

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:

Ο ρόλος του TNF-α ως γενετικός δείκτης για καρδιαγγειακή νόσο



Τζηρκαλλή Μαρία, AM 20044

Τριμελής Επιτροπή: Δεδούσης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής
Μοριακής Βιολογίας
Παναγιωτάκος Δημοσθένης, Λέκτορας
Μανιός Ιωάννης, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2004

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Γιώργο Δεδούση, ο οποίος πίστεψε σε μένα και τις ικανότητες μου στη μοριακή βιολογία και μου έδωσε την ευκαιρία να φέρω σε πέρας αυτή την τόσο ενδιαφέρουσα έρευνα. Το Δρ. Γιάννη Μανιό που με βοήθησε στη διατροφική αξιολόγηση των ασθενών και το κ. Παναγιωτάκο του οποίου η συμβολή στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων κάλυψε ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της μελέτης αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Ειρήνη Λουίζου η οποία με δίδαξε ό,τι γνωρίζω όσο αφορά το πρακτικό πειραματικό κομμάτι της έρευνας και της οποίας οι συμβουλές, η συμπαράσταση και η φιλία στάθηκαν για μένα ανεκτίμητα, τη Νικολέττα Βίδρα για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη σε μένα καθώς και τη Δέσποινα Χουμεριανού για το ενδιαφέρον και τη πολύ σημαντική συμβολή στο εργαστήριο μέρος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Θεό, τους γονείς μου που μου πρόσφεραν αυτή την ευκαιρία και αγωνίστηκαν και αγωνίζονται για τη δική μου καταξίωση καθώς και τα αδέρφια μου που με βοήθησαν σε ό,τι χρειάστηκα. Τέλος, τις φίλες μου Άντρεα, Έλενα, Άννα και Γεωργία για τη στήριξη στις δύσκολες στιγμές, τις συμφοιτήτριες μου Ευδοκία και Μαρία και όλους τους φίλους και τις συμφοιτήτριες που με βοήθησαν να φτάσω μέχρι εδώ καθώς και τον κ. Ταππακούδη, όλους τους ασθενείς και τους εργαζόμενους στο νοσοκομείο οι οποίοι συνεργάστηκαν μαζί μου και με βοήθησαν να φέρω εις πέρας την έρευνα αυτή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

σελ.5

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	ΓΕΝΙΚΑ	σελ.6
1.2	TNF- α	σελ.7
1.3	TNF- β	σελ.9
1.4	Μια σύντομη ιστορική αναδρομή	σελ.10
1.5	Λειτουργίες του TNF- α	σελ.11
	1.5.1 Ινσοουλινοαντίσταση	σελ.11
	1.5.2 Παχυσαρκία	σελ.12
	1.5.3 Ο TNF- α ως μία μεταβολική κυτοκίνη	σελ.12
	1.5.4 Ο ρόλος του TNF- α στο μεταβολισμό των λιποκυττάρων	σελ.13
	1.5.5 Ο TNF- α και η ρύθμιση της λεπτίνης	σελ.16
1.6	Δομή του γονιδίου του TNF- α	σελ.17
1.7	Πρόσφατες έρευνες και νέοι ρόλοι για τον TNF- α	σελ.19
1.8	Ο βιολογικός ρόλος του TNF- α	σελ.20
1.9	Μηχανισμοί δράσης	σελ.21
1.10	TNF υποδοχέας	σελ.22
1.11	Κυτταρικός θάνατος και TNF	σελ.23
1.12	Ο TNF- α στο φως της νέας χιλιετίας	σελ.26

1.13	Μοριακή γενετική	σελ.26
1.13.1	Πολυμορφισμοί	σελ.27
1.13.2	Συσχέτιση μεταξύ των SNP's και της παραγωγής του TNF	σελ.31
1.14	Γιατί το γονίδιο του TNF-α είναι τόσο πολυμορφικό;	σελ.33
1.15	Πληθυσμιακές μελέτες	σελ.34
1.16	Στεφανιαία νόσος	σελ.36
1.16.1	Στεφανιαίες καρδιοπάθειες και γενετική	σελ.36
1.16.2	Γενετικές επιδημιολογικές έρευνες	σελ.38
1.16.3	Γενετικοί πολυμορφισμοί και διατροφή	σελ.38
1.16.4	Συμβολή στην προληπτική ιατρική	σελ.41
1.17	Ο πολυμορφισμός -308 του TNF-α και Καρδιοπάθειες	σελ.42
2.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	σελ.46
3.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	σελ.47
3.1.	Δείγμα	σελ.48
3.2.	Διερευνούμενοι παράγοντες	σελ.48
3.3.	Απομόνωση DNA	σελ.49
3.4.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	σελ.50
3.5.	Έλεγχος επιτυχίας PCR	σελ.54
3.6.	Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	σελ.55
3.7.	Έλεγχος του προϊόντος της πέψης	σελ.58
3.8.	Διαλύματα	σελ.59
3.9.	Υλικά	σελ.60
3.9.1.	Πλαστικά-Γυαλικά	σελ.60
3.9.2.	Μηχανήματα	σελ.60
3.10.	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	σελ.61
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.62
4.1	Χαρακτηριστικά	σελ.63
4.2	Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	σελ.64
4.3	Αποτελέσματα πέψης	σελ.64
4.4	Συχνότητα αλληλομόρφων	σελ.66
4.5	Συσχέτιση πολυμορφισμού και καρδιοπαθειών	σελ.66
4.6	Συσχέτιση πολυμορφισμού και ΔΜΣ	σελ.66
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.67
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.70
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	σελ.73

Περίληψη

Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων-άλφα (TNF-α) είναι ένα χημικό μόριο γύρω από το οποίο έχει συσσωρευτεί μεγάλο επιστημονικό ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Αποτελεί μία κυτοκίνη με πλειοτροπικές δράσεις σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού. Έχει πάρει το όνομά του από την ικανότητα που διαθέτει να προκαλεί καταστολή και συρρίκνωση σε ορισμένα είδη όγκων ενώ παράλληλα, συμμετέχει στην αντιφλεγμονώδη απόκριση, στην παχυσαρκία, στην ινσουλिनoαντίσταση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και σε πολλές άλλες διεργασίες μέσω της σύνδεσής του σε ειδικούς υποδοχείς (TNFR). Το πιο πρόσφατο όμως ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας όσο αφορά το μυστήριο αυτό μόριο, έχει επικεντρωθεί στη σχέση του πολυμορφισμού του εκκινητή (-308 G/A) που προκαλεί υπερέκκριση του TNF-α, με την καρδιαγγειακή νόσο. Τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα ερευνών παρουσιάζονται αμφιλεγόμενα. Ο σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να εξετάσει κατά πόσο υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό και της καρδιαγγειακής νόσου, συγκρίνοντας την ύπαρξη του πολυμορφισμού ανάμεσα σε δύο ομάδες, 56 ασθενών με βεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο και 51 υγιών εθελοντών, όλοι Ελληνοκυπριακής καταγωγής. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια, ωστόσο όμως χρειάζονται περαιτέρω έρευνες για να ξεκαθαριστεί η ύπαρξη ή όχι ισχυρής συσχέτισης και εάν πράγματι θα μπορούσε ο γονότυπος όσο αφορά τον TNF-α να αποτελεί δείκτη κινδύνου για τις καρδιαγγειακές παθήσεις.

1. Γενικά

Ο οργανισμός έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς με τους οποίους θα μπορεί να προστατεύεται από διάφορα ξένα σώματα που προσπαθούν να εισβάλουν σε αυτόν, σαν ζώσα ή μη ζώσα ύλη. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται στη μη ειδική ανοσολογική άμυνα και στην ειδική ανοσολογική άμυνα. Κατά την ειδική ανοσολογική άμυνα, αναγνωρίζονται τα ξένα κύτταρα κυρίως μέσω ειδικών πρωτεϊνών που βρίσκονται σε αυτά. Τα κύτταρα του οργανισμού τα οποία εμπλέκονται στην ειδική άμυνα είναι τα λεμφοκύτταρα τα οποία παράγονται στα πρωτογενή λεμφικά όργανα (μυελός, θύμος), ενεργοποιούνται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας, αμυγδαλές) και χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: (1)

- Β λεμφοκύτταρα
- Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
- Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα
- ΝΚ κύτταρα

Επίσης στην ειδική ανοσολογική άμυνα εκτός από τα λεμφοκύτταρα, περιλαμβάνονται και τα μακροφάγα, τα πλασματοκύτταρα, μαστοκύτταρα κ.α. (1)

Οι κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες αποτελούν πρωτεϊνικά μηνύματα που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη του ξενιστή και λειτουργούν τόσο στους ειδικούς όσο και στους μη ειδικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Παράγονται όχι από εξειδικευμένους αδένες αλλά από μια ποικιλία μεμονωμένων κυττάρων του ανοσοποιητικού και μη συστήματος. Δρουν ως αυτοκρινείς/παρακρινείς παράγοντες και μπορούν να ασκήσουν ορμονικές δράσεις σε απομακρυσμένα όργανα και σε ιστούς που κατέχουν σημαντικό ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Αποτελούν δηλαδή, βιολογικούς ρυθμιστές-τροποποιητές της ανοσολογικής απόκρισης, με σημαντικό ρόλο στη δράση των αντισωμάτων και των Τ λεμφοκυττάρων και περιλαμβάνουν τις: (2)

1. Μονοκίνες οι οποίες παράγονται από τα μακροφάγα και περιλαμβάνουν τις:

- Ιντερλευκίνη-1
- TNF
- Ιντερφερόνη-α και -β

- Παράγοντες ανάπτυξης αποικιών

2. Λεμφοκίνες που παράγονται από ενεργοποιημένα Τα λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα και περιλαμβάνουν:

- Ιντερλευκίνες 2-6
- Παράγοντες ανάπτυξης αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων
- Λεμφοτοξίνη

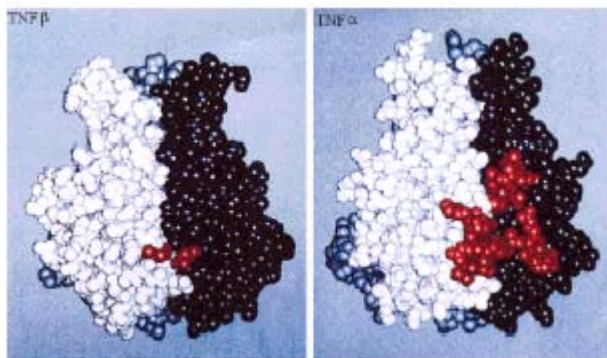
1.2. TNFA

Ο TNFA είναι μια κυτοτοξική μονοκίνη η οποία παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα όταν διεγείρονται από μια βακτηριακή ενδοτοξίνη. Συμμετέχει στην φλεγμονή, στην επούλωση των πληγών και στη αναμόρφωση των ιστών και ονομάζεται επίσης καχεκτίνη. Εκτός από τα μακροφάγα, παράγεται και από μία ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των μονοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων, των B λεμφοκυττάρων και NK κυττάρων καθώς και από άλλους τύπους κυττάρων όταν διεγείρονται και αυτά από κάποια ενδοτοξίνη ή κάποια άλλα μικροβακτηριακά προϊόντα. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τον TNF-α (κεχεκτίνη) και τον TNF-β (λυμφοτοξίνη) εντοπίζονται στο μικρό άκρο του χρωματοσώματος 6 στον άνθρωπο στην MCH περιοχή. Υψηλά επίπεδα TNF-α ανιχνεύονται στην αιματική κυκλοφορία πολύ σύντομα μετά τη χορήγηση ενδοτοξίνης ή μικροοργανισμών. Η χορήγηση αυξημένων ποσοτήτων TNF-α σε ζώα όπως σκύλους, κουνέλια και πρόβατα προκαλεί σοκ, ανεπάρκεια διάφορων οργάνων και αιμορραγική νέκρωση των ιστών με συμπτώματα όμοια με την θανατηφόρα ενδοτοξαίμια. Ο TNF-α παράγεται κατά τις τρεις πρώτες μέρες της επούλωσης κάποιου τραύματος καθώς προάγει την επιστράτευση των λευκοκυττάρων, την αγγειογένεση και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του συνδετικού ιστού. (2)

Γενικά μπορούμε να πούμε ότι, είναι μια πολυλειτουργική, προφλεγμονώδης κυτοκίνη, με δράσεις στον μεταβολισμό των λιποειδών, στη διαδικασία της θρόμβωσης, στην ινσουλινοαντοχή και στην ενδοθηλιακή λειτουργία.

Ανακαλύφθηκε αρχικά στον ορό κουνελιών και ποντικών, ο οποίος είχε την ικανότητα να προκαλεί αιμορραγική νέκρωση και σε μερικές περιπτώσεις πλήρη οπισθοχώρηση ορισμένων μεταφυτευμένων όγκων στα ποντίκια. Έτσι, ο TNF συσχετίζεται με την *in vivo* καθώς και την *in vitro* νέκρωση των καρκινικών κυττάρων.

Μετά την απομόνωση cDNA κλώνων και τη μετάφρασή τους σε στελέχη *E.coli* έγινε η κλωνοποίηση του TNF. Έτσι, βρέθηκε ότι το γονίδιο του TNF αποτελείται από τέσσερα εξόνια τα οποία κωδικοποιούν ένα πρόδρομο προϊόν από 230 αμινοξέα. Με την ωρίμανση του προϊόντος αποκόπτεται μια ασυνήθιστα μεγάλη αλληλουχία leader και παραμένουν στην τελική αλυσίδα 157 αμινοξέα. Ο TNF-α και ο TNF-β έχουν όμοιο βιολογικό ρόλο. Η cDNA αλληλουχία τους αποκάλυψε 30% ομολογία στα κωδικοποιημένα κατάλοιπα αμινοξέων. Οι δομές των TNF-α και TNF-β έχουν καθοριστεί και έχουν οριστεί και οι δύο σαν τριμερή σε σχήμα «αχλάδι» / «κώνου». (σχήμα 1). Επιπλέον, επιστημονικά στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο TNF-α και ο TNF-β μοιράζονται κοινούς υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα και οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζονται από τη γ-ιντερφερόνη.(3)



Σχήμα 1.1: Στις φωτογραφίες παρουσιάζονται τα τριμερή του TNF-α (δεξιά) και του TNF-β (αριστερά). Η κάθε υπομονάδα του τριμερές φαίνεται με διαφορετικό χρώμα.

1.2. TNF-β

Είναι μια πρωτεΐνη μήκους 25kD η οποία συντίθεται από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα. Μπορεί να σκοτώσει καρκινικά κύτταρα σε καλλιέργεια, να προκαλέσει την έκφραση ορισμένων γονιδίων, να διεγείρει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων του συνδετικού ιστού και επιπλέον μιμείται τις περισσότερες δράσεις του TNF-α. Συμμετέχει σε καταστάσεις φλεγμονής και στην απόρριψη μοσχεύματος και ονομάζεται επίσης λυμφοτοξίνη. Ο TNF-α και ο TNF-β έχουν σχεδόν ισάξια διεκδίκηση για τους υποδοχείς TNF. Ο TNF-β μπορεί να συνδέεται στους δύο υποδοχείς TNF των 55kD και 80kD προκαλώντας θάνατο ορισμένων κυττάρων και το proliferation άλλων. Αποτελεί τον μεσάζοντα για τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα έτσι ώστε να πετύχουν το μοιραίο κτύπημα στους στόχους τους. Έχει εισηγηθεί ότι ο TNF-α και ο TNF-β ίσως συμμετέχουν στην παθογένεση του AIDS. (2)

1.3. Η Υπεροικογένεια του TNF-α

Η ανακάλυψη του TNF-β και στη συνέχεια του TNF-α όπως θα αναφερθεί πιο κάτω, καθώς και η δομική και λειτουργική ομολογία τους που οδήγησε στους ερευνητές στο να τους δώσουν αυτή την κοινή ονομασία, έθεσε τα θεμέλια για μία πολύ μεγαλύτερη οικογένεια κυτοκινών που τώρα ονομάζεται η Υπεροικογένεια του TNF. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί 19 μέλη της υπερικογένειας αυτής και αρκετά από τα μέλη της έχει φανεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμό και της επιβίωση καθώς και στην διαφοροποίηση των κυττάρων, με διαδικασίες που δεν έχουν επακριβώς ξεκαθαριστεί ακόμη. Οι περισσότερες από τις κυτοκίνες της υπερικογένειας του TNF παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κάτι που υποδεικνύει το ρόλο τους στην ανοσολογική ρύθμιση. (4)

1.4. Μια σύντομη Ιστορική Αναδρομή

Οι πρώτες αναφορές για την ύπαρξη κάποιου βιολογικού παράγοντα ο οποίος αποτελεί μεσάζον μόριο για διάφορες ογκονεκρωτικές δράσεις, χρονολογούνται από τις αρχές του 18^{ου} αιώνα, μετά από παρατηρήσεις σε καρκινοπαθείς ασθενείς οι οποίοι όταν εκτίθονταν σε σοβαρή μικροβιακή μόλυνση, υφίσταντο σε ορισμένες περιπτώσεις μάζεμα των όγκων.

