



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

**Σύνοψη Πεδίου : Γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σιδήρου και η
συσχέτιση τους με μολυσματικές ασθένειες**

Στογιαννούδη Μαρκέλλα

Πτυχιακή Εργασία

Επιβλέπουσα

Μπράλιου Γεωργία

Λαμία , 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**Σύνοψη Πεδίου : Γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σιδήρου
και η συσχέτιση τους με μολυσματικές ασθένειες**

Στογιαννούδη Μαρκέλλα

Πτυχιακή Εργασία

Επιβλέπουσα

Μπράλιου Γεωργία

Επίκουρος καθηγήτρια

Λαμία , 2023

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις (1) , που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν.1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία:/...../20.....

Η Δηλ.

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

**Σύνοψη Πεδίου : Γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σιδήρου
και η συσχέτιση τους με μολυσματικές ασθένειες**

Στογιαννούδη Μαρκέλλα

Τριμελής Επιτροπή :

Μπράλιου Γεωργία, Επίκουρος καθηγήτρια

Μπάγκος Παντελής, Καθηγητής

Κοντού Παναγιώτα, Επίκουρος καθηγήτρια

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Γεωργία Μπράλιου για την πολύτιμη βοήθεια καθώς και για τη συνεχή και στοχευμένη καθοδήγηση της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Ελισάβετ Μαρία Ανδρονίδου για την παροχή χρήσιμων πληροφοριών καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και στους φίλους μου για την καθημερινή τους στήριξη και την προτροπή τους να κυνηγώ πάντα τους στόχους μου.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	9-10
Abstract	11
Στόχοι Πτυχιακής	12
Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Υπόβαθρο	13
1.1 Γονίδιο	13-15
1.1.1 Γονιδιακή Έκφραση	15-18
1.1.2 Ρύθμιση Γονιδιακής Έκφρασης	18-20
1.2 Σίδηρος	21
1.2.1 Ιστορική Αναδρομή	21-22
1.2.2 Απορρόφηση-Μεταφορά-Ομοιόσταση Σιδήρου	22-23
1.2.3 Διαταραχές στον μεταβολισμό του σιδήρου και συσχέτιση με την πιθανότητα εκδήλωσης μολυσματικών ασθενειών	23-24
1.2.4 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου.....	24-25
1.2.5 Επαναστόχευση φαρμάκων (Drug repositioning) και Σίδηρος.....	25-26
1.3 Βάση Δεδομένων GeneOntology και Γονίδια Σιδήρου	26-27
1.4 Μετα-ανάλυση και Συστηματική Ανασκόπηση.....	27
1.4.1 Συστηματική Ανασκόπηση (Systematic Review)	27
1.4.1.1 Βήματα Συστηματικής Ανασκόπησης	27-28
1.4.1.2 Πλεονεκτήματα Συστηματικής Ανασκόπησης	28
1.4.2 Μετα-ανάλυση	28-29
1.4.2.1 Βήματα Μετα-ανάλυσης	29-30
1.4.2.2 Σημαντικές Έννοιες στη Μετα-ανάλυση	30-31
1.4.2.3 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	32
1.4.3 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων	32-34
Κεφάλαιο 2. Μεθοδολογία	35
2.1 Εργαλεία	35-39
2.2 Βήματα Συστηματικής Ανασκόπησης Μετα-αναλύσεων	39-41
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	42
3.1 Αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο στη βάση GeneOntology	42-44

3.2 Βιβλιογραφική αναζήτηση για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο και με μολυσματικές ασθένειες.....	45-47
3.3 Περιγραφική Στατιστική	48-53
3.4 Έλεγχος Γενετικής Συσχέτισης Γονιδίων με Ανθρώπινες Ασθένειες Σιδήρου	54-58
3.5 Δημιουργία , Ανάλυση και Αξιολόγηση Δικτύων Συσχετίσεων	58-61
3.6 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από KEGG Database	61-65
3.7 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από STRING Database	65-69
3.8 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από g:Profiler	69-71
Κεφάλαιο 4. Συμπέρασμα – Συζήτηση	73-74
Κεφάλαιο 5. Βιβλιογραφία	75-81
Κεφάλαιο 6. Παράρτημα	83-87

Περίληψη

Ο σίδηρος είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τους παθογόνους μικροοργανισμούς που τον προσβάλλουν. Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που χρησιμεύει ως προσθετική ομάδα σε πολλά ένζυμα που ρυθμίζουν ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Επειδή ο σίδηρος είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η έμφυτη ανοσία του ανθρώπου έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να στερεί τον σίδηρο από τους παθογόνους εισβολείς, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται διατροφική ανοσία. Στην παρούσα εργασία επιδιώξαμε να εντοπίσουμε όλα τα γονίδια που συσχετίζονται με το σίδηρο και τα οποία σχετίζονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με μολυσματικές ασθένειες. Με τον τρόπο αυτόν θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε άτομα, τα οποία που με αλλαγή διατροφής θα μπορούσαν να θεραπευτούν πιο εύκολα από μολυσματικές ασθένειες. Εντοπίσαμε και τα 357 γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου από τη βάση δεδομένων GEO. Μια βιβλιογραφική αναζήτηση στη PubMed όλων των δημοσιευμένων μετα-αναλύσεων σχετικά με τους πολυμορφισμούς αυτών των γονιδίων που σχετίζονται με λοιμώδη νοσήματα οδήγησε σε 1228 άρθρα εκ των οποίων μόνο 43 πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής. Η καταγραφή των δεδομένων περιλάμβανε, μεταξύ άλλων, τον λόγο Odds Ratio (OR), για όλους τους τρόπους κληρονομικότητας, το 95% CI, τον αριθμό των μελετών και των συμμετεχόντων. Καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικά δεδομένα συσχέτισης γονιδίων:ασθενειών από 115 μετα-αναλύσεις που περιλάμβαναν 1011 μελέτες ασθενών-μαρτύρων με 181.194 ασθενείς και 303.884 υγής. Είκοσι ένα γονίδια βρέθηκαν να σχετίζονται με μία ή περισσότερες ασθένειες που προκαλούνται είτε από βακτήρια, είτε από παράσιτα, είτε από ιούς. Δεκατέσσερα γονίδια βρέθηκαν να σχετίζονται με ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια, επτά με ασθένειες από παράσιτα και μόνο το γονίδιο SLC11A1 ήταν κοινό. Τέλος, μόνο δύο γονίδια παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με ασθένειες που προκαλούνται από ιούς, ενώ το γονίδιο TNF ήταν κοινό και με τα γονίδια που σχετίζονται με βακτηριακές λοιμώξεις. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε οπτικοποίηση του δικτύου συσχέτισης γονιδίων: ασθενειών (Cytoscape 3.0), ενώ η χρήση της βάσης KEGG Pathway αποκάλυψε ότι επτά ζεύγη γονιδίων: ασθενειών (από τα 34) ήταν κοινά με αυτά της βάσης KEGG, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα υπόλοιπα 27 θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως νέες ενημερωμένες καταχωρήσεις που πρέπει να εισαχθούν στη KEGG. Επιπλέον, η αναζήτηση συσχέτισης με ασθένειες αυτών των 21 γονιδίων στη βάση δεδομένων KEGG αποκάλυψε 72 ακόμη συσχετίσεις (FDR 0,05), οι οποίες προτείνουμε να διερευνηθούν περαιτέρω. Η χρήση της STRING Database έδειξε πως 16 από τα γονίδια της έρευνάς μας σχετίζονται με την

πρωτεϊνική δέσμευση, ενώ 19 σχετίζονται με μεμβράνες. Τέλος, παρατηρήθηκαν 6 κοινές αλληλεπιδράσεις γονιδίων (από τις 48) μεταξύ των δικών μας αποτελεσμάτων και αυτών της βάσης δεδομένων STRING.

Abstract

Iron is an essential nutrient for both humans and pathogenic microorganisms that infect them. It is an indispensable metal that serves as a cofactor for many enzymes regulating vital cellular functions. Because iron is important for pathogens, human innate immunity has been evolved such as to deprive iron from pathogenic invaders, a procedure called nutritional immunity. In the present work we set out to identify all iron related genes that are statistically significant associated with infectious disease. In this way we could identify individuals who, with a change in diet, could be more easily cured of infectious diseases. We identified all 357 genes associated with iron metabolism from GEO database. A PubMed literature search of all published meta-analyses on polymorphisms of these genes associated with infectious diseases resulted in 1228 articles of which only 43 fulfilled eligible criteria. Data recording included, among others, the metric Odds Ratio (OR), for all modes of inheritance, 95% CI, number of studies and participants. Statistically significant gene-disease association data were recorded from 115 meta-analyses comprising 1011 cases-controls studies with 181,194 cases and 303,884 controls. Twenty-one genes were found to be associated with one or more diseases caused by either bacteria, parasites, or viruses. Fourteen genes were found to be associated with bacteria caused diseases, seven with parasite diseases and only SLC11A1 was common. Finally, only two genes showed statistically significant association with viral diseases, while TNF gene was common with the bacteria infections-associated genes. Validation of the gene-disease association network (Cytoscape 3.0) created herein, with KEGG-Pathway enrichment analysis revealed that seven gene-disease pairs (from 34) were common with KEGG, suggesting that the rest 27 could be considered as new updated entries in KEGG. Moreover, search for disease association of these 21 genes in KEGG database revealed 72 more associations (FDR 0.05) that we propose to be further investigated. The use of the STRING Database showed that 16 of the genes in our study are associated with protein binding, while 19 are associated with membranes. Finally, 6 common gene interactions (out of 48) were observed between our results and those of the STRING Database.

Στόχοι Πτυχιακής

Στην παρούσα εργασία επιδιώξαμε να εντοπίσουμε όλα τα γονίδια που συσχετίζονται με το σίδηρο και τα οποία σχετίζονται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με μολυσματικές ασθένειες. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε άτομα που με αλλαγή διατροφής θα μπορούσαν να θεραπευτούν πιο εύκολα από μολυσματικές ασθένειες. Αρχικά ο στόχος της πτυχιακής ήταν η συλλογή και η καταγραφή όλων των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου και με μολυσματικές ασθένειες και στη συνέχεια η αξιολόγηση της μεθόδου μας με σύγκριση άλλων προσεγγίσεων με σκοπό την καλύτερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας. Επιπλέον ένας ακόμα στόχος μας ήταν η ταυτοποίηση των συσχετίσεων των γονιδίων-ασθενειών (gene-disease), ώστε αυτές να λειτουργήσουν ως εργαλείο πρόγνωσης / διάγνωσης ασθενειών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου. Επίσης η δημιουργία δικτύων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία ανίχνευσης των ασθενειών, θα μπορούσε να βοηθήσει στην επαναστόχευση φαρμάκων (Drug Repositioning).

Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

1.1 Γονίδιο

Η έννοια του γονιδίου καταγράφηκε πρωτίστως όταν ο Gregor Mendel παρατήρησε ότι οι βιολογικές μεταβολές είναι διακριτά χαρακτηριστικά και διατηρούνται σε μία γενεαλογική γραμμή. Ως γονίδια ονομάστηκαν οι παράγοντες, που είναι υπεύθυνοι για τον καθορισμό των γνωρισμάτων, αλλά η βιολογική βάση για την κληρονομικότητα παρέμεινε άγνωστη μέχρι την αναγνώριση του DNA ως το γενετικό υλικό κατά τη δεκαετία του 40'. Το 1944 οι Avery McLeod και McCarty απέδειξαν ότι το DNA ήταν η δραστική ουσία στον βακτηριακό μετασχηματισμό, ενώ λίγα χρόνια αργότερα ο Alfred Hershey και ο Martha Case απέδειξαν ότι κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με βακτηριοφάγο, στο κύτταρο ξενιστή εισέρχεται μόνο το DNA και όχι οι πρωτεΐνες. Ένας πιο σύγχρονος ορισμός για το γονίδιο είναι ο εξής : “ ένα σύνολο διαδοχικά διατεταγμένων νουκλεοτιδίων που καθορίζουν την αμινοξική αλληλουχία μιας κυτταρικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας.”

Όλοι οι οργανισμοί έχουν πολλά γονίδια που αντιστοιχούν σε πολλά διαφορετικά γνωρίσματα, μερικά από τα οποία είναι άμεσα ορατά όπως αυτά που σχετίζονται με την εμφάνισή μας, και άλλα όχι, όπως ο τύπος αίματος ή η προδιάθεση για την εκδήλωση συγκεκριμένων ασθενειών. Συνεπώς το γονίδιο αποτελεί τον φορέα της κληρονομικής πληροφορίας σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα τα γονίδια είναι αλληλουχίες βάσεων DNA, οι οποίες διαθέτουν πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση ενός πολυπεπτιδίου ή ενός μορίου RNA, το οποίο έχει μια λειτουργικότητα στον οργανισμό. Επομένως όλες οι πρωτεΐνες και οι λειτουργικές αλυσίδες RNA καθορίζονται από τα γονίδια και αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί εξαρτώνται από τα γονίδια[1].

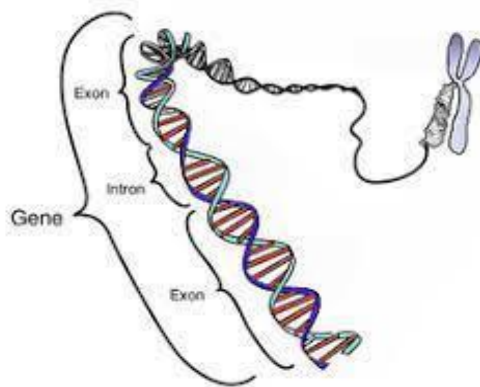
Τα γονίδια διακρίνονται σε δύο είδη. Πρώτον αυτά που μεταγράφονται σε mRNA και στη συνέχεια μεταφράζονται σε πρωτεΐνες (protein-coding genes) και δεύτερον αυτά που μεταγράφονται σε RNA τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (RNA-specifying genes) όπως tRNA (προσαρμογέας μετάφρασης), rRNA (δομικό και λειτουργικό στοιχείο του ριβοσώματος), miRNA (καταστολέας μετάφρασης), siRNA (καταστολέας μετάφρασης) και snRNA (συσκευή σύνδεσης RNA). Η κωδικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται μέσα από μία σειρά τρι-νουκλεοτιδικών ακολουθιών που ονομάζονται κωδικόνια, τα οποία χρησιμεύουν ως λέξεις στη γενετική γλώσσα. Ο γενετικός κώδικας καθορίζει την αλληλεπίδραση, κατά τη μετάφραση της πρωτεΐνης, μεταξύ των κωδικονίων και των αμινοξέων. Η παραγωγή μίας λειτουργικής πρωτεΐνης ή ενός μορίου RNA αποτελεί μία κυτταρική διαδικασία που

ονομάζεται γονιδιακή έκφραση, η οποία εμφανίζεται σε όλες τις γνωστές μορφές ζωής, συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών οργανισμών, των προκαρυωτικών καθώς και των ιών. Η γονιδιακή έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί σε διάφορα στάδια της διαδικασίας της, όπως στη μεταγραφή, στις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, στη μετάφραση αλλά και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Ωστόσο όλα τα γονίδια έχουν και περιοχές, που δεν κωδικοποιούν ρητά μια πρωτεΐνη ή μία RNA αλυσίδα, αλλά περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για μόρια προσδέτες που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της μεταγραφής. Στην πλειονότητα των γονιδίων εμφανίζεται μια ρυθμιστική περιοχή γνωστή ως υποκινητής (promoter) και αναγνωρίζεται από τη μεταγραφική μηχανή, όταν ένα γονίδιο πρόκειται να μεταγραφεί και να εκφραστεί. Ένα γονίδιο ενδέχεται να περιέχει και περισσότερους από έναν υποκινητές. Επίσης υπάρχουν και περιοχές γνωστές ως ιντρόνια ή εσόνια που περιέχονται στα γονίδια ευκαρυωτικών οργανισμών και αφαιρούνται από το mRNA σε μια διαδικασία γνωστή ως μάτισμα ή ωρίμανση του mRNA που γίνεται στον πυρήνα.

