



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs2043211 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
CARD8 ΣΤΗΝ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ
ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΚΑΙ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

Φανδρίδη Ανδρονίκη του Νεκτάριου

ΛΑΡΙΣΑ, 2025



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

THESIS

**THE ROLE OF THE *CARD8* GENE rs2043211 POLYMORPHISM
IN THE IMPACT OF INFECTIONS IN CHILDREN WITH SOLID
TUMORS AND HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES**

Fandridi Androniki

LARISSA, 2025

Περιεχόμενα

.....	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
Εισαγωγή	8
Αιματολογικές κακοήθειες.....	8
<i>Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία</i>	9
<i>Λέμφωμα Hodgkin</i>	10
<i>Λέμφωμα Non-Hodgkin</i>	10
Συμπαγείς όγκοι.....	11
Λοιμώξεις.....	12
Caspase Activation and Recruitment Domains - CARD	12
<i>Συμπλοκοποίηση του τομέα CARD και ο ρόλος του σε σηματοδοτικά μονοπάτια</i> ...	12
CARD8	13
<i>Γονίδιο</i>	13
<i>Δομικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης πρωτεΐνης</i>	13
<i>Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης CARD8</i>	14
<i>Ο πολυμορφισμός rs2043211 και οι επιπτώσεις στην παραγωγή της πρωτεΐνης</i>	15
<i>Συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs2043211 με ασθένειες</i>	16
ΣΚΟΠΟΣ	17
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
Υπό μελέτη πληθυσμός	18
Υλικά και αντιδραστήρια.....	19
<i>Kit για το DNA Extraction</i>	19
<i>Αντιδραστήρια για την ενίσχυση γενετικού υλικού με PCR</i>	19
<i>Υλικά Ηλεκτροφόρησης DNA</i>	20
<i>Ένζυμα και αντιδραστήρια πέψης</i>	20
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα και αίμα προερχόμενο από τον μυελό των οστών	20
Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CARD8 σε δείγμα γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο της PCR.....	21
Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αгарόζης 2% w/v.....	22
Πέψη προϊόντος PCR	23
Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης σε πηκτή αгарόζης 3% w/v	23

Στατιστική ανάλυση πειραματικών αποτελεσμάτων	24
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
Επίδραση του πολυμορφισμού rs2043211 (c.102T>A) του γονιδίου CARD8 στη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων.....	25
Παρατηρήσεις	34
Υπολογιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων.....	34
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο project και που μοιράστηκαν τις γνώσεις τους μαζί μου. Επίσης, το κλίμα στο εργαστήριο ήταν πολύ όμορφο και μου έδωσε την δυνατότητα να εξελιχθώ δημιουργικά. Ένα επιπλέον ευχαριστώ στην υπεύθυνη καθηγήτρια μου κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς, τον κύριο Σπελέτα Ματθαίο και την κυρία Καλαλά Φανή, για τις διορθώσεις και την καθοδήγηση μέσα σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η βοήθεια του διδακτορικού μου Μπακαρού Βαγγέλη που οργάνωνε συνεχώς με τον καλύτερο δυνατό τρόπο την εξέλιξη και την προσέγγιση του πειράματος. Δεν είναι δυνατό να μην ευχαριστήσω την Νάνσυ και την Μιχαέλα για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή τους σε οποιαδήποτε κατάσταση και δυσκολία. Ήταν μαζί μας από την αρχή και μας υπέδειξαν πολλές από τις βασικές τεχνικές του εργαστηρίου. Πολλά ευχαριστώ στην Εύη και στην Αναστασία, στα κορίτσια που μοιραστήκαμε τους ίδιους προβληματισμούς καθώς και διαφορετικές πτυχές του ίδιου project, εύχομαι καλή σταδιοδρομία στην μετέπειτα επαγγελματική τους πορεία. Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου που βρίσκονταν κοντά μου οποιαδήποτε στιγμή μέσα στο όμορφο αυτό ταξίδι, πάντα έτοιμοι να με βοηθήσουν και να συζητήσουμε οτιδήποτε με απασχολούσε. Τελικά, θα μοιραστούμε παρέα τους καρπούς αυτής της επιτυχίας, έτοιμοι να με στηρίξουν στα επόμενα βήματά μου!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο του παιδικού καρκίνου αποτελεί ανησυχητικό παράγοντα της σύγχρονης κοινωνίας. Σε πολλές περιπτώσεις, εξαιτίας της εμφάνισης καρκίνου, άμεση συνέπεια αποτελεί η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος και η πρόκληση λοιμώξεων σε επόμενο χρόνο. Η διαφορετικότητα δράσης του μεταξύ των ανθρώπων οφείλεται στο ατομικό γενετικό υπόβαθρο. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί γονιδίων ή ακόμα και μεγαλύτερου μήκους ζευγών βάσεων, καθορίζουν το προφίλ του ανοσοποιητικού. Το γονίδιο *CARD8* αποτελεί μέρος του ανοσοποιητικού κι έχει διερευνηθεί στο παρελθόν για τον ρόλο του στη σοβαρότητα των συμπτωμάτων ασθενειών από προσβολή παθογόνου και στη συνεργατική δράση του στη δημιουργία φλεγμονωδών νοσημάτων. Έχουν παρατηρηθεί πολλοί και διαφορετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου με διαφορετικά αποτελέσματα τόσο στην ανοσολογική απόκριση όσο και στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, διεξήχθη κλινική έρευνα με παιδιατρικούς ασθενείς με καρκίνο, που νοσηλεύονται σε νοσοκομειακά ιδρύματα, και ελέγχθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου *CARD8* με την εμφάνιση λοιμώξεων στους συγκεκριμένους ασθενείς.

ABSTRACT

Childhood cancer is a worrying phenomenon in modern society. In many cases, due to the occurrence of cancer, the direct consequence is the weakening of the immune system and the occurrence of infections in the following year. The diversity of its action among people is due to the individual genetic background. Single-nucleotide polymorphisms of genes or even longer base pair lengths determine the immune profile. The *CARD8* gene is part of the immune system and has been investigated in the past for its role in the severity of disease symptoms from pathogen infection and in its cooperative action in the creation of inflammatory diseases. Many different polymorphisms of the gene have been observed with different effects on both the immune response and the functionality of the protein. As part of the thesis, a clinical study was conducted with pediatric cancer patients hospitalized in hospitals, and the association of the rs2043211 polymorphism of the *CARD8* gene with the occurrence of infections in these patients was tested.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Ο παιδικός καρκίνος αναφέρεται, συνήθως, στη διάγνωση του καρκίνου σε ένα άτομο ηλικίας 19 ετών και κάτω. Έχει χαρακτηριστεί ως το δεύτερο πιο συχνό αίτιο θανάτου σε αυτή την ηλικία τόσο στις χώρες υψηλού όσο και χαμηλού εισοδήματος, ενώ ο αυξημένος επιπολασμός των τελευταίων ετών, οφείλεται, κυρίως στις βελτιωμένες διαγνωστικές μεθόδους (1). Τα ποσοστά εμφάνισης μιας μορφής καρκίνου της παιδικής ηλικίας διαφέρουν από εκείνα των ενηλίκων, όπως επίσης διαφέρει και ο τρόπος ανάπτυξής τους. Ωστόσο, ο εντοπισμός πιθανών παραγόντων κινδύνου είναι δύσκολος, καθώς πρόκειται για ένα πολυπαραγοντικό νόσημα. Μεταξύ αυτών, συγκαταλέγονται το γενετικό υπόβαθρο και η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία είτε κατά τη διάρκεια της ζωής του παιδιού είτε κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είτε πριν τη σύλληψη. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου στα παιδιά είναι οι όγκοι του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος, οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα (2), (3).

Αιματολογικές κακοήθειες

Οι αιματολογικές κακοήθειες αφορούν καρκίνους που έχουν ως αφετηρία είτε τον αιμοποιητικό ιστό, όπως για παράδειγμα τον μυελό των οστών, είτε τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Μέρος των καρκίνων αυτών αποτελούν οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα.

Οι λευχαιμίες αναπτύσσονται στον μυελό των οστών και συνδέονται με τον αριθμό και τη λειτουργία των λευκοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και συσσώρευση ανώριμων λευκών αιμοσφαιρίων στον μυελό, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η παραγωγή των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος.

Διακρίνονται σε Οξείες Λευχαιμίες και Χρόνιες Λευχαιμίες. Οι υποκατηγορίες των Οξείων Λευχαιμιών είναι οι Οξείες Λεμφοβλαστικές και Οξείες Μυελογενείς Λευχαιμίες, ενώ οι Χρόνιες Λευχαιμίες διακρίνονται περαιτέρω σε Χρόνιες Λεμφοκυτταρικές και σε Χρόνιες Μυελογενείς Λευχαιμίες (3).

Όσο αναφορά τα λεμφώματα, εντοπίζονται στο λεμφικό σύστημα και προέρχονται από τα λεμφοκύτταρα (B ή T λεμφοκύτταρα). Οι δύο κύριες κατηγορίες λεμφωμάτων είναι τα Hodgkin και τα non-Hodgkin λεμφώματα (4).

Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι ένα νεόπλασμα που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών λεμφοβλαστών στον μυελό των οστών. Συναντάται στο 25%-30% των παιδιατρικών ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με κακοήθεια και η αναλογία μεταξύ αγοριών και κοριτσιών είναι 1,2:1 . Συνοδεύεται από τριπενία (αναιμία, θρομβοπενία, λευκοπενία) και τα κοινά συμπτώματα, όπως πυρετός, απώλεια βάρους (3), (5).

Συσχέτιση ΟΛΛ με γνωστές νόσου και παράγοντες κινδύνου

Έρευνες έχουν συσχετίσει γενετικά σύνδρομα, όπως Down, Bloom και Li-Fraumeni, με αυξημένη προδιάθεση για εμφάνιση ΟΛΛ. Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται, επίσης, ο ιός Epstein-Barr και ο ιός HIV και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (6), (7).