Το 1968, ο Dr. Gale A. Granger από το πανεπιστήμιο της California, ανέφερε μια πρωτεΐνη με κυτοτοξικές ιδιότητες η οποία παραγόταν από τα λεμφοκύτταρα και την ονόμασε λυμφοτοξίνη. Κάποια χρόνια αργότερα, το 1975, ο Dr. Lloyd Old στο Sloan-Kettering Memorial Cancer Center της Νέας Υόρκης, ανέφερε μια άλλη πρωτεΐνη με κυταροτοξικές δραστηριότητες η οποία πιθανώς παραγόταν από τα μακροφάγα. (4) Με διάφορα πειράματα φάνηκε ότι η πρωτεΐνη η οποία ορίστηκε «Tumor Necrosis Factor ή Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων» (TNF-α) απελευθερωνόταν στην κυκλοφορία και προκαλούσε ταχεία νέκρωση και μείωση στο μέγεθος ορισμένων όγκων. Η νεκρωτική ικανότητα του TNF-α δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα είδη όγκων και η θεραπευτικές προοπτικές που παρουσιάζονταν δεν μπορούσαν να υλοποιηθούν λόγω της συστηματικής τοξικότητας που προκαλούσε σε δραστικές συγκεντρώσεις. Ο TNF-α καθώς και ο TNF-β αποτελούν δύο δομικά και λειτουργικά όμοιες πρωτεΐνες, απομονώθηκαν το 1984 από ενεργοποιημένα μακροφάγα και T κύτταρα, αντίστοιχα. Οι υποδοχείς για τον TNF (ο όρος αναφέρεται και στις δύο πρωτεΐνες) TNFR-1 και TNFR-2, έχουν κλωνοποιηθεί και εκφράζονται σαν 55 και 75 kDa πρωτεΐνες αντίστοιχα. Η αποκάλυψη με ακτίνες X της δομής του TNF-β σαν σύμπλοκο με τον υποδοχέα TNFR-1 αποτέλεσε σταθμό για την μοριακή κατανόηση για το πώς λειτουργεί ο TNF. Το τριμερές του TNF δένεται σε τρία μόρια του υποδοχέα, ένα για την κάθε μία των τριών μονομερές προς μονομερές διασυνδέσεων του TNF. Η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα είναι ένα επίμηκες μόριο το οποίο αποτελείται από 3 μοτίβα των 3 δισουλφιδίου περιεχόμενα κατάλοιπα. Αρχικά μόνο οι τρεις από τις τέσσερις εξωκυτταρικές υπομονάδες είχαν απεικονιστεί. Στη συνέχεια με την καινοφανή μέθοδο της ευθυγράμμισης και πρόβλεψης της δομής συγγενών υποδοχέων αποκαλύφθηκε και η δομή της τέταρτης υπομονάδας η οποία είναι διαφορετική από τις άλλες τρεις.

1.5. Λειτουργίες του TNF-α

Δυσλειτουργία, και πιο συγκεκριμένα υπερπαραγωγή του TNF-α έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία ανθρωπίνων ασθενειών όπως σήψη, εγκεφαλική ελονοσία, καθώς και αυτοάνοσες ασθένειες όπως πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ασθένεια Crohn καθώς και καρκίνο. Κατά ένα ποσοστό, η εμφάνιση των ασθενειών αυτών οφείλεται και σε γενετικούς παράγοντες και το γονίδιο του TNF-α θεωρείται ένα από τα πιθανά γονίδια στα οποία οφείλεται η γενετική προδιάθεση των ασθενειών αυτών. Η προσπάθεια να ξετυλιχτεί η πιθανότητα συσχέτισης των γενετικών διακυμάνσεων του TNF-α με την προδιάθεση για διάφορες ασθένειες ή τη σοβαρότητα των ασθενειών αυτών περιπλέκεται από τη θέση του στο ανθρώπινο γονιδίωμα δηλαδή στην περιοχή MHC. Η περιοχή αυτή εκτός από το γεγονός ότι είναι υψηλά πολυμορφική, κωδικοποιεί ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση. (5)

1.5.1. Ινσουλινοαντίσταση και Διαβήτης

Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι αυξημένα επίπεδα του TNF-α μπορούν να προκαλέσουν ινσουλινοαντίσταση σε ένα αρκετά μεγάλο εύρος καταβολικών καταστάσεων διαφόρων παθήσεων όπως είναι ο καρκίνος, η σήψη και το τραύμα. Αυτό υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι απευθείας έκθεση υγιών ατόμων, ζώων ή απομονωμένων κυττάρων στον TNF-α προκαλεί μια κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη. Πρόσφατες έρευνες έχουν επίσης εδραιώσει στέρεα τον TNF-α ως ένα πολύ κρίσιμο μεσολαβητικό μόριο για την ανάπτυξη της ινσουλινοαντίστασης της συσχετιζόμενης με την παχυσαρκία, κάτι που υποστηρίζεται από ένα αρκετά μεγάλο αριθμό πειραματικών αποδείξεων. Αρχικά έχει βρεθεί ότι σε παχύσαρκα άτομα όπως και σε παχύσαρκα μοντέλα τρωκτικών, παρατηρείται πολύ μεγάλη έκφραση του TNF-α στο λιπώδη και στο μυϊκό ιστό στο επίπεδο και του mRNA και σε κυτταρικό επίπεδο της έκφρασης σαν πρωτεΐνη. Αυτό είναι σύμφωνο με πρόσφατες έρευνες οι οποίες εισηγούνται ότι τα κυκλοφορούντα επίπεδα του TNF-α αυξάνονται σε άτομα με NIDDM. Επιπλέον, τα επίπεδα του TNF-α συσχετίζονται ισχυρά με την υπερινσουλιναίμία και τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Διαιτητική καθώς και χημική θεραπεία της παχυσαρκίας βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και ταυτόχρονα συσχετίζεται με μειωμένη παραγωγή του

TNF- α . Οι κατασταλτικές δράσεις του TNF- α μπορούν να αναιρεθούν από φάρμακα τα οποία βοηθούν στην ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη όπως οι θειαζολιδινεδιόνες. (6)

Μελετώντας τη σχέση μεταξύ του TNF- α και των ανθρωπομετρικών και φυσιολογικών μεταβλητών της ινσουλινοαντίστασης και του διαβήτη σε ένα απομονωμένο ιθαγενή καναδέζικο πληθυσμό με πολύ υψηλά ποσοστά NIDDM βρέθηκαν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Χρησιμοποιώντας το homeostasis assessment model (HOMA) για την εκτίμηση της ινσουλινοαντοχής, βρέθηκε μέτρια αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF- α και της γλυκόζης νηστείας, της περιφέρειας μέσης, των τριγλυκεριδίων νηστείας και της συστολικής αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο TNF- α συσχετίζεται με προδιάθεση που οδηγεί στην εξέλιξη κάποιων διαβητικών ασθενών προς την εξάρτηση από εξωγενή ινσουλίνη οι οποίοι αρχικά είχαν διαγνωστεί με διαβήτη τύπου II και ότι ο καθορισμός του γονοτύπου όσο αφορά τον TNF- α αυτών των ασθενών, μπορεί να αποτελέσει παράγοντα καλύτερης κλινικής πρόγνωσης. (7)

1.5.2. Παχυσαρκία

Η επίδραση της G με A αντικατάστασης στη θέση -308 στον εκκινιτή του γονιδίου του TNF- α στην παχυσαρκία καθώς και στα επίπεδα ινσουλίνης, γλυκόζης, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και των κυκλοφορούντων ορμονών συμπεριλαμβανόμενης και της κορτιζόλης του σάλιου μελετήθηκε σε μια έρευνα σε 284 Σουηδούς άντρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γονότυποι -308 G/A είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης καθώς και περιφέρειας μέσης. (8)

1.5.3. Ο TNF- α ως μια μεταβολική κυτοκίνη

Αρκετές επιστημονικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν τον TNF- α ως παράγοντα ενάντια στη λιπογένεση. Η κύρια προέλευση του TNF- α στην κυκλοφορία πιστεύεται ότι είναι τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρ' όλα αυτά, πολλοί τύποι κυττάρων, συμπεριλαμβανόμενα και τα λιποκύτταρα, συνθέτουν και εκκρίνουν TNF- α . Η παραγωγή του TNF- α από το λιπώδη ιστό παραλληλίζεται με την παραγωγή της λεπτίνης. Για παράδειγμα, τα επίπεδα του TNF- α είναι υψηλότερα στον λιπώδη ιστό παχύσαρκων ποντικών και ανθρώπων σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς controls. Επειδή όμως σε πειράματα σε ποντίκια, η διαγραφή των γονιδίων του TNF- α ή των

υποδοχέων του δεν προκάλεσε παχυσαρκία, ο TNF-α δεν θεωρείται σημαντικός λιποστατικός παράγοντας. Συμπερασματικά, οι παρούσες γνώσεις για τον TNF-α και τον μεταβολισμό υποδεικνύουν ότι ο TNF-α διαμορφώνει τον ενεργειακό μεταβολισμό με τρόπο που να κατευθύνει τον οργανισμό προς αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο. (9)

Οι κυτοκίνες μπορούν και δρουν απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) έτσι ώστε να μειωθεί η πρόσληψη φαγητού και να αυξηθεί η ενεργειακή κατανάλωση, αλλά μπορεί να προκαλέσουν παρόμοιες δράσεις άλλων φυσιολογικών συστημάτων. Ο TNF-α συγκεκριμένα, παρακινεί τα λιποκύτταρα να παράγουν λεπτίνη η οποία δρα κεντρικά για να μειώσει την ενεργειακή πρόσληψη και αυξάνει την ενεργειακή δαπάνη. (9)

1.5.4. Ο ρόλος του TNF-α στον μεταβολισμό των λιποκυττάρων.

Ο TNF-α είναι μία πολυλειτουργική κυτοκίνη που εξασκεί μια μυριάδα βιολογικών δράσεων σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά είδη. Πολλές από αυτές τις δράσεις διαταράσσουν τη φυσιολογική λειτουργία του ενεργειακού μεταβολισμού. Στον λιπώδη ιστό, συγκεκριμένα, ο TNFα αποδείχθηκε ότι είτε ρυθμίζει ή παρεμβαίνει με τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων σε πολυάριθμα σημεία όπως η μεταγραφική ρύθμιση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων καθώς και η μετάδοση σήματος μέσω των ορμονών. (6)

Είναι ευρέως γνωστό ότι ο λιπώδης ιστός εξυπηρετεί όχι μόνο ως μία αποθήκη αποταμίευσης ενέργειας αλλά και σαν ένα ενδοκρινολογικό όργανο. Συμμετέχει ενεργά στην διαπίστωση της ενεργειακής και μεταβολικής κατάστασης του οργανισμού μέσω διαφόρων οδών μετάδοσης σήματος και ρυθμίζει τον ενεργειακό μεταβολισμό εκκρίνοντας μόρια σαν απάντηση προς τα προαναφερθέντα ερεθίσματα. Αυτό τον καθιστά ικανό όχι μόνο να ανταποκρίνεται τοπικά σε μεταβολικά ερεθίσματα μεταβάλλοντας την έκφραση σημαντικών γονιδίων για την κινητοποίηση ή την αποθήκευση ενέργειας αλλά και να ενεργοποιεί σήματα προς άλλους ιστούς τοιουτοτρόπως ρυθμίζοντας την ισορροπία της ενέργειας συστηματικά. Ένα από τα μόρια που παράγονται από τον λιπώδη ιστό είναι ο TNF-α ο οποίος έχει φανεί ότι ρυθμίζει σχεδόν κάθε πτυχή της βιολογίας του λιπώδους ιστού. Για παράδειγμα, μπορεί

κατευθείαν να μεταβάλει την ομοιόσταση της γλυκόζης και τον μεταβολισμό των λιπιδίων και παίζει αρκετά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ινσουλινοαντοχής. Καθώς ο TNF-α έχει ξεκινήσει να διαφαίνεται ως ένα συστατικό κλειδί για αρκετές από τις μεταβολικές παθήσεις όπως είναι η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η δυσλιπιδαιμία και η αθηροσκλήρωση είναι σημαντικό να κατανοηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο μεσολαβούνται οι δράσεις του. Μόνο τότε θα μπορέσει να γίνει δυνατή η εξεύρεση συγκεκριμένων στόχων για θεραπευτική παρέμβαση. (6)

Μία δράση κλειδί των λιποκυττάρων είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποειδών, σύμφωνα με τις φυσιολογικές ανάγκες σε ενέργεια. Τα τρία βιοχημικά σημεία της ρύθμισης είναι η πρόσληψη των λιπαρών οξέων, η λιπογένεση και η λιπόλυση. Κάθε ένα από τα αυτά τα σημεία μπορεί να μεταβληθεί ως απάντηση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως είναι η ινσουλίνη, η κορτιζόλη, οι κατεχολαμίνες, η αυξητική ορμόνη, η τεστοστερόνη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και οι κυτοκίνες. Υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενος όγκος αποδείξεων που υποστηρίζουν το ρόλο του TNF-α στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποειδών. Ένα από τα στοιχεία αυτά αποτελεί το γεγονός ότι ο τα ποντίκια τα οποία έχουν ανεπαρκείς ποσότητες TNF-α, επιδεικνύουν χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων από ότι άλλα που προήλθαν από το φυσικό τους περιβάλλον. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση του TNF-α μπορεί να διεγείρει τη λιπόλυση και να αυξήσει τα επίπεδα των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία *in vivo* και *in vitro*. Αφού τα λιπαρά οξέα μπορούν επίσης να συμμετέχουν στην ινσουλινοαντίσταση, οι δράσεις του TNF-α στην ινσουλινοευαισθησία μπορεί αποδειχτούν αποτελεσματικές μέσω της αύξησης της λιπόλυσης. (6)

Στα λιποκύτταρα, τα λιπαρά οξέα προέρχονται από στο μεγαλύτερο ποσοστό τους μέσω της αναρρόφησης τους από την κυκλοφορία και σε μικρότερο βαθμό από την *de novo* σύνθεση από τη γλυκόζη. Η αναρρόφηση των λιπαρών οξέων διευκολύνεται από την εξωκυτταρική δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) η οποία ποικίλει ανάλογα με την ενδοκρινολογική και την διατροφική κατάσταση. Ο TNF-α φάνηκε ότι αναστέλλει την δραστηριότητα της LPL και μειώνει την πρωτεϊνική της έκφραση *in vivo* και *in vitro*. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα παραμένουν αμφισβητήσιμα. Πιο πρόσφατα, ο TNF-α έχειδειχθεί ότι μειώνει την έκφραση των μεταφορέων των ελεύθερων λιπαρών οξέων (όπως ο FATP και ο FAT) στον λιπώδη ιστό. Σε συνδυασμό,

αυτές οι δράσεις του TNF-α μπορούν να μειώσουν την αναρρόφηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από την κυκλοφορία και να συμβάλλουν στην υπερλιπιδαιμία η οποία παρατηρείται κατά τη διάρκεια των μολύνσεων καθώς και στην παχυσαρκία. (6)

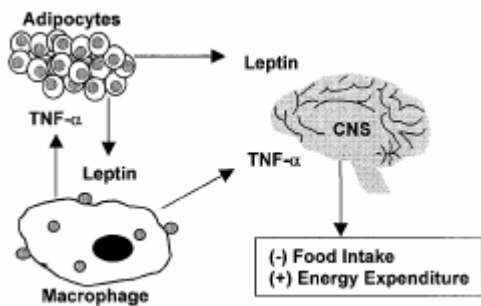
Επιπρόσθετα στην αναστολή της αναρρόφησης των λιπαρών οξέων, ο TNF-α επίσης δρα στην μειώνοντας την έκφραση ενζύμων-κλειδιών στα οποία εμπλέκονται στην λιπογένεση (σχήμα), κυρίως της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA και της συνθετάσης των λιπαρών οξέων, κάτι που πιθανώς δεν συμβαίνει και στα ώριμα λιποκύτταρα. (6)

Ο τρίτος στόχος της δράσης του TNF-α είναι ο λιπολυτικός μηχανισμός των λιποκυττάρων. Ενώ η λιπολυτική διαδικασία ρυθμίζεται κυρίως από αδρενεργικούς παράγοντες και μεσολαβείται από μία οδό που εξαρτάται από το cAMP, ο μηχανισμός με τον οποία δρα ο TNF-α για να προκαλέσει λιπόλυση, παρουσιάζεται να είναι διαφορετικός και λιγότερο κατανοητός. Οι δράσεις που προκαλούνται με την πρόσδεση του μορίου στον TNFR1 πιθανώς συμπεριλαμβάνουν μεταγραφική ρύθμιση πρωτεϊνών-κλειδιών που εμπλέκονται στη λιπόλυση, αφού απαιτείται χρόνια έκθεση για να προκληθεί λιπόλυση σε καλλιέργεια λιποκυττάρων. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η λιπόλυση η οποία προκαλείται από τον TNF-α μπλοκάρεται από ενεργοποιητές του μεταγραφικού παράγοντα PPAR γ , όπως η ινδομεθασίνη. Επιπλέον εξετάζεται κατά πόσο ο ρόλος του TNF-α στην λιπόλυση δεν εκτελείται κατευθείαν αλλά μέσω κάποιων άλλων πρωτεϊνών όπως η ορμονοευαίσθητη λιπάση (HPL) και η περιλιπίνη. (6)

Αναφορικά κάποιες άλλες ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται ο TNF-α είναι η οστεοπόρωση και η οστεοπενία (μέσω πρωτεϊνών συγγενών προς τον TNF, όπως οι RANKL οι οποίες συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση των κυττάρων των οστεοκλαστών, απαραίτητο στάδιο για την απορρόφηση των οστών) (3), το σηπτικό σοκ, η εγκεφαλική ελονοσία, στην αλωπεκία areata, στην ρευματοειδή αρθρίτιδα και αγκυλωτή σπονδυλίτιδα, το άσθμα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου.

1.5.5. Ο TNF- α και η ρύθμιση της λεπτίνης.

Τα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι έντονη έκθεση στον TNF- α διεγείρει την παραγωγή της λεπτίνης. Η λεπτίνη αποτελεί ενδοκρινής ορμόνη καθώς και κυτοκίνη παραγόμενη από τα λιποκύτταρα, και η αλληλεπίδραση αυτή καθιστά τον TNF- α την πιο σημαντική κυτοκίνη για την φλεγμονώδη υπερλεπτιναιμία. Παρόλο που η λεπτίνη σύμφωνα με τα πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα έχει διαφανεί ότι δεν κατέχει κρίσιμο ρόλο στην ανορεξία και την καχεξία, τις συσχετιζόμενες με ασθένεια, εντούτοις η προκαλούμενη από κυτοκίνες υπελεπτιναιμία κατέχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην οξεία φάση της ανοσολογικής απόκρισης και είναι απαραίτητη για την κατανόηση της ανοσολογικής επάρκειας. Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός ενιαίου δικτύου επικοινωνίας, στο οποίο η ενεργειακή κατάσταση του οργανισμού επηρεάζει την ικανότητα του να καταπολεμά παθογόνα, ένα δεδομένο το οποίο διαψεύδει παλαιότερες αντιλήψεις ότι το ανοσολογικό και το ενδοκρινολογικό σύστημα δρουν ανεξάρτητα. Οι πιο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η επαγωγή της λεπτίνης από τον TNF- α πετυχαίνεται με τη μεσολάβηση μιας απευθείας αλληλεπίδρασης μεταξύ του διαλυτού TNF- α και του p55 TNFR ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια των λιποκυττάρων. (9)



Σχήμα 1.2: Η ρύθμιση της λεπτίνης μέσω του TNF- α και οι συνέπειες στην πρόσληψη τροφής και στην κατανάλωση ενέργειας.

