

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

PETER K. GREGERSEN, MD
ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ: ΛΑΖΑΡΟΣ ΣΑΚΚΑΣ

Κληρονομικά στίγματα ευθύνονται για μεγάλο μέρος των διαφορών μεταξύ ατόμων. Αυτή η φαινοτυπική ποικιλία επεκτείνεται σε διαφορές στην ανοσιακή απάντηση και εξηγεί, για παράδειγμα, γιατί μερικά άτομα αντιδρούν ασθενώς στο εμβόλιο κατά της ηπατίτιδας Β, ενώ άλλα έχουν έντονη αντισωματική απάντηση (1). Τα πρωτογενή γονίδια, που καθορίζουν τις μορφές της ανοσιακής απάντησης, εντοπίζονται στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας [Major Histocompatibility Complex (MHC)] στο χρωμόσωμα 6. Κωδικοποιούν τα ανθρώπινα αντιγόνα λευκοκυττάρων [Human Leucocyte Antigens (HLA)] τα οποία συχνά αναφέρονται ως μόρια HLA. Το MHC ενδιαφέρει πολύ τους ρευματολόγους επειδή η περιοχή αυτή κωδικοποιεί γονίδια HLA που σχετίζονται με ποικιλία αυτοανόσων νοσημάτων. Αυτές οι γενετικές συσχετίσεις προσφέρουν σημαντικό πρότυπο για την προσέγγιση του σημαντικού ερωτήματος της γενετικής ευπάθειας στις ρευματικές διαταραχές.

Παραδοσιακά, το κεφάλαιο της γενετικής των ρευματικών νοσημάτων θα έπρεπε να εστιασθεί αποκλειστικά στο MHC. Ωστόσο κατέστη προφανές ότι πολλά γονίδια έξω από το MHC συμβάλλουν σε αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις νόσους. Πρόοδοι σε αυτόν τον τομέα περιλαμβάνουν ταυτοποίηση των γονιδίων, που εμπλέκονται σε αρκετά περιοδικά εμπύρετα σύνδρομα, όπως ο οικογενής μεσογειακός πυρετός και το περιοδικό σύνδρομο, το οποίο σχετίζεται με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων [tumor necrosis factor (TNF)] (2,3). Στην τελευταία περίπτωση, η ταυτοποίηση του γονιδίου οδήγησε σε καλύτερη κλινική αντιμετώπιση μέσω τροποποίησης των αλληλεπιδράσεων του TNF (3).

Οι συχνότερες ρευματικές νόσοι, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), παρουσιάζουν τεράστια εμπόδια στην ταυτοποίηση γονιδίων εκτός του MHC. Οι μελετητές των ρευματικών νόσων χρειάζεται να έχουν κάποια κατανόηση των βασικών προσεγγίσεων, που εφαρμόζονται για την ανίχνευση και περιγραφή της σχέσης γονιδίων με κλινικούς φαινότυπους. Το κεφάλαιο αυτό παρέχει το θεωρητικό πλαίσιο για την ερμηνεία και ενσωμάτωση ευρημάτων στην έρευνα και την κλινική πράξη.

Πιθανότητα, όχι βεβαιότητα

Οι περισσότερες ρευματικές νόσοι, περιλαμβανομένων των αυτοάνοσων νόσων, είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών και μη γενετικών παραγόντων. Με την πάροδο του χρόνου αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην κλινική έκφραση της νόσου. Μη γενετικοί παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν έκθεση σε περιβάλλον, όπως λοίμωξη και «στοχαστικούς» παράγοντες, οι οποίοι είναι τυχαία γεγονότα, που συμβαίνουν από την εμβρυϊκή ως την ενήλικη ζωή (4). Αυτοί οι αιτιολογικοί παράγοντες συνδυάζονται για την πρόκληση κλινικής νόσου, των διαφόρων εκδηλώσεών της, καθώς και του βαθμού βαρύτητας, που συχνά παρατηρείται. Λόγω της πολυπλοκότητας αυτών των αλληλεπιδράσεων δεν παρατηρείται απλή, μία-προς-μία, σχέση μεταξύ του γονιδίου και της νόσου και η πρόβλεψη της έκβασης της νόσου για τον κάθε ασθενή παραμένει δύσκολη.

Είναι δυνατό να ενοχοποιηθεί ιδιαίτερα ο ρόλος ενός ειδικού παράγοντα στην ευπάθεια ή τον κίνδυνο για συγκεκριμένη νόσο ή κλινική εκδήλωση. Στη περί-

ΠΙΝΑΚΑΣ 6-1. Λεξιλόγιο γενετικών όρων

Αλληλία:	Εναλλακτικές μορφές ή ποικιλίες ενός γονιδίου σε συγκεκριμένο γενετικό τόπο.
Απλότυπος:	Ομάδα αλληλίων που βρίσκονται σε παρακείμενους ή στενά συνδεμένους γενετικούς τόπους του ίδιου χρωμοσώματος οι οποίοι συνήθως κληρονομούνται ως μονάδα.
Ετεροζυγώτης:	Ατομο που κληρονομεί δύο διαφορετικά αλληλία σε ορισμένο γενετικό τόπο δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων.
«Ανισορροπία σύνδεσης»:	Η κατά προτίμηση σύνδεση σε ένα πληθυσμό δυο αλληλίων ή μεταλλάξεων, συχνότερα από ότι αναμένεται κατά τύχη. Η ανισορροπία σύνδεσης ανιχνεύεται στατιστικά και εκτός από ασυνήθεις περιστάσεις γενικά συνεπάγεται ότι τα δυο αλληλία βρίσκονται κοντά στο γονιδίωμα.
Γενετική σύνδεση:	Η συν-κληρονομικότητα, εντός μιας οικογένειας, δύο (μη αλληλικών) γονιδίων ή γενετικών τόπων που βρίσκονται κοντά στο γονιδίωμα. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί τη βάση της ανάλυσης γενετικής σύνδεσης στην οποία η συν-κληρονομικότητα του γενετικού τόπου ενός δείκτη εξετάζεται σε σχέση με γενετικό τόπο νόσου εντός οικογενειών.
Πολυμορφισμός:	Ο βαθμός της ποικιλίας αλληλίων ενός γενετικού τόπου σε ένα πληθυσμό. Τα ειδικά κριτήρια διαφέρουν αλλά ένας τόπος λέγεται ότι είναι πολυμορφικός εάν το πιο συχνό αλληλίο δεν απαντά σε περισσότερο του 98% του πληθυσμού. Μερικές φορές ο όρος πολυμορφισμός χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο όπως το «αλληλίο» όταν γίνεται αναφορά σε συγκεκριμένη γενετική παραλλαγή.

