου-νατρίου όπως και με τον EGFR, αλλά και στην μεταφορά μονομερών ακτίνης σε σημεία αποπολυμερισμού και πολυμερισμού (Mao et al, Takeuchi et al).

Ο χαρακτηρισμός της περιοχής κινάσης έδειξε ότι δεν διαθέτει τα συντηρημένα αμινοξέα των κινασών, συνεπώς δεν αυτοφωσφωρυλιώνεται και δεν φωσφορυλιώνει, είναι δηλαδή μία νεκρή κινάση που πιθανόν συμμετέχει στον εντοπισμό της ΡΧΚ (Takeuchi et al).

Μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός μεταφοράς και ενδοκύττωσης του EGFR και της αντλίας καλίου-νατρίου είναι όμως πιθανόν να γίνεται μέσω ρύθμισης της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού (Takeuchi et al).

Ο πολυμορφισμός υπό μελέτη έχει συσχετιστεί με την παραγωγή αυτοαντισωμάτων εναντίον πρωτεϊνών του κεντρομερούς (ACA) και έχει προκύψει από μελέτη υποψηφίου γονιδίου (Martin et al).

2 Μέθοδοι

Για τη μελέτη συσχέτισης των πολυμορφισμών rs6918698 (CTGF) και rs4681851 (ΡΧΚ) με την συστηματική σκλήρυνση απομονώθηκε DNA από το αίμα ασθενών και υγιών ατόμων που αποτελούσαν την ομάδα έλεγχου. Στη συνέχεια, ενισχύθηκαν τα τμήματα υπό μελέτη με PCR και πραγματοποιήθηκε ανάλυση SSCP για την ανίχνευση διαφορετικών προτύπων και απευθείας αλληλούχηση για την ταυτοποίηση διαφορετικών γονοτύπων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των συχνοτήτων εμφάνισης των διαφορετικών γονοτύπων σε ασθενείς και υγιείς.

2.1 Δείγματα

Τα 80 συνολικά, δείγματα ασθενών με διάχυτο και εστιασμένο σκληρόδερμα που αναλυθήκαν, προήλθαν από την κλινική ρευματολογίας του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Λάρισας. Η ομάδα ελέγχου περιλαμβάνει 50 άτομα μέσης ηλικίας που δεν πάσχουν από συστηματική σκλήρυνση ούτε και από κάποιο άλλο αυτοάνοσο νόσημα.

2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από το αίμα ασθενών και μη, έγινε με βάση τις οδηγίες του kit απομόνωσης της εταιρίας Invitrogen.

2.3 Φωτομέτρηση

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των προϊόντων της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διέγερση των ηλεκτρονίων των μορίων των ουσιών που βρίσκονται στο διάλυμα προς φωτομέτρηση από μία δέσμη φωτός. Κατά την αποδιέγερσή τους τα μόρια απελευθερώνουν την ενέργεια που προσέλαβαν σε μορφή ακτινοβολίας. Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{\max}) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση, για τα νουκλεϊκά οξέα είναι τα 260 nm, ενώ για τις πρωτεΐνες τα 280 nm. Αφού φωτομετρήθηκαν τα δείγματα προσδιορίστηκε ο λόγος $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ που δείχνει τη σχέση της συγκέντρωσης του DNA προς τις πρωτεΐνες στο προϊόν του καθαρισμού, η βέλτιστη τιμή του λόγου για διάλυμα DNA είναι 1,8. Για την φωτομέτρηση σε κυψελίδα χαλαζία προστέθηκαν 98μl νερό και 2μl προϊόν.

2.4 BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών και τον έλεγχο της ειδικότητας τους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα primer BLAST του NCBI. Το BLAST είναι ένας αλγόριθμος που παρέχει στο χρήστη τη δυνατότητα σύγκρισης μίας αλληλουχίας επερώτησης με αλληλουχίες που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων.

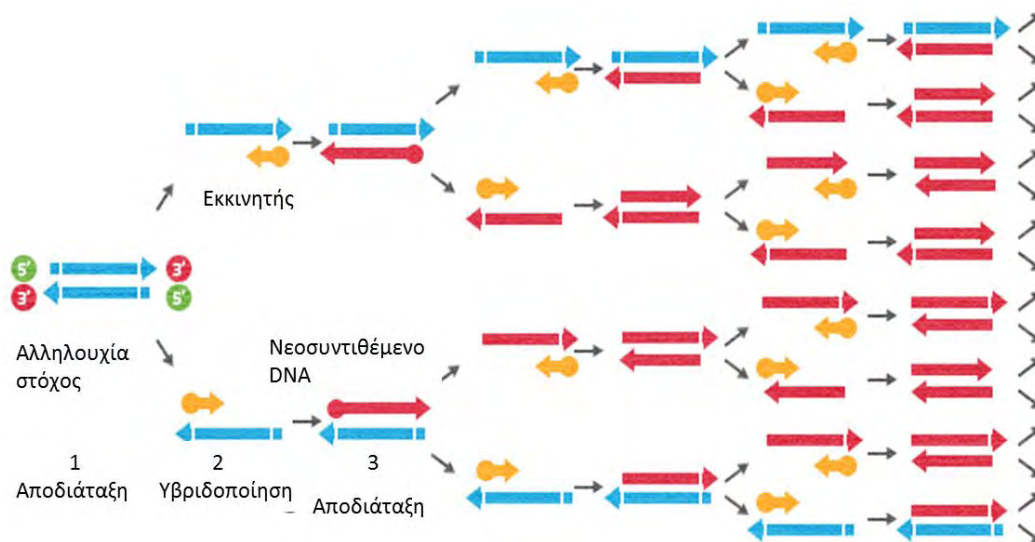
Οι αλληλουχίες των ζευγών των εκκινητών (forward και reverse) για κάθε τμήμα προς ενίσχυση φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής	Αλληλουχία
CTGF F	AGAACAAAGACGCGTGTGAC
CTGF R	CCCCTTTGCATCCCAGTGTT
PXK F	AGTCAAAACGATCTGCTCTTGAAA
PXK R	AGACGGAGTTATTTGTTCTCTGT

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση της περιοχής των γονιδίων υπό μελέτη όπου βρίσκονται τα επιθυμητά SNPs, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Mullis KB). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να αναδιατάσσεται και να επαναδιατάσσεται όταν βρίσκεται σε κατάλληλες συνθήκες. Η ενίσχυση του εκμαγείου DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου πολυμεράσης του DNA, η οποία έχει την ικανότητα να προσθέτει νουκλεοτίδια σε ελεύθερη 3'-OH ομάδα. Για το λόγο αυτό προστίθενται οι εκκινητές. Τα στάδια της PCR συνοψίζονται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η σύσταση των διαλυμάτων των αντιδράσεων για τα δύο γονίδια περιγράφεται στους πίνακες 3 και 4

Οι συνθήκες ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος DNA είναι οι εξής:

Αρχική αποδιάταξη : 95°C για 5 min

Αποδιάταξη: 95°C για 40 sec

Υβριδοποίηση: 60°C (γονίδιο CTGF)

59°C (γονίδιο PΧΚ) για 40 sec } x40 κύκλους

Επιμήκυνση: 72°C για 1,3 min

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min

Τελικά προκύπτουν πολλαπλά αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA, απαραίτητα για την επιτυχία των μεθόδων που ακολουθούν.

