



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Πλαγεράς Δημήτριος

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες»

«Μελέτη συσχέτισης πολυμορφισμών σε γονίδια σχετικά με τη βιταμίνη D σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση»

«An association study of SNPs on Vitamin D related genes on patients with systemic sclerosis»

Πλαγεράς Δημήτριος

Λάρισα 2019

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ζήσης Μαμούρης : Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών (επιβλέπων)

Λάζαρος Ι. Σακκάς : Καθηγητής Παθολογίας και Ρευματολογίας τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπόγδανος Δημήτριος : Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μια σπάνια αυτοάνοση ασθένεια του συνδετικού ιστού. Χαρακτηρίζεται από ίνωση και φλεγμονή του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων. Ως πολυπαραγοντικό νόσημα εκδηλώνεται σε άτομα με επιπρεπτικό γενετικό υπόβαθρο κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η βιταμίνη D αποτελεί ένα καλά μελετημένο μόριο με μια σειρά από διαφορετικές φυσιολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Λόγω αυτής της ιδιότητας, η έλλειψη της θεωρείται πως παίζει κρίσιμο ρόλο στην εκδήλωση μιας σειράς νοσημάτων του ανοσοποιητικού. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, διερευνήθηκε ένας αριθμός μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών σε γονίδια σχετικά με την βιοσύνθεση, την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και τη δράση της βιταμίνης D και η σχέση τους με την προδιάθεση για εκδήλωση συστηματικής σκλήρυνσης καθώς και με τα συνολικά επίπεδα βιταμίνης D στον ορό.

Abstract

Systemic sclerosis is a rare autoimmune disease of the connective tissue that affects mostly women. It is characterized by fibrosis and inflammation of the skin, blood vessels and internal organs. Being a multifactorial disease, it is believed to occur in genetically susceptible individuals after the effect of various environmental triggers. Vitamin D3 is a well-studied molecule with a plethora of functions, including regulation of the immune system. Due to this trait, vitamin D deficiency is believed to play a crucial role in the development of various diseases of the immune system. During this master thesis, a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were investigated on vitamin D-related genes, regarding their relationship with systemic sclerosis susceptibility, as well as whole vitamin D serum levels.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

- 1.1 Συστηματική σκλήρυνση- Γενικά στοιχεία της νόσου
- 1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου
- 1.3 Επιδημιολογία της νόσου
- 1.4 Βασική παθοφυσιολογία της νόσου
- 1.5 Γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου
- 1.6 Τύποι γενετικών μελετών
- 1.7 Βιταμίνη D- γενικά στοιχεία
- 1.8 Βιταμίνη D- ανοσορυθμιστικός ρόλος
- 1.9 Γενετικοί τόποι σχετικοί με τη βιταμίνη D

Σκοπός

2. Υλικά και μέθοδοι

- 2.1. Δειγματοληψία
- 2.2. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα
- 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- 2.4. Φωτομέτρηση
- 2.5 Γονοτύπηση
- 2.6 Ποιοτική ανάλυση αποτελεσμάτων γονοτύπησης
- 2.7 Στατιστική ανάλυση

3. Αποτελέσματα

- 3.1. Απομόνωση ολικού DNA από περιφερικό αίμα
- 3.2. Γονοτύπηση
- 3.3. Ποιοτική ανάλυση αποτελεσμάτων γονοτύπησης
- 3.4 Στατιστική ανάλυση
- 3.5. Α Αποτελέσματα ανάλυσης ασθενών-υγιών μαρτύρων
- 3.5. Β Αποτελέσματα ανάλυσης μεταξύ των ασθενών

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

5. Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

1.1 Συστηματική σκλήρυνση- Γενικά στοιχεία της νόσου

Η συστηματική σκλήρυνση (SSc, συστηματικό σκληρόδερμα) είναι ένα σπάνιο πολυπαραγοντικό αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού με προσβολή του δέρματος και εσωτερικών οργάνων. Παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων και φαινοτύπων και συχνά μπορεί κατά τη πορεία της νόσου να εμφανιστούν σοβαρές ή και θανατηφόρες επιπλοκές από διάφορα συστήματα, με κυριότερες την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης ή και πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης. Η νόσος εμφανίζει αυξημένη συχνότητα προσβολής του γυναικείου φύλου και εκδηλώνεται τυπικά κατά τη μέση ηλικία (Barnes et al). Θεωρείται πως εμφανίζεται σε άτομα με γενετική προδιάθεση, μετά από έκθεση σε κατάλληλο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Το ακριβές περιβαλλοντικό ερέθισμα, παραμένει άγνωστο, ωστόσο από πολλούς ερευνητές θεωρείται ότι η προσβολή από διάφορους λοιμώδεις παράγοντες, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein Barr (EBV) και το *Toxoplasma Gondii*, μπορεί να παίζει καταλυτικό ρόλο ως προς την εμφάνιση και την εκδήλωση της ασθένειας, κυρίως μέσω μηχανισμών μοριακής μίμησης (Lunardi et al, Cusick et al). Ένας ακόμα περιβαλλοντικός μηχανισμός που έχει προταθεί πως συμβάλει στην εκδήλωση της νόσου, είναι η έλλειψη βιταμίνης D3, η οποία λόγω της φυσιολογικής ανοσορύθμισης που παρέχει μπορεί να εμπλέκεται με απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και τελικώς με την ανάπτυξη και την εκδήλωση αυτοανοσίας. (Varga et al)

1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου

Κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας αποτελεί η φλεγμονή και η ίνωση του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων, ως απάντηση σε ιστική βλάβη. Εμφανίζεται σταδιακά σκλήρυνση και ίνωση του δέρματος ενώ παράλληλα επηρεάζονται το ανοσοποιητικό και το μικραγγειακό σύστημα. Ο ακριβής μηχανισμός της μικρο-αγγειοπάθειας δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί, ωστόσο ως πιθανοί μηχανισμοί βλάβης των αγγείων αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω : ελεύθερες ρίζες, διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες και αυτοαντισώματα που προκαλούν κυτταροτοξικότητα μεσολαβούμενη από αντίσωμα μέσω των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (Pattanaik et al).

Εξαιτίας της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος, παράγονται αυτοαντισώματα και ενεργοποιούνται οι ανοσοκύτταρα. Η δυσλειτουργία των ανοσοκυττάρων οδηγεί στην υπέρμετρη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η οποία αποτελείται από κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβροκονεκτίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες. Η σταδιακά αυξανόμενη και τελικά ανεξέλεγκτη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας ονομάζεται ίνωση. Η ίνωση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ουλώδους ιστού και συνεπώς την πρόκληση αγγειοπάθειας που περιλαμβάνει: μείωση διαπερατότητας των αγγείων και του αγγειακού τόνου παράλληλα με την εμφάνιση τηλεαγγειεκτασίας. Έτσι δημιουργούνται αλλαγές στα τριχοειδή αγγεία των νεφρών, των πνευμόνων, της καρδιάς και των μυών που τα καθιστούν δυσλειτουργικά καθώς χάνουν την ελαστικότητά τους λόγω της εναπόθεσης κολλαγόνου. Η ίνωση είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία

και όταν αφορά ζωτικά όργανα όπως τους πνεύμονες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών (Gabrielli et al).)

Η SSc είναι μια ιδιαίτερα ετερογενής νόσος με άγνωστη αιτιολογία και ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις αναλόγως το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο. Παρά την μεγάλη ετερογένεια των κλινικών φαινοτύπων, γενικά οι ασθενείς διαχωρίζονται σε δύο βασικούς υποτύπους (ομάδες), σε ασθενείς με εστιασμένη συστηματική σκλήρυνση και ασθενείς με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση. Ο διαχωρισμός γίνεται βάση διαφορετικής κατανομής της ίνωσης στο δέρμα καθώς και άλλων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών, όπως φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 1 (Van den Hoogen et al) .

Υπότυπος	Εστιασμένη SSc	Διάχυτη SSc
Συμπτώματα		
Στόχοι αυτοαντισωμάτων	Πρωτεΐνες του κεντρομερούς (ACA)	RNA πολυμεράση III Τοποϊσομεράση I (ATA)
Δέρμα	Εντοπισμένη/ Περιφερική αλλοίωση	Ταχύτατη ίνωση
Πνεύμονες	Πνευμονική υπέρταση	Πνευμονική ίνωση
Πρόγνωση	Καλή	Φτωχή
Γενικά χαρακτηριστικά	Φαινόμενο Raynaud Σκληροδακτυλία	Επιπλοκές σε: Νεφρούς, Καρδιά, Πνεύμονες

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά υποτύπων της συστηματικής σκλήρυνσης (προσαρμογή από Allanore et al)

1.3 Επιδημιολογία της νόσου

Ο επιπολασμός και η επίπτωση της ασθένειας φαίνεται να ποικίλουν ανάμεσα σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται περίπου σε 150 ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού και η επίπτωση σε 10 νέα περιστατικά/εκατομμύριο πληθυσμού το χρόνο σε βόριο-Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ οι αντίστοιχες τιμές εκτιμώνται από 276 μέχρι 443 ασθενείς/εκατομμύριο και από 14 μέχρι 21 νέες περιπτώσεις/εκατομμύριο το χρόνο σε νότιο-Ευρωπαϊκούς, βόριο-Αμερικανικούς και Αυστραλιανούς πληθυσμούς (Allanore, et al).

Η νόσος, όπως και τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε γυναίκες σε σχέση με άντρες. Συγκεκριμένα, αναφέρονται χαρακτηριστικά στοιχεία επιπολασμού της συστηματικής σκλήρυνσης από Σουηδικό πληθυσμό : 88 άντρες ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού και 514 γυναίκες ασθενείς/εκατομμύριο πληθυσμού. Ταυτόχρονα έχει δείχτει πως οι άντρες ασθενείς εμφανίζουν

βαρύτερη κλινική εικόνα, επομένως το άρρεν φύλο θεωρείται φτωχός προγνωστικός παράγοντας (Salazar et al).

Πέρα από το φύλο, έχει φανεί ότι και η εθνικότητα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην εμφάνιση όσο και στην βαρύτητα της ασθένειας. Για παράδειγμα, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας έχει βρεθεί πως είναι αυξημένη στους Ευρωπαϊκούς σε σχέση με τους Ασιατικούς πληθυσμούς ενώ στους Αφροαμερικάνους η νόσος εμφανίζεται συχνότερα και ταυτόχρονα παρατηρείται μεγαλύτερη νοσηρότητα, καθώς στον συγκεκριμένο πληθυσμό έχει παρατηρηθεί μειωμένη ηλικία εμφάνισης της νόσου και αυξημένη παραγωγή ακόμα και διαφορετικού τύπου αυτοαντισωμάτων (π.χ. αντι-τοποϊσομεράσης). Ακόμα ένα στοιχείο που φαίνεται να υποστηρίζει την συχνότερη εκδήλωση βαρύτερου κλινικού φαινοτύπου σε Αφροαμερικάνους είναι το γεγονός πως το ποσοστό των Καυκάσιων ασθενών με εστιασμένο σκληρό-δερμα (δηλαδή τον ηπιότερο υπότυπο της νόσου) είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο στους Αφροαμερικανικούς πληθυσμούς (Simms et al).

Με βάση λοιπόν τα ευρήματα των επιδημιολογικών μελετών, διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες φαίνεται να διαθέτουν χαρακτηριστικά φαινοτυπικά προφίλ. Τα ευρήματα αυτά, υποδεικνύουν ότι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν εν μέρει στην εμφάνιση και την παθογένεια της ασθένειας (Salazar et al).

1.4 Βασική παθοφυσιολογία της νόσου

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μία χρόνια αυτοάνοση ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή, λόγω απορύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και παραγωγής αυτοαντισωμάτων, βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων και ανεξέλεγκτη παραγωγή ινοβλαστών και εξωκυττάριου υλικού, που τελικά οδηγεί στην εμφάνιση ίνωσης (Allanore et al).

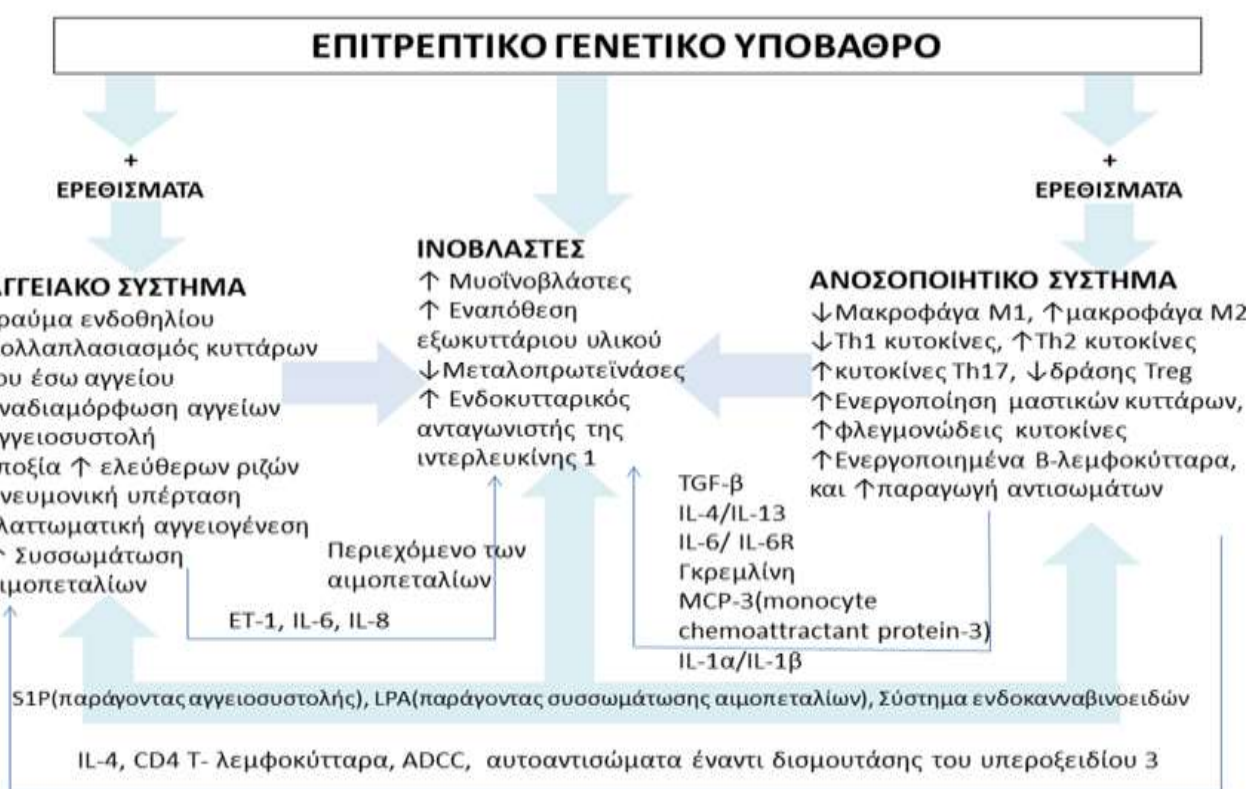
Η παραγωγή αυτοαντισωμάτων είναι αποτέλεσμα της παρατεταμένης και απορυθμισμένης ενεργοποίησης Τ και Β λεμφοκυττάρων του οργανισμού. Επιπλέον στοιχεία που συμμετέχουν στην αυτοανοσία είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις προ-φλεγμονωδών μορίων στους ασθενείς (Simms et al).

Στους κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου συμπεριλαμβάνονται ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες, Β και Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα. Σημαντικοί μεσολαβητές της κυτταρικής ενεργοποίησης και της φλεγμονής είναι ο TGF-β (transforming growth factor-β), οι ιντερλευκίνες IL-6 και IL-13, η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη 2 καθώς και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Allanore et al).

Ο τραυματισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων θεωρείται πως είναι ένα από τα αρχικά κεντρικά γεγονότα στην εξέλιξη της ασθένειας. Ως πιθανοί μηχανισμοί πρόκλησης μικροαγγειακής βλάβης έχουν προταθεί διάφοροι ιοί (π.χ. CMV) καθώς και η δράση κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, διαμεσολαβούμενη από αυτο-αντισώματα (Pattanaik et al).

Το κύριο χαρακτηριστικό της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η σταδιακή συσσώρευση στους ιστούς ινώδους εξωκυττάριου υλικού αποτελούμενο από κολλαγόνο, ελαστίνη, γλυζαμινογλυκάνες και φιμπρονεκτίνη. Η διαδικασία αυτή είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής και συσσώρευσης ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών, ως απάντηση σε ιστική βλάβη. Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες είναι οι κεντρικοί κυτταρικοί πληθυσμοί στην παθογένεια της ίνωσης καθώς εκείνοι προκαλούν την αυξημένη σύνθεση εξωκυττάριου υλικού, η οποία σε συνδυασμό με την ελαττωματική αποικοδόμησή του οδηγεί προοδευτικά στην εμφάνιση ίνωσης και ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ουλώδους ιστού (Allanore et al).

Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλαστες στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στην απόπτωση και από αυξημένη παραγωγή TGF-β (αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης), συμβάλλοντας έτσι στη συντήρηση ενός φαύλου κύκλου συσσώρευσης εξωκυτταρίου υλικού. Στους συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς έχουν βρεθεί ισομορφές μορίων του εξωκυτταρίου υλικού όπως είναι η φιμπρονεκτίνη που έχουν προκύψει από εναλλακτικό μάτισμα. Οι ισομορφές αυτές προσδένονται άμεσα σε υποδοχείς TLR4 (toll-like receptor υποδοχείς που αναγνωρίζουν πρότυπα σε παθογόνα) στην επιφάνεια στρωματικών κυττάρων και επάγουν την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών. Οι ιντερφερόνες τύπου I και II εκτός από γνωστοί ανοσορυθμιστές, ρυθμίζουν και την παραγωγή κολλαγόνου. Επομένως είναι πιθανόν να έχουν κύριο ρόλο στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης. Δημιουργείται έτσι ένας ανατροφοδοτικός κύκλος μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης. (Pattanaik et al).



Εικόνα 1: Επίδραση παραγόντων στην εκδήλωση ενός πολυπαραγοντικού νοσήματος (προσαρμογή από Allanore et al).

1.5 Γενετικοί παράγοντες που εμπλέκονται στη αιτιοπαθογένεια της νόσου

Ήδη από τις προηγούμενες δεκαετίες υπήρχαν ενδείξεις και υποψίες ότι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τις επιβεβαίωσαν, καθώς έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε οικογένειες με ιστορικό, κυμαίνεται από 1,5% έως 1,7% σε σύγκριση με 0,026% που παρατηρείται στον γενικό πληθυσμό (Yangyang et al). Επιπλέον, έρευνες σε οικογένειες έδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι 3.07 (95% ΔΕ, 1.25-7.57) σε συγγενείς 1^{ου} βαθμού ασθενών και 2.14 σε συγγενείς σε 3^{ου} βαθμού (95% ΔΕ, 1.16-3.95). Το γεγονός

αυτό αποτελεί μια ένδειξη υπέρ της γενετικής βάση της νόσου, ταυτόχρονα όμως αυτή η οικογενής συσχέτιση μπορεί να σχετίζεται και με την έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Allanore et al).