Επιπρόσθετα παρατηρούνται και ορισμένες περιοχές στο γονιδίωμα που περιέχουν ψευδογονίδια. Τα ψευδογονίδια ορίζονται ως εκφυλισμένα γονίδια, τα οποία έχουν μεταλλαχθεί σε διαφορετικές μορφές σε σχέση με τις αρχικές αλληλουχίες έτσι ώστε η πολυπεπτιδική αλυσίδα που κωδικοποιούν να μην είναι λειτουργική. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα ψευδογονίδια έχουν προσληφθεί στο DNA μέσω ιών με αντίστροφη μεταγραφή. Αυτό αναγνωρίζεται και από το γεγονός της απουσίας των ιντρονίων.

Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας ενός οργανισμού, καθώς και η πλήρης αλληλουχία DNA ή RNA ενός ιού, ονομάζεται γονιδίωμα. Δηλαδή το σύνολο όλων των γονιδίων, το μη κωδικοποιητικό DNA, το μιτοχονδριακό DNA αλλά και το DNA των χλωροπλαστών, αν και τα τελευταία εξετάζονται και ανεξάρτητα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται περίπου από 23.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο, ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος είναι σχετικά φτωχές σε γονίδια κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Επιπλέον, σε έναν ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν 10 τρισεκατομμύρια κύτταρα, η κατανομή των οποίων γίνεται σε 210 περίπου είδη, μερικά εκ των οποίων είναι τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα νευρικά κύτταρα. Είναι αξιοσημείωτο πως τα 23.000 γονίδια μπορούν να καθορίσουν τη δομή ενός πολύπλοκου οργανισμού, όπως αυτόν των θηλαστικών. Οι κύριοι λόγοι που το επιτρέπουν αυτό είναι η καθορισμένη από το είδος του κυττάρου γονιδιακή έκφραση (cell-type specific gene expression), η καθορισμένη από τον ιστό γονιδιακή μεταγραφή (tissue specific gene transcription), η μετα-μεταγραφική αλλαγή του RNA (RNA editing) και η εναλλακτική συρραφή εξονίων (alternative splicing) [2][3].



Εικόνα 1: Απεικόνιση γονιδίων στο χρωμόσωμα. Πηγή: <https://el.wikipedia.org/wiki/Γονίδιο>

1.1.1. Γονιδιακή Έκφραση

Η γονιδιακή έκφραση είναι η διαδικασία κατά την οποία οι πληροφορίες από ένα γονίδιο χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση ενός λειτουργικού γονιδιακού προϊόντος, το οποίο παράγει στη συνέχεια προϊόντα όπως είναι πρωτεΐνες ή το μη κωδικοποιητικό RNA. Ως τελικό αποτέλεσμα η γονιδιακή έκφραση έχει τον καθορισμό του φαινοτύπου. Η διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τους προκαρυωτικούς αλλά και τους ιούς. Στη γενετική, η γονιδιακή έκφραση είναι το θεμελιώδες επίπεδο κατά το οποίο ο γονότυπος δημιουργεί τον φαινότυπο, δηλαδή το παρατηρήσιμο χαρακτηριστικό. Οι γενετικές πληροφορίες που αποθηκεύονται στο DNA αντιπροσωπεύουν τον γονότυπο, ενώ ο φαινότυπος προκύπτει από την αποσαφήνιση των πληροφοριών αυτών.

Τα ανθρώπινα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν σε διαφορετικά όργανα τις κατάλληλες πρωτεΐνες ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Τα κύτταρα δεν επιλέγουν μόνο ποιες πρωτεΐνες θα δημιουργηθούν αλλά και ποιος θα είναι ο ρυθμός παραγωγής τους, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται μέσω ποικίλων μηχανισμών. Μερικοί από αυτούς περιλαμβάνουν τη δέσμευση πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, για τον έλεγχο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η διαδικασία της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να διαφοροποιηθεί σε διάφορα στάδια της, ξεκινώντας από τη μεταγραφή έως τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο και κατ'επέκταση ο οργανισμός μπορεί να ανταποκριθεί σε διάφορα ερεθίσματα, να αποκτήσει ευελιξία και προσαρμοστικότητα. Παρακάτω παρουσιάζεται μία περιγραφή των σταδίων του μηχανισμού της γονιδιακής έκφρασης[4].

Μεταγραφή

Η μεταγραφή χαρακτηρίζεται ως το πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης και σχετίζεται με την δημιουργία ενός μορίου RNA, έχοντας ως πρότυπο μία αλυσίδα DNA, με την οποία είναι συμπληρωματικό. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η μεταγραφή της γενετικής πληροφορίας από τη γλώσσα του DNA στη γλώσσα του RNA, με τη μόνη διαφορά πως η βάση της θυμίνης αντικαθίσταται από ουρακίλη. Η διαδικασία της μεταγραφής λαμβάνει χώρα στον πυρήνα των κυττάρων ή στο πυρηνοειδές των προκαρυωτικών, καθώς επίσης και στα μιτοχόνδρια και στους χλωροπλάστες. Στόχος της είναι η μεταφορά των απαραίτητων γενετικών πληροφοριών από το DNA στο RNA το οποίο δεσμεύεται στα ριβοσώματα, ώστε να διεξαχθεί η σύνθεση των πρωτεϊνών. Ένα χαρακτηριστικό της μεταγραφής είναι ότι μπορεί να υλοποιηθεί ταυτόχρονα αρκετές φορές, επιταχύνοντας με αυτόν τον τρόπο τις διεργασίες του κυττάρου. Το φαινόμενο της αντίστροφης μεταγραφής συμβαίνει σπανιότερα, αλλά παρατηρείται κυρίως στους ρετροϊούς με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

Για την διεξαγωγή της μεταγραφής απαιτούνται εκτός από τη μήτρα του DNA, το ένζυμο που θα καταλύσει την αντίδραση (RNA πολυμεράση), τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια (NTP, Nucleoside Triphosphates), μικρομοριακοί και μεγαλομοριακοί παράγοντες. Σε αντίθεση με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, που διαθέτουν μία μοναδική RNA πολυμεράση, οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί κατέχουν τρεις διαφορετικές RNA πολυμεράσες, όπου κάθε μία μεταγράφει διαφορετικές κατηγορίες γονιδίων.

Πριν ξεκινήσει η μεταγραφή η διπλή έλικα του DNA ξετυλίγεται σε μία μικρή περιοχή, η οποία βρίσκεται δίπλα σε ένα γονίδιο, και μία RNA πολυμεράση καταλύει την σύνθεση ενός μορίου RNA με κατεύθυνση 5' προς 3' κατά μήκος της αλυσίδας του DNA. Η αλυσίδα αυτή του DNA ονομάζεται μήτρα ή αλλιώς μη κωδική ή μεταγραφόμενη και έχει κατεύθυνση 3' προς 5'. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως μόνο η μία από τις δύο αλυσίδες του DNA μεταγράφεται σε RNA, αυτό συμβαίνει καθώς το RNA είναι μονόκλωνο σε αντίθεση με το DNA που έχει διπλή έλικα. Η άλλη έλικα του DNA ονομάζεται κωδική ή μη μεταγραφόμενη και έχει την ίδια αλληλουχία με εκείνη του μεταγράφου RNA, με τη διαφορά ότι στη θέση της ουρακίλης υπάρχει θυμίνη.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το RNA που προκύπτει από την μεταγραφή, δηλαδή το πρωτογενές μετάγραφο RNA (pre-mRNA), πρέπει αρχικά να τροποποιηθεί στον πυρήνα και ύστερα να μεταφερθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκονται τα ριβοσώματα, για να μεταφραστεί. Η τροποποίηση του pre-mRNA είναι γνωστή ως ωρίμανση

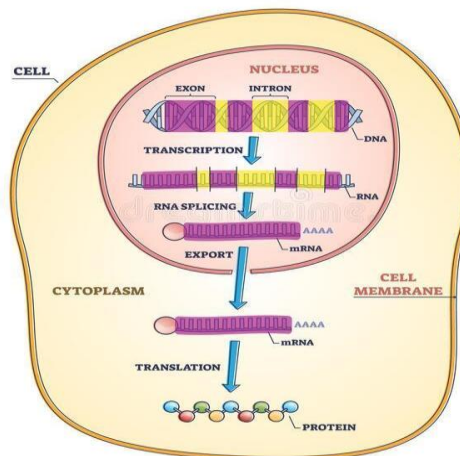
του RNA (RNA processing) και περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ιντρονίων, καθώς και την προσθήκη μιας καλύπτρας στο 5' άκρο και μιας polyA ουράς στο 3' άκρο. Κάθε ευκαρυωτικό mRNA πρέπει να υφίσταται την κατάλληλη επεξεργασία πριν την μετάφρασή του.

Μετάφραση

Η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης πραγματοποιείται στα ριβοσώματα, όπου η γενετική πληροφορία που μεταφέρει το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) μεταφράζεται με τη βοήθεια του γενετικού κώδικα. Σύμφωνα με αυτόν κάθε τριπλέτα νουκλεοτιδίων (κωδικόνιο) του mRNA αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η μετάφραση είναι μία πολύπλοκη αλλά και ιδιαίτερα ακριβής διαδικασία, η οποία απαιτεί αρκετούς πρωτεϊνικούς παράγοντες. Τα τρία βασικά στάδιά της είναι η έναρξη, η επιμήκυνση και ο τερματισμός και είναι παρόμοια και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και στους ευκαρυωτικούς. Η έναρξη σηματοδοτείται από το κωδικόνιο AUG (μεθειονίνη), ενώ ο τερματισμός προκαλείται από την αλληλεπίδραση ενός παράγοντα απελευθέρωσης με ένα κωδικόνιο τερματισμού. Κατά το στάδιο της επιμήκυνσης το σύμπλοκο των ριβοσωμάτων βοηθάει τα μεταφορικά RNA να συνδεθούν με το αγγελιοφόρο RNA και συνδέει το αμινοξέα από κάθε μεταφορικό RNA ώστε να δημιουργηθεί μία δομημένη πρωτεΐνη. Η υψηλή ακρίβεια του μηχανισμού της μετάφρασης προκύπτει από την δέσμευση κάθε αμινοξέος σε συγκεκριμένα μόρια μεταφορικού RNA (tRNA), καθώς και στην ειδική δέσμευση μεταξύ του κωδικονίου του mRNA με το συμπληρωματικό του αντικωδικόνιο του tRNA.

Στα προκαρυωτικά κύτταρα η μετάφραση εκτελείται συνήθως μαζί με την μεταγραφή, ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολλές διαφορετικές περιοχές του κυττάρου, ανάλογα με τη θέση που πρέπει να βρεθεί η πρωτεΐνη που θα παραχθεί. Στους προκαρυώτες οι πρωτεΐνες είτε εκκρίνονται είτε εντοπίζονται στην μεμβράνη του κυττάρου, σε αντίθεση με τους ευκαρυώτες που αρκετές πρωτεΐνες πρέπει να μεταφερθούν σε συγκεκριμένες κυτταρικές ομάδες. Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών καθορίζεται από μία σειρά γονιδίων, τα οποία παρουσιάζουν στο αμινοτελικό τους άκρο ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται σηματοδοτικές αλληλουχίες (signal sequences) ή αλληλουχίες οδηγού (leader sequences). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή Golgi και από εκεί δρομολογούνται προς τον τελικό τους προορισμό.

GENE EXPRESSION



Εικόνα 2: Απεικόνιση της γονιδιακής έκφρασης. Πηγή : <https://vectormine.com/item/gene-expression-stages-with-transcription-and-rna-splicing-outline-diagram/>

1.1.2. Ρύθμιση Γονιδιακής Έκφρασης

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι αναγκαία τόσο στους προκαρυώτες όσο και στους ευκαρυώτες, καθώς η ποσότητα παραγωγής λειτουργικών προϊόντων ενός κυττάρου μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Η δυνατότητα προσαρμογής των οργανισμών στις εκάστοτε αλλαγές του περιβάλλοντος είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση τους. Ο έλεγχος της ρύθμισης προσφέρει την ευελιξία στα κύτταρα να παράγουν τα προϊόντα που χρειάζονται καθώς και να ενεργοποιούν ή να απενεργοποιούν γονίδια την χρονική στιγμή που είναι απαραίτητο. Ένα παράδειγμα της σημασίας της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης είναι η αποσιώπηση του χρωμοσώματος X στα θηλυκά θηλαστικά, ώστε να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της “αντιστάθμισης δόσης” που προκύπτει, διότι τα γονίδια των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων περιέχουν διαφορετικούς αριθμούς αντιγράφων γονιδίων του χρωμοσώματος X. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως μία λανθασμένη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση σοβαρών ασθενειών.

Τα σημεία άσκησης ελέγχου της γονιδιακής ρύθμισης ποικίλλουν, καθώς ο έλεγχος μπορεί να συμβεί από το στάδιο της μεταγραφής του DNA σε RNA μέχρι και στη μεταμεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης. Οι διεργασίες ελέγχου κυρίως διαμεσολαβούνται από ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RNA-Binding proteins, RBPs). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ο έλεγχος της ρύθμισης είναι πιο πολύπλοκος σε σχέση με τον έλεγχο στα προκαρυωτικά, διότι στους ευκαρυώτες συναντάμε μεγαλύτερα γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από περισσότερους ρυθμιστικούς παράγοντες. Επιπλέον άλλος ένας παράγοντας είναι η διαμερισματοποίηση του

ευκαρυωτικού κυττάρου, καθώς επίσης και το πλήθος απαιτήσεων που προκύπτει από τους πολλούς κυτταρικούς τύπους που υπάρχουν σε αυτούς τους οργανισμούς.

Μεταγραφική ρύθμιση

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται κυρίως στο στάδιο της μεταγραφής. Το DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων δεν οργανώνεται σε οπερόνια αλλά κάθε γονίδιο έχει τον δικό του υποκινητή και μεταγράφεται αυτόνομα. Η RNA πολυμεράση λειτουργεί με τη βοήθεια των πρωτεϊνών, που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες, με τη διαφορά ότι στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι μεταγραφικοί παράγοντες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία.

Η αλληλεπίδραση ενός παράγοντα ελέγχου με το γονίδιο είναι η πιο άμεση μέθοδος με την οποία μπορεί να τροποποιηθεί η παραγωγή μιας πρωτεΐνης. Τα γονίδια περιλαμβάνουν στοιχεία γύρω από την κωδική τους περιοχή, τα οποία αλληλεπιδρούν με πλήθος μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη λειτουργία της μεταγραφής. Οι ρυθμιστικές αυτές περιοχές ποικίλλουν και μερικές εξ αυτών είναι γνωστές ως μονωτές, ενισχυτές, καταστολείς και σιγαστήρες. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την μεταγραφή εκτείνονται από τον αποκλεισμό της RNA-πολυμεράσης στις θέσεις δέσμευσης του DNA έως και την ενεργοποίηση και προώθηση της μεταγραφής, με την παροχή βοήθειας στην πρόσδεση της RNA-πολυμεράσης.

