

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
**« Κυτταρική και γενετική αιτιολογία, διαγνωστική και
θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης:

*«Συχνότητα μεταλλαγών του γονιδίου MEFV σε ασθενείς με
κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς.
Γονοτυπικές – Φαινοτυπικές συσχετίσεις».*

ΕΛΕΝΗ ΦΡΑΓΚΟΥΛΗ

Επιβλέποντες

Γεώργιος Γουλιέλμος: Λέκτορας Γενετικής
Εμμανουήλ Γαλανάκης: Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	Σελ. 1
I) ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΟΙ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝΤΕΣ ΠΥΡΕΤΟΙ...Σελ.	1
II) ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ.....Σελ.	1
1) Γενικά.....	Σελ. 1
2) Κλινικές εκδηλώσεις.....	Σελ. 1
α) Φαινότυπος I.....	Σελ. 1
2β) Επιπλοκές.....	Σελ. 3
2γ) Φαινότυπος II και III.....	Σελ. 3
3) Διάγνωση και διαφορική διάγνωση.....	Σελ.4
4) Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	Σελ.4
5) Μοριακή γενετική και παθογένεια της νόσου.....	Σελ.5
5α) Το γονίδιο MEFV.....	Σελ.5
5β) Η πρωτεΐνη πυρίνη.....	Σελ.5
5γ) Μοριακή παθογένεια της νόσου.....	Σελ.6
5δ) Τρόπος κληρονομικότητας και μεταλλάξεις.....	Σελ.7
6) Επιδημιολογικά δεδομένα.....	Σελ.7
6α) Πληθυσμοί υψηλού κινδύνου.....	Σελ.7
6β) Δεδομένα από τον ελληνικό πληθυσμό.....	Σελ.8
7) Φαινοτυπικές-γονοτυπικές συσχετίσεις.....	Σελ.8
8) Γενετική διάγνωση.....	Σελ.9
III) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	Σελ.9
<u>ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	Σελ.11
<i>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</i>	Σελ.11
Κριτήρια επιλογής.....	Σελ.11
<i>ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	Σελ.12
I) ΥΛΙΚΑ.....	Σελ.13
II) ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	Σελ.14
III) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	Σελ.15
1) Απομόνωση γενωμικού DNA.....	Σελ.15
1i) Απομόνωση γενωμικού DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	Σελ.15
1ii) Απομόνωση γενωμικού DNA με το Puregene DNA genomic purification της Gentra.....	Σελ.17

2) Ποσοτικός προσδιορισμός DNA.....	Σελ.17
2i) Φωτομέτρηση DNA.....	Σελ.17
2ii) Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	Σελ.18
3) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	Σελ.19
4) Έλεγχος των προϊόντων της PCR.....	Σελ.21
5) Υβριδισμός.....	Σελ.21
6) Αυστηρά ξεπλύματα.....	Σελ.22
7) Ανάπτυξη χρώματος και ερμηνεία αποτελεσμάτων.....	Σελ.22
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	Σελ.24
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	Σελ.26
1) Δειγματοληψία και επιλογή ασθενών.....	Σελ.26
2) Γενετικός έλεγχος και οικογενής μεσογειακός πυρετός.....	Σελ.26
3) FMF STRIP Assay και οικογενής μεσογειακός πυρετός.....	Σελ.28
4) Ανάλυση των αποτελεσμάτων του γενετικού ελέγχου στον κρητικό πληθυσμό.....	Σελ.29
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</u>	Σελ.31
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	Σελ.32
<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	Σελ.38
1) Πίνακες	
2) Εικόνες	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Σεπτεμβρίου 2004-Σεπτεμβρίου 2005, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κυτταρική και Γενετική αιτιολογία, διαγνωστική και θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου», για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης. Το πειραματικό κομμάτι της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Παθολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με συνεπιβλέποντες τον επίκουρο καθηγητή Παιδιατρικής κ. Γαλανάκη και το λέκτορα Γενετικής κ. Γουλιέλμο. Ολοκληρώνοντας τη μελέτη αυτή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Μπούμπα, Καθηγητή Παθολογίας και κ. Ζαννή, Καθηγητή Βιοχημείας για την ευκαιρία που μου έδωσαν να φοιτήσω στο πρόγραμμα και επιπλέον τον κ. Μπούμπα για την αποδοχή μου στο εργαστήριό του και την κατανόησή του. Τον κ. Γαλανάκη και τους συνεργάτες μου στα εργαστήρια Παθολογίας και Ρευματολογίας, καθώς και το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Ρευματολογικής κλινικής για την καλή συνεργασία και τη συνεισφορά τους στη συλλογή κλινικών πληροφοριών. Επίσης, όλους τους ιατρούς που συνεισέφεραν παρέχοντας πληροφορίες για τους ασθενείς τους και ιδιαίτερα τη μητέρα μου, της οποίας η συμμετοχή στη διαμόρφωση του δείγματος ήταν καθοριστική. Θα ήταν παράλειψη εκ μέρους μου εάν δεν απηύθυνα ειλικρινείς ευχαριστίες στην κ. Δημητρίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, για τη φιλοξενία της στο εργαστήριο Παιδοαιματολογίας και την παροχή εξοπλισμού για την πραγματοποίηση τμήματος της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και την κ. Αδαμάκη, γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος για την διαρκή εγρήγορση και μέριμνα για την επίλυση τυχόν προβλημάτων. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Γουλιέλμο, που με την επιστημονική ακεραιότητα και την εργατικότητα που τον διακρίνει, πέρα από την ολοκληρωμένη επίβλεψη και καθοδήγηση μου καθ'όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας, συνέβαλε ουσιαστικά στη βαθμιαία εξοικείωσή μου με την έρευνα και τη μοριακή γενετική.

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στους γονείς μου και όσους μου συμπαραστάθηκαν όλο αυτό το διάστημα.

ABSTRACT

The gene responsible for the FMF is MEFV and encodes for the pyrin protein. FMF is common among Non Ashkenazi Jewish, Armenians, Arabs and Turks, where 5 mutations, M694V, V726A, M694I, M680I and E148Q, account for the 74% of FMF chromosomes. In not at risk populations, individual mutations are preferentially identified. Although the exact prevalence is not yet known, Greeks are considered to be at “intermediate” risk with the most prevalent mutations localized in exons 2 and 10. The incidence of FMF in Greece seems to be higher in the island of Crete. The objectives of the study was **a)** to find the frequency of MEFV mutations in patients from Crete and **b)** to correlate specific genotypes with clinical manifestations. Patients from Crete were selected according to established clinical criteria for hereditary periodic fevers. Genomic DNA was isolated from blood samples by a commercial kit and in all cases the FMF Viennalab Strip Assay (based on the reverse-hybridization method) was applied for the simultaneous detection of 12 MEFV mutations. Among 34 individuals with the FMF phenotype 29 had at least one mutation. No mutations were detected in 5 patients. Common mutations were found in patients under examination as in high risk populations, with the M694V being the most penetrant. Heterozygotes, unexpectedly, appear with severe clinical manifestations and moreover, complex genotypes also seem to exist. Atypical clinical patterns are related to rare private mutations. Thus the DNA test confirms the diagnosis of FMF and represents a useful diagnostic tool in case of clinical suspicion of the disease.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ι) ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΟΙ ΥΠΟΤΡΟΠΙΑΖΟΝΤΕΣ ΠΥΡΕΤΟΙ

Οι κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί αποτελούν μια σπάνια κατηγορία νοσημάτων, στην παθογένεια των οποίων δεν φαίνεται να εμπλέκεται κάποιος μικροβιακός παράγοντας, ούτε ανευρίσκονται αντιγονοειδικά T-Λεμφοκύτταρα ή αυτοαντισώματα¹. Συχνά αναφέρονται ως «αυτοφλεγμονώδη νοσήματα» και όπως υποδηλώνει η ονομασία τους, συγκεντρώνουν τέσσερα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά² :

- α) Κληρονομούνται σύμφωνα με το αυτοσωμικό επικρατές ή υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομικότητας.
- β) Χαρακτηρίζονται από υποτροπές ποικίλουσας συχνότητας με απουσία κανονικότητας, γεγονός που δικαιώνει την αντικατάσταση του όρου «περιοδικοί» πυρετοί από τον όρο «υποτροπιάζοντες».
- γ) Κλινικά, χαρακτηρίζονται από επεισόδια πυρετού που συνοδεύονται από ποικίλες φλεγμονώδεις εντοπίσεις (ορογόνοι, αρθρώσεις, δέρμα).
- δ) Παρατηρείται συνοδός φλεγμονώδης αντίδραση, που εκφράζεται με αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs), της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών (ΤΚΕ) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP).

Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί, τόσο κλινικά όσο και γενετικά, τα αντιπροσωπευτικότερα σύνδρομα κληρονομούμενου υποτροπιάζοντος πυρετού (πινάκας 1). Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (Familial Mediterranean Fever - FMF) και το σύνδρομο ανοσοσφαιρίνης D με υποτροπιάζοντα πυρετό (Hyperimmunoglobulin D and Periodic Fever Syndrome - HIDS) μεταβιβάζονται σύμφωνα με το αυτοσωμικό υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Αντίθετα, το αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο υποτροπιάζοντος πυρετού σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF Receptor Autoinflammatory Periodic Syndrome - TRAPS) και τα σύνδρομα Muckle Wells (MWS), οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο μετά από έκθεση στο κρύο (Familial Cold Autoinflammatory Syndrome - FCAS) και φλεγμονώδες σύνδρομο με εμφάνιση στη νεογνική ηλικία (Neonatal Onset Multi-inflammatory disease - NOMID/CINCA) κληρονομούνται σύμφωνα με το αυτοσωμικό επικρατές.

II) ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ

1) Γενικά

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (OMIM 249100), αποτελεί το πρότυπο νόσημα της οικογένειας των κληρονομούμενων υποτροπιάζόντων πυρετών, λόγω συστηματικότερης μελέτης και αυξημένης επίπτωσης της νόσου σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες. Οφείλει την ονομασία του στον οικογενή χαρακτήρα της νόσου, στην εμπύρετη φύση των επεισοδίων και στην προέλευση των συχνότερα προσβαλλομένων πληθυσμών, από την ευρύτερη λεκάνη της Μεσογείου.

2) Κλινικές εκδηλώσεις

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός, στο 90% των περιπτώσεων, εμφανίζεται σε ηλικία μικρότερη των 20 ετών³ και κλινικά εκδηλώνεται με τρεις διαφορετικούς φαινοτύπους.

2α) Φαινότυπος I

Ο φαινότυπος I αποτελεί την τυπική προσβολή της νόσου και χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα, αυτοπεριοριζόμενα επεισόδια πυρετού άνω των 38° C και διάρκειας 24 έως 72 ωρών. Η συχνότητα των επεισοδίων ποικίλει τόσο από ασθενή σε ασθενή, όσο και στο ίδιο άτομο, και μπορεί να κυμαίνεται από ένα επεισόδιο την εβδομάδα μέχρι ένα κάθε λίγα έτη. Ως εκλυτικοί παράγοντες για την εμφάνιση κρίσης αναφέρονται η έντονη φυσική άσκηση, το συναισθηματικό stress, η έμμηνος ρύση και η κύηση.

Κατά την τυπική προσβολή, ο πυρετός είναι δυνατό να συνοδεύεται από προσβολή ορογόνων, δέρματος και αρθρώσεων³. Κοιλιακό άλγος εμφανίζεται σε ποσοστό 95% των ασθενών, υποδυόμενο εικόνα οξείας κοιλίας και οδηγώντας πολλές φορές σε άσκοπες χειρουργικές επεμβάσεις σκωληκοειδεκτομής ή διερευνητικής λαπαροτομής για διαγνωστικούς σκοπούς. Σε κάθε περίπτωση, η χειρουργική επέμβαση αποκαλύπτει στείρα περιτονίτιδα, με περιτοναϊκό υγρό διηθημένο από πολυμορφοπύρηνα. Σε ποσοστό

30% παρατηρείται θωρακικό άλγος ή ετερόπλευρη πλευρίτιδα ενώ το 75% των ασθενών εμφανίζει μονοαρθρίτιδα μεγάλων αρθρώσεων (γόνατος, ποδοκνημικής, πηχεοκαρπικής). Επίσης, έχουν περιγραφεί περιστατικά σπάνιας διαβρωτικής μονοαρθρίτιδας ισχίου, που απαιτεί αντικατάσταση της άρθρωσης καθώς και εικόνα μεταναστευτικής πολυαρθρίτιδας. Σε ποσοστό 25% παρατηρείται επώδυνη δερματική ερυθρηματώδης βλάβη κνήμης, ραχιαίας επιφάνειας ποδός ή ποδοκνημικής άρθρωσης, που αναφέρεται ως ερυσιπελοειδές εξάνθημα. Λιγότερο συχνές εκδηλώσεις αποτελούν η περικαρδίτιδα, η ορχίτιδα και η σοβαρή εμπύρετος μυαλγία (εικόνα 1).

Κατά την οξεία προσβολή, ο εργαστηριακός έλεγχος αποκαλύπτει μη ειδική φλεγμονώδη απόκριση οξείας φάσης, με αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών (ΤΚΕ), της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του αμυλοειδούς-A του ορού (SAA), του ινωδογόνου και της απτοσφαιρίνης. Ωστόσο, υψηλές τιμές των παραπάνω παραμέτρων, αναφέρονται τόσο στα μεσοδιαστήματα των κρίσεων, οπότε οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, όσο και σε ασυμπτωματικούς φορείς της νόσου⁴.

2β) Επιπλοκές

Η αμυλοείδωση αποτελεί σοβαρότατη εκδήλωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού. Χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση αμυλοειδούς (προϊόν αποδόμησης του SAA) σε διάφορα όργανα, με κυριότερα τους νεφρούς, το ήπαρ και το γαστρεντερικό σωλήνα. Η νεφρική προσβολή οδηγεί την εγκατάσταση χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, έχει κακή πρόγνωση και συχνά αποβαίνει θανατηφόρα¹.

2γ) Φαινότυποι II και III

Κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν αμυλοείδωση ως πρώτη και μοναδική εκδήλωση της νόσου (φαινότυπος II)⁵, ενώ κάποιοι άλλοι, αν και φέρουν δύο μεταλλάξεις στο γονότυπό τους, παραμένουν ασυμπτωματικοί (φαινότυπος III)⁶.

3) Διάγνωση και διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει όλα τα αίτια που οδηγούν σε οξεία κοιλία, νοσολογικές οντότητες όπως το κληρονομικό αγγειοσίδημα και η οξεία διαλείπουσα πορφυρία, αυτοάνοσα νοσήματα, χρόνιες λοιμώξεις, κακοήθειες καθώς και τα λοιπά σύνδρομα κληρονομούμενου υποτροπιάζοντος πυρετού.

Η διάγνωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού παραμένει κατά κύριο λόγο διάγνωση αποκλεισμού, στηριζόμενη σε κλινικά κριτήρια σε συνδυασμό με την ανταπόκριση του ασθενούς στην κολχικίνη, που αποτελεί και την τρέχουσα θεραπευτική αντιμετώπιση. Έχουν οριστεί κλινικά κριτήρια⁷ για τη διευκόλυνση της διάγνωσης, σε πληθυσμούς όπου ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλός (πίνακας 2). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν η αναφερόμενη ευαισθησία και ειδικότητα (99% και στις δύο περιπτώσεις) γι' αυτά τα κριτήρια, βρίσκει εφαρμογή και σε άλλους πληθυσμούς³. Για το λόγο αυτό, η σύγχρονη επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στη γενετική διάγνωση του νοσήματος, προκειμένου να ανευρεθούν τεχνικές μοριακής γενετικής, ικανές να επιβεβαιώνουν ή όχι την κλινική διάγνωση και να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο στη διαγνωστική φαρέτρα της νόσου.

4) Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού συνίσταται στην καθημερινή από του στόματος χορήγηση κολχικίνης, δια βίου. Πρόκειται για αλκαλοειδές με αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία επιτυγχάνεται είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασής της με τους μικροσωληνίσκους είτε μέσω αλλαγών που επιφέρει σε μεταγραφικό επίπεδο. Η δόση χορήγησης εξατομικεύεται, καθορίζεται από την αποτελεσματικότητά της στον ασθενή και συνήθως κυμαίνεται από 1 έως 2,5mg την ημέρα. Η κολχικίνη οδηγεί στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών, με μείωση της συχνότητας, της διάρκειας και της σοβαρότητας των κρίσεων⁸ αλλά και στην πρόληψη εμφάνισης της αμυλοείδωσης⁹. Τις περισσότερες φορές, η μη ανταπόκριση στην κολχικίνη οφείλεται σε μη συμμόρφωση στη θεραπεία. Ωστόσο, σε ασθενείς αληθώς μη ανταποκρινόμενους στο φάρμακο, καμία θεραπευτική προσέγγιση δεν έχει τεκμηριωμένη αποτελεσματικότητα. Σε αυτούς τους ασθενείς, η

ιντερφερόνη α (INF-α), καταστέλλει πιθανά την οξεία φλεγμονή όταν χορηγείται έγκαιρα στην πρώιμη φάση της κρίσης¹⁰ και αποβαίνει αποτελεσματική κατά τη συνεχή συνδυασμένη χορήγησή της με την κολχικίνη¹¹. Υπό μελέτη βρίσκονται ανάλογα κολχικίνης, λιγότερο τοξικά και με ευρύτερο θεραπευτικό παράθυρο¹².

5) Μοριακή γενετική και παθογένεια της νόσου

5α) Το γονίδιο *MEFV*

Το γονίδιο που ευθύνεται για τον οικογενή μεσογειακό πυρετό είναι το *MEFV*. Το 1992 πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση του από την ομάδα του D.L.Kastner στα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) των ΗΠΑ¹³, η οποία αποκάλυψε ότι αυτό εδράζεται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (εικόνα 2). Η κλωνοποίησή του ακολούθησε πέντε χρόνια αργότερα από την προαναφερθείσα ομάδα¹⁴, καθώς και από μία δεύτερη, γαλλική ομάδα¹⁵. Το γονίδιο έχει μέγεθος 15 kb και αποτελείται από δέκα εξόνια που οδηγούν σε μετάγραφο των 3,7 kb. Το ανθρώπινο αγγελιαφόρο RNA της *MEFV* εκφράζεται στα πολυμορφοπύρρηνα, τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα του αίματος¹⁶, στους ινοβλάστες δέρματος και περιτόναιου¹⁷, ενώ *MEFV* μεταγραφήματα προερχόμενα από εναλλακτικό μάτισμα, φαίνεται να εκφράζονται και στους ινοβλάστες του αρθρικού υμένα¹⁸.

5β) Η πρωτεΐνη πυρίνη

Το γονίδιο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 781 αμινοξέων (εικόνα 3) και μοριακού βάρους 86KD, που αναφέρεται ως πυρίνη (pyrin) ή μαρενοστρίνη (marenostrin), οφείλοντας τις ονομασίες αυτές αντίστοιχα, στις πυρετογόνες ιδιότητες του μορίου¹⁴ και στη μεσογειακή καταγωγή των συχνότερα προσβαλλόμενων πληθυσμών¹⁵. Η υποκυτταρική (πυρηνική ή κυτταροπλασματική) εντόπιση της πρωτεΐνης, ελέγχεται από διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος και κυτταροειδικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις¹⁸. Οι βασικές αναγνωρίσιμες δομικές περιοχές στο πρωτεϊνικό μόριο της πυρίνης είναι τέσσερις: μία αμινοτερματική περιοχή 92 αμινοξέων γνωστή ως Pyrin domain (PYD, PAD, DAPIN),

μία B-box zinc-finger περιοχή, μία coiled-coil περιοχή και μία καρβοξυτελική B30.2 περιοχή¹⁹ (εικόνα 3).

5γ) Μοριακή παθογένεια της νόσου

Η πυρίνη αποτελεί μέλος μιας ευρύτερης οικογένειας πρωτεϊνών που αναφέρεται ως DD-fold υπεροικογένεια και περιλαμβάνει πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία φέρουν μία δομική περιοχή με ελικοειδή διαμόρφωση που δομείται από έξι αντιπαράλληλες έλικες, σε σχηματισμό πτυχής (DD-fold αναδίπλωση) (εικόνα 4). Τέτοιες δομικές DD-fold περιοχές (domains) αποτελούν η PYD (pyrin domain) της πυρίνης και οι DD, DED και CARD domains (εικόνα 5). Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε διαδικασίες φλεγμονής μέσω παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών, σε αποπτωτικά μονοπάτια με τη μεσολάβηση πρωτεασών των κασπασών, καθώς και στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB. Μέσω της εξαελικοειδούς διαμόρφωσης που διαθέτουν είναι σε θέση να συμμετέχουν σε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που φέρουν τις ίδιες δομικές περιοχές²⁰ (εικόνα 6).

Η παθοφυσιολογία του οικογενούς μεσογειακού πυρετού δεν έχει απόλυτα δευκρινιστεί μέχρι σήμερα. Ωστόσο, φαίνεται ότι η πυρίνη αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της φλεγμονώδους διαδικασίας, αναστέλλοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι η IL-1β (εικόνα 7). Η ιδιότητα αυτή της πυρίνης, εξασφαλίζεται μέσα από την ομότυπη αλληλεπίδραση της PYD αμινοτερματικής περιοχής της, με την ομόλογη περιοχή του προσαρμοστικού μορίου ASC, με επακόλουθη ενεργοποίηση κασπασών και τελικά παραγωγή IL-1β. Η λειτουργικότητα πάντως της πυρίνης αίρεται σε περίπτωση μεταλλαγών του γονιδίου MEFV, όπως συμβαίνει στον οικογενή μεσογειακό πυρετό¹⁹.

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από πειράματα σε ζωικά μοντέλα που εκφράζουν μία τροποποιημένη ελειμματική (truncated) μορφή της πυρίνης, όπου παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία στην ενδοτοξίνη, επαγωγή φλεγμονής μέσω παραγωγής IL-1β και ελαττωματική αποπτωτική εργασία στα μακροφάγα²¹.

5δ) Τρόπος κληρονομικότητας και μεταλλαγές

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός μεταβιβάζεται σύμφωνα με το πρότυπο της αυτοσωμικής υπολειπόμενης κληρονομικότητας. Ωστόσο, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που κάνουν λόγο και για αυτοσωμικά επικρατή τρόπο μεταβίβασης²².

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 50 μεταλλαγές του γονιδίου *MEFV*. Στην πλειοψηφία τους αποτελούν μεταλλαγές χωρίς νόημα (missense), εκ των οποίων δύο αφορούν μεταλλαγές απαλοιφής (I692del, M694del) και μία οδηγεί σε πρόωμο τερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Y688X)²³. Οι περισσότερες μεταλλαγές που έχουν ανιχνευθεί έως σήμερα εντοπίζονται στο εξόνιο 10 του γονιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στη B30.2 (SPRY) δομική περιοχή της πυρίνης (π.χ. μεταλλαγές στα κωδικόνια # 694, 680) ενώ εξίσου σημαντικό θεωρείται και το εξόνιο 2 (και ειδικότερα η μεταλλαγή στο κωδικόνιο # 148) (εικόνα 8).

6) Επιδημιολογικά δεδομένα

6α) Πληθυσμοί υψηλού κινδύνου

Οι εθνικές ομάδες που προσβάλλονται με αυξημένη συχνότητα από τον οικογενή μεσογειακό πυρετό είναι οι non-Askenazi Εβραίοι, οι Αρμένιοι, οι Άραβες και οι Τούρκοι²³ (εικόνα 10). Στους πληθυσμούς αυτούς, τα ποσοστά φορείας ανέρχονται από 1:3 έως 1:7, υποδηλώνοντας ίσως κάποιο προσαρμοστικό πλεονέκτημα των ετεροζυγωτών έναντι κάποιου μικροβιακού παράγοντα³. Ωστόσο, ο γενετικός έλεγχος έχει αποκαλύψει σχετικά αυξημένη συχνότητα της νόσου και σε άλλες χώρες που ανήκουν στην ευρύτερη λεκάνη της Μεσογείου (εικόνα 9).

Στους πληθυσμούς που η επίπτωση της νόσου είναι αυξημένη (υψηλού κινδύνου πληθυσμοί για την εμφάνιση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού), η νόσος εκδηλώνεται στην τυπική κλινική της μορφή, με το 74% των περιπτώσεων να οφείλεται στις ακόλουθες πέντε μεταλλαγές: M694V, V726A, M694I, M680I (εξόνιο 10) και E148Q (εξόνιο 2)²³ (εικόνα 11). Αντίθετα, σε πληθυσμούς μη υψηλού

κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου, ανευρίσκονται συχνά σπάνιες, «ατομικές» (private) μεταλλαγές²⁴.

6β) Δεδομένα από τον ελληνικό πληθυσμό

Ο επιπολασμός της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό δεν είναι γνωστός. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα των μεταλλαγών της MEFV είναι φτωχά, αν και η κατανομή τους φαίνεται να μοιάζει με αυτή που παρατηρείται στους Ιταλούς και τους Άραβες²³ (εικόνα 12).

Ωστόσο, ο οικογενής μεσογειακός πυρετός δεν φαίνεται να αποτελεί σπάνιο νόσημα στη χώρα μας. Προκαταρκτικά δεδομένα σε μικρό αριθμό ασθενών υποδηλώνουν ότι η επίπτωσή της στην Ελλάδα είναι αυξημένη στους νησιωτικούς χώρους της Κρήτης και της Δωδεκανήσου²⁵. Οι πλέον διαδεδομένες μεταλλαγές μεταξύ των Ελλήνων εντοπίζονται στα εξόνια 2 και 10^{25,26} ενώ το ποσοστό φορείας της νόσου μεταξύ των Ελληνοκυπρίων είναι σημαντικό και ανάλογο με αυτό της κυστικής ίνωσης²⁷.

7) Φαινοτυπικές-Γονοτυπικές συσχετίσεις

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός χαρακτηρίζεται από κλινική ετερογένεια η οποία εν μέρει οφείλεται σε γενετική ετερογένεια. Το εύρος των κλινικών ευρημάτων που σχετίζονται με μεταλλαγές του γονιδίου *MEFV* ποικίλλει, από παντελή απουσία συμπτωμάτων (ατελής διεισδυτικότητα) έως ανάπτυξη της σοβαρότατης επιπλοκής της αμυλοείδωσης²³. Η διεισδυτικότητα της M694V ομοζυγωτίας είναι πολύ υψηλή (99%) και σχετίζεται με σοβαρότατη νόσο στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου. Ασθενείς ομοζυγώτες για τη M694V, είναι δυνατό να εμφανίσουν πρώιμη έναρξη της νόσου, αρθρίτιδα και αμυλοείδωση, ενώ σε κάποιους παρατηρείται καταστροφική μυαλγία και ερυσιπελοειδές ερύθημα. Εξίσου σοβαρός φαινότυπος εκδηλώνεται και με άλλες μεταλλαγές στη θέση #694, μεταλλαγές στη θέση #680 ή συνδυασμούς αυτών με άλλες μεταλλαγές.

Αντίθετα, τα αλληλόμορφα E148Q και V726A που εμφανίζονται αρκετά συχνά, σχετίζονται με ατελή διεισδυτικότητα και ηπιότερες κλινικές εκδηλώσεις, αν και σε συνδυασμό με άλλα (π.χ M694V / V726A), προσδίδουν στον πάσχοντα ένα σοβαρότερο φαινότυπο.

Ήπιος φαινότυπος ή ατελής διεισδυτικότητα έχει περιγραφεί και σε ασθενείς με τις σπάνιες μεταλλάξεις K695R και P369S.

Σε μη τυπικά προσβεβλημένους πληθυσμούς ανευρίσκονται σπάνιες μεταλλάξεις²⁴ ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρονται συχνά και σύνθετοι γονότυποι αλληλομόρφων που συγκληρονομούνται στο ίδιο χρωμόσωμα, όπως ο παρατηρούμενος στον ελληνοκυπριακό πληθυσμό σύνθετος γονότυπος F479L - E167D²⁷.

8) Γενετική διάγνωση

Η αξία του γενετικού ελέγχου στη διάγνωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού σε πληθυσμούς μικτής εθνικής προέλευσης με άγνωστη επίπτωση και φορεία, και σε ασθενείς αβέβαιου οικογενειακού ιστορικού ή προέλευση από μη ενδημικές για τη νόσο χώρες δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί²⁶. Σε ασθενείς με τυπική κλινική εικόνα και καταγωγή από υψηλού κινδύνου εθνικές ομάδες, η διάγνωση τίθεται με βεβαιότητα κλινικά, χωρίς τη χρήση μοριακών τεχνικών¹, και ο γενετικός έλεγχος παραμένει υψηλής διαγνωστικής αξίας μόνο στις άτυπες περιπτώσεις όπου υπάρχει κλινική αβεβαιότητα ή απουσιάζει το οικογενειακό ιστορικό²⁸.

Η παρουσία δύο μεταλλαγών (ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία), σε ασθενείς με κλινικές εκδηλώσεις οικογενούς μεσογειακού πυρετού επιβεβαιώνει τη διάγνωση. Η παρουσία μίας και μόνο μεταλλαγής του γονιδίου MEFV δεν θέτει με βεβαιότητα τη διάγνωση, ούτε όμως αποκλείει τη νόσο².

III) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στόχοι της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση της συχνότητας μεταλλαγών του γονιδίου MEFV σε ασθενείς που πληρούν γενικά κλινικά κριτήρια για κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς, η συσχέτιση γονοτύπων με συγκεκριμένους κλινικούς φαινότυπους και ο προσδιορισμός «απλοτύπων κινδύνου» (risk haplotypes) στην υπό μελέτη πληθυσμιακή ομάδα.

Η αντιστοίχιση μεταλλαγών (γονοτύπου) με συγκεκριμένο φαινότυπο (κλινικές εκδηλώσεις, ένταση και σοβαρότητα

συμπτωμάτων, επιπλοκές, ανταπόκριση στη θεραπεία) θα εμπλουτίσει τις υπάρχουσες γνώσεις μας σχετικά με τη νόσο και θα επιτρέψει τη συλλογή ικανοποιητικών πληροφοριών σχετικά με την έκβαση (πρόγνωση) της νόσου. Επιπρόσθετα, θα αποσαφηνιστεί η αξία του γενετικού ελέγχου (DNA test) ως διαγνωστικού μέσου στη διερεύνηση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού και θα εκτιμηθεί ο βαθμός στον οποίο το νόσημα υποδιαγιγνώσκεται και άρα καθίσταται αναγκαία η καθιέρωση του γενετικού ελέγχου, ως διαγνωστικού μέσου ρουτίνας.

Η παρούσα ερευνητική εργασία είναι συμβατή με παρεμφερείς ερευνητικές προσπάθειες που διεξάγονται στον Ελληνικό χώρο^{25,26,27} για την προαγωγή της επιστημονικής προόδου στο μάλλον όχι και τόσο σπάνιο νόσημα του οικογενούς μεσογειακού πυρετού και τη μείωση της ταλαιπωρίας των ασθενών που πάσχουν από αυτό.

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Για την ανίχνευση μεταλλαγών οικογενούς μεσογειακού πυρετού, χρησιμοποιήθηκαν 34 ασθενείς προερχόμενοι από το νησιωτικό χώρο της Κρήτης, όπου διεξάγεται και η παρούσα μελέτη. Για την επιλογή των ασθενών ορίστηκαν αρχικά (screening), γενικά, κλινικά και εργαστηριακά κριτήρια επιλογής για κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς (FMF, TRAPS, HIDS, MWS, FCAS). Τα κριτήρια αυτά, παρέχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης όλων των γνωστών συνδρόμων κληρονομούμενου υποτροπιάζοντος πυρετού, προκειμένου να μη διαφύγουν άτυπες περιπτώσεις (FMF) ή περιπτώσεις που προσομοιάζουν σε άλλους κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς.