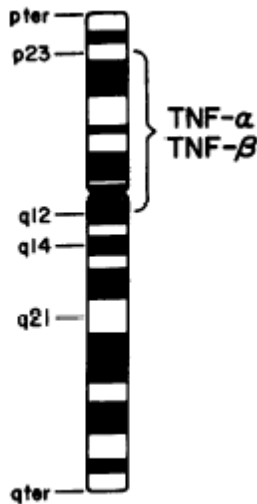
Παρόλο που ο σκοπός αυτής της ενδοκρινολογικής-ανοσολογικής αλληλεπίδρασης δεν έχει εντελώς ξεκαθαριστεί, η φλεγμονώδης υπερλεπτιναιμία είναι σημαντική για τους εξής λόγους:

1. Για την παθοφυσιολογία του wasting
2. Για την κανονική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε καταστάσεις μόλυνσης ή ασθένειας.
3. Για την αντι-φλεγμονώδη απόκριση σε σηπτικό σοκ.(9)

1.6. Δομή του γονιδίου του TNF- α

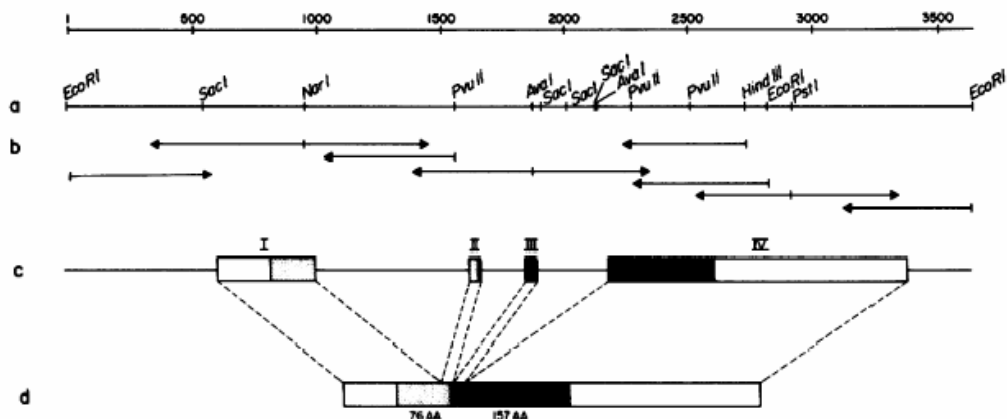
Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τον TNF- α και τον TNF- β βρίσκονται στενά συνδεδεμένα στο χρωμόσωμα 6 και πιο συγκεκριμένα στη θέση 6p23-q12 (σχήμα 2).

(10)



Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της θέσης των γονιδίων του TNF- α και του TNF- β στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 6.

Το γονίδιο του TNF- α είναι ένα μονόκλωνο γονίδιο το οποίο βρίσκεται μετά το γονίδιο του TNF- β στο κοντό άκρο του ανθρώπινου χρωματοσώματος 6. Το μήκος του είναι γύρω στα 3 kb, αποτελείται από 4 εξόνια τοποθετημένα σε αυτό το μήκος ενώ τα εξόνια αυτά διακόπτονται από 3 εσόνια. Περισσότερο από 80% της ώριμης αλληλουχίας του TNF κωδικοποιείται από το τέταρτο εξόνιο, ενώ τα εξόνια I και II περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά πεπτιδικές αλληλουχίες του εκκινιτή. Το mRNA του TNF- α παρουσιάζεται να μεταγράφεται σε μια μεγάλη ποικιλία ειδών κυττάρων. Το 5' άκρο του γονιδίου του TNF- α περιέχει αρκετή από την ομόλογη αλληλουχία του ενισχυτή του κB καθώς και ένα MCH class II όπως το «Y box». Αυτές οι αλληλουχίες φαίνονται να σχετίζονται με τη μεταγραφική δραστηριότητα. Επιπλέον, σε μεταγραφικό επίπεδο το γονίδιο του TNF- α φαίνεται να επηρεάζεται και από την πλούσια σε UA αλληλουχία στο 3' μη μεταφραζόμενο άκρο του mRNA του TNF α .



Σχήμα 1.4: Δομή του ανθρώπινου γονιδίου του TNF-α

- (a) Θέσεις κοπής των περιοριστικών ενδονουκλεασών πάνω στο γονίδιο TNF-α
- (b) Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση και το μέγεθος της αλληλουχίας κάθε τμήματος.
- (c) Το διάγραμμα παρουσιάζει μία σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TNF-α
- (d) Σχηματική αναπαράσταση του TNF-α mRNA (12)

Ο TNF-α συναντάται σε δύο μορφές, την μεμβρανική και τη διαλυτή μορφή, κάθε μία από τις οποίες εικάζεται ότι επιτελεί διαφορετικό φυσιολογικό ρόλο. Εκφράζεται σαν πρόδρομο μόριο 157 αμινοξέων, στο οποίο προηγείται μια προ-αλληλουχία 76 αμινοξέων. Αυτή η συντηρητική προ-αλληλουχία φαίνεται να λειτουργεί σαν άγκυρα για το πρόδρομο πολυπεπίδιο στη μεμβράνη. Έτσι, αντιθέτως με το TNF-β, που εκκρίνεται, ο TNF-α παράγεται αρχικά σαν μία τύπου II μεμβρανική πρωτεΐνη. Τα αμινοξέα -44 με -26 της προ-αλληλουχίας του TNFα συνθέτουν την υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και τα κατάλοιπα -76 με -50 συνθέτουν την ενδοπλασματική περιοχή. Η ακατέργαστη πρωτεΐνη έχει μοριακή μάζα 26 kDa και διαχωρίζεται πρωτεολυτικά (πιθανώς με μια πρωτεάση σερίνης μεταξύ των αμινοξέων -14 και -1) για να δώσει την ενεργή μορφή των 17kDa. Στην ώριμη μορφή του TNFα δεν ανιχνεύονται κατάλοιπα μεθειονίνης. Η επεξεργασμένη μορφή του TNFα υφίσταται σε διάλυμα ως ομοτριμερές συνολικής μοριακής μάζας περίπου 52 kDa και σε αυτή τη μορφή προσδένεται με τους υποδοχείς. Καθεμία από τις τρεις υπομονάδες περιέχει μία δισουλφιδική γέφυρα η οποία δεν είναι απαραίτητα για τη βιολογική δράση του μορίου.

1.7. Πρόσφατες έρευνες και νέοι ρόλοι για τον TNFA

Με βάση το δεδομένο ότι ο TNFA είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη η οποία παράγεται από λευχαιμικά κύτταρα στην Β χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (B-CLL) με αυτοκρινείς και παρακρινείς λειτουργίες στα υγιή Β κύτταρα καθώς και στις Β λυμφοπολλαπλασιαζόμενες ασθένειες, εξετάστηκε το ενδεχόμενο να καθοριστούν οι επιδράσεις του TNFA στην παραγωγή (in vitro) των CD20 σε κύτταρα από ασθενείς με B-CLL. Επί του παρόντος εφαρμόζεται η θεραπεία με αντι-CD20 μονόκλωνα αντισώματα για την για ασθένεια αυτή όπως και την αντιμετώπιση άλλων διαταραχών των Β κυττάρων. (11)

Μετά από μελέτες τα πρόσφατα έτη διαφάνηκε ότι ο TNFA δεν αποτελεί μόνο ένα κυτοστατικό και κυτοτοξικό παράγοντα αλλά μια κυτοκίνη με πλειοτροπικές δράσεις στα μυελοειδή και λυμφοειδή κύτταρα. Επιπλέον, έχει εισηγηθεί ότι ο TNFA ο οποίος παράγεται από τα Β κύτταρα εξασκεί αυτοκρινή δράση ρυθμίζοντας την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των υγιών Β κυττάρων. Δυσλειτουργία αυτής της δράσης του μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες κακοήθειες παθήσεις όπως η B-CLL και η hairy cell leukemia (HCL). Σε δείγματα καλλιέργειας κυττάρων από ασθενείς με τις πιο πάνω ασθένειες έχουν ανιχνευθεί ποσότητες TNF καθώς και των υποδοχέων του. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα έχουν γίνει προσπάθειες να βρεθούν μέθοδοι θεραπείας μέσω του TNF για η θεραπεία των κακοηθών αυτών ασθενειών. Τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα μία έρευνα όμως έδειξε ότι επώαση με TNFA in vitro κυττάρων από αυτούς τους ασθενείς έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση στην πυκνότητα της έκφρασης των CD20 αντιγόνων από τα Β κύτταρα. (11)

Ο TNFA έχει χορηγηθεί σε ασθενείς με διάφορες κακοήθειες. Οι πολύ σοβαρές παρενέργειες οι οποίες προκύπτουν από τη χορήγηση δόσεων που να είναι ικανές να προκαλέσουν τοξικότητα στον όγκο έχουν αποκλείσει τον TNFA από το να είναι μια χρήσιμη θεραπευτική επιλογή. Οι συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή βρίσκονται πολύ χαμηλότερα από αυτές που έχουν χρησιμοποιηθεί σε άλλες θεραπείες και έτσι πιστεύεται ότι δεν θα προκαλέσουν in vivo τέτοια ενάντια συμπτώματα. Το συμπέρασμα από τις έρευνες αυτές είναι η χορήγηση μικρών δόσεων TNFA ή άλλων κυτοκινών οι οποίες διεγείρουν την παραγωγή του μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη μέθοδος θεραπείας για την αύξηση της έκφρασης των CD20 κυττάρων σε B-

CLL και άλλους ασθενείς λυμφομάτων πριν από τη θεραπεία με αντι CD20 αντισώματα.(11)

1.8 Ο βιολογικός ρόλος του TNF-α

Οι βιολογικές δράσεις του TNF-α ποικίλουν και ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν είναι σχετικά περίπλοκος. Αυτή η πρωτεΐνη η οποία συνεισφέρει στην αντίσταση σε ορισμένα είδη μολύνσεων από τη μία και προκαλεί παθολογικές επιπλοκές από την άλλη, εκτελεί αντιφατικούς ρόλους κάτι που μπορεί να οφείλεται στην ποικιλία των ουδών αγωγής σήματος οι οποίοι ενεργοποιούνται. Οι ποικίλοι θεραπευτικοί ρόλοι του TNF-α, συμπεριλαμβάνουν την ανοσοδιέγερση, την αντίσταση σε μολυσματικούς παράγοντες, την αντίσταση σε όγκους, τη ρύθμιση του ύπνου και την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Από την άλλη, παρασιτικές, βακτηριακές και ιικές μολύνσεις γίνονται πιο επικίνδυνες ή και θανατηφόρες λόγω της κυκλοφορίας του. (3)

Ο κυριότερος ρόλος του TNF-α παρά ταύτα, φαίνεται να είναι ως ένας πολύ σημαντικός μεσάζοντας ενάντια στις μολύνσεις όπως η λείσμανίαση. Σε πειράματα τα οποία έγιναν σε ποντίκια στα οποία αφαιρέθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί είτε τον TNF-α, είτε του υποδοχέα του (TNFR) έδειξαν ξεκάθαρα ότι ένας από τους σημαντικότερους ρόλους του TNF-α είναι να συμμετέχει στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και στην κατάλληλη φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού. Φαίνεται ότι για την εμφάνιση των επιβλαβών δράσεων του TNF πρέπει να υφίστανται κάποιες συνθήκες όπως η υπερβολική αντίδραση του ξενιστή ή δυσλειτουργία των φυσικών αυτορυθμιζόμενων δικτύων του οργανισμού. Οι τρόποι με τους οποίους συμβάλλει ο TNF στην αντίσταση απέναντι στις διάφορες μολύνσεις είναι μέσω της ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων, της ενδυνάμωσης των ικανοτήτων των μακροφάγων και των NK κυττάρων και τέλος τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. (3)

Ο TNF επίσης πιθανόν να εμπλέκεται στις παθολογικές επιπλοκές σε ένα αρκετά μεγάλο αριθμό αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η απόρριψη μοσχεύματος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Επιπλέον, ο TNF παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα έναντι κακοηθών κυττάρων ειδικά σε συνδυασμό με την Ιντερφερόνη. Λόγω της τοξικότητας που παρουσιάζει ο TNF σε θεραπευτικές δόσεις, έχουν γίνει προσπάθειες είτε να μειωθεί η τοξικότητα που

προκαλεί ή να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του μορίου μέσω μεταλλάξεων. Τα μέχρι τώρα δοκιμαστικά πειράματα έχουν αποδειχτεί αναποτελεσματικά. (3)

Επίσης ο TNFα συμμετέχει στη ρύθμιση του ύπνου με το αντίστοιχο mRNA να παράγεται σε ημερήσιο ρυθμό στον εγκέφαλο και τα υψηλότερα επίπεδα να παρουσιάζονται κατά τα άκρα των περιόδων του ύπνου. Πειράματα σε ζώα έδειξαν μειωμένο ύπνο σε ζώα στα οποία απουσίαζε ο TNFR-1. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η κυτοκίνη IL-1. (3)

Ο TNF μπορεί να προκαλεί νεκρωτικό ή αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο

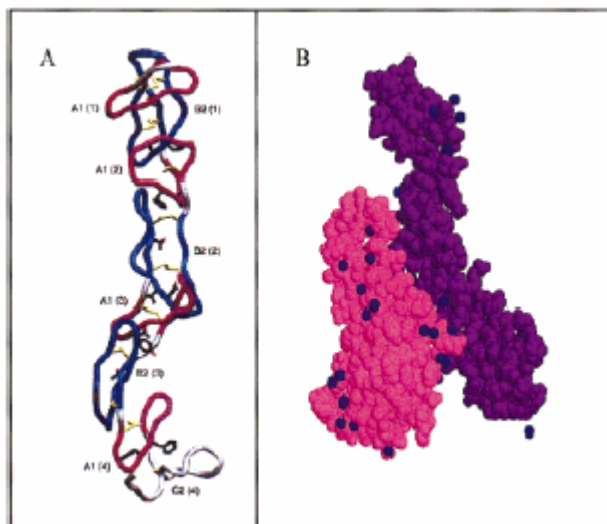
1.9. Μηχανισμοί δράσης

Ο TNF-α εξασκεί τις δράσεις του μέσω της σύνδεσης και της δημιουργίας συμπλέγματος ως τριμερές με τους υποδοχείς του οι οποίοι είναι παρόντες σε αυξημένους αριθμούς στις περισσότερες κυτταρικές μεμβράνες. Το σύμπλεγμα ενδοκυττώνεται και μέσω βαθουλωμάτων κλαθρίνης και συνέχεια καταλήγει στα λυσοσώματα (3)

Επιπλέον, για τον τρόπο λειτουργίας του TNFα έχει βρεθεί ότι σε σχετικά χαμηλό pH, υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωση του μορίου του που του επιτρέπουν να λειτουργεί σαν ιοντικό κανάλι. Αυτό είναι ένα επιπλέον στοιχείο το οποίο δείχνει ότι ο TNFα επιτελεί πολλές περίπλοκες και ασυνήθιστα αντιφατικές λειτουργίες. Επιπρόσθετα, η δέσμευση του TNF μεσολαβεί αλλαγές στον κυτταρικό όγκο οι οποίες συσχετίζονται με την νέκρωση και την απόπτωση με τη ρύθμιση της δραστηριότητας μερικών καναλιών ανιόντων/κατιόντων. (3)

1.10. TNF υποδοχέας

Αποτελεί ένα υποδοχέα για τον TNF ο οποίος αποτελείται από 461 κατάλοιπα αμινοξέων και κατέχει μια εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη. Ο 55kD τύπου I υποδοχέας όπως και ο 75kD τύπου II δεσμεύουν τον TNFA αλλά και τον TNFB. Αυτοί οι δύο υποδοχείς ανήκουν στην NGFR/TNFR υπερικογένεια. Υδατοδιαλυτές μορφές και των δύο υποδοχέων έχουν περιγραφεί στα ούρα και στον ορρό. Εάν εξαιρέσουμε τα ερυθροκύτταρα και τα λανθάνοντα T λεμφοκύτταρα, οι υποδοχείς TNF βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων. Ενώ ο τύπου I ρ55 υποδοχέας είναι ευρέως διαδεδομένος σε διάφορους τύπους κυττάρων, ο τύπου II ρ75 εμφανίζεται περιορισμένος στα αιμοποιητικά κύτταρα. Στην εικόνα φαίνονται οι δύο τύποι υποδοχέων TNF.(12)



(3)

Σχήμα 1.5: Απεικόνιση του υποδοχέα TNF (A) και του συμπλόκου του TNF-β μαζί με τον υποδοχέα TNFR (B)

Έχουν αναγνωρισθεί 30 διαφορετικά μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων του TNF και διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, οι υποδοχείς με τις ενδοκυτταρικές περιοχές, τις «death domains» (DD) στο κυτοπλασματικό μέρος του υποδοχέα και στους υποδοχείς χωρίς «death domains». Το πώς οι υποδοχείς χωρίς αυτές τις περιοχές διαμεσολαβούν στην κυτταρική απόπτωση ακόμη δεν έχει ξεκαθαρισθεί. (4)

Ο TNF ενεργοποιεί ένα μεγάλο αριθμό δευτερευόντων πρωτεϊνών μέσω των οποίων προκαλείται μία ποικιλία αποκρίσεων μέσα στο κύτταρο όπως για παράδειγμα την μεταγραφή κάποιων γονιδίων και/ ή την παραγωγή ριζών αζώτου ή οξυγόνου και έτσι

εξασκεί τις δράσεις του. Αρκετά μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων TNF κατέχουν τις «death domains» οι οποίες συμμετέχουν στη διαμεσολαβούμενη από τον TNF κυτταρική απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης μια ειδικής ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, των πρωτεασών.