Όσον αφορά τη δράση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εκδήλωση της νόσου, έχει προταθεί ότι αυτοί διαταράσσουν τη φυσιολογική ανοσολογική ανοχή του οργανισμού μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και επάγουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων μέσω του μοριακού μιμητισμού (Yang et al). Ο μοριακός μιμητισμός είναι ένας προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο οι λοιμώξεις μπορούν να πυροδοτήσουν την αυτοανοσία (Cusick et al). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη θεωρία, το ανοσοποιητικό σύστημα, λόγω της ομοιότητας εξωγενών αντιγόνων με ενδογενείς πρωτεΐνες και άλλα μόρια, καταλήγει να δημιουργεί αντισώματα που στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών του ίδιου του οργανισμού (αυτό-αντιγόνα) (Cusick et al).

Η συστηματική σκλήρυνση, ως πολυπαραγοντικό νόσημα δεν ακολουθεί Μενδελική κληρονομικότητα. Είναι μία πολύπλοκη ασθένεια, η εμφάνιση και οι κλινικές εκδηλώσεις της οποίας επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση πολλαπλών γενετικών τόπων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Θεωρείται πως κάθε γονίδιο που εμπλέκεται στην εκδήλωση της νόσου ασκεί μικρή δράση στο φαινότυπο και δρα αθροιστικά με τα υπόλοιπα. Η δράση αυτή μπορεί να αφορά προστατευτική δράση ή την αύξηση του κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου. (Allanore et al).



Εικόνα 1: Επίδραση διαφορετικών παραγόντων στην εκδήλωση ενός πολυπαραγοντικού νοσήματος

Μια σειρά μελετών σε ευρωπαϊκούς και αμερικάνικους πληθυσμούς ασθενών έχει αναδείξει πάνω από πενήντα γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την συστηματική σκλήρυνση. Η ισχυρότερη γενετική προδιάθεση για την εκδήλωση και πρόοδο της ασθένειας έχει φανεί πως αφορά γονίδια της επίκτητης και έμφυτης ανοσίας, όπως για παράδειγμα γονίδια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) και γονίδια ιντερφερονών, αλλά και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διεργασία της ίνωσης (π.χ. TGF) και της φλεγμονής, γονίδια αυξητικών παραγόντων (π.χ. CTGF), γονίδια που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών (π.χ. PXX) καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διακυτταρική σηματοδότηση (π.χ. NOTCH4). Επιπλέον σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών και μεταλλαγών που σχετίζονται με τη νόσο έχουν βρεθεί σε περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστική δράση, δηλαδή περιοχές που δέχονται επιγενετική τροποποίηση ή συμμετέ-

χουν σε αυτή όπως για παράδειγμα γενετικές περιοχές που μεταγράφονται σε μικρά ρυθμιστικά RNAs. (Allanore et al, Dieudé et al, Radstake et al, Martin et al, Salazar et al).

Συνολικά, μέχρι σήμερα, περίπου το 88% των πολυμορφισμών και μεταλλαγών που εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση έχουν βρεθεί σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος. Οι περιοχές αυτές περιλαμβάνουν ρυθμιστικά στοιχεία (υποκινητές, ενισχυτές, αποσιωποητές) και ιντρόνια που επιδέχονται εναλλακτικό μάτισμα (Salazar et al).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα μοιράζονται κοινές μεταλλαγές γονιδίων, καθώς πολλές από τις διάφορες παραλλαγές που συναντώνται σε ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο εμφανίζονται σε παραπάνω από μία αυτοάνοσες διαταραχές. Η εμφάνιση διαφορετικών αυτοάνοσων νοσημάτων σε οικογένειες αλλά και η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων αυτοάνοσων νοσημάτων σε ένα άτομο είναι παράγοντες που υποστηρίζουν την ύπαρξη κοινού γενετικού υπόβαθρου (Pearce et al).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, διαπιστώθηκε ότι 38% των ασθενών είχαν δύο ή παραπάνω αλληλεπικαλυπτόμενα αυτοάνοσα νοσήματα, με τα συχνότερα να είναι η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjorgen. Όσον αφορά την οικογενή ομαδοποίηση των αυτοάνοσων ασθενειών το 36% των συγγενών 1ου βαθμού είχαν τουλάχιστον ένα αυτοάνοσο νόσημα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι αυτοάνοσες ασθένειες μοιράζονται κοινούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου (Allanore et al).

1.6 Τύποι γενετικών μελετών

Παρά την επιβεβαιωμένη ύπαρξη γενετικού υποβάθρου, εξαιτίας των πολλαπλών γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην εκδήλωση της ασθένειας αλλά και της μεγάλης φαινοτυπικής ετερογένειας είναι δύσκολη η επανάληψη αποτελεσμάτων μελετών σύνδεσης. Ένα άλλο στοιχείο που δυσκολεύει τις έρευνες για την κατανόηση της ασθένειας είναι η έλλειψη ζωικού μοντέλου. Επομένως για τη καλύτερη μελέτη της γενετικής βάσης της νόσου απαιτούνται πιο συστηματικές προσεγγίσεις (Allanore et al).

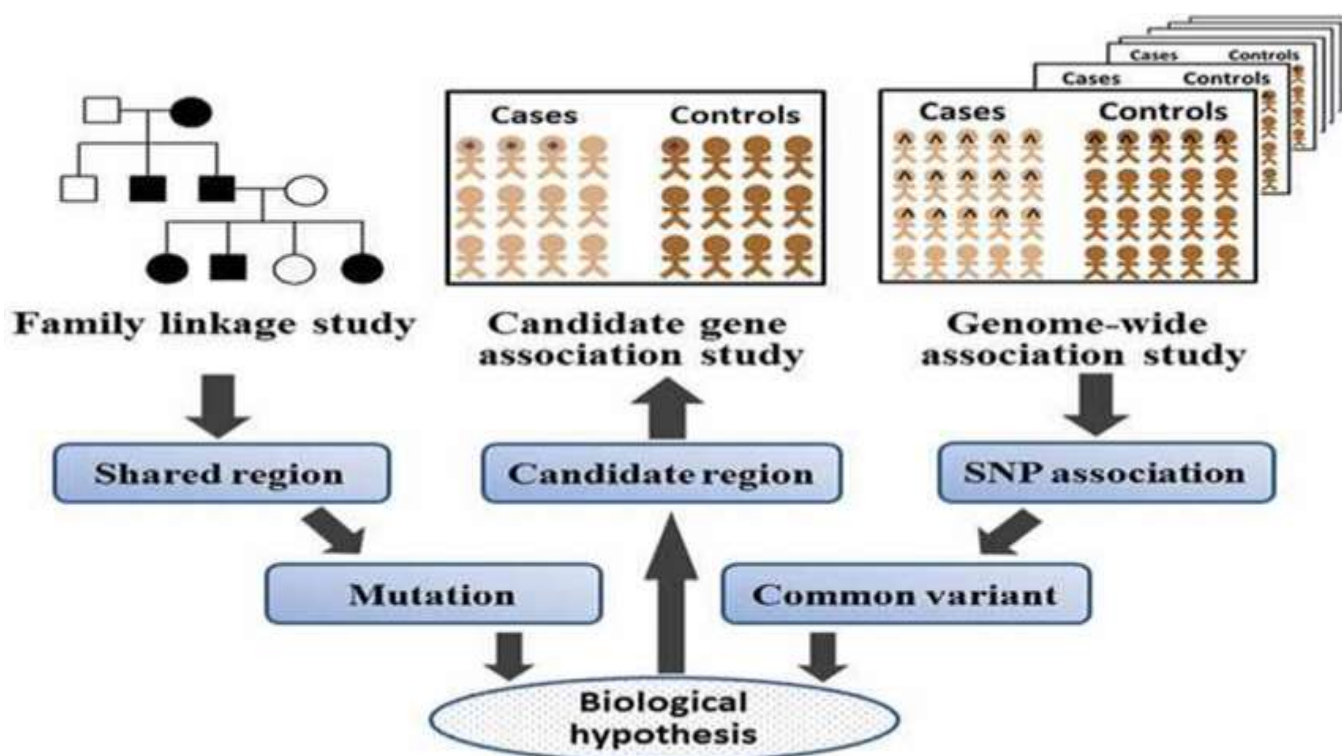
Η συστηματική σκλήρυνση ως πολυπαραγοντικό νόσημα δεν ακολουθεί μενδελική κληρονομηση, όμως θετικό οικογενειακό ιστορικό εμφάνισης της αυξάνει τον σχετικό κίνδυνο (RR) 15-19 φορές στα αδέρφια και 13-15 στους συγγενείς 1ου βαθμού. Επιπλέον μελέτες σε οικογένειες έδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι 3.07 (95% ΔΕ, 1.25-7.57) σε συγγενείς σε 1ου βαθμού ασθενών οι οποίοι είχαν προδιάθεση εμφάνισης του φαινομένου του Reynaud και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων και 2.14 σε συγγενείς σε 3ου βαθμού (95% ΔΕ, 1.16-3.95) (Yang et al).

Έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής μία μελέτη σε δίδυμα, όπου η συχνότητα εμφάνισης της νόσου δεν διέφερε σημαντικά σε μονοζυγωτικά (4,2%) και διζυγωτικά (5,6%). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση για την ασθένεια, που όμως δεν είναι όμως ικανή από μόνη της να οδηγήσει στην εμφάνισή της (Allanore et al).

Ως επί το πλείστον η πιο συχνή παραλλαγή στο DNA αφορά την αντικατάσταση μίας νουκλεοτιδικής βάσης από μία άλλη. Η αλλαγή αυτή έχει καθιερωθεί να αναφέρεται ως σημειακός μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός ή SNP (single nucleotide polymorphism). Η διαφορετική αλληλουχία που προκύπτει ως αποτέλεσμα της παρουσίας του SNP μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στο τελικό προϊόν του γονιδίου ή στην έκφρασή του. Για την ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών που σχετίζονται με πολυπαραγοντικά νοσήματα όπως η συστηματική σκλήρυνση ακολουθούνται συνήθως δύο ειδών προσεγγίσεις που βασίζονται στο χαρακτηρισμό SNP και προσδιορίζουν την πιθανότητα εμφάνισης του στους ασθενείς σε σχέση με μια ομάδα υγιών ατόμων που ορίζεται ως ομάδα ελέγχου

Ο πρώτος τύπος μελέτης, η προσέγγιση σε επίπεδο ολικού γονιδιώματος ή Genome Wide Association Study (GWAS) αφορά τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος ασθενών και υγιών μαρτύρων. Αρχικά, δημιουργείται το γενετικό προφίλ ασθενών, πάντα σε σχέση με υγιείς με τον προσδιορισμό ενός μεγάλου (500.000-2.000.000) αριθμού SNPs χωρίς να υπάρχει εκ των προτέρων υπόθεση για το αν σχετίζονται με την ασθένεια. Συνεπώς, είναι μια αντικειμενική μέθοδος η οποία δεν προϋποθέτει την ύπαρξη φυσιολογικής υπόθεσης και παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης νέων γενετικών τόπων και πολυμορφισμών, για τους οποίους δεν υπήρχαν κατ'ανάγκη υποψίες συσχέτισης τους με την ασθένεια. Όμως με την προσέγγιση αυτή μελετώνται και SNPs σε ανισοροπία σύνδεσης (LD) με άλλα, οπότε υπάρχει δυσκολία στην ταυτοποίηση του αιτιατού και του ψευδούς SNP. Η ανισοροπία σύνδεσης αναφέρεται στην περίπτωση που η συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων συνδυασμών αλληλομόρφων σε φάση σύζευξης, σε δύο ή περισσότερους γενετικούς τόπους, είναι μεγαλύτερη από την τυχαίως αναμενόμενη βάση της συχνότητας των αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Οπότε, είναι πιθανό γονίδια που δεν σχετίζονται με την ασθένεια να εμφανίζουν θετική συσχέτιση επειδή βρίσκονται σε ανισοροπία σύνδεσης με εκείνα που όντως σχετίζονται με τη νόσο. Άλλα μειονεκτήματα της προσέγγισης αυτής είναι το σχετικά υψηλό κόστος και η ανάγκη για μελέτη μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επιπλέον, είναι πιθανό να μην συμπεριληφθούν στη μελέτη σπάνια αλληλόμορφα ($MAF < 0.1\%$) λόγω της κάλυψης που παρέχει κάθε πλατφόρμα γονοτύπησης που χρησιμοποιείται για την ανάλυση.

Ο δεύτερος τύπος μελέτης, Candidate Gene Approach (μελέτη υποψηφίου γονιδίου), αφορά την εξέταση συγκεκριμένων SNPs σε καθορισμένους από πριν γενετικούς τόπους. Στη περίπτωση μια τέτοιας μελέτης προηγείται η διατύπωση μιας φυσιολογικής υπόθεσης σχετικά με τον πιθανό ρόλο που μπορεί να παίζει ο γενετικός τόπος υπό εξέταση με το χαρακτηριστικό που μελετάται. Έτσι, ο γενετικός τόπος που μελετάται, επιλέγεται βάση της συσχέτισης του με άλλα αυτοάνοσα ή γιατί είναι μέρος μονοπατιών που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της ασθένειας. Από αυτό πηγάζει ένα από τα πλεονεκτήματα της προσέγγισης, το ότι είναι δυνατή η μελέτη SNP με γνωστή λειτουργία. Με αυτή τη μέθοδο έχουν ταυτοποιηθεί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για την συστηματική σκλήρυνση και έχουν συσχετιστεί με διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους. Οι μελέτες αυτές όμως περιορίζονται από το μικρό αριθμό δειγμάτων γεγονός που συμβάλει στη μικρή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που προκύπτουν (Pers et al).

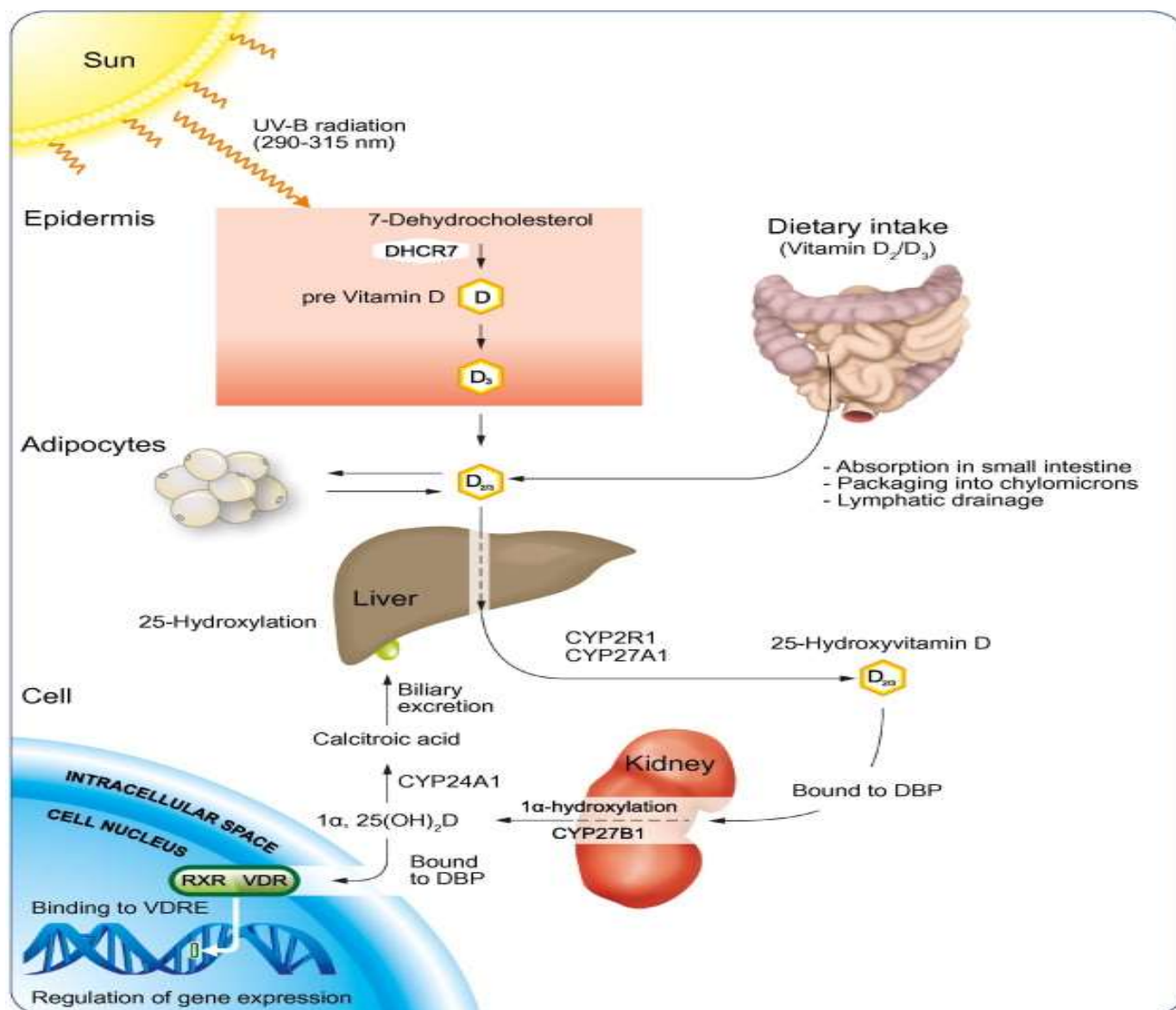


1.7 Βιταμίνη D- γενικά στοιχεία

Η βιταμίνη D ανήκει στην κατηγορία των λιποδιαλυτών βιταμινών. Ο όρος βιταμίνη D αφορά μια σειρά ενώσεων με κύριους εκπροσώπους την εργοκαλσιφερόλη και τη χοληκαλσιφερόλη. Ένα μέρος της βιταμίνης D στον άνθρωπο προέρχεται από τη δίαιτα, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της συντίθεται από τη 7 δευδροξυ-χοληστερόλη στο δέρμα μετά από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η βιταμίνη D που παράγεται στο δέρμα θεωρείται ως μια προ-ορμόνη. Στο ήπαρ, η βιταμίνη D υδροξυλιώνεται σε 25-υδροξυβιταμίνη D ενώ η βιοδραστική μορφή της 1,25 διυδροξυβιταμίνη D (1,25(OH)2D3) ή βιταμίνη D3 παράγεται μετά από μια δεύτερη υδροξυλίωση στη θέση -1 η οποία πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στους νεφρούς και δευτερευόντως στον πλακούντα καθώς και σε κοκκιωματώδεις ιστούς. Σε όλα τα βήματα της σύνθεσης της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D εμπλέκονται μια σειρά από διαφορετικά ένζυμα. Τα επίπεδα της 1,25(OH)2D3 υπολογίζονται περίπου στο 1/1000 αυτών της 25 (OH)D. Η 1,25(OH)2D3 αποτελεί την ενεργό μορφή του μορίου και παίζει κύριο ρόλο στο μεταβολισμό του ασβεστίου. Δρα κυρίως αυξάνοντας την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο και είναι έτσι απαραίτητη κατά την ασβεστοποίηση του οστού (Takeyama et al).

Στο αίμα, η βιταμίνη D κυκλοφορεί συνδεδεμένη με την VDB (vitamin D binding protein), μια ειδική πρωτεΐνη μεταφορέα, ενώ στους ιστούς στόχους ασκεί τη δράση της αφού συνδεθεί στον ενδοκυττάριο υποδοχέα της (VDR) , ο οποίος με τη σειρά του σχηματίζει σύμπλοκο με τον RXRA. Το σύμπλοκο τελικά μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας προάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση διάφορων γονιδίων στόχων. Η δράση αυτή ασκείται μέσω πρόσδεσης σε αλληλουχίες γενετικού υλικού που είναι γνωστές ως στοιχεία ανταπόκρισης στη βιταμίνη D (Vitamin D response elements ή VDREs). Τα στοιχεία αυτά ανακαλύφθηκαν σχετικά πρόσφατα και πρόκειται για επαναλήψεις συγκεκριμένων αλληλουχιών που βρίσκονται διάσπαρτες στο γενετικό υλικό, κοντά σε πολλά διαφορετικά γονίδια.

