



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η μελέτη των πολυμορφισμών του FAS, της κασπάσης 8 (CASP8) και 10 (CASP10) στη Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής παιδιών και εφήβων

Αμπαζόγλου Ευαγγελία Δήμητρα

Βιολόγος

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2021

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή
1. Στειακάκη Ευτυχία
2. Γουλιέλμος Γεώργιος
3. Ποντίκογλου Χαράλαμπος

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στην Κλινική Αιματολογίας- Ογκολογίας Παίδων και στο Εργαστήριο Βιολογίας Αιματολογικών νόσων και Καρκίνου στα παιδιά, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών "Αιματολογία- Ογκολογία παιδιών και εφήβων".

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου για την πολύτιμη βοήθεια τους καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, καθηγήτρια Ευτυχία Στειακάκη, καθηγητή Γεώργιο Γουλιέλμο και αναπληρωτή καθηγητή Χαράλαμπο Ποντίκογλου. Η συμβολή τους στην πραγματοποίηση της εργασίας ήταν καίρια και οι συμβουλές τους όσον αφορά στην επιλογή του θέματος, στην εκπόνηση των πειραμάτων και στην συγγραφή της διατριβής στάθηκαν πολύτιμες. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεργάτιδα και συμφοιτήριά μου Μαριλένα Λούρου για την σημαντική συνεργασία και βοήθεια σε όλα τα στάδια της διπλωματικής εργασίας. Μεγάλη ευγνωμοσύνη χρωστάω επίσης στην Μαρία Ζερβού (Βιολόγο M.Sc-Ph.D, μέλος ΕΔΙΠ) για την βοήθεια της στην στατιστική ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της έρευνας αυτής.

Τελευταία αλλά εξίσου σημαντικά, οφείλω μεγάλη ευγνωμοσύνη στην οικογένεια και τους φίλους μου που χωρίς την στήριξή τους η καθολική πορεία μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών θα ήταν ατελέσφορη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη	1
Abstract	4
Συνοτομογραφίες	6
1. Εισαγωγή / Γενικό μέρος	
1.1. Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής και Απόπτωση	7
1.2. Πολυμορφισμοί (FAS,CASP8,CASP10)	9
1.3. Τεχνικές	13
1.4. Σκοπός Εργασίας	16
2. Μεθοδολογία / πληθυσμός και μέθοδοι	
2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA και Ποσοτικοποίηση	17
2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	21
2.3. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	24
2.4. Στατιστική ανάλυση	26
3. Αποτελέσματα	
3.1. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs1045485 του γονιδίου Caspase 8 στην ITP	27
3.2. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου Caspase 10 στην ITP	27
3.3. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs2234767 του γονιδίου FAS στην ITP	27
4 Συζήτηση	28
4.1. FAS	30
4.2. CASP8	32
4.3. CASP10	34
4.4. Συσχέτιση Θρομβοπενίας Ανοσολογικής Αρχής με απόπτωση	36
4.5. Περιορισμοί μελέτης και προτάσεις για μετέπειτα έρευνες	38
5. Χρηματοδοτήσεις, συμβολή ερευνητών	39
6. Βιβλιογραφία	40
7. Πίνακες και Εικόνες	47

Περίληψη

Τίτλος εργασίας: Μελέτη των πολυμορφισμών του FAS, της κασπάσης 8 (CASP8) και 10 (CASP10) στη Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής παιδιών και εφήβων.

Του/της: Αμπαζόγλου Ευαγγελία-Δήμητρα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Στειακάκη Ευτυχία
2. Γουλιέλμος Γεώργιος
3. Ποντίκογλου Χαράλαμπος

Ημερομηνία: Φεβρουάριος 2021

Η Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής αποτελεί την πιο συχνή αιματολογική νόσο καθώς και την πιο συχνή επίκτητη αιμορραγική διαταραχή στα παιδιά. Παθοφυσιολογικά η Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής χαρακτηρίζεται από θρομβοπενία, με αριθμό κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων κάτω από εκατό χιλιάδες εξαιτίας της παραγωγής αντισωμάτων για την γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων, ειδικότερα κατά των GPIIb/IIIa και Ib/IX, ακολουθούμενη από καταστροφή των αιμοπεταλίων.⁽¹⁾ Η νόσος χαρακτηρίζεται οξεία κατά τους 3 πρώτους μήνες από την διάγνωση, εμμένουσα από τον τρίτο έως τον δωδέκατο μήνα και χρόνια νόσος χαρακτηρίζεται άνω των δώδεκα μηνών από την πρώτη διάγνωση. Κατά προσέγγιση τρία από τα τέσσερα παιδιά με νόσο θα ανακάμψουν σε δώδεκα μήνες μετά την διάγνωση.⁽²⁾

Η απόπτωση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που είναι σημαντική για τον έλεγχο του αριθμού των κυττάρων κατά την ανάπτυξη και επιβίωση του οργανισμού. Απορρύθμιση της απόπτωσης μπορεί να διακινδυνέψει την ομοιόσταση του οργανισμού και να προκαλέσει εμφάνιση νόσων. Η απόπτωση ενεργοποιείται μέσω της ενδογενούς ή εξωγενούς οδού.⁽³⁾ Το FAS μεταγράφεται σε ένα διαμεμβρανικό μόριο που ανήκει στην υπερικογένεια υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου. Η πρόσδεση του FasL στο FasL ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε διάφορες λεμφικές σειρές κυττάρων και ίσως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ζωής των

λεμφοκυττάρων και στην επαγωγή της περιφερικής ανοχής. Επίσης, το Fas εμπλέκεται στην κυτταροτοξικότητα των T λεμφοκυττάρων και των βοηθητικών T κυττάρων, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του FasL που εκφράζεται από ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά κύτταρα.⁽⁴⁾ Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην απόπτωση. Οι κασπάσες 8 και 10 αποτελούν τα πρώτα ένζυμα που ενεργοποιούνται από το πρωτεολυτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την οδό Fas/FasL. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, μεταλλάξεις στις κασπάσες αυτές, που εμπλέκονται στον προγραμματισμό ζωής και θανάτου των ανοσολογικών κυττάρων, επηρεάζουν την κυκλοφορία του ανοσολογικού συστήματος σε ασθένειες και προκαλούν πολλαπλασιασμό των ανοσολογικών κυττάρων (λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο τύπου ΙΑ και Β).⁽⁵⁾

Σκοπός: Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων *FAS*, κασπάσης 8 (*CASP8*) και 10 (*CASP10*) με τον κίνδυνο εμφάνισης Θρομβοπενίας Ανοσολογικής Αρχής σε παιδιά και εφήβους.

Ασθενείς και Μέθοδοι: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 30 παιδιά και έφηβοι με Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής και 60 υγιή άτομα. Αρχικά, έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα, το οποίο έπειτα αναλύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ακολούθησε η πέψη των προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα. Για τη γονοτύπηση των ατόμων για τον μονονουλεοτιδικό πολυμορφισμό (SNP) του γονιδίου *FAS* rs2234767 χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Bst*UI όπως και για το SNP της *CASP8* rs1045485. Για τη γονοτύπηση για το rs13006529 SNP της *CASP10* έγινε πέψη με το ένζυμο *Ssp*I. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης και στην συνέχεια έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

Αποτελέσματα: Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για το rs13006529 SNP του γονιδίου *CASP10*. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να σχετίζεται με τον ρόλο που διαδραματίζει η κασπάση 10 στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης καθώς και στην συμμετοχή της στην διαδικασία της αυτοφαγίας. Δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά για τους πολυμορφισμούς rs2234767 και rs1045485 των γονιδίων *FAS* και *CASP8*, αντίστοιχα.

Συμπεράσματα: Το αλληλόμορφο T του rs13006529 SNP του γονιδίου *CASP10* εμφανίζει συσχέτιση με την Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής. Για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *FAS* και *CASP8* δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα θεωρούνται πρόδρομα λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων. Μελλοντικά, θα ήταν σκόπιμο να αναλυθούν περισσότερα δείγματα για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των πολυμορφισμών των γονιδίων *FAS*, *CASP8* και *CASP10* στην ΙΤΡ παιδιών και εφήβων.

Λέξεις κλειδιά: Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής, παιδιά, έφηβοι, απόπτωση, *FAS*, *CASP8*, *CASP10*

Abstract

Title: Study of FAS, Caspase 8 (CASP8) and 10 (CASP10) polymorphisms in children and adolescents with Immune Thrombocytopenia.

By: Ampazoglou Evangelia-Dimitra

Members of the Evaluating Committee

1. Stiakaki Eftichia
2. Goulielmos George
3. Pontikoglou Charalampos

Date: February 2021

Immune thrombocytopenia (ITP) is one of the most common blood diseases as well as the commonest acquired bleeding disorder in childhood. ITP is pathophysiologically characterized by a low circulating platelet count due to the production of autoantibodies against platelet glycoproteins, especially against GPIIb/IIIa and Ib/IX, followed by their destruction via the reticuloendothelial system.⁽¹⁾ Newly diagnosed ITP is defined as up to 3 months from diagnosis, persistent ITP is 3–12 months from diagnosis, and chronic is defined as ITP lasting more than 12 months. Approximately 3 out of 4 children will recover from ITP within 12 months from diagnosis.⁽²⁾

Apoptosis is a physiologic mechanism of programmed cell death that is crucial for controlling cell number during development and the entire lifetime of an organism. Deregulation of apoptosis signaling may compromise the homeostasis of an organism and cause a wide range of diseases. Apoptosis is triggered through either the intrinsic or extrinsic pathway.⁽³⁾ Fas is a transmembrane molecule belonging to the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. Fas ligation by FasL induces programmed cell death (PCD) in several lymphoid cell lines and may play a role in immune response control, lymphocyte life span regulation and induction of peripheral tolerance. Moreover, Fas is involved in cytotoxic T-lymphocyte and Th1 cell cytotoxicity, which is partially due to the interaction of FasL expressed by activated cytotoxic cells with Fas expressed by target cells.⁽⁴⁾ Caspases are cysteine proteases that play a central role in apoptosis. Caspase-8 and caspase-10 may be the first enzymes in the proteolytic cascade that are activated by FAS ligand and tumor necrosis factor. According to the literature, mutations in either CASP8 or CASP10

(being implicated in programming life and death of immune cells) influence immune surveillance of malignancies and cause lymphoproliferation (autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIA and B).⁽⁵⁾

Aim: Aim of this study is to identify if the polymorphisms of FAS, CASP8 and CASP10 play a role in the emerge of Immune Thrombocytopenia in children and adolescents.

Materials and Methods: In this study 30 children and adolescents with Immune Thrombocytopenia and 60 healthy individuals as control group were included. At first, extraction DNA out of peripheral blood was performed, which then was analysed by Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR was followed by digestion using selected restricted enzymes in order to genotype individuals for the SNPs under study. For the *FAS* (rs2234767) and *CASP8* (rs1045485) polymorphisms, the restriction enzyme *Bst*UI was used. For the *CASP10* polymorphism (rs13006529), the enzyme *Ssp*I was used. Digestion products were analyzed by agarose gel electrophoresis and statistical analysis was performed by using the GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) program.

Results: Statistical analysis of data showed that allele T of *CASP10* rs13006529 SNP was associated with the development of ITP. It's effect may be related to the role of caspase 10 in the endogenous pathway of apoptosis as well as its involvement in the process of autophagy. However, no association for the studied SNPs of *FAS* and *CASP8* genes was detected.

Conclusions: Allele T of *CASP10* rs13006529 SNP appeared to have a statistically significant difference between patients and controls, thus suggesting its role in the development of the ITP. As regards with the *FAS* (rs2234767) and *CASP8* (rs1045485) SNPs no association with ITP was observed. However, these results are considered as early due to the small number of samples examined. Further analysis of a higher number of patients/controls is needed in order to clarify the role of the SNPs under study in children and adolescents with ITP.

Key words: Immune Thrombocytopenia, children, adolescents, apoptosis, FAS, CASP8, CASP10

Συντομογραφίες

- 1) AICD: activation-induced cell death
- 2) ALPS: Autoimmune lymphoproliferative syndrome (αυτάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο)
- 3) DISC: Death-inducing signaling complex
- 4) dNTPs: τριφωσφορικοί δεοξυριβονουκλεοζίτες
- 5) FADD: Fas-associated protein with Death Domain
- 6) ITP: immune thrombocytopenia (Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής)
- 7) NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
- 8) PCR: polymerase chain reaction
- 9) SNP: single nucleotide polymorphism
- 10) STR: short tandem repeats
- 11) TCR: T-cell receptor
- 12) TNF: tumor necrosis factor

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής και απόπτωση

❖ Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής

Η ITP αποτελεί μία από τις πιο συχνές αιματολογικές διαταραχές και είναι η πιο συχνή επίκτητη αιμορραγική διαταραχή στα παιδιά. Οφείλεται σε έναν αυτοάνοσο μηχανισμό αγνώστου αιτιολογίας και έχει επίπτωση 4-6 ασθενείς ανά 100.000 παιδιά το έτος.

Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από θρομβοπενία, με αριθμό αιμοπεταλίων κάτω από εκατό χιλιάδες καθώς και από μειωμένο χρόνο ζωής των αιμοπεταλίων. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η παρουσία αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων στο πλάσμα. Η διάγνωση είναι κυρίως κλινική και εξ αποκλεισμού λαμβάνοντας υπόψη το ιστορικό, την κλινική εξέταση, την γενική αίματος καθώς και το επίχρισμα περιφερικού αίματος του ασθενούς. Όταν η νόσος επιμένει για χρονικό διάστημα άνω των δώδεκα μηνών χαρακτηρίζεται ως 'χρόνια' και οι περιπτώσεις της νόσου που εμμένουν για τρεις έως δώδεκα μήνες μετά την αρχική διάγνωση χαρακτηρίζονται ως 'εμμένουσα νόσος'⁽⁵⁾.

Ο αυτοάνοσος μηχανισμός αν και άγνωστος, χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων ή/και ανοσολογικά διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων έναντι των αιμοπεταλίων και των προβαθμίδων τους στον μυελό των οστών με αποτέλεσμα την αυξημένη καταστροφή αλλά και την καταστολή της παραγωγής των αιμοπεταλίων.⁽⁶⁾ (Εικόνα 1)

❖ Απόπτωση

Η απόπτωση αποτελεί μία κυτταρική διαδικασία που προκύπτει τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.⁽³⁰⁾ Είναι ευρέως γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που προκύπτει από μη φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η σημασία της, τόσο σε πολυκύτταρους οργανισμούς όσο και ερευνητικά μπορεί να αναδειχθεί από τις ποικίλες βιολογικές αποκρίσεις και αλλαγές που γίνονται εξαιτίας της όπως για παράδειγμα κατά την εμβρυική ανάπτυξη, τον

πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς και τον εξωτερικώς επαγόμενο κυτταρικό θάνατο.⁽²⁷⁾

Ο αποπτωτικός μηχανισμός ενεργοποιείται από ενδογενή και εξωγενή σήματα και άρα υπάρχουν δύο διαφορετικά μονοπάτια απόπτωσης, το ενδογενές και το εξωγενές. Τα ενδογενή σήματα περιλαμβάνουν την καταστροφή του DNA, την απουσία αυξητικού παράγοντα και κυτταροκινών ενώ τα πιο συχνά εξωγενή σήματα είναι τα σήματα ενεργοποίησης θανάτου που παράγονται από κυτταροτοξικά T κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ως απάντηση σε κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα. Τα δύο αυτά διαφορετικά μονοπάτια συγκλίνουν στις κασπάσες-εκτελεστές.⁽²⁸⁾

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της απόπτωσης αποτελεί ότι ασκεί την επίδρασή της μέσω ενός τύπου πρωτεασών, γνωστές ως κασπάσες. Τα σήματα θανάτου οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών που θα είναι υπεύθυνες για την εκτέλεση της κυτταρικής καταστροφής. Παρά τις διαφορές στα δύο διαφορετικά μονοπάτια της απόπτωσης, και τα δύο σχηματίζουν αποπτωτικά σώματα που αναγνωρίζονται από φαγοκύτταρα.⁽²⁷⁾ Οι κασπάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της απόπτωσης καθώς αποτελούν τόσο τους εκκινητές όσο και τους εκτελεστές της διαδικασίας.⁽³⁰⁾ Υπάρχουν τέσσερις κασπάσες εκκινητές (κασπάση-2,-8,-9,-10) και τρεις κασπάσες εκτελεστές (κασπάση-3,-6,-7).⁽²⁸⁾

Μορφολογικές αλλαγές κατά την διάρκεια του αποπτωτικού θανάτου που αφορούν τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα είναι παρόμοιες ανάμεσα στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και στα διαφορετικά είδη. Συνήθως χρειάζονται κάποιες ώρες από την αρχή του κυτταρικού θανάτου έως την κλασματοποίηση του κυττάρου και η ακριβής ώρα εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το αποπτωτικό μονοπάτι. Κατά την διάρκεια της απόπτωσης τρεις βασικοί τύποι βιοχημικών αλλαγών παρατηρούνται: η ενεργοποίηση κασπασών, η θραύση του DNA και των πρωτεϊνών και οι μεμβρανικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα την αναγνώριση από φαγοκύτταρα.⁽³⁰⁾ (Εικόνα 2)

1.1 Πολυμορφισμοί (FAS, CASP8, CASP10)

Πολυμορφισμοί DNA είναι οι διάφορες εναλλακτικές μορφές (αλληλόμορφα) ενός χρωμοσωμικού τόπου που διαφέρουν ως προς την αλληλουχία του DNA. Πολλοί από αυτούς χρησιμοποιούνται ως δείκτες DNA και είναι χρήσιμοι στην κατασκευή γενετικών χαρτών υψηλής ακρίβειας, καθώς η συχνότητα τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι υψηλή. Διακρίνονται σε τρία είδη, στους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), στις βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STRs) και στις ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (Variable Number of Tandem Repeats).

Μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) είναι μια αλλαγή σε ζεύγος βάσεων σε ένα γενετικό τόπο του γονιδιώματος (σημειακή αλλαγή). Ευθύνεται για το 90-95% της ποικιλομορφίας του ανθρώπινου DNA και αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή πολυμορφισμού, αφού συναντάται με συχνότητα 1/350bp. Αυθόρμητες μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή οφείλονται για την δημιουργία του. Ανάλογα με το αν βρίσκονται σε κωδικές περιοχές ή όχι, οι SNPs χωρίζονται σε κωδικούς (cSNPs) και μη κωδικούς SNPs αντίστοιχα. Κάθε γονίδιο έχει περίπου 4 cSNPs, 2 εκ των οποίων προκαλούν παρανοηματικές και οι υπόλοιποι σιωπηλές μεταλλάξεις.

Ένα μικρό ποσοστό των SNPs επηρεάζει θέσεις περιορισμού είτε δημιουργώντας νέες είτε απαλείφοντας κάποιες που ήδη υπάρχουν. Για την ανίχνευση τέτοιων αλλαγών χρησιμοποιείται το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού σε διαδικασίες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ή στυπώματος κατά Southern. Για τον εντοπισμό και την ανάλυση SNPs που δεν σχετίζονται με πολυμορφικές θέσεις περιορισμού, γίνεται γονοτύπηση μέσω υβριδοποίησης με ένα αλληλομορφοειδικό ολιγονουκλεοτίδιο.

Οι βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (STR) είναι αλληλουχίες μήκους 2-6bp που επαναλαμβάνονται από λίγες ως 100 φορές. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εξανουκλεοτιδικών επαναλήψεων είναι τα τελομερή. Εξαιτίας της ποικιλίας του αριθμού των επαναλήψεων γίνεται αντιληπτό ότι πολλές STR είναι πολυμορφικές. Ανιχνεύονται με PCR λόγω μικρού μεγέθους.

Η τελευταία κατηγορία είναι οι ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (VNTR), οι οποίες είναι αλληλουχίες μήκους 7bp- δεκάδες bp. Επαναλαμβάνονται λιγότερο από τα STR. Διακρίνονται δυο τύποι γενετικών τόπων, οι μοναδικοί που υπάρχουν μόνο σε μία θέση στο γονιδίωμα ή οι πολλαπλοί που συναντώνται σε πολλές διαφορετικές περιοχές. Λόγω του μεγάλου μεγέθους ανιχνεύονται με πέψη με περιοριστικά ένζυμα και στύπωμα Southern και όχι με την τεχνική της PCR. ⁽⁷⁾

1) *FAS*

Η σηματοδοτική οδός Fas/FasL είναι μία από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την απόπτωση. Ο διαμεμβρανικός υποδοχέας Fas είναι μέλος της υπερικογένειας των TNF. Το γονίδιο του FAS στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 και αποτελείται από 15 εξώνια.⁽⁸⁾

Στο αποπτωτικό μονοπάτι Fas/FasL, με την πρόσδεση του δεσμευτή (FasL) το Fas κλασματοποιείται και προσδένεται στο FADD. Το FADD με την σειρά του ενεργοποιεί την κασπάση 8 και την κασπάση 10 για να δημιουργήσουν το σύμπλοκο σηματοδότησης ενεργοποίησης θανάτου (DISC). Το DISC αυτοκαταλύεται ενεργοποιώντας τις κασπάσες 8 και 10, οι οποίες διαδίδουν το σήμα του κυτταρικού θανάτου μέσω πρωτεόλυσης κασπασών όπως οι κασπάσες 3, 6 και 7. ⁽⁹⁾

Η απόπτωση των ενεργοποιημένων T κυττάρων γίνεται μέσω της οδού Fas/FasL. Η ενεργοποίηση κυτταρικού θανάτου (AICD) των περιφερικών T κυττάρων ελέγχεται από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα T κυττάρων (TCR) και του σηματοδοτικού μονοπατιού Fas/FasL. Επίσης, το Fas διατηρεί την ομοιόσταση των κυκλοφορούντων T κυττάρων ρυθμίζοντας την ισορροπία μεταξύ διαφοροποίησης και θανάτου των T κυττάρων.⁽⁹⁾

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του Fas δείχνουν να έχουν συσχέτιση με την εμφάνιση διάφορων πρωτοπαθών ανοσολογικών νόσων όπως το Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο. ^(10,11,12) (Εικόνα 2)

2) *Κασπάση 8 (CASP8)*

Οι κασπάσες θεωρούνται οι σημαντικότεροι οδηγοί της απόπτωσης που κόβουν πεπτιδικούς δεσμούς ασπαρτικού οξέος σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.⁽¹³⁾

Η κασπάση 8 είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο N-τελικές περιοχές ρυθμιστών θανάτου που ακολουθούνται από μία μεγάλη (p18) και μία μικρή (p10) υπομονάδα πρωτεασών στο C-τελικό άκρο. Το γονίδιο της εδράζεται στο μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 2.⁽¹⁴⁾

Η κασπάση 8 ρυθμίζει δύο μονοπάτια προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, τον ενδογενή και τον εξωγενή. Αποτελεί μία πρωτεάση κλειδί για την έναρξη του αποπτωτικού μονοπατιού και είναι σημαντική στην αρνητική ρύθμιση της νεκρόπτωσης. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της κασπάσης 8 μπορεί να οδηγήσουν σε μειωμένη απόπτωση και να προωθήσουν την επιβίωση του όγκου. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση της νεκρόπτωσης, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο του όγκου.⁽¹⁵⁾

Άλλος ένας σημαντικός ρόλος της κασπάσης 8 είναι η συμμετοχή της στην ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Αυτό το σύμπλεγμα πρωτεϊνών ελέγχει την μεταγραφή του DNA, την παραγωγή κυτοκινών καθώς και την επιβίωση των κυττάρων και αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της ανοσολογικής απόκρισης.⁽¹⁶⁾ Η κασπάση 8, μαζί με την κασπάση 10 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του NF-κB.⁽¹⁷⁾ (Εικόνα 3)

3) *Κασπάση 10 (CASP10)*

Η κασπάση 10 αποτελεί, όπως η κασπάση 8, μία πρωτεάση, της οποίας όμως ο ρόλος δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Είναι ένα κοντινό ομόλογο της κασπάσης 8 και με βάση την ομοιότητα της δομής τους, η κασπάση 10 θεωρείται ότι μεσολαβεί στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης με την πρόσδεσή της στο DISC. Στην βιβλιογραφία έχει βρεθεί συσχέτιση μεταλλάξεων καθώς και επιγενετικών αλλαγών της κασπάσης 10 με διάφορους καρκίνους όπως non-Hodgkin λέμφωμα, γαστρικό καρκίνωμα καθώς και σε διάφορους καρκίνους της παιδικής ηλικίας.⁽¹⁸⁾ Η συσχέτιση

αυτή φαίνεται να οφείλεται στην σύνδεση της κασπάσης 10 με την απόπτωση μέσω της οδού του Fas/FasL.⁽¹⁹⁾

Σε πρόσφατες μελέτες, βρέθηκε ότι παραδόξως η κασπάση 10 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού θανάτου. Ενεργοποιεί το NF-κΒ ανεξαρτήτως της καταλυτικής της δράσης και επάγει την κυτταρική επιβίωση. Επίσης, λειτουργεί ως επαγωγέας των γονιδίων του DISC.⁽¹⁷⁾ (Εικόνα 4)

Παράλληλα, έχει αναδειχθεί ο ρόλος της κασπάσης 10 όσον αφορά το πολλαπλό μυέλωμα στο οποίο έχει φανεί ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι της αυτοφαγίας.⁽⁴⁷⁾ Επίσης, με την ενεργοποίηση του υποστρώματος Bid, η κασπάση 10 μπορεί να ενεργοποιήσει το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης.⁽⁴⁹⁾

1.2 Τεχνικές

❖ Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) είναι μία τεχνική η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis και καθιστά δυνατή την γρήγορη «ακυτταρική μοριακή κλωνοποίηση» συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, των οποίων οι παράπλευρες αλληλουχίες είναι γνωστές, κάνοντας πολύ γρήγορη και επιλεκτική αντιγραφή αλληλουχιών DNA σε πολλά εκατομμύρια αντίγραφα με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής και καθαρής απομονωμένης DNA πολυμεράσης και των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων DNA. Η χρήση της είναι πολύ συχνή σε διαδικασίες διάγνωσης γενετικών ασθενειών και ιογενών λοιμώξεων, καθώς και στην ιατροδικαστική για την ταυτοποίηση ατόμων μέσω βιολογικού υλικού, όπως το αίμα, το σπέρμα και ο σίελος. Χρησιμοποιείται επίσης στην ανίχνευση καρκίνου σε πρώιμα στάδια και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας για τον καρκίνο, αλλά και για εντοπισμό λευχαιμιών που προκύπτουν από χρωμοσωματικές ανακατατάξεις ή ακόμα και για τον καθορισμό του βιολογικού πατέρα σε αμφισβητούμενες περιπτώσεις. Τέλος προϊόντα PCR μπορούν να αποτελέσουν πηγή κατανόησης εξελικτικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών εντοπίζοντας DNA μικροοργανισμών που δεν έχουν απομονωθεί ή αρχαίων μορίων DNA που έχουν μείνει ανέπαφα για χιλιάδες χρόνια.