Receptor	Other names	A.A.	M.wt. kDa	Ligand	Death domain
CAR 1	N/A	368	39	Unknown	Yes
CD 27	N/A	240	45-55	CD27L	No
CD 30	N/A	577	120	CD30L	No
CD 40	N/A	256	40	CD40L	No
CD 95	FAS, APO-1	319	45	CD95L	Yes
CD134	OX 40	272 ¹	50	OX 40L	No
CD137	4-1BB	256	35	4-1BBL	No
DR 3	WSL1, TRAMP, Apo3, LARD	417	54	Apo3L	Yes
DR 4	TRAILR-1	468 ²	32	Apo2L/TRAIL	Yes
DR 5	TRICK2, TRAILR-2, Apo2, KILLER	411	45	Apo2L/TRAIL	Yes
DR 6	N/A	655	72	Unknown	Yes
GITR	AITR	228	25	GITRL	No
HveA	HVE1, HveM	283	30.5	TRAF	No
LTβR	N/A	435	60	LTβ	No
NGFR	N/A	425	75	NGF	Yes
RANK	TRANCE-R	616	80 ³	RANKL	No
TNFR-1	CD120a, R55, R60	460	55	TNFα, TNFβ	Yes
TNFR-2	CD120b, R75, R80	476	75	TNFα, TNFβ	No
DeR1	TRID, TRAIL-R3, LIT	299	50	TRAIL	No
DeR2	TRUNDD, TRAIL-R4	386	42	Apo2L	No
DeR3	N/A	300	33	FasL	No
OCIF	OPG, TR1	401	60	OPGL/RANKL	No
CrmB	N/A	355	48	TNFα, TNFβ	No
CrmC	N/A	186	25	TNFα	No

(3)

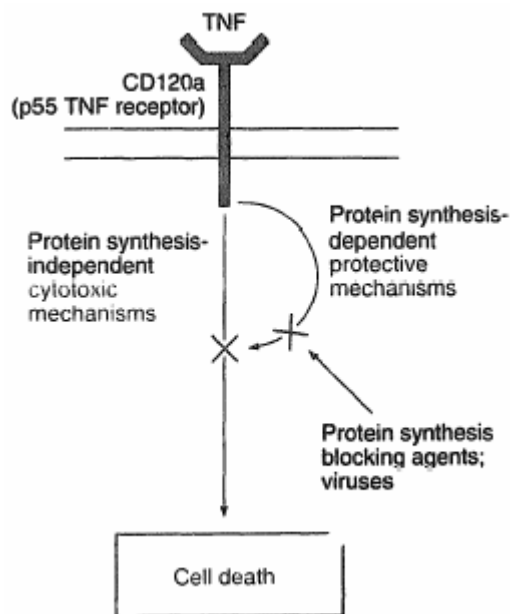
Πίνακας 1.1: Μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων του TNF. Συμπεριλαμβάνονται και οι υποδοχείς TNFR-1 και TNFR-2 οι οποίοι δεσμεύουν τα μόρια του TNF-α και TNF-β.

1.11. Κυτταρικός θάνατος και TNF

Είναι ευρέως γνωστό ότι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του TNF δρουν μέσω μορίων-σημάτων έτσι ώστε να ρυθμίσουν την κυτταρική βιωσιμότητα και διαφοροποίηση καθώς και τον κυτταρικό θάνατο. Επιστημονικά στοιχεία μετά τη μελέτη του υποδοχέα p55 του TNF, ο οποίος είναι ένας από τους πιο μελετημένους υποδοχείς σε αυτό το θέμα, εισηγούνται ότι η πρόκληση του κυτταρικού θανάτου από τον TNF γίνεται μέσω δύο αντιτασσόμενων δραστηριοτήτων του: (13)

1. Με την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών μηχανισμών οι οποίοι προκαλούν κυτταρικό θάνατο και λαμβάνουν χώρα ανεξάρτητα από την πρωτεϊνική σύνθεση.

2. Με τη διέγερση μερικών κυτταροτοξικών μηχανισμών οι οποίοι προστατεύουν τα κύτταρα από θάνατο και εξαρτώνται από την πρωτεϊνική σύνθεση.



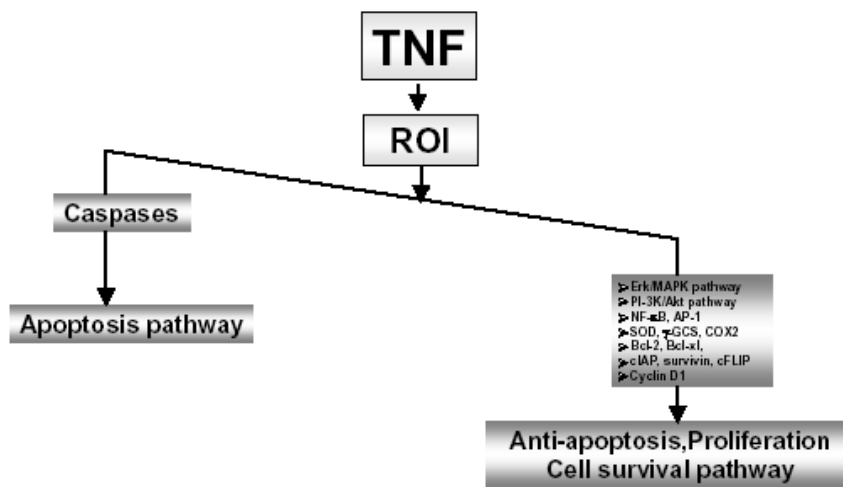
Σχήμα 1.6: Ο ρόλος του TNF-α στη διέγερση αποπτωτικών ή μη μηχανισμών ανάλογα με την πρωτεϊνοσύνθεση.

Προτείνεται ότι, σε αυτή την ισορροπία μεταξύ των καταστροφικών και προστατευτικών δράσεων του TNF οφείλεται η ικανότητα του TNF να δρα επιλεκτικά, καταστρέφοντας τα ασθενή κύτταρα (π.χ. μολυσμένα από ιό) καθώς και τα κύτταρα τα οποία έχουν επεξεργαστεί με αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης ενώ δεν επηρεάζουν καθόλου την βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων. (13)

Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από φούσκωμα του κυττάρου, καταστροφή των οργανιδίων του και κυτταρική λύση και γίνεται με τη σύνδεση του TNF στον TNFR-1 ενώ συμμετέχει και ο TNFR-2 έμμεσα με τον έλεγχο της ενδογενούς παραγωγής του TNF καθώς και της ενεργοποίησης του TNFR-1. Πολλές πρωτεΐνες συμμετέχουν στα περίπλοκες οδούς μετάδοσης σήματος για την έναρξη της απόπτωσης ενώ ολόκληρο το δίκτυο μετάδοσης σήματος δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα, ο TNFR μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα στην επιβίωση μέσω της ενεργοποίησης του NF-kB. (3)

Ο NF-kB αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος εμπλέκεται με την καταστολή της απόπτωσης, την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, τον πολλαπλασιασμό των ιών, την φλεγμονή, την δημιουργία των οστών, τη δημιουργία όγκων και τη

μετάσταση και ενεργοποιείται από σχεδόν όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TNF, κάτι που αποτελεί και κοινό χαρακτηριστικό τους. Τα γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από τον NF- κ B έχει δειχθεί ότι καταστέλλουν την κυτταρική απόπτωση. Έτσι, ο TNF ενεργοποιεί οδούς που οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση αλλά και σε αντιαπόπτωση.



Σχήμα 1.7: Τα μέλη της υπεροικογένειας του TNF μπορούν να ενεργοποιήσουν μονοπάτια κυτταρικής απόπτωσης αλλά και επιβίωσης.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα, από τον TNF ενεργοποιούνται κυτταροτοξικοί καθώς και προστατευτικοί μηχανισμοί. Η παρατηρούμενη ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην κυτταροτοξικότητα του TNF από παράγοντες οι οποίοι μπλοκάρουν την πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς και από ορισμένους ιούς, μπορεί να αντικατοπτρίζει την καταστολή της σύνθεσης ή της δραστηριότητας αυτών των πρωτεϊνών, μπλοκάροντας έτσι το μπλοκάρισμα από την κυτταροτοξική δραστηριότητα του TNF. (13)

1.12. Ο TNF-α στο φως της νέας χιλιετίας

Έχει περάσει σχεδόν ένα τέταρτο του αιώνα από τότε που έχει γίνει γνωστό αυτό το μυστηριώδες μακρομόριο. Στα χρόνια που πέρασαν, δεν έχει αποκαλυφθεί μόνο η δομή του μα και μια τεράστια και βαθιά γνώση στον τρόπο λειτουργίας του. Παρά ταύτα όμως, οι προσπάθειες των επιστημόνων να ξετυλίξουν την βιολογία του ομοιάζουν με το βυθό ενός ωκεανού. Αυτή η αβεβαιότητα των καιρών για τον TNF-α όμως είναι κάτι που διεγείρει την επιστημονική περιέργεια για την απάντηση των πολλών ερωτημάτων που εγείρονται στο λυκόφως της νέας χιλιετίας για το μόριο αυτό. (14)

1.13. Μοριακή γενετική

Μονονουκλεοτιδιακοί πολυμορφισμοί (SNP's) σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων των κυτοκινών έχουν συσχετιστεί με την προδιάθεση για ένα μεγάλο αριθμό περίπλοκων ανωμαλιών του οργανισμού. Ο TNF μπορεί να είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία αποτελεί μια ταχεία μορφή άμυνας ενάντια στη μόλυνση είναι όμως μοιραία σε αυξημένες δόσεις. Λόγω του ότι ο TNF εμπλέκεται στην άμυνα ενάντια μιας ποικιλίας από παθογενή αίτια, είναι αναμενόμενο ότι αυτό θα ευνοούσε ποικιλία στα γενετικά στοιχεία τα οποία ελέγχουν την παραγωγή του TNF.(15)

Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί πέντε πολυμορφισμοί για το γονίδιο του TNF-α. Οι τέσσερις από αυτούς εντοπίστηκαν στην άνωθεν περιοχή του γονιδίου στις θέσεις -857, -851, -308 και -238 από το πρώτο μεταγραφόμενο νουκλεοτίδιο και ένα εντοπίστηκε σε μια μη μεταφραζόμενη περιοχή στη θέση +691. Τρία SNP's βρίσκονται στα νουκλεοτίδια -238, -308 και -376 ως προς το μεταγραφικό σημείο εκκίνησης του TNF είναι όλα αντικατάσταση μιας αδενίνης από γουανίνη και αναφέρονται σαν -238G/-238A, -308G/-308A και -376G/-376A. (15))

1.13.1 Πολυμορφισμοί

Εισαγωγή

Αφότου ανακαλύφθηκε ότι το γονίδιο του TNF-α βρίσκεται τοποθετημένο στην κεντρική περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) έχουν διατυπωθεί πολλές εικασίες όσο αφορά τη συσχέτιση μεταξύ της γενετικής και ειδικότερα μεταξύ αλληλομόρφων του TNF-α και της ευπάθειας σε διάφορες ασθένειες, ειδικότερα αυτοάνοσες. (16)

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, το γονίδιο του TNF-α βρίσκεται εγκατεστημένο εντός της MHC περιοχής στο χρωμόσωμα 6p21.3. Αυτή η περιοχή είναι η πιο πυκνή από άποψη αριθμού γονιδίων καθώς και η πιο πολυμορφική περιοχή ολόκληρου του γονιδιώματος, και έτσι και το ίδιο το γονίδιο του TNF-α περιέχει ένα αυξημένο αριθμό πολυμορφισμών. Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί μέσα αλλά και γύρω από το γονίδιο του TNF-α. Είναι πιθανό ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί έχουν κάποια σχέση με τα επίπεδα της παραγωγής του TNF-α κάτι που μπορεί στη συνέχεια να έχει σχέση με τη φλεγμονώδη απόκριση. Κάποιοι από αυτούς τους πολυμορφισμούς σχηματίζουν εκτεταμένους απλότυπους σε συνδυασμό με τα HLA αλληλόμορφα τάξεως I και II. Οι πολυμορφισμοί του TNF έχουν εξεταστεί σε σχέση με διάφορες παθήσεις και συνήθως όταν υπάρχει συσχέτιση του HLA με την ασθένεια (για παράδειγμα ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης και η ρευματοειδής αρθρίτιδα) υπάρχει συσχέτιση και με πολυμορφισμούς του TNF. Υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες εξετάζουν το πώς λειτουργούν οι πολυμορφισμοί του TNF δείχνοντας την επίδραση των διαφορετικών αλληλομόρφων στα επίπεδα παραγωγής του TNF in vivo και in vitro. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες σε ζώα εισηγούνται ότι η ρύθμιση της παραγωγής του TNF ρυθμίζεται όχι μόνο από πολυμορφισμούς οι οποίοι βρίσκονται εντός του συμπλέγματος του TNF αλλά και αυτοί που βρίσκονται στην περιοχή των υποδοχέων (TNFR). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι η διερεύνηση πολυμορφισμών μέσα στο σύμπλεγμα του TNF καθώς και στους υποδοχείς του TNF θα αποτελούν πολύ σημαντικά στοιχεία για την κατανόηση του ρόλου της ρύθμισης του TNF σε μια δεδομένη πάθηση. Τα επίπεδα του TNF στην κυκλοφορία ποικίλουν σε ατομική βάση. Επιπλέον, όταν τα διαφορετικά άτομα δέχονται το ίδιο ερέθισμα, η αύξηση στα επίπεδα του TNFα στην

κυκλοφορία είναι πολύ μεγαλύτερη σε ορισμένα από τα άτομα αυτά ενώ σε άλλα είναι μικρότερη. (17)

Ένα ερώτημα το οποίο εγείρεται είναι κατά πόσο η παραγωγή του TNF-α αυξάνεται ως αποτέλεσμα της φλεγμονώδους απόκρισης ή εάν η αυξημένη παραγωγή του TNF-α προκαλεί σοβαρότερη φλεγμονώδη απόκριση. Εάν τα υψηλά επίπεδα του TNF-α προκαλούν μεγαλύτερη φλεγμονώδη βλάβη αυτό σημαίνει ότι εμπλέκεται στην εμφάνιση κάποιων παθήσεων.(17)

Χρωμοσωμική τοποθέτηση των γονιδίων του TNF

Το γονίδιο του TNF-α βρίσκεται διαταγμένο σε σειρά με το γονίδιο του TNF-β και είναι τοποθετημένο στην καλούμενη class III περιοχή, μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν το ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρων (HLA) της class II της MCH περιοχής, των μορίων της κυτταρικής επιφάνειας της class II (HLA-DP, DQ και DR) και των αντιγόνων HLA-A, B και C της class I της MCH περιοχής.

Ολόκληρη η MCH περιοχή καταλαμβάνει μια μικρή απόσταση των 4000 κιλοβάσεων (kb) του DNA αφού όπως προαναφέρθηκε είναι η πιο πυκνή γονιδιακή περιοχή. Αυτές οι σχετικά κοντινές κοντινές αποστάσεις οι οποίες συνοδεύονται πιθανώς από μηχανισμούς υπεύθυνους για την παρεμπόδιση του γενετικού ανασυνδυασμού, ερμηνεύονται με την άποψη ότι όλα αυτά τα γονίδια στον ένα κλώνο του DNA σε αυτό το διάστημα τείνουν να κληρονομούνται συνολικά ως ένας ενιαίος απλότυπος. Αυτό αναφέρεται ως genetic linkage disequilibrium και οδηγεί στην εμφάνιση των γνωστών ως εκτεταμένων απλότυπων όπως για παράδειγμα ο HLA-A1, B8, DR3. Οι απλότυποι αυτοί συσχετίζονται με αυτοάνοσες ανωμαλίες όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος. Γι' αυτό το λόγο σε ένα άτομο είναι πιθανότερο να υπάρχει σαν σύνολο ο απλότυπος, για παράδειγμα ένα άτομο έχει μεγαλύτερες πιθανότητες εάν διαθέτει ένα είδος αντιγόνου να υφίστανται και τα υπόλοιπα αντιγόνα του απλότυπου. Το genetic linkage disequilibrium βρίσκει εφαρμογή και στα γονίδια του TNF.(17)

Μικροδορυφόροι

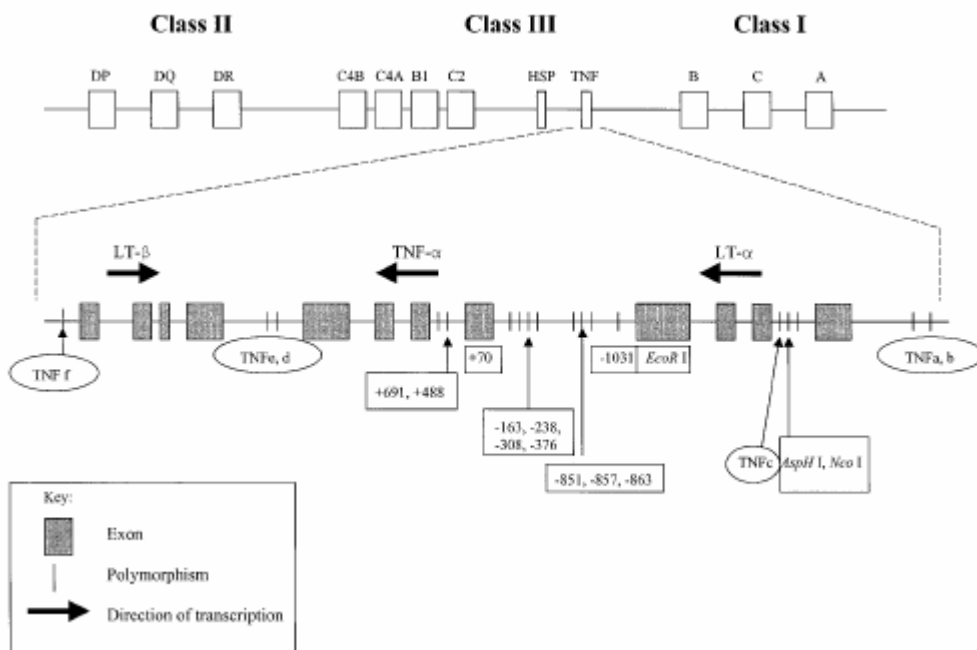
Μία ομάδα πέντε μικροδορυφόρων έχει αναγνωριστεί στην περιοχή του TNF στο χρωμόσωμα και έχουν ονομαστεί TNFa, TNFb, TNFc, TNFd και TNFe. Οι TNFa και