Γενετικές Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΟΛΛ

Η ΟΛΛ στην πλειονότητά της θεωρείται σποραδικός καρκίνος με de novo χρωμοσωμικές αλλαγές. Οι συνηθέστερες γενετικές μεταβολές, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, είναι οι μεταθέσεις t(12;21)(p13;q22 *ETV6-AML1*, t(1;19)(q23;p13) *TCF3-PBX1*, t(9;22)(q34;q11) *BCR-ABL*, t(4;11)(q21;q23) *KMT2A/AFF1* και η αναστροφή του γονιδίου *MLL*. Επίσης εντοπίζονται μεταλλάξεις διπλασιασμού ή διαγραφής του αριθμού των αντιγράφων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων, όπως ο *PAX5* (Paired box protein Pax-5), *IZKF1* (DNA binding protein Ikaros), *EBF1* (Early B-Cell Factor 1), στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog), *TP53* (Tumor protein p53) και της απόπτωσης (8), (9), (10).

Λέμφωμα Hodgkin

Το λέμφωμα Hodgkin αναφέρεται σε κακοήθεια των Β-λεμφοκυττάρων που αναπτύσσεται στους περιφερικούς λεμφαδένες. Τα χαρακτηριστικά καρκινικά κύτταρα του ονομάζονται Hodgkin και Reed Sternberg κύτταρα (HRS) και προέρχονται από ώριμα Β-κύτταρα, στα οποία συνεκφράζονται δείκτες διάφορων τύπων αιμοποιητικών κυττάρων. Τα κύτταρα HRS, λόγω χρωμοσωμικών και γενετικών αλλαγών, διακρίνονται από απορρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης. Παράδειγμα αποτελούν οι μεταλλάξεις των οδών ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα *NF-κB* και *JAK/STAT*. Ωστόσο, ο όγκος δεν αποτελείται αποκλειστικά από πληθυσμό κυττάρων HRS. Εντός αυτού, εντοπίζονται, επίσης, κλώνοι Β και Τ-λευκοκυττάρων (11), (12).

Λέμφωμα Non-Hodgkin

Το λέμφωμα non-Hodgkin είναι μία λεμφοϋπερπλαστική νόσος, η οποία ανάλογα με τον τύπο των εμπλεκόμενων λεμφοκυττάρων διακρίνεται σε λεμφώματα Τ και Β λεμφοκυττάρων. Ο μηχανισμός παθογένεσης δεν είναι ξεκάθαρος, ωστόσο στο non-Hodgkin λέμφωμα Β λεμφοκυττάρων, είναι γνωστό ότι τα καρκινικά Β λεμφοκύτταρα έχουν παρόμοια φυσιολογία με τα φυσιολογικά. Έτσι, συσχετίζεται η ανοσολογική απόκριση με την ανάπτυξη κακοηθών κλώνων. Στον **Πίνακα 1** αναφέρονται μερικοί από τους υπότυπους του λεμφώματος και τις γενετικές μεταβολές που συμβάλλουν στη δημιουργία τους (4), (13).

Πίνακας 1. Υπότυποι *Non-Hodgkin* λεμφώματος

Translocation	Proto-oncogene	Proto-oncogene Function	Lymphoma
t (14;18)	BCL2	Suppresses Apoptosis	Follicular Lymphoma
t (9;14)	PAX5	Transcription Factor	Lymphoplasmacytoid lymphoma
t (11;14)	CCND1 (also called BCL1)	Cell-cycle Regulator	Mantle-cell lymphoma
t (11;18)	BIRC3/MA LT1 (fusion protein)	Suppresses Apoptosis	MALT lymphoma
t (1;14)	BCL10	Regulates Apoptosis	MALT lymphoma
t (8;14)	MYC	Transcription Factor	Burkitt's lymphoma
t (2;5)	NYPM1/AL K (fusion protein)	Tyrosine kinase	Anaplastic large-cell lymphoma (T-cell)

Συμπαγείς όγκοι

Τα κύτταρα ενός ιστού που διαφεύγουν από τα ρυθμιστικά μονοπάτια και μετατρέπονται σε καρκινικά, συνιστούν έναν συμπαγή κακοήγη όγκο. Στην πλειοψηφία τους, δεν φέρουν κύστες ή περιοχές υγρών διαλυμάτων και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την προέλευσή τους σε σαρκώματα, καρκινώματα και λεμφώματα. Το 60% των διαγνώσεων στα παιδιά αφορά συμπαγείς όγκους, με πιο συχνά εμφανιζόμενα τα νεοπλάσματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και το νευροβλάστωμα (14).

Λοιμώξεις

Οι καρκινοπαθείς είναι επιρρεπείς στην εμφάνιση λοιμώξεων, καθώς η ίδια η νόσος και η θεραπεία που λαμβάνουν, εξασθενούν το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία προκαλούν βλάβες στους βλεννογόνους και εν συνεργεία με τις δυνητικές πύλες εισόδου ενός παθογόνου μικροοργανισμού (καθετήρες, βελόνες, αντλίες έγχυσης φαρμάκων), επηρεάζουν αρνητικά την πρώτη γραμμή άμυνας. Επιπλέον, ο χαμηλός αριθμός των υγιών λευκοκυττάρων, εξαιτίας της νόσου και των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, έχει άμεση επίπτωση στη χυμική και την κυτταρική ανοσία. Οι παραπάνω διαταραχές συντελούν στην εμφάνιση λοιμώξεων (βακτηριακές, ιογενείς, μυκητιασικές) και αυτές αφορούν, συνήθως, παθογόνους μικροοργανισμούς που ήδη υπάρχουν στην μικροχλωρίδα του οργανισμού, και λόγω της άτονης ανοσοαπόκρισης, πολλαπλασιάζονται. Ωστόσο, μπορεί να αφορά και ενδονοσοκομειακά νοσήματα εξαιτίας του μεγάλου χρονικού διαστήματος που νοσηλεύονται οι ασθενείς σε νοσοκομειακές μονάδες (15).

Caspase Activation and Recruitment Domains - CARD

Ο τομέας ενεργοποίησης και στρατολόγησης κασπάσης (CARD) βρίσκεται συνήθως σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με φλεγμονώδη και αποπτωτική απόκριση. Πρόκειται για μια οικογένεια πρωτεϊνών της έμφυτης ανοσοαπόκρισης, με υψηλό βαθμό συντηρημένης δομής, οι οποίες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες ικρίωματος συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα *NF-Kb* και της απόπτωσης και στη ρύθμιση της έκφρασης κυτοκινών. Συνήθως, εντοπίζονται στις πρόδρομες αμινοτελικές περιοχές κασπασών, οι οποίες είτε ενεργοποιούν είτε καταστέλλουν την ενεργοποίηση πρόδρομων μορφών κασπασών (16).

Συμπλοκοποίηση του τομέα CARD και ο ρόλος του σε σηματοδοτικά μονοπάτια

Η ένωση του τομέα CARD με άλλες πρωτεΐνες αποπτωτικού χαρακτήρα επιτρέπει τον ομοδιμερισμό CARD-CARD μεταξύ πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα σύμπλοκα αυτά, συνήθως, είναι τα φλεγμονοσώματα, τα οποία συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως απόκριση στη λοίμωξη και την κυτταρική βλάβη. Ανιχνεύουν μοριακά πρότυπα που

σχετίζονται με παθογόνο (PAMPs) ή με κυτταρική βλάβη (DAMPs) και ενεργοποιούν πρωτεΐνες που προκαλούν πυρόπτωση και σταματούν την έκκριση φλεγμονόδων κυτοκινών. Στόχος του μονοπατιού είναι η στρατολόγηση της κασπάσης-1 (16).

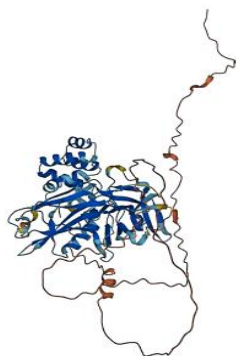
CARD8

Γονίδιο

Ο γενετικός τόπος του γονιδίου εντοπίζεται στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 19. Αποτελείται από 5610 bp και 22 εξώνια (17). Έπειτα, από μελέτες απομόνωσης του ολικού mRNA κυττάρων διαφορετικών ιστών επιβεβαιώθηκε ότι το *CARD8* εκφράζεται κυρίως στα μονοκύτταρα, τον πλακούντα, τους λεμφαδένες, τον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών ειδών παρατηρείται έκφραση διαφορετικών ισομορφών του ίδιου γονιδίου (18). Ως πρωταρχικός στόχος του *CARD8* καταδεικνύεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού της πυρόπτωσης στα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα (19), (20).

Δομικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης πρωτεΐνης CARD8

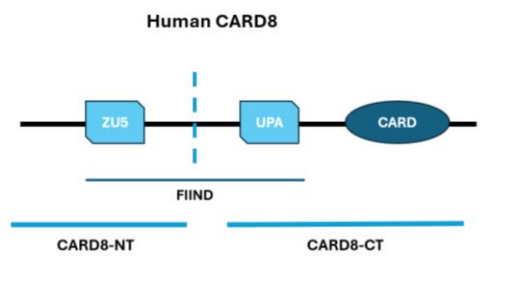
Στην **Εικόνα 1** φαίνεται η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης CARD8. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ανέρχεται στα 48 kDa και αποτελείται από 537 αμινοξέα.



Εικόνα 1: Απεικόνιση στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης **CARD8**

Πηγή: Protein Data Bank (PDB)

Απαρτίζεται από μια περιοχή function-to-find (FIIND) στο κεντρικό της σημείο, από ένα αμινοτελικό άκρο, το οποίο διαφέρει ανάλογα τις διαφορετικές περιπτώσεις ισομορφών και το καρβοξυτελικό άκρο με την περιοχή ενεργοποίησης της κασπάσης (CARD) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δομικές υπομονάδες της πρωτεΐνης CARD8

Η υπομονάδα FIIND αυτοκαταλύει την διάσπαση των δύο υποπεριοχών της ZU5 και UPA. Η ενεργοποίηση της λειτουργικής μορφής της πρωτεΐνης CARD8 πραγματοποιείται ύστερα από την απομάκρυνση του καρβοξυτελικού άκρου από το ανασταλτικό αμινοτελικό (21).