Κριτήρια επιλογής

Μείζονα κριτήρια

- 1) Πυρετός πάνω από 38 που υποτροπιάζει, με επεισόδια περισσότερα των 2 ανά έτος
- 2) Υποτροπές κοιλιακού ή θωρακικού άλγους, περισσότερες των 2 ανά έτος, με ή χωρίς πυρετό

Ελλάσσονα κριτήρια

- 1) Οικογενιακό ιστορικό
- 2) Ηλικία εμφάνισης α' επεισοδίου, μικρότερη των 20 ετών
- 3) Ορογονίτιδα (περιτονίτιδα, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα, αρθρίτιδα)
- 4) Υψηλές τιμές ταχύτητας καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) ή C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ή λευκών αιμοσφαιρίων κατά την κρίση

Προκειμένου να συμπεριληφθούν στη μελέτη, οι ασθενείς όφειλαν να συγκεντρώνουν **ένα μείζον και δύο ή περισσότερα ελλάσσονα κριτήρια υπό την προϋπόθεση ότι είχαν αποκλειστεί από τη διάγνωση αυτοάνοσα νοσήματα, χρόνιες λοιμώξεις ή κακοήθειες.**

Η συλλογή των κλινικών κι εργαστηριακών πληροφοριών έγινε μέσα από τη διαδικασία της προσωπικής συνέντευξης (ιστορικό) και κλινικής εξέτασης κάθε μεμονωμένου περιστατικού. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν γνώση και υπέγραψαν έντυπο ενημερωμένης συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στη μελέτη ενώ κανένας δε χρειάστηκε να διακόψει θεραπεία που τυχόν ελάμβανε.

Οι ερωτήσεις στις οποίες καλούνταν να απαντήσουν οι ασθενείς αφορούσαν τα εξής:

- Ονοματεπώνυμο
- Ηλικία
- Καταγωγή
- Τόπος διαμονής
- Διάρκεια και συχνότητα κρίσεων
- Παρουσία ή όχι πυρετού και θερμοκρασία
- Παρουσία κοιλιακού άλγους/περιτονίτιδας
- Παρουσία θωρακικού άλγους/πλευρίτιδας
- Παρουσία αρθραλγιών/αρθρίτιδας
- Παρουσία εξανθήματος
- Νεφρική προσβολή
- Άσκοπη χειρουργική επέμβαση στην κοιλία
- Ηλικία εμφάνισης α΄ επεισοδίου
- Οικογενειακό ιστορικό (συγγενείς α΄ και β΄ βαθμού)
- Λοιπό ατομικό αναμνηστικό
- Τιμές WBC, CRP, TKE
- Διαγνωστική διερεύνηση που έχει πραγματοποιηθεί προς αποκλεισμό λοιμώδους, κακοήθους ή αυτοάνοσου νοσήματος
- Λήψη κολχικίνης, δοσολογία χορήγησης, χρονικό διάστημα χορήγησης και ανταπόκριση στη θεραπεία

ΜΕΘΟΔΟΙ

- 1) Εξαγωγή γενωμικού DNA από κύτταρα ολικού περιφερικού αίματος**
 - α) με φαινόλη/χλωροφόρμιο
 - β) με εμπορικό kit (Puregene σύστημα απομόνωσης DNA της Gentra)

2) Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

- α) με φασματοφωτόμετρο
- β) με κατασκευή γέλης αγαρόζης 0,8%

3) Πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

(multiplex PCR) σύμφωνα με το εμπορικό kit FMF STRIP Assay της Viennalab και με τη χρήση βιοτινυλιωμένων εκκινητών.

4) Έλεγχος προϊόντων της PCR με κατασκευή γέλης αγαρόζης 2%

5) Ανάστροφος υβριδισμός των προϊόντων της PCR σε

ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (probes) φυσικού τύπου και σε αντίστοιχους με μεταλλαγές

6) Αναγνώριση των βιοτινυλιωμένων αλληλουχιών με το σύστημα στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης

I) ΥΛΙΚΑ

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- Διάλυμα TSE (NaCl 150 mM, EDTA 100mM pH:8, Tris-Cl 20mM pH:8)
- Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 20% w/v
- Πρωτεϊνάση K 10mg/ml
- Απόλυτη αιθανόλη
- 70% αιθανόλη
- Διάλυμα TE (10mM Tris-Cl pH:8, 1mM EDTA pH:8)
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Οξικό Na 3M pH:5,4
- RNase A 10mg/ml
- 100% ισοπροπανόλη (2 προπανόλη)
- Διάλυμα TBE 1x (90mM Tris-Cl, 90mM βορικό οξύ, 2mM EDTA)

- Διάλυμα χρωστικής 6x
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Πήκτωμα αγαρόζης 0,8%
- Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC Lysis solution της Gentra)
- Διάλυμα λύσης κυττάρων (Cell Lysis solution της Gentra)
- Διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών (Protein Precipitation solution της Gentra)
- Διάλυμα επαναιώρησης του DNA (DNA Hydration solution της Gentra)
- Taq πολυμεράση 5U της Minotech
- Ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης της Taq πολυμεράσης της Viennalab
- Νερό απιονισμένο και αποστειρωμένο (ddH₂O)
- Μείγμα πολλαπλασιασμού της Viennalab (Amplification Mix) για τις PCR αντιδράσεις που περιλαμβάνει βιοτινυλιωμένους εκκινητές (primers), dNTPs
- Διάλυμα αποδιάταξης του DNA (DNAT) με 1,6%NaOH της Viennalab
- Μεμβράνες υβριδισμού (ταινίες)
- Υποδοχές μεμβρανών υβριδισμού
- Διάλυμα υβριδισμού της Viennalab (Hybridization buffer)
- Διάλυμα έκπλυσης A της Viennalab(Wash solution A)
- Διάλυμα έκπλυσης B της Viennalab(Wash solution B)
- Διάλυμα σύξευξης της Viennalab που περιλαμβάνει στρεπταβιδίνη-αλκαλική φωσφατάση (kai alp?)
- Διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (περιλαμβάνει NBT-nitro blue tetrazolum και BCIP 5-Br-4-Cl 3-indolyl phosphatase)

II) ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Σωληνίσκοι μικροφυγοκέντρωσης χωρητικότητας 1,5ml
- Σωληνίσκοι χωρητικότητας 15ml
- Αναδευτήρας (vortex mixer)
- Μικροφυγόκεντρος για σωληνίσκους 1,5ml με δυνατότητα ανάπτυξης θερμοκρασιών ψύχους (marka)

- Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής (PTC-100 thermal cycler, MJ Research Inc Watertown Ma, USA)
- Σωληνίσκοι χωρητικότητας 0,5ml, κατάλληλοι για χρήση στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, αποστειρωμένοι με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 20 λεπτά
- Υδατόλουτρο με κινούμενη πλατφόρμα (shaking platform) και δυνατότητα προσαρμογής της θερμοκρασίας στους 45°C +/- 0,5°C
- Rocker ή orbital shaker
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης γέλης αγαρόζης
- Πηγή ηλεκτρικής τάσης
- Λάμπα υπεριώδους
- Εξοπλισμός για φωτογράφιση του πηκτώματος

III) ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1) Απομόνωση γενωμικού DNA

1i) Απομόνωση γενωμικού DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Τα κύτταρα λύνονται με SDS και οι πρωτεΐνες τους αποικοδομούνται μετά από επώαση με πρωτεϊνάση K. Γίνονται διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη, χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη και στη συνέχεια το DNA κατακρημνίζεται από την υδατική φάση με οξικό νάτριο και αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε TE. Το RNA απομακρύνεται με RNaseA.

Πραγματοποιείται αιμοληψία 5ml περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό EDTA. Το EDTA εμποδίζει την πήξη του αίματος. Το αίμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και ο ορός διαχωρίζεται από τα κύτταρα του αίματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σχηματίζουν μία σκουρόχρωμη κάτω φάση ενώ τα λευκά αιμοσφαίρια μία ανοιχτόχρωμη πάνω φάση. Ανάμεσα στις δύο φάσεις βρίσκεται το στρώμα των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ). Αφού απομακρυνθεί ο ορός, διαχωρίζονται τα λευκά αιμοσφαίρια και ένα μέρος των ΔΕΚ και χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA. Στα κύτταρα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος TSE, SDS με τελική συγκέντρωση 1% w/v και πρωτεϊνάση K, με τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Το SDS σπάει

τις μεμβράνες των κυττάρων και απελευθερώνει τη χρωματίνη. Η πρωτεϊνάση K καταστρέφει τις πρωτεΐνες και για να δράσει, το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 45-60 λεπτά. Ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφόρμιου αναμιγνύονται με το δείγμα με ήπια ανακίνηση για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις 4000rpm. Η υδατική φάση που περιέχει τα νουκλειικά οξέα, μεταφέρεται με ευρύστομη πιπέτα Pasteur σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και εκχυλίζεται για δεύτερη φορά με φαινόλη και χλωροφόρμιο, μέχρι να εξαφανιστεί η μεσόφαση στην οποία παγιδεύονται οι πρωτεΐνες. Η τελευταία κατακρήμνιση γίνεται με χλωροφόρμιο που απομακρύνει υπολείμματα φαινόλης από την υδατική φάση. Για την κατακρήμνιση των νουκλειικών οξέων, προστίθενται στην υδατική φάση 2 όγκοι παγωμένης (-20°C) απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3M, Ph 5.4. Η αιθανόλη και το οξικό νάτριο αφυδατώνουν τα νουκλειικά οξέα, ώστε αυτά να κατακρημνιστούν από την υδατική φάση. Μία πιπέτα Pasteur με αγκιστροειδές άκρο χρησιμοποιείται για να τυλιχθούν τα νουκλειικά οξέα που κατακρημνίζονται με τη μορφή νήματος, τα οποία στη συνέχεια, ξεπλένονται με 70% παγωμένη αιθανόλη για την απομάκρυνση των αλάτων. Το ίζημα των νουκλειικών οξέων αφήνεται λίγο στον αέρα για να εξατμιστεί η αιθανόλη και στη συνέχεια τοποθετείται σε διάλυμα TE (0,5ml), όπου αφήνεται να επαναδιαλυθεί στους 4°C. Για την καταστροφή του RNA που περιέχεται στο δείγμα, προστίθεται RNase σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml και το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Ο καθαρισμός της RNase πραγματοποιείται με διαδοχικές εκχυλίσεις φαινόλης και χλωροφόρμιου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1). Για την κατακρήμνιση του DNA προστίθεται στην υδατική φάση παγωμένη απόλυτη αιθανόλη (2 όγκοι) και οξικό νάτριο 3M pH 5,4 (1/10 του όγκου). Το ίζημα ξεπλένεται από τα άλατα με παγωμένη αιθανόλη 70% και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε TE στους 4°C.

1ii) Απομόνωση γενωμικού DNA με το Puregene DNA genomic purification kit της Gentra.

Σε σωληνίσκο χωρητικότητας 1,5ml που περιέχει 900μl RBC Lysis Solution (διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων), προστίθενται 300μl περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό EDTA και το μείγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 13000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου, καταλείποντας ορατή λευκή πελέτα των 10-20μl. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο υγρό με δυναμικό vortex, γεγονός που διευκολύνει τη μετέπειτα κυτταρική λύση. Στα διαλυμένα κύτταρα προστίθενται 300μl Cell Lysis Solution (διάλυμα λύσης κυττάρων) και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη 100μl Protein Precipitation Solution (διάλυμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών), δυναμικό vortex σε υψηλή ταχύτητα για 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13000 rpm. Στον πυθμένα καταλείπεται ορατή πρωτεϊνική πελέτα. Το υπερκείμενο που περιέχει το DNA, μεταφέρεται σε σωληνίσκο του 1,5ml, που περιέχει 300 μl 100% ισοπροπανόλης για κατακρήμνιση και μετά από ήπια ανακίνηση περίπου 50 φορές, φυγοκεντρείται για 3 λεπτά στις 13000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το DNA παραμένει στο σωληνίσκο για στέγνωμα σε καθαρό απορροφητικό χαρτί. Ακολουθεί προσθήκη 300μl 70% αιθανόλης και νέα φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 3 λεπτά. Τέλος, η αιθανόλη απομακρύνεται και το DNA στεγνώνει στον αέρα για να επαναιωρηθεί σε 100μl DNA Hydration solution (διάλυμα επαναιώρησης του DNA) στους 4°C.

2) Ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Η ποσότητα του DNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα, προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2i) Φωτομέτρηση

Τα νουκλειικά οξέα απορροφούν στα 260nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης απορροφούν στα 260nm αλλά

και στα 280nm, όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά. Για να είναι καθαρό το δείγμα, πρέπει η απορρόφηση στα 260nm να είναι σχεδόν διπλάσια της απορρόφησης στα 280nm. Γίνονται επομένως δύο μετρήσεις και υπολογίζεται ο λόγος OD260/OD280. Ο λόγος αυτός πρέπει να είναι 1.6-2. Η ποσοτικοποίηση γίνεται από την τιμή της απορρόφησης μίας αραιώσης του αρχικού δείγματος 1ml στα 260nm. Για μεγαλομοριακό DNA ισχύει ότι OD260=1, σημαίνει ότι στο 1ml που μετρήθηκε περιέχονται 50μg DNA.

2ii) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, εκτός από την δυνατότητα εκτίμησης του μεγέθους του και την προσεγγιστική ποσοτικοποίηση αυτού, δίνει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα του DNA και την περιεκτικότητά του σε RNA.

Υλικά

- *1x διάλυμα TBE* (90 mM Tris - Cl, 90 mM Βορικό οξύ, 2 mM EDTA): πρόκειται για το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, που προσδίδει αγωγιμότητα στο πήκτωμα με τα ιόντα Βορικού οξέος.
- *6x διάλυμα χρωστικής*: το διάλυμα αυτό αναμειγνύεται με τα δείγματα για την καθήλωση του DNA όταν φορτώνεται στο πήκτωμα και την παρακολούθηση της κινητικής της ηλεκτροφόρησης.
- *Βρωμιούχο αιθίδιο*: προστίθεται στο πήκτωμα και στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Προσδένεται μεταξύ των δύο αλυσίδων της DNA έλικας, ώστε το σύμπλοκο αιθιδίου- DNA να φθορίζει όταν φωτίζεται με υπεριώδη ακτινοβολία.
- *Πήκτωμα αγαρόζης 0,8%*: η αγαρόζη διαλύεται σε TBE 1x με βρασμό. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο και στη συνέχεια αφήνεται να σταθεροποιηθεί σε ειδική μήτρα στην οποία τοποθετείται κατάλληλο χτένι για το σχηματισμό των θέσεων όπου φορτώνονται τα δείγματα.

Εξοπλισμός

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

- Πηγή ηλεκτρικής τάσης
- Λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας
- Εξοπλισμός για φωτογράφιση του πήκτωματος και αποθήκευση των φωτογραφιών.

Διαδικασία

10 ml δείγματος DNA αναμειγνύονται με 5 μl διάλυμα χρωστικής. Τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα και στο ίδιο πήκτωμα φορτώνεται (σε παραπλήσια θέση και ένας ποσοτικός μάρτυρας (DNA λ βακτηριοφάγου γνωστής συγκέντρωσης). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 Volt για 45 min με μια ώρα. Στη συνέχεια, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται. Η ποσοτικοποίηση γίνεται συγκρίνοντας την ένταση της ζώνης του αγνώστου DNA με την ένταση της ζώνης του μάρτυρα. Το RNA, εάν υπάρχει, φαίνεται με τη μορφή νέφους (εικόνα 13).

3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στηρίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA που βρίσκεται μεταξύ δύο «εκκινητών» (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεστίδια που συνήθως έχουν μήκος 20-30 bp, υβριδοποιούνται με συμπληρωματικές αλληλουχίες της DNA έλικας και κατευθύνουν την αντιγραφή του ενδιαμέσου τμήματος από την DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές προσανατολίζονται με το 3' άκρο τους προς το τμήμα του DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι θερμικής αποδιάταξης του DNA - στόχου, υβριδοποίησης των εκκινητών στη συμπληρωματική τους αλληλουχία και επέκτασή τους από τη DNA πολυμεράση, καταλήγουν στον εκθετικό πολλαπλασιασμό του τμήματος DNA που ορίζεται από τα 5' άκρα των εκκινητών. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η Taq πολυμεράση, ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, ώστε να μη χρειάζεται η προσθήκη νέου ενζύμου μετά από κάθε στάδιο θερμικής αποδιάταξης.