Πίνακας 3: Συστατικά αντίδρασης PCR γονιδίου PXX (ποσότητες σε μl)

MgCl	1,5	
Buffer	5	
Εκκινητής Fw	1	
Εκκινητής Rv	1	
dNTPs	1	
DNA μήτρα	1	
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2	
ddH ₂ O	40,5	
Συνολικός όγκος	50	

Πίνακας 4: Συστατικά αντίδρασης PCR γονιδίου CTGF (ποσότητες σε μl)

MgCl	1	
Buffer	5	
Εκκινητής Fw	1	
Εκκινητής Rv	1	
dNTPs	1	
DNA μήτρα	1	
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	0,2	
ddH ₂ O	41	
Συνολικός όγκος	50	

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την επαλήθευση της ύπαρξης γενετικού υλικού στα προϊόντα της απομόνωσης DNA ηλεκτροφορήθηκαν 3μl προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1%. Για την επαλήθευση της ποιότητας της αντίδρασης PCR και της ενίσχυσης της επιθυμητής περιοχής ηλεκτροφορήθηκαν σε

πηκτή 2% 5 μl προϊόντος. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους έγινε με την παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (ladder) στην πηκτή κατά την ηλεκτροφόρηση. Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάζεται με την ανάμειξη αγαρόζης με 40ml TAE 1× σύμφωνα με τον πίνακα 5 και θέρμανση του μείγματος μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια προστίθενται 1ml χρωστικής SERVA η οποία προσδένεται στο DNA και φωσφορίζει καθιστώντας δυνατή την παρατήρηση του DNA υπό υπεριώδες φως. Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου πολυμερίζεται και αποκτά το επιθυμητό σχήμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts για 20 λεπτά μετά το πέρας των οποίων ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός (Maria et al).

Πίνακας 5: Ποσότητες αγαρόζης για την παρασκευή πηκτής ορισμένης συγκέντρωσης

Πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v	Πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2% w/v
4 gr αγαρόζη	8 gr αγαρόζη

Η περιεκτικότητα αλλάζει αναλόγως το μέγεθος των τμημάτων προς ηλεκτροφόρηση.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη 3μl loading buffer σε αυτά.

Loading buffer 6x

- Bromophenol blue 1ml 1% w/v
- TBE 20x 0,5ml
- Glycerol 5ml
- ddH₂O έως τα 10ml

Για την παρασκευή TAE 1× αραιώθηκαν 20 ml διαλύματος stock 50× με την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού σε τελικό όγκο 1L

TAE 50×

- Tris Base 121gr
- Acetic Acid 28,5ml
- EDTA 0,5M 50ml
- ddH₂O έως τα 500ml

2.7 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους σε πήκτωμα σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Η δευτεροταγής διαμόρφωση των μονόκλωνων τμημάτων DNA διαφέρει ανάλογα με την αλληλουχία τους και έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση διαφορών ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου. Χρησιμοποιείται για εύρεση μεταλλάξεων και γονοτύπηση, βρίσκει εφαρμογή στην σύγκριση τμημάτων DNA (μέχρι 300bp) και την εύρεση διαφορών μεταξύ τους (Hayashi). Αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

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

Σε 7μl προϊόντος PCR προστίθενται 10μl denaturation buffer και τα δείγματα επωάζονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης

είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλιωνα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλιωνα κατάσταση.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

TEMED

TBE 10x:

- Tris Base 121 gr
- Boric acid 81,5gr
- EDTA 0,5M 80ml
- ddH₂O έως τα 2lt

Πίνακας 6: Σύσταση πηκτής ακρυλαμίδης

Συγκέντρωση πηκτής	12%
ακρυλαμίδη	7,5gr
bis ακρυλαμίδη	0,19gr
Glycerol 50%	6,4ml
TBE 10x	3,2ml
TEMED	62,5μl
APS 20%	375μl
H ₂ O	Έως τα 65ml
Συνολικός όγκος	65ml

Τελευταία προστίθενται τα αντιδραστήρια TEMED και APS αφού τα υπόλοιπα έχουν αναδευτεί και διηθηθεί σε ογκομετρικό σωλήνα μέχρι

τα 65ml. Το διήθημα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όπου προστίθενται τα TEMED και APS. Οι ακριβείς ποσότητες παρασκευής του gel αναφέρονται στον πίνακα 6.

Το διάλυμα τοποθετείται ανάμεσα σε τζάμια ώστε να πάρει το επιθυμητό σχήμα και να γίνει η κάθετη ηλεκτροφόρηση. Για τη δημιουργία οπών για την τοποθέτηση των δειγμάτων χρησιμοποιούνται ειδικά χτενάκια. Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, τα αποδιατεταγμένα δείγματα ηλεκτροφορούνται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με τάση 220 volts σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες για το γονίδιο CTGF και 19 ώρες για το PXC.

Χρώση των πηκτών ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Για να γίνουν εμφανείς οι ζώνες του DNA γίνεται χρώση της πηκτής ακρυλαμίδης 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 (Bassam et al). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1

- Acetic Acid 1ml
- ddH₂O 400ml

Διάλυμα 2

- AgNO₃ 2gr
- ddH₂O 200ml

Διάλυμα 3

- NaOH 3gr
- NaBH₄ 0,05gr
- Formaldehyde 1ml
- ddH₂O 200ml

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml 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 8min. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με απεσταγμένο νερό, διάρκειας 1min η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

Μετά την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα, συγκρίνονται τα πρότυπα των διαφορετικών δειγμάτων, ώστε να προσδιοριστούν ποια άτομα φέρουν κοινά πρότυπα και ποια διαφέρουν μεταξύ τους. Μετά την ομαδοποίηση των δειγμάτων, επιλέχθηκε ένα αντιπροσωπευτικό άτομο από κάθε πρότυπο, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάθε ομάδας.

