



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος

«Απουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *VSIG4* σε Σύνδρομο Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος ορού»

«Absence of *VSIG4* gene mutations in a Neutropenia Syndrome with low serum Complement levels»

Εκπόνηση: Γκοβάτσου Αριάδνη του Νικολάου

A.M. 1820076

Λάρισα 2024

Τριμελής επιτροπή:

Ματθαίος Σπελέτας

Σταματία Παπουτσοπούλου

Φανή Καλαλά

Εκπόνηση: Γκοβάτσου Αριάδνη του Νικολάου

A.M. 1820076

Λάρισα 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η μελέτη του γονιδίου *VSIG4* σε ασθενή με Σύνδρομο Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό και στη μητέρα του αποτέλεσε το αντικείμενο της πτυχιακής μου εργασίας για την ολοκλήρωση των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στην Ιατρική Σχολή Λαρίσης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Ματθαίου Σπελέτα, στον οποίο οφείλω βαθύτατες ευχαριστίες.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να εκφράσω την ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη μου στις καθηγήτριες Ανοσολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και του Τμήματος Ιατρικής, Σταματία Παπουτσοπούλου και Φανή Καλαλά αντίστοιχα, που μου παρείχαν τα απαραίτητα υλικά και πνευματικά εφόδια για να αναπτύξω το ενδιαφέρον μου για την Ανοσολογία και να προσανατολίσω τις σπουδές μου σε αυτόν τον τομέα, καταφέρνοντας να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία με επιτυχία. Η συνεργασία μου με τους καθηγητές Ματθαίο Σπελέτα, Σταματία Παπουτσοπούλου και Φανή Καλαλά ήταν καθοριστική για την ανάπτυξη του έντονου ενδιαφέροντός μου προς τον κλάδο της Ανοσολογίας, καθώς η συνεχής υποστήριξή τους και όσα μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου αποτέλεσαν πολύτιμο θησαυρό που συμπλήρωσε τον κύκλο των προπτυχιακών μου σπουδών, εισάγοντάς με στον χώρο της έρευνας.

Παράλληλα, ευχαριστώ την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ανοσοϊστοσυμβατότητας Νάνσυ Φουσίκα και τον υποψήφιο Διδάκτορα Αχιλλέα Γαλανόπουλο που ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα της διεκπεραίωσης των πειραμάτων που απαιτούνταν για την πτυχιακή μου εργασία προσφέροντάς μου καθοδήγηση, βοήθεια και στήριξη σε κάθε εμπόδιο που αντιμετώπιζα τόσο στο πειραματικό σκέλος όσο και στη διαμόρφωση του κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τους φίλους μου και τους γονείς μου Ειρήνη και Νικόλαο, των οποίων η αμέριστη στήριξη, η υπομονή και η αγάπη αποτέλεσαν τον βράχο πάνω στον οποίο μπορούσα πάντα να βασίζομαι, τόσο κατά τη διάρκεια των σπουδών μου όσο και σε όλη τη ζωή μου, επιτρέποντάς μου να πραγματοποιήσω τα όνειρα και τους στόχους μου και να εξελιχθώ σε έναν καλύτερο άνθρωπο.

Περίληψη

Το Σύνδρομο Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό και η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) είναι διαταραχές που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και τη νευρολογική λειτουργία, αντίστοιχα, οδηγώντας σε αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις και σε μειωμένες προσαρμοστικές λειτουργίες. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις ενδέχεται να συνδέονται με γενετικές παραλλαγές που διαταράσσουν τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και τη λειτουργία του συστήματος Συμπληρώματος. Ένα υποψήφιο γονίδιο που μπορεί να εμπλέκεται είναι το *VSIG4*, το οποίο βρίσκεται στην περικεντρομερή περιοχή του Χ- χρωμοσώματος και κωδικοποιεί έναν υποδοχέα του Συμπληρώματος που εκφράζεται στα μακροφάγα, ρυθμίζοντας τη φαγοκυττάρωση και καταστέλλοντας την ενεργοποίηση των Τ- κυττάρων και τη φλεγμονώδη αντίδραση.

Με δεδομένη την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας στους άνδρες και την διαγνωσμένη ανεπάρκεια του Συμπληρώματος στον υπό μελέτη άρρεν ασθενή, το *VSIG4* επιλέχθηκε για έλεγχο γενετικών παραλλαγών. Για την ανάλυση του γονιδίου *VSIG4* χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από άρρεν ασθενή, με διάγνωση Ουδετεροπενίας συνοδευόμενης με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό του αίματος και Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD), και από την υγιή μητέρα του. Μέσω της μεθοδολογίας PCR- Sanger Sequencing, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των εξονίων του *VSIG4*, χωρίς να ανιχνευτούν παθογόνες μεταλλάξεις στα δείγματα του ασθενούς ή της μητέρας του, υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο αυτό δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην εμφάνιση των διαταραχών αυτών στην περίπτωση που μελετήθηκε.

Επιπλέον, η μελέτη αυτή αναδεικνύει τον ρόλο της γενετικής ανάλυσης στην έρευνα γενετικών διαταραχών και υπογραμμίζει τη σημασία των βιοπληροφορικών εργαλείων και της αλληλούχισης στην ανάλυση γονιδίων και, κατ' επέκταση, στην κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου πολύπλοκων συνδρόμων.

Abstract

Neutropenia Syndrome with low serum Complement levels and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) are disorders that affect the immune system and the neurological function, respectively, leading to increased susceptibility to infections and impaired adaptive functions. These pathological conditions may be associated with genetic variations that disrupt the regulation of immune responses and the function of the Complement system. One candidate gene that may be involved is *VSIG4*, located in the pericentromeric region of the X- chromosome, which encodes a Complement receptor expressed in Macrophages, regulating phagocytosis and suppressing T- cell activation and the inflammatory response.

Given the higher prevalence of ADHD in males and the diagnosed Complement deficiency in the male patient under study, *VSIG4* was selected for screening of genetic variations. For the genetic analysis of *VSIG4* gene, DNA samples were obtained from a male patient diagnosed with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Neutropenia with Complement deficiency, as well as from his healthy mother. Using PCR- Sanger Sequencing methodology, an analysis of the *VSIG4* gene exons was conducted, without detecting any pathogenic mutation in either the patient's or his mother's samples. This suggests that this gene does not appear to be involved in the occurrence of these disorders in the case studied.

Additionally, this study highlights the role of genetic analysis in the research of genetic disorders and emphasizes the importance of bioinformatics tools and sequencing in gene analysis, and by extension, in understanding the genetic background of complex syndromes.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή	8
1.1 Ουδετεροπενία	8
1.2 Καταρράκτης των αντιδράσεων του Συμπληρώματος	9
1.2.1 Πρωτογενείς- Συγγενείς Ανεπάρκειες του Συμπληρώματος	10
1.2.2 Δευτερογενείς- Επίκτητες Διαταραχές του Συμπληρώματος	10
1.3 Φλεγμονή και Νευροαναπτυξιακές Διαταραχές	11
1.4 Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD)	11
1.5 Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) και Νοητική Υστέρηση (ID)	12
1.6 Νοητική Υστέρηση και X- φυλοσύνδετη Κληρονομικότητα	13
1.7 Ο ρόλος του Γονιδίου <i>VSIG4</i>	14
1.8 Δομή και Έκφραση της <i>VSIG4</i>	15
1.9 <i>VSIG4</i> ως Αρνητικός Ρυθμιστής των T- λεμφοκυττάρων	17
1.10 <i>VSIG4</i> ως Ρυθμιστής του Συστήματος Συμπληρώματος	18
1.11 Μείωση πόλωσης M1 μακροφάγων	20
1.12 Επιπτώσεις των παραλλαγών του Γονιδίου <i>VSIG4</i>	22
1.13 <i>VSIG4</i> και φλεγμονώδεις διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος	23
1.13.1 <i>VSIG4</i> και γήρανση του εγκεφάλου	23
1.13.2 <i>VSIG4</i> και Ενδοεγκεφαλική Αιμορραγία	24
1.13.3 <i>VSIG4</i> και Ισχαιμικό Εγκεφαλικό	24
2. Σκοπός	26
3. Υλικά και Μέθοδοι	27
3.1 Αντικείμενο Μελέτης	27
3.2 Ομάδα Μελέτης	27
3.3 Αιμοληψία	28
3.4 Μοριακές τεχνικές	28
3.4.1 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος- DNA extraction	28
3.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης- PCR	29
3.4.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR	32
3.4.4 Αλληλούχιση κατά Sanger	33

3.5 Περιγραφή Βιοπληροφορικού Εργαλείου	34
3.5.1 Εύρεση Εκκινήτων	34
3.5.2 Βάσεις Δεδομένων για ερμηνεία αποτελεσμάτων αλληλούχησης.....	35
4. Αποτελέσματα	37
5. Συζήτηση- Συμπεράσματα	40
6. Βιβλιογραφία	42

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

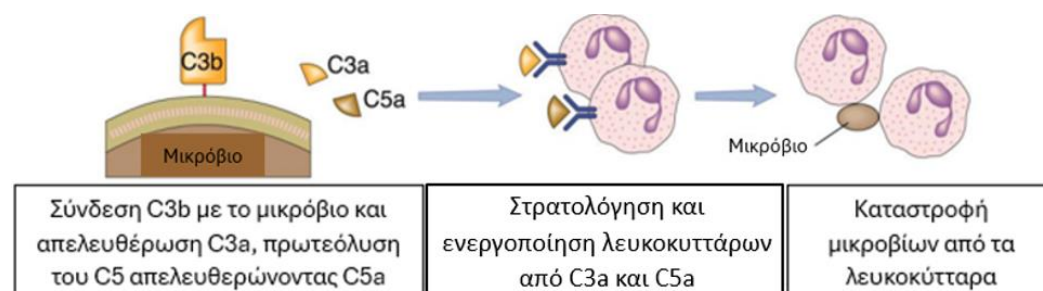
1.1 Ουδετεροπενία

Η Ουδετεροπενία είναι μια αιματολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα. Μπορεί να είναι είτε συγγενής, δηλαδή να υπάρχει από τη γέννηση εξαιτίας γενετικών μεταλλάξεων που επηρεάζουν την παραγωγή των ουδετερόφιλων, είτε επίκτητη λόγω εξωτερικών παραγόντων όπως λοιμώξεις, αυτοάνοσες διαταραχές ή φάρμακα, είτε μπορεί να είναι ιδιοπαθής στην οποία περίπτωση η ακριβής αιτία εμφάνισής της είναι άγνωστη [14, 15, 16].

Οι ασθενείς με Ουδετεροπενία διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρών λοιμώξεων, οι οποίες μπορεί να αποβούν έως και μοιραίες. Τα κλινικά συμπτώματα της Ουδετεροπενίας μπορεί να ποικίλλουν από ασυμπτωματικές περιπτώσεις έως και σοβαρές συστηματικές λοιμώξεις όπως η σηψαιμία [14, 15, 16, 17].

Τα ουδετερόφιλα είναι κρίσιμα για την ανοσολογική άμυνα του οργανισμού και αποτελούν τον πιο πολυάριθμο τύπο λευκών αιμοσφαιρίων. Μάλιστα, είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του οργανισμού από βακτήρια και μύκητες, εκκρίνοντας αντιμικροβιακές ουσίες και απομακρύνοντάς τα μέσω φαγοκυττάρωσης [1, 18].

Κατά τη ανοσολογική απόκριση έναντι σε παθογόνα, τα ουδετερόφιλα είναι από τα πρώτα ανοσοκύτταρα που μετακινούνται χημειοτακτικά από την κυκλοφορία του αίματος, υποβοηθούμενα από αναφυλοτοξίνες που παράγονται κατά την ενεργοποίηση του Συμπληρώματος και άλλες φλεγμονώδεις ουσίες, στους ιστούς που υφίστανται φλεγμονή. Άρα, μια διαταραχή στο σύστημα του Συμπληρώματος μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα των ουδετερόφιλων να μετακινούνται από την κυκλοφορία προς τους φλεγμονώδεις ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, οι διαταραχές του Συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσουν σε αναποτελεσματική ανοσολογική απόκριση που έχει ως αποτέλεσμα τις συχνές λοιμώξεις, την Ουδετεροπενία και άλλες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους [18, 19, 20, 21].



Εικόνα 1: Ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης

1.2 Καταρράκτης των αντιδράσεων του Συμπληρώματος

Το σύστημα του Συμπληρώματος αποτελεί μία από τις αρχαιότερες αμυντικές στρατηγικές και ένα από τα βασικότερα συστατικά της έμφυτης ανοσίας συμμετέχοντας στην άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, συμπληρώνοντας τη δράση των αντισωμάτων. Απαρτίζεται από μια ομάδα περισσότερων των 50 πρωτεϊνών και λειτουργεί ως ένας καταρράκτης πρωτεϊνών, οι οποίες παράγονται κυρίως από ηπατοκύτταρα αλλά και μονοκύτταρα του αίματος, μακροφάγα των ιστών, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής και ουροποιητικής οδού.

Το σύστημα αυτό προσφέρει άμεση άμυνα κατά της μόλυνσης, ενεργοποιώντας φαγοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα, και προκαλώντας την λύση των παθογόνων μέσω του σχηματισμού του Συμπλέγματος Μεμβρανικής Επίθεσης (MAC). Η ενεργοποίηση του Συμπληρώματος, όμως, οδηγεί σε πολλαπλά αποτελέσματα όχι μόνο στον οψωνισμό για ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης και στη λύση των κυττάρων- στόχων, αλλά και στη κάθαρση από ανοσοσυμπλέγματα, στη ρύθμιση της χυμικής ανοσιακής απάντησης και στην έκκριση φλεγμονώδων μορίων, όπως C3a και C5a, που προσελκύουν ουδετερόφιλα και άλλα ανοσοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης- φλεγμονής. Ωστόσο, η μη ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση του συστήματος Συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική φλεγμονή και βλάβη των ιστών συμβάλλοντας στην ανάπτυξη αυτοάνοσων και φλεγμονωδών διαταραχών [1, 19, 21, 22, 23, 24, 25].