TNFB αποτελούνται από (GT) και (GA) αλληλουχίες, αντίστοιχα. Ο TNFc είναι μια (GA) αλληλουχία και είναι τοποθετημένος στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου του TNFβ. Οι TNFd και TNFe αποτελούνται από μια (GA) και μια (GA)-όμοια αλληλουχία αντίστοιχα. Ο κάθε μικροδορυφόρος περιέχει ένα μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων.(17)

Είδη πολυμορφισμών

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί υπάρχουν πολλοί biallelic μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) μέσα και γύρω από το γονίδιο του TNFa. Αυτοί οι πολυμορφισμοί βρίσκονται αντίθετα προς το σημείο έναρξης μεταγραφής του γονιδίου στις εξής θέσεις: (17)

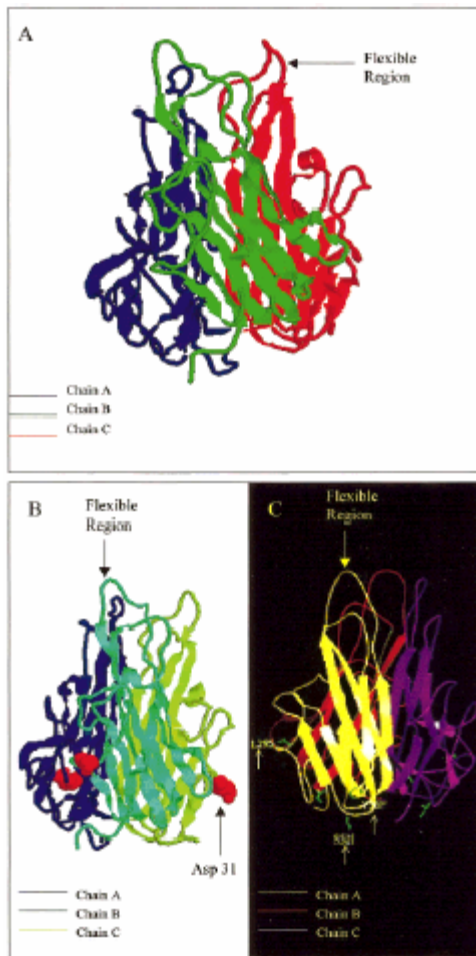
- 1) -1031
- 2) -863
- 3) -857
- 4) -851
- 5) -419
- 6) -376
- 7) -308
- 8) -238
- 9) -163
- 10) -49



Σχήμα 1.8: Στο σχήμα αυτό φαίνονται το γονίδιο του TNF στο χρωμόσωμα 6, παρουσιάζονται οι θέσεις των μικροδορυφόρων a, b, c, d, e, καθώς και οι θέσεις των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.

Από αυτούς οι πολυμορφισμοί στις θέσεις -419, -163 και -49 είναι σπάνιοι. Επιπλέον από πιο πάνω πολυμορφισμούς, υπάρχει ένας SNP στη θέση +488 του πρώτου ιντρονίου. Οι περισσότεροι οφείλονται σε αντικατάσταση της γουανίνης με αδενίνη (G to A inversion) εκτός από τους πολυμορφισμούς στις θέσεις -419, -851, -857, -863 και -1031.

Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί και ένας πολυμορφισμός SNP με αντικατάσταση μιας κυτοσίνης με θυμίνη, 322 βάσεις στην κατεύθυνση από το τέλος του τελευταίου εξονίου. Όπως θα ήταν αναμενόμενο, υπάρχει linkage disequilibrium μεταξύ κάποιων από αυτούς τους πολυμορφισμούς. Ο πολυμορφισμός στη θέση -308 του γονιδίου του TNF-α συνδέεται με ένα πολυμορφισμό στο κωδικόνιο 26 στο γειτονικό γονίδιο του TNF-β.(17)



(3)

Σχήμα1.9: A: Παρουσιάζεται το τριμερές του TNF-α το οποίο έχει σχήμα κώνου. B και C: Παρουσιάζονται τα μεταλλαγμένα μόρια του TNF-α με τα βέλη να υποδεικνύουν τις θέσεις στις οποίες μπορεί να γίνει η αλλαγή.

1.13.2. Συσχέτιση μεταξύ των SNP's και της παραγωγής του TNF

Οι πολυμορφισμοί οι οποίοι βρίσκονται μέσα στο γονίδιο του TNF-α είναι αυτοί που επηρεάζουν περισσότερο τη ρύθμιση της παραγωγής του και πιο συγκεκριμένα, στις ρυθμιστικές περιοχές του TNF-α δηλαδή αυτές που συμπίπτουν με τα μοτίβα του DNA στα οποία συνδέονται οι μεταγραφικοί παράγοντες. (17)

Οι πολυμορφισμοί πάνω στους οποίους έχει διεκπεραιωθεί η πιο εκτεταμένη έρευνα στην περιοχή του εκκινιτή του γονιδίου του TNF-α είναι αυτοί των θέσεων -308 και -238.

Χρησιμοποιώντας reporter gene constructs όπου διαφορετικοί ρυθμιστές χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η έκφραση γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί κάποιο ένζυμο, τέσσερις ανεξάρτητες ομάδες βρήκαν ότι το TNF-α-308*A αλληλόμορφο παρουσιάζει μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα σε σύγκριση με το -308*G αλληλόμορφο. (17)

Επιπλέον μία συσχέτιση μεταξύ του MHC απλότυπου A1, B8, DR3, και της έκφρασης των επιπέδων του TNF-α με την ευπάθεια σε αυτοάνοσες ασθένειες έχει εισηγηθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες. Η ταυτοποίηση του -308 πολυμορφισμού και η σύνδεσή του με τον HLA A1, B8, DR3 απλότυπου έχουν οδηγήσει στο συλλογισμό ότι ο πολυμορφισμός αυτός πιθανώς να παίζει κάποιο ρόλο στην αλλοιωμένη έκφραση του TNF-α. Η έρευνα των Karen et al, παρείχε στοιχεία για το ότι ο πολυμορφισμός -308 πράγματι επηρεάζει την μεταγραφή του γονιδίου του TNF-α in vitro, δείχνοντας ότι η περιοχή (-323 με -285) η οποία περιλαμβάνει και το σημείο -308, στο TNF-α-308*A αλληλόμορφο προκαλεί διαφορετική πρόσδεση των πυρηνικών παραγόντων στον εκκινιτή του TNF-α παρά το πιο κοινό TNF-α-308*G αλληλόμορφο. Ο G/A-308 πολυμορφισμός φάνηκε ότι επηρεάζει τη συγγένεια των πυρηνικών παραγόντων με ενδιάμεσο τρόπο. Η συσχέτιση μεταξύ του -308G/A πολυμορφισμού στον εκκινιτή του TNF-α μπορεί θεωρητικά να συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων παθήσεων in vivo, γνωρίζοντας τις βιολογικές του δράσεις στον οργανισμό προτείνοντας ότι τα άτομα με αυτό τον απλότυπο έχουν αυξημένα κρούσματα αυτοάνοσων ασθενειών. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, παρέχουν μια πιθανή εξήγηση για την παρατήρηση ότι ο A1, B8, DR3 απλότυπος συσχετίζεται με δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού. (16)

Πρόσφατες έρευνες σε ποντίκια υποστηρίζουν αυτό το συλλογισμό. Στοιχεία από αυτές τις έρευνες δείχνουν ότι τα επίπεδα του TNF-α μπορεί να αλλάζουν την πορεία μια

ανοσολογικής απόκρισης και τα επίπεδα αυτά επηρεάζονται από πολυμορφισμούς οι οποίοι μπορεί να υφίστανται στο γονίδιο. Η χορήγηση TNF-α σε νεογνήτα ποντίκια επέφερε την νωρίτερη εμφάνιση και δραματική εξέλιξη των περιστατικών με διαβήτη. (16).

Ως στηρικτικά στοιχεία για τις υποθέσεις της συσχέτισης των επιπέδων του TNF-α με ασθένειες του ανοσοποιητικού παρουσιάζονται τα παρακάτω:

Έρευνες σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση έδειξαν ότι η ομόζυγη μετάλλαξη του TNF-α -308 A/A αυτόματα συνδεόταν με ανοδική ρύθμιση της παραγωγής του CAT σε σύγκριση με τους υγιείς έλεγχους ενώ οι ετεροζυγώτες προς τον πολυμορφισμό εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό απ' ότι στους υγιείς. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται και από έρευνες σε ασθενείς με εγκεφαλική μαλάρια στην βρέθηκε να υπάρχει 7 φορές μεγαλύτερος κίνδυνος θανάτου ή σοβαρών επιπλοκών σε ομόζυγα άτομα προς το -308*A αλληλόμορφο. (18)

Παρά ταύτα, άλλες μελέτες δεν έχουν βρει τα ίδια αποτελέσματα όπως και έρευνες οι οποίες έχουν διεκπεραιωθεί in vitro κατάληξαν σε αντιφατικά αποτελέσματα όσο αφορά την αύξηση των επιπέδων του TNF-α σε καλλιέργειες με το -308*A αλληλόμορφο. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το -308*A αλληλόμορφο δεν οδηγεί απαραίτητα σε αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα που να μεταφράζονται σε διαφορές στη συστηματική συγκέντρωση. Εν τούτοις, οι τοπικές συγκεντρώσεις πιθανώς να επηρεάζονται δηλαδή να αλλάζει η συγκέντρωση του TNF-α στην περιοχή της φλεγμονής κάτι που είναι πολύ σημαντικό. (17)

Μετά από έρευνες σε διαφορετικές φυλές έχει βρεθεί ότι τα αλληλόμορφα -238*G, -308*A, -376*G αποτελούν ένα εκτεταμένο απλότυπο κάτι που όμως διαφέρει στις διάφορες φυλές. Αυτό υπονοεί ότι πιθανώς ολόκληρος ο απλότυπος να συμμετέχει στις μεταβολές των επιπέδων του TNF-α. Μετά από ανάλυση της εξέλιξης των εκτεταμένων MHC απλότυπων συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής του TNF, προτάθηκε ότι υπήρχαν 3 αρχαίοι απλότυποι από τους οποίους προέκυψαν οι νεώτεροι μετά από μετάλλαξη ή crossover. Σε αυτή την ανάλυση, ο -308*A -238*A απλότυπος συσχετίστηκε με υψηλότερη παραγωγή TNF-α από ότι ο -308*G -238*G απλότυπος. (17)

Συμπερασματικά, τα -308*A και -238*A αλληλόμορφα έχουν συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα TNF-α, αυτό όμως πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι

συσχετίζονται και με κάποιο άλλο λειτουργικό πολυμορφισμό, για παράδειγμα στη θέση -376, δεν παύουν όμως να αποτελούν χρήσιμους γενετικούς δείκτες για την υψηλή παραγωγή του TNF-α ειδικά μέσα σε συγκεκριμένα φυλετικά πλαίσια.(17)

1.14. Γιατί το γονίδιο του TNF-α είναι τόσο πολυμορφικό;

Σε σύγκριση με τα γονίδια άλλων κυτοκινών, το γονίδιο του TNF-α καθώς και οι περιοχές του DNA οι οποίες βρίσκονται στα άκρα του γονιδίου, είναι πιο πολυμορφικό. Η μία πιθανότητα έγκειται στο ότι βρίσκεται εγκατεστημένο στη μέση μιας περιοχής του γονιδιώματος το οποίο κληρονομικά είναι ποικίλο έτσι ώστε να διασφαλίζει την ποικιλότητα των ανοσολογικών απαντήσεων. (17)

Επιπλέον, ίσως δεν είναι απόλυτα το ποσό του TNF-α το οποίο ενδιαφέρει πραγματικά αλλά το κατά πόσο είναι ενεργό. Η δραστηριότητα του TNF-α ρυθμίζεται από την παρουσία υδατοδιαλυτών υποδοχέων του έτσι ώστε να αναχαιτίζεται μεν η δραστηριότητα του από την άλλη όμως να αυξάνεται η σταθερότητα και η συνέχιση της δραστηριότητάς του. (17)

Συμπερασματικά, με δεδομένη τη σχέση μεταξύ του γονοτύπου του TNF-α και διαφόρων ασθενειών, η προγνωστική αξία της γνώσης του είναι φανερή, όπως και άλλες εφαρμογές της έτσι ώστε να αποκτήσει μια σημαίνουσα θέση στην ιατρική. (17)

1.15. Πληθυσμιακές μελέτες

Για να μπορέσει να μελετηθεί ένα γονίδιο σε σχέση με κάποιες γενετικές παθήσεις είναι απαραίτητες και οι πληροφορίες που αφορούν τα ποσοστά της εμφάνισης των πολυμορφισμών του στον πληθυσμό. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας με τα ποσοστά των αλληλομόρφων του TNF-α σε διάφορες εθνικότητες.(19)

Ethnic group	n	TNFα – 308	
		G	A
Korean (this study)	581	0.904	0.096
Japanese (TAKASHIGE et al. 1999)	125	0.992	0.008 ¹
Chinese Han (FEI et al. 2002)	164	0.933	0.067
British (HOWELL et al. 2002)	220	0.811	0.189 ²
Finnish (KESÖ et al. 2001)	694	0.880	0.120 ³
French (HERRMANN et al. 1998)	534	0.843	0.157 ⁴
Danish (FUGGER et al. 1989)	108		–

(19)

Πίνακας 1.2: Παρουσιάζονται τα ποσοστά των δύο αλληλομόρφων του TNF-α σε διάφορους πληθυσμούς.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η εθνικότητα επηρεάζει ένα αρκετά μεγάλο εύρος ασθενειών και επιπλέον επηρεάζει την πορεία της νόσου. Μπορεί να παρατηρηθεί η διαφορά των ποσοστών αυτών μεταξύ των ευρωπαϊκών και των ασιατικών πληθυσμών. (19)

Με το δεδομένο ότι οι εθνικότητα μπορεί να αποτελεί ένα καθοριστικό παράγοντα για τις συχνότητες των πολυμορφισμών των κυτοκινών έχει διεκπεραιωθεί στον ελληνοκυπριακό πληθυσμό μία έρευνα σε 100 υγιή άτομα ελληνοκυπριακής καταγωγής, με τη χρησιμοποίηση της PCR-SSP ανάλυσης. Ο πολυμορφισμός GA στη θέση –308 του εκκινιτή του γονιδίου του TNF-α έχει βρεθεί σε ποσοστό 15% με ποσοστό επικράτησης του A αλληλομόρφου να είναι 7,5%. Δεν βρέθηκε κανένα άτομο με το γονότυπο AA στη θέση –308. Τα ποσοστά από ορισμένους από τους πολυμορφισμούς των κυτοκινών στον ελληνοκυπριακό πληθυσμό στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και ο TNF-α εντοπίστηκαν σε παρόμοια ποσοστά με γειτονικούς πληθυσμούς όπως για παράδειγμα ο Ιταλικός.

Αρκετοί άλλοι πολυμορφισμοί όμως, όπως για τις κυτοκίνες IL-6 και IL-10, παρατηρήθηκαν με μεγάλες διαφορές στα ποσοστά επικράτησης από άλλους πληθυσμούς. Είναι πιθανό ότι αυτές οι διαφορές στην κατανομή των πολυμορφισμών των κυτοκινών μεταξύ του ελληνοκυπριακού πληθυσμού control και άλλων εθνικών ομάδων αντανakλούν ένα μοναδικό προφίλ κυτοκινών για τους ελληνοκυπρίους το οποίο πιθανώς επηρεάζει την προδιάθεση και το ποσοστό εμφάνισης για διάφορες ασθένειες.

