



# ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΝΟΣΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ:

*Ανάλυση γονιδιακών πολυμορφισμών*

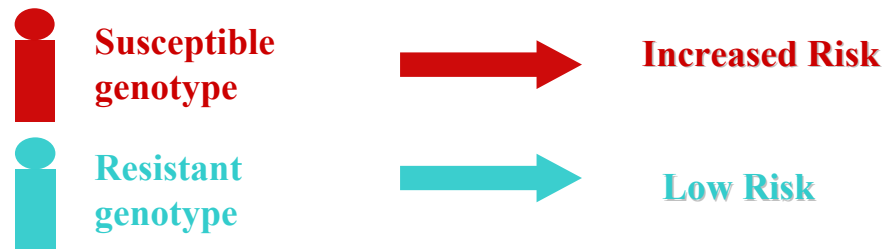
Σταυροπούλου Χρύσα, PhD



**Εργαστήριο Υγειοφυσικής & Περιβαλλοντικής Υγείας**  
Ινστιτούτο Πυρηνικής Τεχνολογίας & Ακτινοπροστασίας  
ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

# Γενετική προδιάθεση:

- ❖ Πώς το γενετικό υλικό (γονότυπος) επηρεάζει ή διαφοροποιεί την πιθανότητα εμφάνισης μίας νόσου στα άτομα ενός πληθυσμού



Όμοιοι κατά το 99,9% του γενετικού μας υλικού

## Γενετική ποικιλομορφία:

- ❖ Το 0,1% του γενετικού μας υλικού




**ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ**

# Γενετικοί Πολυμορφισμοί:

- ❖ **Αλλαγές** στην αλληλουχία του DNA (πολλαπλά αλληλόμορφα) που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%.

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ



*Αντικατάσταση μίας βάσης στο DNA  
(A, T, C, ή G)*  
Single Nucleotide Polymorphisms  
(SNPs)



*Ενθέσεις*  
Insertions



*Ελλείψεις*  
Deletions

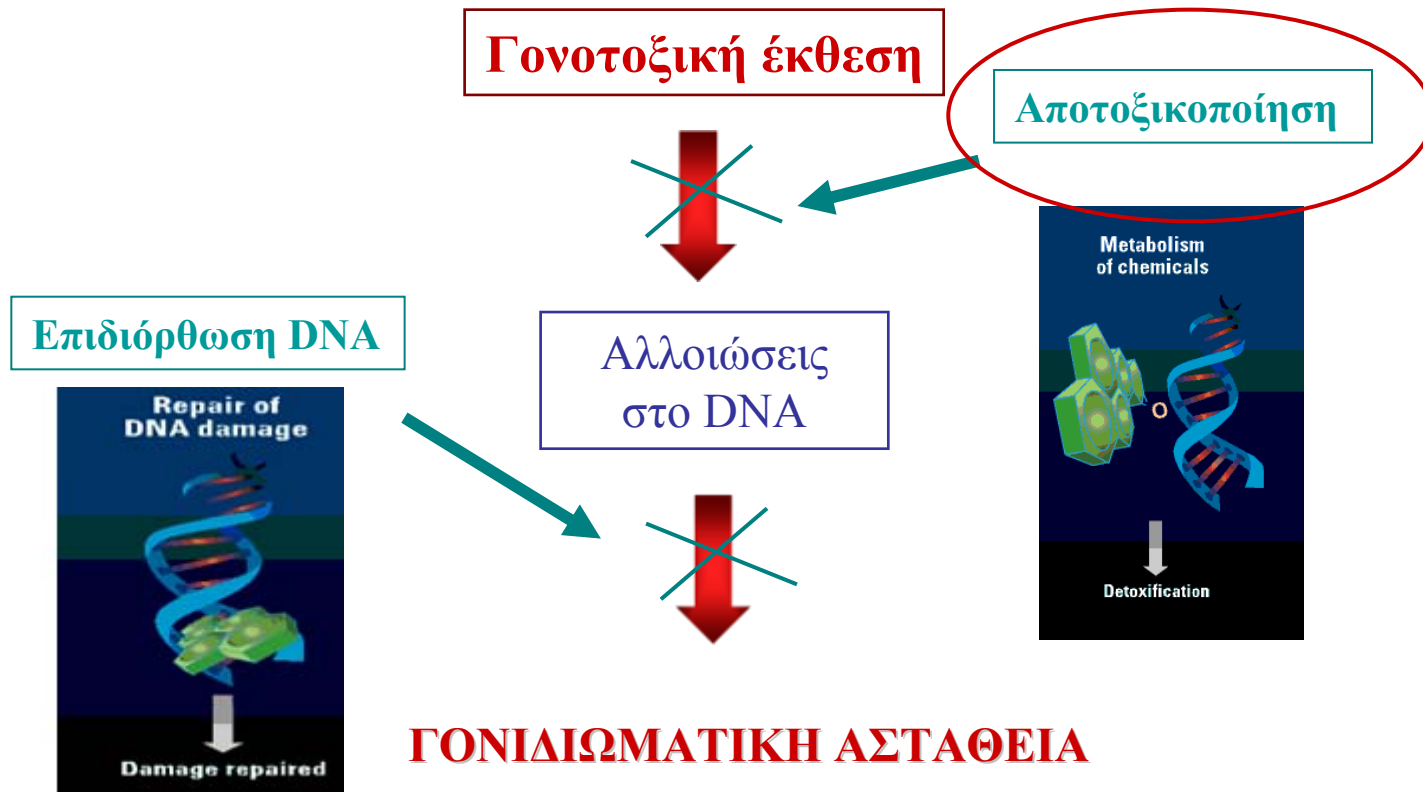
- ❖ Πληθώρα καταγεγραμμένων πολυμορφισμών (~1 SNP/1,250kb, ~2.5 Million SNPs) :