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ιστών, γεγονός που υποδεικνύει την πλειοτρόπο δράση που ασκεί η βιταμίνη D στον ανθρώπινο. Σήμερα είναι γνωστό πως συμμετέχει, η σημαντικότερη όμως και καλύτερα μελετημένη δράση της παραμένει η ρύθμιση της ομοιοστασίας του ασβεστίου. Είναι γνωστό πως η έλλειψη βιταμίνης σε παιδιά μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ραχίτιδας, ενώ στους ενήλικες καλύτερα μελετημένες επιπτώσεις της έλλειψης της είναι η εμφάνιση οστεομαλακίας και οστεοπόρωσης (Malloy et al).



Εικόνα 4: Σύνθεση, απορρόφηση, μεταβολισμός και δράση της βιταμίνης D3.

1.8 Βιταμίνη D- ανοσορυθμιστικός ρόλος

Εκτός από τον καλά μελετημένο ρόλο της ως ρυθμιστή της ομοιοστασίας του ασβεστίου, τα τελευταία χρόνια, έχει αναδειχθεί ο ρόλος της βιταμίνης D σε μια πληθώρα άλλων φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού. Ειδικότερα, πιο πρόσφατα έχει έρθει στο προσκήνιο ο ρόλος αυτού του πλειοτρόπου μορίου και στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, με πλήθος μελετών να διερευνούν την επίδραση της σε μια σειρά από νοσήματα που σχετίζονται με διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος. Το πρώτο στοιχείο υπέρ της συμμετοχής της βιταμίνης D στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι το γεγονός πως ο υποδοχέας της εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε κάθε τύπο κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος (Uitterlinden et al). Επιπλέον, πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως συγκεκριμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν από μόνοι τους την ενεργό μορφή της βιταμίνης D (Kostner et al, Feng et al). Τα τελευταία χρόνια, με βάση αυτή τη γνώση διεξήχθησαν μια σειρά από μελέτες που αφορούσαν στη χορήγηση βιταμίνης σε ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες νόσους, όπως διαβήτης τύπου 1, σκλήρυνση κατά πλάκας, ρευματοειδή αρθρίτις.

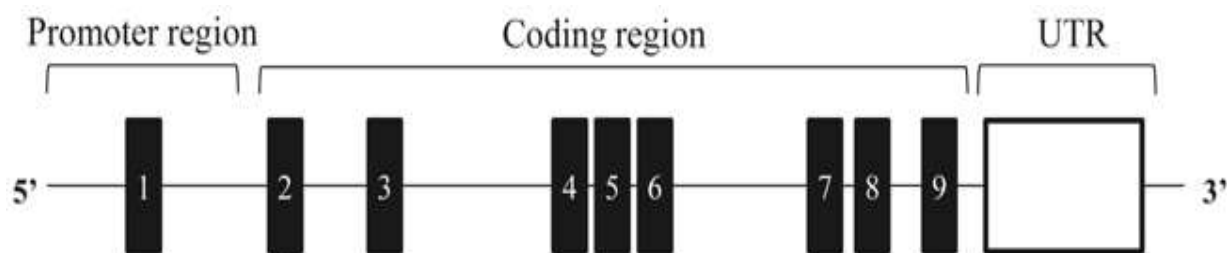
τιδα κ.α. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών σε πολλές περιπτώσεις έδειξαν πως οι ασθενείς ωφελήθηκαν από τη χορήγηση βιταμίνης D ενώ αντίθετα σε άλλες μελέτες δεν φάνηκε καμία επίδραση της χορήγησης αυτής στη πορεία της υπό μελέτη νόσου (Monticcielo et al, Mun et al). Η συστηματική διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της πρόσληψης βιταμίνης D και της ανάπτυξης και εκδήλωσης αυτοανοσίας είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς οι μετρήσεις της διαιτητικής πρόσληψης και της έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία συχνά βασίζονται σε εκτιμήσεις. Ως εκ τούτου, έχει επιλεγεί σε αρκετές μελέτες η προσέγγιση της μέτρησης των επιπέδων 1,25(OH)2D3 του ορού και της συσχέτισης τους με την εκδήλωση αλλά και τη βαρύτητα ορισμένων νοσημάτων. Αποτελέσματα από τέτοιες μελέτες έδειξαν πως σε πολλές περιπτώσεις οι ασθενείς είχαν χαμηλότερα επίπεδα 1,25(OH)2D3 στον ορό από τους υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον σε κάποιες περιπτώσεις φάνηκε πως οι ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα 25(OH)2D3 είχαν εντονότερη δραστηριότητα της νόσου καθώς και σοβαρότερες επιπλοκές. Ωστόσο ένα βασικό μειονέκτημα που χαρακτηρίζει τέτοιου τύπου μελέτες είναι πως βασίζονται κυρίως σε επιδημιολογικά δεδομένα και απλώς φανερώνουν μια συσχέτιση, χωρίς να είναι σε θέση να διαφωτίσουν τον φυσιολογικούς και παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς πίσω από την παρατηρούμενη συσχέτιση των επιπέδων της με την εκδήλωση αυτοανοσίας. Επιπροσθέτως, ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα τέτοιων μελετών ειδικά στον ελληνικό πληθυσμό είναι η έλλειψη ενός ενιαίου και διεθνώς πιστοποιημένου συστήματος μέτρησης των επιπέδων 25(OH)2D3 στον ορό, με αποτέλεσμα πολλές φορές διφορούμενα και αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα.

1.9 Γενετικοί τόποι σχετικοί με τη βιταμίνη D

Με τον όρο γενετικοί τόποι σχετικοί με την βιταμίνη, ορίζονται γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απορρόφηση, τη σύνθεση, το μεταβολισμό και τη δράση της βιταμίνης D. Για τις ανάγκες της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν έντεκα τέτοια γονίδια, τα οποία αναλύονται παρακάτω:

1) VDR (Vitamin D Receptor)

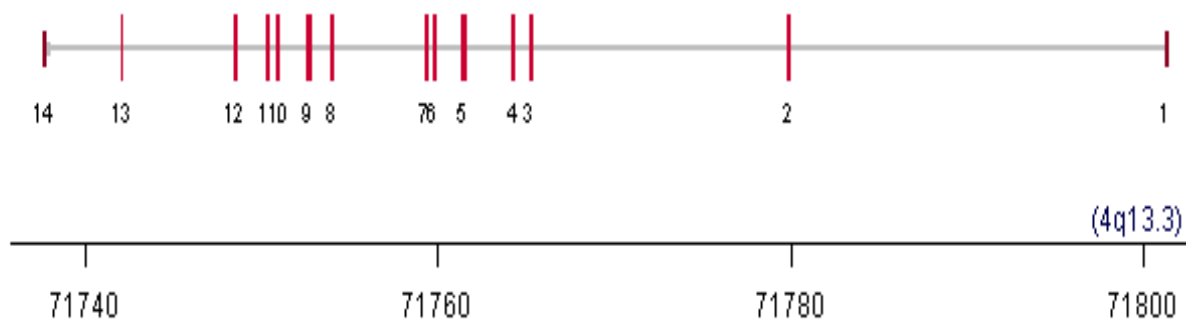
Ο VDR, ο υποδοχέας της βιταμίνης D είναι ένας υποδοχέας στεροειδών ορμονών που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αφού συνδεθεί με το πρόσδεμα του μεταναστεύει στο πυρήνα όπου και ασκεί τη δράση του το σύμπλοκο υποδοχέα-βιταμίνης D, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων στόχων (Mora et al). Ο VDR εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Για τη λειτουργία του συμπλόκου, ως μεταγραφικού παράγοντα απαιτείται η αναγνώριση συγκεκριμένων στοιχείων στο γονίδιο, τα οποία βρίσκονται σε πολλούς γενετικούς τόπους, υποδεικνύοντας την πλειοτρόπο και πολυπαραγοντική ρυθμιστική δράση της βιταμίνης D (Mora et al). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον VDR εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 και συγκεκριμένα στη περιοχή 12q13.11. Όσον αφορά τη δομή του, αποτελείται από 9 εξόνια και 8 ιντρόνια (Miyamoto et al). Ένας μεγάλος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών έχει ανευρεθεί σε όλο το μήκος του γονιδίου καθώς και στις μη κωδικές περιοχές εκατέρωθεν του γονιδίου (McGrath et al). Ορισμένοι από αυτούς τους σημειακούς πολυμορφισμούς στο γονίδιο του VDR έχουν συσχετιστεί με ανεπάρκεια βιταμίνης D αλλά και με μια σειρά από νοσήματα, όπως η οστεομαλακία σε ενήλικες και η ραχίτιδα σε παιδιά (Wang et al). Πιο πρόσφατα, πολυμορφισμοί στο γενετικό τόπο του VDR έχουν συσχετιστεί σε έναν μεγάλο αριθμό μελετών και με νοσήματα όπως η πολλαπλή σκλήρυνση (σκλήρυνση κατά πλάκας), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η αυτοάνοση θυρεοειδοπάθεια, ο διαβήτης τύπου 1 αλλά και διάφορες μορφές καρκίνου (Li et al, Signorello et al, Peelen et al, Lee et al,).



Εικόνα 5: Χάρτης του γονιδίου VDB (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

2) VDB /CG (Vitamin D Binding Protein)

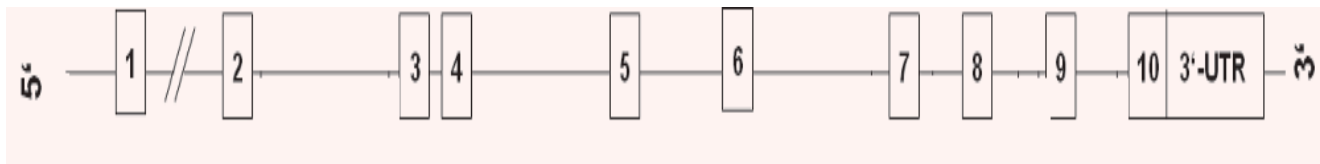
Ο VDB (vitamin D binding protein ή gc-globulin), ο μεταφορέας της βιταμίνης D είναι μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη μεταφορέας που ανήκει στην οικογένεια της αλβουμίνης. Στο αίμα συνδέεται με τις διάφορες μορφές της βιταμίνης D. Μεταφέρει τις πρόδρομες μορφές της βιταμίνης D3 από το ήπαρ προς τους νεφρούς, ενώ είναι επίσης υπεύθυνη για την μεταφορά της ενεργού βιταμίνης D3 στους διάφορους ιστούς του σώματος όπου και ασκεί τη δράση της (). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την VDB βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και συγκεκριμένα στη περιοχή 4q13.3. Όσον αφορά τη δομή του, το γονίδιο της VDB αποτελείται από 14 εξώνια και 13 ιντρόνια. Ένας μεγάλος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών έχει βρεθεί σε όλο το μήκος του γονιδίου CG, ενώ ορισμένοι από αυτούς έχουν συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα της βιταμίνης D3 στον ορό, μέσα από μια GWAS μελέτη (Nissen et al, Signorello et al).



Εικόνα 6: Χάρτης του γονιδίου VDB (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

3) RXRA (Retinoid X Receptor Alpha)

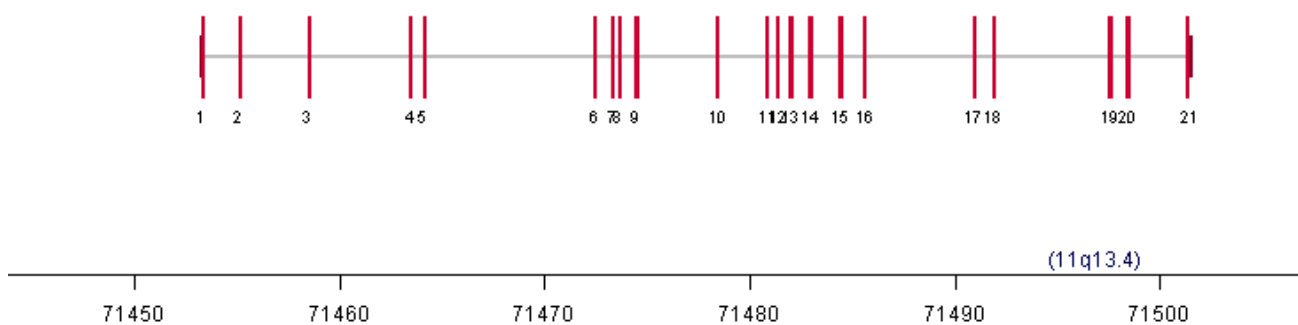
Ο RXRA είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας. Ανήκει σε μια οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων που ρυθμίζουν τη δράση ρετινοειδών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον RXRA εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 και συγκεκριμένα στη περιοχή 9q34.2. Αποτελείται από 10 εξώνια και 9 ιντρόνια. Εκτός από τη δράση του ως συμπαραγόντας του συμπλόκου VDR/D3 κατά τη της βιταμίνης, δρα επίσης και σε πλήθος άλλων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως για παράδειγμα η PPAR σηματοδότηση (Kliwer et al).



Εικόνα 7: Χάρτης του γονιδίου RXRA (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

4) NADSYN1 (NAD Synthetase 1)

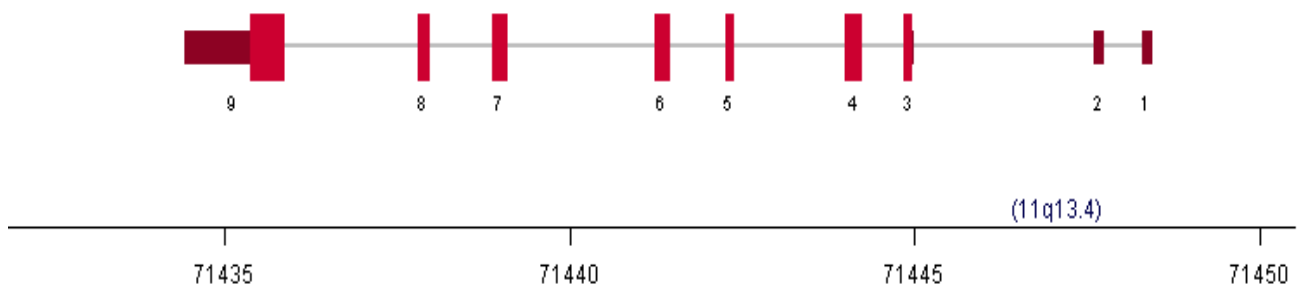
Το γονίδιο NADSYN1, κωδικοποιεί για την NAD Synthetase, μια πρωτεΐνη που καταλύει το τελικό βήμα της βιοσύνθεσης του NAD. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στη περιοχή 11q13.4, στην ίδια περιοχή με το γονίδιο DHCR7. Όσον αφορά τη δομή του, αποτελείται από 21 εξώνια και 20 ιντρόνια. Ένας μεγάλος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών έχει ανευρεθεί σε όλο το μήκος του γονιδίου.



Εικόνα 8: Χάρτης του γονιδίου NADSYN1 (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

5) DHCR7 (7-Dehydrocholesterol Reductase)

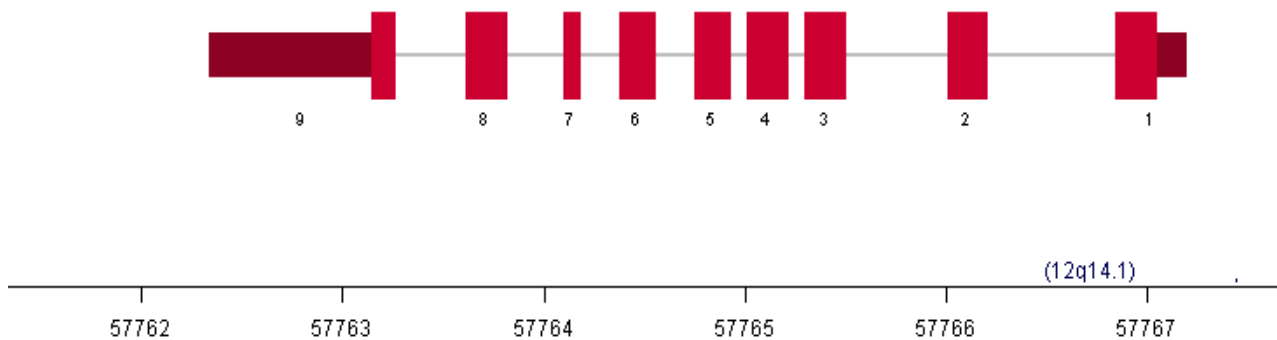
Η 7-Dehydrocholesterol Reductase είναι μια πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της χοληστερόλης καθώς καταλύει το τελικό βήμα στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Καθώς η βιταμίνη D παράγεται στο δέρμα από χοληστερόλη, η 7-Dehydrocholesterol Reductase είναι μόριο κλειδί στη σύνθεση της. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την DHCR7 εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στη περιοχή 11q13.4. Όσον αφορά τη δομή του, αποτελείται από 9 εξώνια και 8 ιντρόνια. Ένας μεγάλος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών έχει ανευρεθεί σε όλο το μήκος του γονιδίου, ενώ συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με προδιάθεση για την εκδήλωση του συνδρόμου Smith-Lemli-Opitz (Wassif et al).



Εικόνα 9: Χάρτης του γονιδίου DHCR7 (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

6) CYP27B1 (Cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1)

Το γονίδιο CYP27B1 κωδικοποιεί για μια από τις υπομονάδες του κυτοχρώματος 450, της ενζυμικής οικογένειας που εκτός άλλων λειτουργιών συμμετέχουν στην υδροξυλίωση της βιταμίνης D στο ήπαρ και στους νεφρούς. Λόγω του κεντρικού του ρόλου στη βιοσύνθεση της ενεργό μορφής της βιταμίνης D, θεωρείται μόριο ρυθμιστής των συγκεντρώσεων της D3 στον ορό. Εδράζεται στο 12^ο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στη περιοχή, ενώ ως προς τη δομή του αποτελείται από 9 εξώνια και 8 ιντρόνια. Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με ανεπάρκειες της βιταμίνης καθώς και εκδήλωση οστεομαλακίας και ραχίτιδας (Bailey et al).



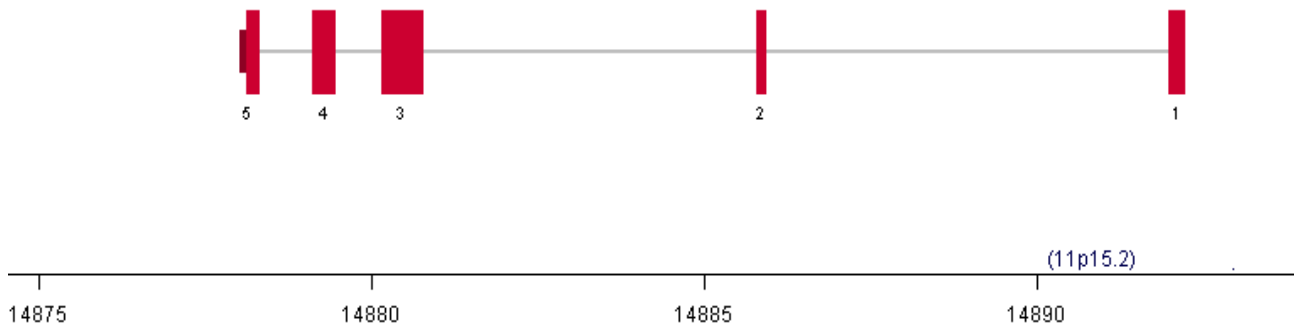
Εικόνα 10: Χάρτης του γονιδίου CYP27B1 (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

7) CYP24A1 (Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1)

Το γονίδιο CYP24A1 κωδικοποιεί για μια από τις υπομονάδες του κυτοχρώματος 450, της ενζυμικής οικογένειας που εκτός άλλων λειτουργιών συμμετέχουν στην υδροξυλίωση της βιταμίνης D στο ήπαρ και στους νεφρούς. Λόγω του κεντρικού του ρόλου στη βιοσύνθεση της ενεργό μορφής της βιταμίνης D, θεωρείται μόριο ρυθμιστής των συγκεντρώσεων της D3 στον ορό. Εδράζεται στο 20^ο χρωμόσωμα.