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου, που αποτελείται από τρία στάδια, και το αποτέλεσμα του είναι ο διπλασιασμός των αντιγράφων DNA και άρα ο συνολικός τους αριθμός να αυξάνεται εκθετικά όσο προχωράει η αντίδραση. Δηλαδή ξεκινώντας από ένα μόριο δίκλωνου DNA, πραγματοποιώντας n επαναλήψεις του κύκλου των αντιδράσεων, θα παραχθούν 2^n αντίγραφα. Τα τρία στάδια του κύκλου αποτελούνται από: α) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, β) πρόσδεση πάνω σε κάθε κλώνο του DNA ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που χρησιμεύουν ως εκκινήτες της αντιγραφής (primers) και γ) αντιγραφή κάθε αλυσίδας του δίκλωνου μορίου με τη βοήθεια της DNA Taq πολυμεράσης, η οποία προέρχεται από το θερμοφιλο βακτήριο που ζει στις θερμές πηγές *Thermus aquaticus*. Για να πραγματοποιηθεί μία τέτοια αντίδραση χρειάζεται την προσθήκη των παρακάτω υλικών: η αλληλουχία-στόχος που θα

πολλαπλασιαστεί, ένα ζεύγος εκκινητών που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, τέσσερις τριφωσφορικοί δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTPs) και θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Η PCR είναι πολύ ευαίσθητη τεχνική και μπορεί να εντοπίσει ακόμα και ένα μόνο μόριο μέσα σε ένα δείγμα και να το πολλαπλασιάσει και επίσης μπορεί να ανιχνεύσει μόρια RNA, τα οποία αφού πρώτα μεταγραφούν σε DNA με την αντίστροφη μεταγραφάση, μετά να πολλαπλασιαστούν. Επιπλέον η θερμοανθεκτικότητα της πολυμεράσης επιτρέπει στην αντίδραση να μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κλειστό δοχείο χωρίς να χρειάζεται να προστεθούν αντιδραστήρια μετά τον πρώτο κύκλο και οι εκκινητές δεν χρειάζεται να είναι απόλυτα ταιριαστοί με τις παράπλευρες αλληλουχίες, καθώς έτσι μπορούν να αναζητηθούν τροποποιήσεις του ίδιου γονιδιακού θέματος, όπως οι οικογένειες γονιδίων.⁽²⁰⁾

❖ Πέψη με περιοριστικό ένζυμο

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή ένζυμα περιορισμού είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες ζευγών βάσεων στο DNA, που ονομάζονται θέσεις περιορισμού, και διασπών το DNA στο εσωτερικό ή κοντά σε αυτές τις αλληλουχίες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων. Συντελούν την προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους, διασπώντας τις αλληλουχίες DNA του «εισβολέα». Το DNA του ξενιστή προφυλάσσεται από τη δράση τους, μεθυλιώνοντας το DNA του στις θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών του με την βοήθεια ειδικών μεθυλοτρανφερασών. Εξαιτίας της τροποποίησης του γενετικού υλικού με την προσθήκη μεθυλομάδων εμποδίζεται η πέψη του από τα ειδικά ένζυμα.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ανάλογα με τον τρόπο κοπής του DNA, διακρίνονται σε ένζυμα με αλληλουχία αναγνώρισης 4,6,8 bp, οι οποίες είναι συμμετρικές και παλίνδρομες. Η άλλη κατηγορία είναι οι νουκλεάσες με μη συμμετρική αλληλουχία αναγνώρισης. Τέλος, ορισμένα ένζυμα κόβουν και τις 2 αλυσίδες του DNA μεταξύ των ίδιων ζευγών βάσεων οπότε προκύπτουν θραύσματα με λεία άκρα, ενώ άλλα κόβουν σε διαφορετικό σημείο την κάθε αλυσίδα, δημιουργώντας μονόκλινα 5' ή 3' προεξέχοντα, κολλώδη άκρα.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι αναμφισβήτητα πολύ χρήσιμα εργαλεία με αναρίθμητες εφαρμογές στο κλάδο της μοριακής βιολογίας. Η κλωνοποίηση DNA, η ανίχνευση πολυμορφισμών, η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA, η μελέτη επιγενετικών αλλαγών, η επεξεργασία, το αποτύπωμα αλλά και η χαρτογράφηση του DNA είναι μερικές από τις σημαντικότερες.⁽²¹⁾

❖ Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση.⁽²¹⁾ Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.⁽²²⁾

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τελευταία απομονώνεται από τα γένη των φύκων *Gelidium* και *Gracilaria* και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες L- και D-γαλακτόζης. Κατά τη δημιουργία γέλης, τα πολυμερή αγαρόζης συνδυάζονται με μη-ομοιοπολικό τρόπο σχηματίζοντας ένα δίκτυο δεσμών των οποίων τα μεγέθη πόρων καθορίζουν τις μοριακές ιδιότητες του υλικού.⁽²³⁾ Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι το πήκτωμα είναι μία ορθογώνια πλάκα αγαρόζης, η οποία τοποθετείται οριζόντια μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και φέρει ένα πλέγμα πόρων διαμέσου των οποίων περνάει το DNA.⁽²¹⁾ Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 100 bp έως 25 kb.⁽²³⁾

1.3 Σκοπός Εργασίας

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε τυχόν συσχέτιση των πολυμορφισμών των γονιδίων *FAS*, κασπάση 8 (*CASP8*) και 10 (*CASP10*) με την Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής παιδιών και εφήβων. Η οδός Fas/FasL και οι κασπάσες 8 και 10 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις οδούς της απόπτωσης, ενδογενή και εξωγενή. Επίσης, για τα γονίδια αυτά έχει βρεθεί συσχέτιση με διάφορες αυτοάνοσες νόσους, όπως για παράδειγμα το ALPS και με διάφορους καρκίνους όπως καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του μαστού και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα⁽²⁴⁾. Κρίθηκε σκόπιμο να ερευνηθεί ο ρόλος των μεταλλάξεων των πολυμορφισμών αυτών στην ITP παιδιών και εφήβων καθώς η βιβλιογραφία για αυτήν την συσχέτιση είναι περιορισμένη, ειδικά για το γονίδιο της κασπάσης 10 (*CASP10*).

2. Μεθοδολογία, πληθυσμός και μέθοδοι

Οι διαδικασίες για την πραγματοποίηση της έρευνας διεξήχθη σε 90 συνολικά άτομα. Από το σύνολο αυτό, τα 30 άτομα ήταν παιδιά και έφηβοι με ITP και τα υπόλοιπα 60 ήταν υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το αρχείο του εργαστηρίου «Επεξεργασίας Μοσχευμάτων» της Κλινικής Αιματολογίας και Ογκολογίας Παίδων του ΠΑ. Γ. Ν. Η. και του εργαστηρίου «Βιολογίας Αιματολογικών νόσων και καρκίνου στα παιδιά» του Πανεπιστημίου Κρήτης.

2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA και NanoDrop

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων έγινε απομόνωση γενωμικού DNA. Στην περίπτωση των ασθενών το DNA απομονώθηκε από λευκά κύτταρα του μυελού των οστών που συντηρούνταν σε καταψύκτη στους -80°C , ενώ στις ομάδες ελέγχου η απομόνωση έγινε από κύτταρα περιφερικού αίματος. Για την ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το DNA Purification Kit της εταιρίας Promega: Wizard Genomic (Madison, Wisconsin, USA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Για την ομάδα των ασθενών χρησιμοποιήθηκε το Genomic DNA mini KIT της εταιρίας Invitrogen: Purelink, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα:

1) Απομόνωση γενωμικού DNA, με το DNA purification KIT της Promega, από περιφερικό αίμα:

Μετά από καλή ανάδευση του περιφερικού αίματος, προστίθενται 300 μl αυτού σε eppendorf του 1,5 ml που ήδη περιέχει 900 μl cell lysis solution. Το δείγμα ανακινείται με το χέρι 5-6 φορές μαλακά. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην λύση των ερυθρών κυττάρων. Έπειτα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 15000 rcf (ή g). Μετά την φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο, το δείγμα ανακινείται με vortex για 15 δευτερόλεπτα ώστε να διαλυθεί η πελέτα και να αρχίσουν να σπάνε τα λευκά κύτταρα. Στην συνέχεια, προστίθενται 300 μl Nuclei lysis solution και το δείγμα αναδεύεται καλά. Με αυτήν την διαδικασία προκύπτει λύση των λευκών κυττάρων. Έπειτα, προστίθεται 1,5 μl RNAase και μετά από ήπια ανάδευση με το χέρι 4-5 φορές επωάζεται για 15 λεπτά στους 37°C . Μετά την επώαση αφήνουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσει το δείγμα. Αφού το δείγμα έρθει σε

θερμοκρασία δωματίου προστίθενται σε αυτό 100 μl Protein Precipitation Solution και γίνεται vortex για 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά σε 16000 rcf (ή g). Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, προκύπτει μια σκουρόχρωμη πελέτα η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες. Σε νέο erpendorf που περιέχει ήδη 300 μl ισοπροπανόλη, προστίθεται το υπερκείμενο με προσοχή για να μην παρθεί καθόλου πελέτα, μιας και αν υπάρχουν πρωτεΐνες επηρεάζεται η καθαρότητα του δείγματος. Το δείγμα ανακινείται καλά με το χέρι, μέχρι να εμφανιστεί μια άσπρη αιωρούμενη πελέτα, η οποία αποτελεί το DNA. Αφού φανεί το DNA, εφαρμόζεται φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 16000 rcf (ή g). Μετά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορρίπτεται. Προστίθενται 300 μl αιθανόλη 70% και ακολουθεί φυγοκέντρωση ίδια με την προηγούμενη. Μετά την φυγοκέντρωση αφαιρείται το υπερκείμενο και η πελέτα αφήνεται κάποιο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου, με ανοιχτό το καπάκι του erpendorf, μέχρι να στεγνώσει τελείως. Αφού στεγνώσει, προστίθενται 100 μl DNA rehydration buffer και μετά από ολονύχτια φύλαξη στο ψυγείο στους 4°C, ώστε να διαλυθεί η πελέτα και το δείγμα να είναι ομοιογενές, το DNA είναι έτοιμο για χρήση.

2) Απομόνωση γενωμικού DNA, με το Genomic DNA mini KIT από λευκά κύτταρα μυελού των οστών:

Τα κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε vials των 2 ml στους -80°C σε συγκέντρωση 3 εκατομμυρίων κυττάρων ανά ml κρυοπροστατευτικού διαλύματος. Τα vials φυγοκεντρώνονται σε 1600 rcf (ή g) για 10 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί το κρυοπροστατευτικό διάλυμα που υπάρχει για την συντήρηση των κυττάρων. Μετά την φυγοκέντρωση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύεται με 200 μl PBS sterile. Έπειτα, προστίθεται 200 μl Proteinase K και 20 μl RNAase A. Το δείγμα ανακινείται απαλά με το χέρι 4-5 φορές και στην συνέχεια επώαζεται 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, προστίθενται 100 μl lysis/binding buffer. Εφαρμόζεται καλό ανακάτεμα με vortex ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα. Έπειτα, επώαζεται σε heat block στους 55°C για 10 λεπτά ώστε να διαλυθούν οι πρωτεΐνες. Με το πέρας της επώασης, προστίθενται 200 μl καθαρή αιθανόλη (96%-100%) και αναδεύεται έντονα με vortex για 5 δευτερόλεπτα. Μετά την ανάδευση, το δείγμα μετακινείται σε κολώνες που δίνει το KIT, οι οποίες έχουν ένα ειδικό φίλτρο. Το δείγμα που πλέον βρίσκεται στην κολώνα φυγοκεντρείται σε 10000 rcf (ή g) για 1 λεπτό. Η κολώνα είναι εφαρμοσμένη σε ένα collection tube που δίνει ο

κατασκευαστής. Μετά την φυγοκέντρωση, ό,τι δεν είναι χρήσιμο βρίσκεται στο collection tube, άρα αυτό απορρίπτεται. Η κολώνα τοποθετείται σε καθαρό collection tube, όπου προστίθενται 500 µl wash buffer 1 και έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 10000 rcf (ή g). Μετά την φυγοκέντρωση το collection tube απορρίπτεται, η κολώνα τοποθετείται σε καθαρό, όπου προστίθενται 500 µl wash buffer 2. Το δείγμα έπειτα φυγοκεντρείται για 3 λεπτά σε 16000 rcf (ή g) και έπειτα το collection tube απορρίπτεται. Μέσα στο φίλτρο είναι παγιδευμένο το DNA. Στην συνέχεια τοποθετείται η κολώνα σε αποστειρωμένο erpendorf 1,5 ml και προστίθεται 50 µl elution buffer με προσοχή να στοχευθεί αυστηρά στο φίλτρο. Το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό 16000 rcf (ή g). Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, στο erpendorf έχει συλλεχθεί το DNA. Σε περίπτωση που χρειάζεται περισσότερη ποσότητα DNA επαναλαμβάνεται το στάδιο του elution buffer. Το DNA είναι έτοιμο για χρήση.