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να επηρεαστεί και από ενδοκυττάρια σήματα, προκαλώντας μία μετά-μεταγραφική τροποποίηση στις πρωτεΐνες, όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση και γλυκοζυλίωση. Με τις αλλαγές αυτές επηρεάζεται τόσο η ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα να προσδεθεί με τον υποκινητή του DNA, όσο και να προωθήσει την RNA-πολυμεράση ή να ευνοήσει την επιμήκυνση ενός πρόσφατα συντιθεμένου μορίου RNA. Επιπλέον η δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να ρυθμιστεί και από την πυρηνική μεμβράνη, μέσω της διάρκειας της παραμονής τους στον πυρήνα προκαλώντας μεταβολές στην δομή τους και δέσμευση διαφορετικών πρωτεϊνών. Ακόμα τροποποίηση των παραγόντων αυτών μπορούν να προκαλέσουν περιβαλλοντικά ερεθίσματα ή ενδοκρινικά σήματα.

Επιπρόσθετα ένας μηχανισμός που συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι οι μεταβολές των προτύπων μεθυλίωσης του DNA που σχετίζονται με αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Τα ευκαρυωτικά χρωμοσώματα διαθέτουν σύμπλοκα του DNA με ιστόνες. Η χημική τροποποίηση των ιστονών, μέσω ποικίλων αντιδράσεων, οδηγεί σε τροποποιήσεις των

αλληλεπιδράσεων DNA-ιστονών καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής λιγότερο ή περισσότερο προσβάσιμες.

Μετα- μεταγραφική ρύθμιση

Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς που εξασφαλίζουν πως μόνο τα μόρια που έχουν υποστεί πλήρη επεξεργασία θα εξέλθουν από τον πυρήνα. Οι μεταφορές εντός και εκτός του πυρήνα γίνονται με τη βοήθεια των πυρηνικών πόρων και ελέγχονται από ένα μεγάλο φάσμα πρωτεϊνών. Μόλις ολοκληρωθεί η δημιουργία του πρόδρομου mRNA, ακολουθεί μία σειρά διεργασιών, όπως η ωρίμανση και η επεξεργασία των 3' UTR. Οι διεργασίες αυτές εκτελούνται με τη συμβολή πρωτεϊνών, χάρη σε ένα μοτίβο αναγνώρισης του RNA, μέσω του οποίου προσδένονται σε συγκεκριμένες ακολουθίες ή δευτερεύουσες δομές των μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον σε ρύθμιση υπόκειται και η ταχύτητα με την οποία θα εξέλθει το mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

Μεταφραστική ρύθμιση

Η ρύθμιση της μετάφρασης είναι λιγότερο επικρατούσα από αυτή της μεταγραφής και πραγματοποιείται περιστασιακά. Ο έλεγχος της μετάφρασης αποτελεί έναν μηχανισμό στον οποίο συμμετέχουν πολλές ριβονουκλεοπρωτεΐνες και καθορίζεται κυρίως από τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι και ο ρόλος που έχουν οι δομές και τα στοιχεία στα αμετάφραστα άκρα των mRNAs . Τέτοιες δομές είναι οι δευτεροταγείς δομές δίκλωνου RNA (δομές φουρκέτας) και οι εσωτερικές θέσεις πρόσδεσης του ριβοσώματος που συμμετέχουν στον έλεγχο της μετάφρασης των mRNAs. Η δομή αυτών των στοιχείων, ενδέχεται να αλλάξει κατά την πρόσδεση πρωτεϊνών όπως συμβαίνει στα στοιχεία απόκρισης στον σίδηρο. Τέλος, η αναστολή της πρωτεϊνικής μετάφρασης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τις τοξίνες και τα αντιβιοτικά, που έχουν ως στόχο να σκοτώσουν ένα κύτταρο, επιτάσσοντας τον κανονικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης.

Μετα-μεταφραστική ρύθμιση

Μετά την έκφραση των πρωτεϊνών, τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ορισμένες εκ των οποίων είναι αναστρέψιμες. Η δέσμευση προσδετών μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών, για παράδειγμα μέσω αλλοστερικών μεταβολών . Επιπλέον το κύτταρο μπορεί να προβεί σε αποδόμηση της πρωτεΐνης, καθώς μία αχρείαστη ή κατεστραμμένη πρωτεΐνη μπορεί να οδηγηθεί σε υποβάθμιση με την προσθήκη ενός συγκεκριμένου συστατικού.

1.2 Σίδηρος

Ο σίδηρος είναι ένα βασικό θρεπτικό συστατικό για τον άνθρωπο, καθώς και για τους παθογόνους μικροοργανισμούς που τον προσβάλλουν. Αποτελεί ένα απαραίτητο μέταλλο που χρησιμεύει ως συμπληρωματική ομάδα για μία σειρά πρωτεϊνών που σχετίζονται με βασικές ζωτικές κυτταρικές λειτουργίες. Η συμμετοχή του σε αυτές τις διαδικασίες οφείλεται στο γεγονός ότι στον ανθρώπινο οργανισμό ο σίδηρος μπορεί να βρεθεί σε δύο καταστάσεις οξειδωσης Fe^{3+} και Fe^{2+} . Ωστόσο το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του συμβάλλει και στην τοξικότητα του. Ο μεταβολισμός του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό διατηρείται εξαιρετικά παρόλο που δεν υπάρχει οδός απέκκρισης σιδήρου. Ως αποτέλεσμα, η ομοιόσταση του σιδήρου έχει αναπτυχθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να συντονίζει αποτελεσματικά την απόκτηση, την αποθήκευση, τη μεταφορά και την ανακύκλωση του σιδήρου.

1.2.1 Ιστορική Αναδρομή

Ο Γαληνός (129-216 μ.Χ.) ήταν ο πρώτος που μίλησε για τη χρήση του σιδήρου στη θεραπευτική ακολουθώντας τη ρήση του Ιπποκράτη (460-377 π.Χ.) «ωφελείν ή μη βλάπτειν». Ο William Harvey το 1578 κάνει μια μικρή αναφορά για την ύπαρξη σιδήρου στην αιμοσφαιρίνη, ενώ ο Samuel Hahneman (1755-1843), χρησιμοποίησε σκευάσματα σιδήρου στην άσκηση ομοιοπαθητικής θεραπευτικής. Από τον 17ο αιώνα ο σίδηρος αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης, αλλά έως τη δεκαετία του 1930 δεν ήταν γνωστό σχεδόν τίποτα για τον μεταβολισμό του σιδήρου σε μοριακό επίπεδο. Ο Sydenham (1624-1689) ασχολήθηκε με τον τρόπο που δρα ο σίδηρος στον οργανισμό και τον συνέστησε ως θεραπεία για την αναιμία. Ο Jean B. Boussingault (1802-1887) ύστερα από αρκετά χρόνια απέδειξε μέσω αναλύσεων ότι ο σίδηρος είναι ουσιώδης ως θρεπτική ουσία. Το 1865, πρώτος ο Helix Hope-Seyler (1825-1895) αναφέρθηκε στην αιμοσφαιρίνη[5], ενώ ο Liebig (1803-1873) ήταν ο πρώτος που υπέθεσε πως ο σίδηρος της αιμοσφαιρίνης μεταφέρει το οξυγόνο. Το 1832 ξεκίνησε η θεραπευτική χρήση χαπιών σιδήρου σύμφωνα με μία αναφορά από το Pierre Blaud. Επίσης την ίδια χρονιά παρουσιάστηκαν δεδομένα που συνέδεαν τον ανόργανο σίδηρο με τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης από τον Castle. Στις περασμένες δεκαετίες, μελέτες απορρόφησης του σιδήρου που πραγματοποιήθηκαν με ραδιενεργά ισότοπα έδειξαν ότι ο ανόργανος σίδηρος πρέπει να είναι σε διαλυτή μορφή προκειμένου να απορροφηθεί από τον οργανισμό. Σχετικά με τα βρέφη και τα παιδιά ο Bunge περιέγραψε πρώτος το 1892 την σιδηροπενική αναιμία της βρεφικής ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γάλα αποτελεί φτωχή πηγή σιδήρου και ότι η υπερβολική χρήση γάλακτος στη διατροφή του παιδιού μετά την εξάντληση των αποθεμάτων σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε σιδηροπενία. Το 1928 η Mackay μελέτησε

την έλλειψη σιδήρου σε παιδιά αστικού πληθυσμού. Η πρώτη ολοκληρωμένη ανασκόπηση για τον μεταβολισμό του σιδήρου δημοσιεύτηκε το 1958 [6]. Έπειτα ακολούθησαν οι ανακαλύψεις του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (TfR) και του συστήματος ρύθμισης των ενδοκυττάρων επιπέδων του σιδήρου (IRP/IRE system) τις δεκαετίες του 1970 και του 1980 αντίστοιχα. Τα τελευταία χρόνια, οι γνώσεις μας αναφορικά με την ομοιόσταση του σιδήρου έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά και έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες στον σχεδιασμό καινοτόμων στρατηγικών για την πρόληψη και τη θεραπεία σοβαρών παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η ανακάλυψη της ορμόνης εψιδίνης (hepcidin), η οποία σε συνδυασμό με τη φερροπορτίνη ρυθμίζει τα επίπεδα του διαθέσιμου σιδήρου στο αίμα[7].

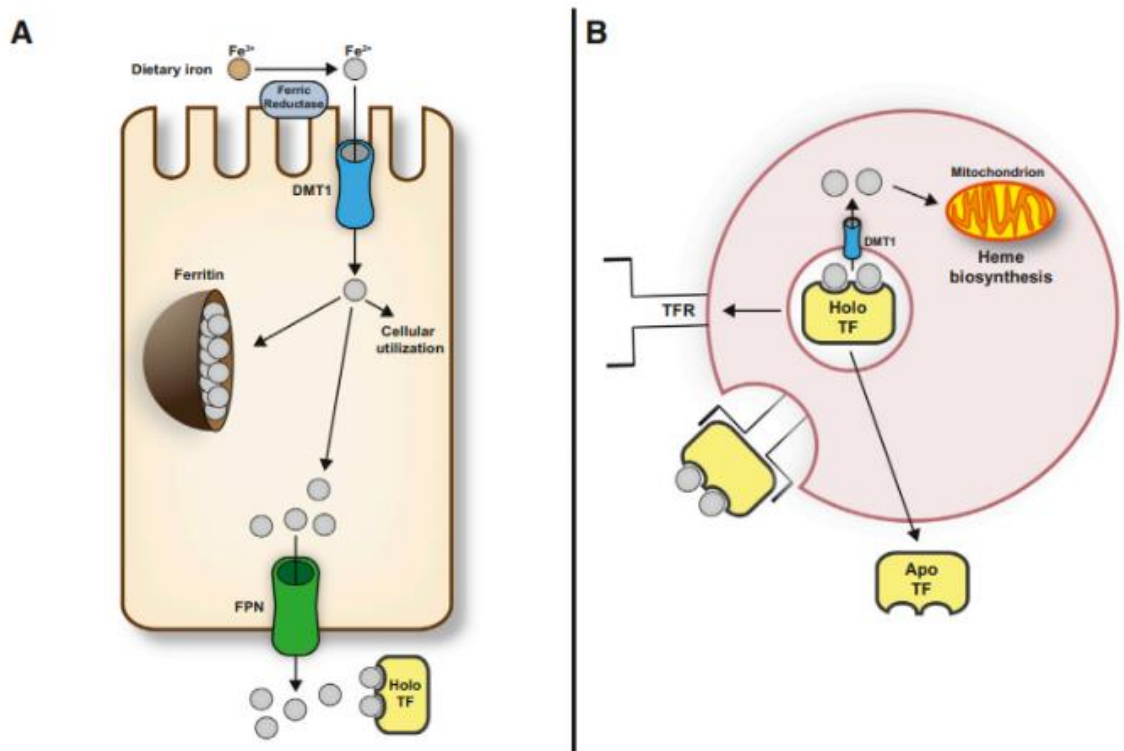
1.2.2 Απορρόφηση-Μεταφορά-Ομοιόσταση Σιδήρου

Όταν ο σίδηρος εισέλθει στον οργανισμό, δεν υπάρχει κάποιος φυσιολογικός τρόπος απομάκρυνσής του. Συνεπώς, εάν υπάρξει αύξηση για κάποιο λόγο της πρόσληψης σιδήρου προκαλείται υπερφόρτωση όλου του οργανισμού. Ως εκ τούτου, ο κύριος έλεγχος των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό πραγματοποιείται στο στάδιο της πρόσληψής του και ,πιο συγκεκριμένα, στο βήμα της μεταφοράς των ιόντων σιδήρου από τη βασική μεμβράνη των εντεροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Η πρόσληψη του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα μπορεί να γίνει με διαφορετικούς μηχανισμούς, είτε υπό τη μορφή της αίμης είτε ως ανόργανα άλατα σιδήρου. Τα δύο τρίτα περίπου του προσλαμβανόμενου σιδήρου εισέρχονται ως αίμη, ενώ το υπόλοιπο ένα τρίτο του σιδήρου προσλαμβάνεται ως ανόργανο άλας από τον μεταφορέα δισθενών μετάλλων (DMT-1) [8]. Σε οποιαδήποτε περίπτωση ο σίδηρος θα πρέπει στην συνέχεια είτε να μεταφερθεί προς την κυκλοφορία του αίματος είτε να αποθηκευτεί στη φερριτίνη (μπορεί να αποθηκεύει πάνω από 4000 άτομα σιδήρου). Η πρωτεΐνη φερροπορτίνη [9], η οποία βρίσκεται στην μεμβράνη των εντεροκυττάρων, είναι υπεύθυνη τόσο για την ρύθμιση του συνολικού σιδήρου όσο και για την μεταφορά του, όταν αυτό κριθεί απαραίτητο.

Ακόμα μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ρύθμιση της απορρόφησης και της απελευθέρωσης του σιδήρου είναι η εψιδίνη (hepcidin). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκλύεται στο ήπαρ και όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι επαρκή στον οργανισμό, συνδέεται με την φερροπορτίνη και την απενεργοποιεί, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την αναστολή της μεταφοράς του σιδήρου από το εσωτερικό των κυττάρων στο αίμα. Σε αντίθετη περίπτωση, όταν τα επίπεδα του σιδήρου είναι χαμηλά, η εψιδίνη μειώνεται με αποτέλεσμα η φερροπορτίνη να εισάγει τον σίδηρο στην κυκλοφορία του αίματος. Αξίζει να σημειωθεί πως

ο σίδηρος που μεταφέρεται από την φερροπορτίνη βρίσκεται στην δισθενή μορφή του και πρέπει στη συνέχεια να οξειδωθεί για να συνδεθεί στην τρανσφερίνη. Η τρανσφερίνη είναι υπεύθυνη για την μεταφορά, αλλά και την κατανομή του σιδήρου[10] [11].

Ο μεταβολισμός του σιδήρου δεν ελέγχεται από έναν καθορισμένο μηχανισμό, αλλά από ποικίλους που έχουν ως στόχο την αποφυγή οποιασδήποτε ανωμαλίας, που μπορεί να δημιουργήσει βλάβη που σχετίζεται είτε με ανεπάρκεια είτε με υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο.