Μια παραλλαγή της PCR είναι η multiplex (πολλαπλή) αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, η οποία επιτρέπει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό διαφορετικών τμημάτων DNA στην ίδια

αντίδραση. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε για κάθε δείγμα, multiplex PCR, για την ταυτόχρονη ενίσχυση των τμημάτων από 4 εξόνια του MEFV γονιδίου (εξόνιο 2, 3, 5 και 10), σε μια μόνο, απλή αντίδραση.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βιοτινυλιωμένοι. Το σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης αποτελεί σύστημα έμμεσης μη ραδνεργούς σήμανσης του DNA, το οποίο αξιοποιεί την εξαιρετικά υψηλή συγγένεια δύο συνδετών (ligands): της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης. Η βιοτίνη είναι βιταμίνη φυσικής προέλευσης η οποία δρα ως μόριο αναφοράς ενώ η στρεπταβιδίνη είναι βακτηριακή πρωτεΐνη και αποτελεί το μόριο συγγένειας. Τα δύο αυτά μόρια δεσμεύονται εξαιρετικά ισχυρά με δύναμη συγγένειας της τάξης του 10^{-14} , μια από τις ισχυρότερες γνωστές στη Βιολογία. Οι βιοτινυλιωμένοι ανιχνευτές (probes) παρασκευάζονται εύκολα, εισάγοντας ένα βιοτινυλιωμένο νουκλεοτίδιο στην αντίδραση σήμανσης. Μια ποικιλία από διαφορετικά μόρια-δείκτες, συζεύγνυνται με τα μόρια συγγενείας. Ένα τέτοιο μόριο δείκτη αποτελεί το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (ALP), το οποίο μέσω σύζευξής του με τη στρεπταβιδίνη, οδηγεί σε ειδική, ανιχνεύσιμη χρωματική αντίδραση.

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 5 μl DNA (περίπου 200 ng DNA ανά αντίδραση), 15 μl από το μείγμα πολλαπλασιασμού (amplification mix) το οποίο περιλαμβάνει τους βιοτινυλιωμένους εκκινητές (4 ζεύγη για τα αντίστοιχα υπό πολλαπλασιασμό τμήματα εξονίων), τα dNTP₅ νουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και το MgCl₂ σε καθορισμένη στοιχειομετρία από την κατασκευάστρια εταιρεία, καθώς και 5μl Taq πολυμεράσης (50 U/μl) αραιωμένης στο ρυθμιστικό της διάλυμα (Taq Dilution buffer) σε συγκέντρωση 0, 4 U/μl. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 25 μl.

Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA: 95^o C/ 2-5min
- 35 κύκλοι:
 - αποδιάταξη του DNA: 94^o C / 15 sec
 - υβριδοποίηση εκκινητή και αλληλουχίας στόχου: 58^o C/30sec.
 - Επέκταση του εκκινητή από την Taq πολυμεράση: 72^o C/30 sec
- Τελική επέκταση: 72^o C για 3 min.

Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης του εκκινητή με την αλληλουχία-στόχο χαρακτηρίζει κάθε ζεύγος εκκινητών και γενικά είναι 3 -10° C μικρότερη από το Tm των εκκινητών. Εκκινητές με υψηλό GC% (υψηλό Tm) υβριδοποιούνται σε θερμοκρασίες άνω των 55° C. Χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, κάτω των 50° C, ευνοούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, λόγω έκτοπης (μη ειδικής) πρόσδεσης των PCR εκκινητών. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται σε μικρό χρόνο, διότι οι εκκινητές βρίσκονται σε περίσσεια. Ο χρόνος της επέκτασης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Για PCR προϊόντα μεγέθους 400-500 bp αρκούν 30 sec ως χρόνος επέκτασης. Η τελική επέκταση γίνεται με σκοπό της παραγωγή όσο το δυνατό πιο ολοκληρωμένων προϊόντων. Σε αυτό το στάδιο, η Taq πολυμεράση ολοκληρώνει την σύνθεση μορίων που δεν έχει προλάβει να ολοκληρώσει στους προηγούμενους κύκλους.

4. Έλεγχος των προϊόντων της PCR .

Ο έλεγχος των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%, με διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκαν 4 ζώνες μήκους 206, 236, και 295 και 318 bp (από κάτω προς τα πάνω), οι οποίες αντιστοιχούν στα τμήματα των 4 πολλαπλασιασμένων εξονίων (εικόνα 14).

5. Υβριδισμός

Η υβριδοποίηση που ακολουθεί, βασίζεται στην τεχνική του ανάστροφου υβριδισμού (reverse hybridization). Σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό μορφή ταινίας, έχουν σταθεροποιηθεί μη σημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές (probes) ενώ το DNA-στόχος που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα είναι σημασμένο (στην προκειμένη περίπτωση βιοτινυλιωμένο). Η δέσμευση του σημασμένου DNA στον ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή πάνω στην μεμβράνη, υποδηλώνει ότι το υπό μελέτη DNA-στόχος φέρει τη συγκεκριμένη συμπληρωματική αλληλουχία. Το διμερές ιχνηθέτης-DNA στόχος

παραμένει σταθερό, μόνον εφόσον η συμπληρωματικότητα των βάσεων είναι τέλεια.

Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR υβριδοποιούνται σε μεμβράνη που περιλαμβάνει 12 μεταλλαγμένους και 10 αγρίου τύπου ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, ακινητοποιημένους σαν παράλληλες γραμμές (εικόνα 15). Αρχικά, σε κάθε πηγαδάκι αναμιγνύονται 10 μl προϊόντων της PCR με 10 μl DNAT για την αποδιάταξη του DNA. Αφού προηγηθούν 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται ένα ml διαλύματος υβριδισμού (Hybridization solution) στο οποίο εισάγεται και η μεμβράνη υβριδισμού. Ακολουθεί επώαση για 30 min, αυστηρά στους 45° C, σε υδατόλουτρο με κινούμενη πλατφόρμα. Επώαση σε χαμηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ υψηλότερες θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα ασθενές σήμα.

6. Αυστηρά ξεπλύματα

Ακολουθούν τρία πλυσίματα με 1 ml Wash Solution A, το πρώτο για 10 sec και τα επόμενα για 15 min, στους 45° C στο υδατόλουτρο με την κινούμενη πλατφόρμα. Με αυτή τη διαδικασία διευκολύνεται η απομάκρυνση της περίσσειας του προϊόντος υβριδισμού.

7. Ανάπτυξη χρώματος και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Οι δεσμευμένες βιοτινυλιωμένες αλληλουχίες ανιχνεύονται με την αξιοποίηση του συστήματος στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης που προαναφέρθηκε και χρωματικών υποστρωμάτων.

Στο πηγαδάκι με τη μεμβράνη στην οποία έχει προηγηθεί ο υβριδισμός του δείγματος, προστίθεται 1 ml, Conjugation Solution, που περιλαμβάνει τη στρεπταβιδίνη και το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Στην συνέχεια, επώαση για 15-20 min σε rocker η orbital shaker, οδηγεί σε δέσμευση του μορίου συγγενείας με τη βιοτίνη και την αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθούν ένα ξέπλυμα για 10 δευτερόλεπτα και δύο πεντάλεπτα πλυσίματα με 1ml Wash Solution B σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα για την απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων της υβριδοποίησης. Τέλος, προστίθεται 1ml από το

διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (Color development), το οποίο αφορά φωτοευαίσθητη χρωστική και το δείγμα επωάζεται υπό συνθήκες έλλειψης φωτός για 20-25 λεπτά ξανά σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα. Οι ζώνες που αντιστοιχούν σε θετική ενζυμική-χρωματική αντίδραση είναι πορφυρές και διακρίνονται εύκολα από τις άχρωμες αρνητικές ζώνες.

Η τεχνική επιτρέπει τη διάκριση ανάμεσα σε ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες (πίνακας 3). Θετική αντίδραση (δηλαδή ζώνη με πορφυρό χρώμα) σε περιοχή που αντιστοιχεί σε μεταλλαγμένο ανιχνευτή (probe), με απουσία χρωματικής αντίδρασης στον αντίστοιχο αγρίου τύπου, ερμηνεύεται ως ομόζυγη κατάσταση. Παρουσία θετικής αντίδρασης τόσο σε ζώνη μεταλλαγμένου ιχνηθέτη όσο και στον αντίστοιχο αγρίου τύπου, ερμηνεύεται ως ετερόζυγη κατάσταση. Διπλά ετεροζυγώτες φέρουν 4 θετικά χρωματισμένες ζώνες, δύο που αφορούν μεταλλαγμένους ανιχνευτές και δύο στους αντίστοιχους αγρίου τύπου. Η απουσία θετικής αντίδρασης στις 12 σειρές μεταλλαγμένων ανιχνευτών, με θετικές ζώνες μόνο στις αγρίου τύπου, χαρακτηρίζει δείγματα φυσιολογικά, δηλαδή χωρίς μεταλλάξεις (εικόνα 16).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 34 ασθενείς κρητικής καταγωγής με συμπτώματα κληρονομούμενων υποτροπιάζόντων πυρετών που συμμετείχαν στη μελέτη, 15 έφεραν 2 μεταλλαγές, 14 έφεραν μια μόνο μεταλλαγή και 5 απολύτως καμία μεταλλαγή. Από τους ασθενείς που έφεραν 2 μεταλλαγές, οι 5 ήταν ομοζυγώτες, όλοι για τη μεταλλαγή M694V, και οι 10 ήταν σύνθετοι ετεροζυγώτες.

Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 7 μεταλλαγές, οι ακόλουθες κατά σειρά συχνότητας: M694V, E148Q, M694I, V726A, F479L, K695R και A744S. Το φάσμα των μεταλλαγών αυτών περιγράφεται στο ιστόγραμμα της εικόνας 17.

Οι γονότυποι που διαπιστώθηκαν στο γενετικό τόπο του MEFV γονιδίου, στον κρητικό πληθυσμό ήταν οι M694V/M694V, M694I/E148Q, M694V/V726A, M694V/wt, F479L/wt, E148Q/wt, K695R/wt, A744S/wt και wt/wt. Ο πίνακας 4 είναι ενδεικτικός της συχνότητας των παραπάνω γονοτύπων επί του συνόλου των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη.

Εξετάζοντας τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μεταλλαγές στο γονίδιο MEFV, διαπιστώθηκε μια μικρή υπεροχή των ανδρών έναντι των γυναικών, με την πλειοψηφία των ασθενών να διανύουν την τρίτη δεκαετία της ζωής τους και εμφάνιση του πρώτου επεισοδίου σε μικρή ηλικία. Όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν, συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις φαίνεται να αποτελούν ο πυρετός και το κοιλιακό άλγος ενώ δεν είναι σπάνιες και οι εκδηλώσεις από τις αρθρώσεις. Λιγότερο συχνές είναι η θωρακική προσβολή και το δερματικό εξάνθημα (ως επί το πλείστον ερυσιπελοειδές) ενώ κανένας ασθενής δεν παρουσίασε πυρετό ως μοναδικό σύμπτωμα. Οι περισσότεροι ασθενείς είχαν καλή ανταπόκριση στην κολχικίνη. Τέσσερις ασθενείς (2 με το γονότυπο M694V/V726A, ένας με το γονότυπο E148Q/wt και μια ετεροζυγώτης για τη M694V) παρουσίασαν φτωχή ανταπόκριση ενώ 3 δε συμμορφώθηκαν με την θεραπεία (πίνακας 5).

Από τους 17 ασθενείς που παρουσίαζαν κλινικές εκδηλώσεις από τις αρθρώσεις, δύο (M694V/M694V, M694V/726A) εμφάνισαν συμμετρική αρθρίτιδα μικρών αρθρώσεων άκρων χειρών και τρεις ιερολαγονίτιδα και προσβολή της σπονδυλικής στήλης (2 ασθενείς με

γονότυπο M694V/wt και ένας με M694V/V726A). Όλοι έφεραν τουλάχιστον ένα αντίγραφο του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου M694V. Ομοίως, τρεις ασθενείς με τουλάχιστον ένα αντίγραφο M694V, εκδήλωσαν ερυσιπελοειδές δερματικό εξάνθημα (και γονότυπους M694V/V726A, M694V/M694V και M694V/wt, αντίστοιχα). Δύο άλλοι ασθενείς (A7445/wt και M694V/wt) είχαν συνοδό σοβαρή ψωριασική αρθρίτιδα από το ατομικό αναμνηστικό τους.

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η συχνότερη μεταλλαγή που διαπιστώθηκε στον υπό μελέτη πληθυσμό ήταν η M694V. Ωστόσο, ασθενείς με πανομοιότυπο γονότυπο (και συγκεκριμένα τον M694V/wt) εμφάνισαν διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις με κάποιους να παρουσιάζουν μόνο πυρετό και κοιλιακό άλγος και άλλους να παρουσιάζουν επιπλέον θωρακική προσβολή και εκδηλώσεις από τις αρθρώσεις ή δερματικό εξάνθημα. Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο φαινότυπο μεταξύ M694V ομόζυγης κατάστασης και M694V ετεροζυγωτίας.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε συσχέτιση του E148Q/wt γονοτύπου με σοβαρή κοιλιακή, θωρακική και αρθριτική προσβολή ενώ ο σπάνιος γονότυπος A7445/wt συσχετίστηκε με άτυπη μάλλον κλινική εικόνα (πυρετός και αρθρίτιδα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Δειγματοληψία και επιλογή ασθενών

Η συλλογή των ασθενών και η ένταξή τους στη μελέτη ήταν δυσχερής λόγω τόσο της σπανιότητας του νοσήματος όσο και της δυσκολίας αναγνώρισής του και τεκμηρίωσης της σωστής διάγνωσης. Μέχρι σήμερα, η διάγνωση αποτελούσε διάγνωση από αποκλεισμό, στηριζόμενη στην εκτίμηση των ιδιαίτερων κλινικών χαρακτηριστικών της νόσου, σε συνδυασμό με την ικανοποιητική ανταπόκριση στην κολχικίνη και υπό την προϋπόθεση ότι έχουν αποκλειστεί λοιμώξεις, αυτοάνοσες παθήσεις και κακοήθειες. Η συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας και του γενετικού ελέγχου για την τεκμηρίωση της ορθής διάγνωσης του οικογενούς μεσογειακού πυρετού, μόλις πρόσφατα τείνει να καθιερωθεί.

Ωστόσο, παρά τις δυσκολίες στη διαμόρφωση ικανοποιητικού δείγματος ασθενών, η επιλογή της νήσου Κρήτης για τη μελέτη της νόσου παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα. Πέρα από την ευνοϊκή γεωγραφική της θέση που την τοποθετεί στη Μεσόγειο θάλασσα, περιοχή με αυξημένο επιπολασμό του οικογενούς μεσογειακού πυρετού, ο κρητικός πληθυσμός εμφανίζει κάποια ιδιαίτερα, «προνομιακά» για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, χαρακτηριστικά. Πρόκειται για σχετικά μικρό (600.000 περίπου κάτοικοι σύμφωνα με δεδομένα της απογραφής του 2001) πληθυσμό, με κοινό γενετικό, περιβαλλοντικό και πολιτιστικό υπόβαθρο, χαρακτηριζόμενο από χαμηλή μεταναστευτικότητα και στενούς οικογενειακούς δεσμούς. Έτσι, η γενετικά απομονωμένη και ομοιογενής αυτή πληθυσμιακή ομάδα, με το σχετικά υψηλό προσδόκιμο επιβίωσης, αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για τη μελέτη γενετικών ασθενειών.