Οι πρωτεΐνες του Συμπληρώματος ομαδοποιούνται σε 7 κατηγορίες ανάλογα της δράσης τους:

- 1) Εναρκτήριες πρωτεΐνες
- 2) Ενεργοποιητές κονβερτασών και ενζυμικοί μεσολαβητές
- 3) Οψωνίνες
- 4) Αναφυλοτοξίνες
- 5) Σύμπλεγμα Μεμβρανικής Επίθεσης (MAC)
- 6) Υποδοχείς Συμπληρώματος
- 7) Ρυθμιστικές πρωτεΐνες

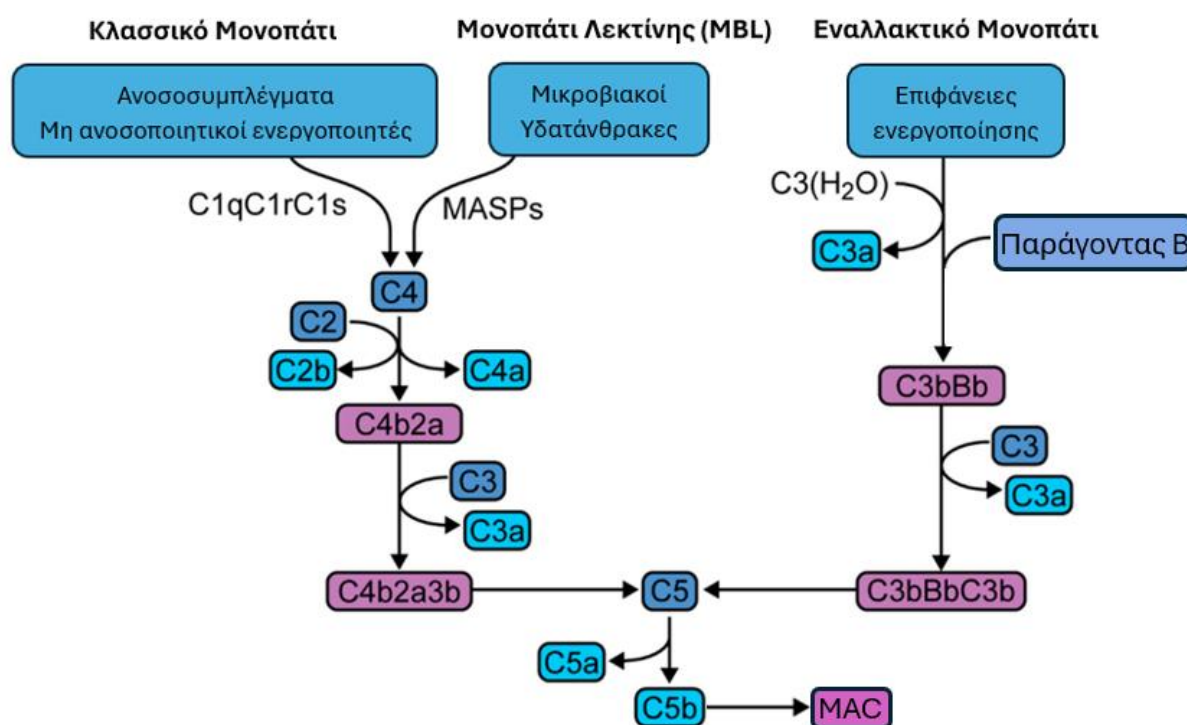
Το γονίδιο *VSIG4* κωδικοποιεί έναν υποδοχέα των θραυσμάτων του συστατικού C3 του Συμπληρώματος, C3b και iC3b, στα μακροφάγα. Η καταστροφή ενός υποδοχέα του Συμπληρώματος οδηγεί σε μειωμένη δράση του Συμπληρώματος [1].

Οι διαταραχές του Συμπληρώματος έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία του συστήματος Συμπληρώματος να ανταποκριθεί αποτελεσματικά σε λοιμώξεις και χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: στις Πρωτογενείς Ανεπάρκειες του Συμπληρώματος και στις Δευτερογενείς Διαταραχές του Συμπληρώματος [26].

1.2.1 Πρωτογενείς- Συγγενείς Ανεπάρκειες του Συμπληρώματος

Οι πρωτογενείς ανεπάρκειες του Συμπληρώματος προκύπτουν λόγω ανεπάρκειας κάποιας πρωτεΐνης οποιασδήποτε εκ των τριών οδών ενεργοποίησης του Συμπληρώματος, ή και εξαιτίας δυσλειτουργίας κάποιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης, ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων [1, 24, 26].

Οι κλινικές εκδηλώσεις ποικίλουν ανάλογα με το ποια πρωτεΐνη μεταλλάχθηκε, αλλά συνήθως περιλαμβάνουν αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, φλεγμονώδεις νόσους και μη απομάκρυνση ανοσοσυμπλεγμάτων και εναπόθεσή τους σε ιστούς προκαλώντας και πάλι φλεγμονή.



Εικόνα 2: Οδοί ενεργοποίησης του Συμπληρώματος (εικόνα 1 από το άρθρο «Targeting the Complement Cascade in the Pathophysiology of COVID-19 Disease» των Nicole Ng και Charles A. Powell)

1.2.2 Δευτερογενείς- Επίκτητες Διαταραχές του Συμπληρώματος

Οι δευτερογενείς διαταραχές του Συμπληρώματος μπορεί να προκύψουν από εξωτερικούς παράγοντες όπως λοιμώξεις που οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του Συμπληρώματος, ή από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων από τον οργανισμό που στοχεύουν πρωτεΐνες του Συμπληρώματος [24, 26, 27].

Ένα ιδιαίτερα γνωστό παράδειγμα ανάπτυξης της διαταραχής λόγω λοίμωξης είναι η μόλυνση του στομάχου από το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*H.pylori*) που οδηγεί σε συνεχή διέγερση της έμφυτης ανοσίας, δηλαδή χρόνια φλεγμονή, καταστρέφοντας το γαστρικό επιθήλιο και προκαλώντας έλκος στομάχου [1].

1.3 Φλεγμονή και Νευροαναπτυξιακές Διαταραχές

Η φλεγμονή αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως σημαντικός παράγοντας στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευροαναπτυξιακών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων της Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD), της Νοητικής Υστέρησης (ID) και των Διαταραχών του Φάσματος του Αυτισμού (ASD), αφού μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου, προκαλώντας διαταραχές στην επικοινωνία και στη συμπεριφορά.

Η δυσλειτουργία του νευροανοσολογικού συστήματος, όπως η χρόνια ενεργοποίηση της μικρογλοίας του φλοιού του εγκεφάλου και η αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών στον εγκεφαλο, προκαλεί βλάβη στις συνάψεις, στην πλαστικότητα του εγκεφάλου -επούλωσή του μετά από τραυματισμούς- και στη δομή των νευρώνων, οδηγώντας σε διαταραχές της κοινωνικής συμπεριφοράς και στην ανάπτυξη χαρακτηριστικών του αυτιστικού φάσματος [5, 6].

1.4 Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD)

Η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) είναι μια κοινή νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από συμπτώματα απροσεξίας, υπερκινητικότητας και παρορμητικότητας. Επηρεάζει σημαντικό μέρος του πληθυσμού, με αξιοσημείωτες διαφορές στον επιπολασμό και την εκδήλωση μεταξύ ανδρών και γυναικών. Συγκεκριμένα, οι άνδρες είναι πολύ πιο πιθανό να διαγνωστούν με ADHD σε σύγκριση με τις γυναίκες [44]. Η Διαταραχή Ελλειμματικής

Προσοχής και Υπερκινητικότητας έχει υψηλό ποσοστό κληρονομικότητας, που υπολογίζεται γύρω στο 74- 76%, υποδηλώνοντας σημαντική γενετική συμβολή στη διαταραχή [45].

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) έχουν εντοπίσει πολλαπλούς γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τη Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας, υπογραμμίζοντας την πολυγονιδιακή φύση της διαταραχής. Αυτές οι μελέτες έχουν αναγνωρίσει σημαντικούς τόπους και εμπλέκουν πολλά γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη λειτουργία του εγκεφάλου [45, 46, 47]. Παράλληλα, υπάρχει σημαντική γενετική επικάλυψη μεταξύ της Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και άλλων ψυχιατρικών διαταραχών, όπως η διαταραχή του φάσματος του Αυτισμού (ASD), η σχιζοφρένεια και η κατάθλιψη. Αυτό υποδηλώνει ότι ορισμένοι γενετικοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν σε πολλαπλές νευροαναπτυξιακές και ψυχιατρικές καταστάσεις [47, 48].

1.5 Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) και Νοητική Υστέρηση (ID)

Η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) και η Νοητική Υστέρηση (ID) είναι δύο νευροαναπτυξιακές διαταραχές που συχνά συνυπάρχουν, δημιουργώντας σημαντικές προκλήσεις στη διάγνωση και τη θεραπεία τους.

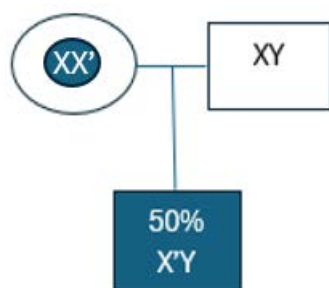
Σχεδόν όλη η συννοσηρότητα μεταξύ της Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και της Νοητικής Υστέρησης μπορεί να αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες [50]. Μάλιστα, άτομα με Νοητική Υστέρηση έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης Διαταραχής Ελλειμματικής προσοχής σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό [52]. Τα άτομα και με τις δύο διαταραχές παρουσιάζουν πιο σοβαρά προβλήματα συμπεριφοράς και υψηλότερα ποσοστά διαταραχής εναντιωματικής συμπεριφοράς σε σύγκριση με τα παιδιά που έχουν μόνο Νοητική Υστέρηση [53].

Η διάγνωση της ADHD σε άτομα με Νοητική Υστέρηση είναι πολύ σύνθετη λόγω της αλληλοεπικάλυψης συμπτωμάτων τους με άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο Αυτισμός (ASD) και οι επικοινωνιακές δυσκολίες. Επιπλέον, η απροσεξία, η υπερκινητικότητα- παρορμητικότητα είναι κοινά χαρακτηριστικά σε παιδιά με Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας, Αυτισμό και Νοητική Υστέρηση, γεγονός που δυσκολεύει τη διάγνωση [54]. Γι' αυτό το λόγο, πολλές φορές η κλινική κρίση κρίνεται πιο αξιόπιστη από τα κριτήρια του DSM- V (Διαγνωστικό και Στατιστικό Εγχειρίδιο Ψυχικών Διαταραχών) [51].

1.6 Νοητική Υστέρηση και X- φυλοσύνδετη Κληρονομικότητα

Τόσο η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας όσο και η Νοητική Υστέρηση έχουν μεγαλύτερο επιπολασμό στα αρσενικού φύλου άτομα απ' ό,τι στα θηλυκού φύλου. Μέχρι τώρα δεν έχει εξακριβωθεί η αιτία που υποβόσκει σε αυτή την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας στους άνδρες αλλά, όσον αφορά τη Νοητική Υστέρηση, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισής της στα άρρενα άτομα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία μονογονιδιακών μεταλλάξεων σε γονίδια του X- χρωμοσώματος (XLMR, X- Συνδεδεμένη Νοητική Υστέρηση), αφού τα άτομα αρσενικού φύλου έχουν μόνο ένα X- χρωμόσωμα (XY), οπότε οι μεταλλάξεις σε αυτό το χρωμόσωμα δεν αντισταθμίζονται από ένα δεύτερο αντίγραφο του γονιδίου όπως γίνεται στα θηλυκά άτομα. Τα θηλυκού φύλου άτομα, λοιπόν, μπορούν να εμφανίζουν ετεροζυγωτία φέροντας ένα υπολειπόμενο παθογόνο γονίδιο και εμφανίζοντας φυσιολογικό φαινότυπο αλλά οι αρσενικού φύλου απόγονοί τους μπορεί κατά 50% να εμφανίζουν τον παθογόνο φαινότυπο- τη Νοητική Υστέρηση [4].

Δηλαδή, έστω X' το X- χρωμόσωμα που φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο υπεύθυνο για τη Νοητική Υστέρηση, μητέρα -ετερόζυγη ως προς το γονίδιο αυτό- και πατέρας υγιείς:



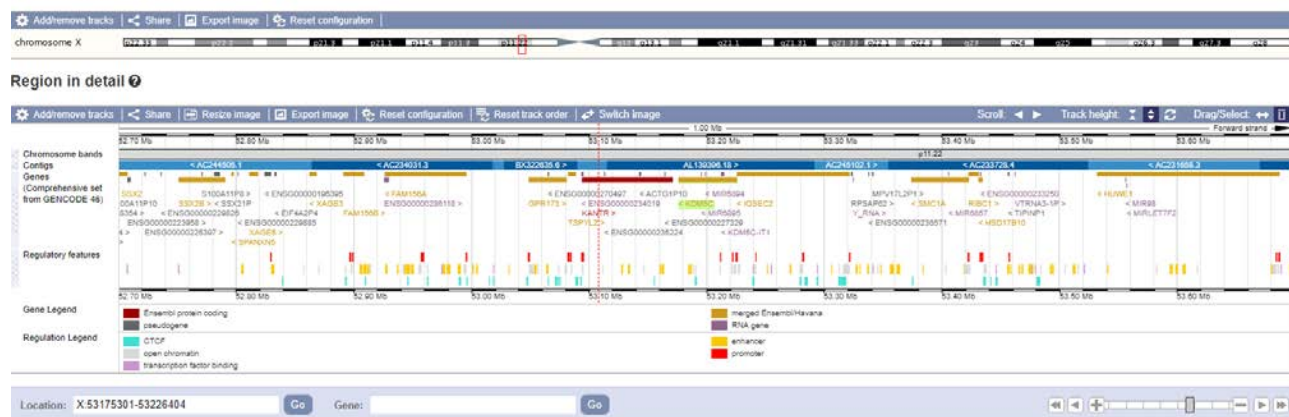
Εικόνα 3: Πιθανότητα απόκτησης πάσχοντος αγοριού από διασταύρωση υγιών γονέων, με ετερόζυγη μητέρα για υπολειπόμενο X- συνδεδεμένο παθογόνο γονίδιο

Έχουν ήδη ταυτοποιηθεί αρκετά γονίδια που σχετίζονται με τη Νοητική Υστέρηση, αλλά υπάρχει η υπόθεση ότι πολλά ακόμα γονίδια θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη διαταραχή αυτή και δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί.