2.8 Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Για την εξακρίβωση των αλληλουχιών κάθε προτύπου έγινε αλληλούχηση σε επιλεγμένα αντιπροσωπευτικά δείγματα. Αφού είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον ακριβή γονότυπο των προτύπων ώστε να εξακριβωθεί η συσχέτιση με την συστηματική σκλήρυνση. Τα επιλεγμένα προϊόντα PCR, καθαρίζονται με τη χρήση kit ώστε να απαλλαγθούν από την παρουσία παραπροϊόντων και ουσιών που εμποδίζουν την διαδικασία της αλληλούχησης. Με τον καθαρισμό τα προϊόντα στάλθηκαν σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την επιθυμητή αλληλουχία και να ακολουθήσουμε με την περαιτέρω ανάλυση με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

2.9 Ανάλυση χρωματογραφήματος αλληλούχησης

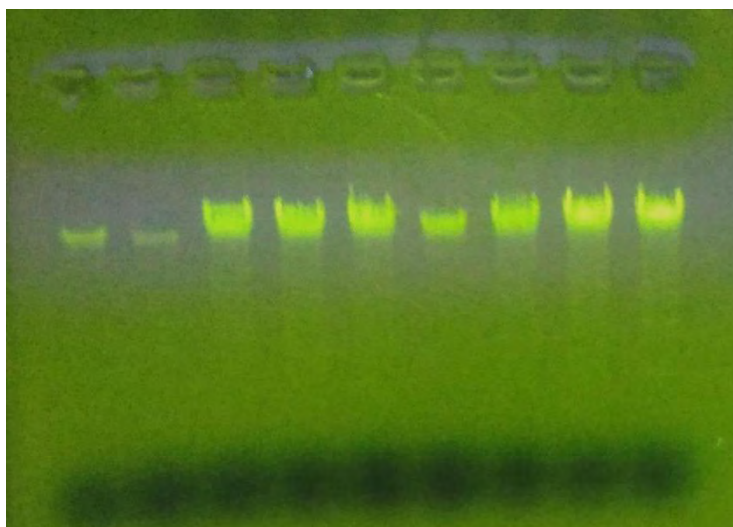
Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Στο γράφημα, απεικονίζονται 4 καμπύλες με διαφορετικά χρώματα, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί και σε διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε 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 ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, έχουμε την πλήρη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

3 Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση DNA

Για την εξακρίβωση της επιτυχίας της απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ενδεικτικά, στην εικόνα 6 παρατίθενται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της απομόνωσης DNA από δείγματα αίματος.

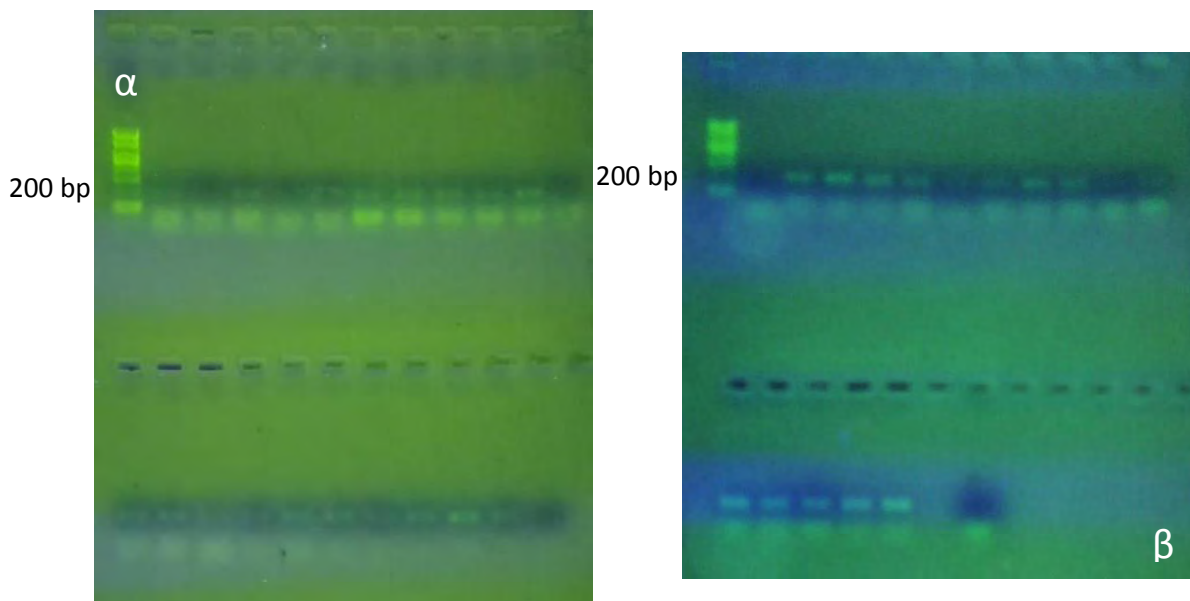


Εικόνα 6: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των προϊόντων της απομόνωσης έγινε φωτομέτρησή τους στα 260 nm όπου απορροφούν οι αζωτούχες βάσεις του DNA και στα 280 nm όπου απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των πρωτεϊνών. Τα δείγματα που αναλύθηκαν είχαν λόγο απορροφήσεων A_{260} / A_{280} γύρω στο 1,8 και τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl.

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

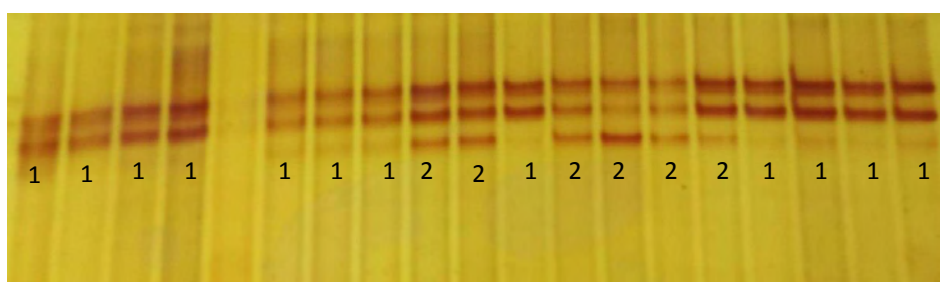
Στην εικόνα 7 φαίνονται ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων των αντιδράσεων PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε στις περιοχές των γονιδίων CTGF και PXC αντίστοιχα όπου εντοπίζονται τα υπό μελέτη SNPs. Η ηλεκτροφόρηση έγινε παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους, για τον έλεγχο του μοριακού βάρους των προϊόντων και αρνητικού ελέγχου και στις δύο περιπτώσεις.