8) CYP2R1 (Cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1)

Το γονίδιο CYP2R1 κωδικοποιεί για μια από τις υπομονάδες του κυτοχρώματος 450, της ενζυμικής οικογένειας που εκτός άλλων λειτουργιών συμμετέχουν στην υδροξυλίωση της βιταμίνης D στο ήπαρ και στους νεφρούς. Εδράζεται στο 11^ο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στη περιοχή 11p 15.2, ενώ ως προς τη δομή του αποτελείται από 5 εξώνια και 4 ιντρόνια. Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με ανεπάρκειες της βιταμίνης καθώς και εκδήλωση οστεομαλακίας σε ενήλικες και ραχίτιδας σε παιδιά (Nissen et al)



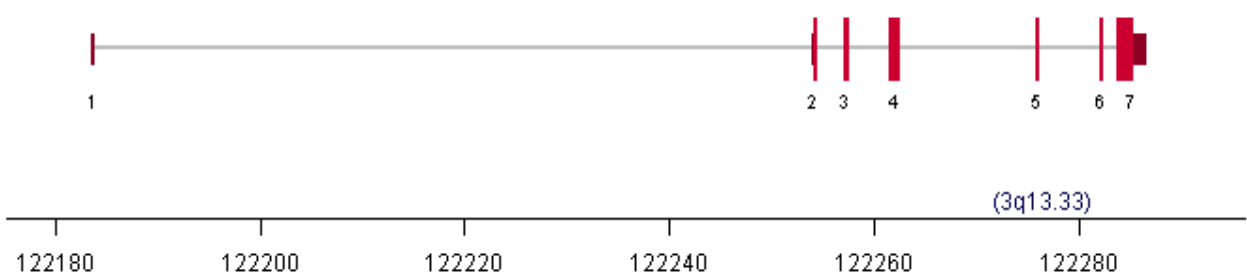
Εικόνα 11: Χάρτης του γονιδίου CYP2R1 (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

9) LRP2 (Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 2 / Megalin)

Το γονίδιο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη υποδοχέα, γνωστή και ως Megalin. Η LRP2 συμμετέχει σε μια πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με τη μεταφορά και την αποικοδόμηση λιποδιαλυτών ενώσεων. Εκτός των άλλων λειτουργιών της, συμμετέχει στην μεταφορά της βιταμίνης D που προσλαμβάνεται από τη τροφή (Kaseda et al).

10) CASR (Calcium Sensing Receptor)

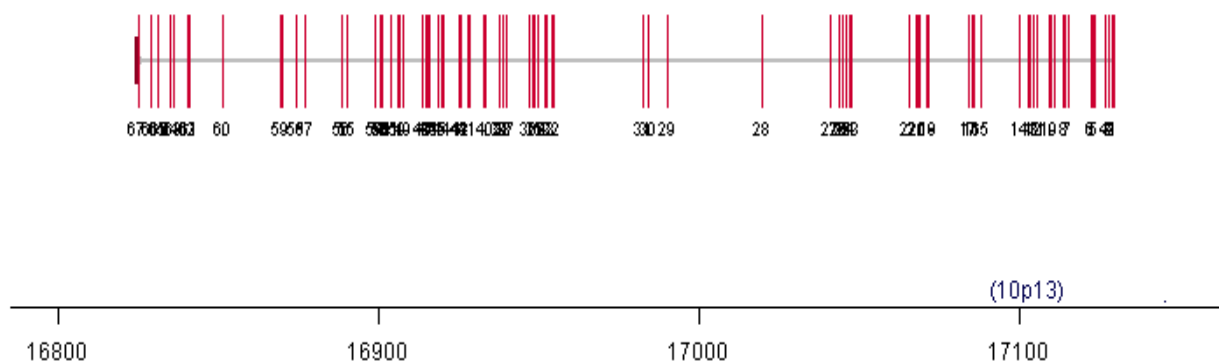
Το γονίδιο CASR κωδικοποιεί για τον Calcium Sensing Receptor, μια πρωτεΐνη συζευγμένη με που δρα ως αισθητήρας της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου και παίζει έτσι κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση των συνολικών επιπέδων ασβεστίου του οργανισμού. Μεταβολές στην έκφραση του επηρεάζουν και τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης D3, παίζοντας ρόλο αρνητικής ανατροφοδότησης. Ο Calcium Sensing Receptor εκφράζεται κυρίως στους παραθυροειδείς αδένες αλλά και στα νεφρικά σωληνάκια. Το γονίδιο CASR εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και συγκεκριμένα στη περιοχή 3q13.33-q21.1 και αποτελείται από 6 ιντρόνια και 7 εξώνια. Πολυμορφισμοί και μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στον μεταβολισμό του ασβεστίου (Aggarwal et al).



Εικόνα 12: Χάρτης του γονιδίου CASR (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

11) CUBN (Cubilin)

Το γονίδιο CUBN, κωδικοποιεί για την Cubilin, μια πρωτεΐνη λειτουργεί δεσμεύοντας τη βιταμίνη. Συμμετέχει επίσης στην εντερική απορρόφηση της βιταμίνης, οπότε διαταραχές στην έκφραση της έχουν συσχετιστεί με μειωμένη απορρόφηση της προσλαμβανόμενης με τη τροφή βιταμίνης D (Kaseda et al). Το γονίδιο CUBN, είναι ένα ιδιαίτερα μεγάλο γονίδιο, που αποτελείται από 67 εξώνια και 66 ιντρόνια και εδράζεται στο χρωμόσωμα 10, στη περιοχή 10p13.



Εικόνα 13: Χάρτης του γονιδίου CUBN (προσαρμογή από Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)

Σκοπός

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος γενετικών σημειακών πολυμορφισμών σε έντεκα γενετικούς τόπους σχετικούς με τη βιοσύνθεση και τη δράση της βιταμίνης D3, ως προς τα συνολικά επίπεδα της βιταμίνης D3 στον ορό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και υγείων μαρτύρων. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι συχνότητες των γονοτύπων των εν λόγω πολυμορφισμών σε ασθενείς και υγείς μάρτυρες προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσον ορισμένοι από αυτούς μπορεί να συσχετίζονται με προδιάθεση για την ανάπτυξη της νόσου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα ασθενών και υγίων μαρτύρων και στη συνέχεια διενεργήθηκε γονοτύπηση με την πλατφόρμα αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina. Η γονοτύπηση αφορούσε συνολικά τον προσδιορισμό περισσότερων από 650.000 πολυμορφισμών σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές ολόκληρου του γονιδιώματος. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά σε πολυμορφισμοί σε 11 γενετικούς τόπους. Τα δεδομένα από την γονοτύπηση αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής *Plink* 1.07 (Purcell et al).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα ασθενών με διάχυτο και εστιασμένο συστηματικό σκληρόδερμα που αναλυθήκαν, προήλθαν από την κλινική Ρευματολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλοι οι ασθενείς τηρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης που θεσπίστηκαν. Ως υγείς μάρτυρες ορίστηκαν άτομα μέσης ηλικίας που δεν πάσχουν από συστηματική σκλήρυνση ούτε και από κάποιο άλλο αυτοάνοσο νόσημα ή νεοπλασία. Όλα τα άτομα από τα οποία απομονώθηκε γενετικό υλικό και συμμετείχαν στη μελέτη, ενημερώθηκαν για τα στοιχεία της έρευνας με φόρμα συγκατάθεσης που εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

2.2 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Ολικό γενωμικό DNA απομονώθηκε από 120 συνολικά ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και 60 υγείς μάρτυρες. Η απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με kit της εταιρίας Macherey Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την απομόνωση του γενωμικού

DNA, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και έλεγχος της καθαρότητας του γενετικού υλικού με τη χρήση φωτομέτρησης.

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Για την επαλήθευση της ύπαρξης γενετικού υλικού στα προϊόντα της απομόνωσης DNA ηλεκτροφορήθηκαν 3μl προϊόντος σε πηκτή αгарόζης συγκέντρωσης 1%. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους έγινε με την παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (ladder) στην πηκτή κατά την ηλεκτροφόρηση. Η πηκτή αгарόζης παρασκευάζεται με την ανάμειξη αгарόζης με 40ml TAE 1× σύμφωνα με τον πίνακα 5 και θέρμανση του μείγματος μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια προστίθενται 1μl χρωστικής SERVA η οποία προσδένεται στο DNA και φωσφορίζει καθιστώντας δυνατή την παρατήρηση του DNA υπό υπεριώδες φως. Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου πολυμερίζεται και αποκτά το επιθυμητό σχήμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 volts για 20 λεπτά μετά το πέρας των οποίων ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα σε αгарόζη αλλάζει αναλόγως το μέγεθος των τμημάτων προς ηλεκτροφόρηση. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη 3μl loading buffer σε αυτά.

Loading buffer 6x

- Bromophenol blue 1ml 1% w/v
- TBE 20x 0,5ml
- Glycerol 5ml
- ddH₂O έως τα 10ml

Για την παρασκευή TAE 1× αραιώθηκαν 20 ml διαλύματος stock 50× με την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού σε τελικό όγκο 1L

TAE 50×

- Tris Base 121gr
- Acetic Acid 28,5ml
- EDTA 0,5M 50ml
- ddH₂O έως τα 500ml

2.4 Φωτομέτρηση

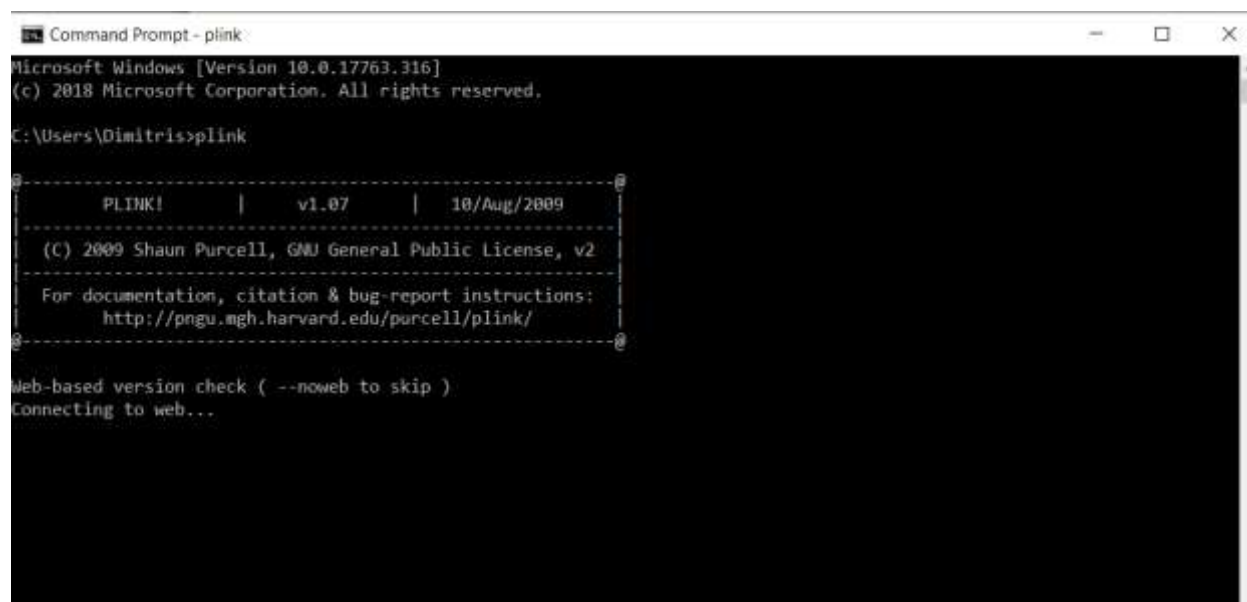
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των προϊόντων της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διέγερση των ηλεκτρονίων των μορίων των ουσιών που βρίσκονται στο διάλυμα προς φωτομέτρηση από μία δέσμη φωτός. Κατά την αποδιέγερσή τους τα μόρια απελευθερώνουν την ενέργεια που προσέλαβαν σε μορφή ακτινοβολίας. Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{max}) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση, για τα νουκλεϊκά οξέα είναι τα 260 nm, ενώ για τις πρωτεΐνες τα 280 nm. Αφού φωτομετρήθηκαν τα δείγματα προσδιορίστηκε ο λόγος A_{260nm} / A_{280nm} που δείχνει τη σχέση της συγκέντρωσης του DNA προς τις πρωτεΐνες στο προϊόν του καθαρισμού, η βέλτιστη τιμή του λόγου για διάλυμα DNA είναι 1,8. Για την φωτομέτρηση σε κυβελίδα χαλαζία προστέθηκαν 98μl νερό και 2μl προϊόν.

2.5 Γονοτύπηση

Μετά την φωτομέτρηση και τον καθαρισμό των δειγμάτων, 4-10 μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ειδικό plate 96 θέσεων. Κατά την διαδικασία αυτή, η ποσότητα που προστέθηκε από κάθε δείγμα υπολογίστηκε έτσι ώστε σε κάθε μία από τις 96 θέσεις του plate να υπάρχει τελικά γενετικό υλικό συγκέντρωσης τουλάχιστον 200 ng. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα δείγματα σταλθήκαν σε εταιρεία για την πραγματοποίηση γονοτύπησης με την πλατφόρμα αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina . Η συγκεκριμένη πλατφόρμα αλληλούχησης επιτρέπει τον προσδιορισμό >650.000 μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών σε όλο το μήκος του γονιδιώματος , περιλαμβάνοντας τόσο κωδικές όσο και μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος και επίσης καλύπτοντας έναν σημαντικό αριθμό σπάνιων (MAF<0.01) πολυμορφισμών.

2.6 Ποιοτική ανάλυση δεδομένων

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης αναλύθηκαν με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής και ειδικότερα με τη χρήση του προγράμματος Plink. Το Plink είναι μια εφαρμογή για την ανάλυση δεδομένων γονοτύπησης και τη πραγματοποίηση μελετών σε επίπεδο ολικού γονιδιώματος. Λειτουργεί σε περιβάλλον γραμμής εντολών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό έλεγχο αποτελεσμάτων γονοτύπησης και την πραγματοποίηση συσχετίσεων ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, επιτρέπει την ανάκτηση πληροφοριών για συγκεκριμένους πολυμορφισμούς όπως και την εστιασμένη ανάλυση τους.



```
Command Prompt - plink
Microsoft Windows [Version 10.0.17763.316]
(c) 2018 Microsoft Corporation. All rights reserved.
C:\Users\Dimitris>plink
-----
  PLINK!      |   v1.07   | 10/Aug/2009
-----
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
  http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----
Web-based version check ( --noweb to skip )
Connecting to web...
```

Εικόνα 14 : Περιβάλλον εργασίας του *Plink* v1.07

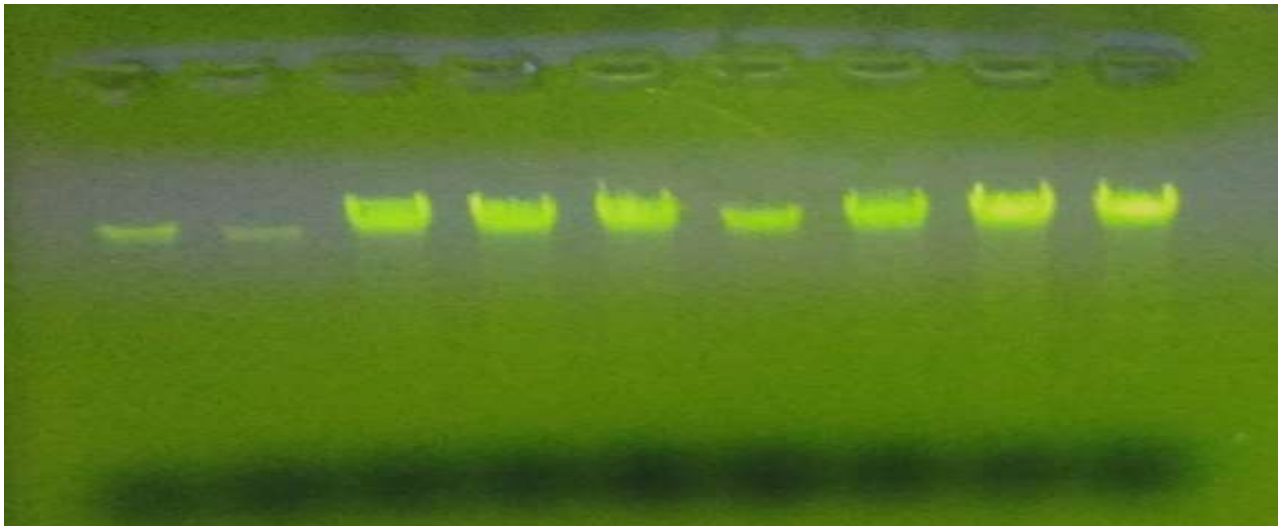
2.7 Στατιστική ανάλυση

Για την ανίχνευση συσχετίσεων ανάμεσα στις συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών υπό εξέταση και τους διαφορετικούς φαινοτύπους που μελετήθηκαν , δηλαδή την συστηματική σκλήρυνση και τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των συχνοτήτων του σπάνιου αλληλομόρφου (MAF) στους διαφορετικούς πληθυσμούς και στατιστική ανάλυση με χρήση της δοκιμασίας σημαντικότητας χ^2 κατά Pearson. Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του Plink (Purcell et al).

3.Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση ολικού DNA από περιφερικό αίμα

Για την εξακρίβωση της επιτυχίας της απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Ενδεικτικά, στην εικόνα παρατίθενται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της απομόνωσης ολικού DNA από ορισμένα δείγματα περιφερικού αίματος.



Εικόνα 15: Ενδεικτικά αποτελέσματα απομόνωσης DNA

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των προϊόντων της απομόνωσης έγινε φωτομέτρησή τους στα 260 nm όπου απορροφούν οι αζωτούχες βάσεις του DNA και στα 280 nm όπου απορροφούν οι αρωματικοί δακτύλιοι των πρωτεϊνών. Τα δείγματα που φωτομετρήθηκαν είχαν λόγο απορροφήσεων A_{260} / A_{280} γύρω στο 1,8 και τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 200ng/μl.

3.2 Γονοτύπηση

Για τη γονοτύπηση επιλέχθηκαν συνολικά 96 δείγματα και συγκεκριμένα 66 ασθενείς (29 με διάχυτο και 37 με εστιασμένο συστηματικό σκληρόδερμα) καθώς και 30 υγιείς μάρτυρες.