Εικόνα 4: (A) Μεταφορά του σιδήρου στα εντεροκύτταρα μέσω της DMT-1. (B) Μεταφορά του σιδήρου από την DMT-1 στο κυτταρόπλασμα. Πηγή : Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*. 2013 May 15;13(5):509-519. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.010. [12]

1.2.3 Διαταραχές στον μεταβολισμό του σιδήρου και συσχέτιση με την πιθανότητα εκδήλωσης μολυσματικών ασθενειών

Η ρύθμιση της κατανομής του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό χρησιμεύει ως μηχανισμός ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς πολλές λοιμώξεις συνδέονται με τις μεταβολές της συγκέντρωσης του σιδήρου. Αρκετοί μολυσματικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των μυκήτων και των πρωτόζωων που προκαλούν ασθένειες απαιτούν σίδηρο για τη ανάπτυξή τους. Αυτοί οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει

μηχανισμούς, ώστε να δεσμεύουν τον σίδηρο του οργανισμού που προσβάλουν, με αποτέλεσμα να μπορούν να ευδοκιμήσουν, να πολλαπλασιαστούν και να αποικίσουν επιτυχώς. Οι μηχανισμοί ωστόσο που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη του στόχου τους εξαρτώνται τόσο από τη θέση του ξενιστή, όσο και από το αν το μικρόβιο υιοθετεί ενδοκυτταρικό ή εξωκυτταρικό τρόπο ζωής. Επιπλέον σημαντικό ρόλο στα παθογόνα βακτήρια για την επιλογή μηχανισμού δέσμευσης σιδήρου έχει και η προτιμώμενη πηγή σιδήρου που επιλέγουν, καθώς αυτός μπορεί να βρίσκεται είτε ελεύθερος είτε συνδεδεμένος με μόρια αίμης και αιμοσφαιρίνης. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται από το βακτήριο Μπορέλλια (*Borrelia burgdorferi*) είναι η χρήση μαγγανίου αντί για σιδήρου, εξαλείφοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη απόκτησης σιδήρου από τον ξενιστή. Άλλοι μηχανισμοί δέσμευσης σιδήρου από τον ξενιστή περιλαμβάνουν την παραγωγή σιδηροφόρων, δηλαδή χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών μορίων, τα οποία παράγονται κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου με σκοπό τη δέσμευση του διαθέσιμου σιδήρου, συστήματα απόκτησης αίμης και υποδοχείς τρανσφερίνης ή λακτοφερρίνης. Συνεπώς η σωστή ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι σχετίζεται με τις παθολογικές συνέπειες που προκαλούνται από την υπερφόρτωση ή ανεπάρκεια του σιδήρου στον οργανισμό. Η υπερφόρτωση του σιδήρου μεταξύ άλλων μπορεί να οφείλεται και σε μεταλλάξεις γονιδίων, σε χρόνιες μεταγγίσεις αίματος ή χρόνια ηπατικά προβλήματα. Συγκεκριμένα στα άτομα που παρατηρείται υπερφόρτωση του σιδήρου υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης λοίμωξης, λόγω της αυξημένης διαθεσιμότητας σιδήρου για τους παθογόνους εισβολείς[12].

1.2.4 Παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου

Οποιαδήποτε αλλαγή στο μεταβολισμό του σιδήρου μπορεί να επηρεάσει τον οργανισμό και να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, οι οποίες μπορεί να οφείλονται είτε στην ανεπάρκεια είτε στην υπερφόρτωση του σιδήρου. Μερικές από τις ομάδες που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης έλλειψης σιδήρου είναι οι έγκυες, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με χρόνιες γαστρεντερικές δυσλειτουργίες, καθώς δεν απορροφούν σωστά το σίδηρο. Ορισμένες παθολογικές καταστάσεις θα αναλυθούν παρακάτω.

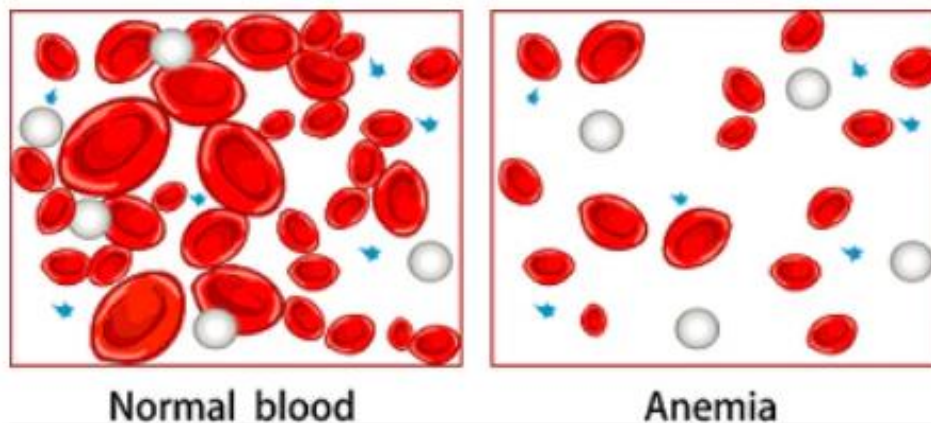
Κληρονομούμενη αιμοχρωμάτωση

Αποτελεί μία γενετική-κληρονομική νόσο που οφείλεται στην υπερβολική συσσώρευση σιδήρου στον οργανισμό και επηρεάζει όργανα, όπως το ήπαρ, το πάγκρεας, την καρδιά αλλά και τις αρθρώσεις. Έχει 6 διαφορετικές μορφές, οι οποίες προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια, την HFE αιμοχρωμάτωση (τύπος 1), την Νεανική αιμοχρωμάτωση

(τύπος 2), την TfR2 αιμοχρωμάτωση (τύπος 3), τη Νόσο της φερροπορτίνης (τύπος 4), την Ασερουλοπλασμιναιμία και την Ατρανσφερριναιμία. Οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο αυτή εμφανίζουν υπερσυσσώρευση σιδήρου, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στην μειωμένη ανακύκλωση του σιδήρου είτε στην μεγάλη αποβολή του σιδήρου από τα κύτταρα [13].

Σιδηροπενική αναιμία

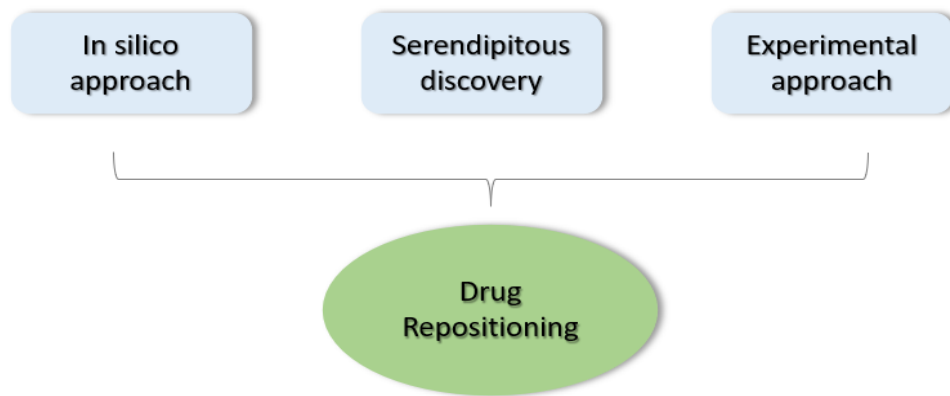
Όταν υπάρχει παρατεταμένη έλλειψη πρόσληψη σιδήρου από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα την εξάντληση των αποθεμάτων του, τότε παρατηρείται η εμφάνιση της σιδηροπενικής αναιμίας. Η παθολογική αυτή κατάσταση αποτελεί πρόβλημα δισεκατομμυρίων ατόμων σε όλο τον κόσμο και εκτιμάται ότι το 3% των γυναικών πάσχουν από τη νόσο αυτή, ενώ περίπου το 20% των γυναικών εμφανίζει μειωμένα επίπεδα σιδήρου. Οι ασθενείς με σιδηροπενία εμφανίζουν προβλήματα κυρίως στους βλεννογόνους και στο δέρμα, καθώς και συμπτώματα όπως κόπωση, υπνηλία και μειωμένη συγκέντρωση. Η συχνότερη αντιμετώπιση της ασθένειας βασίζεται στη χορήγηση σιδήρου από το στόμα σε συνδυασμό με την ενίσχυση της κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε σίδηρο, ενώ σπανιότερα γίνεται και μετάγγιση αίματος [14].



Εικόνα 5: Τα κύτταρα αίματος ενός υγιή και ενός ατόμου που πάσχει από αναιμία. Πηγή: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/blood-diseases/anemia-inflammation-chronic-disease>.

1.2.5 Επαναστόχευση φαρμάκων (Drug repositioning) και σίδηρος

Όπως αναφέρθηκε και στους στόχους αυτής της πτυχιακής είναι σημαντικό μέσα από αυτή την έρευνα με *in silico* ανάλυση να εντοπίσουμε νέες ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου και να καταλήξουμε σε επαναστόχευση φαρμάκων με σκοπό την αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών με τη χρήση ήδη υπαρχόντων και γνωστών φαρμάκων.



Εικόνα 6: Μία απλή αναπαράσταση της επεξήγησης της επαναστόχευσης των φαρμάκων

1.3 Βάση Δεδομένων GeneOntology και Γονίδια Σιδήρου.

Η GeneOntology[15] αποτελεί μία από τις πιο γνωστές και παράλληλα σημαντικές βιολογικές βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς περιέχει πληροφορίες σχετικά με γονίδια και προϊόντα γονιδίων που παράγονται από όλα τα είδη οργανισμών. Η δημιουργία της είχε ως απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση σύνθετων βιολογικών ερωτημάτων και η καινοτομία της βασίζεται στη χρήση ενός κωδικοποιημένου λεξιλογίου. Η έννοια της οντολογίας έχει ως στόχο την παροχή πληροφοριών σχετικά με γονίδια, καθώς και με τις λειτουργίες και σχέσεις που έχουν αυτά μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για να περιγράψει διάφορα εννοιολογικά πλαίσια με απόρροια τη συλλογή, την οργάνωση και την δημοσίευση βιολογικών δεδομένων. Η προσέγγιση των λειτουργιών των γονιδίων γίνεται σε 3 επίπεδα: Την μοριακή λειτουργία, τον κυτταρικό εντοπισμό και τη βιολογική διαδικασία. Η ιδέα αυτής της βάσης προέκυψε το 1998 με αφορμή μελέτες γονιδιώματος που γίνονταν στη *Drosophila melanogaster* (μύγα φρούτων), *Mus musculus* (ποντίκι) και *Saccharomyces cerevisiae* (ζαχαρομύκητα) κατά τις οποίες μία ομάδα επιστημόνων αποφάσισε να εργαστεί σε ένα κοινό πλαίσιο ταξινόμησης της λειτουργίας των γονιδίων. Πλέον η GeneOntology περιέχει πληροφορίες για χιλιάδες διαφορετικούς οργανισμούς, μεταξύ των οποίων και περιγραφές ομόλογων πρωτεϊνών και ακολουθιών γονιδίων. Η πιο πρόσφατη καταμέτρηση έδειξε πως η βάση περιέχει 44.945 όρους και 6.408.283 σχολιασμούς που αφορούν 4.467 είδη οργανισμών. Γενικά η GeneOntology αποσκοπεί να παραστήσει σε υπολογιστική μορφή μια πάρα πολύ μεγάλη μάζα βιοϊατρικών γνώσεων και αποτελεί ένα σπουδαίο εργαλείο που συνδέεται με διάφορες βιοϊατρικές οντολογίες. Επίσης βρίσκει εφαρμογή τόσο στην επιστήμη των υπολογιστών όσο και στους κλάδους των επιστημών της βιολογίας και της ιατρικής. Στην

παρούσα εργασία η βάση της GeneOntology χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί η αναζήτηση των γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο.



*Εικόνα 3: Το λογότυπο της βιολογικής βάσης GeneOntology.
Πηγή: <http://geneontology.org/docs/introduction-to-go-resource/>*

1.4 Μετα-ανάλυση και Συστηματική Ανασκόπηση

1.4.1 Συστηματική Ανασκόπηση (Systematic Review)

Η συστηματική ανασκόπηση σχετίζεται με τη συνεχή βιβλιογραφική αναζήτηση και αξιολόγηση όλων των διαθέσιμων μελετών για ένα συγκεκριμένο ζήτημα. Στην ανασκόπηση χρησιμοποιούνται κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού των μελετών σύμφωνα με τα καθορισμένα ζητούμενα της εκάστοτε έρευνας. Στόχος της συστηματικής ανασκόπησης είναι η επιλογή των καλύτερα μεθοδολογικά σχεδιασμένων μελετών και συχνά περιέχει μετα-αναλύσεις ως καλύτερο μέσω αξιολόγησης και εξαγωγής συμπερασμάτων[16].

1.4.1.1 Βήματα Συστηματικής Ανασκόπησης

Τα βήματα τα οποία ακολουθούνται στη συστηματική ανασκόπηση είναι τα ακόλουθα[16]:

- Διατύπωση του κατάλληλου ερευνητικού ερωτήματος , σύμφωνα με το οποίο θα γίνει η αναζήτηση των μελετών.
- Καθορισμός των κριτηρίων ένταξης και αποκλεισμού των μελετών.
- Αναζήτηση της βιβλιογραφίας στις διάφορες βάσεις δεδομένων.
- Αξιολόγηση και επιλογή των μελετών που προέκυψαν από την αναζήτηση.
- Συλλογή των δεδομένων από τις μελέτες που τελικά κρίθηκαν κατάλληλες για την συγκεκριμένη έρευνα.
- Στατιστική ανάλυση (μετα-ανάλυση).

Η αιτιολόγηση της ένταξης ή του αποκλεισμού των μελετών που προέκυψαν από την αναζήτηση απεικονίζεται σε ένα διάγραμμα ροής που ονομάζεται PRISMA. Το συγκεκριμένο διάγραμμα περιλαμβάνει τον αρχικό αριθμό των μελετών που προέκυψαν, τον αριθμό των μελετών που τελικά συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα καθώς και τον αριθμό των μελετών που τελικά συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα καθώς και τον αριθμό των μελετών που απορρίφθηκαν, διότι δεν πληρούσαν κάποιο κριτήριο. Για την εξαγωγή των δεδομένων από τις μελέτες χρησιμοποιούνται φόρμες, όπως υπολογιστικά φύλλα δεδομένων Excel, στις οποίες καταγράφονται πληροφορίες σχετικά με το έτος συγγραφής, το όνομα του συγγραφέα, την πληθυσμιακή ομάδα καθώς και άλλα ζητούμενα που θεωρούνται χρήσιμα. Έπειτα ακολουθεί το στάδιο της μετα-ανάλυσης και τέλος η παρουσίαση και η επεξήγηση των αποτελεσμάτων μέσω διαγραμμάτων.

1.4.1.2 Πλεονεκτήματα της Συστηματικής Ανασκόπησης

Η χρήση αυτής της μεθόδου επιφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- Μείωση της προκατάληψης του ερευνητή, καθώς οι αναζητήσεις δεν περιορίζονται σε συγκεκριμένη βιβλιογραφία.
- Αξιόπιστα και αντικειμενικά αποτελέσματα.
- Εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τον σχεδιασμό της έρευνας, τη στρατηγική δειγματοληψίας και τις μεθόδους συλλογής δεδομένων.
- Χρήση συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, το οποίο συμβάλλει τόσο στην καθοδήγηση των ερευνητών όσο και στη μεθοδολογική διαφάνεια.