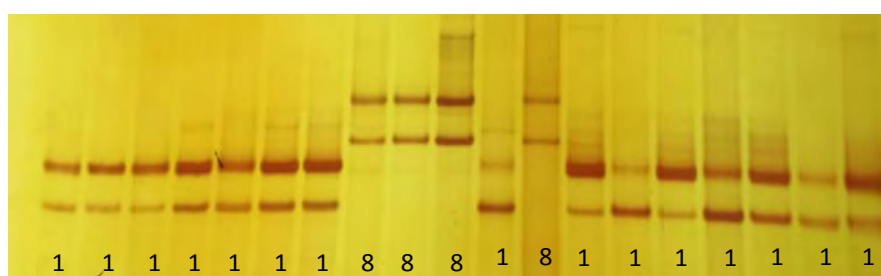
Εικόνα 7: PCR του γονιδίου CTGF (α) και ΡΧΚ (β)

3.3 Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Κατά την ανάλυση SSCP παρατηρήθηκαν 3 πρότυπα ζωνών στο γονίδιο CTGF και 9 στο γονίδιο ΡΧΚ. Τα διαφορετικά πρότυπα οφείλονται σε διαφορές στην αλληλουχία των προϊόντων PCR, συνεπώς αντιστοιχούν σε διαφορετικούς γονότυπους. Ορισμένα πρότυπα φαίνονται ενδεικτικά στις εικόνες 8 και 9.



Εικόνα 8: Απλότυποι από ανάλυση SSCP του γονιδίου CTGF

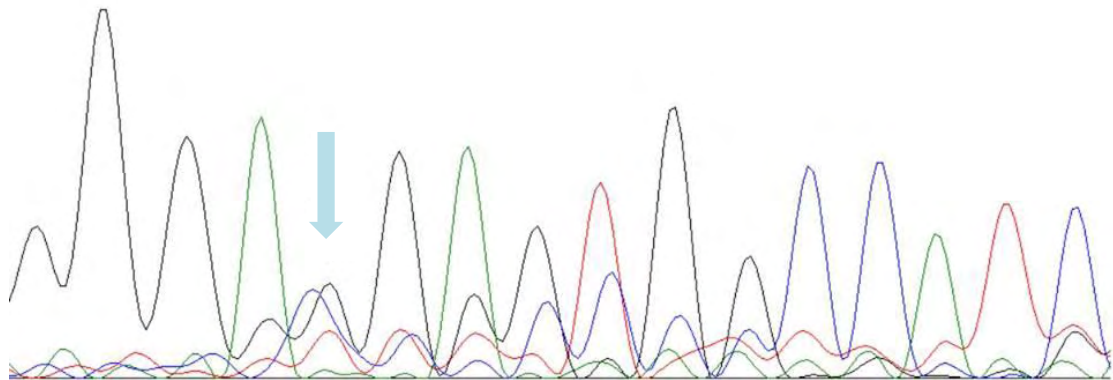


Εικόνα 9: Απλότυποι από ανάλυση SSCP του γονιδίου ΡΧΚ

3.4 Αλληλούχιση προϊόντων PCR

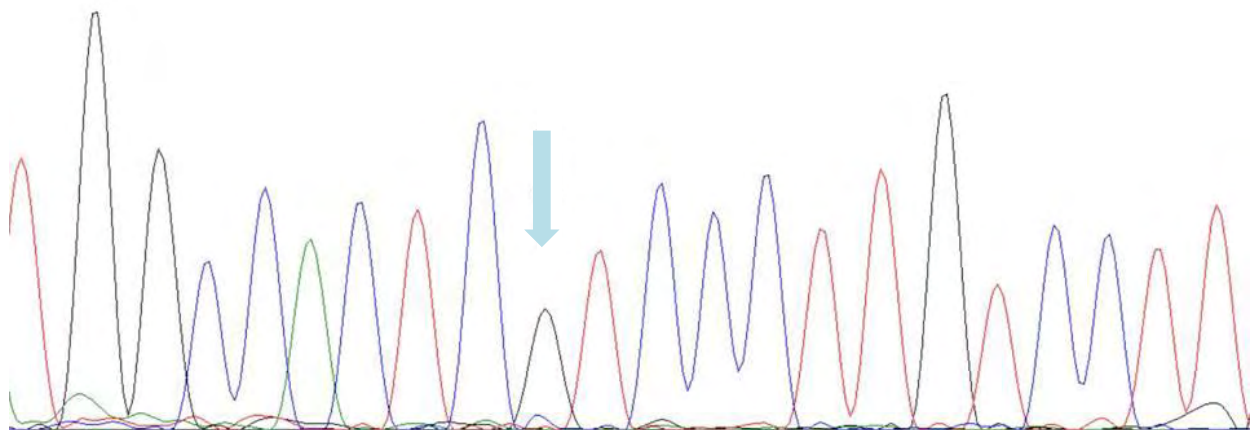
Στη συνέχεια επιλέχθηκαν δείγματα αντιπροσωπευτικά για κάθε πρότυπο και στάλθηκαν για αλληλούχιση ώστε να γίνει γνωστή η ακριβής αλληλουχία των ενισχυμένων προϊόντων. Έτσι έγινε και η εξακρίβωση ότι η διαφορά στην κινητικότητα οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικών αλληλομόρφων των υπό μελέτη πολυμορφισμών. Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όπου και έχουν σημειωθεί οι γονότυποι. Για το γονίδιο CTGF το πρότυπο 1 αντιστοιχεί στο γονότυπο GG (ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο), το πρότυπο 2 στον CC και το πρότυπο 3 στην ετεροζυγοτία GC. Για το PXC τα πρότυπα 1 ως 4 αντιστοιχούν στον γονότυπο GG ενώ τα 5 ως 9 στον γονότυπο CC. Στην περίπτωση του γονιδίου PXC, η ύπαρξη περισσότερων απλοτύπων σε σχέση με τους γονοτύπους θεωρείται πως οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία διαφορετικών σημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή γύρω από το SNP υπό μελέτη. Η ανάλυση και επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Bioedit. Στις εικόνες 10-14 φαίνονται τα χρωματογραφήματα των προσδιορισθέντων γονοτύπων.