Δύο από τα πιο πρόσφατα συσχετισμένα με Νοητική Υστέρηση X- συνδεδεμένα γονίδια είναι το *JARID1C* και το *USP9X* που βρίσκονται, αντίστοιχα, στη περικεντρομερή περιοχή του X- χρωμοσώματος και κοντά σε αυτή [4].

- Το *JARID1C* εμπλέκεται στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Chromosome X: 53,175,301-53,226,404



Εικόνα 4: Θέση του JARIC1C στο X- χρωμόσωμα μέσω της Ensembl Genome Browser

- Το *UPS9X* συνδέεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στο stress και με τη σηματοδότηση μεταξύ των νευρώνων.

Chromosome X: 41,205,059-41,210,654



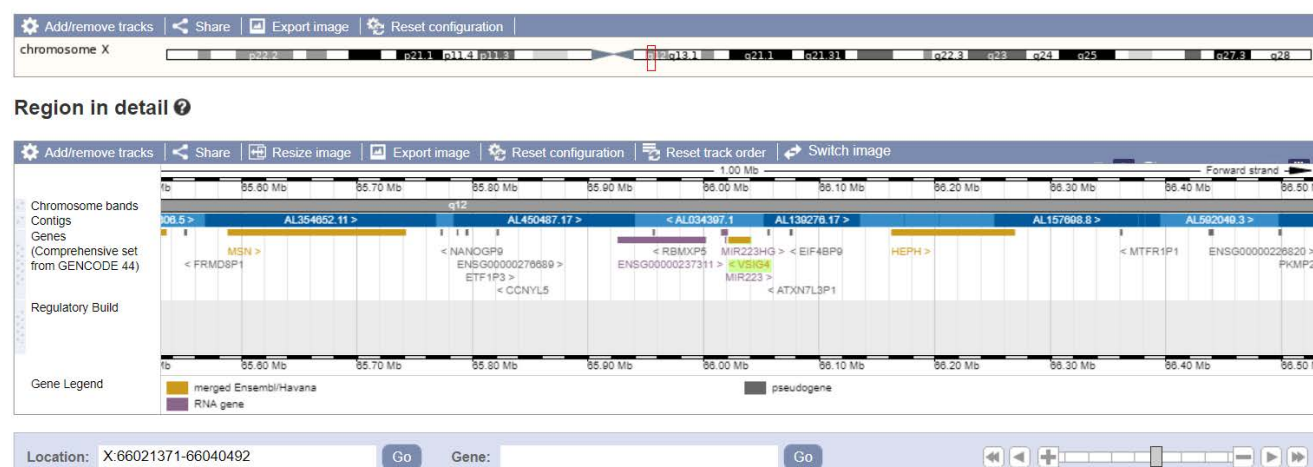
Εικόνα 5: Θέση του UPS9X στο X- χρωμόσωμα μέσω της Ensembl Genome Browser

1.7Ο ρόλος του Γονιδίου *VSIG4*

Το γονίδιο *VSIG4* παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και συγκεκριμένα στη λειτουργία του συστήματος του Συμπληρώματος. Το γονίδιο αυτό περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 2000 ως γονίδιο που βρίσκεται στην περικεντρομερή περιοχή του X- χρωμοσώματος, μια περιοχή που είναι γνωστή για την έντονα συχνή της εμπλοκή σε πολλές νευροαναπτυξιακές διαταραχές, μία εκ των οποίων είναι και η Νοητική Υστέρηση. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο

VSIG4 είναι γνωστή και ως CR1g (Υποδοχέας Συμπληρώματος της Υπεροικογένειας Ανοσοσφαιρινών) και έχει σημαντικές ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες [4, 29, 36].

Chromosome X: 66,021,371-66,040,492



Εικόνα 6: Θέση του *VSIG4* στο X- χρωμόσωμα μέσω της *Ensembl Genome Browser*

1.8 Δομή και Έκφραση της *VSIG4*

Το γονίδιο *VSIG4* είναι αρνητικής πολικότητας και αποτελείται από οχτώ εξόνια. Έχουν καταγραφεί πέντε διαφορετικά μετάγραφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου αυτού, με τη μεταξύ τους διαφορά να εντοπίζεται στην παρουσία, μερική απουσία ή πλήρη απουσία του τομέα ανοσοσφαιρίνης τύπου C. Τα τέσσερα μετάγραφα είναι ίδια λειτουργικά ενώ το πέμπτο μετάγραφο έχει χαρακτηριστεί ως nonsense. Το canonical μετάγραφο είναι μήκους 1807 bp [29, Ensembl Genome Browser].

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *VSIG4* αποτελείται από το εξωκυτταρικό τμήμα, που περιέχει δομικά στοιχεία ανοσοσφαιρίνης, το ενδοκυτταρικό τμήμα και μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή (TM) αποτελούμενη από είκοσι πέντε αμινοξέα.

Συγκεκριμένα, το εξωκυτταρικό τμήμα αποτελείται από:

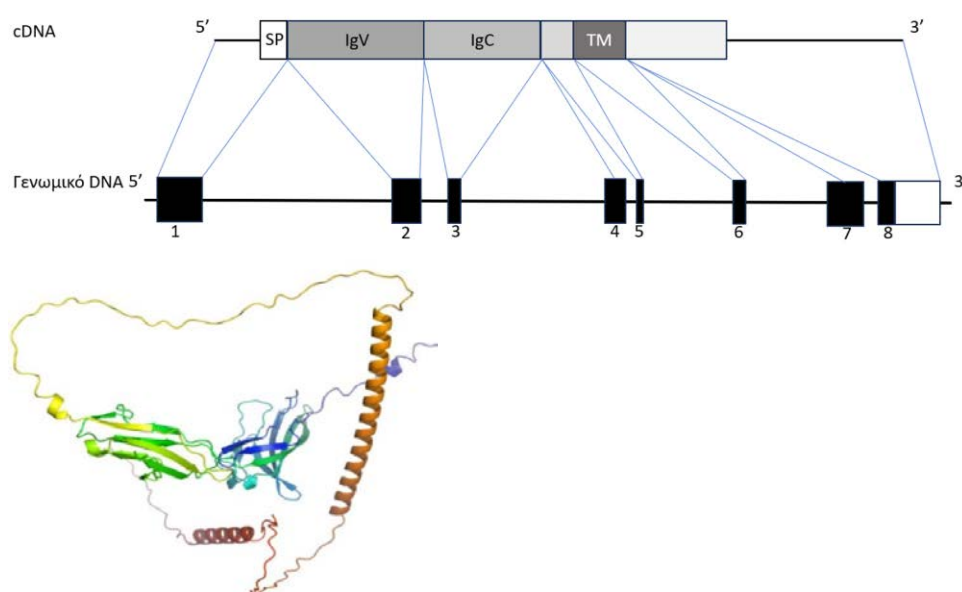
- Την περιοχή IgV, υπεύθυνη για τη δέσμευση αντιγόνου και για τη σύνδεση με την β αλυσίδα του C3b.

- Την περιοχή IgC η οποία εμπλέκεται στον ολιγομερισμό και στις μοριακές αλληλεπιδράσεις.

Ενώ, το ενδοκυτταρικό τμήμα περιέχει:

- Μια θέση φωσφορυλίωσης Πρωτεϊνικής Κινάσης που εξαρτάται από cAMP ή cGMP.
- Μια θέση φωσφορυλίωσης Πρωτεϊνικής Κινάσης C.

Άρα, το εξωκυτταρικό τμήμα της VSIG4 επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, όπως αυτές του Συμπληρώματος, ενώ το ενδοκυτταρικό εμπλέκεται στη μετάδοση σημάτων που ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση [12, 29].



Εικόνα 7: Δομικά χαρακτηριστικά του VSIG4 και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί

Το SP είναι ένα διασπάσιμο πεπτίδιο σήματος που αποτελείται από δεκαεννέα αμινοξέα και η αμινοτερματική περιοχή είναι υδρόφοβη. Συνεπώς, η ολική πρωτεΐνη αποτελείται από τριακόσια ενενήντα εννιά αμινοξέα αλλά η κύρια πρωτεΐνη αποτελείται από τριακόσια ογδόντα αμινοξέα.

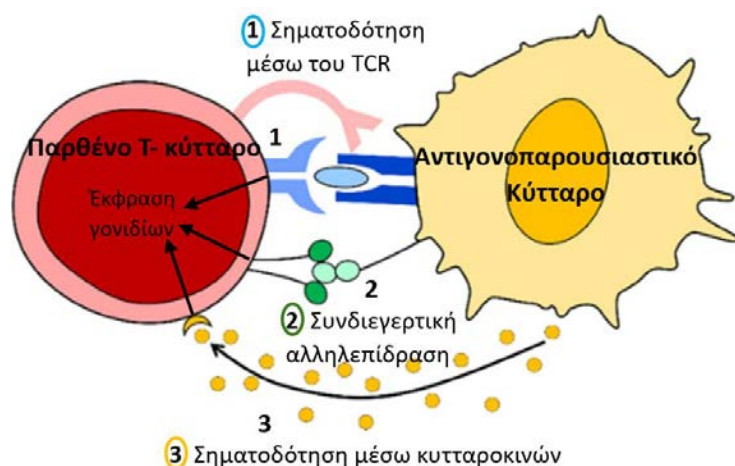
Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη από το VSIG4 περιορίζεται στην επιφάνεια των μακροφάγων, φαγοκυτταρικά κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος [30, 33, 41], και το mRNA του ανιχνεύεται σε αρκετά όργανα, γεγονός που συμβαίνει λόγω της ύπαρξης των resident- μόνιμων μακροφάγων που εδράζονται στους ιστούς. Μάλιστα, είναι γενικά πιο άφθονο στους εμβρυϊκούς ιστούς, με εντονότερη έκφραση στο Ήπαρ και στους Πνεύμονες, παρά στους ενήλικους ανθρώπινους ιστούς, με υψηλότερο επίπεδο έκφρασης να ανιχνεύεται στους Πνεύμονες και στον Πλακούντα

[28]. Δηλαδή, τα δεδομένα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί πιθανώς παίζει ευρύτερο ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου [29, 36], γεγονός που θα μπορούσε να συμβάλει στη συσχέτισή του και με την εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών όπως η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και η Νοητική Υστέρηση.

1.9 VSIG4 ως Αρνητικός Ρυθμιστής των T- Λεμφοκυττάρων

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το *VSIG4* ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών B7, οι οποίες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση και ρύθμιση των T- λεμφοκυττάρων. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι γνωστές ως συνδιεγερτικοί και συν- ανασταλτικοί υποδοχείς και είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της διέγερσης των ανοσοκυττάρων, ιδιαίτερα στην προσαρμοστική ανοσία [30].

Απουσία των συνδιεγερτικών σημάτων ή παρουσία συν- ανασταλτικών σημάτων, τα T- κύτταρα βρίσκονται σε κλωνική ανέργεια, δηλαδή δεν ενεργοποιούνται. Αυτή η λειτουργία είναι ζωτικής σημασίας για την αποτροπή της υπερβολικής ή ανεξέλεγκτης ανοσολογικής απόκρισης που μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις διαταραχές [1, 31, 36].

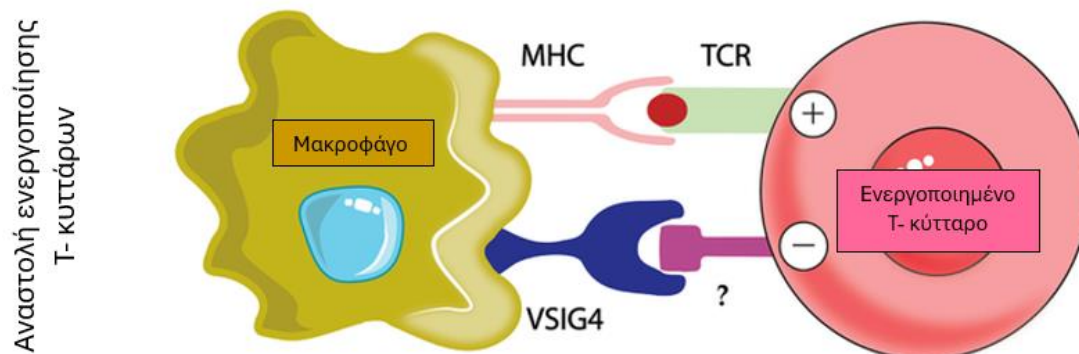


Εικόνα 8: Απαραίτητα σήματα για την ενεργοποίηση T- λεμφοκυττάρων

Μηχανισμός καταστολής T- κυττάρων από VSIG4:

- Η VSIG4 μπορεί να συνδεθεί με ακόμη άγνωστους υποδοχείς στην επιφάνεια των T- κυττάρων, οδηγώντας σε αναστολή της ενεργοποίησής τους [12].