- ❖ Όταν εμπλέκουν περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούνται, μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στο άτομο.



**Γενετική Προδιάθεση**

Η αθροιστική δράση **γονοτοξικών περιβαλλοντικών** εκθέσεων εμπλέκεται στους μηχανισμούς παθογένεσης των «πολυπαραγοντικών» νόσων (π.χ. καρκίνος, νευρολογικές παθήσεις)



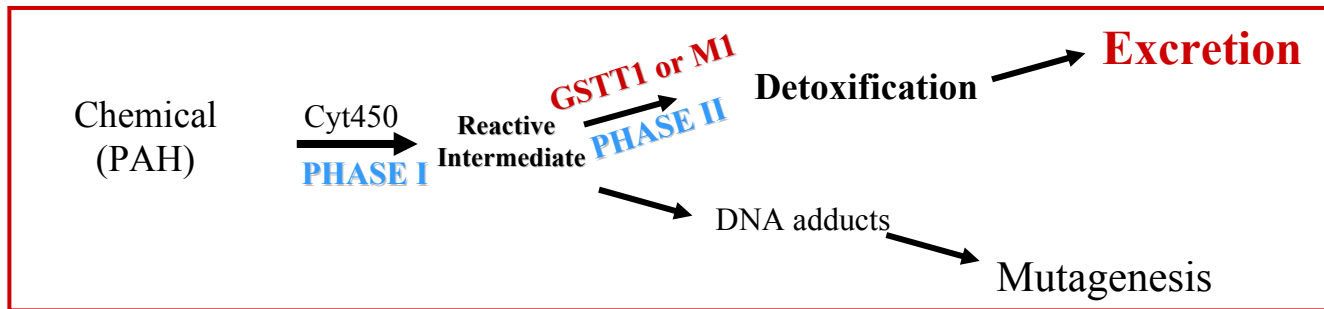
# Μηχανισμοί Αποτοξικοποίησης

❖ Επιστρατεύονται ομάδες γονιδίων που κωδικοποιούν «ένζυμα αποτοξικοποίησης»:

## Τρανσφεράσες της γλουταθειόνης T1 (GSTT1) και M1 (GSTM1) :

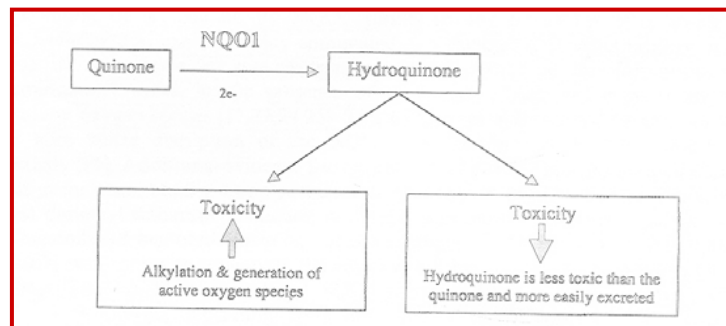
Ένζυμα-κλειδιά» της 2<sup>ης</sup> φάσης της κυτταρικής αποτοξικοποίησης (detoxification phase II).