G G G A S G A G ⁹⁰T G G C C A T C



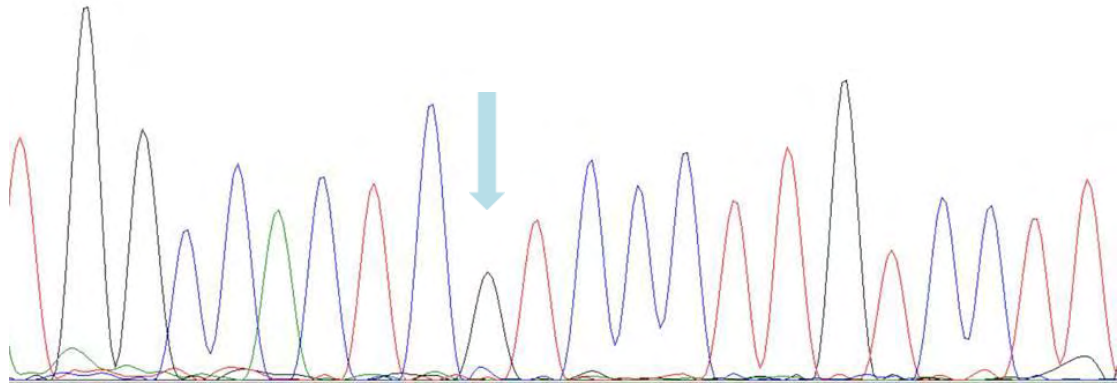
Εικόνα 10: Χρωματογράφημα γονοτύπου GC του γονιδίου CTGF

T G G C C A C T C ⁹⁰G T C C C T T G T C ¹⁰⁰C T T

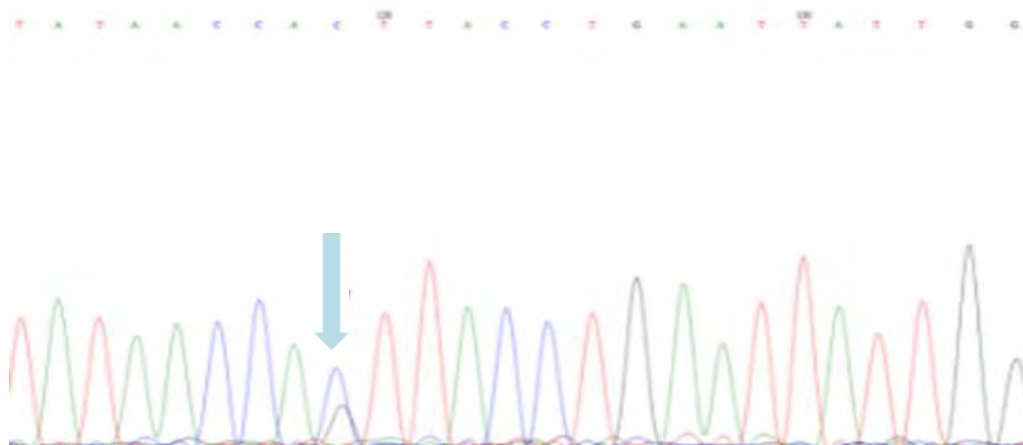


Εικόνα 11: Χρωματογράφημα γονοτύπου GG του γονιδίου CTGF

T G G C C A C T C ⁹⁰G T C C C T T G T C ¹⁰⁰C T T



Εικόνα 12: Χρωματογράφημα γονοτύπου CC του γονιδίου CTGF



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα γονοτύπου GG του γονιδίου RXK



Εικόνα 14 Χρωματογράφημα γονοτύπου CC του γονιδίου RXK

Παρακάτω παρατίθενται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης ορισμένων δειγμάτων. Στους πίνακες 12 και 13 αναγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης όλων των δειγμάτων.

Πίνακας 7: Σύνοψη των αποτελεσμάτων

Γονότυπος	CTGF		PXX	
	Ασθενείς	Ομάδα ελέγχου (υγιείς)	Ασθενείς	Ομάδα ελέγχου (υγιείς)
GG	46	17	11	16
GC	-	6	-	-
CC	32	30	71	42
Σύνολο	78	53	82	58

3.5 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των διαφορετικών γονοτύπων σε ασθενείς και υγιείς έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με δείκτη σημαντικότητας $p < 0.05$ σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα προέκυψε ότι $p=0.0020888$ για τον γονότυπο GG του γονιδίου CTGF και $p=0.036301$ για τον γονότυπο GG του γονιδίου PXX.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης SNP του γονιδίου CTGF

Κωδικός	Φύλο	Υπότυπος νόσου	Πρότυπο SSCP	Γονότυπος
S1	Θήλυ	diffuse	1	GG
S2	Θήλυ	limited	1	GG
S3	Άρρεν	diffuse	2	CC
S4	Θήλυ	limited	1	GG
S5	Θήλυ	diffuse	1	GG
S6	Θήλυ	diffuse	1	GG
S7	Θήλυ	diffuse	2	CC
S8	Θήλυ	limited	1	GG
S11	Άρρεν	diffuse	2	CC
S12	Θήλυ	limited	1	GG
S13	Άρρεν	diffuse	2	CC
S14	Θήλυ	limited	2	CC
S15	Θήλυ	limited	1	GG

S16	Άρρεν	diffuse	2	CC
S17	Θήλυ	diffuse	2	CC
S18	Θήλυ	diffuse	2	CC
S20	Θήλυ	limited	2	CC
S21	Θήλυ	limited	1	GG
S23	Θήλυ	limited	1	GG
S25	Θήλυ	limited	1	GG
S26	Θήλυ	diffuse	1	GG
S27	Άρρεν	diffuse	2	CC
S32	Θήλυ	diffuse	2	CC
S33	Θήλυ	diffuse	1	GG
S34	Θήλυ	diffuse	2	CC
S36	Θήλυ	diffuse	1	GG
S37	Θήλυ	limited	1	GG
S39	Θήλυ	limited	1	GG
S40	Άρρεν	limited	1	GG
S41	Θήλυ	limited	1	GG
S42	Θήλυ	limited	1	GG
S43	Θήλυ	limited	1	GG
S45	Θήλυ	diffuse	2	CC
S47	Θήλυ	limited	1	GG
S48	Θήλυ	limited	1	GG
S49	Θήλυ	diffuse	1	GG
S52	Άρρεν	diffuse	2	CC
S53	Θήλυ	limited	1	GG
S54	Θήλυ	diffuse	1	GG
S56	Θήλυ	diffuse	2	CC
S57	Θήλυ	diffuse	1	GG
S58	Θήλυ	limited	1	GG
S59	Θήλυ	limited	1	GG
S60	Θήλυ	limited	1	GG
S62	Θήλυ	limited	2	CC
S65	Θήλυ	limited	1	GG
S66	Θήλυ	diffuse	2	CC
S67	Θήλυ	limited	1	GG
S70	Θήλυ	limited	2	CC
S71	Άρρεν	diffuse	1	GG
S74	Θήλυ	limited	1	GG
S75	Θήλυ	diffuse	1	GG
S76	Θήλυ	diffuse	1	GG
S78	Θήλυ	diffuse	2	CC
S82	Θήλυ	diffuse	2	CC
S84	Άρρεν	diffuse	2	CC
S85	Θήλυ	diffuse	2	CC
S87	Θήλυ	diffuse	2	CC
S89	Θήλυ	diffuse	2	CC