2. Γενετικός έλεγχος και οικογενής μεσογειακός πυρετός

Η κλωνοποίηση του γονιδίου MEFV επέτρεψε την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για την γενετική διάγνωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού. Ωστόσο, το μεγάλο μέγεθος του γονιδίου και η

αδυναμία ελέγχου όλων των γνωστών μεταλλαγών λόγω μεγάλου αριθμού (ο αριθμός αυτών ανέρχεται στις 98), αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες στην χρήση αυτών στα πλαίσια διαγνωστικού ελέγχου ρουτίνας. Με άλλα λόγια, η «σάρωση» ολόκληρου του γονιδίου με αλληλούχιση καθίσταται πρακτικά αδύνατη και κάθε μεμονωμένη τεχνική επιτρέπει την αναζήτηση περιορισμένου αριθμού μεταλλαγών.

Η γενετική διάγνωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού τεκμηριώνεται με την ανεύρεση δύο μεταλλαγών του γονιδίου MEFV σε ασθενείς με κλινική υποψία για τη νόσο². Σε κάθε άλλη περίπτωση (μία μόνο μεταλλαγή ή αρνητικός γενετικός έλεγχος) η διάγνωση είναι αμφίβολη και το ενδεχόμενο παρουσίας της νόσου δεν δύναται να αποκλειστεί. Τότε καθίσταται επιτακτική η συνεκτίμηση του γονιδιακού αποτελέσματος με την κλινική εικόνα του εξεταζόμενου.

Στην πράξη, ο γενετικός έλεγχος δεν εφαρμόζεται σε ασθενείς με τυπικές κλινικές εκδηλώσεις οικογενούς μεσογειακού πυρετού που προέρχονται από «υψηλού κινδύνου» πληθυσμούς αλλά περιορίζεται σε άτυπες περιπτώσεις ή εκεί που απουσιάζει η κλινική εμπειρία¹. Προς την κατεύθυνση αυτή, έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί διάφορες μοριακές στρατηγικές μεταξύ των οποίων η ARMS^{25,29}, η NIRCA²⁶ και η FMF-STRIP Assay (Viennalab).

Η τεχνική ARMS (Amplification Refractory Mutation System) συνίσταται σε δύο συμπληρωματικές PCR αντιδράσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας το ίδιο υπόστρωμα DNA. Ωστόσο, η μια εξ' αυτών, αξιοποιεί εκκινητή (primer) ειδικό για τη φυσιολογική αλληλουχία DNA και ως εκ τούτου δεν πολλαπλασιάζει DNA μεταλλαγμένο σε δεδομένο γενετικό τόπο ενώ η δεύτερη αξιοποιεί έναν ειδικό για την μεταλλαγή εκκινητή και δεν δύναται να πολλαπλασιάσει φυσιολογικό DNA. Ο δεύτερος εκκινητής είναι κοινός και για τις δύο αντιδράσεις. Η ανίχνευση προϊόντων PCR και στις δύο αντιδράσεις υποδηλώνει ετεροζυγωτία ενώ η απουσία προϊόντων από τη μια αντίδραση είναι ενδεικτική ομοζυγωτίας αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένου DNA. Πρόκειται για απλή, ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο η οποία επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση απλοτύπων με μεταλλαγές που αφορούν αλλαγές μιας βάσης ή μικρές ελλείψεις²⁹. Η NIRCA (Non-isotopic RNase cleavage assay), βασίζεται στην ικανότητα της ριβονουκλεάσης (RNase) να διακόπτει και τις δύο αλυσίδες διμερών RNA-στόχων σε θέσεις όπου ένα ζεύγος βάσεων έχει δημιουργηθεί χωρίς να υφίσταται η προυπόθεση της

συμπληρωματικότητας των νουκλεοτιδίων που το συγκροτούν (κατάργηση συμπληρωματικότητας των βάσεων)³⁰ και επιτρέπει την ανίχνευση ετερόζυγης κατάστασης μεταλλαγών οικογενούς μεσογειακού πυρετού²⁶. Πρόκειται για ταχεία, χαμηλού, κόστους τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλαγών ή ελλείψεων και μπορεί να εφαρμοστεί και σε μη πολλαπλασιασμένο γενωμικό DNA.

3. FMF – STRIP Assay και οικογενής μεσογειακός πυρετός

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική FMF-STRIP Assay (Viennalab) και, όπως ήδη έχει περιγραφεί, βασίζεται στη μέθοδο του ανάστροφου υβριδισμού. Η επιλογή της στηρίχθηκε τόσο στις ιδιαιτερότητες του ελληνικού πληθυσμού όσο και στα πλεονεκτήματά της έναντι άλλων τεχνικών.

Ο Ελληνικός πληθυσμός δεν ανήκει στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση οικογενούς μεσογειακού πυρετού. Ως εκ τούτου είναι πιθανή η παρουσία μεμονωμένων σπάνιων μεταλλαγών, διαφορετικών από τις πέντε συχνότερα ανευρισκόμενες στους «υψηλού κινδύνου» πληθυσμούς²⁴. Η FMF-STRIP Assay τεχνική παρέχει την δυνατότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης 12 μεταλλαγών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και επτά, λιγότερο συχνά απαντώμενες μεταλλαγές. Πρόκειται για αξιόπιστη τεχνική εύκολα πραγματοποιήσιμη, που εξασφαλίζει οικονομία χρόνου, της οποίας η ειδικότητα, η ευαισθησία και οι συνθήκες εφαρμογής έχουν επιβεβαιωθεί με ποικίλες μεθόδους αναφοράς³¹. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από το συγκριτικό έλεγχο των 12 μελετούμενων μεταλλαγών με ανάστροφη υβριδοποίηση και «Fluorescent cycle» αλληλούχιση ήταν σε απόλυτη συμφωνία μεταξύ τους³². Τα πλεονεκτήματα που παρέχει η FMF-STRIP Assay συγκριτικά με τις προαναφερθείσες ARMS και NIRCA μεθοδολογίες, είναι η δυνατότητα της ταυτόχρονης αναζήτησης μεγάλου αριθμού μεταλλαγών σε σύντομο χρονικό διάστημα, η εξασφάλιση ορατού με γυμνό οφθαλμό αποτελέσματος, και η διάκριση της ετερόζυγης από την ομόζυγη κατάσταση κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

4. Ανάλυση των αποτελεσμάτων του γενετικού ελέγχου στον κρητικό πληθυσμό

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται, σε σημαντικό βαθμό, σε συμφωνία με αντίστοιχες ερευνητικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στους Άραβες³³. Συγκεκριμένα, οι συχνότερες μεταλλαγές που διαπιστώθηκαν, τόσο στον αραβικό πληθυσμό όσο και στον υπό μελέτη δείγμα ήταν οι M694V, V726A, M694I και E148Q, με διαφορετική ωστόσο κατανομή συχνοτήτων.

Η αναζήτηση μεταλλαγών και ο υπολογισμός των συχνοτήτων τους στους ασθενείς που επελέγησαν, επιβεβαίωσε τα ευρήματα παρόμοιων ερευνητικών προσπαθειών που έχουν λάβει χώρα στον Ελλαδικό χώρο^{25,26} και επαλήθευσε την υπόθεση περί ύπαρξης (και ανίχνευσης) σπάνιων μεταλλαγών σε πληθυσμούς μη υψηλού κινδύνου για οικογενή μεσογειακό πυρετό²⁴. Οι σπάνιες μεταλλαγές που διαπιστώθηκαν (F479, K695R, A744S) φάνηκε να σχετίζονται με λιγότερο τυπικές κλινικές εκδηλώσεις, ωστόσο η αξία τους επιβάλλεται να συνυπολογιστεί με την συχνότητά τους στο γενικό πληθυσμό²⁷. Ο σύνθετος γονότυπος M694I/E148Q ο οποίος ανευρίσκεται σε υψηλή σχετικά συχνότητα, ενδεχομένως αποτελεί «απλότυπο κινδύνου» (risk- haplotype) για την εκδήλωση της νόσου στον κρητικό πληθυσμό.

Ως διεισδυτικότητα ενός χαρακτήρα για ένα δεδομένο γονότυπο, ορίζεται η πιθανότητα εμφάνισης του χαρακτήρα αυτού στο άτομο που φέρει το γονότυπο. Από την άλλη πλευρά, η φύση και η βαρύτητα του φαινοτύπου ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου αντανακλούν την εκφραστικότητα αυτού. Με βάση τα παραπάνω η συχνότερα απαντώμενη μεταλλαγή M694V χαρακτηρίζεται ως η πιο διεισδυτική στον υπό μελέτη πληθυσμό, τόσο γιατί ευθύνεται για πλειάδα κλινικών εκδηλώσεων και μάλιστα τις περισσότερες περιπτώσεις στον ίδιο ασθενή (πυρετός, κοιλιακό, άλγος, αρθρίτιδα, ευρισιπελοειδές εξάνθημα) όσο και γιατί η παρουσία ενός και μόνο μεταλλαγμένου αλληλομόρφου αρκεί για την έκφραση του φαινοτύπου (ετεροζυγώτες εμφανίζουν τυπική κλινική εικόνα οικογενούς μεσογειακού πυρετού). Επιπλέον, η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου M694V στο γονότυπο ασθενών, σε συνδυασμό ή όχι με άλλα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα όπως το V726A, προσδίδει ανθεκτικότητα στη χορηγούμενη θεραπεία, δηλαδή την κολχικίνη. Η V726A, ήπια από

την φύση της μεταλλαγή, οδηγεί σε σοβαρό φαινότυπο όταν συνδυάζεται με την M694V, πιθανά λόγω αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στο πρωτεϊνικό μόριο της πυρίνης και αλλαγής της διαμόρφωσης αυτού στο χώρο.

Σε ένα αυτοσωματικά υπολειπόμενο νόσημα όπως είναι ο οικογενής μεσογειακός πυρετός, η εκδήλωση φαινοτύπου παρουσία ενός μόνο μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (δηλαδή σε ετερόζυγη κατάσταση), επιδέχεται διάφορες ερμηνείες. Πέρα από την υψηλή διεισδυτικότητα (όπως συμβαίνει με την περίπτωση της M694V μεταλλαγής), το φαινόμενο θα μπορούσε να αιτιολογηθεί από την παρουσία δεύτερης άγνωστης έως σήμερα ή μη ανιχνεύσιμης από την FMF STRIP Assay μεταλλαγής, μεταλλαγής σε ιντρόνια και ρυθμιστικές περιοχές ή την ανάπτυξη αρνητικά κυρίαρχης (dominant negative) μεταλλαγής. Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν αλλά γονίδια που αλληλεπιδρούν με το γονίδιο MEFV, γειτονικοί τροποποιητικοί γενετικοί τόποι (modifier genes) ή επιγενετικοί παράγοντες.

Το γεγονός ότι βρέθηκαν άτομα με οικογενή μεσογειακό πυρετό, τα οποία για τις υπό μελέτη μεταλλαγές είχαν γονότυπο wt/wt, δεν πρέπει να μας εκπλήττει. Σε πρόσφατη μελέτη³⁶ σε πληθυσμό με FMF στην Τουρκία, βρέθηκε ότι σε σύνολο 1653 μελετηθέντων ατόμων, οι 993 είχαν τουλάχιστο μία μεταλλαγή στο γονίδιο MEFV (ποσοστό 56,5%) ενώ στους υπόλοιπους 720 ασθενείς δεν ανευρέθη καμία μεταλλαγή (ποσοστό 43,5%). Παρά το γεγονός ότι δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός ο τύπος των μεταλλαγών που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, δεν παύει να είναι εντυπωσιακός ο μεγάλος αριθμός wt/wt FMF ασθενών που αποκαλύφθηκε. Και σε αυτή την περίπτωση μπορεί να πιθανολογηθεί η παρουσία άγνωστης ή μη ανιχνεύσιμης μεταλλαγής και η επίδραση άλλων γονιδίων και επιγενετικών παραγόντων.

Όσον αφορά την E148Q μεταλλαγή, αυτή αν και σε ετερόζυγη μορφή οδήγησε σε νόσο ανθεκτική στη χορήγηση κολχικίνης, δεδομένο που επιβεβαιώνει πρόσφατες ερευνητικές προσπάθειες που τη θεωρούν ως γνήσια μεταλλαγή³⁴ και όχι καλοήγη πολυμορφισμό³⁵. Ωστόσο, ένας τέτοιος χαρακτηρισμός χρήζει περαιτέρω τεκμηρίωση μέσα από μεγαλύτερο αριθμό ασθενών φορέων του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.

Τέλος, εύκολα διαπιστώνεται η συσχέτιση μεταλλαγών του γονιδίου MEFV με ιερολαγονίτιδα, στα πλαίσια ψωριασικής

αρθρίτιδας ή αγκυλοποιητικής σπονδυλοαρθροπάθειας καθώς και με συμμετρική αρθρίτιδα μικρών αρθρώσεων του τύπου της ρευματοειδούς. Οι κλινικές αυτές εκδηλώσεις φαίνεται να αποτελούν εκδηλώσεις στα πλαίσια του οικογενούς μεσογειακού πυρετού ή συνυπάρχουσες ανεξάρτητες φλεγμονώδεις οντότητες, όπου το γονίδιο MEFV κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής και της φυσικής ανοσίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός, αποτελεί διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα για πολλές ιατρικές ειδικότητες και αρκετά συχνά, λόγω έλλειψης εμπειρίας ή χαμηλής υποψίας, υποδιαγιγνώσκεται. Η παρούσα ερευνητική εργασία, επέτρεψε μέσω του γενετικού ελέγχου την καταγραφή του είδους και της συχνότητας μεταλλαγών του γονιδίου MEFV σε ένα γενετικά ομοιογενή πληθυσμό, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με γονοτυπικές-φαινοτυπικές συσχετίσεις και οδηγώντας στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την βαρύτητα της κλινικής εικόνας, την πρόγνωση και την ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία.

Από τα παραπάνω, καθίσταται αναγκαία η εφαρμογή του γονιδιακού ελέγχου στην διάγνωση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού. Η καθιέρωση προγεννητικού, νεογνικού ή ελέγχου φορείας της νόσου σε ασυμπτωματικά άτομα στα πλαίσια ρουτίνας, δεν είναι πρακτική και η γενετική διάγνωση από μόνη της δεν αποτελεί πανάκεια. Εντούτοις, καθιστάται επιτακτική σε άτυπες περιπτώσεις και όταν υπάρχει η κλινική υποψία ή απουσιάζει η κλινική εμπειρία. Με αυτόν τον τρόπο, θα αποφευχθεί η υποδιάγνωση του νοσήματος, θα μειωθεί η άσκοπη ταλαιπωρία των ασθενών από διαδοχικές νοσηλείες και άσκοπες χειρουργικές επεμβάσεις και με την έγκαιρη χορήγηση θεραπείας θα βελτιωθεί η ποιότητα ζωής τους και θα παραταθεί η επιβίωση μέσα από την πρόληψη της αμυλοείδωσης.