- Οι VSIG4 και CR3 (υποδοχέας του Συμπληρώματος) στην επιφάνεια των μακροφάγων, συνδέονται με τους προσδέτες τους, C3b και iC3b, εκκινώντας την ανασταλτική σηματοδότηση των T- κυττάρων [30].
- Η VSIG4 αναστέλλει την ενεργοποίηση των T- κυττάρων ρυθμίζοντας αρνητικά τις πρωτεϊνικές κινάσες του κυτταρικού κύκλου φάσης G1, όπως τις CDK2, CDK4 ή CDK6 (εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες), επάγει τον αποκλεισμό φάσης G0/G1 και αυτό οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των T- κυττάρων [33].



Εικόνα 9: Σύνδεση της VSIG4 της επιφάνειας των μακροφάγων με υποδοχείς των T- κυττάρων και καταστολή ενεργοποίησής τους (εικόνα 1 από το άρθρο «V-Set and immunoglobulin domain containing (VSIG) proteins as emerging immune checkpoint targets for cancer immunotherapy» από Xia Zhou, Sohail Khan, Dabing Huang, Lu Li)

1.10 VSIG4 ως Ρυθμιστής του Συστήματος Συμπληρώματος

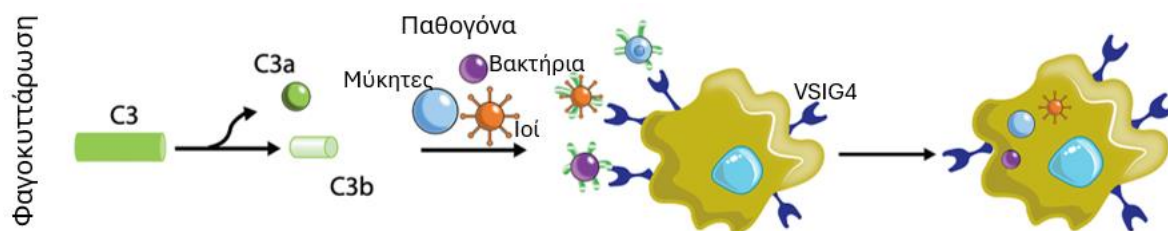
Η VSIG4 έχει επίσης κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του συστήματος Συμπληρώματος, το οποίο αποτελεί βασικό μέρος της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Το σύστημα Συμπληρώματος περιλαμβάνει μια σειρά από πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται διαδοχικά και συνεισφέρουν στην εξουδετέρωση των παθογόνων (εικόνα 2) [1].

Η VSIG4 λειτουργεί ως υποδοχέας του Συμπληρώματος, συγκεκριμένα των θραυσμάτων του C3, τις οψωνίνες C3b και iC3b. Η C3b είναι ένα βασικό συστατικό του Συμπληρώματος αφού έχει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης και της λύσης των παθογόνων κυττάρων. Ωστόσο, η υπερβολική ενεργοποίηση του C3b μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη στους φυσιολογικούς ιστούς του σώματος. Η VSIG4 συνδεόμενη με την C3b περιορίζει την περαιτέρω ενεργοποίηση του καταρράκτη του Συμπληρώματος συμβάλλοντας στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ άμυνας έναντι των παθογόνων (εικόνες 2 και 12) [1, 30, 32, 36].

Εμβαθύνοντας στις λειτουργίες της VSIG4 σχετικά με το σύστημα Συμπληρώματος, η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στη φαγοκυττάρωση και στη φλεγμονώδη αντίδραση [36].

i. Φαγοκυττάρωση:

Η VSIG4 συμμετέχει στην άμυνα έναντι των λοιμώξεων της κυκλοφορίας του αίματος. Αναγνωρίζοντας τη β αλυσίδα του C3b βοηθά τα μακροφάγα να φαγοκυτταρώσουν παθογόνα με επισήμανση C3b ή iC3b [33, 43].



Εικόνα 10: Φαγοκυττάρωση παθογόνων με σήμανση C3b μέσω της αναγνώρισης αυτού από τη VSIG4 (εικόνα 1 από το άρθρο «V-Set and immunoglobulin domain containing (VSIG) proteins as emerging immune checkpoint targets for cancer immunotherapy» από Xia Zhou, Sohail Khan, Dabing Huang, Lu Li)

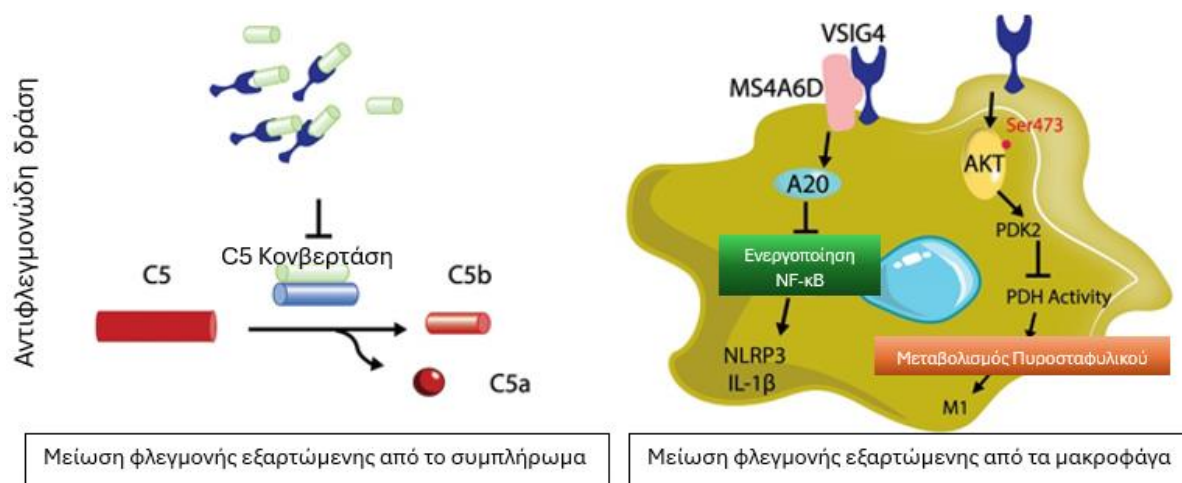
ii. Αντιφλεγμονώδη δράση:

Η VSIG4 λειτουργεί ως ρυθμιστής της φλεγμονής μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των μακροφάγων, της παραγωγής αντιφλεγμονωδών σημάτων και της δέσμησης του C3b που παρεμποδίζει την Εναλλακτική οδό ενεργοποίησης του Συμπληρώματος αλλά όχι την Κλασσική οδό.

Η VSIG4 αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη MS4A6D σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο επιφανειακής ανασταλτικής σηματοδότησης, οδηγώντας σε εξασθενημένη ενεργοποίηση του φλεγμονώδους NLRP3 (πρωτεΐνη που περιέχει NOD-, LRR- και πυρίνη 3) και σε μειωμένη έκκριση της φλεγμονώδους ιντερλευκίνης IL-1β μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης JAK2- STAT3- A20 [10, 11, 34].

Επιπλέον, η VSIG4 μπορεί να παρέμβει στον μεταβολισμό του μιτοχονδριακού πυροσταφυλικού στα μακροφάγα ενεργοποιώντας την σηματοδοτική οδό PI3K- Akt- STAT3, προκαλώντας αυξημένη έκφραση της Κινάσης 2 της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης (PDK2) η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητα της Πυροσταφυλικής Αφυδρογονάσης (PDH) μέσω φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα τη μείωση του μεταβολισμού του Πυροσταφυλικού, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της έκκρισης φλεγμονωδών παραγόντων και της πόλωσης M1 μακροφάγων. Η αναστολή της PDH μειώνει την παραγωγή πυροσταφυλικού και ακετυλο- CoA, περιορίζοντας την ενέργεια που διατίθεται για τη φλεγμονώδη αντίδραση των μακροφάγων [13].

Τέλος, με τη σύνδεση της VSIG4 με το C3b, το C3b δεσμεύεται και δεν μπορεί να συμμετάσχει στη «συναρμολόγηση» της C5 κονβερτάσης που διασπά το C5 στην αναφυλοτοξίνη C5a και στην C5b που συμμετέχει στην κυτταρική λύση. Άρα και πάλι η VSIG4 έχει αντιφλεγμονώδη δράση [1, 33].

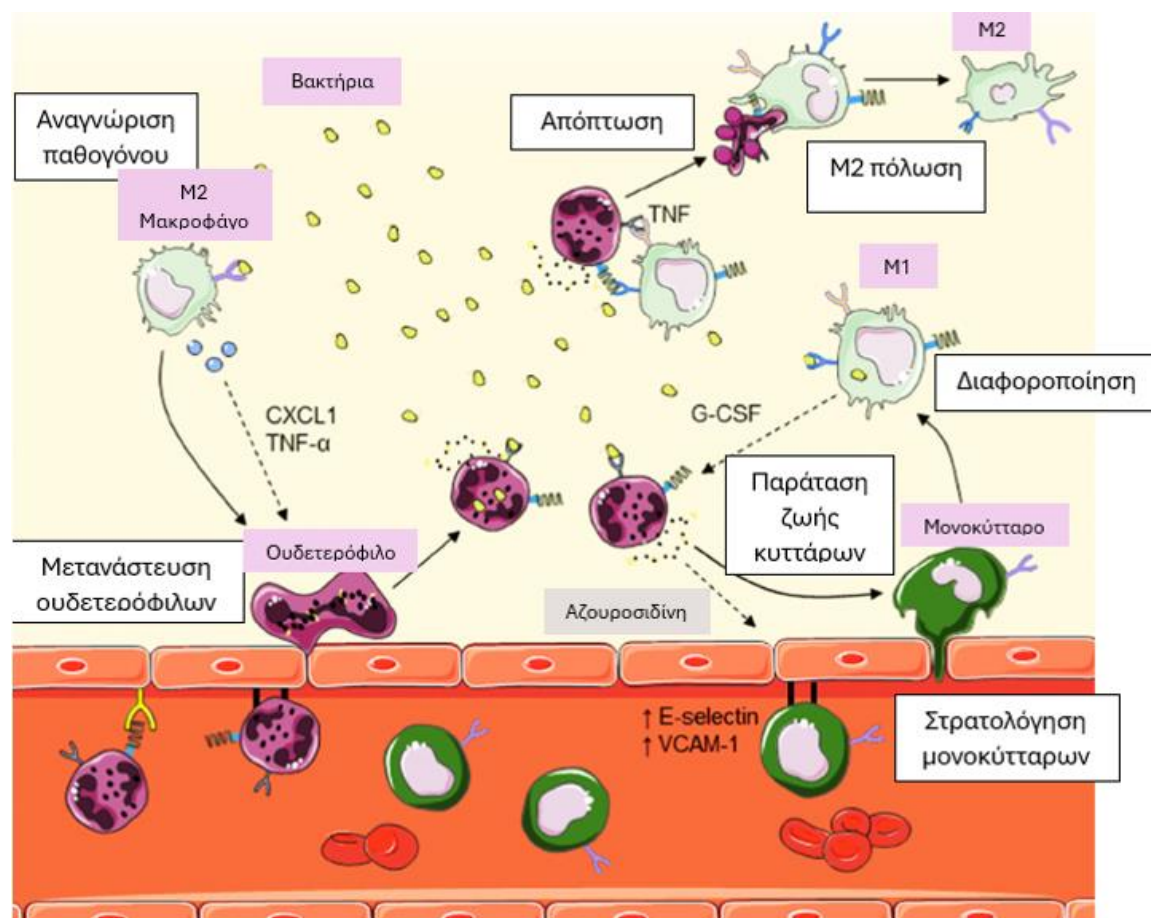


Εικόνα 11: Αντιφλεγμονώδη δράση της VSIG4 μέσω καταστολής της C5 κονβερτάσης και μέσω παρεμβολής σε λειτουργίες των μακροφάγων (εικόνα 1 από το άρθρο «V-Set and immunoglobulin domain containing (VSIG) proteins as emerging immune checkpoint targets for cancer immunotherapy» από Xia Zhou, Sohail Khan, Dabing Huang, Lu Li)

1.11 Μείωση πόλωσης M1 μακροφάγων

Η αλληλεπίδραση των ουδετερόφιλων με τα μακροφάγα κατά τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης ακολουθεί συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά, τα μακροφάγα τύπου M2 που βρίσκονται στους ιστούς, ανιχνεύουν το παθογόνο και εκκρίνουν τη χημειοκίνη CXCL1 (C-X-C μοτίβο με συνδέτη 1) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α) που βοηθούν στη στρατολόγηση ουδετερόφιλων και στην ενεργοποίησή τους, υποβοηθούμενα και από αναφυλοτοξίνες που παράγονται κατά την ενεργοποίηση του Συμπληρώματος (C3a, C5a). Τα ουδετερόφιλα που φτάνουν, καταστρέφουν τα παθογόνα και παράγουν αζουροσιδίνη, η οποία ενισχύει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνη και VCAM-1 (πρωτεΐνη προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1) στο αγγειακό ενδοθήλιο, διευκολύνοντας τη στρατολόγηση νέων μονοκυττάρων. Τα μονοκύτταρα που εισέρχονται στους ιστούς διαφοροποιούνται σε μακροφάγα τύπου M1, που συνεχίζουν την εξουδετέρωση των παθογόνων και παράγουν G-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικίας 3), που παρατείνει τη ζωή των ουδετερόφιλων. Μετά το πέρας της απόκρισης, τα μακροφάγα M1 αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα μέσω του TNF για να προκαλέσουν την απόπτωσή τους. Τα αποπτωτικά ουδετερόφιλα απομακρύνονται από τα M1

μακροφάγα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε M2 αποκαθιστώντας την ομοιόσταση και την επούλωση των ιστών [35].