S91	Θήλυ	diffuse	2	CC
S94	Θήλυ	diffuse	1	GG
S97	Θήλυ	diffuse	1	GG
S99	Θήλυ	diffuse	1	GG
S101	Θήλυ	diffuse	1	GG
S102	Θήλυ	diffuse	1	GG
S103	Θήλυ	diffuse	2	CC
S108	Θήλυ	diffuse	2	CC
S111	Θήλυ	diffuse	2	CC
S115	Θήλυ	diffuse	1	GG
S122	Θήλυ	diffuse	2	CC
S124	Θήλυ	diffuse	1	GG
s127	Άρρεν	diffuse	2	CC
s44	Θήλυ	diffuse	1	GG
s46	Θήλυ	diffuse	1	GG
s29	Θήλυ	diffuse	2	CC
s35	Θήλυ	diffuse	1	GG
s31	Θήλυ	diffuse	1	GG
s90	Θήλυ	diffuse	2	CC
M3	Άρρεν	-	1	GG
M4	Άρρεν	-	3	GC
M5	Άρρεν	-	3	GC
M6	Άρρεν	-	3	GC
M8	Άρρεν	-	3	GC
M9	Άρρεν	-	3	GC
M12	Άρρεν	-	3	GC
C1	Θήλυ	-	1	GG
C2	Θήλυ	-	1	GG
C4	Θήλυ	-	1	GG
C5	Θήλυ	-	2	CC
C6	Θήλυ	-	1	GG
C7	Θήλυ	-	1	GG
C8	Θήλυ	-	1	GG
C9	Θήλυ	-	1	GG
C10	Θήλυ	-	1	GG
C11	Θήλυ	-	1	GG
C12	Θήλυ	-	1	GG
C13	Θήλυ	-	2	CC
C14	Θήλυ	-	1	GG
C15	Θήλυ	-	1	GG
C16	Θήλυ	-	1	GG
C17	Θήλυ	-	1	GG
C19	Θήλυ	-	2	CC
C20	Θήλυ	-	2	CC

C22	Θήλυ	-	2	CC
C23	Θήλυ	-	2	CC
C24	Θήλυ	-	2	CC
C26	Θήλυ	-	1	GG
C27	Θήλυ	-	2	CC
C28	Θήλυ	-	2	CC
C29	Θήλυ	-	2	CC
C30	Θήλυ	-	2	CC
C31	Θήλυ	-	2	CC
C33	Θήλυ	-	2	CC
c34	Θήλυ	-	1	GG
C35	Θήλυ	-	2	CC
C36	Θήλυ	-	2	CC
C37	Θήλυ	-	2	CC
C38	Θήλυ	-	2	CC
C39	Θήλυ	-	2	CC
C40	Θήλυ	-	2	CC
C41	Άρρεν	-	2	CC
C42	Άρρεν	-	2	CC
C43	Άρρεν	-	2	CC
C44	Άρρεν	-	2	CC
C45	Άρρεν	-	2	CC
C46	Άρρεν	-	2	CC
C47	Άρρεν	-	2	CC
C48	Άρρεν	-	2	CC
C49	Άρρεν	-	2	CC
C50	Άρρεν	-	2	CC
C51	Άρρεν	-	2	CC

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης SNP του γονιδίου ΡΧΚ

Κωδικός	Φύλο	Υπότυπος νόσου	Πρότυπο SSCP	Γονότυπος
S1	Θήλυ	diffuse	1	CC
S2	Θήλυ	limited	4	CC
S3	Άρρεν	diffuse	1	CC
S4	Θήλυ	limited	8	GG
S6	Θήλυ	diffuse	1	CC
s7	Θήλυ	diffuse	1	CC
S8	Θήλυ	limited	4	CC
S11	Άρρεν	diffuse	1	CC
S12	Θήλυ	limited	4	CC
S13	Άρρεν	diffuse	1	CC
S14	Θήλυ	limited	1	CC
S15	Θήλυ	limited	1	CC
S16	Άρρεν	diffuse	1	CC
S17	Θήλυ	diffuse	1	CC
S18	Θήλυ	diffuse	1	CC
S20	Θήλυ	limited	1	CC
S21	Θήλυ	limited	1	CC
S22	Θήλυ	diffuse	7	GG
S23	Θήλυ	limited	1	CC
S25	Θήλυ	limited	1	CC
S26	Θήλυ	diffuse	8	GG
S27	Άρρεν	diffuse	1	CC
S30	Θήλυ	diffuse	1	CC
S32	Θήλυ	diffuse	5	GG
S33	Θήλυ	diffuse	1	CC
S34	Θήλυ	diffuse	1	CC
S36	Θήλυ	diffuse	1	CC
S37	Θήλυ	limited	1	CC
S39	Θήλυ	limited	1	CC
S40	Άρρεν	limited	1	CC
S41	Θήλυ	limited	1	CC
S42	Θήλυ	limited	1	CC
S43	Θήλυ	limited	1	CC
S45	Θήλυ	diffuse	1	CC
S47	Θήλυ	limited	1	CC
S48	Θήλυ	limited	1	CC
S49	Θήλυ	diffuse	7	GG
S51	Θήλυ	diffuse	1	CC
S52	Άρρεν	diffuse	1	CC
S53	Θήλυ	limited	1	CC
S54	Θήλυ	diffuse	1	CC
S55	Θήλυ	limited	1	CC