Cytokine	Position	Allele	%	Genotype	%
TNF α	-308	A	7.5	AA	0
		G	92.5	GA	15
				GG	85
TGF β	codon 10	C	42.5	CC	19
		T	57.5	CT	47
				TT	34
	codon 25	C	7	CC	1
		G	93	CG	12
				GG	87
IL-6	-174	C	18.5	CC	4
		G	81.5	GC	29
				GG	67
IFN γ	+874	A	47.5	AA	26
		T	52.5	TA	43
				TT	31
IL-10	-592	A	23.5	AA	8
		C	76.5	AC	31
				CC	61
	-819	C	76.5	CC	61
		T	23.5	CT	31
				TT	8
	-1082	A	62	AA	40
		G	38	GA	44
				GG	16

Πίνακας 1.3: Συχνότητα του πολυμορφισμού στον Ελληνοκυπριακό πληθυσμό

1.16. Στεφανιαία νόσος

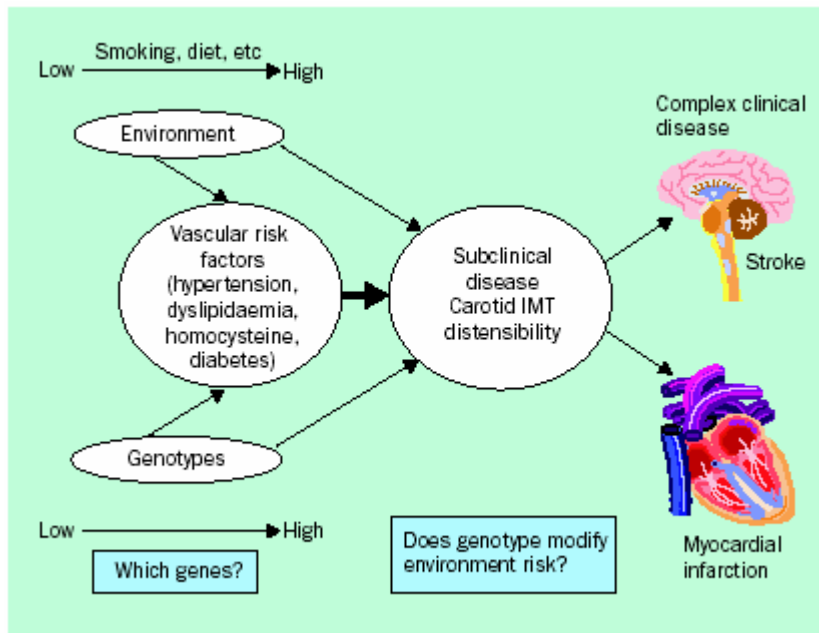
1.16.1 Στεφανιαίες Καρδιοπάθειες και Γενετική

Οι επιστήμονες έχουν μόλις ξεκινήσει να αποκαλύπτουν τους γενετικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις καρδιοπάθειες. Οι σχέσεις γονότυπου-φαινότυπου είναι αρκετά περίπλοκες αφού είναι αποτέλεσμα μεταβλητών όπως η ηλικία και άλλων παραγόντων και είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ωστόσο, η ταυτοποίηση των μεταβλητών των γονιδίων που σχετίζονται με τις χρόνιες και οξείες διαδικασίες των στεφανιαίων παθήσεων παρουσιάζεται εφικτή και αυτό θα μπορούσε να βελτιώσει την κατανόηση περί της αιτιολογίας καθώς και των μηχανισμών που σχετίζονται με τις παθήσεις αυτές. Η ταυτόχρονη ανάλυση αρκετών προδιαθεσικών αλληλομόρφων θα μπορούσε να βοηθήσει στην αναγνώριση ατόμων τα οποία βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο και έτσι να γίνει μια προσαρμογή των θεραπευτικών προσεγγίσεων ανάλογα με το γενετικό προφίλ. (20)

Η Coronary Heart Disease αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνητότητας και θνησιμότητας στις περισσότερες βιομηχανοποιημένες χώρες και αποτελεί μία πολυπαραγοντική ασθένεια με πολύπλοκη παθοφυσιολογία. Η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνει με την ηλικία, παρουσιάζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στους άντρες από ότι στις γυναίκες, κυμαίνεται σημαντικά μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών και επηρεάζεται από ένα μεγάλο αριθμό περιβαλλοντικών και κληρονομικών παραγόντων. Η συμβολή της γενετικής στη CHD μπορεί να περιγραφεί πολύ παραστατικά με την τα αποτελέσματα μιας follow-up μελέτης περισσότερων από 20000 διδύμων στη Σουηδία. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου από CHD στους άντρες, σύμφωνα με την ηλικία θανάτου του θανάτου του διδύμου τους από CHD, μειώθηκε από 8 στους μονοζυγώτες και 4 στους διζυγώτες στην ηλικία των 36-55 σε 4 στην ηλικία των 66-75. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η επίδραση της γενετικής εξασθενεί με την ηλικία. Ωστόσο, ως συνέπεια της ισχυρής αύξησης στη συχνότητα της ασθένειας με την ηλικία, στο επίπεδο του πληθυσμού, ο κίνδυνος για CHD που αποδιδόταν στη γενετική παρουσιαζόταν μέγιστος στις ηλικίες των 55-75. (20)

Τα γενετικά στοιχεία τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για να ολοκληρωθεί ένα μοντέλο μιας πολυπαραγοντικής ασθένειας είναι: (20)

- Ο αριθμός των σχετικών γονιδίων
- Η συχνότητα των προδιαθεσικών αλληλομόρφων
- Οι αντίστοιχες τους επιδράσεις
- Οι επιδράσεις της συνέργειάς τους
- Οι εξωγενείς επιδράσεις στα αποτελέσματα των πολυμορφισμών αυτών



Σχήμα 1.10: Η αλληλεπίδραση μεταξύ του περιβάλλοντος και των γονιδίων ως παράγοντας κινδύνου για καρδιοπάθεια, συγκεκριμένες γενετικές μεταβλητές σε συνδυασμό με συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο που διατρέχει ένα άτομο και να επιβαρύνουν τον αγγειακό του φαινότυπο.

Όσο αφορά την περίπτωση της CHD, αρκετά γονίδια με συχνά συναντόμενα αλληλόμορφα τα οποία έχουν σχετικά μικρή επίδραση στην ασθένεια και ταυτόχρονα αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι πολύ πιθανό να είναι υπόλογα για το μεγαλύτερο ποσοστό του γενετικού μέρους της πάθησης. Αντιστρόφως, σπάνιες μονογονιαδικές ανωμαλίες είναι υπεύθυνες για μία αξιοσημείωτη αύξηση στον απόλυτο κίνδυνο όπως η οικογενής υπερχοληστερολαιμία (FHC) παρατηρούνται σε ένα μικρό μέρος των ασθενών με CHD. (20)

1.16.2. Γενετικές επιδημιολογικές έρευνες

Η πρόσφατη δημοσίευση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει συμβάλει στη διάδοση της πεποίθησης ότι με τη γνώση του θα επέλθει μια ριζική αλλαγή στον τρόπο που αντιμετωπίζουμε και στις γνώσεις που έχουμε για μία ποικιλία από ανθρώπινες ασθένειες. Πιο συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι αυτές οι νέες πληροφορίες που έχουν αναδυθεί από την προσπάθεια να γίνει γνωστό το ανθρώπινο γονιδίωμα θα διευκολύνουν τη διεξαγωγή πληθυσμιακών γενετικών μελετών, οι οποίες θα αποκαλύψουν τις γενετικές μεταβλητές για τις «σύνθετες» ή «πολυγονιδιακές» ασθένειες. (21)

1.16.3. Γενετικοί πολυμορφισμοί και διατροφή

Ενώ οι ανθρώπινες δίαιτες έχουν εξελιχτεί σημαντικά με το πέρασμα των αιώνων, το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει αλλάξει πολύ οριακά. Εντούτοις, διάφοροι πολυμορφισμοί αρκετά κοινών γονιδίων έχει βρεθεί ότι είναι αρκετά διαδεδομένοι στον πληθυσμό. Το ότι η πλειοψηφία των κυριότερων ασθενειών (συμπεριλαμβανόμενης και των καρδιακών παθήσεων), προέρχεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της γενετικής προδιάθεσης και των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η διατροφή έχει επαληθευτεί. (22)

Εξετάζοντας την πορεία του ανθρώπου, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία στις διατροφικές συνήθειες. Υπάρχει ένα τεράστιο αρχείο από διάφορες διατροφικές συνήθειες οι οποίες υιοθετούνται από διάφορους πληθυσμούς παγκοσμίως. Ο κυνηγός-συλλέκτης αποτελεί ένα τρόπο ζωής που κυριαρχούσε στην ανθρωπότητα για πολλές χιλιάδες χρόνια. Τα τελευταία δέκα χιλιάδες χρόνια όμως, ανάλογα με το αν υπήρχαν σε αφθονία περισσότερες ζωικές ή φυτικές τροφές, η πρόσληψη των διαφόρων θρεπτικών στοιχείων ποικίλει σημαντικά. (πρωτεΐνη 19-35%, υδατάνθρακες 22-40%, λίπος 28-58%).(22)

Από τότε που ο άνθρωπος παρουσιάστηκε πάνω στη γη, μόνο ελάχιστες αλλαγές έχουν επέλθει στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Πράγματι, μόνο μία διαφορά της τάξης του 1,6% έχει βρεθεί μεταξύ του μοντέρνου ανθρώπου και των πιο εξελιγμένων θηλαστικών. Παρόλη

όμως αυτή τη σταθερότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ένας μεγάλος αριθμός από μικρές αλλαγές στη δομή των γονιδίων έχουν εντοπιστεί από τους επιστήμονες. Για παράδειγμα, εθνικές διαφορές για διάφορα γνωρίσματα έχουν παρατηρηθεί προ πολλού. Έχει βρεθεί ότι μονάχα για το μεταβολισμό των λιποειδών έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα 250 μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε περίπου 15 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν σχετικές πρωτεΐνες-κλειδιά. Οι ακόλουθες δηλώσεις αποτελούν μία σύνοψη του τεράστιου όγκου δεδομένων που δημοσιεύτηκε τις τελευταίες δεκαετίες όσο αφορά τις μεταβολικές επιδράσεις των κυριότερων θρεπτικών συστατικών: (22)

- Το ποσό καθώς και το είδος των υδατανθράκων προάγει διαφορετικές αποκρίσεις στον οργανισμό (π.χ. γλυκαιμικός δείκτης, δείκτης ινσουλίνης, υπερτριγλυκεριδαιμία)
- Οι διαιτητικές ίνες, ειδικότερα οι υδατοδιαλυτές, μπορούν να μειώσουν τον γλυκαιμικό δείκτη, το δείκτη ινσουλίνης, καθώς και την υπερχοληστερολαιμία και την LDL χοληστερόλη.
- Το κορεσμένο λίπος αυξάνει την ολική και την LDL χοληστερόλη.
- Η αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης από την τροφή προκαλεί αύξηση της χοληστερόλης αίματος και ειδικότερα του λόγου LDL:HDL χοληστερόλη.
- Μερικές βιταμίνες έχουν προστατευτικές δράσεις στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα.
- Φυτικές τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά παρουσιάζουν ένα προστατευτικό ρόλο έναντι των καταστροφικών δράσεων της οξείδωσης.

Ωστόσο, οι περισσότερες έρευνες έχουν τονίσει την μεγάλη διακύμανση των αποτελεσμάτων αυτών από άτομο σε άτομο. Δηλαδή, μπορεί το μεγαλύτερο ποσοστό κατά τη διεξαγωγή ερευνών παρέμβασης να αντιδρά όπως περιγράφεται πιο πάνω, υπάρχει όμως και ένα μικρό ποσοστό το οποίο δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη αλλαγή καθώς και ορισμένα άτομα που παρουσιάζουν αλλαγές προς την αντίθετη κατεύθυνση. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ξεκάθαρα ότι κάθε άτομο μπορεί να παρουσιάζει τα γενικά γνωρίσματα του πληθυσμού αλλά επίσης, μπορεί να παρουσιάζει μια διαφορετική απόκριση σε ένα δεδομένο περιβαλλοντικό – διατροφικό παράγοντα. Αυτή η διαφορετικότητα αποτελεί τη βάση της αλληλεπίδρασης των γονιδίων με τη διατροφή. Η αλληλεπίδραση αυτή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ανερχόμενο τομέα για έρευνα, που αναμένεται να παρέχει περισσότερες πληροφορίες και έτσι καλύτερη γνώση

της σπουδαιότητας των γενετικών γνωρισμάτων και διαιτητικών συνηθειών σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων ασθενειών που ισχύουν για την πλειοψηφία. (22)

Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις των γονιδίων με το περιβάλλον έχουν διερευνηθεί σε σχέση με αρκετούς φαινότυπους που σχετίζονται με τη δυσλιπιδαιμία και τον λιποπρωτεϊνικό μεταβολισμό. Για παράδειγμα, το φύλο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σαν παράγοντας κινδύνου για CVD, αφού συμβάλει στα επίπεδα των λιπιδίων και των τριγλυκεριδίων στο πλάσμα που αποτελούν ένα από τους παράγοντες κινδύνου. Σαν αποτέλεσμα, οι επιδράσεις των γονιδίων, καθώς και η επίδραση άλλων παραγόντων κινδύνου, διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το φύλο. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα φύλα πιθανώς οφείλεται σε διαφορά στις ενδογενείς ορμόνες, αλλά παράλληλα μπορεί να επηρεάζεται και από διαφορές στον τρόπο ζωής, όπως η διατροφή και η φυσική δραστηριότητα. (20)

Επιπλέον, όσο αφορά το κυτταρικό επίπεδο, υφίσταται και εδώ μία ποικιλία διαφορετικών αντιδράσεων και τρόπου λειτουργίας από άτομο σε άτομο. Τα γονίδια κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες επιτρέπουν τη διατήρηση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης προσαρμόζοντας το κύτταρο σε διάφορες εξωκυτταρικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές. Τα κύτταρα απαιτούν οξυγόνο, ενέργεια καθώς και μία ποικιλία από χημικά για να μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται. Μερικά άτομα μπορούν να διατηρήσουν καλύτερα την ομοιόσταση από κάποια άλλα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες και αυτό ονομάζεται φυσική ύπαρξη γενετικής ποικιλίας. Στις πιο ανεπτυγμένες χώρες, οι άνθρωποι βιώνουν αρκετές προκλήσεις για τη διατήρηση της καρδιαγγειακής ακεραιότητας, όπως είναι το κάπνισμα και τα υψηλά επίπεδα πρόσληψης αλκοόλ. Ακόμα και απέναντι στις προκλήσεις αυτές, κάποια άτομα μπορούν να διατηρούν την υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος μέχρι μια αρκετά προχωρημένη ηλικία, ενώ, άλλα άτομα με διαφορετική γενετική σύσταση δεν μπορούν. Αυτά τα άτομα, αναπτύσσουν αγγειακές ασθένειες που συμπεριλαμβάνουν την αθηροσκλήρυνση, την καρδιακή προσβολή καθώς και το έμφραγμα. Η αναγνώριση των γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στις διαφορές αυτές θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ βασικό παράγοντα για την πρόληψη και την καταλληλότερη αντιμετώπιση των ατόμων που βρίσκονται στις υψηλότερες ομάδες κινδύνου. (23)

1.16.4. Συμβολή στην προληπτική ιατρική

Αφού η προδιάθεση για ορισμένες κοινές χρόνιες ασθένειες όπως είναι η καρδιαγγειακή νόσος, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζεται να επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα γονίδια και στους περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και αποκλειστικά ανάμεσα σε διαφορετικά γονίδια (γενετική επίσταση), μία σύνθεση της παρούσας γνώσης και των ευρημάτων από διάφορες έρευνες μπορεί να ενσωματώσει τη γενετική έρευνα στις καρδιοπάθειες, στην προληπτική ιατρική καθώς και σε σχεδιασμό προγραμμάτων αγωγής υγείας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων παρουσιάζονται να επηρεάζουν, το μεταβολισμό των λιπιδίων, τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα καθώς και την αντίδραση σε διάφορα κοινώς συνταγογραφούμενα φάρμακα. Καθώς ο κύριος στόχος της προληπτικής ιατρικής επεκτείνεται έτσι ώστε να συμπεριλάβει και την έγκαιρη εντόπιση και θεραπευτική αντιμετώπιση ασυμπτωματικών ατόμων τα οποία βρίσκονται σε κίνδυνο για την εμφάνιση μιας νόσου, η ικανότητα να ποσοτικοποιηθούν οι συνέπειες της αλληλεπίδραση των γονιδίων με το περιβάλλον θα είναι κρίσιμη για να καθοριστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων σε διαφορετικούς πληθυσμούς ασθενών και έτσι να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα στην πρόληψη και στα θεραπευτικά προγράμματα. (20)

Μελλοντικά, θα μπορούσαν εξακριβωμένοι γενετικοί παράγοντες να χρησιμοποιούνται ως μέσο στην προαγωγή υγείας, μέσω συμβουλών όσο αφορά τον τρόπο ζωής, συγκεκριμένων για τον κάθε γονότυπο, αντί να δίνονται οι γενικότερες συμβουλές προς τον υγιή πληθυσμό για την αποφυγή των καρδιαγγειακών παθήσεων. (23)

1.17. Ο πολυμορφισμός –308 του TNF-α και Καρδιοπάθειες

Ο TNF-α αποτελεί μία κυτοκίνη με πολλαπλές δράσεις. Γνωρίζοντας τη δράσης του στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στη διαδικασία της θρόμβωσης, στην ινσουλινοαντίσταση και στην ενδοθηλιακή λειτουργία, θα μπορούσε εύκολα να συμμετέχει και στην παθοφυσιολογία της καρδιακής λειτουργίας. (24)

Παρά το γεγονός ότι για προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α πιστεύεται παραδοσιακά ότι παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, μία από τις πιο πρόσφατες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις είναι ότι κυριολεκτικά όλοι οι κυτταρικοί τύποι με πυρήνα μέσα στο μυοκάρδιο, συμπεριλαμβάνοντας και αυτά τα καρδιακά μονοκύτταρα, είναι ικανά να συνθέσουν TNF σε ανταπόκριση σε διάφορες μορφές καρδιακού τραύματος. Παράγεται τοπικά στο μυοκάρδιο και οφείλεται σε διέγερση των καρδιακών κυττάρων από διάφορες μορφές stress. (25)

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι να θεωρείται ο TNF-α ως ένα υποψήφια γονίδιο για καρδιαγγειακές ανωμαλίες. Αρχικά, ο TNF-α επηρεάζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και μπορεί να οδηγήσει σε υπερτριγυκεριδαιμία, μειώνοντας λιπορωτεϊνικής λιπάσης σε καλλιέργεια λιποκυττάρων και αυξάνοντας τη de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ. Στους ανθρώπους φάνηκε ότι η χορήγηση TNF-α οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Κατά δεύτερο, ο TNF-α παρουσιάζεται να κατέχει ένα ζωτικής σημασίας ρόλο στην ινσουλινοαντίσταση τη σχετιζόμενη με την παχυσαρκία. Τρίτο, ο TNF μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης μέσω των απευθείας δράσεων της στην ενδοθηλιακή λειτουργία, Τέταρτο, ο TNF-α μπορεί να επηρεάσει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά παρεμβαίνοντας σε διαδικασίες της θρόμβωσης. (24)