Εικόνα 12: Αλληλεπίδραση ουδετερόφιλων- μακροφάγων κατά την ανοσολογική απόκριση (εικόνα 1 από το άρθρο «Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease» των Kathryn Prame Kumar, Alyce J. Nicholls, Connie H. Y. Wong)

Εστιάζοντας στα μακροφάγα, φαγοκύτταρα προερχόμενα από μονοκύτταρα που έχουν μεταναστεύσει στον ιστό, διακρίνουμε πως διαφοροποιούνται σε δύο τύπους, τα M1 μακροφάγα και τα M2 μακροφάγα.

- Τα M1 είναι υπεύθυνα για την ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης και για την καταπολέμηση των παθογόνων, παράγοντας φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η TNF-α, η IL-1β και η IL-6.
- Τα M2 προάγουν την καταστολή της φλεγμονής και την επούλωση των ιστών, συμμετέχοντας στην αποδόμηση του νεκρού ιστού, στην αγγειογένεση και στην έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-10.

Η ισορροπία μεταξύ M1 και M2 μακροφάγων είναι απαραίτητη για την πρόληψη της υπερβολικής ιστικής βλάβης.

Συνολικά, όταν υπάρχει τραυματισμός, το Συμπλήρωμα ενεργοποιεί τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω των παραγόντων C3a και C5a. Αυτοί οι παράγοντες προσελκύουν μακροφάγα και, χημειοτακτικά, ουδετερόφιλα στην περιοχή της φλεγμονής, προάγοντας την απόκριση του ανοσοποιητικού. Η αρχική φλεγμονώδης απόκριση των ουδετερόφιλων και των M1 μακροφάγων είναι ζωτικής σημασίας για την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων και την εξάλειψη των παθογόνων. Με τη μείωση της πόλωσης των M1 μακροφάγων λόγω της VSIG4, οι M1 μακροφάγοι εμποδίζονται να μετατραπούν σε ενεργή μορφή M1 ή μετατρέπονται σε μια λιγότερο ενεργή- φλεγμονώδη κατάσταση. Άρα, η μείωση της πόλωσης των M1 μακροφάγων οδηγεί σε μείωση της φλεγμονής ενώ, ταυτόχρονα, προάγεται η μετάβαση των μακροφάγων προς τον αντιφλεγμονώδη τύπο M2, υπεύθυνο για την ανοσοκαταστολή, την αφαίρεση κατεστραμμένων ιστών και την προώθηση της δημιουργίας νέου ιστού. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της αποκατάστασης του ιστού.

Συνεπώς, η αλληλεπίδραση ουδετερόφιλων και μακροφάγων κρίνεται απαραίτητη για τη ρύθμιση και τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ φλεγμονής και αποκατάστασης των ιστών. Η αποτυχία διατήρησης της ισορροπίας αυτής μπορεί να οδηγήσει είτε σε ανεπαρκή αντίδραση του οργανισμού είτε σε υπερβολική φλεγμονή και καταστροφή του ιστού [18].

Σε συνδυασμό αυτών των δεδομένων και της εμφάνισης Συνδρόμου Ουδετεροπενίας στον ασθενή, ευκόλως συμπεραίνεται πως η ισορροπία αυτή έχει απορρυθμιστεί, πιθανότατα επηρεάζοντας και την ενεργοποίηση των μακροφάγων και της φλεγμονώδης αντίδρασης.

1.12 Επιπτώσεις των παραλλαγών του Γονιδίου VSIG4

Οι γενετικές παραλλαγές ή μεταλλάξεις στο γονίδιο VSIG4 μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ομοίωση του οργανισμού, καθώς μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση της πρωτεΐνης του ή την ικανότητά της να συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες, όπως η C3b. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να εμφανιστεί είτε ανεπαρκής καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης, που μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις παθήσεις, είτε υπερβολική καταστολή, που θα έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία του οργανισμού να αντιδράσει αποτελεσματικά σε λοιμώξεις [1, 25, 32, 36].

Συγκεκριμένα, δυσλειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το VSIG4 μπορεί να προκαλέσει μειωμένη δέσμευση των οψωνίων C3b και iC3b απορρυθμίζοντας το Σύστημα Συμπληρώματος και μειώνοντας τη συμμετοχή των μακροφάγων στη φαγοκυττάρωση που σε συνδυασμό και με την υπερβολική φλεγμονή που επίσης μπορεί να προκληθεί, να οδηγήσει σε αυξημένη προσέλκυση ουδετερόφιλων στο

σημείο της φλεγμονής. Επιπλέον, η υπερβολική φλεγμονή στον εγκέφαλο θα μπορούσε να προκαλέσει και νευρολογικές και νευροαναπτυξιακές διαταραχές όπως η Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD).

1.13 Σύνδεση της VSIG4 με φλεγμονώδεις διαταραχές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Η μελέτη του VSIG4 σε διάφορες φλεγμονώδεις διαταραχές αποκαλύπτει τη σημασία του στη διατήρηση της ομοιόστασης και, ιδίως, της ισορροπίας μεταξύ ανοσολογικής απόκρισης και παθολογικής φλεγμονής, γεγονός που αναδεικνύει ως τον πιο σημαντικό του ρόλο την καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Ήδη έχει συσχετιστεί με ορισμένες φλεγμονώδεις διαταραχές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, στις οποίες ο ρόλος του αναλύεται παρακάτω.

1.13.1 VSIG4 και γήρανση του εγκεφάλου

Σε βιοπληροφορική ανάλυση το 2022 για την ταυτοποίηση βασικών βιοδεικτών και μονοπατιών που παίζουν ρόλο στη φυσιολογική γήρανση του εγκεφάλου, αναλύθηκε η διαφορά στην έκφραση και του γονιδίου VSIG4 μεταξύ ατόμων με φυσιολογική γήρανση του εγκεφάλου και ατόμων με γνωστικές διαταραχές και επισημάνθηκε ως ένα από τα βασικά γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση της φυσιολογικής γνωστικής λειτουργίας κατά τη γήρανση.

Η έρευνα αυτή αποσκοπούσε στον εντοπισμό παραγόντων που διατηρούν τον εγκέφαλο λειτουργικό παρά την αύξηση της ηλικίας καθώς η γήρανση του εγκεφάλου συνδέεται συχνά με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Αλτσχάιμερ.

Έτσι, εντοπίστηκαν διάφορα μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με τη γήρανση του εγκεφάλου, από τα οποία τα σημαντικότερα περιλαμβάνουν τη φλεγμονή, την αντίδραση στο οξειδωτικό stress και τα συστήματα νευροδιαβίβασης.

Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο VSIG4 βρέθηκε να συμμετέχει στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και να ρυθμίζεται προς τα κάτω στους ηλικιωμένους- στο γερασμένο εγκέφαλο, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση επιρροή του στην ανάπτυξη της γήρανσης του εγκεφάλου.

Πέρα από το VSIG4, στον γερασμένο εγκέφαλο εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης τριών παρόμοιων αλλά διακριτών υπομονάδων της C1Q (C1QA, C1QB,

C1QC), η οποία είναι κύρια πρωτεΐνη της Κλασσικής οδού ενεργοποίησης του Συμπληρώματος και, επομένως, προάγει την φλεγμονώδη απόκριση (εικόνα 2).

Συνολικά, η μελέτη προτείνει ότι η διατήρηση χαμηλότερης ανοσοφλεγμονώδους δραστηριότητας μέσω της ρύθμισης των παραπάνω γονιδίων, θα μπορούσε να συνδράμει στη διατήρηση της γνωστικής λειτουργίας κατά τη γήρανση [7, 8].

Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα άτομα με Νοητική Υστέρηση συχνά παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα φλεγμονής και οξειδωτικού stress, τα οποία συνδέονται με την πρόωρη γήρανση και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών [9].

1.13.2 VSIG4 και Ενδοεγκεφαλική Αιμορραγία

Η Ενδοεγκεφαλική Αιμορραγία (ICH) είναι μια θανατηφόρα εγκεφαλοαγγειακή νόσος που προκαλεί εγκεφαλικές βλάβες μέσω κυρίως της ανάπτυξης φλεγμονωδών αντιδράσεων.

Η NLRP3 (πρωτεΐνη που περιέχει NOD-, LRR- και πυρίνη 3) ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη απόκριση, σχετίζεται με βλάβες στους ιστούς που προκαλούνται από εγκεφαλική αιμορραγία συμβάλλοντας στην παθογένεση της ICH και τα επίπεδά της αυξάνονται μετά από ICH.

Το VSIG4 που εκφράζεται σε μακροφάγα τα οποία κατοικούν σε ηρεμία τον ιστό (M2 μακροφάγα), παρέχει αντιφλεγμονώδη σήματα σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες και τα επίπεδα της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί βρέθηκαν μειωμένα μετά από ICH.

Οι δύο αυτές πρωτεΐνες βρέθηκαν να συνδέονται καθώς έπειτα από τη χορήγηση εξωγενούς VSIG4 πρωτεΐνης σε ποντίκια με ICH, μειώθηκαν τα επίπεδα της NLRP3, έγινε αναστολή της φλεγμονής και βελτιώθηκε η νευρολογική λειτουργία. Αυτό έγινε μέσω της σηματοδοτικής οδού JAK2- STAT3- A20. Το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται στην αναστολή των φλεγμονωδών αποκρίσεων και στη βελτίωση της νευροπροστασίας. Πιο συγκεκριμένα, η VSIG4 ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του JAK2- STAT3, η οποία προάγει την έκφραση του A20, γνωστού αναστολέα της φλεγμονής. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε μείωση της έκκρισης φλεγμονωδών κυτοκινών και στη μείωση του οξειδωτικού stress που είναι κρίσιμο για την προστασία των νευρώνων (εικόνα 11) [10, 11].

1.13.3 VSIG4 και Ισχαιμικό Εγκεφαλικό

Το Ισχαιμικό Εγκεφαλικό είναι μια από τις κύριες αιτίες ανθρώπινων θανάτων και μια βασική αιτία για μακροχρόνια αναπηρία.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η φλεγμονώδης αντίδραση που ρυθμίζεται από τη μικρογλοία του φλοιού του εγκεφάλου προάγει τον θάνατο των νευρώνων αλλά ο μοριακός μηχανισμός παραμένει ασαφής. Ωστόσο, σε μελέτη εν έτη 2019, εντοπίστηκε η μείωση της έκφρασης του *VSIG4* στα μακροφάγα αυτά μετά από εγκεφαλική ισχαιμική βλάβη που προκλήθηκε από Απόφραξη της Μέσης Εγκεφαλικής Αρτηρίας (MCAO), καθώς και υπερβολική ενεργοποίηση του TLR4 (υποδοχέα τύπου Toll 4), που εκφράζεται κυρίως σε νευρογλοιακά κύτταρα συμπεριλαμβανομένης της μικρογλοίας του ιστού, οδηγώντας σε έντονη φλεγμονώδη αντίδραση που επιδεινώνει την εγκεφαλική βλάβη.

Σε ποντίκια με MCAO ανιχνεύθηκε πόλωση των M1 μακροφάγων η οποία αναστάλθηκε σημαντικά έπειτα από υπερέκφραση του *VSIG4*, που επίσης προκάλεσε μείωση της περιοχής του εμφράγματος και του θανάτου των νευρώνων.

Ο αντιφλεγμονώδης ρόλος του *VSIG4* γονιδίου εντοπίζεται στην αλληλεπίδραση της κωδικοποιούμενης του πρωτεΐνης με τον TLR4 αναστέλλοντας την έκφρασή του και κατά συνέπεια την μεταγραφή του φλεγμονώδους πυρηνικού παράγοντα kappa B (NF-κB) και άλλων φλεγμονωδών κυτοκινών και μειώνοντας τον αριθμό των ενεργοποιημένων ανοσοκυττάρων στην περιοχή βλάβης [12, 13].

2 ΣΚΟΠΟΣ

Η παθογένεση της Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και της Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό είναι περίπλοκη και πιθανόν να εμπλέκει ποικίλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αν και έχουν αναγνωριστεί διάφορα γονίδια που συμβάλλουν τόσο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και στην εμφάνιση νευροαναπτυξιακών διαταραχών [8], η συγκεκριμένη εμπλοκή του *VSIG4* στην εμφάνιση αυτών των διαταραχών δεν έχει διερευνηθεί εκτενώς.

Οι κύριοι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι εξής:

1. Να προσδιοριστεί η παρουσία ή απουσία παραλλαγών -short- variants (παραλλαγές, ενθέσεις, διαγραφές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων)- του γονιδίου *VSIG4* σε ασθενή με Ουδετεροπενία με μειωμένα επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό και Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) και στην υγιή μητέρα του. Η εύρεση παραλλαγών θα επέτρεπε τη συσχέτιση της γενετικής ποικιλομορφίας του γονιδίου με αυτές τις διαταραχές και στην εύρεση X- φυλοσύνδετης κληρονομικότητας αυτών.
2. Να διερευνήσει συγκεκριμένα κλινικά χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να προκληθούν από τις παραλλαγές αυτές, υπό την προϋπόθεση ύπαρξής τους.
3. Να προσπαθήσει να συμβάλει στην κατανόηση του γενετικού υποβάθρου της Ουδετεροπενίας με μειωμένα επίπεδα του Συμπληρώματος στον ορό και της Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής μπορεί να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέου γενετικού δείκτη ή στην απόκλιση ενός μέχρι τώρα πιθανού γονιδίου ενδιαφέροντος για αυτές τις διαταραχές βοηθώντας στον καλύτερο «προσανατολισμό» της μελλοντικής έρευνας πάνω σε αυτούς τους παθογόνους φαινοτύπους.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Αντικείμενο μελέτης

Η μελέτη επικεντρώνεται στη γενετική ανάλυση του γονιδίου *VSIG4*, αποσκοπώντας στην ανακάλυψη γενετικών παραλλαγών που ενδέχεται να συνδέονται με την εμφάνιση Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και Ουδετεροπενίας με μειωμένα επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό του αίματος. Η επιλογή ανάλυσης αυτού του γονιδίου έγινε λόγω των χαρακτηριστικών του ότι κωδικοποιεί έναν υποδοχέα του Συμπληρώματος και εδράζεται στο Χ- χρωμόσωμα. Ο υπό μελέτη ασθενής πάσχει από Ουδετεροπενία με ανεπάρκεια Συμπληρώματος και Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) καθώς και πολλά ακόμα, επίσης, αρσενικού φύλου μέλη της οικογένειάς του.