Βιβλιογραφία

- 1. D.Kastner. The hereditary periodic fevers. *Rheu-158 (1717-1734)* 29/4/2003**
- 2. Grateau G. Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Apr;43(4):410-5.**
- 3. Drenth J and Van der Meer J. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345(24)1748-1757**
- 4. Tunca M, Kirkali G, Soy Turk M et al. Acute phase response and evolution of familial Mediterranean fever. *Lancet*. 1999 Apr 24;353(9162):1415.**
- 5. Melikoglu M, Ozdogan H, Korkmaz C et al. A survey of phenotype II in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2000 Nov;59(11):910-3.**
- 6. Kogan A, Shinar Y, Lidar M et al. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet*. 2001 Aug 15;102(3):272-6.**
- 7. Livneh A, Langevitz P, Zemer D et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum*. 1997 Oct;40(10):1879-85.**

8. Zemer D, Revach M, Pras M et al. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. **N Engl J Med. 1974 Oct 31;291(18):932-4.**
9. Zemer D, Pras M, Sohar E et al. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. **N Engl J Med. 1986 Apr 17;314(16):1001-5.**
10. Tunca M, Akar S, Soy Turk M et al. The effect of interferon alpha administration on acute attacks of familial Mediterranean fever: A double-blind, placebo-controlled trial. **Clin Exp Rheumatol. 2004 Jul-Aug;22(4 Suppl 34):S37-40.**
11. Calguneri M, Apras O, Ozbalkan Z et al. The efficacy of continuous interferon alpha administration as an adjunctive agent to colchicine-resistant familial Mediterranean fever patients. **Clin Exp Rheumatol. 2004 Jul-Aug;22(4 Suppl 34):S41-4.**
12. Cercuaglia C, Diaco M, Nucera G et al. Pharmacological and clinical basis of treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with colchicine or analogues: an update. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005 Feb;4(1):117-24. Review.**
13. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L et al. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. **N Engl J Med. 1992 Jun 4;326(23):1509-13.**
14. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. **Cell. 1997 Aug 22;90(4):797-807.**

15. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. **Nat Genet.** 1997 Sep;17(1):25-31.
16. Centola M, Wood G, Frucht DM et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. **Blood.** 2000 May 15;95(10):3223-31.
17. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E et al. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. **Blood.** 2000 Jul 15;96(2):727-31.
18. Diaz A, Hu C, Kastner DL et al. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. **Arthritis Rheum.** 2004 Nov;50(11):3679-89.
19. Hull KM, Shoham N, Chae J et al. The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. **Curr Opin Rheumatol.** 2003 Jan;15(1):61-9. **Review.**
20. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2003 Feb;4(2):95-104. **Review.**
21. Chae J, Komarow H, Cheng J et al. Targeted disruption of pyrin the familial Mediterranean fever protein, causes heightened

- sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis.**Mol Cell** 2003;**11**:591-604.
- 22.Booth D, Gillmore J, Lachmann H et al. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever.**QJM**. 2000 Apr;**93**(4):217-21.
- 23.Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations.**Eur J Hum Genet**. 2001 Jul;**9**(7):473-83. Review.
- 24.Touitou I. Diagnostic value of MEFV gene analysis in familial Mediterranean fever must still be assessed in non-classically affected populations: comment on the article by Cazeneuve et al.**Arthritis Rheum**. 2004 Apr;**50**(4):1354-5; author reply 1355-6.
- 25.Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas K et al. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece.**Ann Rheum Dis**. 2003 May;**62**(5):479-81.
- 26.Ritis K, Giaglis S, Spathari A et al. Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients.**Ann Rheum Dis**. 2004 Apr;**63**(4):438-43.
- 27.Deltas K, Mean R, Rossou E et al. Familial Mediterranean fever (FMF) mutations occur frequently in the Greek-Cypriot population of Cyprus.**Genet Test**. 2002 Spring;**6**(1):15-21.
- 28.Grateau G, Pecheux C, Cazeneuve C et al. Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever.**QJM**. 2000 Apr;**93**(4):223-9.

29. Eisenberg S, Akaentijevich I, Deng Z et al. Diagnosis of familial mediterranean fever by a molecular genetics method. **Ann Rheum Dis.** 1998 Oct;129(7):539-542
30. Goldrick M, Kimball G, Liu Q et al. NIRCA: a rapid robust method for screening for unknown point mutations. **Biotechniques.** 1996 Jul;21(1):106-12.
31. Tchernitchko D, Legendre M, Delahaye A et al. Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve MEFV gene mutations. **Clin Chem.** 2003 Nov;49(11):1942-5.
32. Delague V, Kriegshauser G, Oberkanis C et al. Reverse hybridization vs. DNA sequencing in the molecular diagnosis of Familial Mediterranean fever. **Genet Test.** 2004 Spring;8(1):65-8.
33. Majeed H, El-Khateeb M, El-Shanti H et al. The spectrum of familial Mediterranean fever gene mutations in Arabs: report of a large series. **Semin Arthritis Rheum.** 2005 Jun;34(6):813-8.
34. Topaloglu R, Ozaltin F, Yilmaz E et al. E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. **Ann Rheum Dis.** 2005 May;64(5):750-2
35. Tchernitchko D, Legendre M, Delahaye A et al. The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of familial Mediterranean fever. **Hum Mutat.** 2003 Oct;22(4):339-40.
36. Berdeli A, Mir S, Ozalkaya E et al. MEFV gene mutation distribution in EGE region of Turke: one single center experience. **Abstracts of 4th International Congress on Systemic**

**Autoinflammatory Diseases 2005, November 6-10, Bethesda,
Maryland, USA.**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΠΙΝΑΚΕΣ

2. ΕΙΚΟΝΕΣ

	FMF	TRAPS	HIDS	MWS	FCAS
No OMIM	249100	142680	260920	191100	120100
Κληρονομικότητα	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Αυτοσωμική επικρατής	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	Αυτοσωμική επικρατής	Αυτοσωμική επικρατής
Γονίδιο-χρωμόσωμα	MEFV 16p13.3	TNFRSF1A 12p13	MVK 12q24	CIAS1 1q44	CIAS1 1q44
Πρωτεΐνη	Πυρίνη	55kD TNFa υποδοχέας	Μεβαλονική κινάση	Κρυσταλλίνη	Κρυσταλλίνη
Διάρκεια προσβολής	1-3 ημέρες	> 7 ημέρες	3-7 ημέρες	1-2 ημέρες	30 λεπτά-72ώρες
Προσβολή οργάνων	Κοιλιακό άλγος, περιτονίτιδα, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα	Κοιλιακό άλγος, περιτονίτιδα, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα	Κοιλιακό άλγος, σπάνια περιτονίτιδα/πλευρίτιδα	Κοιλιακό άλγος, σπάνια πλευρίτιδα	Απούσα
Μυοσκελετικές εκδηλώσεις	Μυαλγία, σοβαρή εμπύρετος μυαλγία, μονοαρθρίτιδα, ολιγοαρθρίτιδα, ιερολαγονίτιδα	Μεταναστευτική μυαλγία, αρθραλγία, μονοαρθρίτιδα	Σπάνια μυαλγία, συχνά συμμετρική πολυαρθρίτιδα	Μυαλγία, ολιγοαρθρίτιδα, προσβολή μεγάλων αρθρώσεων	Πολυαρθραλγία, Μυαλγία
Δερματικές εκδηλώσεις	Ερυσιπελοειδές ερύθημα, πορφύρα H.Schonlein	Μεταναστευτικό ερύθημα συνοδό της μυαλγίας	Κηλιδοβλατιδώδες, αφθώδη έλκη	Κνιδωτικό	Κνιδωτικό
Λεμφαδενοπάθεια	Σπάνια	Ενίοτε	Τραχηλική	Μερικές φορές	Απούσα
Νευροαισθητήριες διαταραχές	Σπάνια άσηπτη μηνιγγίτιδα	Επιπεφυκίτιδα, ραγοειδίτιδα	Σπάνιες	Κώφωση, επιπεφυκίτιδα	Κεφαλαλγία, Επιπεφυκίτιδα
Κίνδυνος αμυλοείδωσης	Συσχέτιση με γονότυπο	~14%	Δεν έχει περιγραφεί	~25%	Σπάνια~2%
Θεραπεία	Κολχικίνη	Πρεδνιζόνη, Etanercept	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη	Κολχικίνη, στεροειδή	Μη στεροειδή, στεροειδή

Πίνακας 1. Κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί (RHEU 2003;158:1718)

ΜΕΙΖΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

ΤΥΠΙΚΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

1. Περιτονίτιδα
2. Πλευρίτιδα (ετερόπλευρη) ή περικαρδίτιδα
3. Μονοαρθρίτιδα (ισχίο, γόνατο, ποδοκνημική)
4. Μόνο πυρετός

ΕΛΑΣΣΟΝΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1-3. ΑΤΥΠΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΣΕ ΜΙΑ Ή ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΕΣ ΕΣΤΙΕΣ

1. Κοιλία
2. Θώρακας
3. Αρθρώσεις
4. Άλγος άκρου με την άσκηση
5. Ευνοϊκή ανταπόκριση στην κολχικίνη

ΥΠΟΣΤΗΡΙΚΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

1. Οικογενειακό ιστορικό FMF
2. Εθνικότητα
3. Ηλικία εμφάνισης < 20
- 4-7. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ
4. Σοβαρή, που απαιτεί κατάκλιση
5. Αυτόματη υποχώρηση
6. Ασυμπτωματικά μεσοδιαστήματα
7. Παροδική φλεγμονώδης απάντηση, με παθολογική τιμή σε μία από τις ακόλουθες εργαστηριακές παραμέτρους: λευκά αιμοσφαίρια, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών, αμυλοειδές Α ορού, ινωδογόνο.
8. Επεισοδιακή αιματοουρία/πρωτεινουρία
9. Άσκοπη λαπαροτομή ή σκωληκοειδεκτομή
10. Συγγένεια γονέων

Απαιτούνται:

- A) Ένα ή περισσότερα μείζονα κριτήρια
- B) Δύο ελάσσονα
- Γ) Ένα έλασσον και πέντε ή περισσότερα υποστηρικτικά
- Δ) Ένα έλασσον και τέσσερα από τα πέντε πρώτα υποστηρικτικά

**Πίνακας 2. Κριτήρια κατά Livneh για τη διάγνωση του FMF
(Ann Rheum Dis 1997;40(10):1881)**

	Αγρίου τύπου ζώνη (wt)	Μεταλλαγμένη ζώνη (mut)	Γονότυπος
Φυσιολογικός	+	-	wt/wt
Ομοζυγώτης	-	+	wt/mut
Ετεροζυγώτης	+	+	mut/mut

Πίνακας 3. Ερμηνεία γονοτύπου με βάση τη χρωματική αντίδραση που αναπτύσσεται

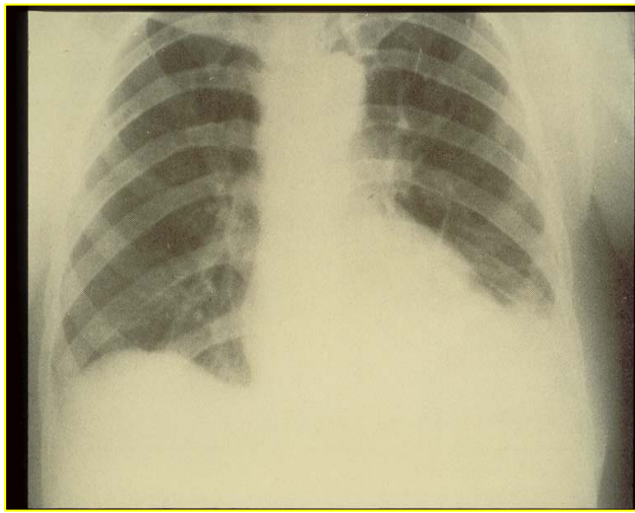
Γονότυπος	Αριθμός (%) ασθενών
M694V / M694V	5 (17)
M694I / E148Q	6 (20)
M694V / E148Q	1 (0.4)
M694V/V726A	3 (10)
M694V / άγριος τύπος	10 (34)
F479L / άγριος τύπος	1 (0.4)
E148Q / άγριος τύπος	1 (0.4)
K695R / άγριος τύπος	1 (0.4)
A744S / άγριος τύπος	1 (0.4)
άγριος τύπος / άγριος τύπος	5 (17)
ΣΥΝΟΛΟ	34 (100)

Πίνακας 4. Γονότυποι στην περιοχή του MEFV γονιδίου σε ασθενείς από την Κρήτη

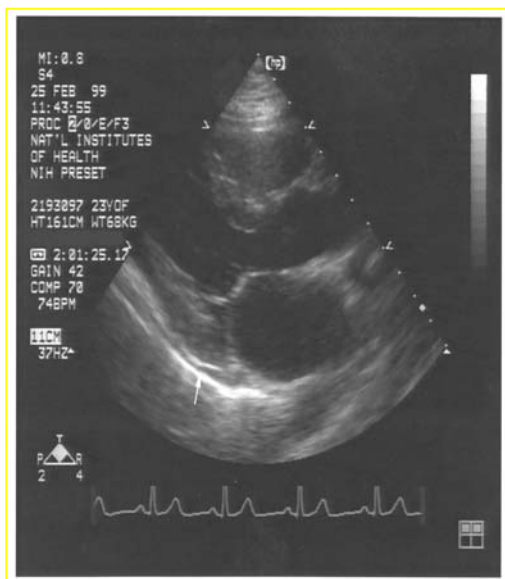
Φύλο	
Άρρεν (%)	16 (55)
Θήλυ (%)	13 (45)
Ηλικία (έτη)	37 ± 18*
Ηλικία έναρξης	19 ± 11
Κλινικές εκδηλώσεις	
πυρετός (%)	27 (93)
κοιλιακό άλγος (%)	27 (93)
θωρακικό άλγος (%)	10 (34)
αρθρίτιδα (%)	17 (59)
εξάνθημα (%)	4 (14)
πυρετός μόνο (%)	0 (0)
Απόκριση στη θεραπεία	
καλή απόκριση	16/23 (70)
φτωχή απόκριση	4/23 (17)
μη συμμόρφωση	3/23 (13)

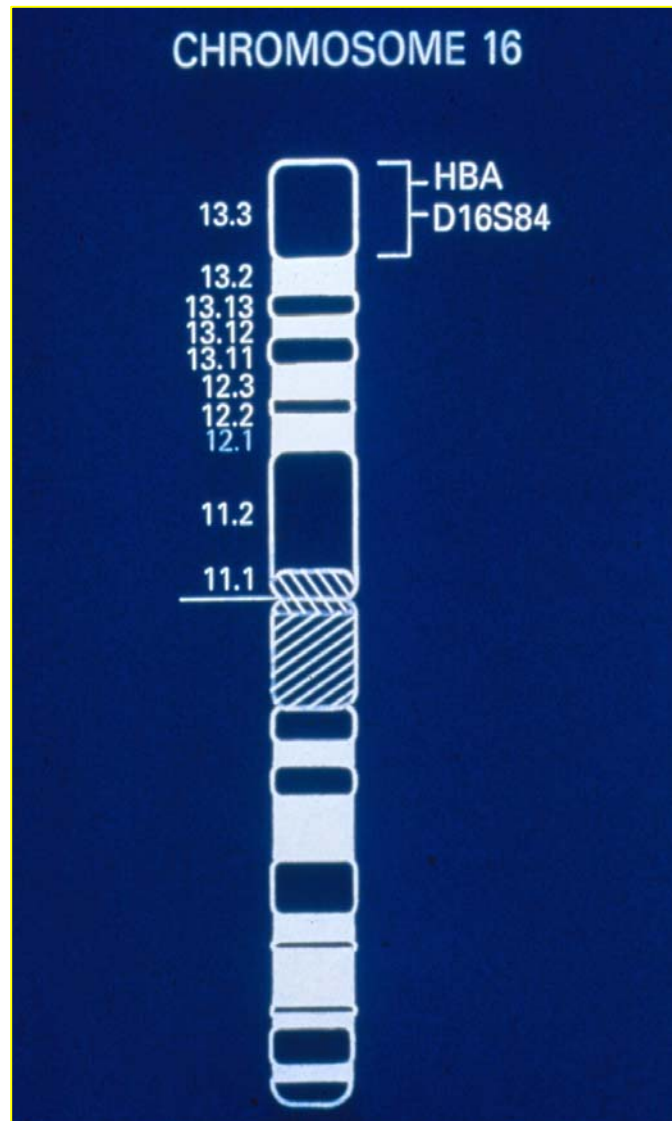
* Μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση.