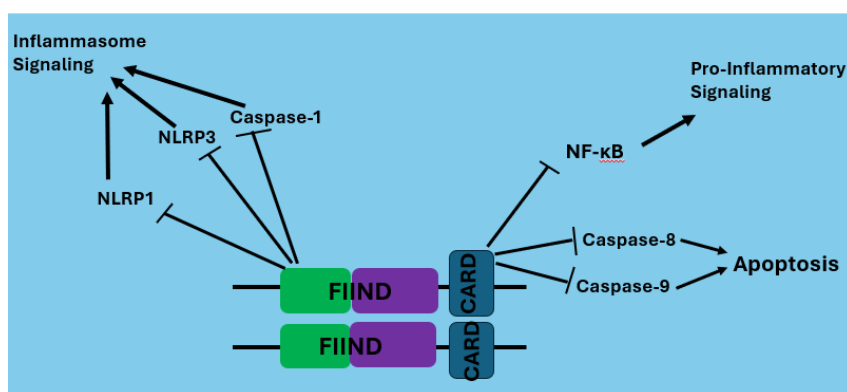
Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης CARD8

Η πυροδότηση της ανοσολογικής απόκρισης από πρωτεΐνες τελεστές αποτελεί έναν ακόμα τρόπο ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, κατά την οποία κυτταρικές πρωτεΐνες-αισθητήρες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση παθογενούς δραστηριότητας (21). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη CARD8, λόγω της περιοχής FIIND που φέρει, μπορεί να ανιχνεύσει τη δράση ιικών πρωτεασών. Η πρωτεάση τύπου 3C του κορωνοϊού (3CL^{Pro}) και η πρωτεάση του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1^{Pro}) υδρολύουν το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης CARD8 και απελευθερώνεται το φλεγμονοδραστικό καρβοξυτελικό άκρο (22).

Συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1 είτε αποτρέποντας τον ολιγομερισμό της είτε τη σύνδεσή της με τον παράγοντα RICK και το σύμπλοκο Iraf/CARD12. Ως επακόλουθο αποτέλεσμα παρατηρείται η μετατροπή της προ-IL-1β και της προ-IL-18

σε ενεργά εκκρινόμενες μορφές και οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες εκκινούν τη διαδικασία της φλεγμονής (21).

Παρόλα αυτά, το υπό συζήτηση γονίδιο, φαίνεται να έχει και αντιφλεγμονώδη δράση με πολλαπλούς ρόλους (**Εικόνα 3**). Η ικανότητα του CARD8 να προκαλεί την επεξεργασία και την απελευθέρωση κυτοκινών μπορεί να εξαρτάται τόσο από το αντιγόνο όσο και από τον κυτταρικό τύπο (23). Για αυτό και μέχρι σήμερα, ο μοριακός μηχανισμός για την επιλογή φλεγμονώδους ή αντιφλεγμονώδους δράσης της πρωτεΐνης δεν έχει αποσαφηνιστεί (18).



Εικόνα 3: Επίδραση του CARD8 στο αντιαποπτωτικό και αντιφλεγμονώδες μονοπάτι

Ο πολυμορφισμός rs2043211 και οι επιπτώσεις στην παραγωγή της πρωτεΐνης

Ο πολυμορφισμός rs2043211 χαρακτηρίζεται ως μη συνώνυμη μονονουκλεοτιδική μεταλλαγή και αφορά την μετατροπή της αδενίνης σε θυμίνη στο 5^ο εξώνιο του πρότυπου κλώνου του γονιδίου *CARD8*. Η μετατροπή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του κωδικονίου και μεταγενέστερα, του αμινοξέος που προστίθεται στο νεοσυντιθέμενο πεπτίδιο. Πιο συγκεκριμένα, στη θέση 102 το αμινοξύ φαινυλαλανίνη αντικαθίσταται από το αμινοξύ ισολευκίνη (p.Phe102Ile), με πιθανό αντίκτυπο στη διαφοροποίηση της στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης ή, ακόμα, και στην έκφραση της (23).

Σε αναλύσεις σταθερότητας της πρωτεΐνης φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός rs2043211 **μειώνει την σταθερότητα** της παραγόμενης πρωτεΐνης. Πειράματα σε κύτταρα

έδειξαν σημαντικώς μειωμένα επίπεδα έκφρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης έναντι της πρωτεΐνης αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο πολυμορφισμός ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή της (24).

Συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs2043211 με ασθένειες

Το γονίδιο *CARD8* με τον πολυμορφισμό rs204321 (p.Phe102Ile) έχει χαρακτηριστεί ως γονίδιο ευαισθησίας για ένα μεγάλο ποσοστό φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων. Ειδικότερα, φαίνεται να επηρεάζει την πορεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (25) και της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (26) με την συμβολή του στην ενεργοποίηση και διαδικασία της φλεγμονής (27). Επίσης, φαίνεται να έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα έκφρασης των αυτοαντισωμάτων κατά της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, τα οποία επάγουν τον εκφυλισμό των β-κυττάρων του παγκρέατος, που παράγουν την ινσουλίνη (17).

Στο παρελθόν, είχε διερευνηθεί για τη συσχέτισή του με τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων επί της νόσου COVID-19 (28). Από τα αποτελέσματα της έρευνας βρέθηκε να έχει προστατευτική δράση έναντι της νόσου, γεγονός που στηρίζεται στην αρνητική ρύθμιση της ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας αφού αναστέλλει τη δράση της κασπάσης-1 και του σηματοδοτικού μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα NF-kB (20).

ΣΚΟΠΟΣ

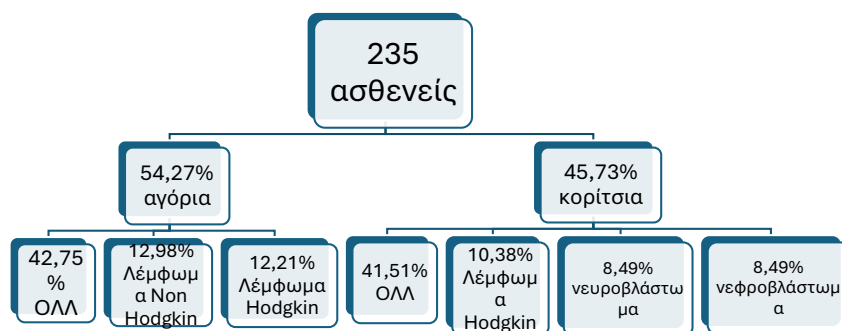
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η γενετική ανάλυση παιδιατρικών ασθενών με διαγνωσμένους καρκίνους του αίματος ή συμπαγείς όγκους για τον προαναφερθέν πολυμορφισμό rs204321 και η συσχέτισή του με τη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων. Η πειραματική μέθοδος που ακολουθήθηκε αποτελούνταν από την απομόνωση γενωμικού DNA, στη συνέχεια ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος (PCR), ταυτοποίηση των γονοτύπων μέσω πέψης και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων από την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση της δοκιμασίας χ^2 (Chi-Square), καθώς πρόκειται για δύο κατηγορικές μεταβλητές.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υπό μελέτη πληθυσμός

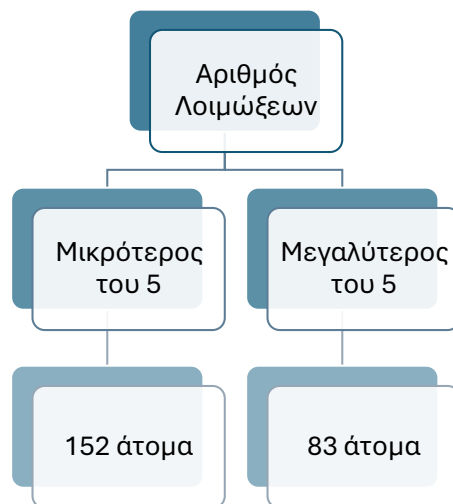
Στην παρούσα μελέτη έγινε επεξεργασία 235 δειγμάτων από το Γενικό Νοσοκομείο Παίδων Αθηνών «Η Αγία Σοφία». Τα άτομα που μελετήθηκαν ήταν παιδιά που έχουν διαγνωσθεί με συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες και έχουν νοσήσει από παθολόγους παράγοντες. Το ηλικιακό εύρος τους κυμαινόταν από 0-17 ετών και η διάμεση ηλικία ανερχόταν στα 5,5 έτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι καθένα από τα παιδιά που συμμετείχαν στη μελέτη, οι γονείς τους παρέδωσαν υπογεγραμμένο έντυπο συναίνεσης.

Έγινε ομαδοποίηση των ασθενών με βάση το φύλο και τον τύπο της παθολογίας που φέρουν όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



Εικόνα 4: Διαγραμματική απεικόνιση κατηγοριοποίησης των ατόμων με βάση το φύλο και τον τύπο καρκίνου

Επίσης, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν και με βάση τη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων. Ο ένας πληθυσμός αφορά τα παιδιά που εμφάνισαν αριθμό λοιμώξεων κάτω του 5, κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους, και ο άλλος πληθυσμός τα παιδιά που εμφάνισαν αριθμό άνω του 5, όπως οπτικοποιείται στην **Εικόνα 5**.



Εικόνα 5: Διαγραμματική απεικόνιση κατηγοριοποίησης με βάση τη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων

Υλικά και αντιδραστήρια

Kit για το DNA Extraction

- EXTRACTME GENOMIC DNA M13 KIT, το οποίο περιέχει τα ακόλουθα αντιδραστήρια: GL Buffer (Lysis buffer), GB Buffer (Binding

Buffer), DNA Purification Column, collection tube, GW1 Buffer (Wash buffer 1),

GW2 Buffer (Wash buffer 2), Elution Buffer, RNάση A, πρωτεϊνάση K

Αντιδραστήρια για την ενίσχυση γενετικού υλικού με PCR

- Πολυμεράση DFS-Taq (BIORON GmbH, Römerberg, Germany)
- Ενέσιμο ύδωρ (Water for injection 1000 mL, ΒΙΟΣΕΡ)
- Ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλα παρασκευασμένο για την συγκεκριμένη πολυμεράση, απουσία MgCl₂ (BIORON GmbH, Römerberg, Germany)
- Διαλύματα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dCTP, και dGTP, 100mM έκαστο (GeneON Bioscience)
- Διάλυμα ιόντων MgCl₂ , 100mM (BIORON GmbH, Römerberg, Germany)
- Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (Biolegio)

Υλικά Ηλεκτροφόρησης DNA

- Πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x [Σύστασης (1X): 89mM Tris-Borate, 2mM EDTA, pH 8,3 ± 0.1] (GRISP)
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 1%, συγκέντρωσης 10mg/ml (AppliChem)
- Μάρτυρας μεγέθους DNA (GENEON)
- Διάλυμα χρώσης DNA