❖ Ποσοτικός προσδιορισμός DNA (NanoDrop)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του NanoDrop. Το NanoDrop είναι μηχανήμα που μπορεί να μετρήσει συγκεντρώσεις DNA, RNA και πρωτεϊνών σε δείγματα 1-2 µl. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer της εταιρίας Thermo Fisher Scientific.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

Αρχικά επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή (ND100) και γίνεται επιλογή του προς μέτρηση προϊόντος, δηλαδή Nucleid Acid. Προστίθενται στον αισθητήρα του μηχανήματος 1,5 µl elution buffer και επιλέγουμε την μέτρηση του blank. Η κεφαλή κλείνει και γίνεται η μέτρηση με βάση την οποία θα μετρηθεί το DNA. Αφού πραγματοποιηθεί το blank, καθαρίζεται απαλά η κεφαλή με απορροφητικό χαρτί και τοποθετείται στον αισθητήρα 1,5 µl διάλυμα που περιέχει DNA. Επιλέγουμε το measure για να γίνει η μέτρηση. Μετά από κάποια δευτερόλεπτα, εμφανίζεται μια καμπύλη, η οποία πρέπει να είναι ομαλή. Το δείγμα χαρακτηρίζεται από τα νούμερα συγκέντρωση DNA ανά µl, η καθαρότητα ως προς τα άλατα (260nm/230nm) και η καθαρότητα ως προς τις πρωτεΐνες (260nm/280nm) που χαρακτηρίζουν το δείγμα. Μετά από την μέτρηση κάθε δείγματος, πρέπει η κεφαλή να καθαρίζεται απαλά με απορροφητικό χαρτί, ώστε να μετρηθεί το επόμενο δείγμα. Η διαδικασία μέτρησης επαναλαμβάνεται αναλόγως πόσο δείγματα πρέπει να μετρηθούν. Τα δείγματα για μέτρηση πρέπει να συντηρούνται σε πάγο όση ώρα

διαρκεί η διαδικασία, καθώς το DNA είναι ευαίσθητο και μπορεί να επέλθει αποδιάταξη. Με το πέρας της διαδικασίας προστίθενται στον αισθητήρα 1,5 μl WFI (Water for Injection) και το πρόγραμμα στον υπολογιστή κλείνεται μέχρι την επόμενη χρήση. (Εικόνα 5)

2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα πειράματα της PCR έγιναν με χρήση του Taq PCR Core Kit της εταιρίας Qiagen.

Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας αποδιάταξης έγινε με τον τύπο

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$$

1) *FAS*

Η PCR πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο δείγματος 25 μl εκ των οποίων κάθε δείγμα περιείχε: 2,5 μl DNA, 5 μl CoralLoad Buffer, 0,5 μl τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 1,25 μl από τον κάθε εκκινητή, 0,5 μl Taq polymerase (5U/μl) και ενέσιμο νερό (WFI) έως την συμπλήρωση των 25 μl τελικού όγκου.

Οι εκκινητές έχουν τις εξής αλληλουχίες:

FAS-forward: TGTGTGCACAAGGCTGGCGG

FAS-reverse: TGCATCTGTCACCTGCACTTACCACCA

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

- Στάδιο αποδιάταξης: 94°C για 3 λεπτά
- 30 κύκλοι: 94°C για 1 λεπτό, 70°C για 1 λεπτό, 72°C για 1 λεπτό
- Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: 72°C για 10 λεπτά

Το προϊόν της αντίδρασης πρέπει να έχει τελικό μέγεθος 122 ζεύγη βάσεων. Για να επιβεβαιωθεί ότι η PCR είναι επιτυχής τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης 3%. Το δείγμα που φορτώθηκε στην γέλη αποτελούταν από 10 μl προϊόν PCR. Οι μπάστες του DNA εμφανίζονται βάζοντας την γέλη σε ειδικό μηχάνημα, στο οποίο χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία.

2) *CASP8*

Η PCR πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο δείγματος 25 μl εκ των οποίων κάθε δείγμα περιείχε: 2,5 μl DNA, 5 μl CoralLoad Buffer, 0,5 μl τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 1,25 μl από τον κάθε εκκινητή, 0,5 μl Taq polymerase (5U/μl) και ενέσιμο νερό (WFI) έως την συμπλήρωση των 25 μl τελικού όγκου.

Οι εκκινητές έχουν τις εξής αλληλουχίες:

CASP8-forward: CATTTTGAGATCAAGCCCCAC

CASP8-reverse: CCCTTGTCTCCATGGGAGAGGA

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

- Στάδιο αποδιάταξης: 94°C για 3 λεπτά
- 30 κύκλοι: 94°C για 1 λεπτό, 65°C για 1 λεπτό, 72°C για 1 λεπτό
- Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: 72°C για 10 λεπτά

Το προϊόν της αντίδρασης πρέπει να έχει τελικό μέγεθος 132 ζεύγη βάσεων. Για να επιβεβαιωθεί ότι η PCR είναι επιτυχής τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3%. Το δείγμα που φορτώθηκε στην γέλη αποτελούταν από 10 μl DNA προϊόν PCR. Οι μπάντες του DNA εμφανίζονται βάζοντας την γέλη σε ειδικό μηχάνημα, στο οποίο χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία.

3) *CASP10*

Η PCR πραγματοποιήθηκε με τελικό όγκο δείγματος 25 μl εκ των οποίων κάθε δείγμα περιείχε: 2,5 μl DNA, 5 μl CoralLoad Buffer, 0,5μl MgCl₂, 0,5 μl τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 1,25 μl από τον κάθε εκκινητή, 0,5 μl Taq polymerase (5U/μl) και ενέσιμο νερό (WFI) έως την συμπλήρωση των 25 μl τελικού όγκου.

Οι εκκινητές έχουν τις εξής αλληλουχίες:

CASP10-forward: GAGTGGACAAACAGGGAACAAA

CASP10-reverse: AGAACCAACAAAACTCTCTGCAATA

Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

- Στάδιο αποδιάταξης: 94°C για 3 λεπτά
- 30 κύκλοι: 94°C για 1 λεπτό, 65°C για 1 λεπτό, 72°C για 1 λεπτό
- Στάδιο τελικής επιμήκυνσης: 72°C για 10 λεπτά

Το προϊόν της αντίδρασης πρέπει να έχει τελικό μέγεθος 122 ζεύγη βάσεων. Για να επιβεβαιωθεί ότι η PCR είναι επιτυχής τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3%. Το δείγμα που φορτώθηκε στην γέλη αποτελούταν από 10 μl DNA

προϊόν PCR. Οι μπάντες του DNA εμφανίζονται βάζοντας την γέλη σε ειδικό μηχάνημα, στο οποίο χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία.

2.3 Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

Μετά την PCR ακολουθεί πέψη των δειγμάτων με περιοριστική ενδονουκλεάση. Η ειδικότητα του ενζύμου σε αυτό το στάδιο είναι απαραίτητη, για αυτό και σε κάθε πολυμορφισμό έχει επιλεγθεί το κατάλληλο ένζυμο.

1) *FAS (rs2234767)*

Χρησιμοποιείται το ένζυμο BstUI της εταιρίας Biolabs. Το wild type του γονιδίου είναι ο γονότυπος GG. Αν το δείγμα έχει γονότυπο CC δεν δημιουργείται θέση κοπής ενώ κάποιο από τα αλληλόμορφα είναι γουανίνη δημιουργείται θέση κοπής ως εξής:

5'....CG/CG....3'

3'...GC/GC....5'

Το μείγμα της πέψης αποτελείται από 8μl προϊόν της PCR, 2μl buffer, 1μl BstUI και συμπλήρωση νερού ώστε το μείγμα να έχει τελικό όγκο 20 μl. Έπειτα, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 60°C για 3 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αгарόζης 3% προκειμένου να διαπιστωθεί ο γονότυπος και εμφανίζονται με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Στην γέλη φορτώνονται 20 μl δείγματος. Τα δείγματα με ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C δεν πέπτονται και άρα στην γέλη εμφανίζεται μια μπάντα, ίδια με της PCR, σε μέγεθος 122 ζεύγη βάσεων. Η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G δημιουργεί θέση κοπής και στην γέλη φαίνονται 2 μπάντες μεγέθους 103 και 19 ζεύγη βάσεων. Η ετεροζυγωτία, δηλαδή γονότυπος AG δημιουργεί 3 μπάντες με μεγέθη 122, 103 και 19 ζεύγη βάσεων.

2) *CASP8(rs1045485)*

Χρησιμοποιείται το ένζυμο BstUI της εταιρίας Biolabs. Το wild type του γονιδίου είναι ο γονότυπος GG. Αν το δείγμα έχει γονότυπο CC δεν δημιουργείται θέση κοπής ενώ άμα κάποιο από τα αλληλόμορφα είναι γουανίνη δημιουργείται θέση κοπής ως εξής:

5'....CG/CG....3'

3'...GC/GC....5'

Το μείγμα της πέψης αποτελείται από 8μl προϊόν της PCR, 2μl buffer, 1μl BstUI και συμπλήρωση νερού ώστε το μείγμα να έχει τελικό όγκο 20 μl. Έπειτα, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 60°C για 3 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αгарόζης 3% προκειμένου να διαπιστωθεί ο γονότυπος και εμφανίζονται με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Στην γέλη φορτώνονται 20 μl δείγματος. Τα δείγματα με ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C δεν πέπτονται και άρα στην γέλη εμφανίζεται μια μπάντα, ίδια με της PCR, σε μέγεθος 132 ζεύγη βάσεων. Η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G δημιουργεί θέση κοπής και στην γέλη φαίνονται 2 μπάντες μεγέθους 112 και 20 ζεύγη βάσεων. Η ετεροζυγωτία, δηλαδή γονότυπος AG δημιουργεί 3 μπάντες με μεγέθη 132, 112 και 20 ζεύγη βάσεων.

3) *CASP10(rs13006529)*

Χρησιμοποιείται το ένζυμο SspI της εταιρίας Biolabs. Το wild type του γονιδίου είναι ο γονότυπος TT. Αν το δείγμα έχει γονότυπο AA δεν δημιουργείται θέση κοπής ενώ άμα κάποιο από τα αλληλόμορφα είναι θυμίνη δημιουργείται θέση κοπής ως εξής:

5'....AAT/ATT....3'

3'...TTA/TAA....5'

Το μείγμα της πέψης αποτελείται από 8μl προϊόν της PCR, 2μl buffer, 1μl BstUI και συμπλήρωση νερού ώστε το μείγμα να έχει τελικό όγκο 20 μl. Έπειτα, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 3 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αгарόζης 3% προκειμένου να διαπιστωθεί ο γονότυπος και εμφανίζονται με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Στην γέλη φορτώνονται 20 μl δείγματος. Τα δείγματα με ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A δεν πέπτονται και άρα στην γέλη εμφανίζεται μια μπάντα, ίδια με της PCR, σε μέγεθος 122 ζεύγη βάσεων. Η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T δημιουργεί θέση κοπής και στην γέλη φαίνονται 2 μπάντες μεγέθους 97 και 25 ζεύγη βάσεων. Η ετεροζυγωτία, δηλαδή γονότυπος AT δημιουργεί 3 μπάντες με μεγέθη 122, 97 και 25 ζεύγη βάσεων.

2.4 Στατιστική Ανάλυση

Οι ασθενείς και οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη γενετικής συσχέτισης δεν σχετίζονταν μεταξύ τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), εφαρμόζοντας το προσθετικό μοντέλο. Χρησιμοποιήθηκε το τεστ Chi square (χ^2), είτε για έναν ή για δύο βαθμούς ελευθερίας ή η ακριβής δοκιμασία Fisher, για να εξεταστούν οι διαφορές των συχνοτήτων των γονότυπων αλλά και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Το $p < 0.05$ ορίστηκε ως στατιστικά σημαντικό. Υπολογίστηκαν επίσης τα odd ratios (OR) για διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% που αντιπροσωπεύουν την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης της νόσου ανάλογα με το γονότυπο ή κάποιο αλληλόμορφο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ο ρόλος του πολυμορφισμού *rs1045485* του γονιδίου *Caspase 8* στην *ITP*

Στην περίπτωση του *rs1045485* SNP του γονιδίου *Caspase 8* δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση σε επίπεδο αλληλομόρφων με την *ITP*, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1 ($p=0.117$, OR = 2.071. CI 95% 0.882-4.865).

Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ούτε σε επίπεδο γονοτύπων, όπως φαίνεται στον ίδιο πίνακα.

3.2 Ο ρόλος του πολυμορφισμού *rs13006529* του γονιδίου *Caspase 10* στην *ITP*

Στην περίπτωση του *rs13006529* SNP του γονιδίου *Caspase 10* αποκαλύφθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα του αλληλόμορφου T μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ($p=0.037$, OR = 4.786, CI 95% 1.068-21.460) (Πίνακας 2). Όπως φαίνεται στον ίδιο πίνακα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο γονοτύπων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων

3.3 Ο ρόλος του πολυμορφισμού *rs2234767* του γονιδίου *FAS* στην *ITP*

Στην περίπτωση του *rs2234767* SNP του γονιδίου *FAS* δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση σε επίπεδο αλληλομόρφων με την *ITP*, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 ($p=0.839$, OR = 1.122, CI 95% 0.493-2.553).

Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ούτε σε επίπεδο γονοτύπων, όπως φαίνεται στον ίδιο πίνακα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΙΤΡ αποτελεί μία σπάνια αυτοάνοση ασθένεια. Προκύπτει λόγω μίας ασυνήθιστης απόκρισης των Τ κυττάρων και είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η απόκριση υποστηρίζεται από τα ηπατικά Τ βοηθητικά κύτταρα τα οποία ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των Β κυττάρων. Τα αντισώματα που δημιουργούν ενεργοποιούν την φαγοκυττάρωση των αιμοπεταλίων από τα μακροφάγα, ειδικά στον σπλήνα. Τα μακροφάγα συμβάλλουν στην διαιώνιση της αυτοάνοσης αυτής απόκρισης ως τα κύρια αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα κατά την διάρκεια της νόσου. Τα CD8⁺ Τ κύτταρα επίσης συμβάλλουν στην θρομβοπενία, αυξάνοντας την απόπτωση των αιμοπεταλίων.

Εκτός της καταστροφής των αιμοπεταλίων στην περιφέρεια, η ακατάλληλη παραγωγή στον μυελό των οστών επιδεινώνει την θρομβοπενία, λόγω της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των μεγακαρυοκυττάρων. Τέλος, κατά την διάρκεια της νόσου, τα επίπεδα της θρομβοποιητίνης, η οποία αποτελεί τον κύριο παράγοντα ανάπτυξης των μεγακαρυοκυττάρων, είναι χαμηλά.⁽²⁵⁾

Η ΙΤΡ μπορεί να χωριστεί κλινικά σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση, που αποκαλείται νεοδιαγνωσθέντα ορίζεται η διάρκεια των πρώτων τριών μηνών από την διάγνωση της νόσου. Η δεύτερη φάση (εμμένουσα) αναφέρεται στα συμπτώματα που διαρκούν από τον τρίτο έως και δωδέκατο μήνα από την διάγνωση της νόσου και η τρίτη και τελευταία φάση (χρόνια) αφορά τα συμπτώματα που επιμένουν για πάνω από δώδεκα μήνες μετά την πρώτη διάγνωση της νόσου. Η οξεία ΙΤΡ ένας όρος που χαρακτήριζε την νόσο κυρίως στα παιδιά, τώρα αναφέρεται ως νεοδιαγνωσθέντα. Η νόσος χαρακτηρίζεται σοβαρή όταν είναι απαραίτητη η ενεργή παρέμβαση για να θεραπευθούν αιμορραγικά συμπτώματα.⁽²⁶⁾

Η απόπτωση είναι μία ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου.⁽²⁷⁾ Αποτελεί μία σημαντική διαδικασία για θηλαστικά με μακροζωία καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την ομοιόσταση του οργανισμού, αφού αποκλείει τα μη απαραίτητα κύτταρα.⁽²⁸⁾ Αντίθετα με την νέκρωση, που είναι μία τραυματική εκδοχή του κυτταρικού θανάτου, η απόπτωση περιλαμβάνει λογικές αποφάσεις εξάλειψης συγκεκριμένων κυττάρων προς πλεονέκτημα του οργανισμού.⁽²⁷⁾ Στην απόπτωση, κύριοι στόχοι αποτελούν μολυσμένα ή προβληματικά εμπύρηννα κύτταρα. Εξαιρέση σε αυτό, αποτελούν τα αιμοπετάλια τα οποία, παρόλο που είναι απύρηννα, έχει δεχθεί

ότι εμπεριέχουν τα απαραίτητα στοιχεία για το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, το οποίο καθορίζει την επιβίωση και το προσδόκιμο ζωής τους.⁽²⁹⁾

Η απόπτωση χωρίζεται σε δύο μονοπάτια, το ενδογενές και το εξωγενές και ρυθμίζεται κυρίως από κασπάσες, μία ειδική ομάδα πρωτεασών.⁽²⁸⁾ Η κατανόηση των μηχανισμών της απόπτωσης είναι σημαντική, καθώς διαδραματίζει κύριο ρόλο στην παθογένεση πολλών ασθενειών.⁽³⁰⁾ Υπερβολική απόπτωση συναντάται σε περιπτώσεις στειρότητας, ανοσοανεπάρκειες καθώς και σε οξείες ή χρόνιες εκφυλιστικές νόσους. Καθυστερημένη ή ανασταλμένη απόπτωση βρίσκεται σε περιπτώσεις καρκίνων ή αυτοανοσίας.⁽²⁸⁾

4.1 FAS

Το Fas είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που εκφράζεται από την οικογένεια γονιδίων του παράγοντα νέκρωσης όγκων. Η απόπτωση των Β και Τ λεμφοκυττάρων ξεκινάει μέσω της αλληλεπίδρασης του δεσμευτή του Fas με το Fas. Το Fas μεταδίδει το σήμα θανάτου μέσω του τομέα θανάτου που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος είναι το σημείο πρόσδεσης για πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις κασπάσες και έτσι ξεκινάει ο καταρράκτης της απόπτωσης. Το μονοπάτι της απόπτωσης Fas/FasL έχει δύο βασικούς ρόλους: την εξάλειψη αχρείαστων και πιθανώς βλαβερών λεμφοκυττάρων και την εξόντωση κυττάρων που έχουν προσβληθεί με ιό.⁽³¹⁾

Η αλληλεπίδραση του Fas με τον δεσμευτή του έχει χαρακτηριστεί ως το κλειδί του εξωγενούς μονοπατιού που σχετίζεται με την απόπτωση των λεμφοκυττάρων, μία σημαντική διαδικασία για την ανοσολογική ανοχή και ομοιόσταση.

Σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο, έχει βρεθεί ότι διάφορα γονίδια που σχετίζονται με το Fas/FasL μονοπάτι έχουν συσχέτιση με την εμφάνιση της νόσου. Η πλειονότητα των ασθενών έχουν γενετικές μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία στο γονίδιο FAS που σχετίζονται με φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης και κληρονομούνται με κυρίαρχο σωματικό τρόπο.

Σε ασθενείς με ομόλογη μετάλλαξη A>G η υψηλά συντηρημένη ασπαραγίνη αντικαθίσταται με σερίνη στην θέση 266 της πρωτεΐνης του τομέα θανάτου. Παρόλα αυτά, βρέθηκε ότι η αντικατάσταση αυτή δεν επηρεάζει την έκφραση του Fas. Ωστόσο, στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του FADD ήταν μειωμένα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.⁽³²⁾

Ένας πιθανός ρόλος του Fas στην ITP προτείνεται από τον ρόλο που διαδραματίζει το μόριο αυτό στο ALPS. Στην σπάνια αυτή ασθένεια που προκαλείται από γενετικές ελλείψεις στην λειτουργία του Fas, η χρόνια αυτοάνοση θρομβοπενία είναι μία συχνή εκδήλωση. Ωστόσο, σε ένα σημαντικό υποπληθυσμό των ασθενών με ITP βρέθηκε ελαττωματική λειτουργία του Fas χωρίς όμως να υπάρχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του.^(33,4)

Σε μία πρόσφατη μελέτη 130 ασθενών με ITP αναγνωρίστηκαν δύο πιθανώς λειτουργικές μεταλλάξεις στο γονίδιο FAS που μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου. Όμως, οι μεταλλάξεις αυτές αφορούσαν τους πολυμορφισμούς rs56006128 και rs753487267 του γονιδίου FAS αλλά όχι τον πολυμορφισμό rs2234767 που μελετήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία.⁽³⁴⁾

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού rs2234767 του γονιδίου *FAS* με βάση την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν βρέθηκε συσχέτιση με την Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής ούτε σε επίπεδο αλληλομόρφων ούτε σε επίπεδο γονοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, σε 30 ασθενείς οι 25 είχαν γονότυπο AG και οι 5 γονότυπο AG ή GG. Οι μάρτυρες ήταν 48 με γονότυπο AA και 12 με γονότυπο AG ή GG. Για τους γονοτύπους το p-value ήταν ίσο με 0,782, δηλαδή μεγαλύτερο από το όριο του 0,05 που χρειάζεται για να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά. Σε επίπεδο αλληλομόρφων τα 50 από τα 60 αλληλόμορφα στην ομάδα ασθενών ήταν A ενώ τα 10 υπολειπόμενα ήταν G. Για την ομάδα μαρτύρων τα 98 από τα 120 αλληλόμορφα ήταν A και τα υπόλοιπα 22 ήταν G. Στην σύγκριση αλληλομόρφων δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά με το p-value να είναι ίσο με 0,839.

4.2 CASP8

Οι κασπάσες εκφράζονται από μία οικογένεια γονιδίων που είναι σημαντικά για την διατήρηση της ομοιόστασης, μέσω της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου και φλεγμονής. Οι κασπάσες είναι ενδοπρωτεάσες που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς σε μία αντίδραση που εξαρτάται από καταλυτικά υπολείμματα κυστεΐνης στο ενεργό μέρος της κασπάσης και προκύπτει μόνο μετά την ύπαρξη ασπαρτικού οξέος στο υπόστρωμα.⁽³⁵⁾

Η κασπάση 8 είναι μία ειδική πρωτεάση που ενεργοποιεί το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι, ως απάντηση στην ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου επιφανείας.⁽³⁶⁾

Η αναστολή της απόπτωσης θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα ορόσημα στην καρκινογένεση. Η αναστολή αυτή θα μπορούσε να προκληθεί από την απενεργοποίηση του γονιδίου της κασπάσης 8 μέσω διάφορων μηχανισμών που συμπεριλαμβάνουν μεταλλάξεις, επιγενετικές αλλαγές, λάθη στην μεταγραφή και μεταμεταφραστικές αλλαγές. Σε μελέτες που χρησιμοποίησαν αλληλούχιση νέας γενιάς φάνηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της κασπάσης 8 παρατηρούνται στο 7-34% των ασθενών με καρκίνωμα εγκεφάλου και τραχήλου.⁽³⁷⁾

Μεταλλάξεις απενεργοποίησης στο CASP8 είναι ικανές να επιφέρουν κλωνική ανάπτυξη και αυξημένη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και έχουν περιγραφεί σε μελέτες έκφρασης της κασπάσης 8. Οι μελέτες αυτές χρησιμοποίησαν δείγματα από ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, οστεοβλάστωμα, νευροβλάστωμα, καρκίνο εγκεφάλου, καρκίνο του προστάτη κ.α.⁽³⁶⁾

Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο της κασπάσης 8 στον καρκίνο του μαστού και ειδικότερα ο πολυμορφισμός rs1045485 θεωρείται σημαντικός στην αιτιολογία του καρκίνου αυτού. Τα συνολικά αποτελέσματα δείχνουν μία σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού αυτού με μειωμένη πιθανότητα παθογένεσης του καρκίνου του μαστού.⁽³⁸⁾ Ο πολυμορφισμός D302H επιφέρει την αλλαγή ασπαρτικού οξέως προς ιστιδίνη και το αναμενόμενο θα ήταν να επηρεαστεί η λειτουργία της κασπάσης 8 και κατ'επέκταση οι μοριακές αλληλεπιδράσεις που επιφέρει η πρωτεάση. Ωστόσο, φαίνεται ότι το αλληλίο C σχετίζεται με μειωμένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και η συχνότητα του γονοτύπου GC είναι σημαντικά υψηλότερη σε υγιή άτομα συγκριτικά με ασθενείς με καρκίνο του μαστού.⁽³⁹⁾

Άλλη μία σημαντική διεργασία στην οποία λαμβάνει μέρος η κασπάση 8 είναι η αρνητική επιλογή, που περιλαμβάνει την καταστροφή αυτοκαταλυόμενων T και B κυττάρων, και είναι απαραίτητη για την αποφυγή της αυτοανοσίας.⁽³⁶⁾ Μία μεταλλαγή

σε ομοζυγωτία στο γονίδιο της κασπάσης 8 αποτρέπει την καταστροφή των T και B κυττάρων και οδηγεί σε ένα σύνδρομο ALPS-like με σημαντική διαφορά την ανοσοανεπάρκεια. Η απουσία της αυτοανοσίας ξεχωρίζει το σύνδρομο αυτό από το κλασικό ALPS.⁽⁴⁰⁾ Στην πρόσφατη βιβλιογραφία δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση του CASP8 με αυτοανοσία, πράγμα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Για τον πολυμορφισμό rs1045485 του γονιδίου CASP8 δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την σύγκριση της ομάδας ασθενών με την ομάδα μαρτύρων ούτε σε επίπεδο γονότυπων ούτε σε επίπεδο αλληλομόρφων. Πιο συγκεκριμένα, σε 30 ασθενείς οι 22 εμφάνισαν γονότυπο CC και οι 8 γονότυπο CG ή GG. Στην ομάδα ελέγχου με 60 μάρτυρες οι 32 είχαν γονότυπο CC και οι 28 γονότυπο CG ή GG. Με την σύγκριση των δύο ομάδων το p-value ήταν μεγαλύτερο του 0,05 και ισούταν με 0,074. Σε επίπεδο αλληλομόρφων, στην ομάδα ασθενών υπήρχαν 52 C αλληλόμορφα και 8 G αλληλόμορφα. Στην ομάδα μαρτύρων αντίστοιχα 91 C και 29 G. Μετά την στατιστική ανάλυση το p-value βρέθηκε ίσο με 0,117.