1.4.2 Μετα-ανάλυση

Η τεχνική της μετα-ανάλυσης εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1904 από τον βρετανό στατιστικολόγο Karl Pearson, ο οποίος συγκέντρωνε δεδομένα από διάφορες έρευνες σχετικά με τον εμβολιασμό για τον τυφοειδή πυρετό. Ενώ λίγα χρόνια αργότερα το 1940 πραγματοποιήθηκε η πρώτη μετα-ανάλυση όλων των εννοιολογικά πανομοιότυπων πειραμάτων που αφορούσαν ένα συγκεκριμένο ζήτημα. Ωστόσο ο όρος της «μετα-ανάλυσης» αναπτύχθηκε το 1976 από τον στατιστικολόγο Gene V. Glass, ο οποίος δήλωσε πως «η μετα-ανάλυση αναφέρεται στην ανάλυση των αναλύσεων». Ο ίδιος εκείνη την περίοδο ερευνούσε την ανάπτυξη μεθόδων που θα μπορούσαν να δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα αντλώντας δεδομένα από όλη αυτή την πληθώρα μελετών που υπήρχε. Σχεδόν 20 χρόνια αργότερα το

1994 το πεδίο της μετα-ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε και για οικολογικά ζητήματα, ενώ πλέον η τεχνική αυτή είναι ευρέως γνωστή και χρησιμοποιείται τόσο από τις ιατρικές επιστήμες, όσο και από τις κοινωνικές.[17]

Η μετα-ανάλυση είναι μία μαθηματική τεχνική , η οποία πραγματεύεται την ποσοτική σύνθεση των δεδομένων από παλαιότερες επιστημονικές μελέτες και τον στατιστικό υπολογισμό ενός αξιόπιστου συνολικού αποτελέσματος. Τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης μπορεί να περιλαμβάνουν μια ακριβέστερη εκτίμηση της επίδρασης της θεραπείας ή του παράγοντα επικινδυνότητας της ασθένεια ή άλλων αποτελεσμάτων από οποιαδήποτε μεμονωμένη μελέτη που συνεισφέρει στην συγκεντρωτική ανάλυση. Η εξέταση της είτε μεταβλητότητας είτε της ετερογένειας στα αποτελέσματα της μελέτης αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο αποτέλεσμα. Επιπλέον μέσω της μετα-ανάλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί η αξιολόγηση ερευνών που δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική επίδραση με σκοπό να διαπιστωθεί αν υπάρχει τελικά ή όχι σημαντική επίδραση [18] [19].

1.4.2.1 Βήματα Μετα-ανάλυσης

Η διαδικασία της μετα-ανάλυσης ακολουθεί κάποια συγκεκριμένα βήματα τα οποία θα παρουσιαστούν παρακάτω[20][21]:

- Κατάλληλη διατύπωση του ερωτήματος με βάση τα ζητούμενα της έρευνας που πρόκειται να πραγματοποιηθεί.
- Βιβλιογραφική αναζήτηση του ερωτήματος αυτού σε βάσεις δεδομένων, όπως είναι η PubMed.
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μέσω της ανάγνωση των περιλήψεων, των τίτλων αλλά και ολόκληρων των μελετών που επιλέχθηκαν αρχικά, ώστε να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα καλύπτουν τα κριτήρια που επιθυμούμε. Σε περίπτωση που δεν τα καλύπτουν, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αποκλείονται.
- Συλλογή των χρήσιμων δεδομένων από τις μελέτες που έμειναν από την πρώτη διαλογή.
- Αξιολόγηση αυτών των δεδομένων με στόχο να προσδιοριστεί η ποιότητα αυτών. Για παράδειγμα οι ερευνητές ελέγχουν αν η κάθε μελέτη είναι επαρκής, αν το μέγεθος του δείγματος είναι το κατάλληλο, αν έχει εξαιρεθεί η μεροληψία κ.ά.
- Προσδιορισμός της ετερογένειας των μελετών.

- Εκτίμηση του τελικού αποτελέσματος με τη μορφή Oddsratio καθώς και δημιουργία Forestplot.
- Προσδιορισμός μεροληψίας (bias) των μελετών.
- Πραγματοποίηση ερευνών σε υπό ομάδες (subgroupanalyses) και μετα-παλινδρόμηση.

1.4.2.2 Σημαντικές Έννοιες στη Μετα-ανάλυση

Μέγεθος επίδρασης OddsRatio (OR)

Το OddsRatio είναι μία στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως στην επιδημιολογία και εκφράζει τη δύναμη της συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών. Εφαρμόζεται για τη σύγκριση των σχετικών πιθανοτήτων εμφάνισης για παράδειγμα μιας ασθένειας με δεδομένο μια σχετική μεταβλητή έκθεσης. Αν ο λόγος απόδοσης είναι ίσος με τη μονάδα τότε τα δύο ενδεχόμενα έχουν ίση πιθανότητα εμφάνισης ή μη εμφάνισης της ασθένειας και αυτό δεν επηρεάζεται από την έκθεση (Independent), ενώ αν ο λόγος απόδοσης είναι μικρότερος ή μεγαλύτερος της μονάδας τότε τα ενδεχόμενα σχετίζονται με την έκθεση απλά τα συνδέει διαφορετική σχέση. Πιο συγκεκριμένα αν το OR είναι μεγαλύτερο της μονάδας τότε η έκθεση έχει περισσότερες πιθανότητες έκβασης (Risk), ενώ σε αντίθετη περίπτωση όταν δηλαδή το $OR < 1$ τότε μειώνονται οι πιθανότητες (Protective) [22].

		Event	
		Yes	No
Exposure	Yes	a	b
	No	c	d

$$\text{Odds Ratio} = \frac{\text{odds of the event in exposed group}}{\text{odds of the event in non-exposed group}}$$

$$\text{Odds Ratio} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc}$$

Εικόνα 7: Πίνακας ασθενών-μαρτύρων για τον υπολογισμό του OddsRatio. Πηγή:

<https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/37432>

Μεροληψία (bias)

Κατά τη διαδικασία της μετα-ανάλυσης είναι αναγκαίο να ελεγχθεί η μεροληψία (bias), καθώς μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα [23]. Αναλυτικότερα το bias είναι η

ανακριβής εκτίμηση που γίνεται κατά την παρατήρηση των μελετών και είτε έχουν παραλειφθεί χρήσιμες έρευνες είτε το αντίθετο. Επομένως ο έλεγχος της μεροληψίας καθίσταται απαραίτητος για να μπορέσει να υπάρξει ένα πιο αξιόπιστο και αντικειμενικό αποτέλεσμα [24].

Ετερογένεια

Η ύπαρξη της ετερογένειας σε μια μετα-ανάλυση αποτελεί βασικό ζήτημα, καθώς επηρεάζει την επιλογή μοντέλου που θα χρησιμοποιηθεί. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος για να ελεγχθεί η ετερογένεια είναι μια στατιστική δοκιμή, η οποία συχνά περιγράφεται ως δοκιμασία χ^2 ή Cochran's Q. Η δοκιμή αυτή παρουσιάστηκε το 1954 και ακολουθεί κατανομή chi-squared, ωστόσο υπάρχουν και άλλοι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ετερογένειας όπως ο H^2 , ο R^2 και ο I^2 [25].

Ευαισθησία και ειδικότητα (sensitivity-specificity)

Οι διαγνωστικοί έλεγχοι έχουν ως στόχο το διαχωρισμό των υγιών ατόμων από τους ασθενείς σε έναν πληθυσμό. Η διακριτική ικανότητα αναφέρεται στην ακρίβεια με την οποία διακρίνονται οι ασθενείς με την υπό μελέτη νόσο. Η ευαισθησία (sensitivity), εκφράζει το ποσοστό των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων, δηλαδή των πραγματικά ασθενών στην ομάδα του πληθυσμού που μελετάται (true positive rate). Η ειδικότητα (specificity), αποτελεί μέτρο διαγνωστικής ακρίβειας και λειτουργεί συμπληρωματικά με την ευαισθησία, και καθορίζεται ως το ποσοστό των πραγματικά αρνητικών αποτελεσμάτων σε υγιή άτομα, δηλαδή, εκφράζει την πιθανότητα ενός αρνητικού αποτελέσματος σε άτομο που δεν πάσχει (true negative rate).

Subgroup analysis και μετα-παλινδρόμηση (meta-regression)

Ο διαχωρισμός των δεδομένων μιας έρευνας σε υποομάδες καθώς και η σύγκριση αυτών μεταξύ τους ονομάζεται ανάλυση υποομάδων (subgroup analysis). Σκοπός αυτής της ανάλυσης είναι ο έλεγχος της ετερογένειας, καθώς και η μελέτη των δεδομένων που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες ομάδες. Στην παρούσα εργασία εντοπίσαμε διαχωρισμό του πληθυσμού σε ομάδες ανάλογα με την καταγωγή και καταγράφηκαν δεδομένα που αφορούσαν πληθυσμιακές ομάδες όπως Ασιάτες και Καυκάσιους [26].

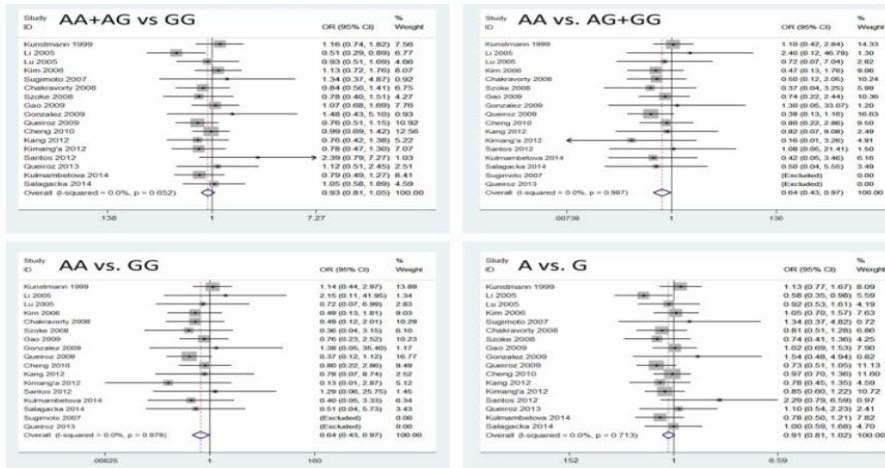
Η διαδικασία της μετα-παλινδρόμησης πραγματοποιείται με σκοπό την επεξήγηση οποιασδήποτε ετερογένειας μεταξύ των μελετών [27].

1.4.2.3 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Μία ολοκληρωμένη και αξιόπιστη μετα-ανάλυση χαρακτηρίζεται από μία εμπειριστατωμένη αναζήτηση βιβλιογραφίας, δηλαδή τη συγκέντρωση και τη μελέτη όλων των διαθέσιμων πηγών, οι οποίες είναι σχετικές με το αντικείμενο της έρευνας. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να λαμβάνονται όλες οι σχετικές μελέτες, διότι η απώλεια μελετών μπορεί να οδηγήσει σε προκατάληψη (bias) κάτι που δημιουργεί σφάλμα στην μετα-ανάλυση. Για την διεξαγωγή της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία του «PRISMA» [28], σύμφωνα με την οποία πρέπει να παρέχεται ρητή δήλωση των ερωτήσεων με αναφορά σε συμμετέχοντες, παρεμβάσεις, συγκρίσεις, αποτελέσματα και σχεδιασμό μελέτης (PICOS – Participants, Interventions, Comparisons, Outcomes, Study Design). Τα δημοσιευμένα έγγραφα και περιλήψεις αναγνωρίζονται από μια ηλεκτρονική βιβλιογραφική αναζήτηση ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων όπως η βιβλιοθήκη PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία. Ωστόσο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να πραγματοποιούνται και χειρωνακτικές αναζητήσεις δεδομένων σε βιβλία, σχετικά έγγραφα και περιλήψεις. Επιπλέον ο διασταυρούμενος έλεγχος των αναφορών, οι αναφορές σε έγγραφα ανασκόπησης και η επικοινωνία με επιστήμονες που δουλεύουν στον σχετικό τομέα είναι σημαντικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παροχή ολοκληρωμένης αναζήτησης. Παρόλα αυτά η συλλογή κάθε σχετικής μελέτης για ένα συγκεκριμένο ζήτημα δεν είναι πάντα εφικτή, καθώς υπάρχουν μελέτες που είτε δεν δημοσιεύονται είτε δεν είναι καταγεγραμμένες σε βάσεις δεδομένων ή ακόμα παρατίθενται ξενόγλωσσα και η μετάφρασή τους δεν καθίσταται δυνατή [29] [30].

1.4.3 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Το τελικό στάδιο της μετα-ανάλυσης απεικονίζεται μέσω του διαγράμματος forestplot, στο οποίο καταγράφονται τα αποτελέσματα της εκάστοτε έρευνας που σχετίζονται με το μέγεθος επίδρασης και το διάστημα εμπιστοσύνης 95% (95% confidence interval). Αναλυτικότερα το διάστημα εμπιστοσύνης είναι ένας τύπος εκτίμησης που υπολογίζεται από τα στατιστικά στοιχεία των μελετούμενων δεδομένων.

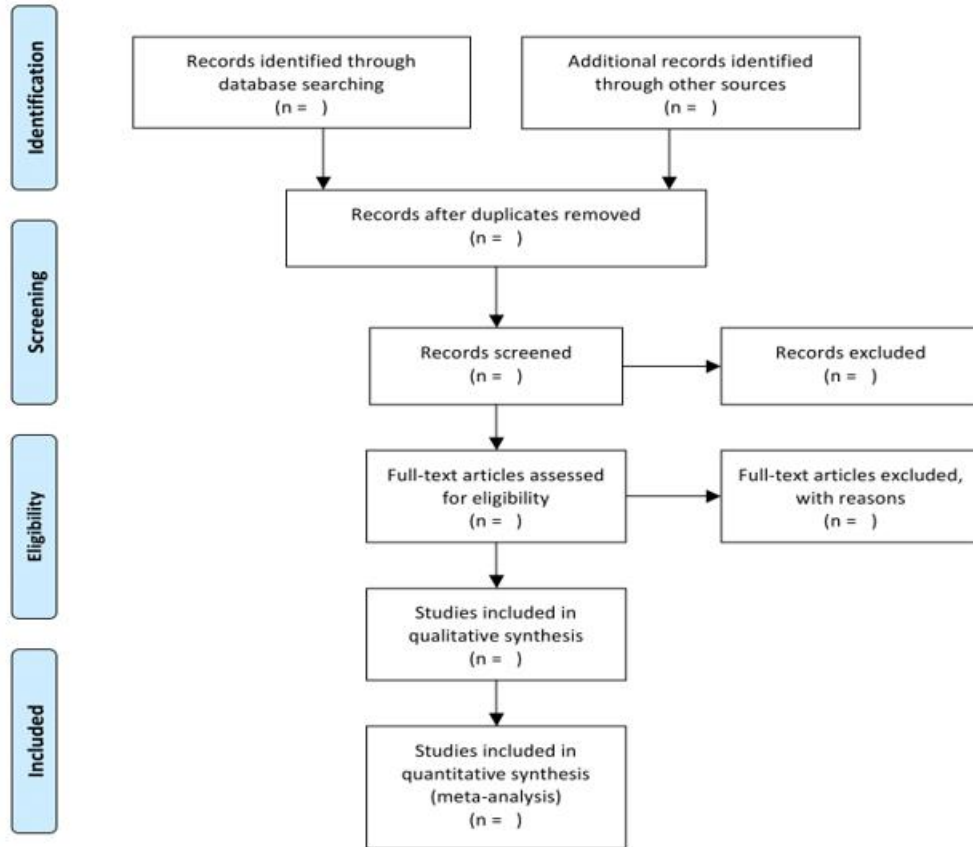


Εικόνα 8: Παράδειγμα απεικόνισης forestplot για όλα τα μοντέλα. Πηγή: Xudong Sun, Yuanyuan Xu , Li Wang , Fuhua Zhang , Jinhua Zhang , Ximei Fu , Tao Jing , Jian Han “Association between TNFA Gene Polymorphisms and Helicobacter pylori Infection: A Meta-Analysis”

Στο παραπάνω διάγραμμα οι οριζόντιες γραμμές παρουσιάζουν κάθε έρευνα με το αποτέλεσμα τους να προβάλλεται σαν κουτί και το διάστημα εμπιστοσύνης να απεικονίζεται σαν γραμμή. Αν η κάθε μελέτη περνάει την κατακόρυφη γραμμή καταλαβαίνουμε πως η μηδενική τιμή ανήκει στο διάστημα εμπιστοσύνης και συνεπώς η μελέτη δεν έχει σημαντική διαφορά, ενώ ο ρόμβος στο τέλος δείχνει το τελικό αποτέλεσμα των επιμέρους μελετών.