Συμμετέχουν στην προστασία των κυττάρων από γονοτοξικούς ενδιάμεσους οξυγονομένους μεταβολίτες.



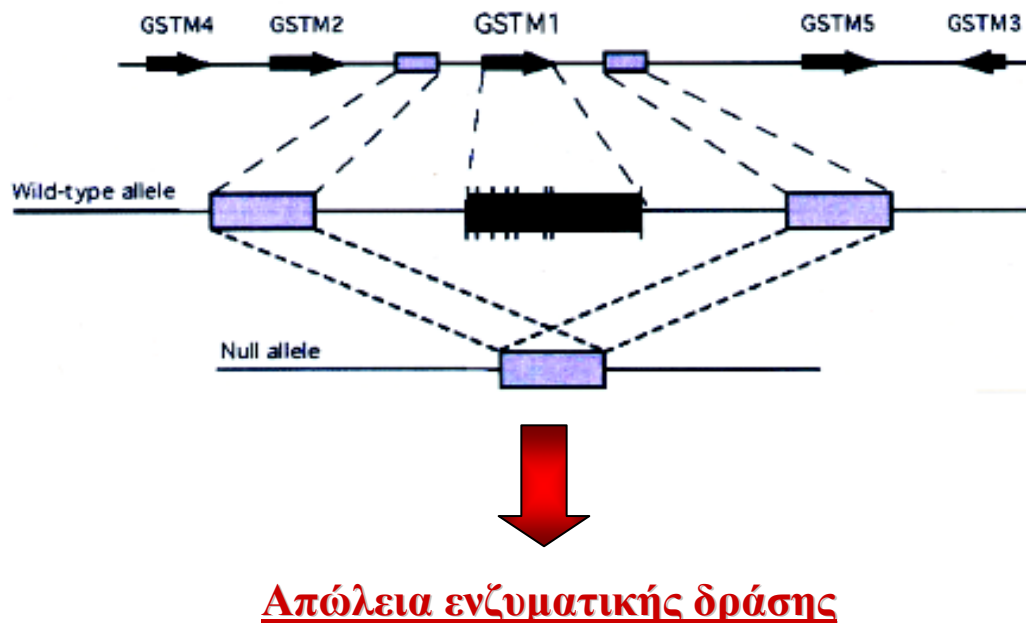
## Η οξειδοредουκτάση NAD(P)H-κινόνη (NQO1):

Εμπλέκεται στον μεταβολισμό του βενζολίου και των παραγόντων του (κινόνες, αμίνες, αζωτούχες ενώσεις) μετατρέποντάς τα σε υδροκινόνες που είναι λιγότερο τοξικές και απομακρύνονται ευκολότερα από το κύτταρο.



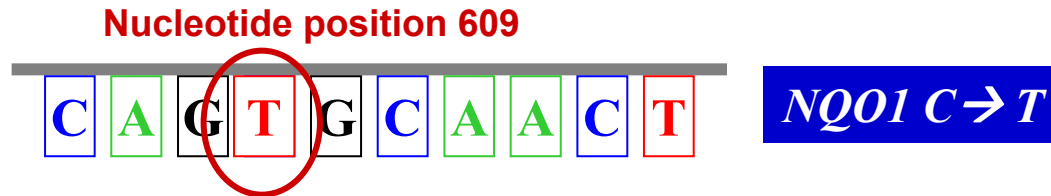
## Τα γονίδια GSTT1 και GSTM1

- ❖ Παρουσιάζουν πολυμορφισμό του τύπου **ολικής έλλειψης** (null genotype).



## Το γονίδιο NQO1:

- ❖ Παρουσιάζει πολυμορφισμό του τύπου **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism)



- ❖ Άτομα **ετερόζυγα (C/T)** παρουσιάζουν μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου NQO1 ενώ άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό σε **ομόζυγη κατάσταση (T/T)** παρουσιάζουν ολική απώλεια της δράσης NQO1.

- ❖ Συνέπεια των πολυμορφισμών είναι άτομα του πληθυσμού να διαφέρουν ως προς την **ικανότητά** τους να **μεταβολίσουν** και να **αποβάλλουν** γονοτοξικές ουσίες.