4.3 CASP10

Η κασπάση 10 αποτελεί ένα ομόλογο μόριο της κασπάσης 8 και είναι μία υψηλά διατηρημένη κασπάση κατά την διάρκεια της εξέλιξης παρόλο που απουσιάζει από τα τρωκτικά. Ο ρόλος της, μαζί με την κασπάση 8 εντοπίζεται κυρίως στο εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, μέσω της ενεργοποίησης του DISC. Μεταξύ άλλων, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που καταδεικνύουν τον ρόλο της κασπάσης 10 στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης που ενεργοποιείται κυρίως μέσω κυτταροτοξικών φαρμάκων.⁽³⁵⁾

Άλλος ένας μη αναμενόμενος ρόλος της κασπάσης 10 φαίνεται να είναι η ενεργοποίηση του NF-κB για την επιβίωση των κυττάρων. Φαίνεται επίσης ότι η κασπάση 10 επάγει το γονίδιο του DISC ανεξάρτητα της σηματοδότησης ενεργοποίησης του NF-κB. Τα δεδομένα αυτά φανερώνουν την κασπάση 10 ως αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού θανάτου μέσω της κασπάσης 8 και ως επαγωγέα για τα γονίδια των κυττάρων CD95 (Fas ligand).⁽¹⁶⁾

Με βάση τον ρόλο της κασπάσης 10 στην απόπτωση, μελέτες έχουν αποδείξει ότι μεταλλάξεις αποσιώπησης στο γονίδιο της έχουν συσχετισθεί με διάφορους καρκίνους όπως για παράδειγμα λέμφωμα non-Hodgkin, γαστρικό καρκίνωμα και καρκίνο του πνεύμονα. Επιγενετικές αποσιωπήσεις της κασπάσης 10 έχουν επίσης αναφερθεί σε όγκους παιδικής ηλικίας και σε οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία.

⁽¹⁸⁾ Σπάνιες μεταλλάξεις στο CASP10 έχουν επίσης αναφερθεί σε περιπτώσεις Οξείας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας Τ σειράς και σε πολλαπλό μυέλωμα.⁽³⁵⁾ Παράλληλα, έχει βρεθεί συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου της κασπάσης 10 με το αυτοάνοσο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο.⁽⁴¹⁾

Μέχρι σήμερα μόνο δύο μεταλλάξεις του CASP10 έχουν αναδειχθεί ως παθογενετικές και είναι η μετάλλαξη I406L και L258F. Ωστόσο, σε μία πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός L522I μπορεί να διαδραματίζει καίριο ρόλο στην δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε περιπτώσεις ασθενών με ALPS.⁽¹⁹⁾ Όσον αφορά την μετάλλαξη αυτή, άλλη μία μελέτη την ενοχοποιεί στην περίπτωση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας ενώ φαίνεται ότι ο άγριος τύπος του πολυμορφισμού δεν σχετίζεται με την παθογένεση της ασθένειας.⁽⁴²⁾

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου CASP10 δεν αποκαλύφθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο γονοτύπων. Πιο συγκεκριμένα, σε πληθυσμό 30 ασθενών οι 28 είχαν γονότυπο AA και οι υπόλοιποι 2 είχαν γονότυπο AA ή AT. Στην ομάδα ελέγχου, από τα 60 υγιή άτομα οι 49 είχαν

γονότυπο AA και οι υπόλοιποι 11 είχαν γονότυπο AA ή AT. Μετά την σύγκριση των δύο ομάδων το p-value ήταν ίσο με 0,206. Σε επίπεδο αλληλομόρφων βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την συχνότητα του αλληλομόρφου T μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, η ομάδα ασθενών είχε 58 αλληλόμορφα A από τα 60 και τα υπόλοιπα 2 ήταν T αλληλόμορφα. Στην ομάδα μαρτύρων τα 103 από τα 120 αλληλόμορφα ήταν A ενώ τα υπόλοιπα 17 ήταν T. Με την σύγκριση των αποτελεσμάτων το p-value ήταν ίσο με 0,037, δηλαδή μικρότερο της τιμής 0,05 η οποία τίθεται ως όριο στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

4.4 Συσχέτιση Θρομβοπενίας Ανοσολογικής Αρχής με απόπτωση

Η ITP αποτελεί μία επίκτητη αιμορραγική δυσλειτουργία που χαρακτηρίζεται κυρίως από αριθμό αιμοπεταλίων <100000 και υψηλό κίνδυνο αιμορραγίας. Αντισώματα για τα αιμοπετάλια είναι γνωστό ότι προκαλούν θρομβοπενία σε ασθενείς με την νόσο αυτή, ωστόσο ανιχνεύονται μόνο στο 50-60% των περιπτώσεων. Τα μεγακαρυοκύτταρα παράγουν αιμοπετάλια στον μυελό των οστών. Η εξασθενημένη παραγωγή των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με ITP υποδηλώνει ότι ο μυελός των οστών μπορεί να διαδραματίζει παθολογικό ρόλο σε περιπτώσεις της νόσου.⁽⁴³⁾

Ο κυριότερος λόγος παθογένεσης της νόσου είναι η καταστροφή των αιμοπεταλίων και η μη φυσιολογική απόπτωση των μεγακαρυοκυττάρων. Ωστόσο, ο μηχανισμός που αφορά στην απόπτωση των μεγακαρυοκυττάρων χρειάζεται να αποσαφηνιστεί. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει ότι η αλλαγμένη μορφολογία των μεγακαρυοκυττάρων σε ασθενείς με ITP μπορεί να προκαλεί ενδοπλασματικό στρες στα κύτταρα και έτσι να οδηγεί στον θάνατο των κυττάρων μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας ή της απόπτωσης.⁽⁴⁵⁾ Όπως και σε πολλά αιματολογικά κύτταρα, η δημιουργία, ανάπτυξη και επιβίωση των μεγακαρυοκυττάρων εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα του ενδογενούς αποπτωτικού μονοπατιού. Η ενδογενής απόπτωση στηρίζεται στα μιτοχόνδρια και είναι εξαρτημένη από την ενεργοποίηση του Bcl-2 και της κασπάσης 3.⁽⁴²⁾

Η παραγωγή των αιμοπεταλίων βασίζεται στην ενεργοποίηση κασπασών στα μεγακαρυοκύτταρα, ειδικά της κασπάσης 3, που οδηγεί στην απόπτωση. Αυτό αποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση της κασπάσης είναι υπεύθυνη για την αυτοφαγία των μεγακαρυοκυττάρων, η οποία επηρεάζει την διαδικασία της απόπτωσης. Τα αποπτωτικά μονοπάτια που ακολουθούν τα μεγακαρυοκύτταρα έχει αποδειχθεί ότι είναι και εξωγενή, ενώ μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ως αμιγώς ενδογενή. Απαραίτητη για την ενεργοποίηση και των δύο μονοπατιών είναι η συμμετοχή του Bcl-2.⁽⁴⁴⁾ Έχει αποδειχθεί ότι η παθογένεση της ITP σχετίζεται με την απόπτωση των αιμοπεταλίων. Τα παρατηρηθέντα αποπτωτικά συμβάντα των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με το σύνδρομο συμβάλλουν στην θρομβοπενία. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταρρακτώδης και ξεκινάει με την πρόσληψη ενός σήματος θανάτου, την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση κασπασών που θα επιφέρουν εν τέλει τον θάνατο των αιμοπεταλίων.⁽⁴⁵⁾

Τέλος, πρόσφατα στοιχεία αναδεικνύουν την ικανότητα των αιμοπεταλίων να επάγουν την απόπτωση μέσω της οδού Fas/FasL.⁽⁴²⁾

Ως τώρα, η αυξημένη απόπτωση των αιμοπεταλίων έχει χαρακτηριστεί ως παθογενετικός παράγοντας για την ΙΤΡ. Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης που έχει εφαρμογή στα αιμοπετάλια είναι καλά χαρακτηρισμένο.⁽⁴⁶⁾ Η έκφραση του υποστρώματος Bid που ενεργοποιείται από την κασπάση 10 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της κασπάσης 9.⁽⁴⁷⁾ Επίσης, η έκφραση του υποστρώματος Bid των κασπασών έχει περιγραφεί ως ο βασικός σύνδεσμος μεταξύ των δύο βασικών μονοπατιών της απόπτωσης.⁽⁴⁸⁾ Παράλληλα, η έκφραση της κασπάσης 10 και 8 έχει βρεθεί ότι είναι αυξημένη στα αιμοπετάλια που είναι πρόσφατα στην κυκλοφορία.⁽⁴⁶⁾ Άλλο ένα δεδομένο που θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί, είναι ότι η κασπάση 10 έχει χαρακτηριστεί ως βασική για την ζωτικότητα των κυττάρων του μυελώματος και έχει αναδειχθεί ένα μοριακό μονοπάτι που σχετίζεται με την αυτοφαγία. Η αναστολή της λειτουργίας της κασπάσης 10 σε κύτταρα του μυελώματος ενεργοποιεί έναν αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο, παρόμοιο με τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την αναστολή της κασπάσης 8 σε άλλους τύπους κυττάρων.⁽⁴⁹⁾

Επομένως, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 10⁽⁵⁰⁾, η κασπάση 10 φαίνεται να εμπλέκεται τόσο στο εξωγενές όσο και στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Επίσης, έχει βρεθεί συσχέτιση της κασπάσης 10 με την αυτοφαγία, γεγονός που μπορεί να εμπλέκεται στην αυτοφαγία των μεγακαρυοκυττάρων κατά την παραγωγή αιμοπεταλίων.

4.5 Περιορισμοί μελέτης και προτάσεις για μετέπειτα έρευνες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί την αρχή για μία πολλά υποσχόμενα έρευνα. Η περιορισμένη βιβλιογραφία όσον αφορά τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των γονιδίων *FAS*, *CASP8*, *CASP10* δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ειδικά για την συσχέτισή τους με την παθογένεση της Θρομβοπενίας Ανοσολογικής Αρχής η έρευνα είναι ελάχιστη. Κυρίως μετά την ανάδειξη της εμπλοκής των αιμοπεταλίων με το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης η περαιτέρω έρευνα για τα γονίδια αυτά καθίσταται απαραίτητη καθώς αποτελούν τα σημεία κλειδιά όσον αφορά το μονοπάτι αυτό⁽⁵¹⁾(Εικόνα 11).

Στην μελέτη αυτή δυστυχώς σημαντική τροχοπέδη αποτέλεσε ο χρόνος, καθώς με τους περιορισμούς που επιβλήθηκαν λόγω της πανδημίας Covid-19 ο αριθμός των δειγμάτων είναι πολύ μικρός. Επομένως, μελλοντικά σκόπιμο θα ήταν να μελετηθούν οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί σε μεγαλύτερο πληθυσμό. Ακόμα μία πρόταση για την εξέλιξη της έρευνας θα ήταν να διενεργηθούν μελέτες έκφρασης του γονιδίου της κασπάσης 10 στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα ασθενών με Θρομβοπενία Ανοσολογικής Αρχής, καθώς φαίνεται ότι η κασπάση αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του συνδρόμου.

5. Χρηματοδοτήσεις, συμβολή ερευνητών.

Για την εκπόνηση της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν πόροι από το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Αιματολογία-Ογκολογία Παιδιών και Εφήβων. Η έρευνα διεξήχθη κατά το τρίτο εξάμηνο σπουδών του προγράμματος αυτού.