Πίνακας 5. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών από την Κρήτη



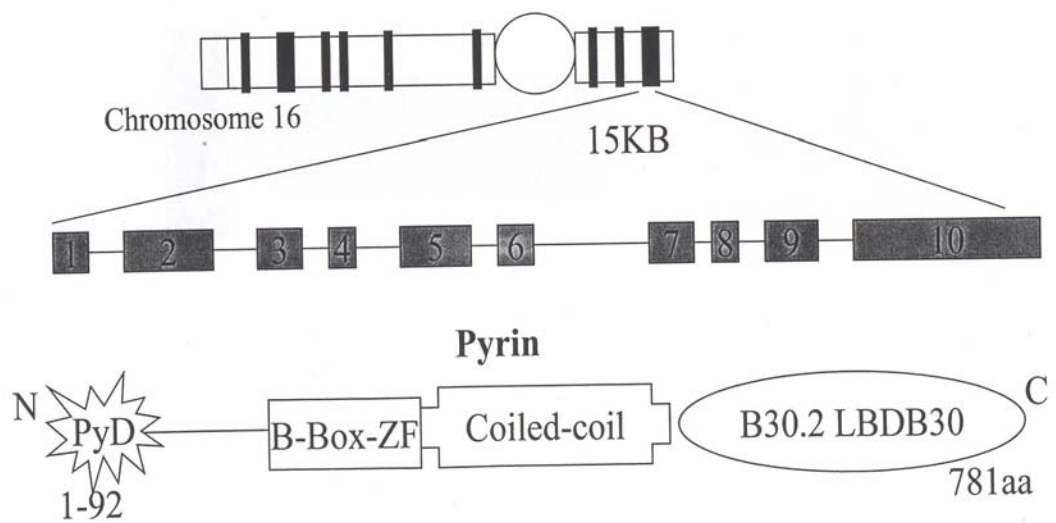
Εικόνα 1.
Κλινικές εκδηλώσεις FMF



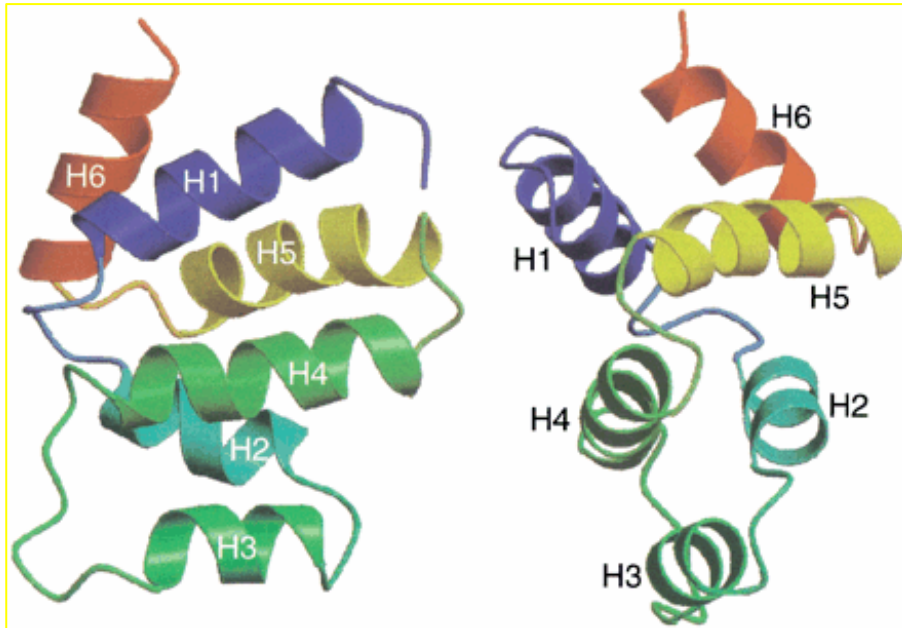


**Εικόνα 2. Εντόπιση του MEFV γονιδίου στο χρωμόσωμα 16
(*N Engl J Med* 1992; 326:1509)**

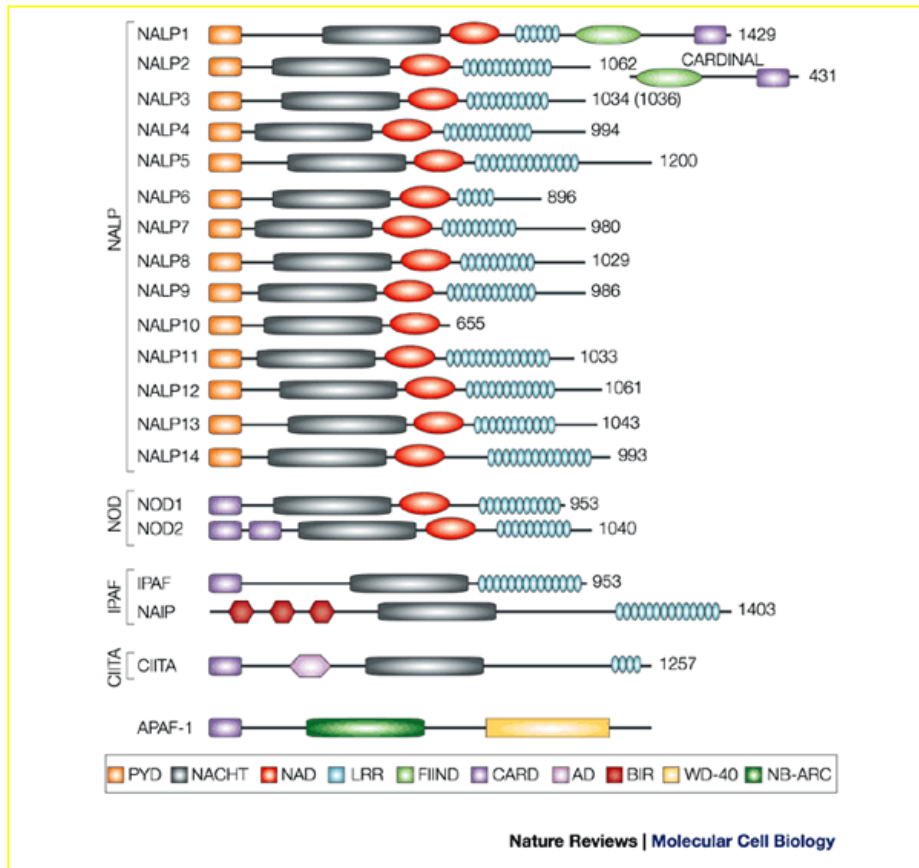
MEFV-gene



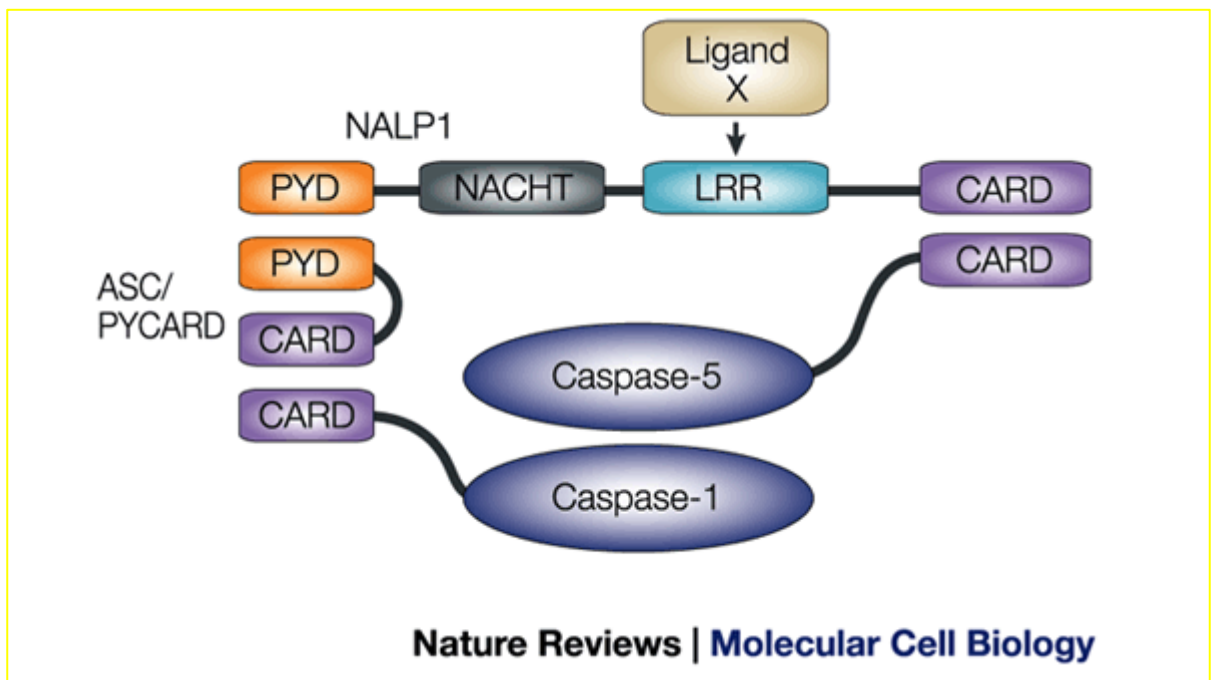
Εικόνα 3. Από το γονίδιο MEFV στην πρωτεΐνη
(*Curr Opin Rheumatol* 2003;15:63)



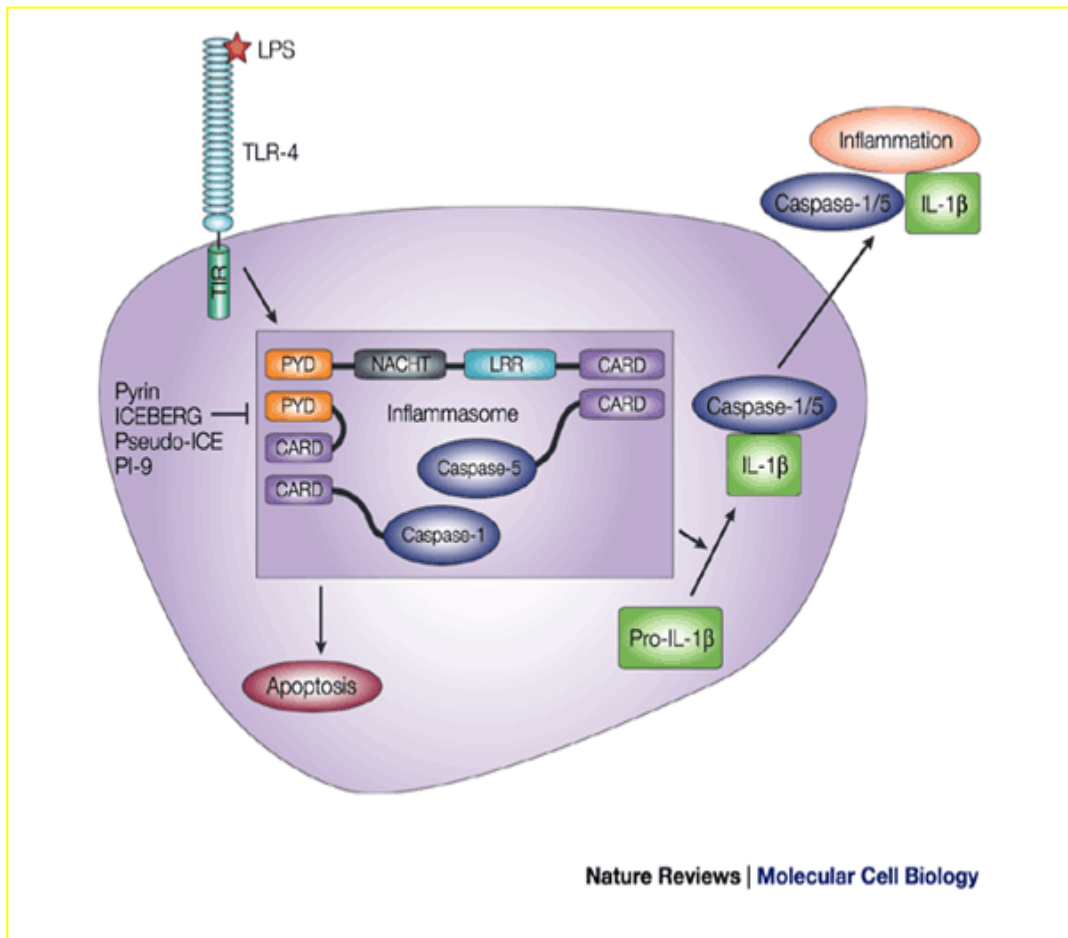
Εικόνα 4. DD-αναδίπλωση (*Protein Science* 2001 ;10:1911)



Εικόνα 5. DD-δομικές περιοχές στα μέλη της Caterpillar οικογένειας πρωτεϊνών
(Nature Reviews/Molecular Cell Biology 2003;4:98)

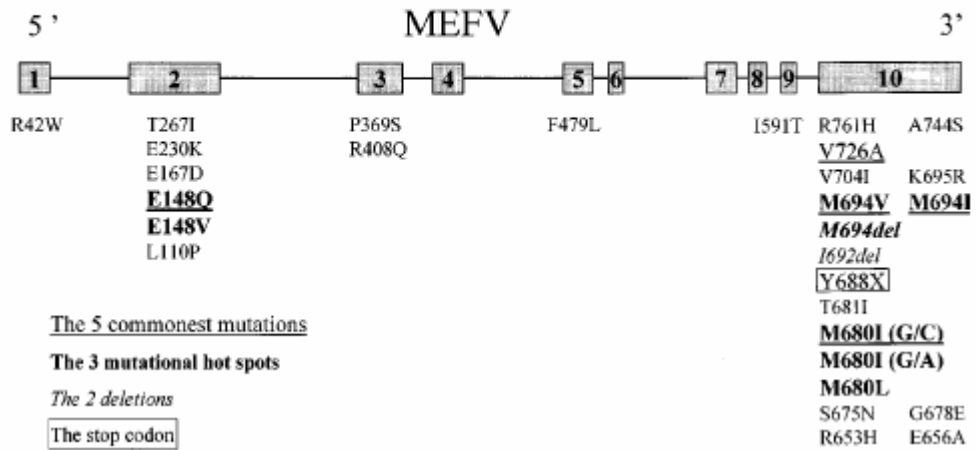


Εικόνα 6. Ομότυπες αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών
(*Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 2003;4:98)



Εικόνα 7. Ανασταλτικός ρόλος της πυρίνης στο μοριακό μονοπάτι παραγωγής της IL-1β (Nature Reviews/Molecular Cell Biology 2003;4:98)

The spectrum of MEFV mutations



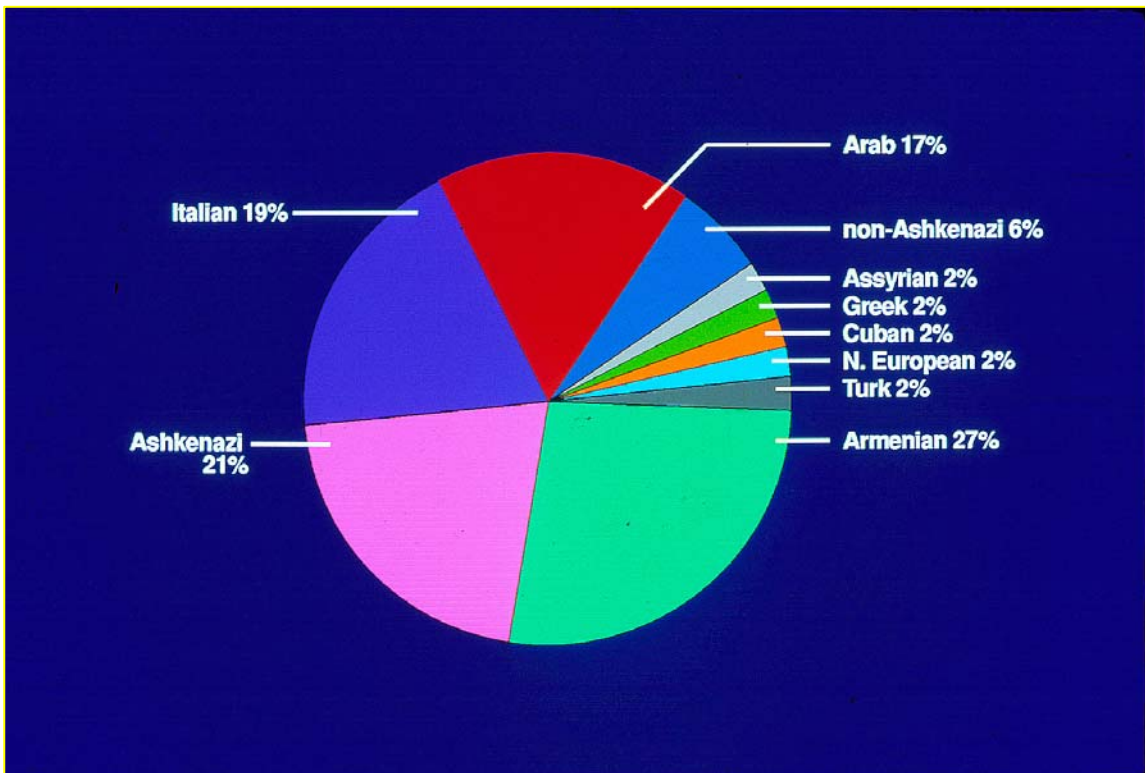
Εικόνα 8. Το φάσμα των μεταλλαγών του MEFV γονιδίου
(*Eur J Hum Genet* 2001;9:475)