Για την πειραματική διαδικασία, συλλέξαμε περιφερικό αίμα από τον ασθενή, από την υγιή μητέρα του, για ταυτόχρονο έλεγχο Χ- φυλοσύνδετης κληρονομησης, και από μια υγιή γυναίκα ως αρνητικό control. Στη συνέχεια, εξήγαμε το DNA από τα δείγματα από την αιμοληψία του ασθενούς, της μητέρας του και του αρνητικού control. Ακολούθησε η διαδικασία της PCR για την ενίσχυση των περιοχών του γονιδίου *VSIG4* που μας ενδιαφέρουν. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν οχτώ ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση των οχτώ εξονίων του γονιδίου και σχεδιάστηκαν, με τη χρήση controls, πρωτόκολλα για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, το προϊόν κάθε αντίδρασης υποβλήθηκε σε περαιτέρω καθαρισμό και στάλθηκε για αλληλούχιση κατά Sanger. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων, αναλύθηκαν με βιοπληροφορικά εργαλεία για την εκτίμηση της παρουσίας και του τύπου των παραλλαγών στο γονίδιο.

3.2 Ομάδα Μελέτης

Ομάδα μελέτης αποτέλεσε ένας αρσενικού φύλου ασθενής διαγνωσμένος με Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD), Ουδετεροπενία και χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό του αίματος, η υγιής μητέρα του και μία υγιής γυναίκα ως αρνητικό control. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και από τους τρεις συμμετέχοντες ώστε να ακολουθήσουν οι απαραίτητες ερευνητικές διεργασίες.

3.3 Αιμοληψία

Η διαδικασία της αιμοληψίας πραγματοποιήθηκε εν έτη 2021 στο ιδιωτικό Αιματολογικό- Ανοσολογικό ιατρείο του καθηγητή Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Ματθαίου Σπελέτα, στη Θεσσαλονίκη και περιλάμβανε την λήψη δείγματος περιφερικού αίματος από τον ασθενή, τη μητέρα του και το αρνητικό control -υγιή γυναίκα- για ερευνητικούς σκοπούς.

Το περιφερικό αίμα ή αλλιώς φλεβικό αίμα πρόκειται για το αποξυγονωμένο αίμα που επιστρέφει από τους ιστούς στην καρδιά και η συλλογή του γίνεται μέσω φλεβοκέντησης.

Στη συνέχεια, για να αποθηκευτούν τα τρία δείγματα αίματος, εισάχθηκε το καθένα σε κατάλληλο σωλήνα που περιείχε EDTA ως αντιπηκτικό παράγοντα για αποφυγή σχηματισμού θρόμβων αντί για Ηπαρίνη η οποία δεσμεύεται στο DNA και αναστέλλει την Taq πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR). Οι σωλήνες σφραγίστηκαν και ετικετοποιήθηκαν με τα στοιχεία του ασθενούς και την ημερομηνία λήψης ώστε να διασφαλιστεί η σωστή ταυτοποίηση και αποθήκευση [38, 39, 40].

3.4 Μοριακές τεχνικές

3.4.1 Απομόνωση DNA από δείγματα αίματος

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από δείγμα αίματος, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Extractme Genomic DNA kit της Bliirt και ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

1. Σε αποστειρωμένο σωλήνα προστέθηκαν 200 μl από το δείγμα αίματος.
2. Προστέθηκε 1 ml Lysis Buffer για τη λύση των κυττάρων του δείγματος.
3. Ακολούθησε επώαση στον πάγκο και φυγοκέντρηση στα 8.600g για 4 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 375 μl GL Buffer.
5. Προστέθηκαν 10 μl πρωτεϊνάσης K και το μείγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 55°C για 30 λεπτά.

6. Μετά την επώαση, το διάλυμα απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 4 μl RNAase A.
7. Το μείγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10 λεπτά.
8. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400 μl GB Buffer και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 13.000g για 2 λεπτά.
9. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη με φίλτρο και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13.000g για 1 λεπτό.
10. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 600 μl Wash Buffer 1.
11. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.
12. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, προστέθηκαν 500 μl Wash Buffer 2 και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα.
13. Το διάλυμα από το collection tube απορρίφθηκε και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 16.000g για 2 λεπτά.
14. Το collection tube απομακρύνθηκε και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα.
15. Προστέθηκαν 100 μl Elution Buffer και το μείγμα επώαστηκε στον πάγκο για 5 λεπτά.
16. Το τελικό βήμα περιλάμβανε φυγοκέντρωση στα 13.000g για 1 λεπτό, απομάκρυνση της στήλης και αποθήκευση του δείγματος στους -20°C.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε και για τα υπόλοιπα δύο δείγματα αίματος.

3.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η διαδικασία περιλάμβανε την εκτέλεση αντιδράσεων PCR για την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *VSIG4*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οχτώ ξεχωριστές αντιδράσεις προκειμένου να ενισχυθούν και τα οχτώ εξόνια του γονιδίου χρησιμοποιώντας οχτώ διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.

Η διαδικασία της αλληλούχισης επικεντρώθηκε στα εξόνια, στις περιοχές δηλαδή των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καθώς οι μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές είναι πιο πιθανό να επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης και, κατά συνέπεια, να προκαλούν νόσο [26].

Οι συνθήκες των αντιδράσεων επιλέχθηκαν με βάση την θερμοκρασία τήξης (T_m) κάθε εκκινητή που βρίσκεται με το εργαλείο Primer Blast. Έπειτα, μέσω του Oligo Analyzer, βρέθηκε το μήκος κάθε μεταγράφου και η περιεκτικότητα σε Γουανίνη και Κυτοσίνη αφού μεταξύ αυτών των αζωτούχων βάσεων αναπτύσσονται τρεις δεσμοί υδρογόνου γεγονός που καθιστά πιο σταθερή τη σύνδεση δυσχεραίνοντας το στάδιο της αποδιάταξης των αλυσίδων και επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα της σύνδεσης και αποσύνδεσης των εκκινητών.

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα Master Mix αποτελούμενο από:

Πίνακας 1: Σύσταση του Master Mix για την πραγμάτωση PCR για ένα εξόνιο

DFS, HOT Taq polymerase	
dH ₂ O	60,625 μl
Buffer for DFS-Taq or SuperHot-Taq polymerase (διάλυμα που προσφέρεται από τον κατασκευαστή)	12,5 μl
dNTPs (62,5 mM)	10 μl
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,875 μl
5' primer (500 pmoles)	2,5 μl
3' primer (500 pmoles)	2,5 μl

Αυτό το master mix ήταν ποσότητας για την παρασκευή τεσσάρων διαλυμάτων: ενός blank και των τριών δειγμάτων, του ασθενή, της μητέρας του και του αρνητικού control.

Στη συνέχεια, σε φιαλίδιο PCR- tube τελικού όγκου 30 μl προστέθηκαν:

Πίνακας 2: Τελική σύσταση κάθε διαλύματος για την πραγμάτωση PCR για ένα εξόνιο

Master Mix	22 μl
Διάλυμα DFS-Taq Πολυμεράσης (Bioron GmbH, Romerberg, Germany) 0,8 U σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από τον κατασκευαστή / Διάλυμα SuperHot-Taq Πολυμεράσης (Bioron GmbH, Romerberg, Germany) 5 U σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από τον κατασκευαστή (50 μl dH ₂ O + 2,2 μl Polymerase)	6 μl
DNA	2 μl

Σε καμία αντίδραση δεν απαιτήθηκε η χρήση DMSO, αλλά για τις PCR του δεύτερου εξονίου χρησιμοποιήθηκε SuperHot πολυμεράση αφού τα προϊόντα με την χρήση της DFS-Taq πολυμεράσης ήταν ιδιαίτερα ανεπαρκής ποσότητας, διατηρώντας τις παραπάνω ποσότητες συστατικών. Επιπλέον, στις αντιδράσεις των εξονίων επτά και οχτώ χρησιμοποιήθηκε ποσότητα DNA 4 μl αντί για 2 μl, λόγω του ότι τα προϊόντα των αντιδράσεων δεν ήταν αρκετής ποσότητας.

Συνθήκες θερμοκρασίας και νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών για κάθε αντίδραση PCR:

Επειδή το γονίδιο είναι αρνητικής πολικότητας προηγήθηκε «μετατροπή» του σε θετικής πολικότητας και παραδοχή αυτής της μετατροπής.

Πίνακας 3: Αλληλουχία εκκινητών, συνθήκες πραγμάτωσης PCR και μήκος τελικού προϊόντος για την ανάλυση κάθε εξονίου του VSIG4

Εξόνιο γονιδίου	Εκκινητές	Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Προϊόν PCR
1 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- CCTGGGCTCACCACAAAGGA -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 59°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	600 base pairs
	Reverse	5'- CAGAGTTTGGCTGAGAAGACTCACCT -3'		
2 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- GAGGTTTGTCACTGTACCTTAGTTGC -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 59°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	540 bp
	Reverse	5'- CCTCTGTATAAACGAAGGCCTCTGGA -3'		
3 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- AAGTCAGAAGCCCCCTTAGTT -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 57°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	499 bp
	Reverse	5'- TTCTTCTTTTGCATAAGGGCACCTT -3'		
4 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- CAGAAGTGTGAGGCAGGTCCA -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 61°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	538 bp
	Reverse	5'- TGTTAGGTGTGGGCAGTGAGAAGA -3'		
5 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- TCTTCTCACTGCCACACCTAACA -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για	413 bp

			30 δευτερόλεπτα, 58°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	
	Reverse	5'- CCCTTGACCATTGCTTGGCA -3'		
6 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- TTTTCTAAGGGAAGGTGAAAACCT -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 61°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	499 bp
	Reverse	5'- CCTAACACAATGCCTGATACAGAA -3'		
7 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- TGATTGACCTTTGTCCACTTGCC -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 59°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	596 bp
	Reverse	5'- CGGGCGTAGTTGCCATTGAT-3'		
8 ^ο Εξόνιο	Forward	5'- ATTGAGGCAGAAAGGTGGGAAAC -3'	94°C για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από 32 κύκλους (94°C για 30 δευτερόλεπτα, 61°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα) και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 λεπτά	510 bp
	Reverse	5'- CCAAATCCAGCAGCTGGCTTACTT -3'		

Τα προϊόντα της PCR από κάθε αντίδραση ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% (w/v) ώστε να ελεγχθεί η στοχευμένη ενίσχυση των περιοχών ενδιαφέροντος και η παρουσία επιμόλυνσης ή και παραπροϊόντων.

3.4.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR που αφορούν την ενίσχυση των εξονίων του γονιδίου *VSIG4*, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα της GRISP, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey- Nagel, Duren, Germany).

Τα βήματα της διαδικασίας ήταν τα εξής:

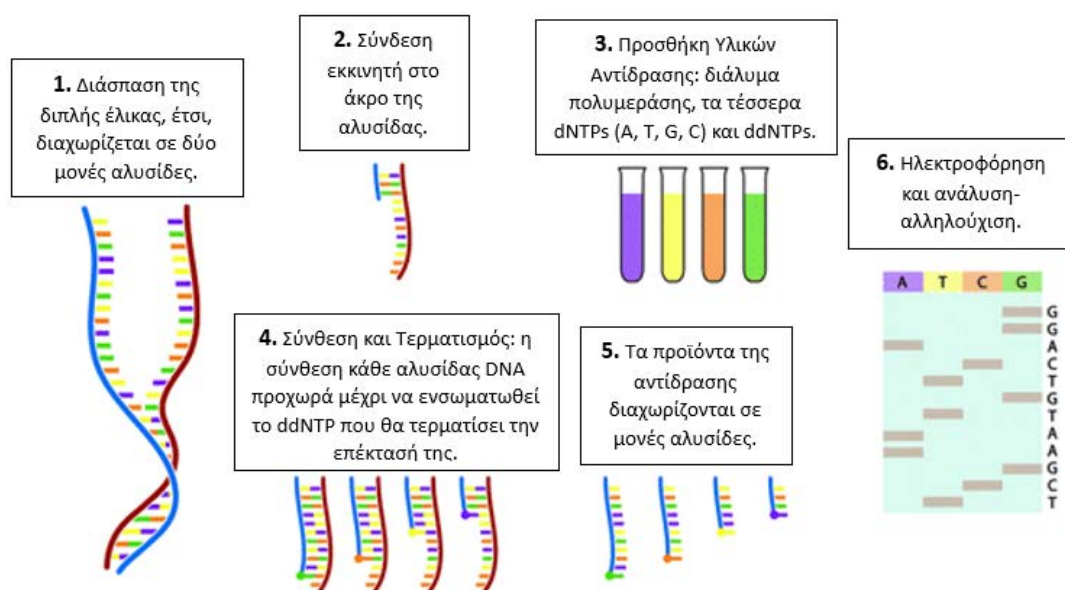
1. Μεταφορά του προϊόντος PCR σε σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml και προσθήκη 5 φορές του όγκου του προϊόντος από το Gel Solubilization Solution, ακολουθούμενη από vortex. Στην προκειμένη περίπτωση, για 25 μl προϊόντος προστέθηκαν 125 μl Gel Solubilization Solution.
2. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη καθαρισμού.
3. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 15.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
4. Απόρριψη του διαλύματος που πέρασε από τη στήλη.
5. Προσθήκη 600 μl Wash Buffer 2 στη στήλη και επώαση του διαλύματος στον πάγκο για 1 λεπτό.
6. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 15.000 g για 3 λεπτά.
7. Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο, προσθήκη 30 μl Elution Buffer και επώαση στον πάγκο για 2 λεπτά.
8. Φυγοκέντρηση της στήλης στα 15.000 g για 2 λεπτά.
9. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 2% για επιβεβαίωση των επιθυμητών αποτελεσμάτων.
10. Αποθήκευση των καθαρισμένων προϊόντων στους -20°C.