πτωση των γενετικών παραγόντων ο σκοπός είναι να ταυτοποιηθούν οι ειδικές γενετικές παραλλαγές ή τα αλληλία τα οποία μεταβιβάζουν κίνδυνο νόσου (ο Πίνακας 6-1 περιέχει ένα λεξιλόγιο γενετικών όρων). Στον απλούστερο τύπο, ένα αλληλίο προσδίδει αυξημένο κίνδυνο, όταν η πιθανότητα της νόσου (D) σε ένα πληθυσμό (P) είναι, σε όλη τη διάρκεια της ζωής, μεγαλύτερη με την παρουσία ειδικού αλληλίου (A) συγκριτικά με την απουσία του. Αυτή η έννοια εκφράζεται ως:

$$P(D | A) > P(D | \text{απουσία } A)$$

Ο λόγος των δυο αυτών πιθανοτήτων μπορεί να υπολογισθεί με διάφορους τρόπους. Μοντέρνες μέθοδοι της γενετικής και της επιδημιολογίας επιτρέπουν να μετρηθούν αυτές οι επιδράσεις και τελικά να ταυτοποιηθούν τα γονίδια, που προσδίδουν κίνδυνο νόσου, ακόμα και όταν πολλοί άλλοι παράγοντες είναι παρόντες (προκαλούν «θόρυβο») και αποκρύπτουν το υποκείμενο γενετικό υπόστρωμα.

Η γνώση του γενετικού υποστρώματος νόσου

Μολοντί οι ερευνητές αρκετές φορές ανακαλύπτουν ένα γονίδιο που σχετίζεται με νόσο, συνήθως το γενετικό υπόστρωμα υποδηλώνεται από την ύπαρξη πολλών περιστατικών της νόσου στην ίδια οικογένεια. Ωστόσο, για τις περισσότερες αυτοάνοσες νόσους, η απομόνωση πολλαπλών περιστατικών νόσου σε οικογένειες είναι μάλλον μέτριου βαθμού. Στις περισσότερες περιπτώσεις ένα άτομο με RA ή ΣΕΛ δεν έχει στενό συγγενή με την ίδια νόσο. Ετσι είναι αναγκαίο να μελετηθεί προσεκτικά ο επιπολασμός της νόσου σε πληθυσμό ατόμων με διαφορετικού βαθμού γενετική συγγένεια.

Οι χρησιμότεροι τύποι πληθυσμών για τις συγκρίσεις αυτές είναι γενετικά πανομοιότυπα άτομα (μονο-ωογενείς δίδυμοι), άτομα που έχουν κοινό το 50% των γονιδίων τους (δι-ωογενείς δίδυμοι και αδελφοί) και μη συγγενικά άτομα του πληθυσμού. Για την ομάδα των μη συγγενικών ατόμων, ο γενικός βαθμός της γενετικής ομοιότητας (σε πολυμορφικούς τόπους) είναι σχετικά χαμηλός με περίπου 0.1% διαφορά σε σχέση με το όλο γονιδίωμα (4). Σημειωτέον ότι 0.1% διαφορά σε σχέση με ολόκληρο το γονιδίωμα των 3.2×10^9 ζευγών βάσεων υπαινίσσεται διαφορές σε τουλάχιστο τρία εκατομμύρια ζεύγη βάσεων μεταξύ τυχαίων μη συγγενικών ατόμων. Στην πραγματικότητα ο αριθμός αυτός μπορεί να υποεκτιμάται. Για τους μονο-ωογενείς ή μονοζυγωτικούς διδύμους (MZ), ο βαθμός σύμπτωσης μιας νόσου (concordance) για τις περισσότερες αυτοάνοσες νόσους είναι μεταξύ 15% και 30% (4). Το γεγονός ότι αυτή η σύμπτωση νόσου είναι σημαντικά μικρότερη του 100% δείχνει ότι μη γενετικοί παράγοντες παίζουν ρόλο. Ωστόσο, εάν κάποιος συγκρίνει αυτή τη σύμπτωση στους μονο-ωογενείς με τη σύμπτωση στους δι-ωογενείς διδύμους ή διζυγωτικούς (DZ) αδελφούς ή αδελφούς (που έχουν τα μισά αλληλία κοινά), το ποσοστό κατέρχεται στο 2%-5%. Αυτό δείχνει ότι η πλήρης γενετική ομοιότητα με πάσχοντα άτομα αυξάνει σημαντικά το κίνδυνο της νόσου (στην περίπτωση αυτή υποτίθεται ότι οι κοινόι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι ισοδύναμοι μεταξύ MZ και DZ διδύμων).