Ένζυμα και αντιδραστήρια πέψης

- RCUtSmart Buffer (New England Biolabs)
- Ενδονουκlease περιορισμού MboI (New England Biolabs)

Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα και αίμα προερχόμενο από τον μυελό των οστών

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα έγινε με τη χρήση του EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT της εταιρίας Blirt. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν η μεταφορά 200 µl αίματος (είτε ολικού περιφερικού είτε από τον μυελό των οστών) σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου Eppendorf® 1,5 ml και προσθήκη σε αυτόν 1 ml διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων RBC Lysis Buffer με επακόλουθη ήπια ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας 5 min, το διάλυμα έπρεπε να είναι διαυγές, κάτι που υποδεικνύει την πλήρη λύση των ερυθροκυττάρων. Σε περιπτώσεις όπου αυτή η προϋπόθεση δεν πληρούνταν, ο χρόνος επώασης επιμηκύνθηκε για μερικά λεπτά ακόμα. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 8600 x g για 4 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε 374 µl GL Buffer. Ύστερα, προστέθηκαν στο μίγμα 4 µl RNAάσης A και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 37° C για 10 min. Μετά την προσθήκη 10 µl Πρωτεϊνάσης K, ακολούθησε επώαση του μίγματος στους 55° C για 30 min. Στη συνέχεια, το μίγμα αφαιρέθηκε από το υδατόλουτρο κι έγινε προσθήκη σε αυτό 400 µl διαλύματος GB, ακολουθούμενη από ανάδευση. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντρωση με ταχύτητα 13000 x g για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη. Η στήλη μαζί με το περιεχόμενό της φυγοκεντρήθηκαν με ταχύτητα 13000 x g για 1 min. Έγινε αλλαγή του σωλήνα συλλογής του υγρού και

ακολούθησαν δύο πλύσεις με 600 µl Wash Buffer 1 και 500 µl Wash Buffer 2 αντίστοιχα. Μετά από κάθε βήμα πλύσης, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση με ταχύτητα 13000 x g για 30 sec και απορρίφθηκε το διήθημα. Προκειμένου να απομακρυνθεί ολοκληρωτικά το υγρό από τη στήλη, πραγματοποιήθηκε μία φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 16000 x g για 2 min. Η στήλη μεταφέρθηκε σε σωλήνα Eppendorf®, όπου και προστέθηκαν 100 µl Elution Buffer για να γίνει η έκλυση του DNA. Η στήλη αφέθηκε σε ηρεμία για 5 min και ακολούθησε μια τελευταία φυγοκέντρηση σε ταχύτητα 13000 x g για 1 min. Το τελικό προϊόν περιείχε γονιδιωματικό DNA και αποθηκεύτηκε στους -20° C.

Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου CARD8 σε δείγμα γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο της PCR

Για να μελετηθεί το γονίδιο CARD8 ως προς την παρουσία του πολυμορφισμό rs2043211 (T>A) έπρεπε πρώτα να ενισχυθεί. Επομένως, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), πραγματοποιήθηκε ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου, μεγέθους 475 bp, για την οποία χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές με την παρακάτω αλληλουχία:

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
Πρόσθιος	5'- AAGAGCAGCATATAGTGGGAAA-3'
Ανάστροφος	5'-TGAGTTCGATGAAAAACACCC- 3'

Ο πρόσθιος εκκινητής υβριδίζει εντός του 5ου ιντρονίου, ενώ ο ανάστροφος εντός του 6ου.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ανερχόταν στα 30 µl, εκ των οποίων, τα 22 µl ήταν το μίγμα της αντίδρασης, τα 6 µl η πολυμεράση DFS-Taq Polymerase και τα 2 µl το γονιδιωματικό DNA. Στο διάλυμα του μίγματος της αντίδρασης περιέχονταν 242,5 µl H₂O, 50 µl Incomplete NH₄ 10x Reaction Buffer free of MgCl₂, 7,5 µl διαλύματος MgCl₂ 100 Nm, 40 µl ισομοριακού μίγματος των δεοξυριβονουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dCTP, και dGTP και 10 µl από τον κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 50 pmol/µl.

Το μηχάνημα, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η PCR, ήταν ο θερμοκυκλοποιητής της εταιρίας Applied Biosystems και χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες:

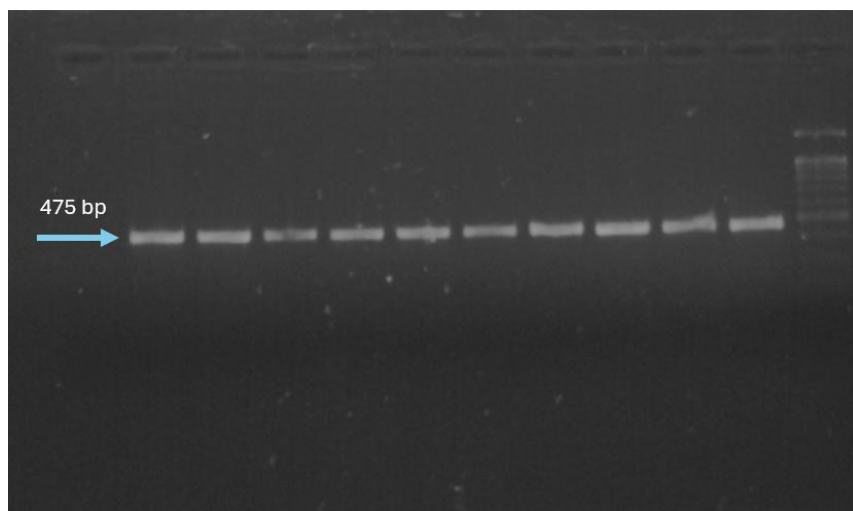
ΣΤΑΔΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	2 min
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec
Υβριδισμός εκκινητών	57 °C	30 sec
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec
Τελική επιμήκυνση	72 °C	1 min

Ο αριθμός των κύκλων για τα στάδια της αποδιάταξης, του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης ορίστηκε στους 30.

Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR σε πηκτή αгарόζης 2% w/v

Μετέπειτα, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης 2% w/v προκειμένου να ελεγχθεί, αρχικά, εάν ήταν επιτυχής η αντίδραση PCR και σε δεύτερο χρόνο το μέγεθος του προϊόντος. Για την δημιουργία της πηκτής, αναμίχθηκαν 2 g αгарόζης με 100 ml αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TBE (αραίωση 1:10) και θερμάνθηκαν. Μετά από ψύξη του δείγματος, προστέθηκαν 5 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου και αφέθηκε το μίγμα σε ηρεμία να σταθεροποιηθεί. Όταν πλέον η γέλη ήταν έτοιμη, φορτώνονταν σε κάθε πηγαδάκι της 5 μl προϊόντος DNA και 3 μl διαλύματος χρωστικής. Ωστόσο, σε ένα πηγαδάκι, αντί για DNA, προστέθηκαν 5 μl διαλύματος blank, το οποίο παρασκευάστηκε μαζί με τα δείγματα PCR με τη διαφορά ότι περιείχε 2 μl H₂O αντί γονιδιωματικού DNA (για την διερεύνηση τυχόν επιμολύνσεων) και σε ένα άλλο 5 μl διαλύματος μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες 120 V και 400 mA για 30 min. Μετά την ολοκλήρωσή της, η πηκτή εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία εντός του μηχανήματος MiniBIS Pro. Το

αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης ήταν 475 ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Δείγμα απεικόνισης μεγέθους προϊόντος PCR μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης

Πέψη προϊόντος PCR

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με το ένζυμο MboI στους 37°C και αφέθηκε στο υδατόλουτρο για ένα ολόκληρο βράδυ. Για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης πέψης αναμίχθηκαν 150 μl H₂O, 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος RCutSmart και 5 μl ενζύμου MboI. Κατά την αντίδραση πέψης, 6 μl προϊόντος PCR επωάστηκαν με 9 μl μίγματος ενζύμου.

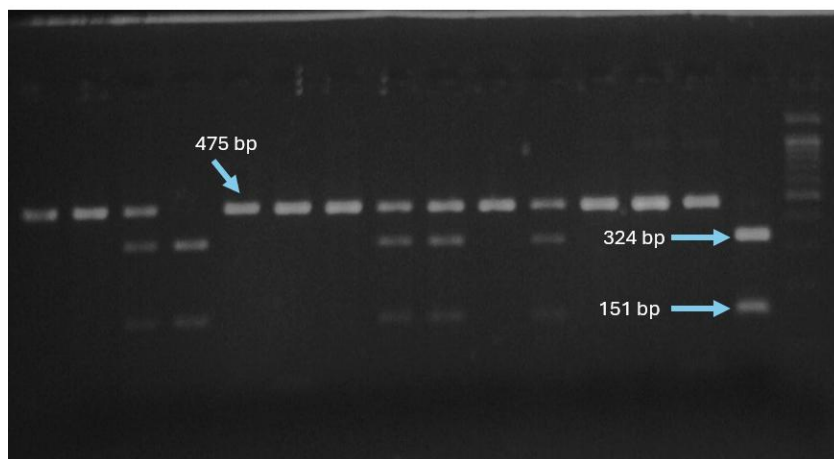
Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 3% w/v, η οποία παρασκευάστηκε με τη διάλυση 3 g αγαρόζης σε 100 μl αραιωμένου διαλύματος TBE. Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε 45 min σε συνθήκες των 120 v και 400 mA. Στην εικόνα,

μετά την έκθεση σε UV, απεικονίζονταν οι διαφορετικές ζώνες, λόγω της δράσης του περιοριστικού ενζύμου. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο είναι η εξής:



Ωστόσο, η παραπάνω αλληλουχία δεν εντοπίζεται στο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs2043211 του γονιδίου CARD8, καθώς η αδείνη στη θέση 2 της αλληλουχίας αναγνώρισης του ενζύμου, έχει αντικατασταθεί από θυμίνη. Οπότε, τα ομόζυγα δείγματα με γονότυπο TT για τον πολυμορφισμό εμφανίζουν μία ζώνη στα 475 ζεύγη βάσεων. Όσο αναφορά τα ομόζυγα δείγματα για του αγρίου τύπου, προέκυψαν δύο θραύσματα στα 151 και 324 ζεύγη βάσεων σε δείγματα, των οποίων άτομα δεν φέρουν τον πολυμορφισμό στα δύο αλληλόμορφα τους. Τα ετεροζυγωτικά δείγματα εμφάνισαν τρεις ζώνες στα 474, 324 και 151 ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 7**), καθώς η θέση αναγνώρισης του ενζύμου δεν υπάρχει στο amplicon.