PRISMA 2009 Flow Diagram



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

Εικόνα 9: Πρότυπο του διαγράμματος ροής σύμφωνα με το PRISMA flow chart

Κεφάλαιο 2. Μεθοδολογία

2.1 Εργαλεία

Παρουσίαση των εργαλείων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία :

➤ PubMed



Αποτελεί μία δωρεάν μηχανή αναζήτησης, η οποία χρονολογείται από τον Ιανουάριο του 1996. Περιέχει περισσότερες από 30 εκατομμύρια αναφορές και περιλήψεις σχετικά με θέματα που αφορούν τις βιοεπιστήμες και την βιοϊατρική και οι περισσότερες από αυτές οι πληροφορίες αντλούνται από τη βάση δεδομένων MEDLINE. [30] Εκτός από το MEDLINE η βιβλιοθήκη PubMed περιέχει και παλαιότερες αναφορές, που χρονολογούνται από το 1951 , από την έντυπη μορφή του Index Medicus. Επιπλέον αποτελεί εργαλείο NCBI (Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών) που ανήκει στην NLM (Εθνική Βιβλιοθήκη Ιατρικής των ΗΠΑ). Κάθε αναφορά σε αυτή τη μηχανή αναζήτησης διαθέτει ένα μοναδικό πεδίο που ονομάζεται PubMed ID (PMID) και αποτελεί μία μοναδική ακέραια τιμή, η οποία ωστόσο δεν δίνει καμία πληροφορία στον αναγνώστη για το περιεχόμενο της δημοσίευσης [32] [33].

➤ Excel



Το Microsoft Excel είναι ένα πρόγραμμα λογιστικών φύλλων που δημιουργήθηκε από τη Microsoft το 1987. Χρησιμοποιεί ένα πλέγμα κελιών διατεταγμένων σε αριθμημένες σειρές και στήλες για να την οργάνωση χειρισμών δεδομένων, μπορεί να εμφανίζει

δεδομένα ως γραμμικά γραφικές παραστάσεις, ιστογράμματα και τρισδιάστατα γραφήματα, καθώς επίσης περιέχει και μία γλώσσα προγραμματισμού μακροεντολών (Visual Basic for Applications) [34].

➤ **Gene Ontology (GO)**



Η GeneOntology αποτελεί μια βιολογική βάση δεδομένων που πρωτοεμφανίστηκε το 1998 από μία ομάδα ερευνητών και περιέχει πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια και τα γονιδιακά προϊόντα που παράγονται από πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς. Τον Ιούλιο του 2019 η βάση περιείχε σχεδόν 45.000 όρους και περίπου 7.000.000 σχολιασμούς για διάφορους βιολογικούς οργανισμούς. Η συγκεκριμένη βάση αποτελεί το μεγαλύτερο επίτευγμα στον τομέα της βιοπληροφορικής σε σχέση με άλλες βιολογικές βάσεις γονιδιακών δεδομένων και ο σκοπός της δημιουργίας της ήταν η αποσαφήνιση πολύπλοκων βιολογικών ερωτημάτων.

➤ **HEATMAPPER**



Πρόκειται για ένα εύχρηστο εργαλείο ελεύθερου λογισμικού το οποίο δίνει τη δυνατότητα στους χρήστες να οπτικοποιήσουν διαφορετικούς τύπους δεδομένων. Οι χρήστες μπορούν να οπτικοποιήσουν χάρτες με βάση την έκφραση (πχ. των γονιδίων), χάρτες συσχετίσεων, χάρτες επικάλυψης εικόνας. Στο αποτέλεσμα αποτυπώνονται οι διαβαθμίσεις την έντασης δύο χρωμάτων τα οποία χαρακτηρίζουν το φαινόμενο που μελετάται. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα να τροποποιηθεί η εικόνα και να προσαρμοστεί χρησιμοποιώντας τις επιλογές και τις παραμέτρους σχεδίασης [35].

➤ **Cytoscape**



Το Cytoscape είναι ένα πρόγραμμα λογισμικού ανοιχτού κώδικα, το οποίο κατασκευάστηκε το 2002, για την ενσωμάτωση δικτύων βιομοριακής αλληλεπίδρασης με δεδομένα έκφρασης υψηλής απόδοσης σε ένα ενοποιημένο θεματικό πλαίσιο. Παρόλο που μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε σύστημα μοριακών στοιχείων και αλληλεπιδράσεων, το Cytoscape είναι πιο ισχυρό όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μεγάλες βάσεις δεδομένων με σχέσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, πρωτεϊνών-DNA και γενετικών αλληλεπιδράσεων ανθρώπων και άλλων οργανισμών. Παρέχει λειτουργίες για να διαταχθεί το δίκτυο, να γίνουν αναζητήσεις μέσα σε αυτό καθώς και να πραγματοποιηθεί οπτική ενσωμάτωση αυτού με βάση το προφίλ έκφρασης, του φαινοτύπου και άλλων μοριακών καταστάσεων [36].

➤ **KEGG**



Η KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) είναι μια πηγή πληροφοριών από ένα σύνολο βάσεων δεδομένων, η οποία δημιουργήθηκε το 1995 από τον Minoru Kanehisa. Οι πληροφορίες που περιέχει σχετίζονται με την κατανόηση λειτουργιών σε μοριακό επίπεδο, με τα γονιδιώματα, με τα βιολογικά μονοπάτια, με ασθένειες, χημικές ουσίες και φάρμακα, με αλληλεπιδράσεις μορίων, γονιδίων και πρωτεϊνών. Συνεπώς αποτελεί κύριο εργαλείο για την βιοπληροφορική, την γονιδιωματική, την προσομοίωση βιολογικών συστημάτων και την δημιουργία φαρμάκων [37].

➤ **STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) database**



Το STRING (Εργαλείο αναζήτησης για την ανάκτηση αλληλεπιδρώντων γονιδίων/πρωτεϊνών) αποτελεί μία βιολογική βάση δεδομένων καθώς και μία διαδικτυακή πηγή για την εύρεση αναγνωρισμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών. Οι πληροφορίες που περιέχει προέρχονται από πολλές πηγές, όπως πειραματικά δεδομένα, τεχνικές υπολογιστικών προβλέψεων αλλά και από κείμενα δημόσιων συλλογών. Τα δεδομένα που περιέχει ενημερώνονται τακτικά και η πρόσβαση στη βάση αυτή είναι ελεύθερη. Αποσκοπεί επίσης στην ανάδειξη και στον σκόπιμο εμπλουτισμό των πρωτεϊνικών λιστών που παρέχονται από τους χρήστες καθώς και στη χρήση μιας ποικιλίας σκόπιμων δομών ταξινόμησης όπως GO, Pfam και KEGG. Η ανανεωμένη έκδοση της βάσης (11b) περιλαμβάνει στατιστικά στοιχεία για σχεδόν 24,5 εκατομμύρια πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται με περισσότερους από 5.000 οργανισμούς. Το STRING έχει δημιουργηθεί με τη βοήθεια μίας κοινοπραξίας ορισμένων ακαδημαϊκών ιδρυμάτων, μεταξύ αυτών είναι τα CPR, EMBL, KU, SIB, TUD και UZH [38].

➤ **g:Profiler**



Το g:Profiler[39] είναι ένα σύνολο εργαλείων με δωρεάν πρόσβαση για την ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού σε βιολογικές κατηγορίες για εύρεση βιολογικών κατηγοριών εμπλουτισμένων σε λίστες γονιδίων (g:GOST), τη μετατροπή μεταξύ αναγνωριστικών IDs (g:Convert), την ορθόλογη χαρτογράφηση γονιδίων μεταξύ οργανισμών (g:Orth) καθώς και τη χαρτογράφηση ανθρώπινων SNP rs-codes (π.χ. rs7961894) σε ονόματα γονιδίων (g:SNPense). Ειδικότερα, μέσω του g:GOST σε μια ή πολλαπλές λίστες γονιδίων εισόδου μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάλυση

λειτουργικού εμπλουτισμού, γνωστή και ως ανάλυση εμπλουτισμού γονιδίων (GSEA). Τα γονίδια χαρτογραφούνται με βάση γνωστές βάσεις δεδομένων και προκύπτουν κατηγορίες, μονοπάτια, βιολογικές διεργασίες, μοριακές λειτουργίες, υποκυτταρικοί εντοπισμοί και κοινές περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (transcription factors binding sites, TFBS) με στατιστικά σημαντικά εμπλουτισμένους όρους. Τα δεδομένα ανανεώνονται συνεχώς από τη βάση δεδομένων Ensembl Genomes και από ειδικά δεδομένα για παράσιτα από το WormBase ParaSite. Εκτός από την οντολογία των γονιδίων για τη λειτουργική ενίσχυση χρησιμοποιεί μεταβολικά μονοπάτια από τις βάσεις KEGG, Reactome και WikiPathways, miRNA στόχους από την miRTarBase, ρυθμιστικά μοτίβα από το TRANSFAC, εξειδίκευση ιστού από το Human Protein Atlas, πρωτεϊνικά σύμπλοκα από το CORUM και φαινοτύπους ανθρώπινης νόσου από το Human Phenotype Oncology.

2.2 Βήματα Συστηματικής Ανασκόπησης Μετα-Αναλύσεων

Επιλογή Δεδομένων

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από μετα-αναλύσεις που αφορούν τη συσχέτιση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων με ανθρώπινες ασθένειες συσχετισμένες με τον σίδηρο. Τα βήματα που ακολουθήσαμε για την εύρεση και συλλογή των δεδομένων είναι τα ακόλουθα:

1. Προσδιορισμός όλων των γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο από τη βάση GeneOntology.
2. Δημιουργία 2 search term όπου περιείχαν λέξεις κλειδιά όπως iron, gene, polymorphism, συγκεκριμένες ασθένειες που σχετίζονται με το σίδηρο και τη λέξη μετα-ανάλυση. Επιπλέον το ένα search term περιλαμβάνει και όλα τα γονίδια που προέκυψαν από την GeneOntology.
3. Βιβλιογραφική αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για τον εντοπισμό μετα-αναλύσεων που σχετίζονται με ασθένειες σιδήρου.
4. Επιλογή των μελετών που ήταν σχετικές με τα κριτήρια αναζήτησης της παρούσας έρευνας, καθώς προέκυψαν και μελέτες που είτε δεν ήταν σχετικές είτε δεν περιείχαν στατιστικά σημαντικά δεδομένα.

Καταγραφή Αποτελεσμάτων

Επόμενο βήμα μετά την ολοκλήρωση της επιλογής των άρθρων τα οποία πληρούσαν τα κριτήρια, ήταν η καταγραφή των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα για κάθε ένα από τα 43 άρθρα υπήρξαν καταγραφές για τα εξής πεδία:

Για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δεδομένων:

- Το PubMed ID, δηλαδή ο μοναδικός αριθμός τον οποίο λαμβάνει η κάθε δημοσιευμένη μελέτη στη βάση δεδομένων και αποτελεί χαρακτηριστικού του κάθε άρθρου.
- Το όνομα το συγγραφέα.
- Το έτος δημοσίευσης.
- Τη φυλή των συμμετεχόντων στις έρευνες. Οι πληθυσμοί κατηγοριοποιήθηκαν στις εξής ομάδες πληθυσμών : Γενικό Σύνολο (Overall), Ασιάτες (Asian), Αφρικανοί (African), Καυκάσιοι (Caucasian), Αμερικανοί (Ad-Mixed American) και Ευρωπαίοι (European).
- Η ονοματολογία του γονιδίου που μελετάται στην κάθε μετα-ανάλυση.
- Τον πολυμορφισμό του συγκεκριμένου γονιδίου με τη μορφή rsnumber (η ακολουθία αριθμών που υπάρχει μετά το rs είναι μοναδική για τον κάθε πολυμορφισμό και το πρόθεμα rs είναι συντόμευση του referencesSNP(RefSNP)).
- Την ασθένεια που συσχετίζεται η έκφραση του γονιδίου που μελετάται.
- Τον αριθμό των πειραματικών μελετών και των ασθενών-υγιών που συμπεριλαμβάνονταν στην εκάστοτε μετα-ανάλυση.

Για τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των δεδομένων:

- Το Odds ratio (OR) της μετα-ανάλυσης καθώς και το διάστημα εμπιστοσύνης με επίπεδο σημαντικότητας (confidence interval) 95% για κάθε έναν από τους 5 γονοτύπους επικρατής (Dominant), υπολειπόμενος (Recessive), ομόζυγος (Homozygous), ετερόζυγος (Heterozygous) και αλληλόμορφου (Allelic) όταν αυτός εξεταζόταν.
- Την τιμή p για την συσχέτιση (p-value for association).
- Την τιμή p για την ετερογένεια (p-value for heterogeneity) για όσους γονοτύπους υπήρχε.
- Τον αριθμό Z (Z-score).
- Την τιμή της ετερογένειας I^2 όπου είχε εξαχθεί.

- Το μοντέλο επίδρασης το οποίο ακολουθήθηκε στη διεξαγωγή των ερευνών, δηλαδή καταγράφονταν το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects model) και το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effects model).
- Αν για την συγκεκριμένη μετα-ανάλυση είχε διεξαχθεί bias test, για την αποφυγή λαθών προκαταλήψεων.
- Αν το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης αποδείκνυε συσχέτιση της ασθένειας με το συγκεκριμένο πολυμορφισμό, τόσο από τα συμπεράσματα των συγγραφέων όσο και από τις διαθέσιμες καταγεγραμμένες τιμές που το υποδείκνυαν.
- Και τέλος, στην περίπτωση ύπαρξης συσχέτισης, σε ποιους γονότυπους αυτή εμφανίζεται, πάλι βάσει των λεγομένων των συγγραφέων αλλά και παρατήρησης των στατιστικών τιμών.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων συμπεριελήφθησαν έρευνες με στατιστικώς σημαντικά δεδομένα σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% και $p\text{-value} < 0.005$. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της βάσης δεδομένων KEGG και STRING.