S56	Θήλυ	diffuse	1	CC
S57	Θήλυ	diffuse	1	CC
S58	Θήλυ	limited	9	GG
S59	Θήλυ	limited	1	CC
S60	Θήλυ	limited	1	CC
S61	Άρρεν	diffuse	1	CC
S62	Θήλυ	limited	7	GG
S65	Θήλυ	limited	1	CC
S67	Θήλυ	limited	1	CC
S68	Θήλυ	diffuse	1	CC
S69	Θήλυ	diffuse	1	CC
S70	Θήλυ	limited	8	GG
S71	Άρρεν	diffuse	5	GG
S74	Θήλυ	limited	1	CC
S75	Θήλυ	diffuse	1	CC
S76	Θήλυ	diffuse	1	CC
S78	Θήλυ	diffuse	1	CC
S87	Θήλυ	diffuse	1	CC
S89	Θήλυ	diffuse	1	CC
S91	Θήλυ	diffuse	1	CC
S94	Θήλυ	diffuse	1	CC
S97	Θήλυ	diffuse	4	CC
S99	Θήλυ	diffuse	1	CC
S100	Θήλυ	diffuse	1	CC
S101	Θήλυ	diffuse	1	CC
S102	Θήλυ	diffuse	1	CC
S103	Θήλυ	diffuse	4	CC
S115	Θήλυ	diffuse	1	CC
S117	Θήλυ	diffuse	4	CC
S118	Θήλυ	diffuse	4	CC
S120	Άρρεν	diffuse	1	CC
S121	Άρρεν	diffuse	1	CC
S122	Θήλυ	diffuse	1	CC
S124	Θήλυ	diffuse	1	CC
s127	Άρρεν	diffuse	1	CC
s95	Θήλυ	diffuse	1	CC
s44	Θήλυ	diffuse	1	CC
s46	Θήλυ	diffuse	1	CC
s29	Θήλυ	diffuse	5	GG
s35	Θήλυ	diffuse	5	GG
M3	Άρρεν	-	1	CC
M4	Άρρεν	-	5	GG
M5	Άρρεν	-	5	GG
M6	Άρρεν	-	4	CC
M8	Άρρεν	-	1	CC

M9	Άρρεν	-	5	GG
M12	Άρρεν	-	6	GG
C1	Θήλυ	-	6	GG
C2	Θήλυ	-	7	GG
C3	Θήλυ	-	1	CC
C4	Θήλυ	-	5	GG
C5	Θήλυ	-	1	CC
C6	Θήλυ	-	1	CC
C7	Θήλυ	-	5	GG
C8	Θήλυ	-	5	GG
C9	Θήλυ	-	5	GG
C10	Θήλυ	-	5	GG
C11	Θήλυ	-	5	GG
C12	Θήλυ	-	5	GG
C13	Θήλυ	-	1	CC
C14	Θήλυ	-	1	CC
C15	Θήλυ	-	1	CC
C16	Θήλυ	-	1	CC
C17	Θήλυ	-	1	CC
C18	Θήλυ	-	1	CC
C19	Θήλυ	-	1	CC
C20	Θήλυ	-	1	CC
C21	Θήλυ	-	1	CC
C22	Θήλυ	-	1	CC
C23	Θήλυ	-	1	CC
C24	Θήλυ	-	1	CC
C25	Θήλυ	-	1	CC
C26	Θήλυ	-	7	CC
C27	Θήλυ	-	4	CC
C28	Θήλυ	-	5	GG
C29	Θήλυ	-	1	CC
C30	Θήλυ	-	7	GG
C31	Θήλυ	-	9	GG
C32	Θήλυ	-	1	CC
C33	Θήλυ	-	1	CC
c34	Θήλυ	-	1	CC
C35	Θήλυ	-	1	CC
C36	Θήλυ	-	1	CC
C37	Θήλυ	-	4	CC
C38	Θήλυ	-	1	CC
C39	Θήλυ	-	1	CC
C40	Θήλυ	-	1	CC

C41	Άρρεν	-	1	CC
C42	Άρρεν	-	1	CC
C43	Άρρεν	-	1	CC
C44	Άρρεν	-	1	CC
C45	Άρρεν	-	1	CC
C46	Άρρεν	-	1	CC
C47	Άρρεν	-	1	CC
C48	Άρρεν	-	1	CC
C49	Άρρεν	-	1	CC
C50	Άρρεν	-	1	CC
C51	Άρρεν	-	1	CC

4 Συζήτηση

Η συστηματική σκλήρυνση είναι ένα από τα πολυπλοκότερα αυτοάνοσα νόσημα του συνδετικού ιστού και επηρεάζει πέρα από το δέρμα, ζωτικά όργανα όπως οι πνεύμονες. Δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και στο αγγειακό όπου εμπλέκονται κύτταρα του αγγειακού συστήματος, ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, τα οποία παράγουν εξωκυττάριο υλικό, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους και συμβάλλουν στον φαινότυπο και στην εκδήλωση της ασθένειας. Η κλινική ετερογένεια της νόσου οφείλεται στην αλληλεπίδραση πολλών διαφορετικών παραγόντων πέρα των διαφορετικών γονιδίων των συστημάτων που εμπλέκονται στην παθογένεια. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι η μόλυνση από ορισμένους ιούς αλλά και η περιορισμένη έκθεση στο φως του ήλιου θεωρείται πως αποτελούν ερεθίσματα που πυροδοτούν και συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας.

Η περιοχή του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας έχει συσχετιστεί από πολλαπλές μελέτες με τη συστηματική σκλήρυνση. Πρόσφατες έρευνες έχουν αναδείξει νέα βιοσυνθετικά μονοπάτια και γενετικούς τόπους που συνδέονται με την ασθένεια όπως: ρυθμιστικές περιοχές του γενετικού υλικού, γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και γονίδια που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος και την ίνωση (Pearce et al).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί rs6918698 στον γονιδιακό τόπο CTGF και rs4681851 στον γονιδιακό τόπο PXX σε ελληνικό πληθυσμό περίπου 78 και 82 ασθενών και ομάδα ελέγχου που περιελάμβανε 53 και 58 άτομα που δεν έπασχαν από συστηματική σκλήρυνση αντίστοιχα.

Ο CTGF είναι ένας αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων που η έκφρασή του επάγεται όπως προαναφέρθηκε σε περίπτωση ιστικής βλάβης. Η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs6918698 στη θέση -945 του υποκινητή του γονιδίου αναδέχθηκε από μελέτες υποψηφίου γονιδίου (Kawaguchi et al, Granel et al, Fonseca et al) και ερευνήθηκε περαιτέρω από μια ανάλυση στη οποία δείχθηκε ότι ο γονότυπος CC/CG μειώνει την εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης (Zhang et

a). Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονοτύπου GG που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό.