Εικόνα 7: Δείγμα απεικόνισης ομόζυγων και ετερόζυγων ατόμων ως προς τον πολυμορφισμό rs2043211 σε αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πέψης

Στατιστική ανάλυση πειραματικών αποτελεσμάτων

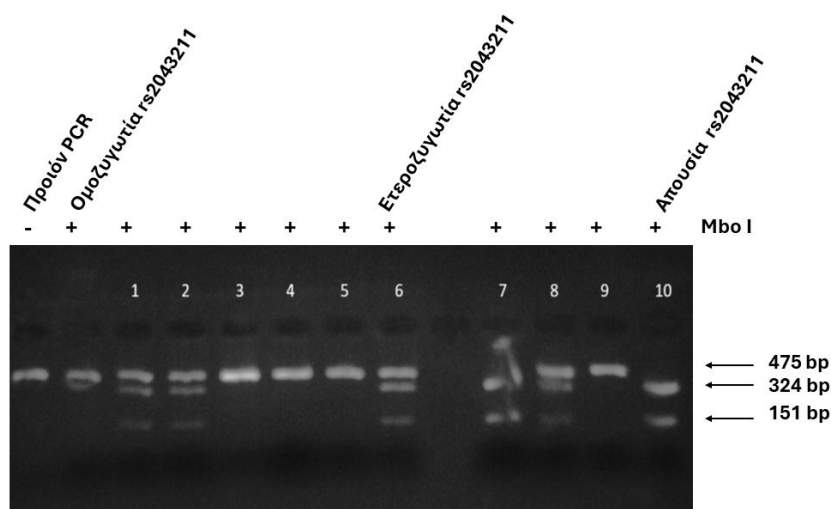
Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 (Chi-Square) στο πρόγραμμα στατιστικών αναλύσεων JASP και με καθορισμένη στατιστική σημαντικότητα $p_{\text{value}} < 0,05$. Η διακύμανση των γονοτύπων ελέγχθηκε για τυχόν απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση του πολυμορφισμού rs2043211 (c.102T>A) του γονιδίου CARD8 στη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων

Η παρουσία του πολυμορφισμού καταστρέφει τη θέση που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού, οπότε οπτικά παρατηρείται μία ζώνη στα 475 bp ενώ στην περίπτωση των ατόμων wild type οι ζώνες είναι 2, στις 324bp και 151bp, και των ετερόζυγων οι ζώνες είναι 3, στις 475bp, 324bp και 151bp (όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 8**). Στο σύνολο των **235 ατόμων** που μελετήθηκαν για τον πολυμορφισμό **rs2043211** (c.102T>A) του γονιδίου **CARD8** βρέθηκαν **24** άτομα αγρίου τύπου, **114** με ετεροζυγωτία και **97** με ομοζυγωτία. Παρακάτω, θα παρατεθούν τα στιγμιότυπα από τις **ηλεκτροφορήσεις των πέψεων**. Πρέπει να επισημανθεί ότι για τον έλεγχο της πιστότητας της διαδικασίας και των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα προϊόντος **PCR** και προϊόντος **πέψης** ατόμου με ομόζυγο γονότυπο αντίστοιχα. Έχουν τοποθετηθεί με την παραπάνω σειρά στα πρώτα δύο πηγαδάκια και εμφανίζουν ζώνη στις **475** ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 8**).

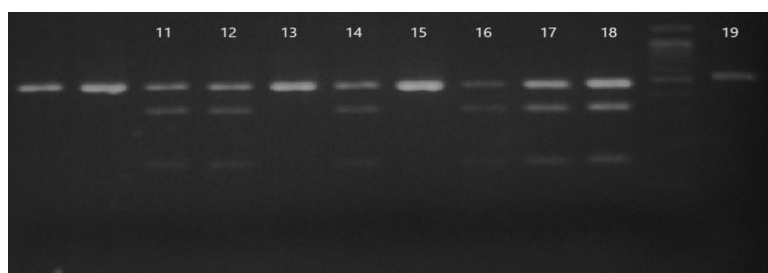
Αριθμός δειγμάτων 1-10



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	4
Ετεροζυγώτες	5
Ομοζυγώτες για το wild type	1

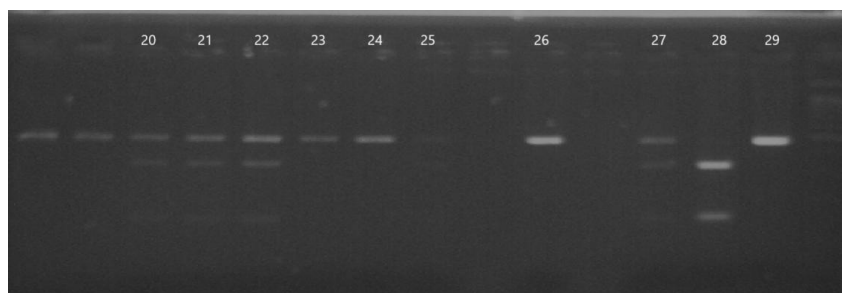
Αριθμός δειγμάτων 11-19



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	3
Ετεροζυγώτες	6
Ομοζυγώτες για το wild type	0

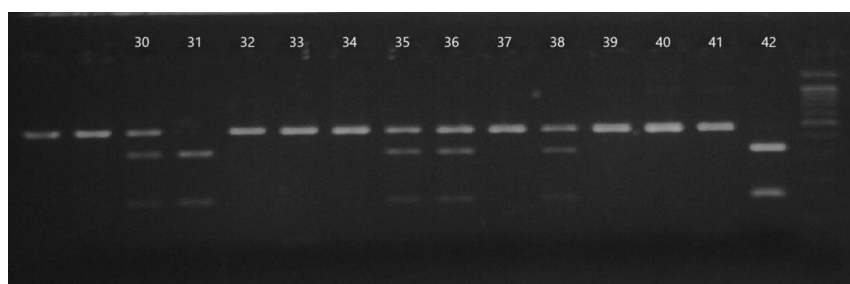
Αριθμός Δειγμάτων 20-29



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	4
Ετεροζυγώτες	5
Ομοζυγώτες για το wild type	1

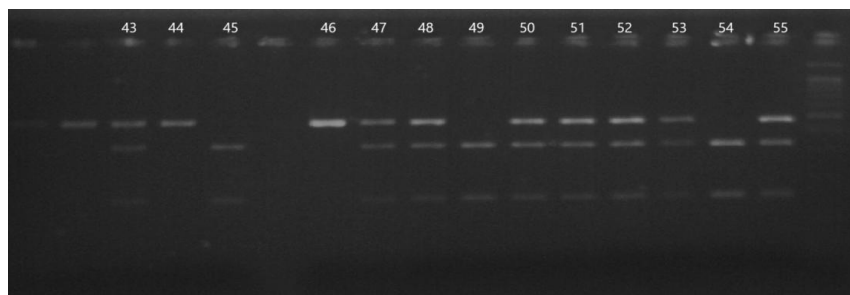
Αριθμός Δειγμάτων 30-42



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	7
Ετεροζυγώτες	4
Ομοζυγώτες για το wild type	2

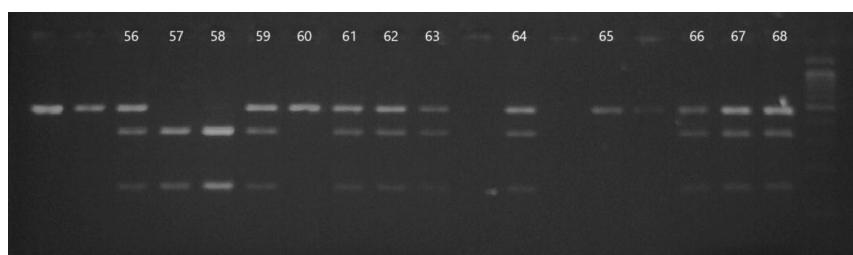
Αριθμός Δειγμάτων 43-55



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	2
Ετεροζυγώτες	8
Ομοζυγώτες για το wild type	3

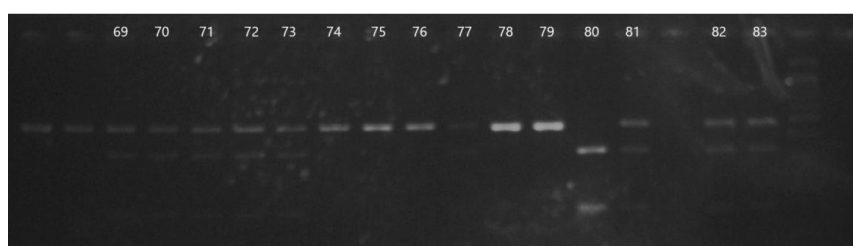
Αριθμός Δειγμάτων 56-68



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	2
Ετεροζυγώτες	9
Ομοζυγώτες για το wild type	2

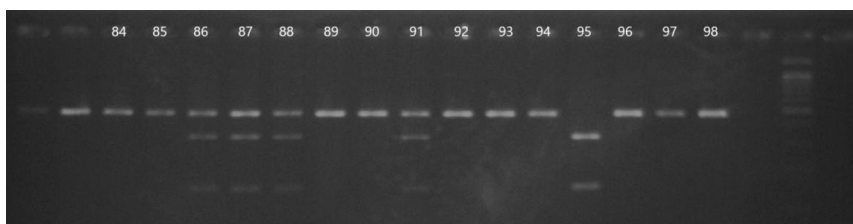
Αριθμός Δειγμάτων 69-83



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	5
Ετεροζυγώτες	9
Ομοζυγώτες για το wild type	1

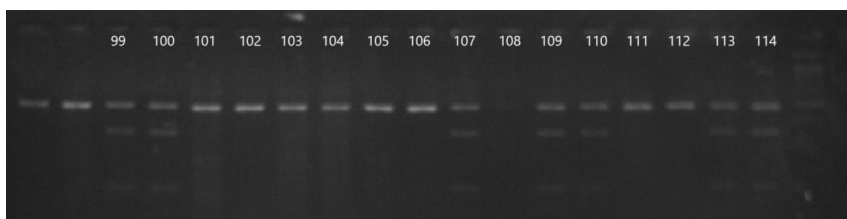
Αριθμός Δειγμάτων 84-98



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	10
Ετεροζυγώτες	4
Ομοζυγώτες για το wild type	1