3.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής Plink v 1.07. Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας στα αρχικά αποτελέσματα με στόχο την εκκαθάριση δειγμάτων και πολυμορφισμών κακής ποιότητας γονοτύπησης. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο συγκεκριμένος έλεγχος, τεθήκαν συγκεκριμένα κατώφλια ποιότητας σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και αντίστοιχες αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, ως προς την ποιότητα γονοτύπησης των δειγμάτων, μη αποδεκτά θεωρήθηκαν αποτελέσματα αλληλούχησης με genotyping call <99%, ενώ ως προς τα αποτελέσματα της γονοτύπησης ανά πολυμορφισμό τέθηκε ως όριο το 90%. Επιπλέον δεν έγιναν αποδεκτά αποτελέσματα που βρέθηκαν να αποκλίνουν από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Μετά τον έλεγχο ποιότητας και την εφαρμογή των παραπάνω κριτηρίων, παρέμειναν διαθέσιμα προς ανάλυση συνολικά 95 άτομα (65 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και 30 υγιείς μάρτυρες) και 681.031 μονονουκλεοτιδικοί σημειακοί πολυμορφισμοί. Με τη χρήση του εργαλείου άντλησης δεδομένων Biomart της βάσης δεδομένων Ensembl και το πρόγραμμα Plink, έγινε επιλογή μόνο των πολυμορφισμών που περιείχονταν στο μήκος των 11 γονιδίων υπό εξέταση. Έτσι, συνολικά προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν 287 πολυμορφισμοί από τους 11 γενετικούς τόπους υπό εξέταση, όπως παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ
VDR	12	48
VDB	4	20
RXRA	9	26
NADSYN1	11	8
DCHR7	11	14
LRP2	2	61
CASR	3	30
CUBN	10	58
CYP24B1	12	8
CYP27A1	20	11
CYP2R	11	3
		Συνολικά= 287

Πίνακας 2 : Γονίδια και αριθμός πολυμορφισμών που αναλύθηκαν

3.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

A) Ασθενείς/ Υγιείς μάρτυρες

Για την ανάλυση ασθενών/ υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την γονοτύπηση 65 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση (29 με διάχυτο και 37 με εστιασμένο υπότυπο της νόσου) και 30 υγιών μαρτύρων. Συνολικά αναλύθηκαν 287 σημειακοί πολυμορφισμοί σε 11 γενετικούς τόπους σχετικούς με την βιταμίνη D. Για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν με τη χρήση του *Plink* οι συχνότητες των γονοτύπων και το MAF στον πληθυσμό των ασθενών και στον πληθυσμό των υγιών μαρτύρων. Ακολούθησαν ζευγαρωτές δοκιμασίες σημαντικότητας για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς.

Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω, ξεχωριστά για κάθε έναν από τους γενετικούς τόπους που μελετήθηκαν.

A1. VDR

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs181665806	C	0.3	0.4667	T	4.995	0.02542	0.4898
rs56382517	C	0.2385	0.25	T	0.02979	0.863	0.9394
rs11574129	T	0.2538	0.25	C	0.003216	0.9548	1.021
rs731236	G	0.2846	0.431	A	3.89	0.04857	0.5252
rs7975232	C	0.2923	0.35	T	0.6382	0.4244	0.7671
rs1544410	A	0.3308	0.2333	G	1.856	0.1731	1.624
rs2239185	G	0.1154	0.08333	A	0.4478	0.5034	1.435
rs142418811	G	0.3077	0.3	A	0.01145	0.9148	1.037
rs11574099	A	0.1154	0.2	G	2.411	0.1205	0.5217
rs2238140	C	0.3333	0.3667	T	0.2001	0.6546	0.8636

rs1540339	A	0.3	0.3	G	0	1	1
rs2239179	T	0.3077	0.45	C	3.642	0.05634	0.5432
rs121909793	G	0.2385	0.3667	A	3.355	0.06701	0.5409
rs145002466	C	0.03077	0.06667	T	1.312	0.2521	0.4444
rs200041268	C	0.4206	0.4167	T	0.002629	0.9591	1.016
rs121909794	A	0.2231	0.2667	G	0.4316	0.5112	0.7896
rs116886958	A	0.1615	0.2	G	0.4231	0.5154	0.7706
rs886441	C	0.1	0.1833	T	2.583	0.108	0.4949
rs2238138	C	0.2769	0.2833	T	0.008387	0.927	0.9687
rs3782905	A	0.06923	0.03333	G	0.9699	0.3247	2.157
rs121909797	G	0.09231	0.1	A	0.02832	0.8663	0.9153
rs2408876	G	0.5154	0.4167	A	1.602	0.2056	1.489
rs7297462	A	0.1385	0.15	G	0.04483	0.8323	0.9107
rs2853564	T	0.3385	0.2167	C	2.9	0.08859	1.85
rs12321826	C	0.4154	0.4167	A	0.000278	0.9867	0.9947
rs12721404	T	0.06154	0.03333	C	0.655	0.4183	1.902
rs11168284	A	0.1385	0.1	T	0.5503	0.4582	1.446
rs59128934	C	0.4769	0.3833	T	1.454	0.2278	1.467
rs4237855	T	0.08462	0.06667	C	0.1819	0.6698	1.294
rs11574029	T	0.03077	0.06667	C	1.312	0.2521	0.4444
rs12427078	G	0.3615	0.3333	T	0.1431	0.7053	1.133
rs58379944	T	0.3	0.2667	C	0.2218	0.6377	1.179
rs112884497	T	0.1462	0.2	G	0.8718	0.3505	0.6847
rs12721409	C	0.3923	0.4833	T	1.395	0.2375	0.6901
rs12581281	C	0.2538	0.15	T	2.571	0.1088	1.928
rs11574012	G	0.4308	0.3833	C	0.3803	0.5374	1.217
rs4516035	T	0.1308	0.2	C	1.521	0.2174	0.6018
rs11568820	C	0.0625	0.06667	T	0.01187	0.9132	0.9333
rs117860837	G	0.4	0.45	T	0.4225	0.5157	0.8148
rs11168302	A	0.2154	0.2333	C	0.07681	0.7817	0.902
rs7311030	G	0.4385	0.45	A	0.02216	0.8817	0.9543
rs7315992	A	0.06349	0.1333	C	2.522	0.1123	0.4407
rs4760670	A	0.06923	0.1333	G	2.071	0.1502	0.4835
rs12303561	T	0.1154	0.08333	C	0.4478	0.5034	1.435
rs7297624	G	0.3692	0.4667	A	1.624	0.2025	0.669
rs10875704	A	0.1308	0.15	G	0.1285	0.72	0.8525
rs145989923	A	0.2154	0.2667	G	0.6067	0.436	0.7549

Πίνακας 3: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του VDR

Όσον αφορά το γονίδιο του VDR γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 48 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 3. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης τα αποτελέσματα της δοκιμασίας χ^2 κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson, μόνο ένας πολυμορφισμός φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs731236, ο οποίος αφορά σε μια αντικατάσταση μιας βάσης αδενίνης από γουανίνη. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου για τον συ-

γκεκριμένο πολυμορφισμό στον πληθυσμό των υγιών ήταν γύρω στο 43% ενώ στον πληθυσμό των ασθενών υπολογίστηκε περίπου στο 28%. Σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία η παρουσία του σπάνιου αλληλομόρφου έχει συσχετιστεί με προστατευτικές δράσεις καθώς και αυξημένα επίπεδα της βιταμίνης D3 στον ορό.

A2. VDB

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs2070741	T	0.05385	0.01667	C	1.407	0.2356	3.358
rs705117	C	0.3	0.3833	T	1.297	0.2548	0.6894
rs2282679	C	0.2154	0.2333	T	0.07681	0.7817	0.902
rs222042	C	0.04615	0.03333	T	0.1673	0.6825	1.403
rs7041	A	0.03846	0.01667	G	0.6377	0.4246	2.36
rs16846943	C	0.2308	0.2	T	0.2257	0.6347	1.2
rs76803094	T	0.1077	0.15	C	0.6906	0.406	0.6839
rs139133782	A	0.1615	0.1667	G	0.007907	0.9291	0.9633
rs149023528	C	0.01538	0.06667	T	3.53	0.06026	0.2188
rs116134435	T	0.06923	0.1167	C	1.198	0.2738	0.5632
rs142840177	G	0.3538	0.45	T	1.604	0.2053	0.6693
rs75774690	A	0.007692	0.03333	G	1.737	0.1875	0.2248
rs116748421	C	0.4231	0.5333	T	2.01	0.1562	0.6417
rs222016	G	0.03077	0.08333	A	2.514	0.1129	0.3492
rs117925738	C	0.02308	0.01667	T	0.08185	0.7748	1.394
rs180820099	C	0.06154	0.01667	A	1.832	0.1759	3.869
rs1155563	G	0.06154	0.1167	A	1.716	0.1902	0.4965
rs72607829	A	0.02308	0.01667	G	0.08185	0.7748	1.394
rs3733359	G	0.3615	0.3333	T	0.1431	0.7053	1.133

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του VDB (GC)

Όσον αφορά το γονίδιο του VDB γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 20 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 4. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, δεν προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ($p < 0.05$) ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης.

A3. RXRA

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs11185647	G	0.1077	0.03333	A	2.943	0.08623	3.5
rs113865624	C	0.3	0.4	A	1.852	0.1735	0.6429
rs75619434	C	0.06923	0.1	T	0.5345	0.4647	0.6694
rs12339187	C	0.01538	0.06667	T	3.53	0.06026	0.2188
rs148774194	C	0.007692	0.01667	A	0.3174	0.5731	0.4574
rs192572518	C	0.4286	0.4333	T	0.00376	0.9511	0.9808
rs59211076	T	0.1	0.1346	G	0.455	0.5	0.7143
rs11185659	A	0.007692	0.03333	C	1.737	0.1875	0.2248
rs73663460	C	0.3077	0.3167	T	0.01544	0.9011	0.9591

rs28412613	T	0.4385	0.4333	G	0.004389	0.9472	1.021
rs116906088	A	0.1385	0.1167	C	0.1707	0.6795	1.217
rs113311097	T	0.05385	0.08333	C	0.6033	0.4373	0.626
rs114509195	T	0.2308	0.2833	C	0.6092	0.4351	0.7588
rs34835001	T	0.08462	0.15	C	1.863	0.1722	0.5238
rs78310111	A	0.1385	0.03333	C	4.817	0.02817	4.661
rs34208214	A	0.2077	0.2667	G	0.8154	0.3665	0.7209
rs75664280	A	0.3538	0.2667	G	1.419	0.2335	1.506
rs112935160	T	0.2923	0.1167	C	7.007	0.00812	3.127
rs35780541	T	0.3538	0.1897	C	5.118	0.02368	2.34
rs2234753	G	0.4923	0.45	A	0.2944	0.5874	1.185
rs7861779	T	0.3231	0.3167	G	0.007739	0.9299	1.03
rs2234960	T	0.4	0.4167	C	0.04731	0.8278	0.9333
rs1536475	C	0.4615	0.4667	T	0.004342	0.9475	0.9796
rs6413517	G	0.3769	0.4333	A	0.5468	0.4596	0.7911
rs35603635	G	0.03846	0.03333	A	0.03042	0.8615	1.16
rs4240711	G	0.1077	0.05	A	1.677	0.1953	2.293

Πίνακας 5 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του RXRA

Στη περίπτωση του γονιδίου του RXRA προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 26 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 26 πολυμορφισμούς προέκυψε ότι 3 πολυμορφισμοί παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές συχνότητες γονοτύπων στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου. Ο πρώτος πολυμορφισμός, με κωδικό rs78310111 αφορά σε μια αντικατάσταση G από A. Ο δεύτερος πολυμορφισμός με κωδικό rs112935160 είναι μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη και τέλος και ο τρίτος πολυμορφισμός με κωδικό rs35780541 αποτελεί επίσης μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη. Και οι τρεις πολυμορφισμοί εντοπίζονται σε ιντρονικές θέσεις.

A4. DCHR7

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs186924567	A	0.4385	0.4	G	0.2483	0.6183	1.171
rs77073138	C	0.2846	0.25	T	0.2475	0.6189	1.194
rs1044535	T	0.2769	0.2667	C	0.02172	0.8828	1.053
rs80338864	T	0.3615	0.25	C	2.323	0.1275	1.699
rs80338862	A	0.2923	0.2667	C	0.1327	0.7157	1.136
rs121909768	G	0.1	0.1833	A	2.583	0.108	0.4949
rs80338860	C	0.2308	0.1667	T	1.015	0.3137	1.5
rs121909764	T	0.3077	0.2	C	2.395	0.1217	1.778
rs80338857	T	0.2231	0.25	C	0.1672	0.6826	0.8614
rs80338856	C	0.2154	0.25	T	0.2809	0.5961	0.8235
rs80338853	G	0.1231	0.01667	A	5.706	0.01691	8.281
rs146867923	C	0.09231	0.05	T	1.011	0.3148	1.932
rs147394240	A	0.4769	0.4667	G	0.01732	0.8953	1.042
rs7928249	T	0.06923	0.03333	C	0.9699	0.3247	2.157

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του DCHR7

Στη περίπτωση του γονιδίου του DCHR7 προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 14 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 6. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 14 πολυμορφισμούς, μόνο ένας φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Συγκεκριμένα επρόκειτο για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs80338853, μια αντικατάσταση A από G. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 η συχνότητα στη περίπτωση των ασθενών έφτανε και ξεπερνούσε το 12% ενώ στη περίπτωση των υγιών μαρτύρων μόλις που ξεπερνούσε το 1%. Η διαφορά αυτή φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική με $p = 0.01691$. Ανατρέχοντας στη βάση δεδομένων Ensembl με στόχο την ανάκτηση πληροφοριών σχετικά με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, προκύπτει ότι πρόκειται για μια συνώνυμη μετάλλαξη, που οδηγεί σε αλλαγή στο 93^ο από τα 475 συνολικά αμινοξέα της πρωτεΐνης DCHR7. Η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλομόρφου (Global MAF) σύμφωνα με την Ensembl υπολογίζεται κάτω από 1% ενώ όπως προκύπτει από σχετική βιβλιογραφία έχει βρεθεί πως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση του συνδρόμου Smith-Lemli-Opitz (Wassif et al).

A5. NADSYN1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P
rs35588716	C	0.03175	0.05172	G	0.4332	0.5104
rs11233800	G	0.09231	0.1034	T	0.05749	0.8105
rs117345171	G	0.03077	0.08333	A	2.514	0.1129
rs184748544	T	0.3462	0.3333	C	0.02998	0.8625
rs3829251	C	0.2385	0.2667	A	0.1754	0.6753
rs117951834	C	0.2846	0.25	T	0.2475	0.6189
rs12286616	G	0.03077	0.05	T	0.4279	0.513
rs7950649	T	0.4769	0.5333	C	0.5226	0.4697

Πίνακας 7 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του NADSYN1

Όσον αφορά το γονίδιο του NADSYN1 γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 8 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 7. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, δεν προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης.

A6. LRP2

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs34564141	A	0.03077	0.08333	G	2.514	0.1129	0.3492
rs41268685	C	0.02308	0.05	T	0.973	0.3239	0.4488
rs116171923	A	0.03077	0.03333	G	0.008826	0.9252	0.9206

rs2075252	A	0.06923	0.1167	G	1.198	0.2738	0.5632
rs77568907	A	0.03077	0.01667	G	0.3186	0.5724	1.873
rs150384793	C	0.01538	0.03333	T	0.6417	0.4231	0.4531
rs2268375	A	0.007692	0.01667	G	0.3174	0.5731	0.4574
rs189806678	G	0.2615	0.4167	T	4.614	0.03171	0.4958
rs144081819	C	0.1077	0.08333	T	0.2707	0.6029	1.328
rs199806925	G	0.05385	0.01667	A	1.407	0.2356	3.358
rs2229265	T	0.4538	0.4167	C	0.2301	0.6315	1.163
rs143367996	A	0.2385	0.2333	G	0.005973	0.9384	1.029
rs200563635	A	0.3923	0.2667	G	2.839	0.09201	1.775
rs140272085	C	0.03846	0.01852	T	0.481	0.488	2.12
rs143920714	A	0.03226	0.03448	G	0.006135	0.9376	0.9333
rs79028167	C	0.03077	0.01667	T	0.3186	0.5724	1.873
rs35734447	T	0.01538	0.03448	C	0.7025	0.402	0.4375
rs28454851	A	0.01538	0.03333	G	0.6417	0.4231	0.4531
rs144594832	C	0.02308	0.01667	T	0.08185	0.7748	1.394
rs183171381	G	0.01538	0.03333	A	0.6417	0.4231	0.4531
rs61995915	G	0.03846	0.01667	A	0.6377	0.4246	2.36
rs35114151	T	0.03846	0.03333	C	0.03042	0.8615	1.16
rs10170902	A	0.02308	0.06667	G	2.198	0.1382	0.3307
rs4668124	T	0.01538	0.06667	G	3.53	0.06026	0.2188
rs148299415	G	0.1846	0.2167	A	0.2689	0.604	0.8186
rs138269726	C	0.1016	0.1667	A	1.613	0.2041	0.5652
rs4667596	T	0.007692	0.01667	C	0.3174	0.5731	0.4574
rs116456291	A	0.2385	0.25	G	0.02979	0.863	0.9394
rs144665535	C	0.01538	0.05	T	1.92	0.1659	0.2969
rs3821126	A	0.01538	0.03333	G	0.6417	0.4231	0.4531
rs143413559	C	0.2	0.2833	T	1.628	0.202	0.6324
rs2268365	T	0.2462	0.35	G	2.201	0.1379	0.6064
rs17848152	A	0.03846	0.05	G	0.1355	0.7128	0.76
rs145669628	T	0.03846	0.01667	C	0.6377	0.4246	2.36
rs114215601	T	0.007692	0.01667	C	0.3174	0.5731	0.4574
rs199627472	C	0.007692	0.01667	T	0.3174	0.5731	0.4574
rs181448146	C	0.1692	0.08621	T	2.248	0.1338	2.159
rs201115003	T	0.07692	0.08333	G	0.0232	0.8789	0.9167
rs143822500	A	0.2	0.15	C	0.6829	0.4086	1.417
rs142080405	A	0.2385	0.1833	G	0.7246	0.3946	1.395
rs76668605	T	0.02308	0.01667	C	0.08185	0.7748	1.394
rs116332504	A	0.01538	0.05	G	1.92	0.1659	0.2969
rs111360923	G	0.007692	0.03333	A	1.737	0.1875	0.2248
rs12991585	A	0.06154	0.1167	C	1.716	0.1902	0.4965
rs201080826	C	0.02308	0.05	T	0.973	0.3239	0.4488
rs831007	T	0.007692	0.01724	C	0.3475	0.5556	0.4419
rs73037817	A	0.08462	0.1167	G	0.4917	0.4832	0.6999
rs147110349	A	0.2846	0.3667	G	1.291	0.2559	0.6872
rs59457398	G	0.03077	0.05	A	0.4279	0.513	0.6032
rs830965	G	0.03125	0.01667	A	0.3356	0.5624	1.903
rs830968	T	0.1692	0.1667	G	0.001927	0.965	1.019

rs76514916	G	0.03077	0.03333	T	0.008826	0.9252	0.9206
rs2229263	T	0.5	0.4667	C	0.1825	0.6692	1.143
rs186568676	C	0.4846	0.4	T	1.184	0.2765	1.41
rs74846790	C	0.04615	0.01667	T	1.006	0.3159	2.855
rs13006076	C	0.4231	0.4167	T	0.00692	0.9337	1.027
rs3770636	G	0.03077	0.03333	A	0.008826	0.9252	0.9206
rs75193630	A	0.03125	0.01724	C	0.2994	0.5842	1.839
rs16856840	T	0.01538	0.03333	C	0.6417	0.4231	0.4531
rs11685268	T	0.02308	0.03333	C	0.1685	0.6814	0.685

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του LRP2

Όσον αφορά το γονίδιο του LRP2 γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί καθώς και οι συχνότητες των πολυμορφισμών φαίνονται στον πίνακα 8. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, μόνο ένας φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs189806678, μια αντικατάσταση T από G σε ιντρονική θέση.