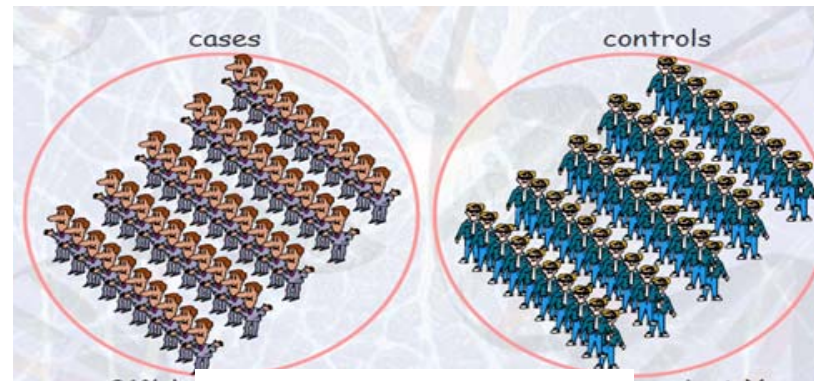
Άτομα «γενετικά προδιαθετημένα» για την εμφάνιση νόσου ;

# Γονοτυπικές μελέτες των πολυμορφισμών στα γονίδια GSTT1, GSTM1 και NQO1:

❖ Αιματολογικά νοσήματα → Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (ΜΔΣ)

❖ Νευρολογικά νοσήματα → Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ)

➤ Διερεύνηση του ρόλου των πολυμορφισμών στην **προδιάθεση** εμφάνισης στον Ελληνικό πληθυσμό με μελέτες ασθενών – μαρτύρων (Case-Control Studies).



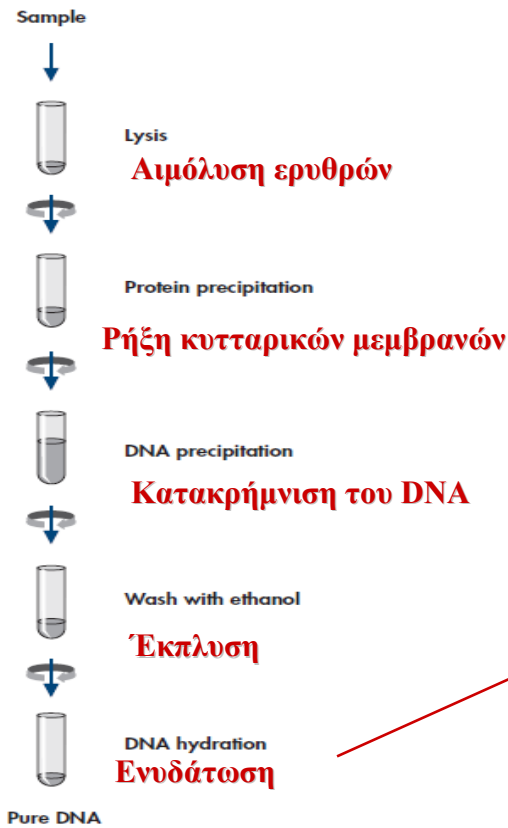
**Case-Control Studies**

➤ **Συσχετισμός** του γονοτύπου με παραμέτρους όπως τα κλινικά χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία) και τις κυτταρογενετικές υποομάδες.



# Υλικό και Μέθοδοι

❖ Δείγματα μυελού των οστών ασθενών με πρωτοπαθές ΜΔΣ, περιφερικού αίματος ασθενών με ΠΣ και περιφερικού αίματος υγιών δοτών (controls).