3.4.4 Αλληλούχιση κατά Sanger

Στη συνέχεια, τα καθαρά προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger με χρήση γενετικού αναλυτή ABU Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Η αλληλούχιση κατά Sanger χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε τμήματα DNA με ακρίβεια 99,99%. Βασίζεται στη χρήση ειδικών νουκλεοτιδίων τερματισμού (ddNTPs) που σταματούν τη σύνθεση της αλυσίδας DNA. Οι αλυσίδες DNA που προκύπτουν φορτώνονται σε γέλη και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση κατά την οποία οι διαφορετικές αλυσίδες αναγνωρίζονται με βάση το μήκος τους και την ένδειξη των ddNTPs. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την αλληλούχιση ήταν υπό τη μορφή χρωματογραφημάτων [41, 42].

Τα βήματα της αλληλούχισης κατά Sanger είναι τα παρακάτω:



Εικόνα 13: Τα βήματα της αλληλούχισης κατά Sanger

3.5 Περιγραφή Βιοπληροφορικού Εργαλείου

3.5.1 Εύρεση Εκκινητών

Για την εύρεση ζεύγους εκκινητών (primers) για κάθε ένα από τα οχτώ εξόνια του γονιδίου *VSIG4* χρησιμοποιήθηκαν με τη σειρά τα παρακάτω εργαλεία:

A. UCSC Genome Browser

Αναζητώντας το γονίδιο *VSIG4* στο ανθρώπινο γονιδίωμα δίνεται πρόσβαση σε έναν χάρτη του γονιδιώματος που επιτρέπει τον εντοπισμό ενός συγκεκριμένου εξονίου του γονιδίου και επιλογής περιοχής- στόχου, περιοχή που περιλαμβάνει το εξόνιο και περιοχή γύρω από αυτό.

Εισάγοντας την θέση της περιοχής- στόχου στο In- Silico PCR, γίνεται έλεγχος πιθανών ζευγών εκκινητών.

B. Ensembl Genome Browser

Αναζητώντας και πάλι το γονίδιο *VSIG4* στο Ensembl Genome Browser, γίνεται επιβεβαίωση της θέσης του εξονίου καθώς και λαμβάνονται επιπρόσθετες πληροφορίες για το γονίδιο αυτό όπως εναλλακτικά μετάγραφα που μπορούν να επηρεάσουν την επιλογή εκκινητών.

C. Primer- BLAST

Εισάγοντας την αλληλουχία της περιοχής- στόχου και κριτήρια για τη σχεδίαση των εκκινητών όπως το μήκος, το εύρος θερμοκρασίας τήξης (T_m) και το μήκος του προϊόντος της PCR, το Primer- Blast εμφανίζει πιθανά ζεύγη εκκινητών, και το ανάποδο.

D. Oligo Analyzer

Μέσω του Oligo Analyzer μπορούν να αξιολογηθούν οι εκκινητές ως προς την αποτελεσματικότητά τους για τη συγκεκριμένη PCR αντίδραση. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο σχηματισμού δευτερογενών δομών, του πόσο «ειδικοί» είναι και της θερμοκρασίας τήξης του καθενός.

E. Thermo Fisher Scientific

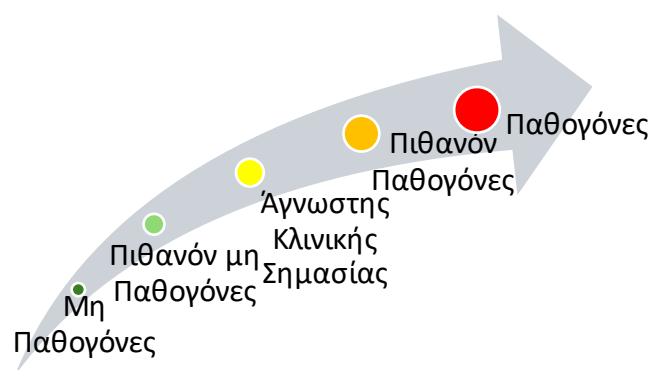
Παραγγελία των ζευγών εκκινητών.

3.5.2 Βάσεις Δεδομένων για ερμηνεία αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έπειτα της αλληλούχισης κατά Sanger των δειγμάτων, τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν διαβάστηκαν μέσω του λογισμικού SnapGeneViewer και πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την παρουσία γενετικών παραλλαγών μεταξύ των τριών ατόμων της ομάδας μελέτης στις εξονικές περιοχές του γονιδίου *VSIG4*.

Ακολούθως, οι γενετικές παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν, αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας πληροφορίες από βάσεις δεδομένων ιατρικής γενετικής (Franklin genoox, ClinVar), βιοπληροφορικά εργαλεία διερεύνησης παθογονικότητας (Mutation Taster) και πληροφορίες πληθυσμιακής γενετικής. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο διερεύνησης παθογονικότητας VEP (Variant Effect Predictor, Ensembl).

Συνολικά, γίνεται χαρακτηρισμός των εντοπισμένων παραλλαγών ως παθογόνες, πιθανόν παθογόνες, καλοήθεις, πιθανόν καλοήθεις ή άγνωστης κλινικής σημασίας και συσχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες ή φαινοτύπους- κλινικές καταστάσεις. Στη μελέτη αυτή, τα short- variants (παραλλαγές, ενθέσεις, διαγραφές μεμονωμένων νουκλεοτιδίων- μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές) που εντοπίστηκαν στο γονίδιο *VSIG4* ανάμεσα στα τρία άτομα της ομάδας μελέτης, χαρακτηρίστηκαν ως μη παθογόνες (Benign) και ως άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS).



Εικόνα 14: Χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων ως προς την παθογένειά τους

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

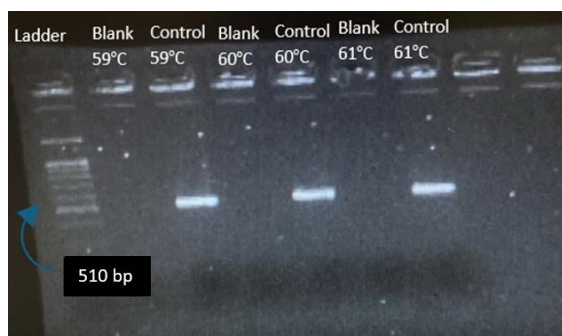
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση δειγμάτων γονιδιωματικού DNA, τα οποία προήλθαν από το περιφερικό αίμα ενός αρσενικού φύλου ασθενή που πάσχει από Διάσπαση Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD) καθώς και από Ουδετεροπενία με μειωμένα επίπεδα του Συμπληρώματος στον ορό του αίματος, της μητέρας του και μιας υγιούς γυναίκας ως αρνητικό control. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο ιδιωτικό Αιματολογικό-Ανοσολογικό ιατρείο του καθηγητή Ανοσολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Ματθαίου Σπελέτα, στη Θεσσαλονίκη.

Βασικά κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς είναι τα εξής:

Άρρεν ασθενής 14 ετών το 2021.
Διαγνωσμένος με Σύνδρομο Ουδετεροπενίας από το 2018.
Πιθανή λήψη φαρμακευτικής αγωγής -κάποιο σιρόπι που πιθανότατα περιέχει Ρισπεριδόνη (αντιψυχωσικό φάρμακο του οποίου η στοματική χορήγηση βοηθάει στην αντιμετώπιση αναπτυξιακών και άλλων διαταραχών διασπαστικής συμπεριφοράς σε ασθενείς με μειωμένη διανοητική λειτουργία και καταστροφικές συμπεριφορές)- [55].
Από τη νηπιακή ηλικία παρουσιάζει Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ADHD), διαταραχή που φαίνεται να απαντάται και σε άλλα αρσενικού φύλου μέλη της οικογένειας, ενδεχομένως και στον αδελφό του, χωρίς να έχει αναφερθεί άλλο κλινικό πρόβλημα.
Συνοδεύεται από Υπογαμμασφαιριναιμία, μη φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρινών στο αίμα που οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, αλλά και σε εμφάνιση αυτοάνοσων διαταραχών [37].
Έχει πραγματοποιήσει εργαστηριακές εξετάσεις για περαιτέρω διερεύνηση στις οποίες βρέθηκαν και μειωμένα επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό του αίματος.

Συγκεκριμένα, έγινε στοχευμένη μελέτη των εξονικών περιοχών του γονιδίου *VSIG4* χρησιμοποιώντας Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) ακολουθούμενη από αλληλούχιση κατά Sanger.

Μέσω βιοπληροφορικών εργαλείων και της χρήσης δείγματος- control εντοπίστηκαν οι κατάλληλες συνθήκες υβριδοποίησης του κάθε ζεύγους εκκινητών του καθενός από τα οχτώ εξόνια για την αντίστοιχη αντίδραση PCR.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για διερεύνηση κατάλληλων συνθηκών PCR του όγδοου εξονίου, το μόνο στο οποίο ανιχνεύθηκε ίδια παραλλαγή στον ασθενή και στη μητέρα του και όχι στο αρνητικό control

Ακολούθησαν οι αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τα τρία δείγματα της μελέτης.



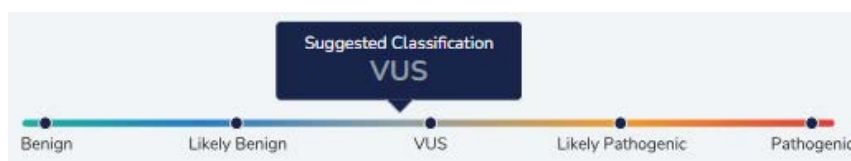
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR των τριών δειγμάτων υπό μελέτη ως προς το όγδοου εξόνιο στους 61°C

Τα αποτελέσματα αλληλούχισης κατά Sanger οπτικοποιούνται με την μορφή χρωματογραφημάτων. Επομένως, για κάθε εξόνιο λήφθηκαν τρία χρωματογραφήματα, ένα του ασθενούς, ένα της μητέρας του και ένα του αρνητικού control. Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα τρία χρωματογραφήματα αλλά και με την αλληλουχία του canonical μεταγράφου από την Ensembl Genome Browser γίνεται εντοπισμός και κατανομή γενετικών παραλλαγών.



Εικόνα 17: Μέρος χρωματογραφημάτων (Α) ασθενούς, (Β) της μητέρας του και (C) του αρνητικού control για το όγδοο εξόνιο

Παρά την ανίχνευση short- variants, οι βάσεις δεδομένων ερμηνείας γενετικών παραλλαγών τις χαρακτήρισαν ως μη παθογόνες και ως άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS). Άρα, τα δεδομένα αυτά οδηγούν στον αποκλεισμό ύπαρξης short- variant που να συμβάλλει στην εμφάνιση Ουδετεροπενίας με μειωμένα επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό του αίματος και Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας.



Εικόνα 18: Ανίχνευση παραλλαγών μέσω του Indigo citing GEAR-Genomics και ερμηνεία τους από την Franklin gensoox

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση του γονιδίου *VSIG4* σε δείγματα περιφερικού αίματος από έναν αρσενικού φύλου ασθενή διαγνωσμένο με Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητα (ADHD) και Ουδετεροπενία συνοδευόμενη από χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό, από την μητέρα του και από ένα αρνητικό control.

Πραγματοποιώντας γενετική ανάλυση και στην υγιή μητέρα του ασθενή, γίνεται διερεύνηση X- φυλοσύνδετης κληρονομικότητας των διαταραχών αυτών αφού, κιόλας, παρατηρείται ότι πάσχουν και άλλα μέλη της οικογένειάς του από ADHD. Τα μέλη της οικογένειας που εμφανίζουν ADHD είναι αποκλειστικά αρσενικού φύλου οδηγώντας στο πόρισμα πως τα αρσενικά άτομα είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση αυτού του φαινοτύπου. Ταυτόχρονα, παρατηρώντας πως όλα τα θηλυκά άτομα της οικογένειας είναι υγιή και ότι από υγιείς γονείς προκύπτουν υγιείς θηλυκοί απόγονοι και αρσενικοί υγιείς και πάσχοντες απόγονοι, αυξάνεται η υπόθεση της X-φυλοσύνδετης κληρονομικότητας της ADHD, η οποία συνοδεύεται από εμφάνιση Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό.

Με βάση την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας στους άνδρες και τη διαγνωσμένη Ουδετεροπενία με ανεπάρκεια του Συμπληρώματος του υπό μελέτη άρρεν ασθενή, επιλέχθηκε το γονίδιο *VSIG4* για έλεγχο εντοπισμού παραλλαγών που ενδεχομένως να σχετίζονται με αυτές τις διαταραχές. Το γονίδιο αυτό αποτέλεσε υποψήφιο γονίδιο ενδιαφέροντος διότι βρίσκεται στη περικεντρομερή περιοχή του X- χρωμοσώματος και κωδικοποιεί τον υποδοχέα CR1g, έναν βασικό ρυθμιστή της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της σύνδεσής του με θραύσματα του συστατικού C3 του Συμπληρώματος. Ο υποδοχέας αυτός διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο μέσω πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών στην αναστολή της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων, στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και στην ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης. Οι μεταλλάξεις στο *VSIG4* μπορεί να επηρεάσουν αυτές τις σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες οδηγώντας σε παθογένεση και διαταραχές.