A7. CASR

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs7646468	T	0.06923	0.05	C	0.2566	0.6125	1.413
rs113654054	A	0.2769	0.3	G	0.1075	0.743	0.8936
rs17282015	T	0.1231	0.15	G	0.2604	0.6098	0.7953
rs17282022	G	0.1077	0.15	A	0.6906	0.406	0.6839
rs75750177	C	0.02308	0.01667	T	0.08185	0.7748	1.394
rs193922420	T	0.03846	0.03333	C	0.03042	0.8615	1.16
rs199734455	G	0.007692	0.03333	A	1.737	0.1875	0.2248
rs193922441	G	0.007692	0.03333	A	1.737	0.1875	0.2248
rs193922442	G	0.03077	0.05	A	0.4279	0.513	0.6032
rs193922444	G	0.02308	0.01667	A	0.08185	0.7748	1.394
rs193922419	G	0.03125	0.01724	A	0.2994	0.5842	1.839
rs193922421	G	0.2615	0.4833	A	9.112	0.00254	0.3786
rs2202127	C	0.04615	0.06667	T	0.3464	0.5561	0.6774
rs4678173	C	0.02308	0.06667	T	2.198	0.1382	0.3307
rs17251221	A	0.03077	0.01667	C	0.3186	0.5724	1.873
rs193922422	T	0.007692	0.01667	G	0.3174	0.5731	0.4574
rs193922426	C	0.02308	0.06667	T	2.198	0.1382	0.3307
rs117375173	C	0.03077	0.01667	A	0.3186	0.5724	1.873
rs104893705	T	0.06923	0.03333	C	0.9699	0.3247	2.157
rs193922431	G	0.03077	0.03333	A	0.008826	0.9252	0.9206
rs139417576	G	0.04615	0.06667	A	0.3464	0.5561	0.6774
rs193922433	C	0.2846	0.2833	A	0.000332	0.9855	1.006
rs193922434	G	0.03077	0.05	A	0.4279	0.513	0.6032
rs193922435	C	0.03077	0.01667	T	0.3186	0.5724	1.873
rs193922436	T	0.02308	0.15	C	11.18	0.000828	0.1339
rs193922437	A	0.03846	0.08333	G	1.658	0.1979	0.44

rs121909269	C	0.04615	0.06667	T	0.3464	0.5561	0.6774
rs1801725	T	0.1077	0.1833	C	2.056	0.1516	0.5376
rs142704083	A	0.03077	0.05	C	0.4279	0.513	0.6032
rs1802757	A	0.04615	0.03333	G	0.1673	0.6825	1.403

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CASR

Όσον αφορά το γονίδιο του CASR γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 30 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 9. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται τα δυο αλληλόμορφα για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, καθώς και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας .Με βάση τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για τη συχνότητα των αλληλομόρφων του κάθε πολυμορφισμού, δυο από αυτούς φάνηκαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Ο πρώτος από τους πολυμορφισμούς, με κωδικό rs193922421, πρόκειται για μια αντικατάσταση G A που εδράζεται σε ιντρόνιο ενώ ο δεύτερος με κωδικό rs193922436 εδράζεται επίσης σε ιντρονική θέση.

A8. CUBN

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs3740169	T	0.2692	0.1833	C	1.651	0.1989	1.641
rs1801230	T	0.06154	0.05	C	0.1002	0.7516	1.246
rs12765044	T	0.3548	0.4423	C	1.189	0.2756	0.6935
rs703062	T	0.2846	0.25	C	0.2475	0.6189	1.194
rs703064	A	0.3077	0.3	G	0.01145	0.9148	1.037
rs780825	T	0.2923	0.2167	C	1.196	0.2741	1.493
rs780821	A	0.09231	0.06667	G	0.35	0.5541	1.424
rs1801239	G	0.08462	0.06667	A	0.1819	0.6698	1.294
rs2796833	T	0.2692	0.2	C	1.057	0.3039	1.474
rs45551835	A	0.01538	0.01667	G	0.004342	0.9475	0.9219
rs1801238	A	0.02308	0.01667	C	0.08185	0.7748	1.394
rs7099855	C	0.0873	0.01786	A	3.036	0.08145	5.261
rs796667	C	0.3077	0.2667	A	0.3324	0.5642	1.222
rs780807	T	0.1692	0.1833	C	0.05689	0.8115	0.9074
rs3740165	G	0.08462	0.01667	A	3.203	0.07349	5.454
rs144360241	C	0.007692	0.01667	T	0.3174	0.5731	0.4574
rs1687716	G	0.2538	0.2667	A	0.03526	0.8511	0.9356
rs10904839	C	0.1462	0.1667	T	0.1336	0.7148	0.8559
rs2883972	G	0.1615	0.08333	A	2.126	0.1448	2.119
rs2356587	C	0.4231	0.3	A	2.628	0.105	1.711
rs7897704	C	0.2462	0.2	T	0.4914	0.4833	1.306
rs7912716	T	0.1231	0.08621	C	0.5495	0.4585	1.488
rs11814420	T	0.4385	0.4	C	0.2483	0.6183	1.171
rs3847364	T	0.3692	0.4	C	0.1651	0.6845	0.878
rs7071576	A	0.2969	0.2667	G	0.1821	0.6696	1.161
rs12354787	T	0.09231	0.01667	C	3.685	0.0549	6
rs2942359	C	0.2385	0.3333	T	1.882	0.1701	0.6263

rs7079269	A	0.04615	0.03333	G	0.1673	0.6825	1.403
rs41335345	A	0.1538	0.05	G	4.161	0.04137	3.455
rs3012499	A	0.03846	0.08333	G	1.658	0.1979	0.44
rs59711315	T	0.1154	0.1	C	0.09884	0.7532	1.174
rs2291521	A	0.2231	0.25	G	0.1672	0.6826	0.8614
rs7900486	T	0.1923	0.1667	C	0.1796	0.6717	1.19
rs11592014	T	0.3385	0.3833	G	0.3621	0.5473	0.8231
rs7896819	C	0.4538	0.4	A	0.4838	0.4867	1.246
rs7897550	A	0.2077	0.3167	G	2.657	0.1031	0.5657
rs17139621	C	0.2077	0.3167	T	2.657	0.1031	0.5657
rs2137425	A	0.03846	0.06667	C	0.7237	0.3949	0.56
rs11254336	C	0.4846	0.4167	A	0.7623	0.3826	1.316
rs7894639	C	0.07692	0.08333	T	0.0232	0.8789	0.9167
rs76600859	A	0.04615	0.03333	G	0.1673	0.6825	1.403
rs1801228	G	0.05385	0.05	A	0.01218	0.9121	1.081
rs73600135	A	0.05385	0.03333	G	0.3828	0.5361	1.65
rs17139719	A	0.08462	0.05	C	0.7207	0.3959	1.756
rs1907358	C	0.1308	0.15	T	0.1285	0.72	0.8525
rs2172080	C	0.2846	0.3833	A	1.852	0.1736	0.64
rs138083522	T	0.007692	0.03333	C	1.737	0.1875	0.2248
rs76021360	A	0.04615	0.03448	G	0.1341	0.7142	1.355
rs11254362	T	0.4308	0.3333	C	1.624	0.2025	1.514
rs41289311	A	0.05385	0.03333	G	0.3828	0.5361	1.65
rs11254363	G	0.3308	0.3621	A	0.175	0.6757	0.8708
rs2145939	A	0.2077	0.2667	C	0.8154	0.3665	0.7209
rs12571671	G	0.07692	0.05	A	0.4669	0.4944	1.583
rs77742924	C	0.06923	0.05	T	0.2566	0.6125	1.413
rs1801223	T	0.2769	0.3	C	0.1075	0.743	0.8936
rs41289313	A	0.06154	0.06667	G	0.01825	0.8925	0.918
rs41289315	A	0.1154	0.1	G	0.09884	0.7532	1.174

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CUBN

Στο γονίδιο του CUBN γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 57 σημειακοί μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 10. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία χ^2 κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, μόνο ένας φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στις συχνότητες των γονοτύπων στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων, με σημαντικότητα $p=0.04137$. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs41335345, μια αντικατάσταση A από G.

A9. CYP27B1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs118204008	G	0.1	0.1333	A	0.464	0.4958	0.7222
rs118204009	C	0.5231	0.4333	T	1.323	0.2501	1.434
rs118204010	G	0.02308	0.08333	A	3.696	0.05455	0.2598
rs201819682	C	0.3692	0.3667	T	0.00116	0.9728	1.011
rs8176345	T	0.1846	0.2333	C	0.609	0.4352	0.7439

rs118204012	C	0.1231	0.08621	T	0.5495	0.4585	1.488
rs10877012	T	0.3231	0.3333	C	0.01964	0.8885	0.9545

Πίνακας 11 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP27B1

Στη περίπτωση του γονιδίου του CYP27B1 γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 7 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 11. Για κανέναν από τους 7 προσδιορισθέντες πολυμορφισμούς δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

A10. CYP24A1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs4809957	G	0.2077	0.15	A	0.8897	0.3455	1.485
rs1570669	G	0.2692	0.2333	A	0.2764	0.5991	1.211
rs2762938	A	0.5077	0.45	G	0.5468	0.4596	1.26
rs2209314	C	0.2385	0.2667	T	0.1754	0.6753	0.8611
rs6091828	T	0.05385	0.03333	G	0.3828	0.5361	1.65
rs6068816	T	0.1692	0.1	C	1.566	0.2108	1.833
rs2762939	C	0.2231	0.1833	G	0.3901	0.5322	1.279
rs76194329	T	0.06154	0.03333	C	0.655	0.4183	1.902
rs3787554	A	0.1231	0.08333	G	0.6596	0.4167	1.544
rs4809959	G	0.4154	0.4	A	0.04015	0.8412	1.066
rs2245153	C	0.1692	0.1167	T	0.877	0.349	1.542

Πίνακας 12 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP24A1

Όσον αφορά το γονίδιο του CYP24A1 γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 11 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 12. Για κανέναν από τους 11 πολυμορφισμούς υπό μελέτη δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

A11. CYP2R

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs377392785	T	0.1077	0.1333	C	0.2636	0.6076	0.7845
rs7129781	A	0.1923	0.2167	G	0.1522	0.6964	0.8608
rs117576073	A	0.4206	0.5667	G	3.482	0.06206	0.5552

Πίνακας 13 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP2R

Όσον αφορά το γονίδιο του CYP2R γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 3 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 13. Για κανέναν από τους τρεις πολυμορφισμούς δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς.

Οι συνολικά εννέα σημειακοί πολυμορφισμοί που φάνηκαν να διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά μετά την ανάλυση ασθενών- υγιών μαρτύρων παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR	GENE
rs731236	G	0.2846	0.431	T	3.89	0.04857	0.5252	VDR
rs78310111	A	0.1385	0.03333	G	4.817	0.02817	4.661	RXRA
rs112935160	T	0.2923	0.1167	C	7.007	0.00812	3.127	
rs35780541	T	0.3538	0.1897	C	5.118	0.02368	2.34	
rs80338853	G	0.1231	0.01667	T	5.706	0.01691	8.281	DCHR7
rs189806678	G	0.2615	0.4167	T	4.614	0.03171	0.4958	LRP2
rs193922421	G	0.2615	0.4833	A	9.112	0.00254	0.3786	CASR
rs193922436	T	0.02308	0.15	C	11.18	0.00083	0.1339	
rs41335345	A	0.1538	0.05	G	4.161	0.04137	3.455	CUBN

Πίνακας 14 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την ανάλυση ασθενών/υγιών μαρτύρων

B) Εστιασμένο/Διάχυτο Σκληρόδερμα

Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα και στην εισαγωγή, οι δυο βασικοί κλινικοί υπότυποι της συστηματικής σκλήρυνσης, δηλαδή το εστιασμένο και το διάχυτο συστηματικό σκληρόδερμα, διαφοροποιούνται αρκετά, κυρίως ως προς την έκταση των συμπτωμάτων αλλά και την κλινική έκβαση των ασθενών. Επιπλέον, από μελέτες έχουν βρεθεί γενετικοί παράγοντες που συσχετίζονται με έναν από τους δυο κλινικούς υπότυπους. Με βάση αυτά τα στοιχεία, οι 65 συνολικά ασθενείς με συστηματικό σκληρόδερμα που γονοτυπήθηκαν και πληρούσαν τα κριτήρια του ποιοτικού ελέγχου χωρίστηκαν σε δυο υποομάδες και πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη ανάλυση, θέτοντας ως cases τους ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα και ως control τους ασθενείς με εστιασμένο σκληρόδερμα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω

B1. VDR

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs181665806	C	0.3276	0.2778	T	0.3795	0.5379	1.267
rs56382517	C	0.2069	0.2639	T	0.5746	0.4485	0.7277
rs11574129	T	0.1207	0.3611	C	9.803	0.001742	0.2428
rs731236	G	0.2069	0.3472	T	3.107	0.07797	0.4904
rs7975232	C	0.2414	0.3333	T	1.313	0.2518	0.6364
rs1544410	A	0.2931	0.3611	G	0.6712	0.4126	0.7336
rs2239185	G	0.06897	0.1528	A	2.211	0.1371	0.4108
rs142418811	G	0.3276	0.2917	A	0.1946	0.6591	1.183

rs11574099	A	0.1034	0.125	G	0.1462	0.7022	0.8077
rs2238140	C	0.3214	0.3429	T	0.06429	0.7998	0.9079
rs1540339	A	0.2414	0.3472	G	1.714	0.1905	0.5982
rs2239179	T	0.3276	0.2917	C	0.1946	0.6591	1.183
rs121909793	G	0.2931	0.1944	A	1.722	0.1895	1.718
rs145002466	C	0.03448	0.02778	T	0.04842	0.8258	1.25
rs200041268	C	0.3929	0.4429	T	0.3192	0.5721	0.814
rs121909794	A	0.1897	0.25	G	0.6749	0.4113	0.7021
rs12717991	G	0.01724	0.1389	A	6.137	0.01324	0.1088
rs116886958	A	0.1207	0.1944	G	1.29	0.256	0.5686
rs886441	C	0.1034	0.09722	T	0.01384	0.9064	1.071
rs2238138	C	0.2414	0.3056	T	0.6607	0.4163	0.7231
rs3782905	A	0.05172	0.08333	G	0.4981	0.4803	0.6
rs121909797	G	0.1034	0.08333	A	0.1551	0.6937	1.269
rs121909790	A	0.01724	0.02778	G	0.1582	0.6908	0.614
rs2408876	A	0.431	0.5278	G	1.204	0.2726	0.6778
rs7297462	A	0.1897	0.09722	G	2.301	0.1293	2.173
rs2853564	T	0.2931	0.375	C	0.9622	0.3266	0.6911
rs12321826	C	0.4828	0.3611	A	1.958	0.1618	1.651
rs12721404	T	0.03448	0.08333	C	1.327	0.2493	0.3929
rs11168284	A	0.1552	0.125	T	0.2452	0.6205	1.286
rs59128934	C	0.3793	0.5556	T	4	0.04551	0.4889
rs4237855	T	0.08621	0.08333	C	0.003425	0.9533	1.038
rs11574029	T	0.01724	0.04167	C	0.6426	0.4228	0.4035
rs12427078	G	0.3621	0.3611	T	0.000128	0.991	1.004
rs58379944	T	0.2241	0.3611	C	2.87	0.09025	0.5111
rs112884497	T	0.1379	0.1528	G	0.05674	0.8117	0.8873
rs7136534	C	0.06897	0.05556	T	0.1	0.7518	1.259
rs12721409	C	0.431	0.3611	T	0.6588	0.417	1.34
rs12581281	C	0.2931	0.2222	T	0.8521	0.356	1.451
rs11574012	G	0.431	0.4306	C	3.01E-05	0.9956	1.002
rs4516035	T	0.1034	0.1528	C	0.6877	0.407	0.6399
rs11568820	C	0.05172	0.07143	T	0.2102	0.6466	0.7091
rs117860837	G	0.3966	0.4028	T	0.005188	0.9426	0.9744
rs11168302	A	0.2069	0.2222	C	0.04465	0.8327	0.913
rs7311030	G	0.431	0.4444	A	0.02346	0.8783	0.947
rs7315992	A	0.06897	0.05882	C	0.05415	0.816	1.185
rs4760670	A	0.08621	0.05556	G	0.4684	0.4937	1.604
rs12303561	T	0.1034	0.125	C	0.1462	0.7022	0.8077
rs7297624	G	0.3621	0.375	A	0.02306	0.8793	0.9459
rs10875704	A	0.1207	0.1389	G	0.0936	0.7596	0.851
rs145989923	A	0.2759	0.1667	G	2.266	0.1322	1.905

Πίνακας 15: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του VDR

Στη περίπτωση του γονιδίου του VDR αναλύθηκαν συνολικά 48 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 15. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας χ^2 κατά Pearson, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει

στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων του στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B2. VDB

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs2070741	T	0.01724	0.08333	C	2.754	0.097	0.193
rs705117	C	0.2586	0.3333	T	0.8539	0.3555	0.6977
rs2282679	C	0.1552	0.2639	T	2.247	0.1339	0.5124
rs1491710	T	0.01724	0.01389	C	0.02383	0.8773	1.246
rs222042	C	0.03448	0.05556	T	0.324	0.5692	0.6071
rs7041	A	0.01724	0.05556	G	1.275	0.2588	0.2982
rs16846943	C	0.2241	0.2361	T	0.02594	0.872	0.9346
rs76803094	T	0.08621	0.125	C	0.5031	0.4782	0.6604
rs139133782	A	0.1897	0.1389	G	0.6112	0.4343	1.451
rs149023528	C	0.01724	0.01389	T	0.02383	0.8773	1.246
rs116134435	T	0.1034	0.04167	C	1.903	0.1678	2.654
rs142840177	G	0.3793	0.3333	T	0.297	0.5858	1.222
rs75774690	A	0.01724	0	G	1.251	0.2634	NA
rs116748421	C	0.5172	0.3472	T	3.804	0.05112	2.014
rs222016	G	0.03448	0.02778	A	0.04842	0.8258	1.25
rs180820099	C	0.05172	0.06944	A	0.1747	0.676	0.7309
rs1155563	G	0.06897	0.05556	A	0.1	0.7518	1.259
rs3733359	G	0.3621	0.3611	T	0.000128	0.991	1.004

Πίνακας 16: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του VDB

Στη περίπτωση του γονιδίου του VDB αναλύθηκαν συνολικά 18 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 16. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας χ^2 κατά Pearson, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων του στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B3. RXRA