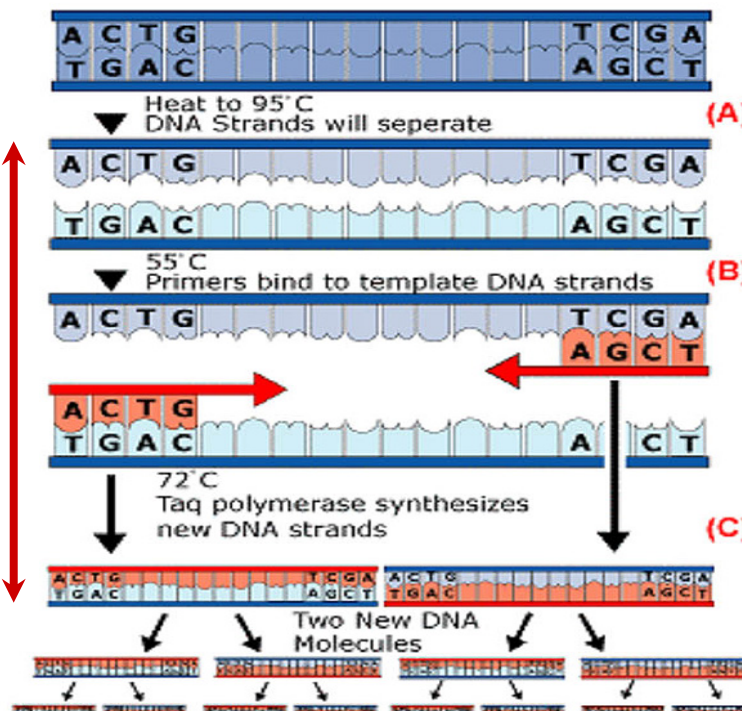
## Απομόνωση DNA



# Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

- ❖ Επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ενός επιλεγμένου τμήματος DNA.
- ❖ Χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών (primers), που έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τα άκρα του DNA-στόχου (primers).

## Polymerase Chain Reaction (PCR):



(A) Αποδιάταξη του DNA στόχου (θέρμανση 94-95°C)

(B) Σύνδεση των εκκινητών στα άκρα του DNA-στόχου

(C) Επέκταση των συμπληρωματικών αλυσίδων

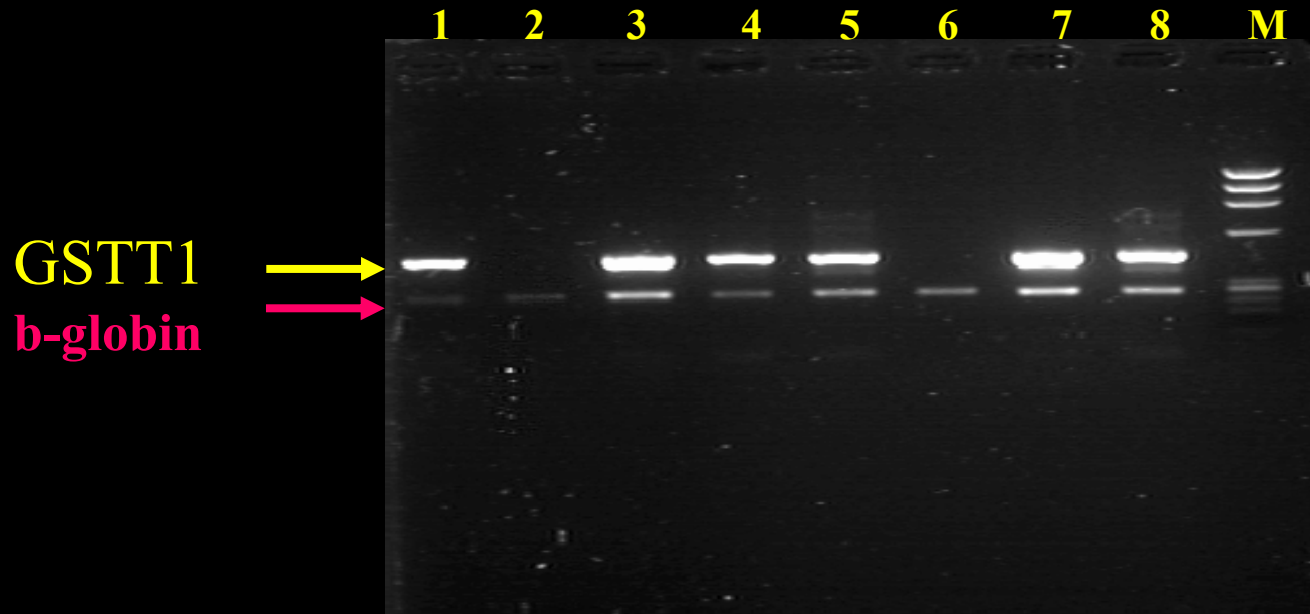
Taq Polymerase:

Πολυμεράση σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες

30-40 κύκλοι

# GSTT1

## Multiplex PCR (GSTT1+b-globin)



# PCR-RFLPs

## Restriction Fragment Length Polymorphisms

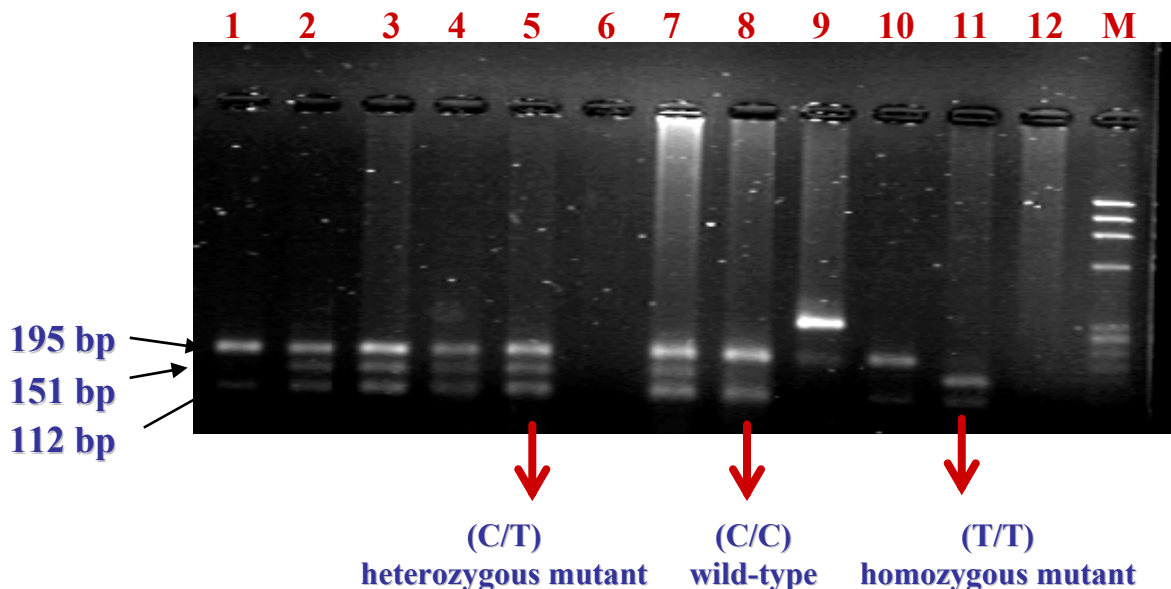
❖ Επιτρέπει την ανάδειξη πολυμορφισμών τύπου **SNPs** (Πολυμορφισμός στο γονίδιο **NQO1**):

1. Η προς μελέτη περιοχή πολλαπλασιάζεται με απλή **PCR**.

2. **Περιοριστική ενδονουκλεάση** **HinfI** (restriction enzyme): το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αποτελεί θέση κοπής, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κομματιών (fragments), διαφόρων μεγεθών ανάλογα με την παρουσία ή όχι πολυμορφισμού.



3. Διαχωρισμός των θραυσμάτων ανάλογα με το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση :



# Αποτελέσματα

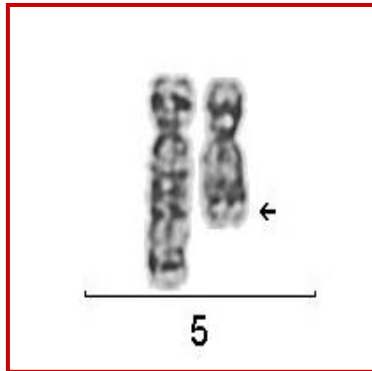
---

## ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ **GSTT1, GSTM1** ΚΑΙ **NQO1** ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΣ **ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (ΜΔΣ)**

- ❖ **Μεγαλύτερη** έως σήμερα σειρά ασθενών με πρωτοπαθές ΜΔΣ (n=330) που έχει αναλυθεί γονοτυπικά για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων **GSTT1, GSTM1** και **NQO1**.
- ❖ Προσδιορισμός για τον **ελληνικό πληθυσμό** (δείγμα ομοιογενούς εθνογεωγραφικής προέλευσης), της συχνότητας απουσίας των γονιδίων GSTT1 και GSTM1 καθώς και της συχνότητας πολυμορφισμού στο γονίδιο NQO1.

# Αποτελέσματα

❖ Σχεδόν **όλοι** οι ασθενείς με έλλειψη **del(5q)** έδειξαν «**θετικό γονότυπο**» για το γονίδιο GSTT1, σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρογενετικές ομάδες.