Η εργασία αυτή αποσκοπούσε στον εντοπισμό πιθανών μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό και στη σύνδεσή του με την εμφάνιση Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας και Ουδετεροπενίας με ανεπάρκεια στο Συμπλήρωμα. Ωστόσο, η ανάλυση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) και η αλληλούχιση κατά Sanger των οχτώ εξονίων του *VSIG4* δεν αποκάλυψε καμία παθογόνο μονονουκλεοτιδική μετάλλαξη στον ασθενή ή στη μητέρα του, απορρίπτοντας την αρχική υπόθεση περί ύπαρξης παθογόνου short- variant που κληρονομήθηκε από τη μητέρα στον γιο.

Αν και δεν ανιχνεύθηκαν παθογόνα short- variants, δεν μπορεί ακόμη να αποκλειστεί πλήρως η συμμετοχή του γονιδίου *VSIG4* στην εμφάνιση αυτών των διαταραχών, καθώς δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανίχνευσης μεγαλύτερων γενετικών μεταλλάξεων -μεγάλες ελλείψεις ή αναδιατάξεις-, για παράδειγμα, με τη χρήση της

μεθόδου long- range PCR. Παράλληλα, η διεκπεραίωση μιας quantitative PCR (qPCR) θα μπορούσε να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης του *VSIG4* από τα μακροφάγα. Επίσης, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί RNA Sequencing (RNA- seq) ή και Whole Exome Sequencing ώστε να ανιχνευτούν παραλλαγές και σε άλλα ενδεχομένως σχετιζόμενα με αυτές τις διαταραχές γονίδια.

Συμπερασματικά, με την απουσία παθογόνων παραλλαγών (short- variants) στο γονίδιο *VSIG4* μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα συσχέτισής του με την εμφάνιση Ουδετεροπενίας με χαμηλά επίπεδα Συμπληρώματος στον ορό και με την ανάπτυξη Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας. Αλλά δεν πραγματοποιήθηκε πιο διεξοδικός έλεγχος για μεγαλύτερες γενετικές μεταλλάξεις, που θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του γονιδίου και της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Συνεπώς, παραμένει ανοιχτή η υπόθεση συσχέτισης του γονιδίου *VSIG4* με αυτές τις διαταραχές μέσω άλλων μορφών γενετικής ανωμαλίας που δεν ανιχνεύθηκαν με τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους.

6 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuby Ανοσολογία 3η έκδοση, Εκδότες: BROKEN HILL PUBLISHERS LTD
2. Medical Microbiology από τους Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller (pages 62-75).
3. Harrison's Principles of Internal Medicine (pages 1323- 1332, 1477- 1494, 1812- 1832, 3144- 3147, 3606-3631).
4. *A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation*, Patrick S Tarpey, Raffaella Smith, Erin Pleasance... (2009)
5. *Neuro-Inflammatory Mechanisms in Developmental Disorders Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder: A Neuro- Immune Perspective*, Barbara Di Marco, Simona D'Antoni, Elisabetta Aloisi, Carmela Maria Bonaccorso et al. (2016)
6. *Focal Brain Inflammation and Autism*, T. Theoharides, Shahrzad Asadi, Arti B Patel) (2013)
7. *Identification of Key Biomarkers and Pathways for maintaining Cognitively Normal Brain Aging Based on Integrated Bioinformatics Analysis*, Jinling Xu, Hui Zhou, Guangda Xiang (2022)
8. *Reduced β -Amyloid Production and Increased Inflammatory Responses in Presenilin Conditional Knock-out Mice*, Vassilios Beglopoulos, Xiaoyan Sun, Carlos A Saura, Cynthia A. Lemere, Richard D. Kim, Jie Shen (2004)
9. *Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions*, Ricklin, D., & Lambris, J. D. Journal of Immunology (2013)
10. *VSIG4 Attenuates NLRP3 and Ameliorates Neuroinflammation via JAK2-STAT3-A20 Pathway after Intracerebral Hemorrhage in Mice*, Na Ji, Lirong Wu, Hui Shi, Qianlu Li, Anyong Yu, Zhao Yang (2022)
11. *VSIG4 mediates transcriptional inhibition of Nlrp3 and Il-1 β in macrophages*, Xiaoyong Huang, Zeqing Feng, Yuanzhong Jiang, Jialin Li, Qun Xiang, Sheng Guo, Chengying Yang, Lei Fei, Guoning Guo, Lixin Zheng, Yuzhang Wu, Yongwen Chen (2019)
12. *Therapeutic modulation of V Set and Ig domain-containing 4 (VSIG4) signaling in immune and inflammatory diseases*, You Li, Qi Wang, Jiaxin Li, Qiangian Wang, Qinggao Zhang, Yingging Chen (2023)
13. *Microglial V-set and immunoglobulin domain-containing 4 protects against ischemic stroke in mice by suppressing TLR4-regulated inflammatory response*, Qingping Lyu, Xiaojun Pang, Zibin Zhang, Yuyu Wei, Jinxu Hong, Huai Chen (2019)
14. *Neutropenia*, Angel A. Justiz Vaillant; Preeti Rout; Samuel B. Reynolds; Patrick M. Zito (2024)
15. *Neutropenia (Agranulocytosis; Granulocytopenia)* by David C. Dale, MD, University of Washington (2023)

16. *Understanding neutropenia secondary to intrinsic or iatrogenic immune dysregulation*, Kelly Walkovich, James A. Connelly (2021)
17. *The European Guidelines on Diagnosis and Management of Neutropenia in Adults and Children: A Consensus Between the European Hematology Association and the EuNet-INNOCHRON COST Action*, Francesca Fioredda, Julia Skokowa, Hannah Tamary, Michail Spanoudakis, Piero Farruggia, Antonio Almeida, Daniela Guardo, Petter Höglund, Peter E. Newburger, Jan Palmblad, Ivo P. Touw, Cornelia Zeidler, Alan J. Warren, David C. Dale, Karl Welte, Carlo Dufour and Helen A. Papadaki (2023)
18. *The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair*, Timothy A Butterfield, Thomas M Best, and Mark A Merrick (2006)
19. *The role of neutrophils in host defense and disease*, Heather K. Lehman, Brahm H. Segal (2020)
20. *The Effect of Complement Depletion on Bacterial Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Hemodynamic and Hematologic Changes in the Rhesus Monkey*, R J Ulevitch, C G Cochrane, K Bangs, C M Herman, J R Fletcher, C L Rice (1978)
21. *Complement Receptors and Their Role in Leukocyte Recruitment and Phagocytosis*, Sofie Vandendriessche, Seppe Cambier, Paul Proost, and Pedro E. Marques (2021)
22. *Complement. First of two parts*, M J Walport (2001)
23. *Membrane complement regulatory protein CD59 in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*, Das Nibhriti, Biswas Bintili, Anand Devyani (2021)
24. *Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions*, Ricklin, D., & Lambris, J. D. Journal of Immunology (2013)
25. *Therapeutic Targeting of the Complement System: From Rare Diseases to Pandemics*, Peter Garred, Andrea J. Tenner, and Tom E. Mollnes (2021)
26. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*
27. *The complement system in systemic autoimmune disease*, Min Chen, Mohamed R Daha, Cees G M Kallenberg (2009)
28. *The biology of VSIG4: Implications for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases and cancer*, Bei Liu, Li Cheng, Honghao Gao, Jiale Zhang, Yanxin Dong, Wenda Gao, Shunzong Yuan, Taiqian Gong, Wenrong Huang (2023)
29. *Cloning of Z39Ig, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromosome X*, K Langnaese, L Colleaux, D U Kloos, M Fontes, P Wieacker (2000)
30. *VSIG4 inhibits proinflammatory macrophage activation by reprogramming mitochondrial pyruvate metabolism*, Jialin Li, Bo Diao, Sheng Guo, Xiaoyong Huang, Chengying Yang, Zeqing Feng, Weiming Yan, Qin Ning, Lixin Zheng, Yongwen Chen, Yuzhang Wu (2017)

31. *VSIG4, a B7 family–related protein, is a negative regulator of T cell activation*, Lorenz Vogt, Nicole Schmitz, Michael O. Kurrer, Monika Bauer, Heather I. Hinton, Silvia Behnke, Dominique Gatto, Peter Sebbel, Roger R. Beerli, Ivo Sonderegger, Manfred Kopf, Philippe Saudan and Martin F. Bachmann (2006)
32. *VSIG4 interaction with heparan sulfates inhibits VSIG4-complement binding*, Sarah Y Ebstein, Ashique Rafique, Yi Zhou, Amanda Krasco, Welby Montalvo-Ortiz, Lola Yu, Luisaidy Custodio, Rene C Adam, Nicolin Bloch, Ken Lee, Funmilola Adewale, Dominic Vergata, Antonio Luz, Sebastien Coquery, Benjamin Daniel, Erica Ullman, Matthew C Franklin, Aynur Hermann, Tammy Huang, William Olson, Samuel Davis, Andrew J Murphy, Matthew A Sleeman, Joyce Wei, Dimitris Skokos (2023)
33. *V-Set and immunoglobulin domain containing (VSIG) proteins as emerging immune checkpoint targets for cancer immunotherapy*. Xia Zhou· Sohail Khan· Dabing Huang· Lu Li (2022)
34. *Tetraspan MS4A6D is a coreceptor of MHC class II antigen (MHC-II) that promotes macrophages-derived inflammation*, Yue Chen, Sirui Li, Xiaoyong Huang, Chenhui Wang, Yue Pan, Qun Xiang, Zeqing Feng, Lei Fei, Yuzhang Wu, Zhihua Ruan, Yunfei An, Yongwen Chen (2023)
35. *Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease*, Kathryn Prame Kumar, Alyce J. Nicholls, Connie H. Y. Wong (2018)
36. *A role of macrophage complement receptor CRIg in immune clearance and inflammation*, He J Q, et al. Molecular immunology (2008).
37. *Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease*, A H Lee, A I Levinson, H R Schumacher Jr (1993)
38. *WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy*, World Health Organization (WHO) (2010).
39. *Blood sampling guidelines with focus on patient safety and identification - a review*, Michael Cornes, Mercedes Ibarz, Helene Ivanov, Kjell Grankvist (2019)
40. *Blood Collection Tubes - LabCE.com, Laboratory Continuing Education*
41. *SangerSequencing: Introduction, Principle, and Protocol*, www.cd-genomics.com › blog › sanger-sequencing (2020)
42. Gauthier, Michel G. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach. Diss. University of Ottawa (Canada) (2008)
43. *Extracellular stimulation of VSIG4/complement receptor Ig suppresses intracellular bacterial infection by inducing autophagy*, Kwang H. Kim, Beom K. Choi, Young H. Kim, Chungyong Han, Ho S. Oh, Don G. Lee, and Byoung S. Kwon (2016)
44. *Sex differences in attention Deficit Hyperactivity Disorder: candidate genetic and endocrine mechanisms*, William Davies (2014)
45. *Genetics of attention deficit hyperactivity disorder*, Stephen V Faraone, Henrik Larsson (2019)
46. *Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder*, Ditte Demontis et al. (2019)

47. *Genome-wide analyses of ADHD identify 27 risk loci, refine the genetic architecture and implicate several cognitive domains*, Ditte Demontis (2023)
48. *Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder*, Nanda N J Rommelse, Barbara Franke, Hilde M Geurts, Catharina A Hartman, Jan K Buitelaar (2010)
49. *Genetic variations influence brain changes in patients with attention-deficit hyperactivity disorder*, Santosh K. Yadav, Ajaz A. Bhat, Sheema Hashem, Sabah Nisar, Madeeha Kamal, Najeeb Syed, Mohamed-Ramzi Temanni, Rakesh K. Gupta, Saddat Kamran, Muhammad Waqar Azeem, Amit K. Srivastava, Puneet Bagga, Sanjeev Chawla, Ravinder Reddy, Michael P. Frenneaux, Khalid Fakhro, Mohammad Haris (2021)
50. *The Familial Co-Aggregation of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Intellectual Disability: A Register-Based Family Study*, Stephen V Faraone, Laura Ghirardi, Ralf Kuja-Halkola, Paul Lichtenstein, Henrik Larsson (2016)
51. *Diagnosis of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Intellectual Disability: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder V versus clinical impression*, B Perera, K Courtenay, S Solomou, A Borakati, A Strydom (2020)
52. *Attention-deficit/hyperactivity disorder among children with and without intellectual disability: an examination across time*, C L Neece, B L Baker, J Blacher, K A Crnic (2011)
53. *Intellectual disability in children with attention deficit hyperactivity disorder*, Alka Ahuja, Joanna Martin, Kate Langley, Anita Thapar (2013)
54. *Inattention and hyperactivity/impulsivity among children with attention-deficit/hyperactivity-disorder, autism spectrum disorder, and intellectual disability*, Maryellen Brunson McClain, Amber M Hasty Mills, Laura E Murphy (2017)
55. *Risperidone*, Shawn E. McNeil; Jonathan R. Gibbons; Mark Cogburn (2023)
56. UCSC Genome Browser
57. Ensembl Genome Browser
58. Primer- Blast by NCBI
59. Oligo Analyzer
60. Thermo Fisher Scientific
61. Franklin genoox
62. Indigo citing GEAR-Genomics
63. ClinVar
64. Mutation Taster
65. Variant Effect Predictor