Σε μία έρευνα σε 641 ασθενείς με ιστορικό εμφράγματος και 710 υγιών εθελοντών βρέθηκε ότι μπορεί μεν να μην υπάρχει πολύ ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού του TNF-α σε σχέση με τον κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο, πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη ότι σε ποσοστό περίπου 40% τα εμφράγματα είναι θανατηφόρα και αυτό αποτελεί μια ισχυρή επιλογή μέσα στο δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη την πιθανότητα ο πολυμορφισμός –308 του TNF να συσχετίζεται με θανατηφόρα μορφή εμφράγματος. Βρέθηκε παρά ταύτα μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας του πολυμορφισμού –308 με την παρουσία αυξημένου δείκτη μάζας σώματος, δηλαδή αυξημένου βάρους και

αυξημένων ποσοστών παχυσαρκίας, ενώ οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNF-α δεν βρέθηκε να έχουν οποιαδήποτε συσχέτιση. (24)

Σε μία άλλη έρευνα από τους Keso et al. που μελέτησε τον πολυμορφισμό -308 του TNF-α σε σχέση με την αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αγγείων και τα επερχόμενα συμπτώματα, βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός δεν έχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αθηροσκλήρυνση των αγγείων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι ο αριθμός των ατόμων που ήταν ομόζυγοι στον πολυμορφισμό ήταν ελάχιστος και είναι αυτός ο γονότυπος ο οποίος πιστεύεται ότι συσχετίζεται με την εμφάνιση της αθηροσκλήρυνσης ενώ οι ετεροζυγώτες δεν διαφέρουν στο φαινότυπο από τους ομοζυγώτες. (26)

Μία άλλη έρευνα που αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί είναι η πρώτη έρευνα που συσχέτισε με στατιστικά σημαντική συσχέτιση τον πολυμορφισμό -308 του TNF-α με την προδιάθεση για εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 2. Τα δεδομένα της έρευνας δηλώνουν ότι η ύπαρξη του A αλληλομόρφου σχετίζεται με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ύπαρξη καρδιαγγειακών παθήσεων στο διαβήτη τύπου 2. Παρά το γεγονός ότι προηγούμενες έρευνες έδειξαν κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού στη θέση -308 με την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων χωρίς να καταφέρουν να παρουσιάσουν μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, τον έχουν όμως συσχετίσει με δυσλιπιδαιμία, αρτηριακή υπέρταση που οφείλεται σε παχυσαρκία και κεντρική παχυσαρκία, όπως και με το γεγονός ότι η ύπαρξη του A αλληλομόρφου οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση του TNF-α κάτι που επιφέρει μεγαλύτερη ινσουλινοαντίσταση. Με αυτά τα δεδομένα, όπως και το ότι ο διαβήτης σχετίζεται με την εμφάνιση καρδιαγγειακών, η ύπαρξη του πολυμορφισμού αυτού μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σύνδεσμο μεταξύ της ύπαρξης του διαβήτη τύπου 2 και τον αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών επιπλοκών. Επιπλέον, ισχυρότερη συσχέτιση παρουσιάζουν οι γυναίκες με διαβήτη τύπου 2, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι έχουν φυσιολογικά πιο αυξημένες ποσότητες σωματικού λίπους και έτσι είναι πιο ευάλωτες στις δράσεις του TNF-α στο λιπώδη ιστό, οδηγώντας έτσι σε αθηροσκλήρυνση. Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά εισηγούνται ότι ο -308 πολυμορφισμός του γονιδίου του TNF-α μπορεί να αποτελεί μια πολύ χρήσιμη μεταβλητή για την πρόβλεψη της εμφάνισης καρδιαγγειακών ειδικότερα σε διαβητικές τύπου 2 γυναίκες. (27)

Έχει βρεθεί ότι η υγιής καρδιά δεν παράγει καθόλου ποσότητες TNF, ενώ η ασθενείς καρδιά παράγει TNF σε άφθονες ποσότητες. Επιπλέον υπάρχει μία άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του TNF και της σοβαρότητας της ασθένειας. Εκτός από αυτά, παρατηρείται, *in vivo* όπως και *in vitro* μέσω διαφόρων μελετών ότι ο TNF επιδρά με το ίδιο τρόπο στις κυτταρικές και βιοχημικές αλλαγές όπως και η καρδιακή ανεπάρκεια. Σε μοντέλα ζώων, η ανάπτυξη φαινότυπου καρδιακή ανεπάρκειας μπορεί να αντιστραφεί μέσω της θεραπείας με αντικυτοκίνες. (28)

Με βάση το δεδομένο ότι κλινικές και επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει ότι ο ρόλος των κυτοκινών στην ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας είναι σημαντικός, έγιναν προσπάθειες να φανεί κατά πόσο η θεραπεία με κυτοκίνες θα μπορούσε να βελτιώσει την πορεία της ασθένειας. Μία από τις στρατηγικές με αυτό το σκοπό, ήταν η χρησιμοποίηση υδατοδιαλυτών υποδοχέων του TNF-α έτσι ώστε να επιτευχθεί η μείωση της παραγωγής του TNF-α από το μυοκάρδιο. Η θεραπεία αυτή μείωσε τα επίπεδα του TNF-α στην κυκλοφορία κατά 70-80% και επιπλέον βελτίωσε την κατάσταση και την ποιότητα ζωής των ασθενών. (28)

Βέβαια, παρά τις άφθονες επιστημονικές πληροφορίες για το ρόλο του TNF-α στην καρδιακή λειτουργία υπάρχουν κάποια ερωτήματα που ακόμη παραμένουν αναπάντητα. (28)

1) Ποιο είναι το σήμα που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της παραγωγής του καρδιακού TNF-α.

2) Γιατί παράγει η καρδιά TNF-α;

3) Μπορεί να γίνει επιλεκτική εξασθένηση της παραγωγής του καρδιακού TNF-α;

Επιπλέον, τα αποτελέσματα των ερευνών προτείνουν την περαιτέρω διερεύνηση των πολυμορφισμών του TNF-α και ειδικότερα του πολυμορφισμού στη θέση -308, και κατά προτίμηση σε πληθυσμούς υψηλής επικινδυνότητας για καρδιοπάθειες, παρά των ασθενών συσχετίσεων που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα για να ελεγχθεί ο πιθανός ρόλος του TNF-α στα καρδιαγγειακά νοσήματα, στην παχυσαρκία και στις σχετιζόμενες με την παχυσαρκία ασθένειες. (24)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να εξερευνήσει κατά πόσο υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού –308G/A του TNF-α με την εμφάνιση καρδιοπαθειών. Αυτό έγινε συγκρίνοντας τα ποσοστά του πολυμορφισμού ανάμεσα σε καρδιοπαθή άτομα και σε υγιά, σε ένα δείγμα εθελοντών Ελληνοκυπριακής καταγωγής.

3. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ

3.1 Δείγμα

Το δείγμα αποτελείται από 56 ασθενείς με βεβαιωμένη καρδιαγγειακή νόσο (CAD: Coronary Artery Disease) (38 άντρες και 18 γυναίκες) με ηλικιακό εύρος από 20 έως 81 ετών (μέσος όρος ηλικίας: 64,35 χρόνια). Όλα τα άτομα είτε είχαν εισαχθεί στο νοσοκομείο για κάποια επέμβαση είτε επισκέπτονταν τακτικά το καρδιολογικό τμήμα των εξωτερικών ιατρείων στα Γενικά Νοσοκομεία Λευκωσίας και Λεμεσού. Επιπλέον, αποτελείται και από 51 υγιή άτομα τα οποία είχαν προσέλθει στο τμήμα αιμοδοσίας των δύο προαναφερθέντων νοσοκομείων. Οι εθελοντές είναι όλοι ελληνοκυπριακής καταγωγής και είναι κάτοικοι των επαρχιών Λευκωσίας και Λεμεσού στην Κύπρο. Κατά τη συλλογή του δείγματος μετρήθηκε το βάρος και το ύψος των εθελοντών για τον υπολογισμό του Δείκτη Μάζας Σώματος και για τους ασθενείς λήφθηκαν κάποιες πληροφορίες όσο αφορά τις διατροφικές τους συνήθειες και τη φυσική τους δραστηριότητα. Το πρωτόκολλο αυτής της έρευνας εγκρίθηκε από τον διευθυντή της καρδιολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου στη Λευκωσία και από τα εργαστήρια Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου ενώ υπήρχε και γραπτή συγκατάθεση από όλους τους εθελοντές.

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάκια των 10ml τα οποία περιείχαν αντιπηκτικό EDTA (EDTA vacutainers). Το αίμα φυλάχτηκε σε πάγο για τη μεταφορά του από την Κύπρο, ενώ μέχρι την απομόνωση του γενωμικού DNA φυλάχτηκαν στους – 80 ...C.

3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΟΥΜΕΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι διερευνούμενοι παράγοντες είναι οι ακόλουθοι:

- **Ατομικά χαρακτηριστικά:** όπως το φύλο, η ηλικία, τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά (βάρος, ύψος),

- Συνήθειες που εκφράζονται μέσω της **διατροφής** (ανάκληση 24ώρου, διατροφικές συνήθειες και ερωτηματολόγιο κατανάλωσης τροφίμων) όπως και από τον **τρόπο ζωής**, όπως το κάπνισμα, και η σωματική δραστηριότητα.
- **Κλασσικοί καρδιαγγειακοί παράγοντες**, όπως η παρουσία: υπέρτασης (ΣΑΠ / ΔΑΠ > 140/90 mmHg ή λήψη ειδικής αγωγής), σακχαρώδη διαβήτη (γλυκόζη νηστείας > 125 mg/dl ή λήψη ειδικής αγωγής), και υπερχοληστερολαιμίας (ολική χοληστερόλη ορού > 200 mg/dl ή λήψη ειδικής αγωγής), καθώς επίσης και αναλυτικά στοιχεία για τις θεραπευτικές αγωγές που σχετίζονταν με τους παράγοντες αυτούς,
- Τέλος, λήφθηκε το οικογενειακό **ιστορικό** καρδιαγγειακής νόσου και άλλων παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από κύτταρα λευκοκύτταρα ολικού αίματος με το Nucleospin Blood Kit. Τα βήματα της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. Μεταφορά 2ml αίματος σε falcons 15 ml
2. Προσθήκη 150ml πρωτεϊνάσης με πιπέτα 200μl
3. Προσθήκη 2ml BQ1 με σύριγγα
4. Vortex στις 3000 rpm για 4min
5. Τοποθέτηση των falcons σε υδατόλουτρο 56°C για 15 min
6. Vortex στις 3000 rpm για 4 min
7. Προσθήκη 2ml αιθανόλης με σύριγγα
8. Vortex στις 3000rpm για 4min
9. Πρώτη μεταφορά αίματος από τα falcons στα Nucleospin Blood Columns
10. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 5min
11. Μεταφορά υπόλοιπου αίματος από τα falcons στα Nucleospin Blood Columns
12. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 7min
13. Πετάμε το υποκείμενο αίμα
14. Προσθήκη 2ml BQ2 με σύριγγα
15. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 5min
16. Προσθήκη 2ml BQ2 με σύριγγα
17. Φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 15min

18. Μεταφορά φίλτρου σε νέα Nucleospin Blood Columns
19. Προσθήκη 200μl BE, με πιπέτα 200μl, το οποίο έχουμε προθερμάνει στο υδατόλουτρο στους 70°C
20. Τα αφήνουμε σε ηρεμία για 2min
21. Φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 2min
22. Πέταγμα του φίλτρου
23. Μεταφορά του DNA με πιπέτα 200μl σε tubes

3.4 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR, η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για in vitro σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις

υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).

2. Σύνδεση εκκινητών (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.

3.Επιμήκυνση (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3'κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5'άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια(26):

- **ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ**

Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την αλληλουχία **5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'** και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 390μl διαλύματος TE, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution)

Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία **5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'** και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 548 μl διαλύματος TE έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution)

Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραιώση 1:8 (working solutions: 3 μl stock + 21 μl

απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.

- **Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ**

Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση (IIY Test Ltd) και είχε συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- **PCR BUFFER**

Η συγκέντρωσή του ήταν 10X και περιείχε: 200 mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- **ΔΙΑΛΥΜΑ MgCL₂**

Η συγκέντρωσή του ήταν 50 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- **ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (dNTP's)**

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της PCR έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ PCR.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1. ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ TNF α (-308 G/A)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	0,2 μ l	1,5 Units
PCR BUFFER	1,25 μ l	1X
MgCl ₂	0,5 μ l	1,5 mM
dNTP's	0,1 μ l	20 mM
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,3 μ l	3,75 pmol
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	0,3 μ l	3,75 pmol
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	9,35 μ l	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένα eppendorf των 0,2 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε eppendorf τοποθετούνται 12 μ l από το μίγμα με πιπέτα και με το ίδιο αποστειρωμένο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα eppendorf με το μίγμα διατηρούνται στον πάγο.

3. Σε κάθε eppendorf προστίθενται 0,5 μ l DNA από τα δείγματα. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 12,5 μ l.

4. Τα eppendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το μίγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες.

5. Τα eppendorf μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα (26):

Βήμα 1^ο: 95°C για 3 min

Βήμα 2^ο: 94°C για 30 sec

Βήμα 3^ο: 57°C για 30 sec : τα βήματα 2,3,4 x 33 φορές

Βήμα 4^ο: 72°C για 45 sec

Βήμα 5^ο: 72°C για 5 min

Βήμα 6^ο: Αποθήκευση στους 4°C

3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος, ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 1% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%

- Ζυγίζονται 0,5 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 50 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid).
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο

- Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό "χτένες" ώστε να δημιουργηθούν "πηγάδια" καθώς πήζει το πήκτωμα της αγαρόζης.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (~10 min).
- Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι "χτένες" από αυτό και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την

ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.

- Σε parafilm τοποθετούνται 2 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης και φυγοκεντρούνται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
- Μεταφέρονται 5 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και τοποθετείται 5 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4 °C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20 °C
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα "πηγάδια" του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο "μάρτυρας".

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

-Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 V για περίπου 20 λεπτά.

-Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχεται σε σύγκριση με τον "μάρτυρα", οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

3.6 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστηρότητά τους περιορίζεται σε "ξένο" DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες ("διαβάζονται" το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA).

Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt

ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα(43).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπράγοντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT κ.ά.) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο από πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ}C$ μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (43).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την πέψη το ένζυμο **Nco I** (26). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου είναι



Για την πέψη του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- **ENZYMO Nco I**

Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 2.500 U/ml και διατηρείται σε θερμοκρασία $-20^{\circ}C$.

- **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER 2)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) ήταν σε συγκέντρωση 1X και περιείχε: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol και είχε pH 7,5 στους 25 °C.

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης έχει ως εξής:

1. ΜΙΓΜΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2. ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ.

<i>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</i>	ΟΓΚΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
ENZYMO Nco I	0,2 µl	1,25 U
BUFFER 2	1,5 µl	1X
ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	3,3 µl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα eppendorf του 1,5 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε eppendorf μεταφέρονται 5 µl από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα eppendorf με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.
3. Στα eppendorf προστίθενται 5 µl από το προϊόν της PCR κάθε δείγματος. Ο συνολικός όγκος μίγματος για την πέψη είναι 10 µl.
4. Τα eppendorf τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37 °C για 12 ώρες

3.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης 4%.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 4%

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2% για τον έλεγχο επιτυχίας της PCR, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.6. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

- Ζυγίζονται 4 gr αγαρόζης και τοποθετούνται στην κωνική φιάλη.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~20 min.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Αφού αποσυρθούν τα eppendorf με το προϊόν της πέψης από τους 37 °C μετά το πέρας των 12 ωρών, προστίθενται στο καθένα 5 μl χρωστικής κυανούν της ξυλόλης. Σε καθαρό eppendorf τοποθετείται 1 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp) και 5 μl χρωστικής.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση (short spin) για την ανάμιξη του προϊόντος της πέψης με τη χρωστική και του μάρτυρα με την χρωστική.
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα "πηγάδια" του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο "μάρτυρας".

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 V για περίπου 40 λεπτά.
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον "μάρτυρα" και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό (308G/A) σε κάθε δείγμα.

3.8 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

➤ **Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)**

- ο 54gr Tris Base.
- ο 27,5gr Boric Acid.
- ο 20ml EDTA 0,5M.
- ο Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.
- ο Ανάδευση.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

➤ **Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)**

- ο 200ml TBE 5x.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- ο Ανάδευση.

➤ **EDTA 0,5M**

- ο 186,1gr EDTA $2H_2O$.
- ο Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
- ο Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.

➤ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

- ο 10mg EtBr.
- ο 1ml αποστειρωμένο νερό.
- ο Ανάδευση σε Vortex.
- ο Φύλαξη στους 4°C.

➤ **Tris-EDTA (TE)**

- ο 0,61gr Tris Base 10Mm.

- ο 1ml EDTA 0,05M.
- ο Προσθήκη $\approx$ 400ml απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- ο Αποστείρωση.

3.9 ΥΛΙΚΑ

3.9.1 ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: πλαστικά σωληνάκια Falcon των 15ml, πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 ml, ακροφύσια (Greiner) των 2 μl , 100 μl , 1000 μl , σωληνάκια Eppendorf των 1,5 ml, 0,5 ml και 0,2 ml.

Τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: ποτήρια ζέσεως, κωνική φιάλη των 200 ml ογκομετρικοί κύλινδροι 25ml, 50ml, 100ml, 500ml, μπουκάλια Boro των 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml.