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs11185647	G	0.06897	0.1389	A	1.634	0.2011	0.4593
rs113865624	C	0.3276	0.2778	A	0.3795	0.5379	1.267
rs75619434	C	0.06897	0.06944	T	0.000114	0.9915	0.9926
rs12339187	C	0.01724	0.01389	T	0.02383	0.8773	1.246
rs59211076	T	0.1552	0.05556	G	3.542	0.05984	3.122
rs73663460	C	0.2069	0.3889	T	4.995	0.02543	0.4099
rs28412613	T	0.5172	0.375	G	2.64	0.1042	1.786
rs116906088	A	0.1552	0.125	C	0.2452	0.6205	1.286
rs113311097	T	0.06897	0.04167	C	0.4699	0.493	1.704
rs114509195	T	0.2069	0.25	C	0.3362	0.562	0.7826
rs34835001	T	0.1034	0.06944	C	0.4795	0.4886	1.546

rs78310111	A	0.1034	0.1667	G	1.076	0.2995	0.5769
rs34208214	A	0.2069	0.2083	G	0.000403	0.984	0.9913
rs75664280	A	0.3276	0.375	G	0.3158	0.5741	0.812
rs112935160	T	0.3103	0.2778	C	0.1647	0.6849	1.17
rs35780541	T	0.3276	0.375	C	0.3158	0.5741	0.812
rs2234753	G	0.5345	0.4583	A	0.7453	0.388	1.357
rs7861779	T	0.2931	0.3472	G	0.4302	0.5119	0.7795
rs2234960	T	0.3448	0.4444	C	1.328	0.2491	0.6579
rs1536475	C	0.3966	0.5139	T	1.78	0.1822	0.6216
rs6413517	G	0.3793	0.375	A	0.002541	0.9598	1.019
rs35603635	G	0.03448	0.04167	A	0.04483	0.8323	0.8214
rs4240711	G	0.1034	0.1111	A	0.01963	0.8886	0.9231

Πίνακας 17: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του RXRA

Στη περίπτωση του γονιδίου του RXRA αναλύθηκαν συνολικά 23 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 12. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας χ^2 κατά Pearson, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων του στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B4. DHCR7

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs186924567	A	0.4483	0.4306	G	0.04097	0.8396	1.075
rs77073138	C	0.2759	0.2917	T	0.03941	0.8426	0.9252
rs1044535	T	0.2586	0.2917	C	0.1752	0.6755	0.8472
rs80338864	T	0.3621	0.3611	C	0.000128	0.991	1.004
rs80338862	A	0.3276	0.2639	C	0.63	0.4273	1.359
rs121909768	G	0.06897	0.125	A	1.121	0.2898	0.5185
rs80338860	C	0.2586	0.2083	T	0.4576	0.4987	1.326
rs121909764	T	0.2759	0.3333	C	0.4981	0.4803	0.7619
rs80338857	T	0.1724	0.2639	C	1.551	0.213	0.5811
rs80338856	C	0.1897	0.2361	T	0.4102	0.5219	0.7572
rs80338853	G	0.1552	0.09722	T	0.9995	0.3174	1.706
rs146867923	C	0.1379	0.05556	T	2.602	0.1068	2.72
rs147394240	A	0.4138	0.5278	G	1.673	0.1959	0.6316
rs7928249	T	0.03448	0.09722	C	1.962	0.1613	0.3316

Πίνακας 15: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του DHCR7

Στη περίπτωση του γονιδίου του DHCR7 αναλύθηκαν συνολικά 14 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 12. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας χ^2 κατά Pearson, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων του στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B5. NADYSN1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs35588716	C	0.03571	0.02857	G	0.05164	0.8202	1.259
rs11233800	G	0.08621	0.09722	T	0.04652	0.8292	0.876
rs184748544	T	0.2931	0.3889	C	1.302	0.2538	0.6516
rs3829251	C	0.2586	0.2222	A	0.2344	0.6283	1.221
rs117951834	C	0.2759	0.2917	T	0.03941	0.8426	0.9252
rs12286616	G	0.01724	0.04167	T	0.6426	0.4228	0.4035
rs7950649	T	0.4828	0.4722	C	0.0143	0.9048	1.043

Πίνακας 16: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του NADSYN1

Στη περίπτωση του γονιδίου του NADSYN1 αναλύθηκαν συνολικά 7 σημειακοί πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 16. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας, κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B6. LRP2

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs34564141	A	0.03448	0.02778	G	0.04842	0.8258	1.25
rs2075252	A	0.06897	0.06944	G	0.000114	0.9915	0.9926
rs77568907	A	0.01724	0.04167	G	0.6426	0.4228	0.4035
rs189806678	G	0.2586	0.2639	T	0.004616	0.9458	0.9731
rs144081819	C	0.1034	0.1111	T	0.01963	0.8886	0.9231
rs199806925	G	0.05172	0.05556	A	0.009256	0.9234	0.9273
rs2229265	T	0.5517	0.375	C	4.047	0.04424	2.051
rs143367996	A	0.1897	0.2778	G	1.374	0.2412	0.6085
rs200563635	A	0.3621	0.4167	G	0.4017	0.5262	0.7946
rs140272085	C	0.01724	0.05556	T	1.275	0.2588	0.2982
rs137983840	G	0.03448	0.01389	A	0.6043	0.4369	2.536
rs79028167	C	0.01724	0.04167	T	0.6426	0.4228	0.4035
rs59363833	T	0.01724	0.01389	C	0.02383	0.8773	1.246
rs144594832	C	0.01724	0.02778	T	0.1582	0.6908	0.614
rs17848169	T	0.05172	0.08333	C	0.4981	0.4803	0.6
rs61995915	G	0.05172	0.02778	A	0.4981	0.4803	1.909
rs35114151	T	0.03448	0.04167	C	0.04483	0.8323	0.8214
rs4668124	T	0.01724	0.01389	G	0.02383	0.8773	1.246
rs148299415	G	0.1897	0.1806	A	0.01767	0.8943	1.062
rs138269726	C	0.05357	0.1389	A	2.513	0.1129	0.3509
rs116456291	A	0.2586	0.2222	G	0.2344	0.6283	1.221
rs143413559	C	0.1897	0.2083	T	0.07004	0.7913	0.8894
rs2268365	T	0.2586	0.2361	G	0.08771	0.7671	1.129
rs17848152	A	0.01724	0.05556	G	1.275	0.2588	0.2982
rs145669628	T	0.03448	0.04167	C	0.04483	0.8323	0.8214
rs181448146	C	0.2069	0.1389	T	1.057	0.304	1.617
rs201115003	T	0.1207	0.04167	G	2.825	0.0928	3.157
rs143822500	A	0.2586	0.1528	C	2.249	0.1337	1.934
rs142080405	A	0.1724	0.2917	G	2.516	0.1127	0.506

rs76668605	T	0.01724	0.02778	C	0.1582	0.6908	0.614
rs116332504	A	0.01724	0.01389	G	0.02383	0.8773	1.246
rs12991585	A	0.08621	0.04167	C	1.103	0.2935	2.17
rs201080826	C	0.03448	0.01389	T	0.6043	0.4369	2.536
rs73037817	A	0.06897	0.09722	G	0.3311	0.565	0.6878
rs147110349	A	0.2414	0.3194	G	0.9615	0.3268	0.6779
rs59457398	G	0.03448	0.02778	A	0.04842	0.8258	1.25
rs184319574	C	0.03448	0.02778	T	0.04842	0.8258	1.25
rs830965	G	0.03571	0.02778	A	0.06554	0.7979	1.296
rs830968	T	0.1552	0.1806	G	0.1472	0.7012	0.8336
rs76514916	G	0.05172	0.01389	T	1.542	0.2143	3.873
rs2229263	C	0.5345	0.4722	T	0.4981	0.4803	1.283
rs186568676	C	0.4655	0.5	T	0.1529	0.6958	0.871
rs74846790	C	0.01724	0.06944	T	1.988	0.1585	0.2351
rs13006076	C	0.3966	0.4444	T	0.3019	0.5827	0.8214
rs3770636	G	0.03448	0.02778	A	0.04842	0.8258	1.25
rs75193630	A	0.03571	0.02778	C	0.06554	0.7979	1.296
rs16856840	T	0.01724	0.01389	C	0.02383	0.8773	1.246
rs11685268	T	0.01724	0.02778	C	0.1582	0.6908	0.614

Πίνακας 17: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του LRP2

Στη περίπτωση του γονιδίου του LRP2 αναλύθηκαν συνολικά 49 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και σε ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 17. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας, ένας πολυμορφισμός φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισής του, ανάμεσα σε ασθενείς με διάχυτο και εστιασμένο υπότυπο της νόσου. Συγκεκριμένα επρόκειτο για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs2229265, μια αντικατάσταση γουανίνης από θυμίνη, σε ιντρονική περιοχή.

B7. CASR

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs7646468	T	0.08621	0.05556	C	0.4684	0.4937	1.604
rs113654054	A	0.2414	0.3056	G	0.6607	0.4163	0.7231
rs17282015	T	0.1552	0.09722	G	0.9995	0.3174	1.706
rs17282022	G	0.1379	0.08333	A	0.9965	0.3182	1.76
rs75750177	C	0.03448	0.01389	T	0.6043	0.4369	2.536
rs193922420	T	0.06897	0.01389	C	2.635	0.1045	5.259
rs193922424	G	0.01724	0.02778	A	0.1582	0.6908	0.614
rs193922442	G	0.03448	0.02778	A	0.04842	0.8258	1.25
rs193922444	G	0.01724	0.02778	A	0.1582	0.6908	0.614
rs193922419	G	0.03448	0.02857	A	0.03661	0.8483	1.214
rs193922421	G	0.2414	0.2778	A	0.2204	0.6388	0.8273
rs2202127	C	0.05172	0.04167	T	0.07381	0.7859	1.255
rs4678173	C	0.03448	0.01389	T	0.6043	0.4369	2.536
rs17251221	A	0.05172	0.01389	C	1.542	0.2143	3.873
rs193922426	C	0.03448	0.01389	T	0.6043	0.4369	2.536
rs117375173	C	0.03448	0.02778	A	0.04842	0.8258	1.25

rs104893705	T	0.03448	0.09722	C	1.962	0.1613	0.3316
rs193922431	G	0.01724	0.04167	A	0.6426	0.4228	0.4035
rs139417576	G	0.01724	0.06944	A	1.988	0.1585	0.2351
rs193922433	C	0.2414	0.3194	A	0.9615	0.3268	0.6779
rs193922434	G	0.05172	0.01389	A	1.542	0.2143	3.873
rs193922435	C	0.01724	0.04167	T	0.6426	0.4228	0.4035
rs193922436	T	0.01724	0.02778	C	0.1582	0.6908	0.614
rs193922437	A	0.01724	0.05556	G	1.275	0.2588	0.2982
rs121909269	C	0.05172	0.04167	T	0.07381	0.7859	1.255
rs1801725	T	0.08621	0.125	C	0.5031	0.4782	0.6604
rs142704083	A	0.01724	0.04167	C	0.6426	0.4228	0.4035
rs1802757	A	0.01724	0.06944	G	1.988	0.1585	0.2351

Πίνακας 18: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CASR

Στη περίπτωση του γονιδίου του CASR αναλύθηκαν συνολικά 28 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 18. Κανένας από τους πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B8. CUBN

SNP id	BP	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs3740169	16873547	T	0.3621	0.4306	C	0.6278	0.4282	0.7507
rs145872906	16877108	C	0.06897	0.09722	A	0.3311	0.565	0.6878
rs703062	16878204	T	0.2931	0.3194	C	0.1046	0.7463	0.8834
rs76254339	16881004	C	0.3621	0.4444	T	0.9027	0.3421	0.7095
rs703064	16882518	A	0.3276	0.3056	G	0.07221	0.7881	1.107
rs11254244	16887922	G	0.08621	0.1111	A	0.2214	0.638	0.7547
rs7089377	16890650	T	0.4655	0.5278	C	0.4981	0.4803	0.7793
rs142581908	16916484	C	0.05172	0.06944	A	0.1747	0.676	0.7309
rs115888073	16919034	T	0.2931	0.375	C	0.9622	0.3266	0.6911
rs11254256	16919512	G	0.2759	0.2083	T	0.8066	0.3691	1.448
rs2796833	16925588	T	0.1897	0.1806	C	0.01767	0.8943	1.062
rs11254262	16926640	T	0.05172	0.1389	G	2.712	0.09961	0.3382
rs11597490	16931955	G	0.3036	0.2917	A	0.02139	0.8837	1.059
rs45551835	16932384	C	0.1071	0.09722	T	0.03398	0.8538	1.114
rs150488625	16932454	T	0.4483	0.4028	G	0.2724	0.6017	1.205
rs72771395	16938684	A	0.05172	0.05556	G	0.009256	0.9234	0.9273
rs7099855	16945193	C	0.1724	0.25	T	1.144	0.2848	0.625
rs796667	16946819	A	0.05172	0.01389	G	1.542	0.2143	3.873
rs780807	16948177	C	0.3276	0.2778	T	0.3795	0.5379	1.267
rs137998687	16948208	C	0.1034	0.1111	T	0.01963	0.8886	0.9231
rs780805	16949401	C	0.1552	0.09722	A	0.9995	0.3174	1.706
rs3740165	16949550	T	0.2241	0.1806	C	0.3813	0.5369	1.311
rs117281395	16951262	G	0.4483	0.4028	A	0.2724	0.6017	1.205
rs149507036	16960624	A	0.06897	0.05556	G	0.1	0.7518	1.259
rs150901286	16961960	G	0.2759	0.375	A	1.426	0.2324	0.6349

rs11254275	16962352	C	0.1552	0.2083	T	0.6031	0.4374	0.698
rs6602163	16966766	C	0.4107	0.5139	T	1.347	0.2459	0.6593
rs199915629	16967396	A	0.5	0.4861	C	0.02479	0.8749	1.057
rs117909190	16968533	T	0.431	0.3889	C	0.2363	0.6269	1.19
rs1687716	16968845	G	0.2414	0.04167	A	11.27	0.000787	7.318
rs74844886	16970164	G	0.06897	0.06944	A	0.000114	0.9915	0.9926
rs75386064	16970304	C	0.01724	0.02778	T	0.1582	0.6908	0.614
rs2883972	16976618	C	0.06897	0.06944	T	0.000114	0.9915	0.9926
rs41289303	16979593	T	0.2414	0.1667	C	1.121	0.2898	1.591
rs2356590	16979606	G	0.3621	0.2361	C	2.464	0.1165	1.836
rs76789390	16981015	C	0.2414	0.1944	T	0.4187	0.5176	1.318
rs2271462	16982061	T	0.2759	0.1528	C	2.957	0.08549	2.113
rs7897704	16985159	T	0.01724	0.02778	C	0.1582	0.6908	0.614
rs7912716	16985317	T	0.2414	0.2286	C	0.029	0.8648	1.074
rs191787640	16990479	C	0.06897	0.05556	T	0.1	0.7518	1.259
rs2271468	16990552	C	0.2414	0.1528	T	1.624	0.2026	1.764
rs74833951	16992773	C	0.1552	0.2222	T	0.9298	0.3349	0.6429
rs3847364	16993821	C	0.5172	0.4861	T	0.1245	0.7242	1.133
rs149801280	16994685	T	0.3966	0.4306	C	0.153	0.6957	0.8691
rs10752064	16996953	A	0.2069	0.1944	G	0.03113	0.86	1.081
rs7071576	16999350	A	0.1071	0.06944	G	0.5699	0.4503	1.608
rs2942359	17008422	T	0.3103	0.3056	C	0.003459	0.9531	1.023
rs7079269	17013295	T	0.3276	0.3611	C	0.1595	0.6896	0.8619
rs41335345	17014995	A	0.4483	0.375	G	0.7143	0.398	1.354
rs3012499	17019013	A	0.1207	0.05556	G	1.759	0.1847	2.333
rs59711315	17020776	G	0.1207	0.1389	A	0.0936	0.7596	0.851
rs1801231	17024503	G	0.06897	0.02778	A	1.238	0.2659	2.593
rs201251467	17026209	T	0.06897	0.05556	A	0.1	0.7518	1.259
rs193230753	17026722	T	0.2931	0.1944	C	1.722	0.1895	1.718
rs11254319	17027254	A	0.08621	0.09722	G	0.04652	0.8292	0.876
rs117453002	17028562	A	0.2069	0.3472	G	3.107	0.07797	0.4904
rs199743759	17032433	C	0.05357	0.07143	T	0.1668	0.6829	0.7358
rs116867125	17033504	G	0.08621	0.09722	A	0.04652	0.8292	0.876
rs386833787	17061832	A	0.3448	0.4028	G	0.4593	0.4979	0.7804
rs118050165	17063417	G	0.3793	0.4028	T	0.07421	0.7853	0.9061
rs7896819	17064594	C	0.1724	0.1389	T	0.2773	0.5984	1.292
rs7897550	17064992	G	0.1897	0.1528	T	0.3107	0.5772	1.298
rs17139621	17065761	C	0.4138	0.2361	T	4.697	0.03022	2.284
rs79775313	17067630	G	0.08621	0.06944	A	0.1271	0.7214	1.264
rs72775007	17068027	A	0.1552	0.2778	G	2.786	0.09508	0.4776
rs11254336	17075573	A	0.431	0.3333	G	1.306	0.2532	1.515
rs7894639	17076130	T	0.1207	0.05556	C	1.759	0.1847	2.333
rs11254339	17081153	T	0.2931	0.2778	G	0.03706	0.8474	1.078
rs76600859	17086818	G	0.2414	0.1667	A	1.121	0.2898	1.591
rs146593010	17089450	C	0.1897	0.1528	T	0.3107	0.5772	1.298
rs10904868	17097263	G	0.3621	0.4028	A	0.2249	0.6353	0.8416
rs73600135	17103637	T	0.1034	0.02778	C	3.185	0.07432	4.038
rs148869805	17110639	G	0.05172	0.06944	A	0.1747	0.676	0.7309

rs150108298	17110721	T	0.03448	0.02778	C	0.04842	0.8258	1.25
rs138545198	17110739	T	0.1897	0.125	C	1.032	0.3098	1.638
rs2172080	17112417	G	0.431	0.5278	T	1.204	0.2726	0.6778
rs138083522	17113456	G	0.08621	0.1389	A	0.8735	0.35	0.5849
rs1801225	17113563	A	0.431	0.25	G	4.756	0.0292	2.273
rs76021360	17123328	T	0.01724	0.01389	G	0.02383	0.8773	1.246
rs7905349	17126383	G	0.03448	0.05556	T	0.324	0.5692	0.6071
rs147752521	17126389	T	0.08621	0.05556	C	0.4684	0.4937	1.604
rs141420691	17126433	A	0.3103	0.3194	G	0.01232	0.9116	0.9587
rs11254362	17129471	C	0.3621	0.5694	T	5.538	0.01861	0.4291
rs41289311	17130199	G	0.05172	0.09722	T	0.9365	0.3332	0.5065
rs11254363	17130693	C	0.2931	0.3333	T	0.2408	0.6236	0.8293
rs2356825	17135164	G	0.08621	0.09722	A	0.04652	0.8292	0.876
rs185252533	17137383	T	0.431	0.4028	C	0.1056	0.7452	1.123
rs147449194	17142088	C	0.3793	0.3194	T	0.5087	0.4757	1.302
rs12571671	17146590	C	0.4655	0.4722	A	0.005799	0.9393	0.9734
rs77742924	17149293	C	0.1552	0.06944	T	2.457	0.117	2.461
rs57335729	17152930	C	0.25	0.2714	T	0.0739	0.7857	0.8947
rs143318407	17154605	A	0.03448	0.1111	G	2.656	0.1031	0.2857
rs117959007	17156911	A	0.5172	0.4306	G	0.9692	0.3249	1.417
rs41289313	17157572	A	0.431	0.5278	G	1.204	0.2726	0.6778
rs11254375	17159192	A	0.08621	0.125	G	0.5031	0.4782	0.6604
rs11254381	17164569	G	0.3276	0.2917	T	0.1946	0.6591	1.183
rs41289315	17165545	T	0.4828	0.4444	G	0.1897	0.6631	1.167

Πίνακας 19: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CUBN

Στη περίπτωση του γονιδίου του CUBN αναλύθηκαν συνολικά 58 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 20. Συνολικά τέσσερις πολυμορφισμοί φάνηκαν να διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δυο ομάδες μελέτης. Συγκεκριμένα επρόκειτο

B9. CYP27B1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs118204008	G	0.1207	0.08333	A	0.4981	0.4803	1.51
rs118204009	T	0.4483	0.5	C	0.3445	0.5572	0.8125
rs118204010	G	0.01724	0.02778	A	0.1582	0.6908	0.614
rs201819682	C	0.3448	0.3889	T	0.2678	0.6048	0.8271
rs8176345	T	0.2069	0.1667	C	0.3454	0.5567	1.304
rs118204012	C	0.1207	0.125	T	0.00553	0.9407	0.9608
rs10877012	T	0.2931	0.3472	C	0.4302	0.5119	0.7795
rs703842	G	0.05357	0.04167	A	0.09992	0.7519	1.302

Πίνακας 20: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP27B1

Στη περίπτωση του γονιδίου του CYP27B1 αναλύθηκαν συνολικά 8 πολυμορφισμοί, σε ασθενείς με εντοπισμένο και σε ασθενείς με διάχυτο σκληρόδερμα. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 20.