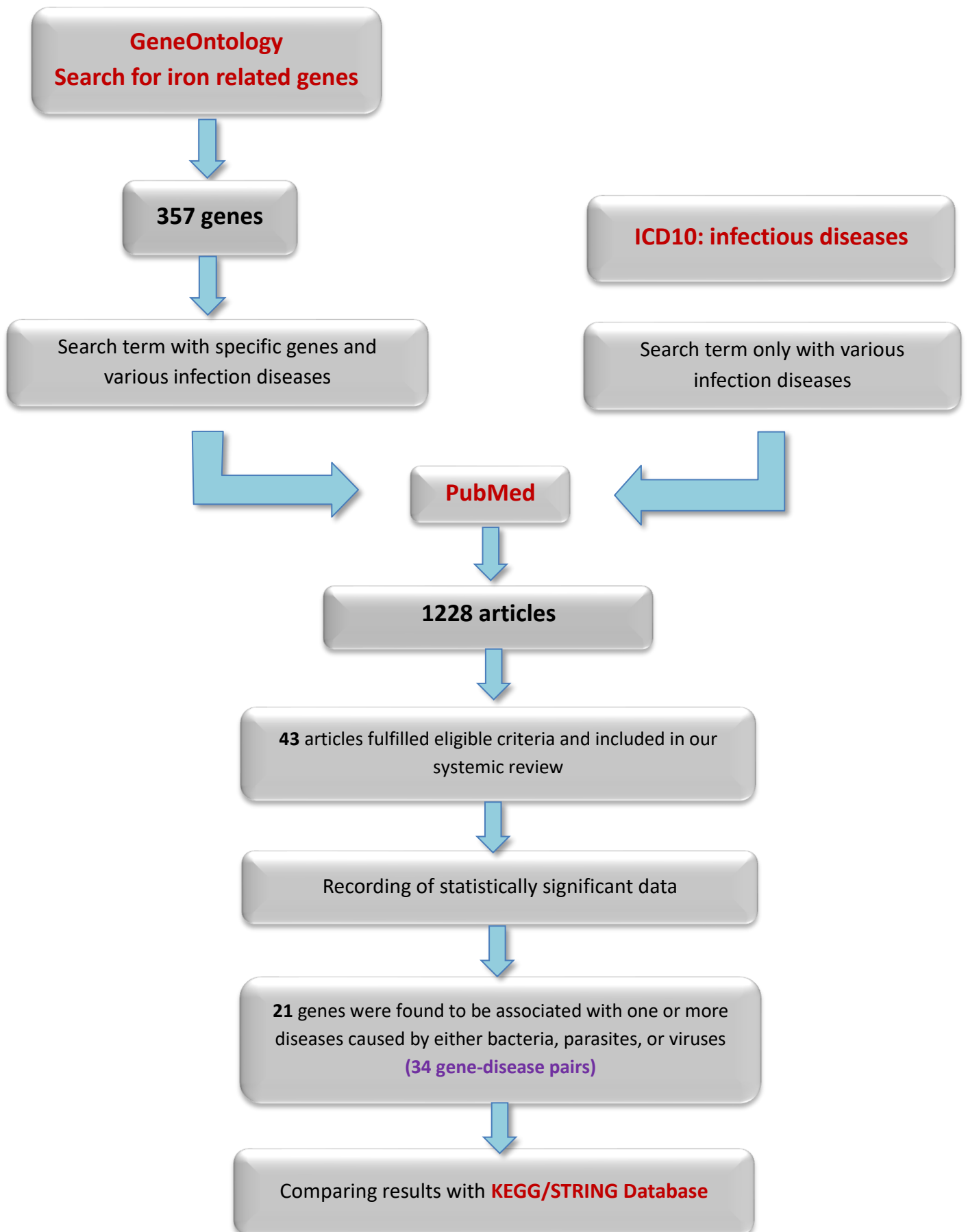
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

3.1 Αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με τον σίδηρο στη βάση GeneOntology

Αρχικά στη βάση δεδομένων GO(GeneOntology) με την τοποθέτηση της λέξης ‘iron’ (σίδηρος) στην αναζήτηση της βάσης και την επιλογή να μας δώσει αποτελέσματα με τα γονίδια (επιλογή→Gene products) του homosapiens καταφέραμε να πάρουμε όλα τα γονίδια που σχετίζονται με το σίδηρο του ανθρώπινου είδους που ήταν καταγεγραμμένα έως και την χρονική στιγμή που εκτελέστηκε το συγκεκριμένο κομμάτι της έρευνας μας. Πιο συγκεκριμένα εκείνη την χρονική στιγμή καταγράψαμε (Οκτώβριος 2020) 357 διαφορετικά γονίδια σχετιζόμενα με το σίδηρο στον άνθρωπο.



Εικόνα 10 : Στιγμιότυπο από την αναζήτηση μας στην GO. Πηγή:
<http://geneontology.org/docs/introduction-to-go-resource/>



Διάγραμμα 1: Απλή διαγραμματική παρουσίαση των βημάτων της έρευνας μας.

Πίνακας : Τα 357 γονίδια του σιδήρου του ανθρώπου που καταγράψαμε από την αναζήτηση στην GO

HYAL2	CYP7B1	ALAS2	RPS3	DPH1	KIF4B	CYP17A1	BRIP1	FLVCR2	CYP2S1
DPYD	ETHE1	FDXR	CYP4Z1	TMPRSS6	MAGEF1	SLC46A1	NDUFAB1	ACP5	HMOX1
TF	TFAP2A	GDF2	SDHB	TYW1B	CYP3A43	CCDC115	MCOLN1	P4HA1	TBXAS1
LTF	CYP26A1	ISCU	CYP2C19	ALKBH1	NCOA4	HBQ1	ISCA1	NDFIP1	CYP4V2
PPEF1	ABCB7	KIF4A	CYP2C18	CYP2F1	CYP2U1	AIFM3	HAAO	CYP27A1	ALOXE3
CYB561A3	BOLA1	BECN1	LTO1	ISCA2	CYP2W1	DPH2	ADI1	CYP1A1	ATP6V0D1
TTYH1	CIAO2B	FDX2	SLC22A17	HSCB	NUBPL	PHF8	CYP2E1	CYP4F3	ALOX5
CYP11B1	SLC39A1	ABCB6	CYP4A22	DNA2	NTHL1	NDUFS7	CYP1A2	POLE	STEAP3
bola2-glrx3_human	CISD3	SLC40A1	CIAO1	B2M	KDM7A	NDUFS5	REV3L	OGFOD3	CISD2
rrm1-rrm2_human	DOHH	DNAJC24	RSAD2	SLC39A14	RIOX1	CYP2A13	CYP11A1	ALKBH2	TMLHE
rrm1-rrm2b_human	ATP7A	CDO1	NUBP1	CPOX	SLC39A8	CYP1B1	CYP4A11	ABCE1	ALKBH3
URS0001BE9568_9606	CYP2A7	URS0001BEF949_9606	SLC39A11	ALOX15	SCARA5	HIF1A	HEPHL1	PHYH	ELP3
URS00008BDA57_9606	CYP3A5	URS0000EB0E9E_9606	CYP4Z2P	P3H3	CIAO2A	PTGIS	PLOD1	SLC25A37	CYP4F2
URS000055128B_9606	CYP2R1	URS0002335CD6_9606	POR	P3H2	FTO	CYP7A1	PGRMC2	P4HA2	FTHL17
URS0001BE640E_9606	NDUFS6	URS00023424D6_9606	EPB42	CYP4F11	CYP26B1	NDUFS4	SLC48A1	HRG	HJV
URS0000EB5314_9606	AOX1	URS00004B8687_9606	LYRM4	MT-RNR2	CYP8B1	NDUFV1	SFXN1	ABCC5	CYP4F22
URS000252B3E2_9606	LIAS	URS000233D7C7_9606	CYP19A1	NECTIN1	GSTP1	EGLN2	RSAD1	SOD2	PICALM
NARF	STEAP4	URS0000EB3795_9606	CYP2A6	CYP20A1	CYP4F8	CYP11B2	CYP27B1	CISD1	SMAD4
DDX11	PDX1	URS00023487DD_9606	CLTC	LCN2	NDUFV2	YAE1	SLC39A3	CYP26C1	CYP2G1P
TH	CALR	URS000256D266_9606	MMGT1	JMJD6	HEPH	FECH	TYW1	TFF1	BDH2
CH25H	PPAT	URS0001BE00C3_9606	OGFOD1	CYP4F12	HAMP	EGLN3	BTBD9	SLC6A3	ALAD
SLC11A2	PPEF2	URS00008C01AB_9606	OGFOD2	TPH2	PLOD3	EXO5	JMJD4	BOLA3	P4HTM
ALKBH8	XDH	CYP2J2	TMEM199	LMTK2	BBOX1	AGMO	CYP24A1	ALOX15B	CYP4B1
SLC11A1	DPH3	NDUFS1	TET2	NDUFS8	FTH1P19	FRRS1	ARHGAP1	EGLN1	DRD2
NDUFS3	MUTYH	KIAA0753	P4HA3	IFNG	HBZ	P3H1	RHAG	CYP3A7	CYBRD1
SNCA	CDKAL1	MYC	FTMT	CYP2C9	MAP1LC3A	TFR2	CYP21A2	HIF1AN	FXN
CYP2D6	PHF2	ERCC2	SLC25A28	CYP4X1	EIF2AK1	GLRX2	CYP3A4	FTH1	CYB561
CYP2C8	PTCD1	ALOX12	TYW5	HSPA9	SLC39A2	ATP13A2	CYP27C1	FTL	HBA1
BMP6	KDM3A	FA2H	RRM2	G6PD	UQCRRF51P1	NFU1	ERFE	HPX	MIOX
STEAP1	ATP6V0A2	MSMO1	TNF	ATP6V1A	TTC7A	CYP51A1	RTEL1	TFRC	NDUFS2
ASIC3	CP	NFS1	GLRX3	RAB11B	BOLA2	FDX1	CYP2D7	CCND1	CYP46A1
NDOR1	SOD1	FLVCR1	PLOD2	ATP6AP1	PRIM2	REP15	MOCS1	IBA57	UQCRRF51
ETFDH	PAH	CIAPIN1	IREB2	POLD1	TPH1	ALOX12B	MELTF	CYP39A1	NUBP2
TET1	CYP2B6	CYGB	NEO1	ACO1	SC5D	ATP6V1G1	GLRX5	CDK5RAP1	
STEAP2	HMOX2	ACO2	HFE	EPAS1	A0A1B0GTQ1	FBXL5	CIAO3	ADO	
BCL2	SRI	ABAT	RFESD	SCD	FAXDC2	ATG5	DNM2	MMS19	

3.2 Βιβλιογραφική αναζήτηση για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο και με μολυσματικές ασθένειες

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική αναζήτηση των δημοσιευμένων μετα-αναλύσεων στη βάση δεδομένων PubMed, με σκοπό να εντοπιστούν τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου και εμπλέκονται σε μολυσματικές ασθένειες. Χρησιμοποιήθηκαν 2 Search Term, τα οποία περιείχαν λέξεις κλειδιά όπως iron, gene, polymorphism, συγκεκριμένες ασθένειες που σχετίζονται με το σίδηρο και είναι καταγεγραμμένες στο ICD-10 και τη μετα-ανάλυση.

Τα Search Term που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα :

- (FE OR iron OR ferric OR ferrous) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP) and (PHF2 OR PTC1 OR KDM3A OR H7C0I5 OR NDUFS6 OR ATP6V1D OR MIOX OR NDUFS2 OR CYP46A1 OR UQCRFS1 OR NUBP2 OR ETFDH OR TET1 OR STEAP2 OR BCL2 OR AGMO OR P3H1 OR TFR2 OR GLRX2 OR KDM7A OR RIOX1 OR SCAR5 OR CIAO2A OR FTO OR CYP26B1 OR CYP8B1 OR FBXL5 OR FXN OR ATP6V1E2 OR ATP6V0A2 OR ETHE1 OR TFAP2A OR CYP26A1 OR ABCB7 OR CIAO2B OR FDX1 OR BBOX1 OR FTH1P19 OR HBZ OR MAP1LC3A OR EIF2AK1 OR SLC39A2 OR UQCRFS1P1 OR TTC7A OR BOLA2 OR CDKAL1 OR CP OR SOD1 OR PAH OR CYP2B6 OR NARF OR DDX11 OR ATP6V1H OR TH OR CH25H OR SLC11A2 OR ALKBH8 OR SLC11A1 OR NDUFS3 OR SNCA OR CYP2D6 OR CYP2C8 OR BMP6 OR STEAP1 OR ASIC3 OR CYP7B1 OR DOHH OR ATP7A OR ATP6V1G2 OR HBA1 OR AOX1 OR LIAS OR STEAP4 OR PDX1 OR CALR OR PPAT OR PPEF2 OR NDOR1 OR CYP2A7 OR CYP3A5 OR ATP6V0E2 OR CYP2R1 OR ATP6V0C OR XDH OR MUTYH OR HEPH OR HAMP OR PLOD3 OR CYP17A1 OR SLC46A1 OR CCDC115 OR HBQ1 OR AIFM3 OR ABCG2 OR ATP6V1G3 OR CYP7A1 OR NDUFS4 OR NDUFV1 OR EGLN2 OR CYP11B2 OR PRIM2 OR TPH1 OR SC5D OR CYP2D7 OR FAXDC2 OR NDUFS7 OR NDUFS5 OR CYP2A13 OR CYP1B1 OR HIF1A OR PTGIS OR ISCA2 OR CYP4V2 OR ALOXE3 OR ATP6V0D1 OR ALOX5 OR STEAP3 OR CISD2 OR NECTIN1 OR CYP20A1 OR LCN2 OR JMJD6 OR ATP6V0B OR CYP4F12 OR TPH2 OR LMTK2 OR NDUFS8 OR APBB1 OR TMLHE OR ALKBH3 OR ELP3 OR NOX5 OR CYP4F2 OR FTHL17 OR SCD5 OR POLA1 OR HJV OR CYP4F22 OR PICALM OR SMAD4 OR IFNG OR CYP2C9 OR CYP2G1P OR BDH2 OR ALAD OR P4HTM OR C1orf194 OR PHF8 OR YAE1 OR FECH OR EGLN3 OR EXO5 OR MAGEF1 OR CYP3A43 OR NCOA4 OR CYP2U1 OR CYP2W1 OR NUBPL OR NTHL1 OR FDXR OR GDF2 OR ISCU OR URS0000EB0E9E_9606 OR URS00008C1EDC_9606 OR URS00008C01AB_9606 OR URS0000EB5314_9606 OR URS00008BDA57_9606 OR URS0000EB3795_9606 OR URS00008BFEF6_9606 OR URS00004B8687_9606 OR URS00008B2468_9606 OR URS00008BFFF5_9606 OR ATP6V0E1 OR ABAT OR RPS3 OR HYAL2 OR DPYD OR TF OR LTF OR PPEF1 OR CYP2E1 OR CYP1A2 OR REV3L OR CYP11A1 OR CYP4A11 OR HEPH1 OR ATP6V1B1 OR MCOLN1 OR ISCA1 OR ATP6V0D2 OR HAAO OR ADI1 OR MDM2 OR M0QY20 OR CYP4Z1 OR SDHB OR CYP2C19 OR CYP2C18 OR PLOD1 OR PGRMC2 OR SLC39A8 OR SLC48A1 OR SLC39A11 OR CYP4Z2P OR POR OR EPB42 OR LYRM4 OR CYP19A1 OR CYP2A6 OR CYP4A22 OR CIAO1 OR RSAD2 OR NUBP1 OR LTO1 OR SLC22A17 OR SFXN1 OR RSAD1 OR CYP27B1 OR SLC39A3 OR TYW1 OR BTBD9 OR JMJD4 OR CYP24A1 OR ARHGAP1 OR RHAG OR CYP21A2 OR CYP3A4 OR CYP27C1 OR ERFE OR NFYA OR RTEL1 OR CYP2D7 OR TCIRG1 OR MOCS1 OR MELTF OR CLTC OR MGMT1 OR OGFOD1 OR OGFOD2 OR TMEM199 OR TET2 OR P4HA3 OR FTMT OR ATP6V1C1 OR SLC25A28 OR TYW5 OR SKP1 OR RRM2 OR H0YGN5 OR TNF OR GLRX3 OR CCNB1 OR CYGB OR GLRX5 OR CIAO3 OR DNM2 OR FLVCR2 OR ACP5 OR P4HA1 OR NDFIP1 OR CYP27A1 OR CYP1A1 OR CYP4F3 OR POLE OR CYP4X1 OR HSPA9 OR G6PD OR ATP6V1A OR RAB11B OR ATP6AP1 OR ACO1 OR SCD OR K7EQS6 OR BRIP1 OR DNAJC24 OR CDO1 OR rrm1-rrm2b_human OR rrm1-rrm2_human OR CYP4B1 OR DRD2 OR SLC6A9 OR CYBRD1 OR OGFOD3 OR ABCE1 OR PHYH OR SLC25A37 OR P4HA2 OR HRG OR SOD2 OR CISD1 OR CYP26C1 OR CYP2J2 OR HSCB OR DNA2 OR B2M OR SLC39A14 OR RFESD OR TMPRSS6 OR TYW1B OR ALKBH1 OR CYP2F1 OR CUL1 OR PLOD2 OR IREB2 OR NEO1 OR HFE OR KIF4B OR NFS1 OR EPAS1 OR FLVCR1 OR ATP6V1B2 OR CIAPIN1 OR ACO2 OR ALOX15B OR EGLN1 CYP3A7 OR RXRA OR HIF1AN OR GSTP1 OR CYP4F8 OR NDUFV2 OR FTH1 OR FTL OR HPX OR TFRC OR C1QA OR CCND1 OR IBA57 OR CPOX OR ATP6V1E1 OR ALOX15 OR P3H3 OR P3H2 OR CYP4F11 OR ATP6V0A4 OR CAND1 OR MT-RNR2 OR TFF1 OR SLC6A3 OR CYP39A1 OR CDK5RAP1 OR MMS19 OR CYP2S1 OR HMOX1 OR TBXAS1 OR POLD1 OR NDUFS1 OR MYC OR ATP6V1C2 OR ERCC2 OR ALOX12 OR NEDD8 OR FA2H OR MSMO1 OR HMOX2 OR TTYH1 OR CYP11B1 OR ALKBH2 OR KIF4A OR FDX2 OR ABCB6 OR SLC40A1 OR SLC39A1 OR CISD3 OR SRI OR ALAS2 OR REP15 OR ALOX12B OR ATP6V1G1 OR ATP6V1F OR ATP13A2 OR NFU1 OR CYP51A1 OR ATP6V0A1 OR URS000055128B_9606) OR (“nutritional immunity” OR Aspergillosis Bacteria OR Bacterial OR Bacillus anthracis OR Bordetella OR bacterius OR Brucellosis OR Brucellosis OR Campylobacter OR Candida OR candidiasis OR Chagas OR Chlamydia OR Coxiela burnetii OR cholera OR Disease OR Enterocolitis OR Fever OR FUNGI OR PARASITE OR gastroenteritis OR Glanders OR Gram OR hepatitis OR HERPES OR Histoplasmosis OR HIV OR infection OR Infectious OR Inflammation OR influenza OR Leishmaniasis OR Legionella OR Leprosy OR Leptospirosis OR Leptospira OR Lyme OR malaria OR Melioidosis OR Meningococcal OR Meningitis OR Microbe OR mycobacteria OR Neurocysticercosis OR Neisseria gonorrhoeae trichomonas OR Oropharyngeal OR Osteomyelitis OR Otitis OR parasitic OR pathogene OR Pathogenic OR Periodontitis OR Pests OR Pseudomonas OR Plague OR pneumoniae OR poliomyelitis OR pylori OR Respiratory OR RSV OR Salmonella OR Sepsis OR syphilis OR Tonsillar OR trachomatis OR Treponema OR tuberculosis OR Tularemia OR Typhoid OR UTI OR Viral OR Virus OR Yaws OR Zoster OR Rubell OR Shigella salmonella camphilobacter helicobacter OR Streptococcus OR Toxoplasma OR Toxoplasmosis OR Ureaplasma OR Vibrio cholera)