Για να υπάρξει μια ιδέα για το γενικό γενετικό κίνδυνο χρειάζεται να συγκριθούν αυτές οι συμπτώσεις νόσου με τον επιπολασμό της νόσου σε γενικό πληθυσμό μη συγγενών ατόμων (δηλαδή τον επιπολασμό στο γενικό πληθυσμό). Ανάλογα με την αυτοάνοση νόσο, ο επιπολασμός στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται από 0.1% έως 1%. Αυτές οι τιμές μπορεί να χρησιμοποιη-

θούν για να υπολογισθούν δυο αναλογίες, ο σχετικός κίνδυνος για τους αδελφούς (λ_A) και ο σχετικός κίνδυνος για τους MZ διδύμους (λ_{MZ}):

$$\lambda_A = \frac{\text{επιπολασμός νόσου σε αδελφούς ασθενών}}{\text{επιπολασμός νόσου στο γενικό πληθυσμό}}$$

$$\lambda_{MZ} = \frac{\text{επιπολασμός νόσου σε διδύμους ασθενείς}}{\text{επιπολασμός νόσου στο γενικό πληθυσμό}}$$

Οι τιμές αυτών των δυο αναλογιών για διάφορες αυτοάνοσες νόσους δίνεται στον Πίνακα 6-2 (5). Συγκρινόμενο με το γενικό πληθυσμό, ένα άτομο που έχει MZ δίδυμο αδελφό ή αδελφό με μια από τις νόσους αυτές υπόκειται σε σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο για τη νόσο. Είναι πιθανό ότι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για τον αυξημένο κίνδυνο, μολονότι οι αναλογίες αυτές κινδύνου αποδίδονται επίσης σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, που κατά προτίμηση υπάρχουν σε μέλη οικογενειών. Γονίδια που σχετίζονται με HLA πιθανώς ευθύνονται για το 50% ή λιγότερο αυτού του κινδύνου στις περισσότερες περιπτώσεις.

Το σύμπλεγμα MHC - Η απόδοση γενετικού κινδύνου

Από τα μέσα του 1970 η έρευνα στη γενετική των ρευματικών νόσων εστιάσθηκε πρωταρχικά στο MHC, το οποίο είναι γνωστό ότι κωδικοποιεί τα HLA που εμπλέκονται ευθέως στην παρουσίαση αντιγόνου στο ανοσιακό σύστημα. Το MHC επίσης σκιαγραφεί πολλές από τις ιδέες και τις πολυπλοκότητες, που υπάρχουν στην απόδοση γενετικού κινδύνου σε ειδικά αλλήλια και δίνει έμφαση στη σπουδαιότητα του συνδυασμού γενετικής και βιολογίας, όταν αποδίδεται κίνδυνος του είδους αυτού.

Η λειτουργία των μορίων HLA

Η κύρια λειτουργία των μορίων HLA είναι να παρουσιάζουν πεπτίδια αντιγόνου για αναγνώριση από τα T λεμφοκύτταρα. Όπως συζητείται σε άλλα κεφάλαια, η αναγνώριση από τα T λεμφοκύτταρα ξένου αντιγόνου απαιτεί τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα να επεξεργάζονται το αντιγόνο και να το παρουσιάζουν στην επιφάνειά τους σε φυσική επαφή με μόρια HLA. Αυτή η επεξεργασία, ονομαζόμενη παρουσίαση αντιγόνου, είναι πολύ πολύπλοκη και καλά ρυθμιζόμενη κυτταρική δραστηριότητα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται στην αύλακα σύνδεσης του αντιγόνου του μορίου HLA και είναι αυτό το σύμπλεγμα, το οποίο αναγνωρίζεται από τα T λεμφοκύτταρα διαμέσου ειδικής αλληλεπίδρασης με μόρια του υποδοχέα αντιγόνου του T λεμφοκυττάρου (6).

Διαφορετικά αλλήλια HLA έχουν διαφορετική δύναμη σύνδεσης με συγκεκριμένη ομάδα αντιγονικών πεπτιδίων, η οποία τα καθιστά ικανά να καθορίζουν ποια

αντιγόνα μπορεί να παρουσιασθούν στα T λεμφοκύτταρα σε ένα συγκεκριμένο άτομο. Τα T λεμφοκύτταρα υφίστανται μια διεργασία εκπαίδευσης κατά την ανάπτυξή τους στο θύμο αδένι έτσι, ώστε τα ώριμα T λεμφοκύτταρα γενικά αντιδρούν μόνο με μόρια HLA του ίδιου ατόμου, από το οποίο προέρχονται τα T λεμφοκύτταρα. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως αναγνώριση T λεμφοκυττάρων περιοριζόμενη από το MHC και οφείλεται στο γεγονός ότι μόρια HLA επιδεικνύουν υψηλό βαθμό δομικού (γενετικού) πολυμορφισμού.

Οργάνωση του ανθρώπινου MHC

Μια τεράστια σειρά γονιδίων και αλληλίων κωδικοποιείται στο γονιδιακό σύμπλεγμα MHC. Ένας πολύ απλοποιημένος χάρτης του MHC φαίνεται στην Εικόνα 6-1. Έχει βρεθεί η αλληλουχία βάσεων ολόκληρης της περιοχής των 3.4 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων και ο πραγματικός αριθμός των γονιδίων υπερβαίνει κατά πολύ αυτόν που δείχνει η Εικόνα 6-1 (7). Πράγματι, το MHC είναι περιοχή ιδιαίτερα πλούσια σε γονίδια έχοντας περισσότερους από 200 γονιδιακούς τόπους και τουλάχιστον 128 λειτουργικά γονίδια, από τα οποία περίπου 40% φαίνονται να εμπλέκονται πρωτοπαθώς στην ανοσιακή λειτουργία (7). Περισσότερο λεπτομερής χάρτης της περιοχής περιέχεται στο Διαδίκτυο (<http://www.nature.com>) (7).