]

3.9.2 ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R, υδατόλουτρο Memert, roller (Stuart Scientific Rollers SRTI), μηχανήμα PCR Primus 96 plus-NWGAGBIOTECH, αναδευτήρας Nuova-stir plate, vortex IKA minishaker MSI, pHμετρο microprocessor pHmeter, WTW pH 537, ζυγαριά ακριβείας Gibertini, συσκευή ηλεκτροφόρησης, αυτόματες πιπέτες Gilson 2 μl , 20 μl , 100 μl , 200 μl , 1000 μl , τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης, θάλαμος UV

3.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η κατανομή των γονότυπων στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη κατανομή στον πληθυσμό με βάση το κριτήριο X^2 , αφού διορθώθηκε κατά Yates. Συγκρίσεις μεταξύ των γονότυπων και τους διερευνούμενους παράγοντες έγιναν με τον έλεγχο X^2 αφού διορθώθηκε η πιθανότητα σφάλματος Τύπου I για τον αριθμό των πολλαπλών συγκρίσεων. Επίσης, ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson εφαρμόστηκε για να αποτιμήσει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών, κανονικά κατανεμημένων, μεταβλητών.

Όλοι οι στατιστικοί έλεγχοι ήταν αμφίπλευροι και επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το 5%. Τα στοιχεία του δείγματος καθώς και οι υπολογισμοί έγιναν με το στατιστικό πακέτο για κοινωνικές επιστήμες SPSS (Statistical Package for Social Sciences), version 10.0, SPSS Inc.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

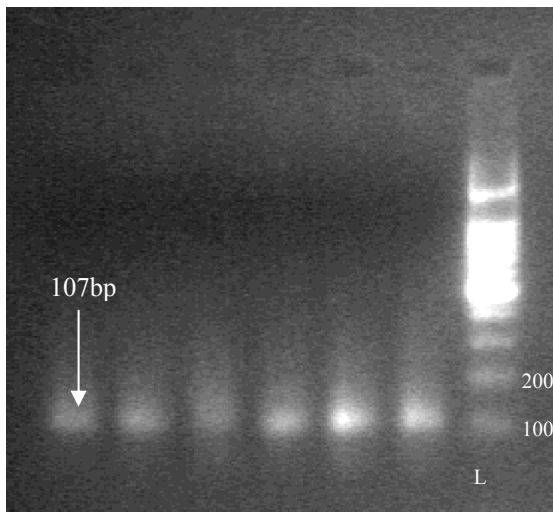
Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον πιο κάτω πίνακα. Τα στοιχεία αυτά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για την συσχέτιση μεταξύ του αγγειακού φαινότυπου και πιθανών συνηθειών στον τρόπο ζωής γιατί τα στοιχεία αυτά έχουν συλλεχθεί μόνο από το δείγμα των ασθενών εθελοντών και δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα και στους ασθενείς για να μπορεί να είναι αξιόπιστη η σύγκριση. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν όμως μελλοντικά εάν συλλεχθούν και τα αντίστοιχα στοιχεία για τους υγιείς.

Χαρακτηριστικά	Ποσοστό
Καμία εκπαίδευση	7%
1 ^ο βάθμια εκπαίδευση	50%
2 ^ο βάθμια εκπαίδευση	34%
Πανεπιστημιακή	9%
Μη καπνιστές	71,4%
Καπνιστές	10,7%
Καθόλου Φ.Δ.	19,1%
Μέτρια Φ.Δ.	55,5%
Αυξημένη Φ.Δ.	25,4%

Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά του δείγματος καρδιοπαθών εθελοντών ελληνοκυπριακής καταγωγής.

4.2. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ήταν επιτυχής για όλα τα άτομα του δείγματος. Ο έλεγχος για την επιτυχία της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.5 του πειραματικού μέρους. Το προϊόν της PCR είναι μεγέθους 107bp και φαίνεται με την αντίστοιχη λωρίδα σε αυτό το μέγεθος όπως φαίνεται και από το μάρτυρα (Ladder).



Εικόνα 4.1: Έλεγχος PCR. Στην εικόνα φαίνονται τα κομμάτια του DNA, μεγέθους 107bp όπως επιβεβαιώνεται και από τις λωρίδες του Ladder (L)

4.3. Αποτελέσματα πέψης

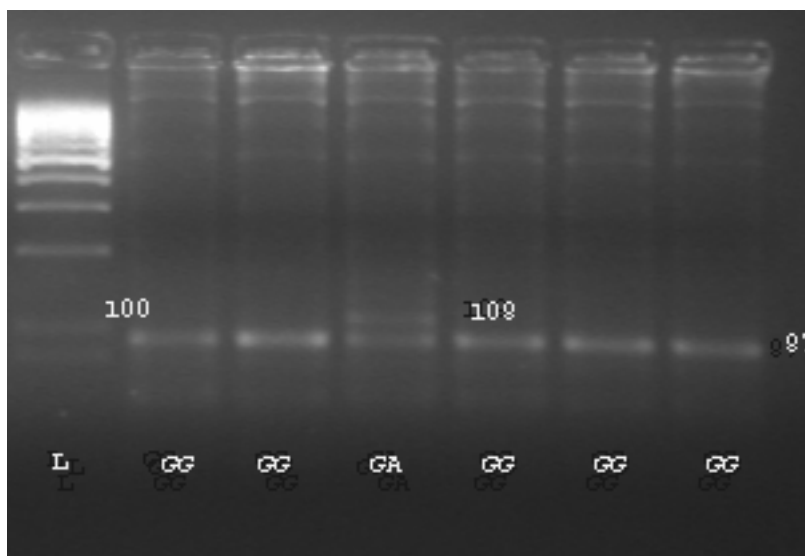
Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο Nco I, υπάρχει στο γονίδιο του TNF- α μόνο απουσία του πολυμορφισμού TNF- α -308G/A. Μετά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αγαρόζης (όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.7) έγινε παρατήρηση του στο υπεριώδες. Για κάθε δείγμα υπήρχαν ζώνες που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA, ανάλογα με το αν το ένζυμο είχε βρει την αλληλουχία αναγνώρισης ή όχι. Στα δείγματα του DNA που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό, το ένζυμο εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στα δύο αλληλόμορφα και έτσι προκύπτουν δύο ζώνες. Οι

ζώνες αυτές αντιστοιχούν σε κομμάτια DNA ίσα με 87bp και 20bp. Επειδή η ζώνη που αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 20bp είναι χαμηλή, στο πήκτωμα παρατηρούμε μία ζώνη που αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 87bp. Τα άτομα αυτά, σύμφωνα και με τα παραπάνω στοιχεία, χαρακτηρίστηκαν GG, δηλαδή ομόζυγα φυσιολογικά.

Στα δείγματα του DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό μόνο στο ένα αλληλόμορφο, το ένζυμο εντόπισε μία αλληλουχία αναγνώρισης (στο φυσιολογικό αλληλόμορφο) και στο πήκτωμα παρατηρήθηκαν δύο ζώνες, που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA ίσα με 107bp και 87bp. Τη ζώνη που αντιστοιχεί στο κομμάτι του DNA ίσο με 20bp δεν μπορεί να φανεί στο πήκτωμα. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν GA, δηλαδή ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Δεν έχουν εντοπιστεί καθόλου δείγματα AA στο δείγμα, δηλαδή ομόζυγα προς τον πολυμορφισμό. Σε μια τέτοια περίπτωση όμως θα παρατηρούσαμε στο πήκτωμα μόνο μία ζώνη που θα αντιστοιχούσε σε κομμάτι DNA ίσο με 107bp. Θα παρέμενε δηλαδή και στις δύο αλυσίδες άκοπο το DNA.

Η πέψη ήταν επιτυχής σε όλα τα άτομα του δείγματος. Παρακάτω παρουσιάζεται μία από τις εικόνες της πέψης σε 6 εθελοντές. Φαίνονται ξεκάθαρα οι δύο γραμμές στο άτομο που φέρει τον πολυμορφισμό και υποδηλώνεται ως GA. Οι υπόλοιποι είναι ομοζυγώτες χωρίς τον πολυμορφισμό και παρουσιάζονται ως GG. Η πρώτη σειρά με την ένδειξη L αποτελεί τον Ladder, είναι δηλαδή το σημείο αναφοράς όσο αφορά το μέγεθος του DNA που έχουμε πάρει.



Εικόνα 4.2: Έλεγχος πέψης: L=Ladder 100bp
 GG=87bp
 GA=107+87bp

4.4. Συχνότητα αλληλομόρφων

Στα 107 άτομα του δείγματος τα αποτελέσματα όσο αφορά τα ποσοστά του πολυμορφισμού φαίνονται στον πίνακα 4.2.

Γονότυπος TNF-α	GG	Αριθμός ατόμων % στην ομάδα	Ομάδα		Σύνολο
			Υγιείς 48	Ασθενείς 49	
			94,1%	87,5%	90,7%
	GA	Αριθμός ατόμων % στην ομάδα	3	7	10
			5,9%	12,5%	9,3%
Σύνολο		Αριθμός ατόμων % στην ομάδα	51	56	107
			100,0%	100,0%	100,0%

Πίνακας 4.2: Κατανομή των αλληλομόρφων του TNF-α στον πληθυσμό.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής δεν έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού -308 G/A και της εμφάνισης στεφανιαίας καρδιοπάθειας. Τα διατροφικά καθώς και τα υπόλοιπα στοιχεία που αφορούν τον τρόπο ζωής των εθελοντών δεν χρησιμοποιήθηκαν λόγω του ότι δεν υπήρχαν σε ολόκληρο το δείγμα αλλά στους ασθενείς μόνο. Θα μπορούσαν όμως να αξιοποιηθούν τα στοιχεία αυτά μελλοντικά εάν συλλεχθούν τα αντίστοιχα και από το δείγμα των υγιών. Με βάση της βιβλιογραφία και τα ποσοστά που έχουν βρεθεί να υφίστανται στον ελληνοκυπριακό πληθυσμό δεν παρατηρούνται πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ αυτών και της παρούσας έρευνας. Όπως αναφέρθηκε στο σημείο 1.16.2. στην έρευνα που διερευνήθηκε σε Κύπριους υγιείς εθελοντές τα ποσοστά βρέθηκαν 85% για το GG, 15% για το GA και καθόλου AA, και αντίστοιχα σε αυτή την μελέτη βρέθηκαν 90,7%, 9,3% και καθόλου AA.

Το γεγονός ότι δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση, θα πρέπει να δώσει το έναυσμα για περισσότερη έρευνα γύρω από τον TNF-α και τις καρδιοπάθειες. Αυτός ο παράγοντας ο οποίος έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα, συμμετέχει σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού, κατέχει πλειοτροπικές και αντιφατικές δράσεις και ακόμα περιβάλλει αρκετό μυστήριο τον τρόπο λειτουργίας του και τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης του. Ο πρωταρχικός του ρόλος έγκειται στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού όπως και τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας του TNF-α και παράγεται από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα κυρίως μπορεί όμως και η ασθενής καρδιά να παράγει TNF-α κάτω από στρες όπως έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί από τους επιστήμονες. Εκτός από αυτό το γεγονός υπάρχουν και πάρα πολλά άλλα στοιχεία τα οποία θεωρητικά συνδέουν τον TNF-α με τις στεφανιαίες νόσους όπως η προαγωγή της ινσουλinoαντίστασης, η συμμετοχή του σε διαδικασίες θρόμβωσης και στην ενδοθηλιακή λειτουργία καθώς και πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι συνδέεται με αυξημένο ΔΜΣ καθώς και με διάφορες επιπλοκές της παχυσαρκίας.

Η έλλειψη συσχέτισης στην παρούσα έρευνα εικάζεται ότι πιθανώς οφείλεται στο μικρό αριθμό των ατόμων, στην έλλειψη ατόμων ομόζυγων ως προς τον πολυμορφισμό καθώς

και το ότι τα πλείστα άτομα τα οποία είναι ομόζυγα και έχουν υποστεί έμφραγμα τις πλείστες φορές ήταν θανατηφόρο. Αυτό αποτελεί μια πολύ ισχυρή επιλογή για το δείγμα. Μελλοντικά, θα μπορούσαν να γίνουν επιπλέον έρευνες όσο αφορά τον TNF-α και τις στεφανιαίες νόσους, με μεγαλύτερο δείγμα και καλύτερη ανάλυση των παραγόντων που θα μπορούσαν και αυτοί να επηρεάσουν τους μηχανισμούς λειτουργίας του. Η γενετική προδιάθεση που οφείλεται σε διάφορους πολυμορφισμούς αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της προληπτικής ιατρικής και της αγωγής υγείας αφού με αυτό τον τρόπο μπορούν να εντοπιστούν τα άτομα που βρίσκονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου και έτσι να γίνει καλύτερη πρόληψη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vender, A.; Sherman, J.; Luciano, P.: **Φυσιολογία του ανθρώπου** (Γελαδάς, Ν.; Τσακόπουλος, Μ.) *Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*
2. Cruse, M.J.; Naismith, H.J.: **Atlas of Immunology**. *CRS Press*
3. Idriss, H.T.; Naismith, H.J.: **TNF α and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s)**. *Micr. Research and Technique* 50:184-195, 2000
4. Upasna, G.; Bharat, B.A.: **Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily**. *Biochemical Pharmacology* 66: 1403-1408, 2003
5. Sedgwick, J.D.; Ruuls, S.R.: **Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models**. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 294-301, 1999
6. Jaswinder K.S.; Hotamisligil, G.S.: **The role of TNF in adipocyte metabolism**. *Cell and Developmental Biology*, 10: 19-29, 1999.
7. Zinman, B.; Hanley, A. J. G.; Harris, S. B.; Kwan, J.; Fantus, I. G.: **Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in Native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus**. *J. Clin. Endocr. Metab.* 84: 272-278, 1999
8. Rosmond, R.; Chagnon, M.; Bouchard, C.; Bjorntorp, P.: **G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene promoter and salivary cortisol secretion**. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 2178-2180, 2001
9. Finck, N.B.; Johnson, R.W.: **Tumor Necrosis Factor- α , Regulates Secretion of the Adipocyte-Derived Cytokine, Leptin**. *Micr. Research and Technique* 50:209-215, 2000
10. Nedwin, G. E.; Naylor, S.L.; Sakaguchi, A. Y.; Smith, D.; Jarrett-Nedwin, J.; Pennice, D.; Goeddel, D. V.; Gray, P. W.: **Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization**. *Nucleic Acids Res.* 13: 6361-6373, 1985
11. Sivaraman, S.; Deshpande, C.G.; Ranganathan, R.; Huang, X.; Jajeh, A.; O'Brien, T.; Huang, R.-W.; Gregory, S.A.; Venugopal, P.; Preisler, H.D.: **Tumor Necrosis Factor Modulates CD 20 Expression on Cells From Chronic Lymphocytic Leukemia: A New Role for TNF Alpha?** *Micr. Research and Technique* 50:251-257, 2000
12. Cruse, M.J.; Lewis, R.E.: **Atlas of immunology**. *CRS press*
13. **Cell death induction by TNF: a matter of self-control.**

14. Mudle, S.D.; Presbyterian, R.; **TNF α In The Millennium Twilight.** *Micr. Research and Technique* 50:183, 2000

15. Herrman, S.-M.; Richard, S.; Nicaud, V.; Mallet, C.; Arveiler, D.; Evans, A.; Ruidavets, J.-B.; Luc, G.; Bara, L.; Parra, H.-J.; Poirier, O.; Cambien, F.: **Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity** *Europ. J. Invest.* 28: 59-66, 1998

16. Kroeger, K.M.; Carville, K. S.; Abraham, L.J.: **The –308 Tumor Necrosis Factor –a Promoter Polymorphism effects Transcription.** *Molecular Immunology* 34:391-399, 1997

17. Hajeer, Ali H.; Hutchinson, Ian V.: **TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications.** *Microscopy Research and Technique* 50:216-228, 2000

18. Braun, N.; Michel, U.; Ernst, B.P.; Metzner, R.; Bitsch, A.; Weber, F.; Rieckmann, P.: **Gene polymorphism at position –308 of the tumor-necrosis-factor- α (TNF α) in Multiple Sclerosis and it's influence on the regulation of TNF α production.** *Neuroscience Letters* 215: 75-78, 1996

19. Jae-Young, U.; Hyung-Min, K.: **Frequencies of the tumor necrosis factor gene polymorphisms in the Korean population.** *Hereditas* 139: 184-188, 2003

20. Cambien, F.; Poirier, O.; Mallet, C.; Tiret, L.: **Coronary heart disease and genetics: an epidemiologist's view.** *Molecular Medicine Today* 197-203, 1997.

21. Keavney, B.; **Genetic epidemiological studies of coronary heart disease.** *International Journal of Epidemiology* 31: 730-736, 2002.

22. Vincent, S.; Plannels, R.; Defoort, C.; Bernard, M.-C.; Gerber, M.; P, J.; Vague, P.; Lairon, D.: **Genetic polymorphism and lipoprotein responses to diets.** *Proceedings of the Nutrition Society* 61:427-434, 2002

23. Humphries, E. S.; Morgan, L.: **Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathology from candidate gene approaches.** *THE LANCET. Neurology* 3: 227-235, 2004

24. Herrmann, S.-M.; Ricard, S.; Nicaud, V.; Mallet, C.; Arveiler, D.; Evans, A.; Ruidavets, J.-B.; Luc, G.; Bara, H.-J.; Poirier, O.; Cambien, F.: **Polymorphisms of the tumor necrosis factor- α gene, coronary heart disease and obesity.** *European Journal of Clinical Investigation* 28: 59-66

25. Mann, D.-L.: **Recent Insights into the Role of Tumor Necrosis Factor in the Failing Heart.** *Heart Failure Reviews* 6: 71-80, 2001
26. Keso, T.; Perola, M.; Laippala, P.; Ilveskoski, E.; Kunnas, T.A.; Mikkelsen, J.; Penttila, A.; Hurme, M.; Karhunen, P.J.: **Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men.** *Atherosclerosis* 154: 691-697, 2001
27. Vendrell, J.; Fernandez-Real, J.-M.; Gutierrez, C.; Zamora, A.; Simon, I.; Bardaji, A.; Ricart, W.; Richart, C: **A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor- α gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients.** *Atherosclerosis* 167: 257-264, 2003
28. Feldman, A.-M.; Combes, A.; Wagner, D.; Kadakomi, T.; Kubota, T.; You, Y.; McTierman, C.: **The Role of Tumor Necrosis Factor in the Pathophysiology of Heart Failure.** *Journal of the American College of Cardiology* 35: 537-44, 2000