**del(5)(q13q33)**

Table 3. Distribution of GSTT1 null genotype among MDS cases with 5q31/EGR1 deletion, classified in groups of different karyotype complexity

Complexity	No	No with GSTT1 null genotype (%)
Isolated 5q deletion	22	0
5q deletion +1 additional abnormality	4	0
Complex ( $\geq 3$ abnormalities)	21	2 (9.5)
Total	47	2* (4.2)

\*Significantly lower when compared to patients with an abnormal karyotype ( $n=105$ , Table 2) (OR = 6.3; 95% CI, 1.4-2.8;  $P = 0.008$ ). Also significantly lower when compared with normal controls (OR = 4.209; 95% CI, 0.990-17.888;  $P = 0.042$ ).

Stavropoulou et al., Leukemia 2008 Aug;22(8):1643-6



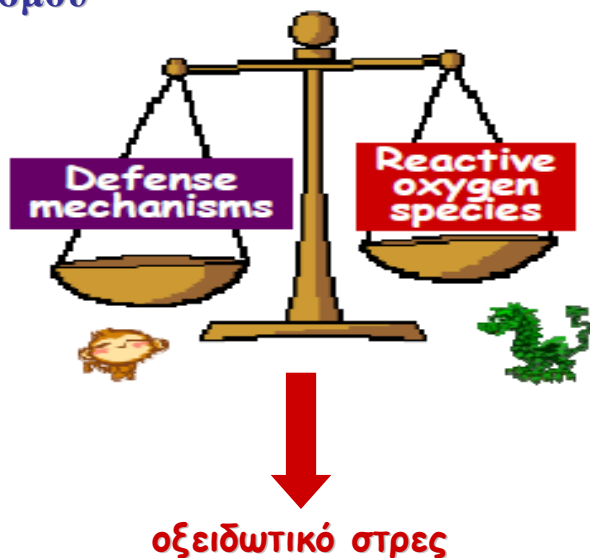
**Δημιουργία ενδιάμεσων τοξικών μεταβολιτών;**  
(π.χ. Μεταβολισμός διχλωρομεθανίου)

❖ Σχέση πολυμορφισμού γονιδίου αποτοξικοποίησης με συγκεκριμένη **κυτταρογενετική ομάδα**.

# ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTT1, GSTM1 ΚΑΙ NQO1 ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

(Συνεργασία με την Νευρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γ. Γεννηματάς»)

- ❖ Η **πολλαπλή σκλήρυνση** (Π.Σ.): Χρόνια φλεγμονώδης απομυελινωτική νόσος του ΚΝΣ
- ❖ Ποσοστό εμφάνισης της νόσου σε δεδομένο πληθυσμό: **διπλάσιο στις γυναίκες** απ'ότι στους άνδρες.
- ❖ Κυρίαρχο ρόλο στην αιτιολογία της Π.Σ. διαδραματίζει το **οξειδωτικό στρες** που προκαλείται σαν αποτέλεσμα διαταραχής της ισοροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας του οργανισμού

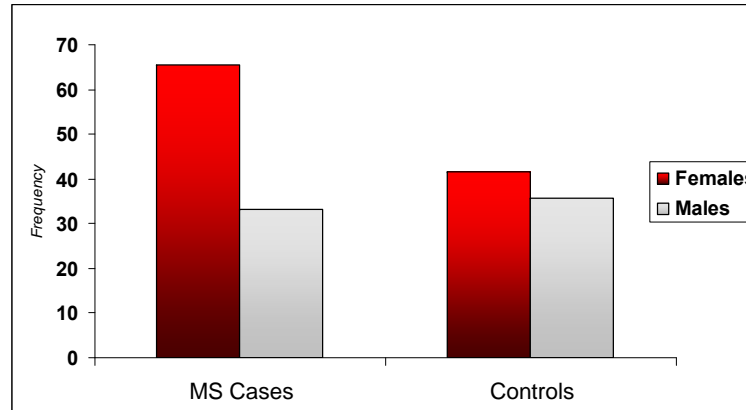


Γονοτυπική ανάλυση Ελλήνων ασθενών με ΠΣ ως προς τους πολυμορφισμούς των γονιδίων **GSTT1**, **GSTM1** και **NQO1** προκειμένου να διερευνηθεί ο **πιθανός τους ρόλος** στην εμφάνιση ΠΣ.

# ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ GSTT1, GSTM1 ΚΑΙ NQO1 ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

## Αποτελέσματα

1. **Αυξημένη συχνότητα** πολυμορφισμού του γονιδίου **GSTM1** σε γυναίκες ασθενείς με ΠΣ, σε σχέση με τους άνδρες ασθενείς ( $n=74$ , 65.5% vs. 33.3%,  $P=0.034$ ).