Στην παρούσα μελέτη σημαντική ήταν η συμβολή αρκετών ερευνητών. Η Στειακάκη Ευτυχία, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης διαδραμάτισε καίριο ρόλο ως επιβλέπουσα καθηγήτρια της εργασίας. Ο Γουλιέλμος Γεώργιος, Καθηγητής Γενετικής (Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου με έμφαση στην Παθολογία) ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής έδωσε αμέριστη βοήθεια όσον αφορά την εκπόνηση των πειραμάτων. Η Ζερβού Μαρία (Βιολόγος M.Sc-Ph.D, μέλος ΕΔΙΠ) αποτέλεσε πολύτιμο συνεργάτη της έρευνας με την στατιστική ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τέλος, η Λούρου Μαριλένα (Βιολόγος, υποψήφια Διδάκτωρ, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του προγράμματος) έδωσε την πολύτιμη βοήθεια της τόσο κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και στην συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

6. Βιβλιογραφία

1. Margarita Pesmatzoglou, Marilena Lourou, George N. Goulielmos, Eftichia Stiakaki DNA Methyltransferase 3B Gene Promoter and Interleukin-1 Receptor Antagonist Polymorphisms in Childhood Immune Thrombocytopenia. *Clinical and Developmental Immunology* 2012;2012 DOI:10.1155/2012/352059
2. Gurpreet Singh, Deepak Bansal, Nicola A. M. Wright. Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies *Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies. The Indian Journal of Pediatrics.* 2019 DOI 10.1007/s12098-019-03155-4
3. Laura P et al. Fas apoptosis inhibitory molecules: more than death-receptor antagonists in the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 2016;2016(139): 11-21 DOI 10.1111/jnc.13729
4. Umberto D et al. 'Deficiency of the Fas Apoptosis Pathway Without Fas Gene Mutations in Pediatric Patients With Autoimmunity /Lymphoproliferation' *Blood*, Vol 89, No 8 (April 15), 1997: 2871-2879
5. Fioredda F et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and defective apoptosis due to CASP8/10 mutations: the role of mycophenolate mofetil. *Blood Advances.* 2019;2019(3): 3432-3435 DOI 10.1182/
6. Ελένη Παπαδάκη Αυτοάνοση Θρομβοπενία,. *Αίμα Τόμος 1 Τεύχος 2 Ιούλιος-Σεπτέμβριος 2010*
7. Peter J. Russell, «Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA», Κεφάλαιο 17, Βιβλίο «iGenetics : Μια μεντελική προσέγγιση», Έτος Έκδοσης: 2009
8. Mei Wang, Ping Su The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64:2, 93-102, DOI: 10.1080/19396368.2017.1422046
9. Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Masako Saito, Yasusei Kudo and Naozumi Ishimaru Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 2017:8(403) DOI: 10.3389/fimmu.2017.00403
10. Sudin M et al. "Immune" Thrombocytopenia as Key Feature of a Novel ADA2 Deficiency Variant : Implication on Differential Diagnostics of ITP in Children.

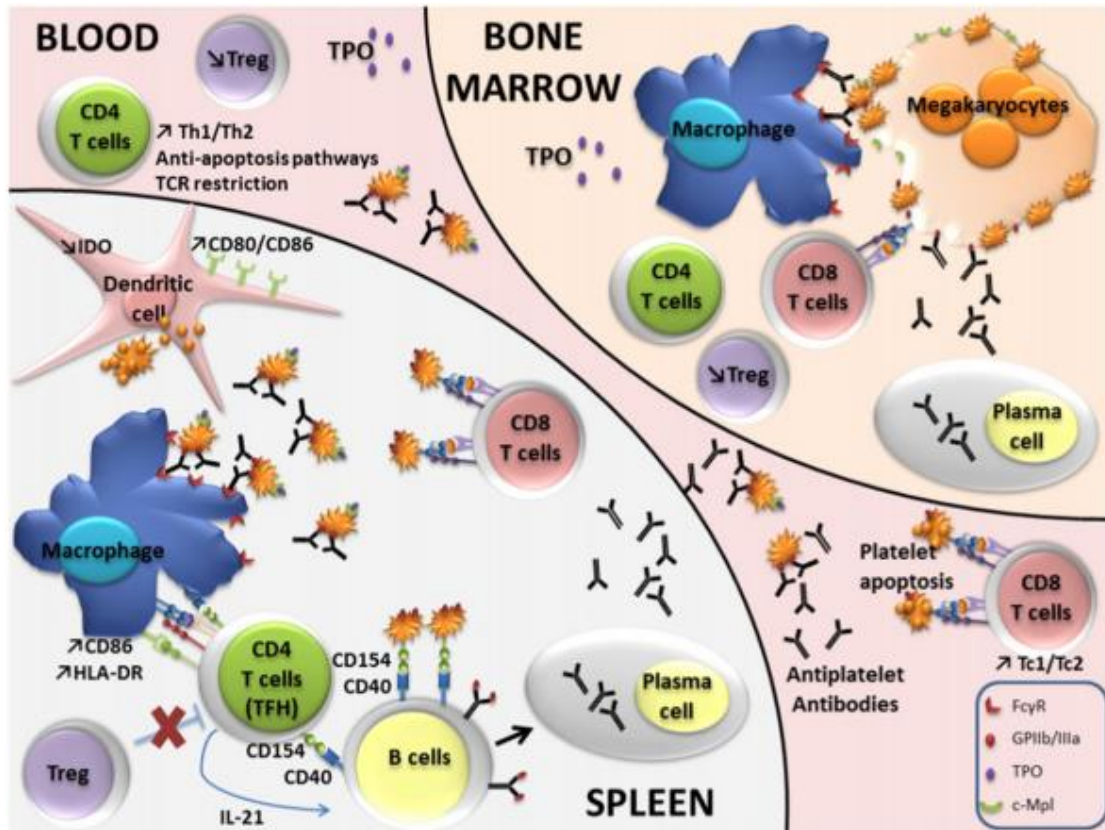
- Journal of Pediatric Hematology/Oncology 2019;41(2):155-157 DOI 10.1097/mpb.0000000000001132
11. Koneti Rao, Stephen Straus Causes and consequences of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. Hematology 2006;11(1): 15-23 DOI 10.1080/10245330500329094
 12. Bride K, Teachey D Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease [version 1; referees: 3 approved]. F1000 Research 2017;6:1-16 DOI 10.12688/f1000research.11545.1
 13. Mohammad Hashemia, Sajjad Aftab , Abdolkarim Moazeni-Roodid, Hosna Saranib , Emilia Wiechecf , Saeid Ghavami Association of CASP8 polymorphisms and cancer susceptibility: A metaanalysis. European Journal of Pharmacology, 2020:881 DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173201
 14. Prajwal Gurung , Thirumala-Devi Kanneganti Novel Roles for Caspase-8 in IL-1b and Inflammasome Regulation. The American Journal of Pathology, 2015:185(1) DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.08.025
 15. Yashoda Ghanekar, Subhashini Sadasivam In silico analysis reveals a shared immune signature in CASP8-mutated carcinomas with varying correlations to prognosis. PeerJ DOI: 10.7717/peerj.6402
 16. Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, Shao-Cong Sun NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy 2017: 2 DOI:10.1038/sigtrans.2017.23
 17. Sebastian Horn et al. Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8- Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF-κB Activation and Cell Survival. , Cell Reports 2017:19 (785–797) DOI:10.1016/j.celrep.2017.04.010
 18. Rajni Kumari, Ruhi S. Deshmukh, Sanjeev Das Caspase-10 inhibits ATP-citrate lyase-mediated metabolic and epigenetic reprogramming to suppress tumorigenesis. NATURE COMMUNICATIONS (2019) 10:4255 DOI: 10.1038/s41467-019-12194-6
 19. Maurizio Miano et al. FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. British Journal of Haematology, 2019, 187, 502–508 DOI: 10.1111/bjh.16098
 20. Berg M. Jeremy, Tymoczko L. John, Stryer Lubert. Απόδοση στα ελληνικά: Αλετράς Αλέξης, Βαλκανά Θεώνη, Δραΐνας Διονύσιος, et al. Βιοχημεία, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαια 6.1.2, 6.1.5 και 6.1.6.

21. Peter J. Russell, «Η τεχνολογία του ανασυνδρασμένου DNA», Κεφάλαιο 16, Βιβλίο «iGenetics : Μια μεντελική προσέγγιση», Έτος Έκδοσης: 2009
22. James D. Watson, Jan A. Witkowski, Richard M. Myers, Amy A. Caudy, «Βασικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδρασμένου DNA», Κεφάλαιο 4, Βιβλίο «ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟ DNA : ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ – ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ», Έτος Έκδοσης: 2007
23. Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, Yong Hoon Kimv, Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments DOI: 10.3791/3923
24. JI EUN OH et al. Mutational analysis of CASP10 gene in colon, breast, lung and hepatocellular carcinomas. Pathology, 2010;42 (73-76) DOI: 10.3109/00313020903434371
25. Sylvain Audia et al. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. Autoimmunity Reviews 16 (2017) 620–632 DOI: 10.1016/j.autrev.2017.04.012
26. Anne Zufferey et al. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). Journal of Clinical Medicine, 2017;6 DOI: :10.3390/jcm6020016
27. Xuebo Xu1, Yueyang Lai and Zi-Chun Hua Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Bioscience Reports (2019) 39 DOI:10.1042/BSR20180992
28. Claire M. Pfeffer and Amareshwar T. K. Singh Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 448; doi:10.3390/ijms19020448
29. Gang Deng et al. Investigation of platelet apoptosis in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. Hematology, 22:3, 155-161, DOI:10.1080/10245332.2016.1237004
30. Rebecca SY Wong Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2011, 30:87 <http://www.jeccr.com/content/30/1/87>
31. Stephen E. Straus et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. BLOOD, 1 JULY 2001 z VOLUME 98, NUMBER 1
32. Nourhen Agrebi et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by homozygous FAS mutations with normal or residual protein expression. J ALLERGY CLIN IMMUNOL JULY 2017

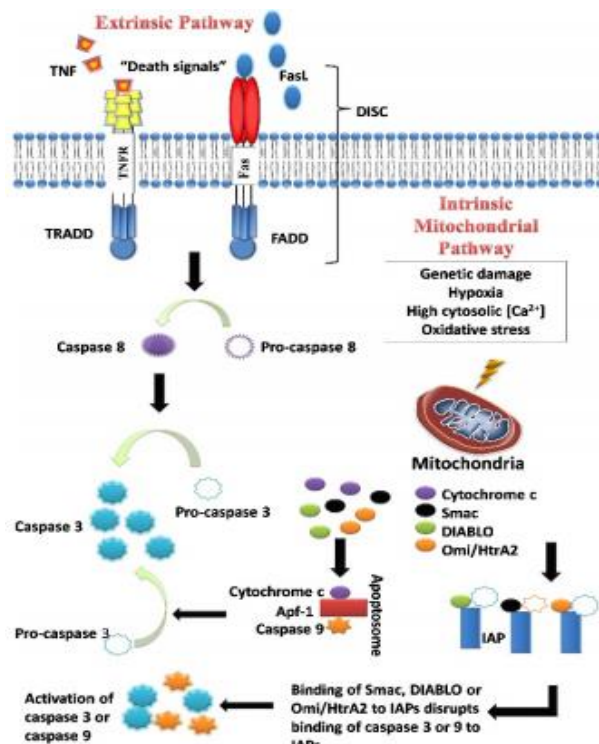
33. Elena Boggio et al. Decreased function of Fas and variations of the perforin gene in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 2017, 176, 258–267 doi: 10.1111/bjh.14248
34. Jana Vandrovcova et al. FAS mutations are an uncommon cause of immune thrombocytopenia in children and adults without additional features of immunodeficiency. *British Journal of Haematology*, 2019, 186, e163–e225 doi: 10.1111/bjh.15979
35. David R. McIlwain^{1,2}, Thorsten Berger¹, and Tak W. Mak Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008656 doi: 10.1101/cshperspect.a008656
36. Ranadip Mandal et al. Caspase-8: The double-edged sword. *BBA- Reviews on Cancer*, 2020 DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188357
37. Nora P. Goette et al. Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by AutoAntibodies. DOI:10.1371/journal.pone.0160563 August 5, 2016
38. YINLIANG ZHANG et al. A systematic analysis of the association studies between CASP8 D302H polymorphisms and breast cancer risk. *Journal of Genetics* 2017;96(2), DOI 10.1007/s12041-017-0774-y
39. Elham Vahednia et al. The Impact of CASP8 rs10931936 and rs1045485 Polymorphisms as well as the Haplotypes on Breast Cancer Risk: A Case-Control Study. *Clinical Breast Cancer* 2019;19(5) DOI: 10.1016/j.clbc.2019.02.011
40. Maria Francesca Campagnoli et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 2006; 91:538-541
41. Thomas Kühne Diagnosis and management of immune thrombocytopenia in childhood. *Hämostaseologie* 2017; 37: 36–44 doi: 10.5482/HAMO-16-06-0017
42. Kate McArthur, Stephane Chappaz, and Benjamin T. Kile Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*. 2018;131(6):605-610
43. Sabrina Shrestha et al. Platelet autoantibodies in the bone marrow of patients with immune thrombocytopenia. *Blood advances* 2020;4(13) DOI:10.1182/bloodadvances.2020001846.