Spread of Ancient Ancestral Mutations in FMF

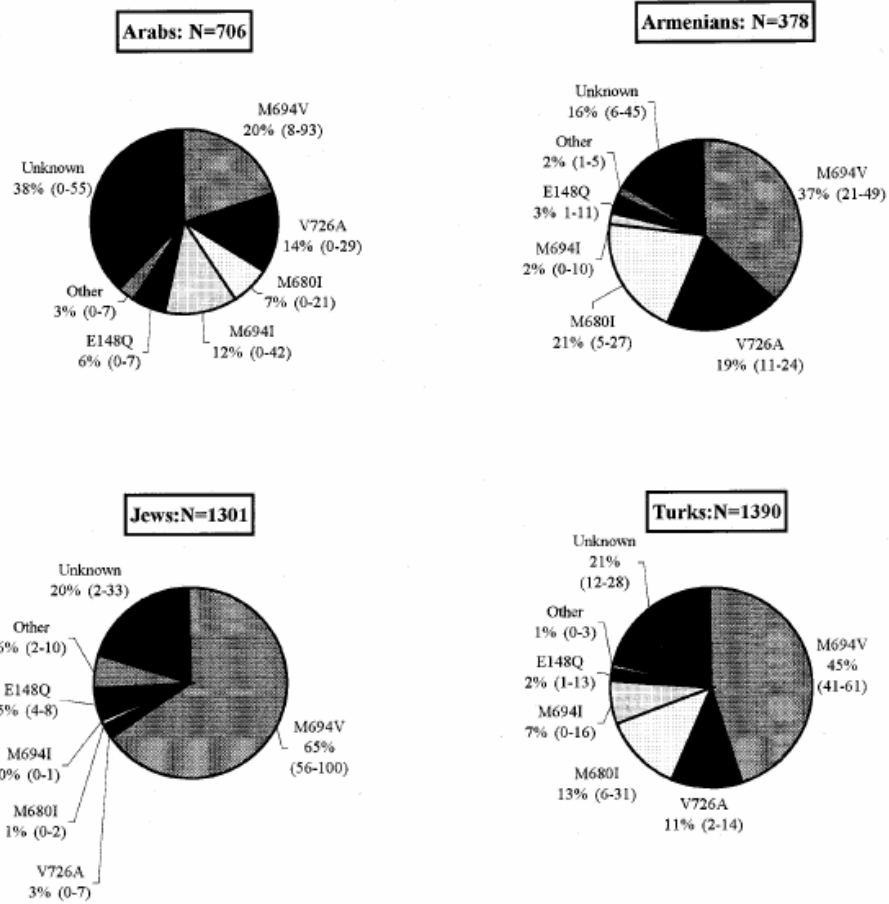


Hospital Practice 33:131, 1998

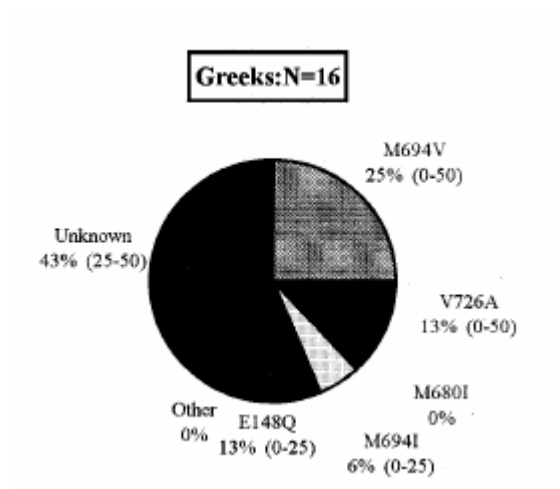
Εικόνα 9. Η εξάπλωση των μεταλλαγών του γονιδίου MEFV
(*Hospital Practice 1998;33:131*)



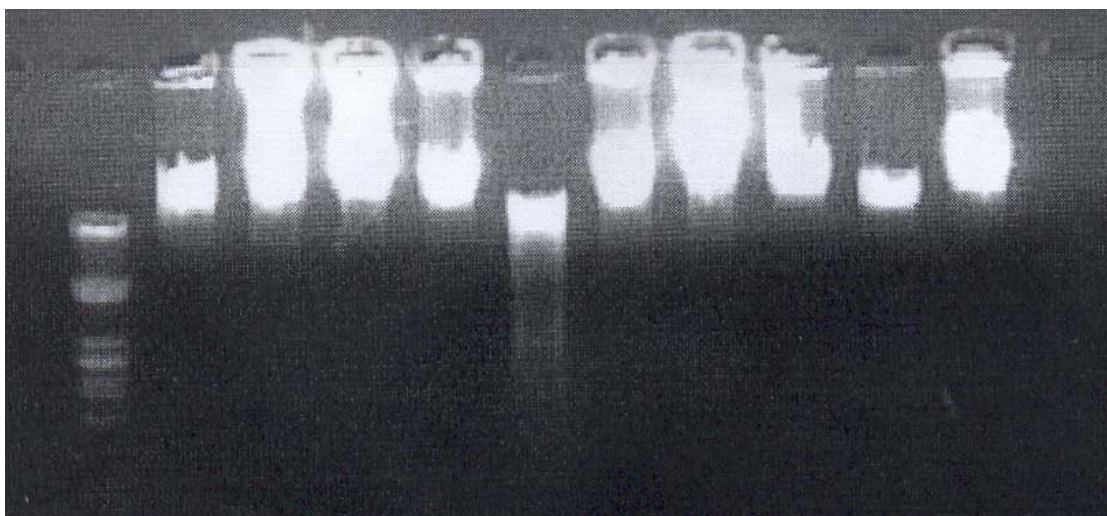
**Εικόνα 10. Η συχνότητα του FMF στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες
(*Medicine Baltimore 1998;77:268*)**



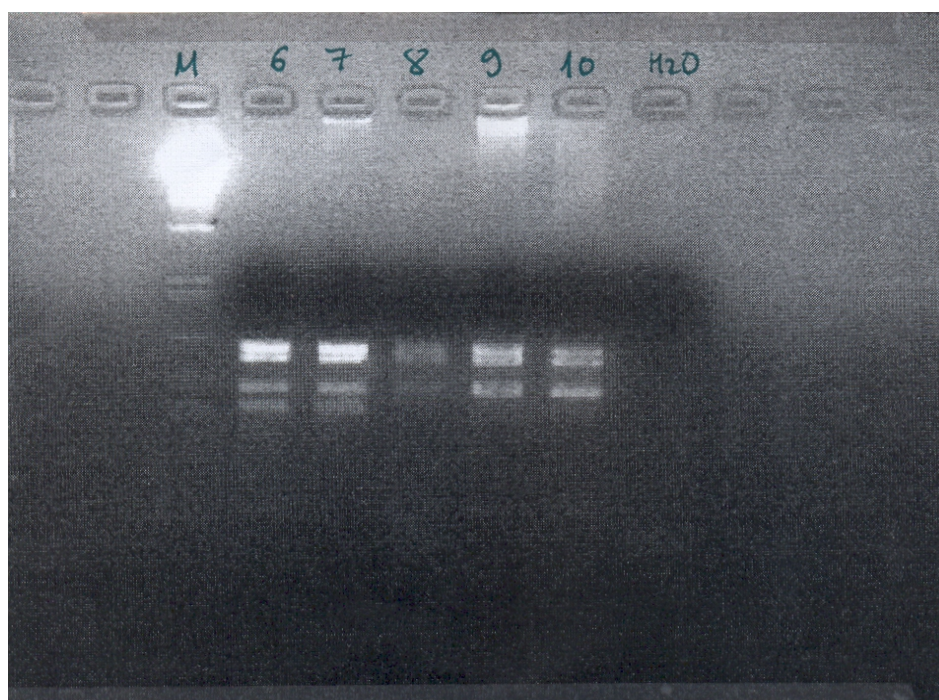
Εικόνα 11. Το φάσμα των MEFV μεταλλαγών σε υψηλού κινδύνου πληθυσμούς (Eur J Hum Genet 2001;9:475)



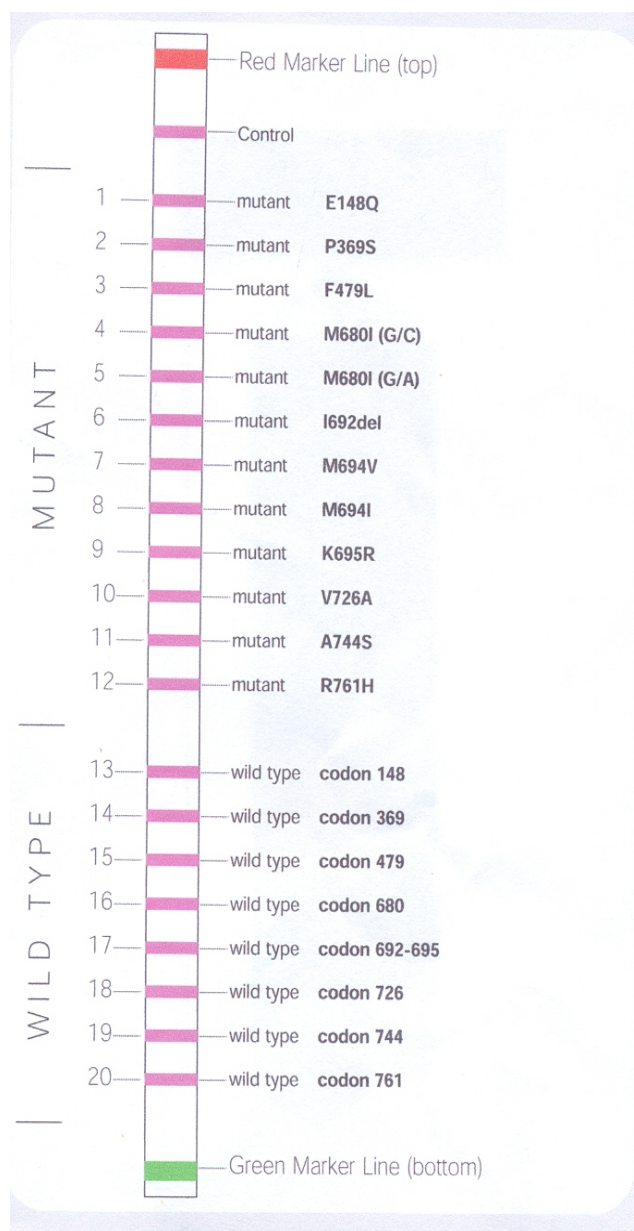
**Εικόνα 12. Το φάσμα των MEFV μεταλλαγών στους Έλληνες
(*Eur J Hum Genet* 2001;9:475)**



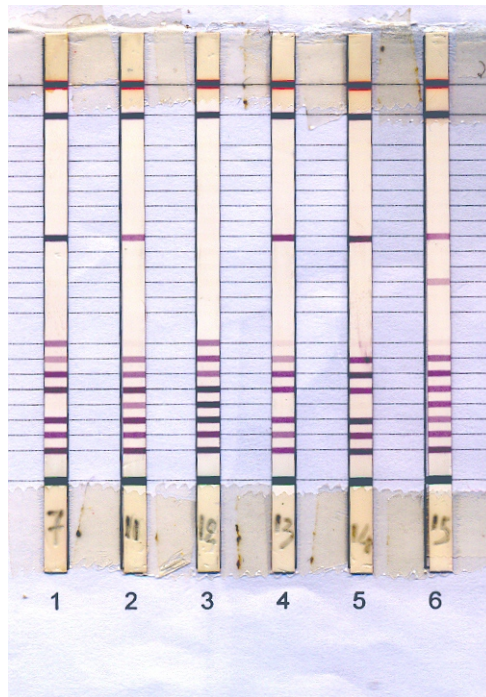
Εικόνα 13. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA σε πήκτωμα αγαρόζης



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

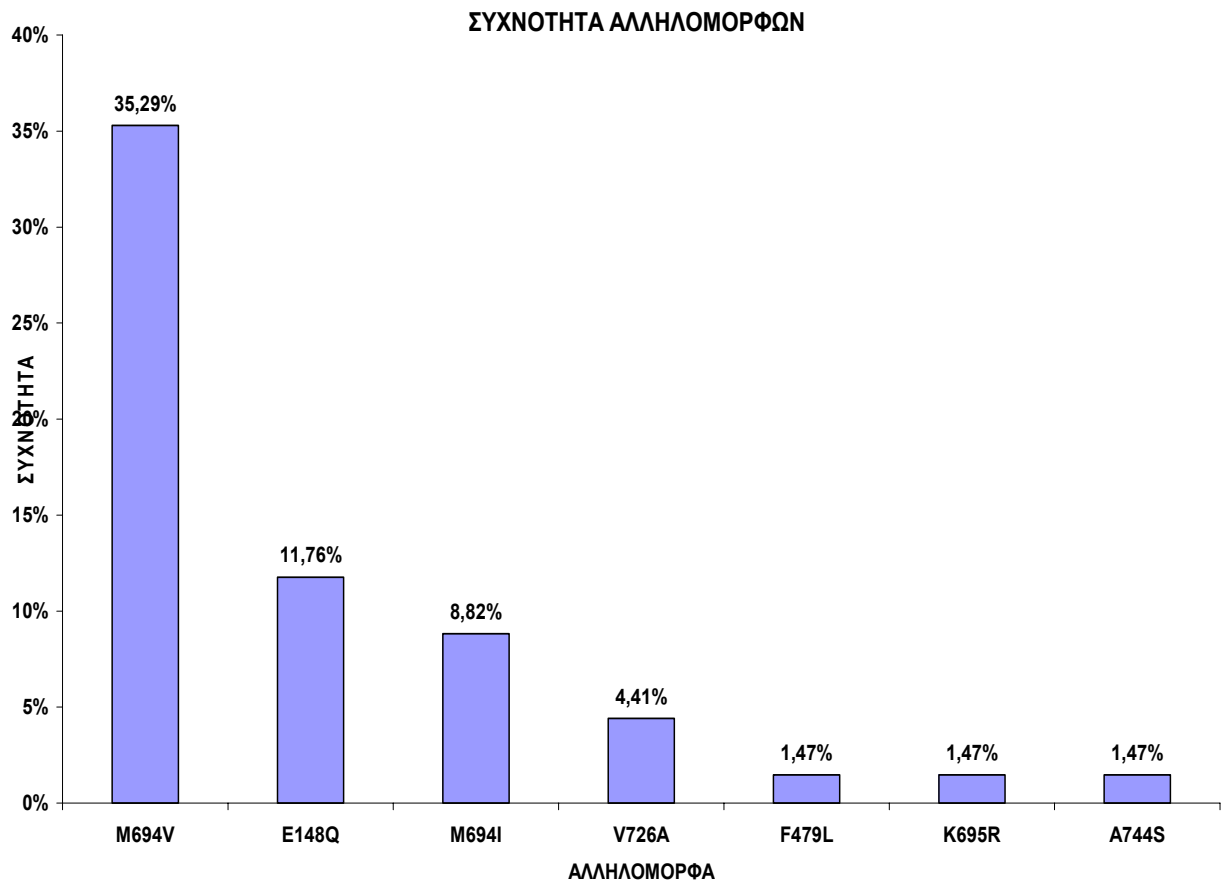


Εικόνα 15. Αγρίου τύπου και μεταλλαγμένοι ιχνηθέτες σταθεροποιημένοι σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης



Εικόνα 16. Ερμηνεία αποτελεσμάτων.

- 1. M694V/M694V ομοζυγωτία**
- 2. M694V/wt ετεροζυγωτία**
- 3. wt/wt χωρίς μεταλλαγές**
- 4. M694V/M694V ομοζυγωτία**
- 5. M694V/M694V ομοζυγωτία**
- 6. M694V/V726A σύνθετη ετεροζυγωτία**



Εικόνα 17. Το φάσμα των MEFV μεταλλαγών σε FMF ασθενείς από την Κρήτη