Το MHC μπορεί γενικά να διαιρεθεί σε περιοχές τάξης I και τάξης II, οι οποίες περιέχουν μεταξύ αυτών το "κεντρικό" MHC. Το κεντρικό MHC περιέχει πολλά γονίδια, περιλαμβανομένων γονιδίων για αρκετά συστατικά του συμπληρώματος (C4A, C4B, C2) και των TNF-α και β. Η περιοχή τάξης I περιέχει τα κλασικά γονίδια τάξης I (HLA-A, -B και -C) και αρκετά γονίδια με παρόμοια δομή. Στην περιοχή τάξης II υπάρχουν αρκετές υποπεριοχές με το όνομα HLA-DR, -DQ και -DP. Κάθε μια από αυτές τις υποπεριοχές περιέχει τη δική της ομάδα γονιδίων. Για παράδειγμα, στην υποπεριοχή HLA-DR υπάρχει ένα γονίδιο (DRA), που κωδικοποιεί την DR αλφα αλυσίδα. Το γονίδιο αυτό είναι αξιοσημείωτο, επειδή γενικά δεν είναι πολυμορφικό. Οι αλυσίδες DR βήτα κω-

ΠΙΝΑΚΑΣ 6-2. Σχετικοί κίνδυνοι αυτοάνοσης νόσου σε αδελφούς (λ_S) και μονοζυγωτικούς διδύμους (λ_{MZ})*

Νόσος	λ_S	λ_{MZ}
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	2-17	12-60
Σκλήρυνση κατά πλάκας	20	250
Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	15	60
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	20	250
Αγκυλωτική σπονδυλαρθρίτιδα	54	500

* Δεδομένα εν μέρει από Vyse και Todd (5).

δικοποιούνται από αρκετά γονίδια (DRB1, DRB2, DRB3, κ.ά.), ο αριθμός των οποίων διαφέρει ανάλογα με τον απλότυπο. Όλοι οι απλότυποι περιέχουν ένα γονίδιο DRB1. Ο γονιδιακός τόπος DRB1 γενικά είναι ο περισσότερο μεταβλητός της υπο-περιοχής DR.

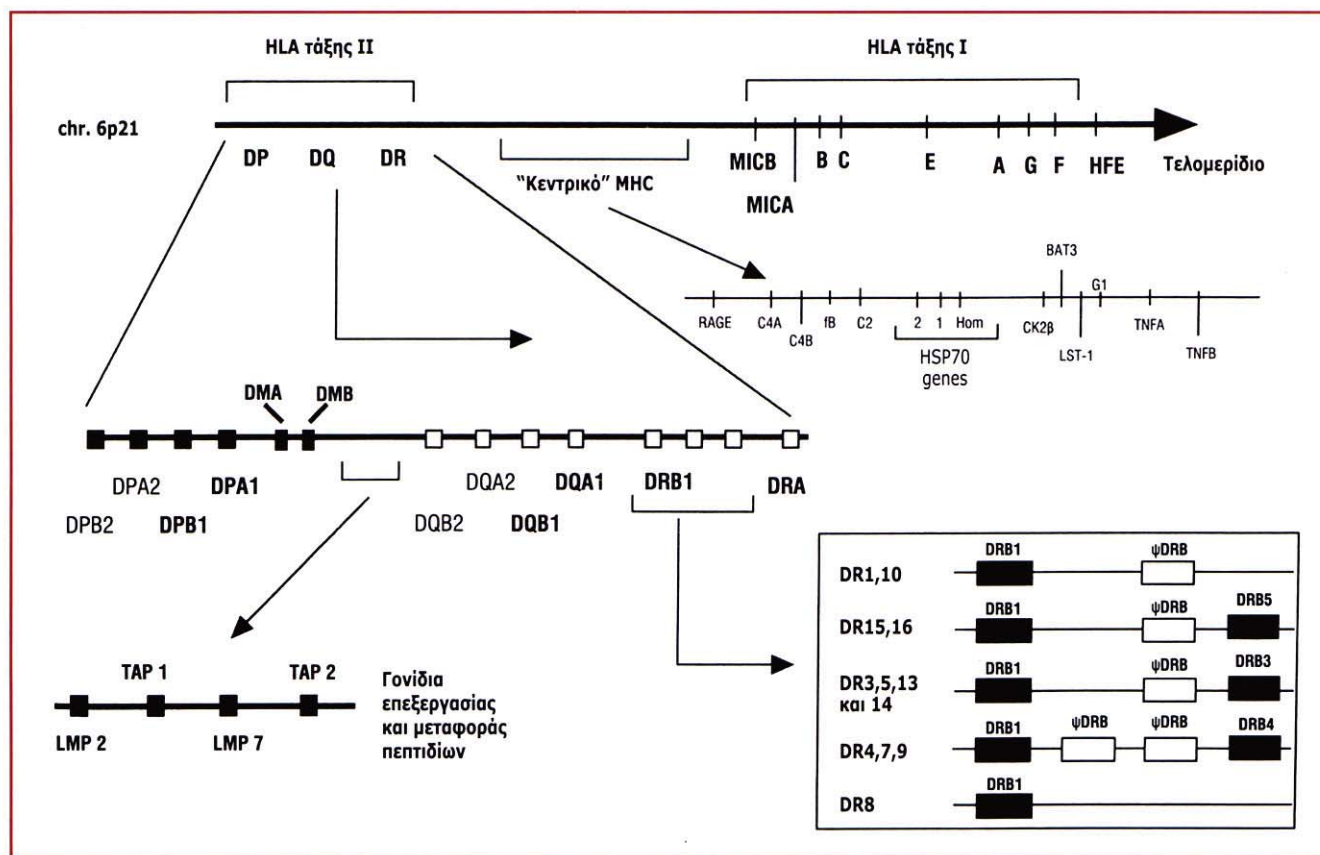
Η πολυπλοκότητα του MHC είναι προφανής από τον μεγάλο αριθμό των γονιδίων και των πολλών αλληλίων των γονιδίων αυτών, που απαντούν σε πληθυσμούς ανθρώπων. Η ιδιότητα αυτή αναφέρεται ως πολυμορφισμός. Πολλοί από τους γονιδιακούς τόπους HLA έχουν εξαιρετικά υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού. Για παράδειγμα, περισσότερα από 100 διαφορετικά αλληλία έχουν περιγραφεί για τον γονιδιακό τύπο HLA-B και για τον γονιδιακό τύπο HLA-DR. Πλήρη κατάλογο των αλληλίων αυτών, της αλληλουχίας τους και επεξη-

γήσεις της ονομασίας τους μπορεί να βρεί κανείς στο Διαδίκτυο (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/allele.html>).