(Stavropoulou et al., Eur J Neurol 2007 May; 14(5):572-4)



**Πιθανός φυλο-εξαρτώμενος ρόλος του πολυμορφισμού GSTM1 στην εμφάνιση ΠΣ**

2. **Αυξημένη συχνότητα** ετεροζυγοτών C/T και ομοζυγοτών T/T για τον πολυμορφισμό **NQO1** σε σχέση με τα controls ( $n=100$ , 45.1% vs 37% and 7% vs 1.8% αντιστοίχως,  $\chi^2=7,786$ ;  $d.f.=2$ ;  $P=0.002$ ).

*Μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού γονοτοξικών παραγόντων (π.χ. Βενζόλιο, PAH) αποτελεί παράγοντα επικινδυνότητας για την εμφάνιση ΠΣ.*

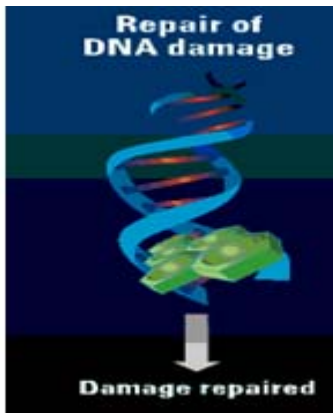


**Παθογενετικός ρόλος του πολυμορφισμού NQO1**

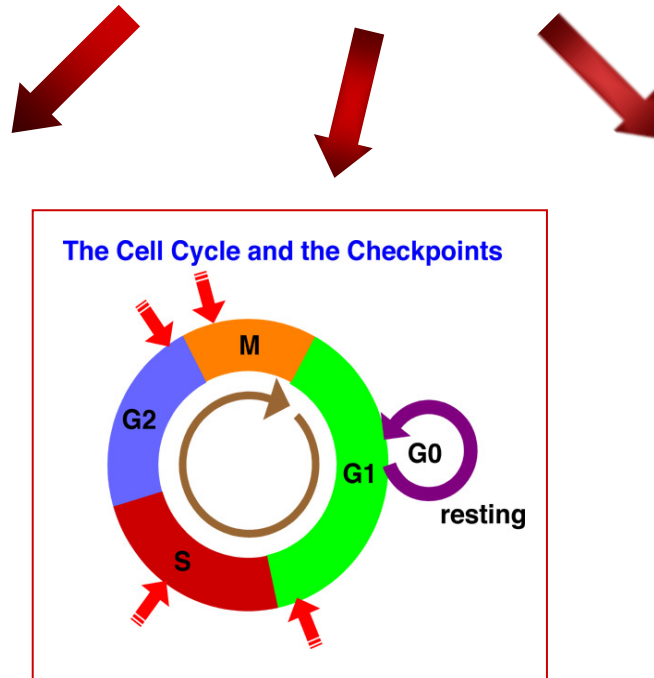


# Μελλοντικές Έρευνες

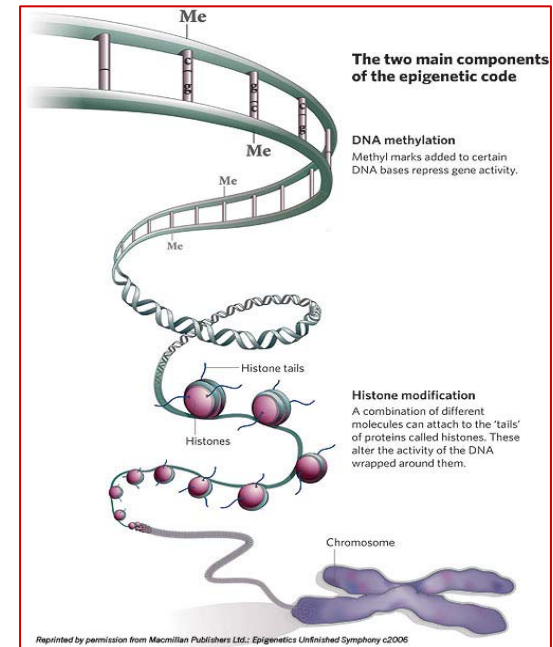
❖ Αφορμή για την δημιουργία τράπεζας γενωμικού DNA ασθενών με ΜΔΣ και ασθενών με ΠΣ:



Επιδιόρθωση DNA



Κυτταρικός Κύκλος



Επιγενετικοί Μηχανισμοί