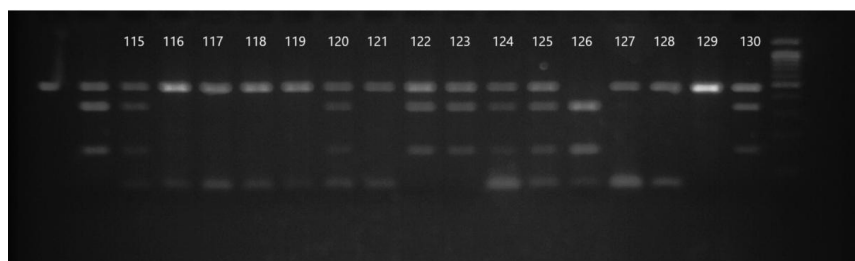
Αριθμός Δειγμάτων 99-114



Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	9
Ετεροζυγώτες	7
Ομοζυγώτες για το wild type	0

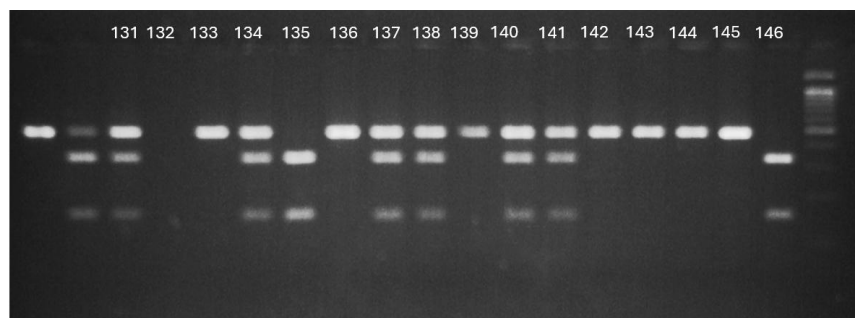
Αριθμός Δειγμάτων 115-130



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	8
Ετεροζυγώτες	7
Ομοζυγώτες για το wild type	1

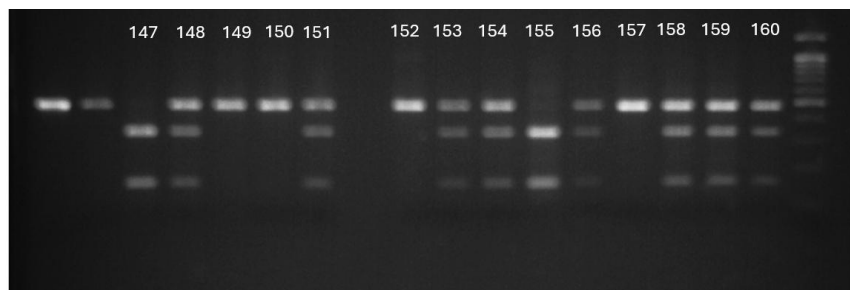
Αριθμός Δειγμάτων 131-146



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	7
Ετεροζυγώτες	6
Ομοζυγώτες για το wild type	3

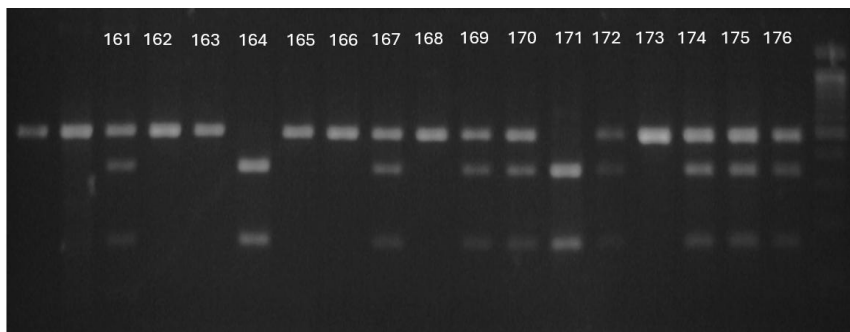
Αριθμός Δεγμάτων 147-160



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	4
Ετεροζυγώτες	8
Ομοζυγώτες για το wild type	2

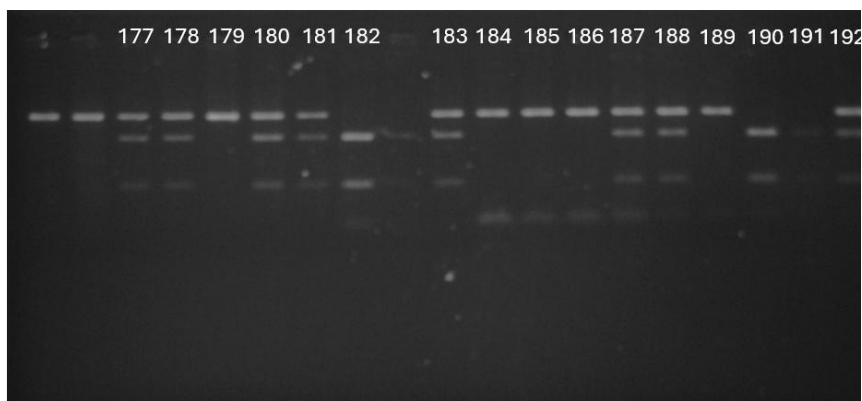
Αριθμός Δεγμάτων 161-176



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	6
Ετεροζυγώτες	8
Ομοζυγώτες για το wild type	2

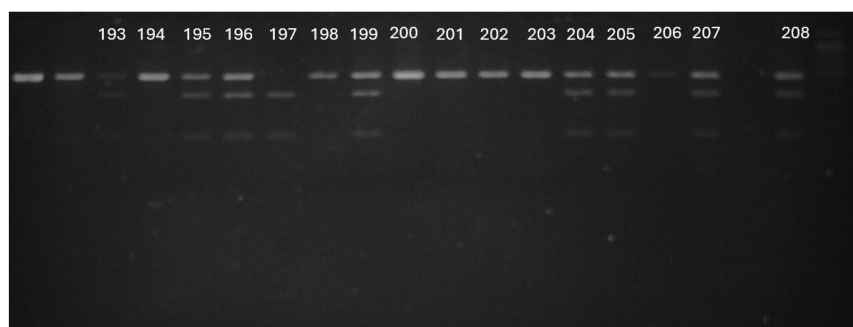
Αριθμός Δειγμάτων 177-192



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

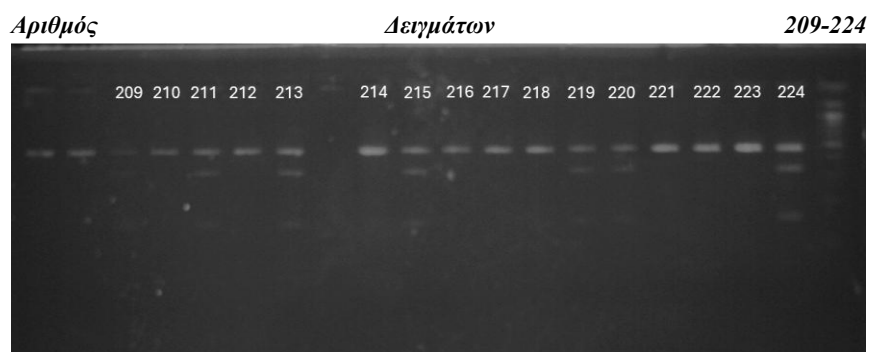
Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	5
Ετεροζυγώτες	8
Ομοζυγώτες για το wild type	3

Αριθμός Δειγμάτων 193-208



Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	7
Ετεροζυγώτες	8
Ομοζυγώτες για το wild type	1



Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs2043211

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	9
Ετεροζυγώτες	7
Ομοζυγώτες για το wild type	0

Αριθμός Δειγμάτων 225-235

Ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό	0
Ετεροζυγώτες	6
Ομοζυγώτες για το wild type	5

Παρατηρήσεις

Κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών υπήρξαν **σφάλματα** και για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν στοχευμένες επαναλήψεις. Τα κενά στις παραπάνω εικόνες ηλεκτροφορήσεων απεικονίζουν αυτά τα σφάλματα και οι γονότυποι των αντίστοιχων δειγμάτων επιβεβαιώθηκαν στην δεύτερη σειρά πειραμάτων. Επιπλέον, έπειτα από επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις δειγμάτων που δεν εμφάνιζαν ζώνες στα αποτελέσματα PCR, αποφασίστηκε να μην προσμετρηθούν στις τελικές στατιστικές αναλύσεις.

Υπολογιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων

Τα δεδομένα έχουν, προηγουμένως, ελεγχθεί για την ισορροπία Hardy-Weinberg με σκοπό τον υπολογισμό της συχνότητας του αλληλομόρφου που είναι υπεύθυνο για τον πολυμορφισμό rs2043211 του γονιδίου *CARD8*. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση διενεργήθηκε μέσω του προγράμματος JASP και με την εκτέλεση της δοκιμασίας χ^2 (Chi-Square). Παρακάτω, έχουν κατηγοριοποιηθεί τα δείγματα σε ομόζυγους, ετερόζυγους και αγρίου τύπου με βάση τον αριθμό λοιμώξεων του κάθε ασθενούς (**Εικόνα 24**).

Infections_5 (0: <5, 1: ≥5)	CARD8 rs2043211			Total
	0	1	2	
0	15	77	60	152
1	7	38	38	83
Total	22	115	98	235

Note. Each cell displays the observed counts

Εικόνα 24: Συνολική κατανομή των δειγμάτων σε ομόζυγους για τον πολυμορφισμό, σε ετερόζυγους και σε ομόζυγους για το wild type από το πρόγραμμα JASP, όπου 0 στην κατηγορία των infections είναι οι ασθενείς με αριθμό εμφανιζόμενων λοιμώξεων υπό του 5, ενώ όπου 1 περιγράφει την ομάδα ασθενών με αριθμό εμφανιζόμενων λοιμώξεων άνω των 5.

Υστερα από την κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τον αριθμό των αλληλομόρφων που φέρουν, υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου στον υπό εξέταση πληθυσμό, μέσω του τύπου :

$$\frac{(\text{Ετερόζυγα δείγματα} + 2 \cdot \text{ομόζυγα δείγματα})}{\text{Συνολικός αριθμός δειγμάτων}}$$

με τιμή περίπου **1,323**.