Αυτό το υψηλό επίπεδο ποικιλίας στα γονίδια HLA θεωρείται αποτέλεσμα επιλεκτικής πίεσης κατά την οντογονική εξέλιξη. Υποτίθεται ότι η ευρεία σειρά των μορίων HLA, που είναι διαθέσιμα να παρουσιάζουν αντιγόνο, προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης κατά λοιμωδών μικρο-οργανισμών ή άλλων περιβαλλοντικών επιδράσεων.

Μελέτες σύνδεσης και η αντίληψη του σχετικού κινδύνου

Η σύνδεση του HLA με νόσο αποτελεί κλασικό παράδειγμα του τρόπου, με τον οποίο μπορούν να παρασχεθούν ενδείξεις, ότι ένα συγκεκριμένο αλληλίο



Εικ. 6-1. Χάρτης του ανθρώπινου μείζονος συμπλεγματος ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα μόρια τάξης I και τάξης II των αντιγόνων ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLA) κωδικοποιούνται σε διαφορετικές περιοχές του MHC, σε έκταση 1 εκατομμυρίου ζευγών βάσεων. Ανάμεσα τους κωδικοποιούνται συστατικά του συμπληρώματος (C4A, C4B, C2 και ο παράγοντας B), παράγοντες νέκρωσης όγκου (TNF)-α και -β και η πρωτεΐνη θερμικού σοκ (heat shock protein) Hsp70. Η περιοχή HLA τάξης II περιέχει τρεις υποπεριοχές, DR, DQ, και DP. Κάθε μία από τις υποπεριοχές αυτές περιέχει μεταβλητό αριθμό γονιδίων α- και β-αλυσίδων. Γενετικοί τόποι HLA-τάξης II με γνωστά λειτουργικά πρωτεϊνικά προϊόντα υποσημαίνονται με έντονα γράμματα. Στην περίπτωση του DR, διαφορετικοί αριθμοί DRB γονιδίων απαντούν σε διαφορετικούς απλότυπους και οι πιο συχνοί φαίνονται σε ένθετο τετράγωνο (η ομάδα DR3, 5 και 6 περιλαμβάνει απλότυπους που φέρουν τις ομάδες αλληλίων DR11, 12, 13 και 14 και οι περισσότερες από αυτές φέρουν λειτουργικό γονίδιο DRB3). Κάθε μία από τις υποπεριοχές DQ και DP περιέχει ένα ζεύγος λειτουργικών γονιδίων για τις α- και β- αλυσίδες. Ένας αριθμός γονιδίων που εμπλέκονται στην επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου (γονίδια TAP, γονίδια LMP) από τα μόρια τάξης I βρίσκονται μεταξύ των υποπεριοχών DP και DQ. Τα γονίδια DMA και DMB που είναι κωδικοποιημένα σε αυτή την περιοχή χρειάζονται για τη φυσιολογική παρουσίαση αντιγόνου από τα μόρια HLA τάξης II. Ένας λεπτομερέστερος χάρτης με παραπομπές για τα γονίδια αυτά μπορεί να ευρεθεί στα συμπληρωματικά στοιχεία της παραπομπής 5 στη δικτυακή διεύθυνση www.nature.com

προσδίδει κίνδυνο νόσου, δηλαδή της εξίσωσης $[P(D/A) > P(D \text{ απουσία } A)]$, που συζητήθηκε προηγουμένως. Κάποιος θα μπορούσε να μετρήσει αυτές τις πιθανότητες απευθείας, κάνοντας μελέτη κλειστού πληθυσμού, στην οποία ένας μεγάλος αριθμός ατόμων που φέρουν (ή δεν φέρουν) το αλληλίο A, παρακολουθούνται δια βίου και παρατηρείται αν αναπτύξουν νόσο. Μολονότι η προσέγγιση αυτή δεν είναι πρακτική, τα αποτελέσματα μπορεί να παρουσιασθούν, όπως φαίνεται στο A του Πίνακα 6-3, και να χρησιμοποιηθούν για να υπολογισθεί ο σχετικός κίνδυνος [Relative Risk (RR)] ως εξής:

$$RR = a/(a+b) \div c/(c+d)$$

Ο RR είναι το μέτρο του πόσο περισσότερο (ή ολιγότερο) πιθανό είναι ένα άτομο να αναπτύξει τη νόσο (σε όλη του τη ζωή) εάν κληρονομήσει το αλληλίο A. Εάν η νόσος είναι ασυνήθης (δηλαδή εάν το c είναι μικρό) ο RR μπορεί να εκτιμηθεί από την εξίσωση $(a \times d) \div (c \times b)$, επίσης γνωστή ως διαγώνιο γινόμενο του Πίνακα 6-3A.