Κανέναν από τους παραπάνω πολυμορφισμούς δε φάνηκε να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους δυο πληθυσμούς των ασθενών.

B10. CYP24A1

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs4809957	G	0.2077	0.15	A	0.8897	0.3455	1.485
rs1570669	G	0.2692	0.2333	A	0.2764	0.5991	1.211
rs2762938	A	0.5077	0.45	G	0.5468	0.4596	1.26
rs2209314	C	0.2385	0.2667	T	0.1754	0.6753	0.8611
rs6091828	T	0.05385	0.03333	G	0.3828	0.5361	1.65
rs6068816	T	0.1692	0.1	C	1.566	0.2108	1.833
rs2762939	C	0.2231	0.1833	G	0.3901	0.5322	1.279
rs76194329	T	0.06154	0.03333	C	0.655	0.4183	1.902
rs3787554	A	0.1231	0.08333	G	0.6596	0.4167	1.544
rs4809959	G	0.4154	0.4	A	0.04015	0.8412	1.066
rs2245153	C	0.1692	0.1167	T	0.877	0.349	1.542

Πίνακας 21 : Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP24A1

Όσον αφορά το γονίδιο του CYP24A1 γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 11 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 10. Για κανέναν από τους 11 πολυμορφισμούς υπό μελέτη δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς

B11. CYP2R

SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs377392785	T	0.08621	0.125	C	0.5031	0.4782	0.6604
rs7129781	A	0.1897	0.1944	G	0.004744	0.9451	0.9696
rs117576073	A	0.375	0.4571	G	0.8614	0.3534	0.7125

Πίνακας 22: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του CYP2R

Όσον αφορά το γονίδιο του CYP2R γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 3 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον πίνακα 22. Για κανέναν από τους τρεις πολυμορφισμούς δε φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές συχνότητες ανάμεσα σε ασθενείς με διάχυτο και περιορισμένο σκληρόδερμα

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η συστηματική σκλήρυνση συνιστά ένα από τα πολυπλοκότερα συστηματικά αυτοάνοσα νόσηματα, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μοντέλο ινωτικής νόσου (Varga et al). Παρουσιάζει υψηλή θνητότητα και επηρεάζει πέρα από το δέρμα διάφορα ζωτικά όργανα όπως οι πνεύμονες και οι νεφροί. Χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και στο αγγειακό σύστημα και στην αιτιοπαθογένεια της νόσου εμπλέκονται διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος, ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες (Gabrielli et al). Οι παραπάνω κυτταρικοί πληθυσμοί παράγουν εξωκυττάρια ουσία, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους και συμβάλλουν

από κοινού στον κλινικό φαινότυπο και στην εκδήλωση της ασθένειας(). Η κλινική ετερογένεια της νόσου οφείλεται στην αλληλεπίδραση πολλών διαφορετικών παραγόντων πέρα των διαφορετικών γονιδίων των συστημάτων που εμπλέκονται στην παθογένεια. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι η μόλυνση από ορισμένους ιούς αλλά και η περιορισμένη έκθεση στο φως του ήλιου θεωρείται πως αποτελούν ερεθίσματα που πυροδοτούν και συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας (Dospinescu et al).

Η περιοχή του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας έχει συσχετιστεί από πολλαπλές μελέτες με τη συστηματική σκλήρυνση. Πρόσφατες έρευνες έχουν αναδείξει νέα βιοσυνθετικά μονοπάτια και γενετικούς τόπους που συνδέονται με την ασθένεια όπως: ρυθμιστικές περιοχές του γενετικού υλικού, γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και γονίδια που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος και την ίνωση (Varga et al).

Η βιταμίνη D αποτελεί ένα μόριο που εμπλέκεται σε μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναδειχθεί ο ρόλος της στο ανοσοποιητικό σύστημα όπου φαίνεται να ασκεί ρυθμιστική και αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω της δράσης του υποδοχέα της. Μια πληθώρα κυρίως επιδημιολογικών μελετών έχει παράξει αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς τον ρόλο εξωγενούς χορήγησης βιταμίνης σε νοσήματα όπως. Παρά την υπάρχουσα γνώση για τις δράσεις της στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, παραμένει ακόμα ασαφής ο τρόπος με τον οποίο επιδρά στην εκδήλωση αλλά και στην βαρύτητα αυτοάνοσων νοσημάτων. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει προσπαθήσει να συσχετίσει πολυμορφισμούς σε γονίδια σχετικά με την βιταμίνη και διάφορα νοσήματα με τα αποτελέσματα αυτών να είναι και πάλι αντικρουόμενα ().

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν πολυμορφισμοί σε έντεκα γενετικούς τόπους που εμπλέκονται με την βιταμίνη D τόσο στο επίπεδο της σύνθεσης και της απορρόφησης τόσο και της δράσης της στους ιστούς στόχους. Οι πολυμορφισμοί αυτοί γονοτυπήθηκαν με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina και αναλύθηκαν με τη χρήση εφαρμογών βιοπληροφορικής. Με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη συστηματική μελέτη σημειακών πολυμορφισμών σε γονίδια σχετικά με τη βιταμίνη σε ελληνικό πληθυσμό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση. Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών ασθενών-υγιών μαρτύρων με στόχο την ανάδειξη διαφοροποιήσεων στις συχνότητες εμφάνισης πολυμορφισμών ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, στο δεύτερο μέρος η ανάλυση αφορούσε σύγκριση ασθενών με τον διάχυτο και τον εστιασμένο υπότυπο της νόσου.

Από την ανάλυση συσχέτισης ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς φάνηκε ότι συνολικά οι συχνότητες εμφάνισης εννέα σημειακών πολυμορφισμών σε πέντε από τα έντεκα γονίδια που εξετάστηκαν διαφοροποιούνταν στατιστικά σημαντικά. Από αυτούς τους πολυμορφισμούς ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός με κωδικό rs731236, που εμφανίστηκε με αυξημένη συχνότητα στους υγιείς μάρτυρες σε σχέση με τους ασθενείς. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εδράζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της βιταμίνης D και έχει φανεί πως ασκεί προστατευτικό ρόλο στην εκδήλωση ραχίτιδας σε παιδιά. Επιπλέον ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει συμπεριληφθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών συσχέτισης της βιταμίνης και διάφορων νόσων, όπως για παράδειγμα την πολλαπλή σκλήρυνση όπου έχει αναδειχθεί και πάλι ο προστατευτικός ρόλος του σπάνιου αλληλομόρφου. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση μας στον ελληνικό πληθυσμό ασθενών με σκληρόδερμα φαίνεται να επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών του εξωτερικού που έχουν εντοπίσει μειωμένη συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε ομάδες ασθενών, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.

Ακόμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός rs80338853 ο οποίος εμφανίστηκε με στατιστικά σημαντική αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι σπάνιος ($maf < 0.01$), εδράζεται στο γονίδιο DCHR7 και έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση του συνδρόμου Smith-Lemli-Opitz, μιας σπάνιας γενετικής νόσου (Wassif et al). Θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος

που μπορεί να παίζει η συγκεκριμένη μετάλλαξη και στην εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η συστηματική σκλήρυνση.

Εκτός από τους παραπάνω πολυμορφισμούς για τους οποίους υπήρχε σχετική βιβλιογραφία, προέκυψαν από την ανάλυση μας επτά ακόμα πολυμορφισμοί, με στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς, οι οποίοι δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Θα πρέπει στη συνέχεια να ακολουθήσει ανάλυση αυτών καθώς και του ρόλου που μπορεί να παίζουν στην διαφοροποίηση της έκφρασης των γονιδίων στα οποία εδράζονται. Τέλος, όσον αφορά πολυμορφισμούς που εντοπίστηκαν σε ιντρονικές και άλλες μη κωδικές περιοχές περιοχές θα πρέπει να ερευνηθεί το ενδεχόμενο να εμπλέκονται σε διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος ή σε ρύθμιση μέσω μικρών rnas.

Ως προς την ανάλυση συσχέτισης ανάμεσα σε ασθενείς με διάχυτη και εντοπισμένη συστηματική σκλήρυνση, φαίνεται να απαιτείται αύξηση του αριθμού των δειγμάτων προκειμένου να προκύψουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Παρά το περιορισμένο αριθμό δειγμάτων της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφοροποιήσεις ως προς τις συχνότητες συνολικά πολυμορφισμών, οι οποίες απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Συμπερασματικά με βάση τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, τα γονίδια σχετικά με την βιταμίνη D φαίνεται να είναι καλοί υποψήφιοι στόχοι για περαιτέρω έρευνα, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση και διασαφήνιση της ανοσορυθμιστικής δράσης της βιταμίνης προκειμένου να μπορέσει να αξιοποιηθεί το πλειοτρόπο αυτό μόριο στην αντιμετώπιση συστηματικών αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η συστηματική σκλήρυνση.

Ως προς τους πολυμορφισμούς που φάνηκε να διαφοροποιούνται σημαντικά στα δύο μέρη της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, απαιτείται να διερευνηθεί περαιτέρω ο λειτουργικός τους ρόλος καθώς και το ενδεχόμενο να αποτελούν δείκτες για άλλους πολυμορφισμούς με τους οποίους βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης.

Επιπλέον θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μετρήσεις των συνολικών επιπέδων της βιταμίνης D καθώς και της ενεργού της μορφής σε όλα τα δείγματα που γονοτυπήθηκαν στη παρούσα ανάλυση, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στους υπό μελέτη σημειακούς πολυμορφισμούς και την επάρκεια σε βιταμίνη D.

Ακόμα, προκειμένου να ενισχυθεί η αξιοπιστία και η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, απαιτείται συνέχιση της έρευνας με χρήση περισσότερων δειγμάτων από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, απαιτείται διεύρυνση της έρευνας σε μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών, εκτός των αλληλουχιών των έντεκα γονιδίων, όπως για παράδειγμα πολυμορφισμούς σε μη κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές καθώς και πολυμορφισμούς σε περιοχές σχετικές με ρύθμιση μέσω μικρών μορίων RNA, τα οποία έχει ήδη δείχθει πως εμπλέκονται τόσο στη παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης, όσο και σε ανεπάρκειες της βιταμίνης D.

5. Βιβλιογραφία

1. Allanore, Y., Simms, R., Distler, O., Trojanowska, M., Pope, J., Denton, C. P., & Varga, J. Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 1 (2015).
2. Gloria Salazar, MD and Maureen D. Mayes, 'Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis' HHS Public Access, 2015
3. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6(JUN). doi:10.3389/fimmu.2015.00272
4. Tsou PS, Sawalha AH. Unfolding the pathogenesis of scleroderma through genomics and epigenomics. *J Autoimmun*. 2017 Sep;83:73-94
5. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* (2009) 360:1989–2003
6. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(3):134–44
7. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* (2007) 117:557–67. doi:10.1172/JCI31139
8. Van den Hoogen, F. et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum*. 65, 2737–2747 (2013).
9. Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24:165–170.
10. Steen, V. D. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum*. 35, 35–42 (2005).
11. Dospinescu, P., Jones, G. T. & Basu, N. Environmental risk factors in systemic sclerosis. *Curr. Opin. Rheumatol*. 25, 179–183 (2013).
12. Lunardi, C. et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med*. 3, e2 (2006).
13. Wang, Y. Y. et al. DNA hypermethylation of the forkhead box protein 3 (FOXP3) promoter in CD4+ T cells of patients with systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol*. 171, 39–47 (2014).
14. Maurer, B. et al. MicroRNA 29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 62, 1733–1743 (2010).
15. H, Li Y, Qu S, Luo H, Zhou Y, Wang Y, et al. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *J Clin Immunol*. 2012;32:514–22Z
16. Wang Z, Jinnin M, Nakamura K, Harada M, Kudo H, Nakayama W, et al. Long non-coding RNA TSIX is upregulated in scleroderma dermal fibroblasts and controls collagen mRNA stabilization. *Exp Dermatol*. 2016;25:131–6.
17. Zhou B, Zhu H, Luo H, Gao S, Dai X, Li Y, et al. MicroRNA-202-3p regulates scleroderma fibrosis by targeting matrix metalloproteinase 1. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:412–8
18. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(1):102-111. doi:10.1007/s12016-011-8294-7
19. Sara M. Garret, DeAnna Baker Frost, and Carol Feghali-Bostwick 'The mighty fibroblast and its utility in scleroderma research', HHS Public Access 2017
20. Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends Mol Med* 2006;12:90-8.)
21. Dieudé, P. et al. BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4. *Arthritis Rheum*. 60, 3447–3454 (2009).
22. Allanore, Y. et al. Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet*. 7, e1002091 (2011).
23. Gorlova O, Martin JE, Rueda B, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genomewide association strategy. *PLoS Genet* 2011;7:e1002178

24. Martin JE, Assassi S, Diaz-Gallo LM, et al. A systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus pan-meta-GWAS reveals new shared susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2013; 22:4021–4029.
25. Zochling J, Newell F, Charlesworth JC, et al. An Immunochip-based interrogation of scleroderma susceptibility variants identifies a novel association at DNASE1L3. *Arthritis Res Ther* 2014; 16:438.
26. Mayes, M. D. et al. ImmunoChIP analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 47–61 (2014)
27. Dieudé, P. et al. STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum.* 60, 2472–2479 (2009).
28. Radstake, T. R. D. J. et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat. Genet.* 42, 426–429 (2010).
29. Pers, T.H. et al. Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions. *Nat. Commun.* 6, 5890 (2015).
30. Dusso AS, Brown AJ, Vitamin SE (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1):F8–F28
31. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S (1997) 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 277(5333):1827–1830
32. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, et al. (2011) Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev* 10: 733–743
33. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW (July 2010). "A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 121 (1–2): 471–7
34. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP (2004). "Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms". *Gene.* 338 (2): 143–56. doi:10.1016/j.gene.2004.05.014
35. Malloy PJ, Hochberg Z, Tiosano D, Pike JW, Hughes MR, Feldman D (1991). "The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D3 resistant rickets in seven related families". *J. Clin. Invest.* 86 (6): 2071–9.
36. Sone T, Marx SJ, Liberman UA, Pike JW (1991). "A unique point mutation in the human vitamin D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3". *Mol. Endocrinol.* 4 (4): 623–31.
37. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):685–98.
38. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet.*2010;376(9736):180-8.
39. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Vitamin D receptor Apal, TaqI, BsmI, and FokI polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Molecular biology reports.* 2012;39(6):6471-8.
40. Li JH, Li HQ, Li Z, Liu Y, Gao JR, Zeng XJ, et al. [Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection]. *Zhonghua yi xue za zhi.* 2006;86(28):1952-6.
41. Lee YH, Bae S-C, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Molecular biology reports.* 2011;38(6):3643-51.
42. Mun MJ, Kim TH, Hwang JY, Jang WC. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk for female reproductive cancers: A meta-analysis. *Maturitas.* 2015;81(2):256-65.
43. Feng M, Li H, Chen S-F, Li W-F, Zhang F-B. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine.* 2013;43(2):318-26.
44. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S et al (1997) Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 11(8):1165–1179

45. Monticcielo OA, Teixeira Tde M, Chies JA, Brenol JC, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.*2012;31(10):1411–21
46. Kostner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.* 2009;29(9):3511–36.
47. Polymorphism rs2239185 in vitamin D receptor gene is associated with severe community-acquired pneumonia of children in Chinese Han population: a case-control study
48. Correale J, Ysrraelit MC, Gaitan MI (2009) Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 132: 1146–1160
49. Saccone D, Asani F, Bornman L (2015) Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene* 561: 171–180
50. Mengping Wua, Ming Yueb, Peng Huang, Yun Zhang Chaonan Xiea, Rongbin Yu, Jun Li, Jie Wang. Vitamin D level and vitamin D receptor genetic variations contribute to HCV infection susceptibility and chronicity in a Chinese population. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* [08 Apr 2016, 41:146-152]
51. K. Tizaoui, W. Kaabachi, A. Hamzaoui, K. Hamzaoui, Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies, *Cell. Mol. Immunol.* 12 (2) (2015) 243–252
52. Bhan I. Vitamin d binding protein and bone health. *International journal of endocrinology.*2014;2014:561214.
53. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genomewide association study of circulating vitamin D levels. *Human molecular genetics.* 2010;19(13):2739-45.
54. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcified tissue international.* 2005;77(1):15-22.
55. Kurylowicz A, Ramos-Lopez E, Bednarczyk T, Badenhop K. Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association.* 2006;114(6):329-35.
56. Tizaoui K, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Contribution of VDR polymorphisms to type 1 diabetes susceptibility: Systematic review of case-control studies and meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 143:240–9.
57. Fu L, Yun F, Oczak M, Wong BY, Vieth R, Cole DE. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clinical biochemistry.*
58. Lu L, Sheng H, Li H, Gan W, Liu C, Zhu J, et al. Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans. *Human genetics.* 2012;131(3):505-12.
59. Nissen J, Rasmussen LB, Ravn-Haren G, Andersen EW, Hansen B, Andersen R, et al. Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *PLoS One.* 2014;9(2):e89907.
60. Signorello LB, Shi J, Cai Q, Zheng W, Williams SM, Long J, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One.*2011;6(12):e28623.
61. Barry EL, Rees JR, Peacock JL, Mott LA, Amos CI, Bostick RM, et al. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of vitamin D3 supplementation for increasing

- serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(10):E2133-7
62. Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, Smyth DJ, Yang JHM, Walker NM, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(10):2616-21.
 63. Alloza I, Otaegui D, de Lapuente AL, Antiguada A, Varade J, Nunez C, et al. ANKRD55 and DHCR7 are novel multiple sclerosis risk loci. *Genes and immunity*. 2012;13(3):253-7.
 64. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
 65. K.C. Simon, K.L. Munger, X. Yang, A. Ascherio, Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis, *Mult. Scler*. 16 (2) (2010) 133–138.
 66. T. Fukazawa, I. Yabe, S. Kikuchi, H. Sasaki, T. Hamada, K. Miyasaka, et al., Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese, *J. Neurol. Sci*. 166 (1) (1999) 47–52.
 67. Kaseda, Hosojima M, Sato H, Saito A. Role of megalin and cubilin in the metabolism of vitamin D(3). *Ther Apher Dial*. 2011 Jun;15 Suppl 1:14-7
 68. Aggarwal , Kállay . Cross Talk between the Calcium-Sensing Receptor and the Vitamin D System in Prevention of Cancer. *Front Physiol*. 2016 Oct 18;7:451.
 69. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (January 1992). "Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling". *Nature*. 355 (6359): 446–9
 70. Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, Steiner RD, Porter FD (Jul 1998). "Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome". *American Journal of Human Genetics*. 63 (1): 55–62.
 71. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*,