Ως **μηδενική υπόθεση** θέτουμε ότι έστω δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs2043211 και των λοιμώξεων και η τιμή στατιστικής σημαντικότητας έχει καθοριστεί σε $P_{\text{value}} < 0,05$.

Chi-Squared Tests

	Value	df	p
X ²	0.891	2	0.640
N	235		

Εικόνα 25: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

Στην **Εικόνα 25** βλέπουμε ότι το P_{value} της ανάλυσης είναι 0,640, σαφώς μεγαλύτερο από το 0,05. Οπότε, συμπεραίνουμε ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση και ο πολυμορφισμός δεν συσχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πεδίο έρευνας της παρούσας εργασίας είναι το ανθρώπινο γονίδιο *CARD8*, που ανιχνεύεται στο χρωμόσωμα 19. Το *CARD8* αποτελείται από 22 εξώνια, αριθμός που αποδεικνύει τις υψηλές πιθανότητες ύπαρξης του φαινομένου του εναλλακτικού ματίσματος. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις πολλαπλές ισομορφές του γονιδίου (23), (29), τεκμηριώνοντας το ευρύ φάσμα των λειτουργιών του. Η δράση της *CARD8* πρωτεΐνης αφορά τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη διαδικασία της απόπτωσης και της φλεγμονής (30).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί η ποικιλία πολλαπλών πολυμορφισμών (SNPs), τα οποία διαφοροποιούν σημαντικά τη δομή και την έκφραση της πρωτεΐνης με βάση τον κάθε κυτταρικό τύπο (29). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ένα άλλο transcript variant του ίδιου πολυμορφισμού, όπου παρατηρείται πρόωρος τερματισμός της μεταγραφής μέσω της σημειακής μετάλλαξης από αδερίνη σε θυμίνη και η παραγόμενη πρωτεΐνη δεν είναι λειτουργική (18). Γι' αυτόν το λόγο οι έρευνες εστιάζουν στην αναζήτηση των βασικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης *CARD8* με άλλους παράγοντες καθώς και στην εύρεση πολυμορφισμών που επηρεάζουν σημαντικά τη δομή και την αρχική της λειτουργία στην ανοσοαπόκριση. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί, τουλάχιστον, δεκαέξι πολυμορφισμοί, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με γνωστές προβληματικές αποκρίσεις, όπως τα αυτοάνοσα και αυτοφλεγμονώδη νοσήματα και τον καρκίνο (18), (31). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός *rs2043211* (*c.102T>A*) του γονιδίου *CARD8*, φαίνεται, στις περισσότερες περιπτώσεις, να έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ανοσολογική απόκριση. Συγκεκριμένα, έχει συσχετιστεί με χρόνια νοσήματα, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (26), η νόσος του Still (32), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (25), (43) και η επιληψία (33). Επιπρόσθετα, έρευνες υποστηρίζουν ότι ο πολυμορφισμός *rs2043211* (*c.102T>A*) του γονιδίου *CARD8* φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ (34) και να αποτελεί παράγοντα κινδύνου της ΟΜΛ, αφού παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε κύτταρα μυελού των οστών σε ασθενείς με Μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (35). Συσχετίζεται με οζώδες μελάνωμα (36) και έχει φανεί ότι συμβάλλει στην επιβίωση ασθενών με Non-Hodgkin λέμφωμα Β-κυττάρων (4).

Με σχόλια [MP1]: Ποσοί πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Να γράψεις το νούμερο και να βάλεις κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές

Οι έρευνες με πληθυσμό μελέτης τους παιδιατρικούς ασθενείς και τον πολυμορφισμό είναι ελάχιστες και εστιάζουν στον προστατευτικό του ρόλο έναντι της υποξικής-ισχαιμικής προσβολής στα νεογνά (37),(38). Στη συγκεκριμένη μελέτη ελέγχθηκαν 235 παιδιατρικοί ασθενείς και για λόγους σύγκρισης όσον αφορά τις μολύνσεις χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα κατηγοριοποιήθηκαν τα παιδιά που εμφάνισαν αριθμό λοιμώξεων κάτω των πέντε και στη δεύτερη τα παιδιά άνω των πέντε λοιμώξεων. Το ανοσοποιητικό σύστημα των συγκεκριμένων ασθενών ήταν αρκετά εξασθενημένο, λόγω της δράσης των καρκινικών μηχανισμών και των χημειοθεραπειών (15), (39). Παρόλα αυτά δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *rs2043211* του γονιδίου *CARD8* και της εμφάνισης λοιμώξεων. Αυτό, ίσως, οφείλεται στο γεγονός ότι δεν γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό και το είδος των λοιμώξεων (βακτηριακές, ιογενείς, μυκητιασικές) που εκδήλωσε κάθε παιδί. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το μετάγραφο του συγκεκριμένου πολυμορφισμού δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης (24). Κατ' επέκταση οι αρνητικές ενέργειες της πρωτεΐνης είναι μειωμένες συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταλλαγές κινδύνου (18).

Στην έρευνα των Fransén, K. et al, ο υπό μελέτη πολυμορφισμός, συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα IL-6 στους άνδρες. Η IL-6 ευθύνεται για την διήθηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού σε περιοχές βλάβης, ενώ μπορεί και να συμβάλλει στην αντιφλεγμονώδη δράση του οργανισμού (40). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μια εστιασμένη έρευνα που θα εξετάζει την ικανότητα του ανοσοποιητικού μεταξύ ανδρών και γυναικών που φέρουν τον πολυμορφισμό *rs2043211*, θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορετικότητα της ανοσοαπόκρισης μεταξύ των δύο φύλων και τη διαφορετική συχνότητα ορισμένων φλεγμονωδών νοσημάτων.

Όσο αναφορά την έκβαση της μελέτης, θα μπορούσαν να προταθούν κάποιες μελλοντικές προσεγγίσεις ή βελτιώσεις μεθόδων. Αρχικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού με έναν αριθμό συχνά εμφανιζόμενων λοιμώξεων της παιδικής ηλικίας, όπως η προσβολή από τον ιό του Epstein-Barr (EBV), της γρίπης, τον νοροϊό, τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV), το σύμπλεγμα των ερπητοϊών (HSV) (41) για πιο ακριβή αποτελέσματα.

Επιπλέον, θα μπορούσε να διερευνηθεί η συγκεκριμένη μελέτη σε σχέση με τη δράση του πολυμορφισμού στον καρκίνο της παιδικής ηλικίας. Αυτό μπορεί να συμβεί με τον

σχεδιασμό ενός πειραματικού πρωτοκόλλου στο οποίο θα συμμετέχουν νοσοκομεία παιδών και πιο συγκεκριμένα παιδιά που πάσχουν από κύριες μορφές λευχαιμίας, καθώς αποτελούν το πιο συχνά εμφανιζόμενο τύπου καρκίνου της παιδικής ηλικίας (42). Η πλειονότητα των ερευνών αναφέρεται σε ενήλικες ασθενείς (4), (34), (35). Η ανάπτυξη του οργανισμού και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος μεταξύ παιδιών και ενηλίκων εμφανίζει διαφορές, όπως, επίσης, και οι τύποι των εμφανιζόμενων τύπων καρκίνου κάθε ηλικίας. Κατά αυτόν τον τρόπο, θα μπορέσουμε να δούμε εάν μπορεί ο πολυμορφισμός *rs2043211* να συσχετιστεί με κάποια μορφή καρκίνου υψηλού επιπολασμού στα παιδιά μέσω στατιστικών αναλύσεων. Δείγμα αυτών είναι οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα και οι όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς αποτελούν το 70% των περιπτώσεων (42). Σε τελική ανάλυση, θα μπορέσουμε να συγκρίνουμε και παρατηρήσουμε την πιθανότητα διαφορικής δράσης και έκφρασης του γονιδίου *CARD8* μεταξύ παιδιών και ενηλίκων μέσω της μεθόδου ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) και συγκριτικών μεθόδων ανάλυσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Johnson KJ, Lee JM, Ahsan K, et al. Pediatric cancer risk in association with birth defects: a systematic review. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181246.
2. Onyije, F. M., Olsson, A., Baaken, D., Erdmann, F., Stanulla, M., Wollschläger, D., & Schüz, J. (2022). Environmental risk factors for Childhood Acute lymphoblastic leukemia: An umbrella review. *Cancers*, 14(2), 382. <https://doi.org/10.3390/cancers14020382>
3. Siddika, A., Chowdhury, S., Hasan, M. R., Moniruzzaman, M., Sayeed, S. J. B., Tabassum, T., Chowduary, M., Tabassum, T., Islam, A., & Rahman, M. M. (2023). Clinicopathological Patterns of Malignant Solid Tumors in Adult Patients: A Hospital-Based Study From Bangladesh. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.34925>
4. Liu, Z., Zhang, L., Jing, F., Xiao, S., Gao, Y., Bian, H., & Zhao, X. (2021). Genetic Polymorphisms in NLRP3 Inflammasome-Associated Genes in Patients with B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Inflammation Research*, Volume 14, 5687–5697. <https://doi.org/10.2147/jir.s329090>
5. Juliusson, G., & Hough, R. (2016). Leukemia. *Progress in Tumor Research*, 87–100. <https://doi.org/10.1159/000447076>
6. Whiteley, A. E., Price, T. T., Cantelli, G., & Sipkins, D. A. (2021). Leukaemia: a model metastatic disease. *Nature Reviews. Cancer*, 21(7), 461–475. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00355-z>
7. Bartenhagen, C., Fischer, U., Korn, K., Pfister, S. M., Gombert, M., Chen, C., Okpanyi, V., Hauer, J., Rinaldi, A., Bourquin, J., Eckert, C., Hu, J., Ensser, A., Dugas, M., & Borkhardt, A. (2017). Infection as a cause of childhood leukemia: virus detection employing whole genome sequencing. *Haematologica*, 102(5), e179–e183. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.155382>
8. Devine, S. M., & Larson, R. A. (1994). Acute leukemia in adults: recent developments in diagnosis and treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 44(6), 326–352. doi:10.3322/canjclin.44.6.326
9. Γιαννακάκη Αικ. (2020) Αιματολογικές κακοήθειες και λεμφώματα στην κύηση

10. Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
11. Connors, J. M., Cozen, W., Steidl, C., Carbone, A., Hoppe, R. T., Flechtner, H., & Bartlett, N. L. (2020). Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0189-6>
12. Küppers, R., Engert, A., & Hansmann, M. (2012). Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3439–3447. <https://doi.org/10.1172/jci61245>
13. Hochberg, J., Waxman, I. M., Kelly, K. M., Morris, E., & Cairo, M. S. (2009). Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science. *British Journal of Haematology*, 144(1), 24–40. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07393.x
14. Dome, J. S., Rodriguez-Galindo, C., Spunt, S. L., & Santana, V. M. (2020). 92-Pediatric Solid Tumors. *Abeloff's Clinical Oncology*, 1703–1747.e11. doi:10.1016/b978-0-323-47674-4.00092-x
15. Vento, S., & Cainelli, F. (2003). Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology*, 4(10), 595–604. doi:10.1016/s1470-2045(03)01218-x
16. Pathan, N., Marusawa, H., Krajewska, M., Matsuzawa, S., Kim, H., Okada, K., Torii, S., Kitada, S., Krajewski, S., Welsh, K., Pio, F., Godzik, A., & Reed, J. C. (2001). TUCAN, an antiapoptotic Caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 32220–32229. <https://doi.org/10.1074/jbc.m100433200>
17. Pang, H., Sun, X., Luo, S., Lin, J., Shi, X., Xiao, Y., Huang, G., Li, X., Xie, Z., & Zhou, Z. (2021). The polymorphism of the CARD8 inflammasome-related gene is associated with glutamic-acid-decarboxylase-antibody positivity in patients with type 1 diabetes mellitus. *Annals of Translational Medicine*, 9(14), 1131. <https://doi.org/10.21037/atm-21-1126>
18. Karakaya, T., Slaufova, M., Di Filippo, M., Hennig, P., Kündig, T., & Beer, H. (2024). CARD8: A Novel Inflammasome Sensor with Well-Known Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Activity. *Cells*, 13(12), 1032. <https://doi.org/10.3390/cells13121032>
19. Linder, A., Bauernfried, S., Cheng, Y., Albanese, M., Jung, C., Keppler, O. T., & Hornung, V. (2020). CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in

- human T cells. *The EMBO Journal*, 39(19). <https://doi.org/10.15252/embj.2020105071>
20. Razmara, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Poyet, J., Geddes, B. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., & Alnemri, E. S. (2002). CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates Caspase-1 activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13952–13958. <https://doi.org/10.1074/jbc.m107811200>
 21. Sharif, H., Hollingsworth, L. R., Griswold, A. R., Hsiao, J. C., Wang, Q., Bachovchin, D. A., & Wu, H. (2021). Dipeptidyl peptidase 9 sets a threshold for CARD8 inflammasome formation by sequestering its active C-terminal fragment. *Immunity*, 54(7), 1392–1404.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.04.024>
 22. Kulsuptrakul, J., Turcotte, E. A., Emerman, M., & Mitchell, P. S. (2023). A human-specific motif facilitates CARD8 inflammasome activation after HIV-1 infection. *eLife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elife.84108>
 23. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201996>
 24. Miao, L., Wang, B., Ji, J., Wan, L., Yin, L., Zhu, B., Zhang, J., & Pu, Y. (2020). CARD8 polymorphism rs2043211 protects against noise-induced hearing loss by causing the dysfunction of CARD8 protein. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(7), 8626–8636. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11193-1>
 25. Jiang, Y., Zhong, S., He, S., Weng, J., Liu, L., Ye, Y., & Chen, H. (2023). Biomarkers (mRNAs and non-coding RNAs) for the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1087925>
 26. Yang, S., Kim, H., Hong, M., Lim, J., Choi, E., Ye, B. D., Park, S., & Song, K. (2011). Association of CARD8 with inflammatory bowel disease in Koreans. *Journal of Human Genetics*, 56(3), 217–223. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.170>
 27. Tsu, B. V., Agarwal, R., Gokhale, N. S., Kulsuptrakul, J., Ryan, A. P., Castro, L. K., Beierschmitt, C. M., Turcotte, E. A., Fay, E. J., Vance, R. E., Hyde, J. L., Savan, R., Mitchell, P. S., & Daugherty, M. D. (2022). Host specific sensing of coronaviruses and picornaviruses by the CARD8 inflammasome. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.21.508960>
 28. Bakaros, E., Voulgaridi, I., Paliatsa, V., Gatselis, N., Germanidis, G., Asvestopoulou, E., Alexiou, S., Botsfari, E., Lygoura, V., Tsachouridou, O., Mimitsoudis, I., Tseroni, M., Sarrou, S., Mouchtouri, V. A., Dadouli, K., Kalala,

- F., Metallidis, S., Dalekos, G., Hadjichristodoulou, C., & Speletas, M. (2023). Innate immune gene polymorphisms and COVID-19 prognosis. *Viruses*, 15(9), 1784. <https://doi.org/10.3390/v15091784>
29. Kulkarni, P., Solomon, T. L., He, Y., Chen, Y., Bryan, P. N., & Orban, J. (2018). Structural metamorphism and polymorphism in proteins on the brink of thermodynamic stability. *Protein Science*, 27(9), 1557–1567. <https://doi.org/10.1002/pro.3458>
30. Nadkarni, R., Chu, W. C., Lee, C. Q., Mohamud, Y., Yap, L., Toh, G. A., Beh, S., Lim, R., Fan, Y. M., Zhang, Y. L., Robinson, K., Tryggvason, K., Luo, H., Zhong, F., & Ho, L. (2022). Viral proteases activate the CARD8 inflammasome in the human cardiovascular system. *The Journal of Experimental Medicine*, 219(10). <https://doi.org/10.1084/jem.20212117>
31. Alves, F. S., Xabregas, L. A., Kerr, M. W. A., Souza, G. L., Pereira, D. S., Magalhães-Gama, F., Santiago, M. R. R., Garcia, N. P., Tarragô, A. M., Ogusku, M. M., Sadahiro, A., Malheiro, A., & Costa, A. G. (2021). Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89310-4>
32. Hung, W., Chen, Y., Hung, S., Chen, H., Gung, N., Hsieh, C., Tang, K., & Chen, D. (2021). CARD8 SNP rs11672725 Identified as a Potential Genetic Variant for Adult-Onset Still's Disease. *Life*, 11(5), 382. <https://doi.org/10.90/life11050382>
33. Esih, K., Goričar, K., Soltirovska-Šalamon, A., Dolžan, V., & Renner-Primec, Z. (2021). Genetic Polymorphisms, Gene–Gene Interactions and Neurologic Sequelae at Two Years Follow-Up in Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Treated with Hypothermia. *Antioxidants*, 10(9), 1495. <https://doi.org/10.3390/antiox10091495>
34. Zhang, C., Han, F., Yu, J., Hu, X., Hua, M., Zhong, C., Wang, R., Zhao, X., Shi, Y., Ji, C., & Ma, D. (2019). Investigation of NF-κB-94ins/del ATTG and

CARD8 (rs2043211) Gene Polymorphism in Acute Lymphoblastic Leukemia.

Frontiers in Endocrinology, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00501>

35. Zhou, Y., Yan, S., Liu, N., He, N., Zhang, A., Meng, S., Ji, C., Ma, D., & Ye, J. (2020). Genetic polymorphisms and expression of NLRP3 inflammasome-related genes are associated with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Human Immunology*, 81(10–11), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.09.001>
36. Da Silva, W. C., Oshiro, T. M., De Sá, D. C., Franco, D. D., Neto, C. F., & Pontillo, A. (2016). Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of CARD8, IL1B and IL18 in melanoma susceptibility and progression. *Cancer Genetics*, 209(10), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.09.004>
37. Hudson, A., Fournier, M., Coulombe, J., & Dae, D. (2023). Using existing pediatric cancer data from the Gabriella Miller Kids First Data Resource Program. *JNCI Cancer Spectrum*, 7(6). <https://doi.org/10.1093/jncics/pkad079>
38. Esih, K., Goričar, K., Rener-Primec, Z., Dolžan, V., & Soltirovska-Šalamon, A. (2021). CARD8 and IL1B Polymorphisms Influence MRI Brain Patterns in Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Treated with Hypothermia. *Antioxidants*, 10(1), 96. <https://doi.org/10.3390/antiox10010096>
39. Martinez, M. F., Alveal, E., Soto, T. G., Bustamante, E. I., Ávila, F., Bangdiwala, S. I., Flores, I., Benavides, C., Morales, R., Varela, N., & Quiñones, L. A. (2020). IL-6 –572C>G and CARD8 304T>A Genetic Polymorphisms are Associated with the Absolute Neutrophil Count in Patients with Hematological Malignancies Under Chemotherapy: An Application of Multilevel Models to a Preliminary Pharmacogenetic Study. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, Volume 13, 337–343. <https://doi.org/10.2147/pgpm.s261208>

40. Fransén, K., Hiyoshi, A., Paramel, G. V., & Hurtig-Wennlöf, A. (2024). Association between C10X polymorphism in the CARD8 gene and inflammatory markers in young healthy individuals in the LBA study. *BMC Cardiovascular Disorders*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12872-024-03765-7>
41. Alter, S. J., Bennett, J. S., Koranyi, K., Kreppel, A., & Simon, R. (2015). Common childhood viral infections. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 45(2), 21–53. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2014.12.001>
42. Steliarova-Foucher, E., Fidler, M. M., Colombet, M., Lacour, B., Kaatsch, P., Piñeros, M., Soerjomataram, I., Bray, F., Coebergh, J. W., Peris-Bonet, R., Stillier, C. A., Hackl, M., Zborovskaya, A., Dimitrova, N., Valerianova, Z., Dušek, L., Mägi, M., Monnereau, A., Clavel, J., . . . Dolya, A. (2018). Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991–2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study. *The Lancet Oncology*, 19(9), 1159–1169. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(18\)30423-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(18)30423-6)
43. McKinney, C., Stamp, L. K., Dalbeth, N., Topless, R. K., Day, R. O., Kannangara, D. R., Williams, K. M., Janssen, M., Jansen, T. L., Joosten, L. A., Radstake, T. R., Riches, P. L., Tausche, A., Lioté, F., So, A., & Merriman, T. R. (2015). Multiplicative interaction of functional inflammasome genetic variants in determining the risk of gout. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0802-3>