Περισσότερο πρακτική προσέγγιση είναι να διεξαχθεί ελεγχόμενη μελέτη, στην οποία ο υπό μελέτη πληθυσμός και ο πληθυσμός μαρτύρων επιλέγονται με βάση το εάν έχουν τη νόσο ή όχι. Η συχνότητα του αλληλίου μετράται σε κάθε ομάδα. Τα αποτελέσματα μεταφέρονται σε πίνακα, όπως φαίνεται στο B του Πίνακα 6-3. Εάν η νόσος είναι σπάνια, όπως συμβαίνει με τα κυριότερα ρευματικά νοσήματα, μια εκτίμηση του RR γνωστή και ως αναλογική πιθανότητα μπορεί να υπολογισθεί χρησιμοποιώντας το διαγώνιο γινόμενο $(a \times b) \div (c \times d)$ από τον Πίνακα 6-3B.

Η μεγάλη πλειοψηφία των δεδομένων, που δείχνουν σχέση/σύνδεση μεταξύ αλληλίων HLA και αυτοάνοσης νόσου, έχουν προκύψει από σχεδιασμό ελεγχόμενων μελετών με μάρτυρες. Γενικά οι υπολογιζόμενοι RR είναι κάτω του 10 με εξαίρεση το HLA-B27 στις οροαρνητικές σπονδυλαρθρίτιδες, όπου οι τιμές RR πλησιάζουν το 100 για την αγκυλωτική σπονδυλαρθρίτιδα (8). Ακόμα και όταν η ανάλυση HLA στηρίζεται σε ειδικές αλληλουχίες αμινοξέων, όπως η σύνδεση του 'κοινού επιτόπου' του HLA-DR4 με τη PA, οι υπολογισμοί του γενικού κινδύνου παραμένουν σε μάλλον μέτριο επίπεδο (4).

Ελεγχόμενες μελέτες με μάρτυρες και η αντίληψη της «ανισορροπίας σύνδεσης»

Μολονότι η θετική σχέση ($RR > 1$) μεταξύ του πολυμορφισμού ενός αλληλίου και μιας νόσου φαίνεται να δείχνει ότι το αλληλίο εμπλέκεται άμεσα στην παθογένεια της νόσου, αυτό το συμπέρασμα δεν μπορεί να εξαχθεί χωρίς να διαπιστωθεί ότι η σύνδεση είναι στατιστικά σημαντική και τα περιστατικά και οι μάρτυρες είναι κατάλληλα εξομοιωμένοι ως προς την εθνικότητα και άλλους παρά-

ΠΙΝΑΚΑΣ 6-3. Αναλύσεις συνδέσεων*

A		
Κλειστές ομάδες μελέτης	Νόσος	Όχι νόσος
Εκτεθειμένοι	a	β
Μη εκτεθειμένοι	γ	δ
B		
Ομάδες ασθενών μαρτύρων	Εκτεθειμένοι	Μη εκτεθειμένοι
Νόσος	a	β
Όχι νόσος	γ	δ

* α, β, γ, δ = αριθμός ατόμων σε κάθε κατηγορία

γοντες. Πέραν αυτών των περιορισμών, είναι κριτικής σημασίας να κατανοηθεί ότι οι περισσότερες θετικές συσχετίσεις δεν σημαίνουν αιτιολογία από πλευράς αλληλίου, που σχετίζεται με τη νόσο. Γενετικοί πολυμορφισμοί απαντούν σε ειδικές θέσεις των χρωμοσωμάτων και περιβάλλονται από πολλούς άλλους πολυμορφισμούς στο γονιδίωμα. Αυτές οι «γειτονίες» αλληλίων τείνουν να συγκεντρώνονται σε απλότυπους ανθρώπινων πληθυσμών, ένα φαινόμενο γνωστό στη γενετική ως «ανισορροπία σύνδεσης» (linkage disequilibrium). Ο όρος αυτός αναφέρεται στο γεγονός ότι αλληλίοι, που βρίσκονται το ένα πολύ κοντά με το άλλο (απόσταση μικρότερη από 200.000 ζεύγη βάσεων), απαντούν μαζί στο ίδιο άτομο συχνότερα από ότι αναμένεται.

Για παράδειγμα, η αιμοχρωμάτωση είναι διαταραχή του μεταβολισμού του σιδήρου, η οποία προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο HFF στο χρωμόσωμα 6, αρκετά κοντά στο MHC (9). Ένα τυπικό αλληλίο τάξης I μέσα στο MHC, το HLA-A3, απαντά στο 25% του πληθυσμού Καυκάσιας φυλής. Επειδή το HLA-A3 δεν έχει σχέση με το αίτιο της αιμοχρωμάτωσης, θα περίμενε κανείς ότι μόνο το 25% των ατόμων με αυτή τη νόσο θα είχε το HLA-A3. Ωστόσο παρατηρήθηκε συχνά σε Καυκάσιους πληθυσμούς ότι το 70% ή περισσότερο των ατόμων με αιμοχρωμάτωση έχουν το HLA-A3. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει επειδή το HLA-A3 είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου HFF. Ο υπολογιζόμενος RR για HLA-A3 και αιμοχρωμάτωση είναι στην περιοχή του 10, εν τούτοις το HLA-A3 δεν έχει σχέση με την αιμοχρωμάτωση. Πολλές και ουσιαστικά οι περισσότερες γενετικές συσχετίσεις πιθανόν παρατηρούνται λόγω ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ του υπό εξέταση αλληλίου και αλληλίων της νόσου. Τα πραγματικά γονίδια, τα υπεύθυνα για τη σχέση, εντοπίζονται κάπου αλλού στη γενετική "γειτονία". Χρησιμοποιώντας ελεγχόμενες μελέτες με μάρτυρες είναι σχεδόν αδύνατο να αποδειχθεί οριστικά ότι ένα συγκεκριμένο αλληλίο είναι το "αίτιο" της σχέσης χωρίς να χρησιμοποιηθούν άλλες πειραματικές μέθοδοι για να καταδειχθεί ο μηχανισμός που υποκρύπτεται.