Το γονίδιο PXC κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που έχει ρόλο στην αποικοδόμηση του EGFR οπότε εικάζεται ότι συμμετέχει στην διαδικασίες της ίνωσης. Το υπό μελέτη SNP του γονιδίου έχει βρεθεί σε μελέτη GWAS (Martin et al) να σχετίζεται με την συστηματική σκλήρυνση. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο γονότυπος GG εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση της ασθένειας. Στην ανάλυση SSCP παρατηρήθηκαν 9 πρότυπα. Τα οποία όμως αντιστοιχούν σε μόλις δύο διαφορετικούς γονότυπους. Αναδεικνύεται λοιπόν η ανάγκη διερεύνησης της συχνότητας των άλλων πολυμορφισμών στην περιοχή γύρω από τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό που αναλύθηκε.

Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι η πρώτη μελέτη συσχέτισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την συστηματική σκλήρυνση σε ελληνικό πληθυσμό. Η συσχέτιση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την ασθένεια συμβάλλει στην κατανόηση της αλλά και στην έγκυρη πρόγνωσή της. Όμως για να ενισχυθεί η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες, αλλά και να αυξηθεί ο αριθμός των ασθενών και των υγιών μαρτύρων που αναλύονται. Επιπλέον θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και λειτουργικές μελέτες των συγκεκριμένων πολυμορφισμών, μετά την πρώτη αυτή συσχέτιση ώστε να διευκρινιστεί ο ακριβής ρόλος τους στην λειτουργία των πρωτεϊνών και συνεπώς στην παθογένεια και την κλινική πορεία της νόσου. Παράλληλα χρειάζεται να διευκρινιστεί αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους ή αξιόπιστους και ευαίσθητους μοριακούς δείκτες για την διάγνωση, την κατηγοριοποίηση του τύπου της ασθένειας και την παρακολούθηση της κλινικής της πορείας σε κάθε ασθενή.

5 Βιβλιογραφία

1. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV, et al. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am J Hum Genet* (2014) 94(1):47–61. doi:10.1016/j.ajhg.2013.12.002
2. Broen JC, Radstake TR, Rossato M. The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10(11):671–681. [PubMed: 25136786]
3. Ellson, C. D., S. Andrews, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins. 2002. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J. Cell Sci.* **115**:1099–1105.
4. Seth P, Walker LC, Yeowell HN. Identification of exonic cis-elements regulating the alternative splicing of scleroderma-associated lysyl hydroxylase 2 mRNA. *J Invest Dermatol*. 2011; 131(2):537–539. [PubMed: 20944645]
5. Sing T, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-92a expression in the sera and dermal fibroblasts increases in patients with scleroderma. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51(9):1550–1556. [PubMed: 22661558]
6. Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, et al. Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis*. 2009;68: 1921,–4.
7. Mao, H., T. S. Ferguson, S. M. Cibulsky, M. Holmqvist, C. Ding, H. Fei, and B. Levitan. 2005. MONaKA, a novel modulator of the plasma membrane Na, K-ATPase. *J. Neurosci.* 25:7934–7943
8. Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends Mol Med* 2006;12:90-8.)
9. Martin JE, Assassi S, Diaz-Gallo LM, et al. A systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus pan-meta-GWAS reveals new shared susceptibility loci. *Hum Mol Genet*. 2013; 22(19):4021–4029. [PubMed: 23740937]
10. Granel B, Argiro L, Hachulla E, et al. Association between a CTGF gene polymorphism and systemic sclerosis in a French population. *J Rheumatol*. 2009;37: 351–8.
11. Zhang X, Nie S, Si X, Luo Y, Tang W. Association between the CTGF -945C/G
12. polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis. *Gene*. 2012;509(1):1–6
13. Takeuchi H, Takeuchi T, Gao J, Cantley LC, Hirata M. Characterization of PXX as a Protein Involved in Epidermal Growth Factor Receptor Trafficking. *Mol Cell Biol*. 2010;30(7):1689-1702. doi:10.1128/MCB.01105-09
14. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(1):102-111. doi:10.1007/s12016-011-8294-7
15. Zhang X, Nie S, Si X, Luo Y, Tang W. Association between the CTGF -945C/G polymorphism and systemic sclerosis: A meta-analysis. *Gene*. 2012;509(1):1-6. doi:10.1016/j.gene.2012.07.061
16. Carmen Fonseca, M.D., Ph.D., Gisela E. Lindahl, Ph.D., Markella Ponticos,

- Ph.D., Piersante Sestini, M.D., Elisabetta A. Renzoni, M.D., Alan M. Holmes, Ph.D., Paolo Spagnolo, M.D., Panagiotis Pantelidis, Ph.D., Patricia Leoni, Ph.D., Neil McHugh, M.D., Car PD, Christopher P. Denton, M.D., Ph.D., Carol M. Black, M.D., Kenneth I. Welsh, Ph.D., Roland M. du Bois, M.D., and David J. Abraham PD. A Polymorphism in the CTGF Promoter Region Associated with Systemic Sclerosis. 2007.
17. Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: A potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal*. 2009;3(2):89-94. doi:10.1007/s12079-009-0037-7
 18. Gloria Salazar, MD and Maureen D. Mayes MM. Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis. 2016;93(4):292-297. doi:10.1016/j.contraception.2015.12.017.Women
 19. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: Autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology*. 2010;49(2):203-210. doi:10.1093/rheumatology/kep368
 20. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6(JUN). doi:10.3389/fimmu.2015.00272
 21. Allanore Y, Simms R, Distler O, et al. Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(April). doi:10.1038/nrdp.2015.2
 22. Ramos PS, Silver RM, Feghali-Bostwick CA. Genetics of systemic sclerosis: Recent advances. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(6):521-529. doi:10.1097/BOR.0000000000000214
 23. Thompson and Thompson. Χαρτογράφηση και ταυτοποίηση γονιδίων του ανθρώπου που σχετίζονται με νοσήματα Στο Nussbaum I. Robert, Mcinnes R. Roderick WFH (eds). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ*. 2^η. Π. Χ. Πασχαλίδης, BROKEN HILL pp. 280,630.
 24. Zhou X, Tan FK, Wang N, et al. Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum* 2003;48:2585-92.
 25. Leask A, Abraham DJ (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *JCell Sci* 119:4803–4810 doi:10.1242/jcs.03270
 26. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRCinduced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114:1285–1294 doi:10.1083/jcb.114.6.1285
 27. Kapoor M, Liu S, Huh K, Parapuram S, Kennedy L, Leask A (2008) Connective tissue growth factor promoter activity in normal and wounded skin. *Fibrogenesis Tissue Repair* 1:1 doi:10.1186/1755-1536-1-3 Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999;238:291-300.
 28. 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
 29. Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*. 1:34-38.

30. B.J. Bassam, G. Caetano-Anollés, P.M. Gresshoff, Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 196 (1991) 80–83
31. 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