44. ZHANSHU LIU and TONGHUA MEI Immune thrombocytopenia induces autophagy and suppresses apoptosis in megakaryocytes. MOLECULAR MEDICINE REPORTS 2018;18 4016-4022 DOI: 10.3892/mmr.2018.9373
45. Gang Deng et al. Investigation of platelet apoptosis in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. Hematology 2017, 22:3, 155-161, DOI:10.1080/10245332.2016.1237004
46. Valery Leytin Apoptosis in the anucleate platelet. Blood Reviews 2012;26 51-63 DOI:10.1016/j.blre.2011.10.002
47. Daolin Tang et al. The molecular machinery of regulated cell death. Cell Research (2019) 29:347–364; Doi:0.1038/s41422-019-0164-
48. Katherine Wachmann et al. Activation and Specificity of human Caspase-10. Biochemistry. 2010 September 28; 49(38): 8307–8315. doi:10.1021/bi100968m.
49. Laurence Lamy et al. Control of Autophagic Cell Death by Caspase-10 in Multiple Myeloma. Cancer Cell 2013; 23, 435–449, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.017
50. S Inoue, G Browne, G Melino and GM Cohen Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. Cell Death and Differentiation (2009) 16, 1053–1061 doi:10.1038/cdd.2009.29
51. Nadine Goelz et al. Platelets express adaptor proteins of the extrinsic apoptosis pathway and can activate caspase-8. Plos one (2021) 16:1 DOI:10.1371/journal.pone.0244848

7. Εικόνες και Πίνακες



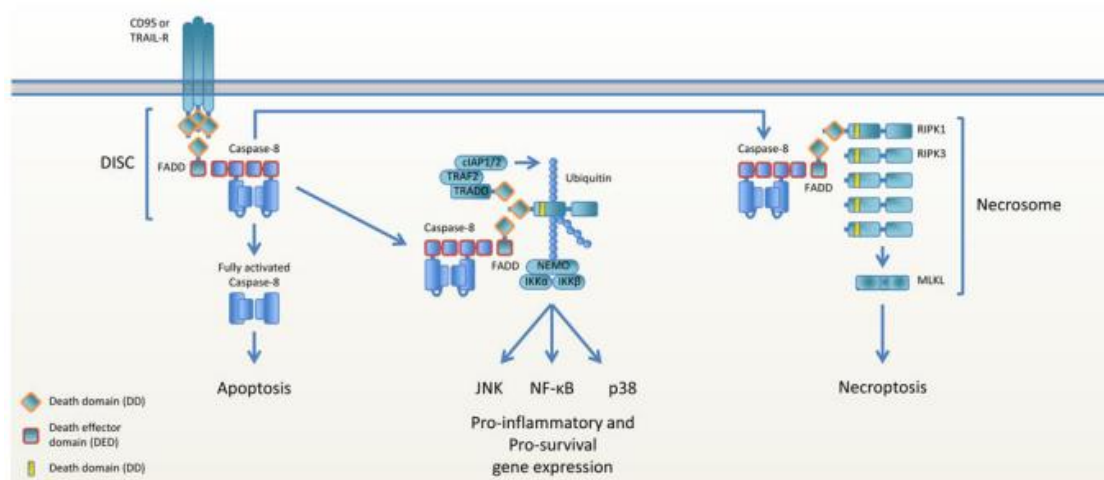
Εικόνα 1: Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί Θρομβοπενίας Ανοσολογικής Αρχής



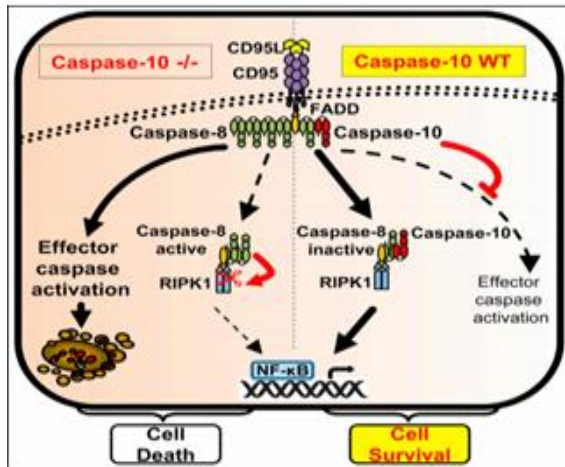
Εικόνα 2 Ενδογενές και εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης



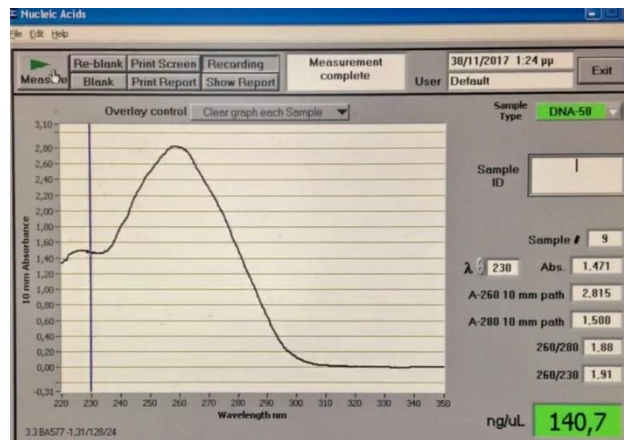
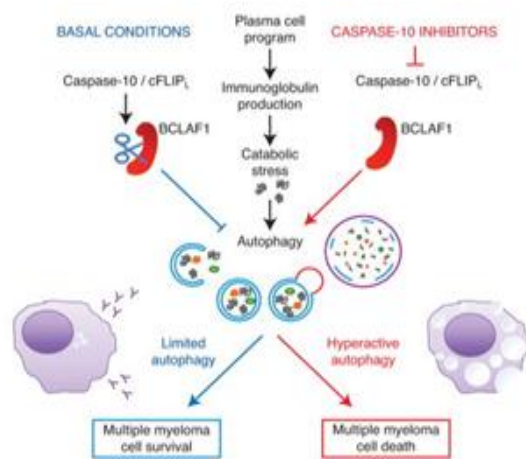
Εικόνα 3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι Fas/FasL



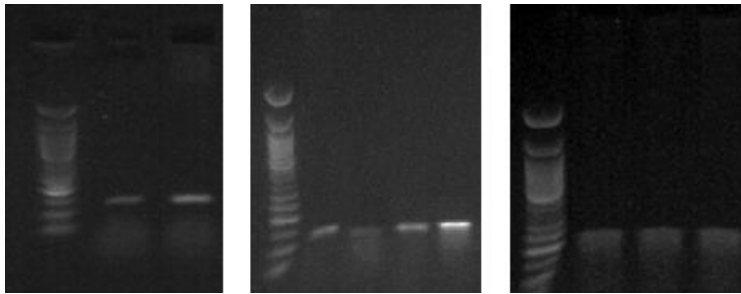
Εικόνα 4 Οι λειτουργίες της κασπάσης 8



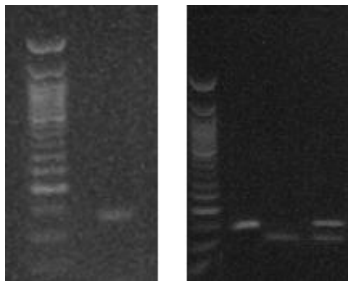
Εικόνα 5 Ρόλος της κασπάσης 10



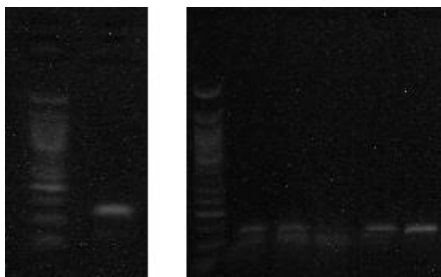
Εικόνα 6 NanoDrop (μηχάνημα και μέτρηση)



Εικόνα 7 FAS PCR και Πέψη (από αριστερά προς τα δεξιά PCR product 122bp, Πέψη AA 122bp, GG 130,19 bp AG 122,103,19 bp)



Εικόνα 8 CASP8 PCR και Πέψη (από αριστερά προς τα δεξιά PCR product 132bp, Πέψη CC 132bp, GG 112,20 bp, CG 132,112, 20bp)



Εικόνα 9 CASP10 PCR και Πέψη (από αριστερά προς τα δεξιά PCR product 122bp, Πέψη πρώτα 2 AT 122,97,25 bp, TT 97,25 bp και τελευταία 2 AA 122bp)

Πίνακας 1 Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs1045485 του γονιδίου *Caspase 8* σε 30 ασθενείς με ITP και 60 μάρτυρες

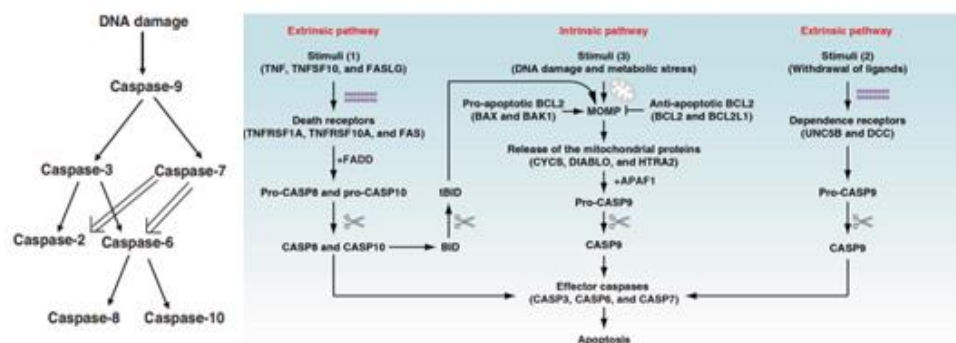
Genotypes CASP8	PATIENTS N=30	CONTROLS N=60	p-value	OR (95% CI)
CC	22	32		
CG + GG	8	28	p=0.074	0.927 (0.034-24.950)
Alleles	N=60	N=120		
C	52	91		
G	8	29	p=0.117	2.071 (0.882-4.865)

Πίνακας 2 Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου *Caspase 10* σε 30 ασθενείς με ITP και 60 μάρτυρες

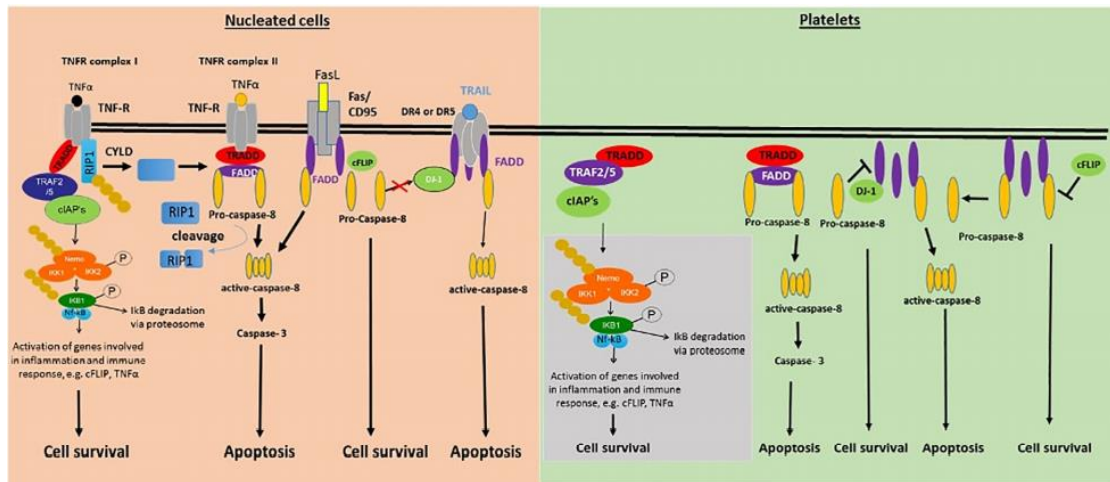
Genotypes CASP10	PATIENTS N=30	CONTROLS N=60	p-value	OR (95% CI)
AA	28	49		
AT + TT	2	11	p=0.206	3.143 (0.649-15.210)
Alleles	N=60	N=120		
A	58	103		
T	2	17	p=0.037	4.786 (1.068-21.460)

Πίνακας 3 Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs2234767 του γονιδίου *Fas* σε 30 ασθενείς με ITP και 60 μάρτυρες

Genotypes FAS	PATIENTS N=30	CONTROLS N=60	p-value	OR (95% CI)
AA	25	48		
AG + GG	5	12	p=0.782	1.250 (0.396-3.948)
Alleles	N=60	N=120		
A	50	98		
G	10	22	p=0.839	1.122 (0.493-2.553)



Εικόνα 10 Η κασπάση 10 στο ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης



Εικόνα 11 Πρωτεΐνες εξωγενούς μονοπατιού απόπτωσης στα αιμοπετάλια