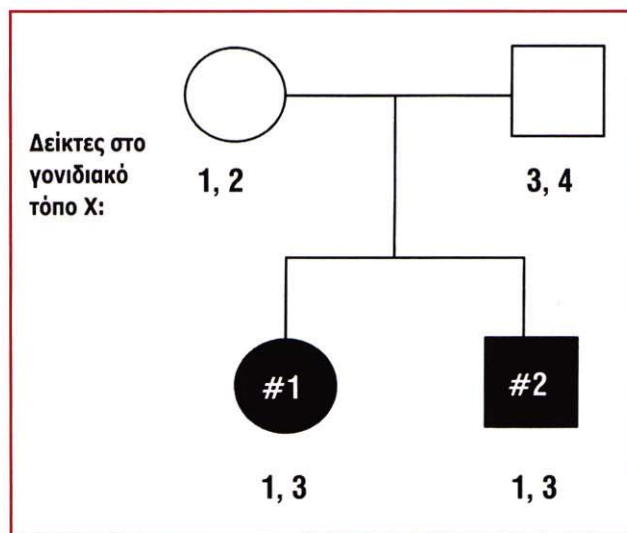
Σχεδόν όλα τα σύγχρονα δεδομένα που υποστηρί-

ζουν το ρόλο των HLA στις αυτοάνοσες νόσους προέρχονται από συσχετίσεις, που βρέθηκαν σε ελεγχόμενες μελέτες με μάρτυρες. Όπως δείχνει το παράδειγμα της αιμοχρωμάτωσης, μόνο αυτά τα δεδομένα δεν αποδεικνύουν ότι τα αλληλία HLA πράγματι προκαλούν ή εμπλέκονται ευθέως στο μηχανισμό της νόσου. Το γεγονός όμως ότι γονίδια MHC είναι γνωστό ότι ελέγχουν ευθέως μορφές της ανοσιακής απάντησης σε πειραματόζωα καθιστά ένα συμπέρασμα του είδους αυτού πολύ ισχυρό, που υποστηρίζεται από πλήθος συμπληρωματικών δεδομένων της μοριακής βάσης της ανοσιακής αναγνώρισης. Ωστόσο, το γεγονός ότι οι ακριβείς υποκείμενοι μηχανισμοί στις σχέσεις των HLA με νόσους δεν έχουν επακριβώς διευκρινισθεί, δημιουργεί επιφυλάξεις σε μελετητές και πρόκληση στους ερευνητές. Τελικά η βασική βιολογική έρευνα και όχι η γενετική θα επιλύσει το θέμα αυτό.

Πέραν του MHC

Η μελέτη συσχετίσεων και ανισορροπίας σύνδεσης είναι χρήσιμη μόνον όταν υπάρχουν προγενέστερες ενδείξεις ότι το υπό εξέταση γονίδιο βρίσκεται κοντά στην υπό εξέταση χρωμοσωμική περιοχή, όπως στην περίπτωση της περιοχής HLA. Γονίδια εκτός των HLA είναι σημαντικά αλλά μπορεί να μην υπάρχουν πληροφορίες για τη θέση τους στο γονιδίωμα. Μία προσέγγιση είναι να επινοηθεί "έξυπνη" πρόβλεψη και να επιλεγεί ένα "υποψήφιο" γονίδιο, όπως ένα γονίδιο κυτταροκίνης, προς εξέταση για πολυμορφισμούς. Εάν βρεθούν πολυμορφισμοί, μπορεί να σχεδιασθεί ελεγχόμενη μελέτη με μάρτυρες για να ερευνηθεί πιθανή σχέση με τη νόσο. Το προφανές μειονέκτημα της προσέγγισης αυτής είναι η πιθανότητα λάθους στην επιλογή του γονιδίου. Στο γονιδίωμα εξάλλου υπάρχουν τουλάχιστο 30.000 γονίδια, για να επιλέξει κανείς.

Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι να αποκτηθούν ενδείξεις ότι συγκεκριμένος τόπος γονιδιώματος περιέχει γονίδιο νόσου και στη συνέχεια να ακολουθήσουν μελέτες συσχέτισης χρησιμοποιώντας περιορισμένη επιλογή γονιδίων της περιοχής αυτής. Οι συνήθεις μέθοδοι της πρακτικής αυτής στηρίζονται σε φαινόμενο γνωστό ως γενετική σύνδεση. Η πλήρης συζήτηση των μεθόδων της γενετικής σύνδεσης είναι πέραν του σκοπού του κεφαλαίου αυτού και μπορεί να ανευρεθούν αλλού (10). Ωστόσο είναι χρήσιμο να αντιπαραβάλλεται η χαρτογράφηση γονιδίων μέσω γενετικής σύνδεσης με τη χαρτογράφηση μέσω ανισορροπίας σύνδεσης. Όπως συζητήθηκε, μελέτες βασισμένες σε ανισορροπία σύνδεσης εστιάζονται στη σχέση αλληλίων σε πληθυσμούς μη συγγενών ατόμων. Αντίθετα οι μέθοδοι γενετικής σύνδεσης εστιάζονται στη συν-κληρονομικότητα νόσου με γενετικό δείκτη εντός οικογενειών, ανεξάρτητα από αλληλίο.



Εικ. 6-2. Οικογένειες στις οποίες δύο αδελφοί είναι προσβεβλημένοι με νόσο μπορεί να είναι χρήσιμες για την ανακάλυψη γενετικής σύνδεσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του "ζεύγους προσβεβλημένων αδελφών". Φαίνεται ο διαχωρισμός των αλληλίων 1,2,3 και 4 του γενετικού δείκτη X σε γονείς και πάσχοντες αδελφούς. Ο πρωτότοκος (#1) και ο δευτερότοκος (#2) δείχνονται για να διευκολυνθεί η συζήτηση (βλ. κείμενο).

Κλασική ανάλυση γενετικής σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την εμπλοκή των HLA στην αγκυλωτική σπονδυλαρθρίτιδα (11) και σε μερικές μελέτες του ΣΕΛ (12). Ωστόσο, στα κυριότερα ρευματικά νοσήματα η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης, που βασίζεται στη γενετική σύνδεση είναι γνωστή ως μέθοδος του "ζεύγους προσβεβλημένων αδελφών" [affected sibling pair (ASP)]. Παράδειγμα η οικογένεια που φαίνεται στην Εικόνα 6-2, στην οποία υπάρχουν δύο αδελφοί, καθένας με την ίδια νόσο ή φαινότυπο. Σε αυτούς τους τύπους οικογενειών οι ασθενείς αδελφοί κάθε οικογένειας είναι πολύ πιθανό, αλλά όχι βέβαιο, να είναι φορείς του ίδιων αλληλίων της νόσου. Αυτό το συμπέρασμα λαμβάνει ως δεδομένο ότι τα εμπλεκόμενα γονίδια δεν είναι τόσο ετερογενή ούτε τόσο συχνά στον πληθυσμό, ώστε οι ασθενείς αδελφοί να είχαν αναπτύξει την ίδια νόσο κληρονομώντας διαφορετικά γονίδια ευπάθειας.

Στην οικογένεια αυτή και τα δύο αδέλφια έχουν κληρονομήσει τα ίδια αλληλία στο γενετικό τόπο X. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει μόνο 25% πιθανότητα να συμβεί αυτό τυχαία. Για παράδειγμα, δεδομένου ότι ο πρωτότοκος αδελφός (#1) κληρονόμησε το γονότυπο 1,3, ο αδελφός #2 θα μπορούσε να κληρονομήσει έναν από τους τέσσερις γονότυπους (1,3 - 2,3 - 1,4 ή 2,4) με ίσες πιθανότητες. Με την ίδια λογική, υπάρχει 50% πιθανότητα ότι οι δύο αυτοί αδελφοί θα έχουν κοινό μόνο ένα αλληλίο και 25% πιθανότητα ότι δεν θα έχουν τίποτα κοινό στο γενετικό τόπο αυτού του δείκτη.

Εάν, ωστόσο, ο τόπος του δείκτη X βρίσκεται κοντά σε γονίδιο νόσου, οι ασθενείς αδελφοί θα αναμενόταν να έχουν κοινά αλληλία του δείκτη συχνότερα από ότι προβλέπεται με τις μεντελικές αναλογίες συνάθροισης. Η εξέταση μεγάλου αριθμού ζευγών ασθενών αδελφών βοηθά να αποκτηθεί στατιστική απόδειξη ότι έτσι συμβαίνει σε δεδομένο υπό εξέταση δείκτη, χρησιμοποιώντας την ανάλυση χ^2 με τη μηδενική υπόθεση ότι δεν υπάρχει αυξημένη συχνότητα κοινών αλληλίων στο γενετικό τόπο του δείκτη. Αυτή είναι η ουσία της ανάλυσης ASP (13).

Έρευνα γονιδιώματος για μη MHC γονίδια

Χρησιμοποιώντας ανάλυση ζεύγους ασθενών αδελφών και άλλες μεθόδους γενετικής σύνδεσης κατέστη προφανές ότι πολλά γονίδια έξω από το MHC συμβάλλουν σε ρευματικές/αυτοάνοσες νόσους. Μολονότι κανένα από αυτά τα γονίδια δεν έχει οριστικά ταυτοποιηθεί, είναι πιθανό να ταυτοποιηθούν στο άμεσο μέλλον. Ίσως η πιο σημαντική υποψηφιότητα είναι ο ΣΕΛ, στον οποίο ένα γονίδιο ή γονίδια στο χρωμόσωμα 1 είναι προφανώς σημαντικά τόσο στο λύκο του ανθρώπου όσο και στο λύκο του ποντικού (14, 15). Ερευνες σε όλο το γονιδίωμα στην αγκυλωτική σπονδυλαρθρίτιδα (16) και στη ΡΑ (17, 18) αρχίζουν επίσης να αποκαλύπτουν χρωμοσωμικές περιοχές με ενδιαφέρον. Αρχίζει να δημιουργείται η εντύπωση ότι πολλαπλά γονίδια σε πολύπλοκα και επικαλυπτόμενα σχήματα, περιλαμβανομένων γονιδίων εντός του MHC, εμπλέκονται στις νόσους αυτές. Πιθανώς αυτή η εμπλοκή αντανakλά επικαλυπτόμενη ομάδα μοριακών οδών, οι οποίες μετέχουν στην παθογένεια των αυτοανόσων νόσων.

Βιβλιογραφία

1. Egea E, Iglesias A, Salazar M, et al. The cellular basis for lack of antibody response to Hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991; 173:531-538.
2. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77:268-297.
3. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:479-486.
4. Gregersen PK. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. *Arthritis Res* 1999; 1:37-44. Available at: <http://arthritis-research.com/26oct99/ar0101r04>.
5. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85:311-8.
6. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506-512.
7. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999; 401:921-923.
8. Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7:263-269.
9. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, et al. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:1472-1477.
10. Ott J. *Analysis of Human Genetic Linkage*. 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins Univ Press, 1991.
11. Rubin LA, Amos CI, Wade JA, et al. Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1212-1220.
12. Moser KL, Neas BR, Salmon JE, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14869-14874.
13. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *Am J Hum Genet* 1990; 46:229-241.
14. Harley JB, Moser KL, Gaffney PM, Behrens TW. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:690-696.
15. Criswell LA, Amos CI. Update on genetic risk factors for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12:85-90.
16. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, et al. A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:588-595.
17. Cornelis F, Faure S, Martinez M, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10746-10760.
18. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, et al. A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 2001; 68:927-936.