- (FE OR iron OR ferric OR ferrous) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP) and (inflammation OR malaria OR infection OR Infectious OR tuberculosis OR cholera OR Aspergillosis OR Campylobacter OR Oropharyngeal OR candidiasis OR HIV OR trachomatis OR Enterocolitis OR Leishmaniasis OR Leprosy OR Meliodosis OR Neurocysticercosis OR Osteomyelitis OR Otitis OR Salmonella OR gastroenteritis OR pneumoniae OR influenza OR Tonsillar OR Disease OR Typhoid OR Fever OR Chagas OR pylori OR Meningococcal OR Periodontitis OR Respiratory OR RSV OR Virus OR Viral OR Sepsis OR UTI OR Brucellosis OR pathogene OR Pathogenic OR Microbe OR Gram OR bacteria OR bacterius OR FUNGI OR PARASITE OR “nutritional immunity” OR Tularaemia OR Brucellosis OR Leptospirosis OR syphilis OR Plague OR Glanders OR mycobacteria OR Yaws OR Treponema OR hepatitis OR parasitic OR Chlamydia OR poliomyelitis OR Zoster OR HERPES OR Histoplasmosis) and meta-analysis

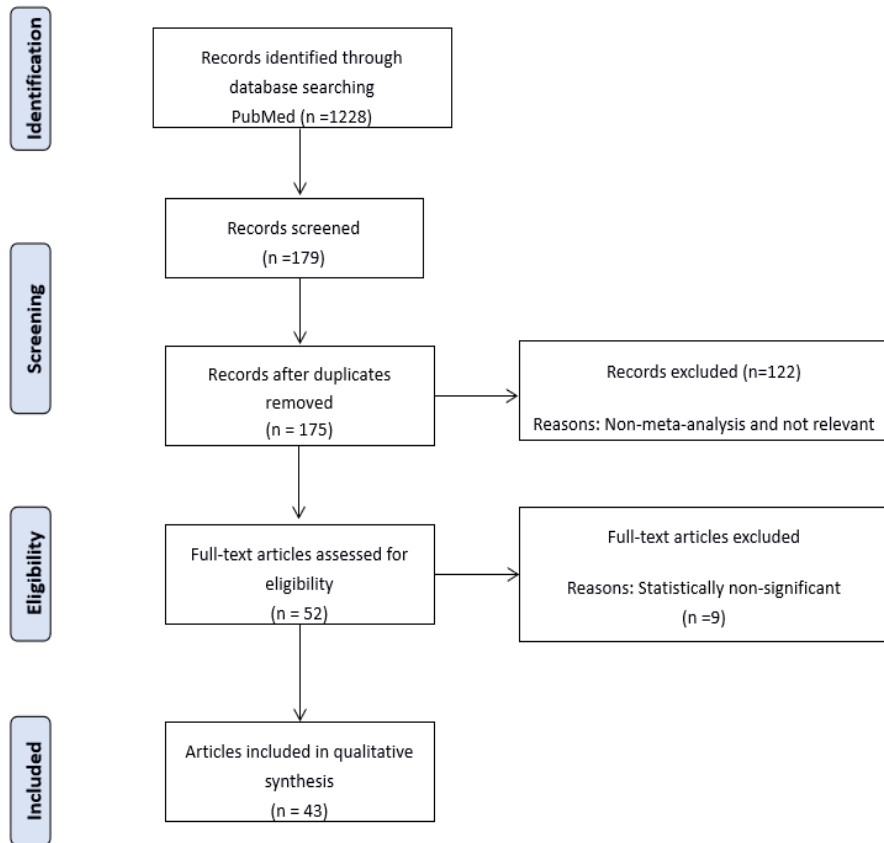
Το πρώτο Search Term που περιείχε τα γονίδια που προέκυψαν από την αναζήτηση στη βάση GeneOntology μας έδωσε 1135 άρθρα ως αποτελέσματα, ενώ το δεύτερο το οποίο δεν περιείχε συγκεκριμένα γονίδια και είχε και τη λέξη μετα-ανάλυση μας έδωσε 93 αποτελέσματα (Τα αποτελέσματα αυτά ανακτήθηκαν τον Οκτώβριο του 2020).

Η καταγραφές έγιναν σε Excel και είχαν την εξής πορεία :

- Το PubMedID, δηλαδή τον χαρακτηριστικό αριθμό κάθε δημοσιευμένου άρθρου.
- YES ή NO, δηλαδή αν είναι δεκτό το άρθρο ή όχι αντίστοιχα, με βάση τα κριτήρια που έχουμε θέσει στην έρευνα μας.
- Για τα άρθρα που είχαν YES έγινε εκτενέστερος έλεγχος του περιεχομένου τους και ορισμένα εξ αυτών απορρίφθηκαν.
- Στα άρθρα που τελικά έμειναν καταγράφηκαν δεδομένα σχετικά με την ημερομηνία δημοσίευσης, το όνομα του συγγραφέα και το αν περιείχαν στατιστικά σημαντικά ή μη δεδομένα.
- Για τα άρθρα με στατιστικά σημαντικά δεδομένα έγινε καταγραφή του Gene, δηλαδή το αναφερόμενο γονίδιο σε κάθε μελέτη, του SNP, δηλαδή του πολυμορφισμού για το συγκεκριμένο γονίδιο με τη μορφή rsnumber (η ακολουθία αριθμών που υπάρχει μετά το rs είναι μοναδική για τον κάθε πολυμορφισμό και το πρόθεμα rs είναι συντόμευση του referencesSNP(RefSNP)), της ασθένειας στην οποία αναφέρεται το άρθρο και τα μεγέθη που αφορούσαν το Odds Ratio (OR).



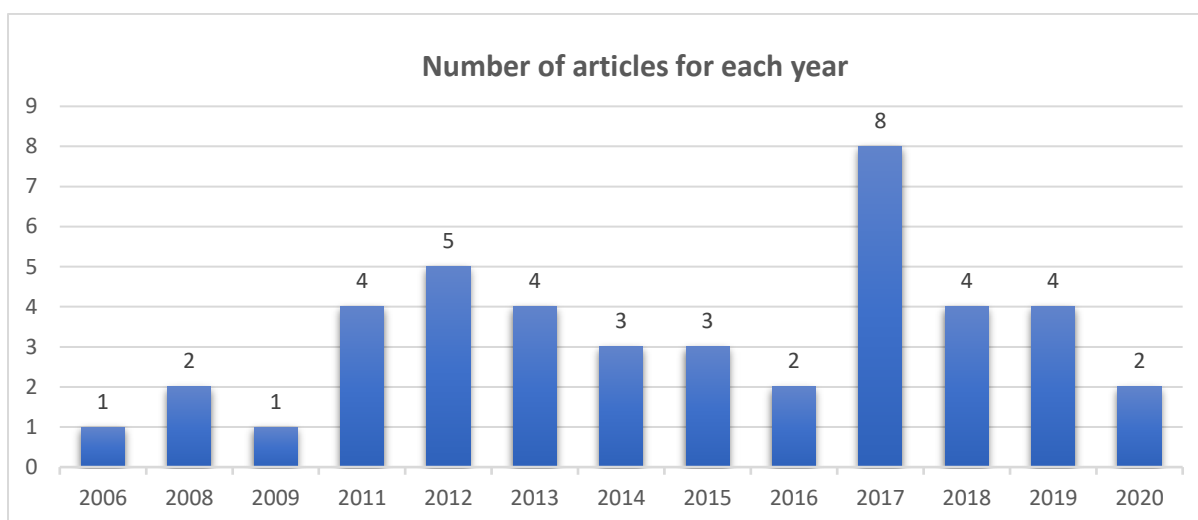
PRISMA 2009 Flow Diagram



Διάγραμμα 2 : Διάγραμμα ροής της παρούσας συστηματικής ανασκόπησης για μετα-αναλύσεις.

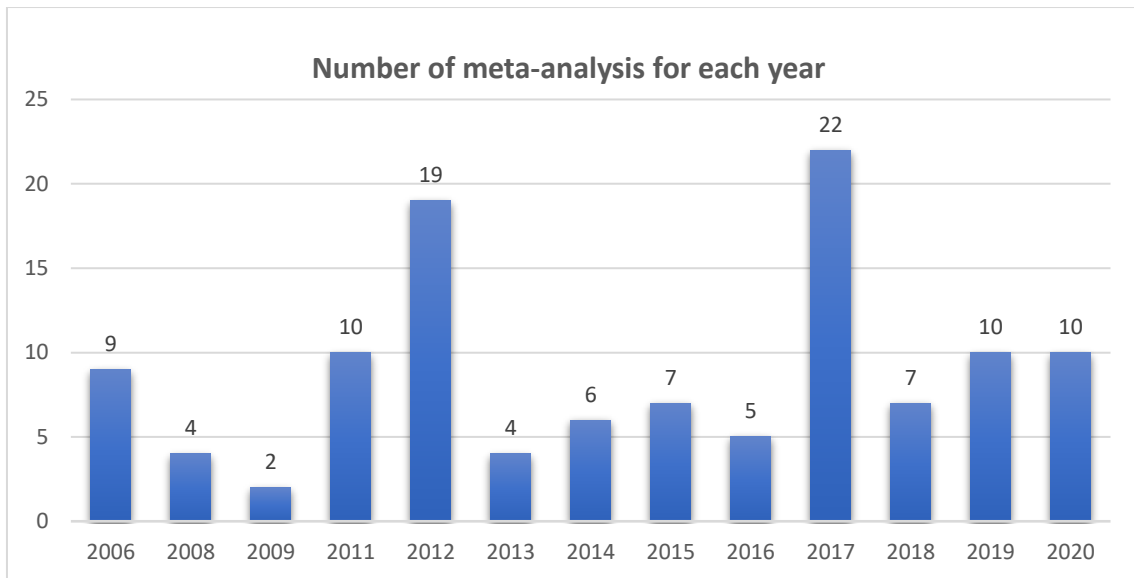
3.3 Περιγραφική Στατιστική

Στην παρούσα εργασία έγινε μία συνοπτική παρουσίαση ορισμένων δεδομένων που ελήφθησαν από τα άρθρα που μελετήθηκαν. Αρχικά παρατηρούμε ότι το χρονολογικό εύρος των μελετών κυμαίνεται από το 2006 έως το 2020. Η αιτία για την ύπαρξη μη παλαιότερων μελετών στη βάση δεδομένων είναι το γεγονός πως η ανακάλυψη των γονιδίων έγινε ευρέως γνωστή στην επιστημονική κοινότητα τον 21^ο αιώνα και η συσχέτιση της απορυθμισμένης έκφρασης των γονιδίων με τις ανθρώπινες ασθένειες σχετιζόμενες με τον σίδηρο, προέκυψε αργότερα. Όπως είναι ορατό στο γράφημα που ακολουθεί ο μεγαλύτερος αριθμός δημοσιευμένων άρθρων παρατηρείται στο έτος 2017, ενώ στα έτη 2006 και 2009 αντιστοιχεί μόλις από μία δημοσιευμένη μελέτη. Συνολικά τα άρθρα που μελετήθηκαν είναι 43.



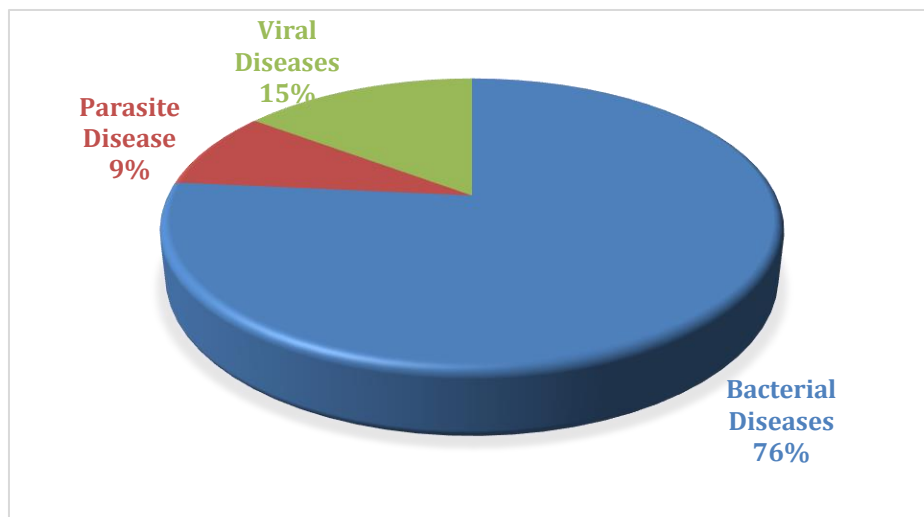
Γράφημα 1 : Χρονική κατανομή άρθρων

Από τα 43 άρθρα που μελετήθηκαν προέκυψαν 115 καταγραφές/μετα-αναλύσεις. Η διαφορά στον αριθμό άρθρων - καταγραφών υπάρχει λόγω του φαινομένου της ύπαρξης άνω της μίας μετα-ανάλυσης στο ίδιο άρθρο. Η χρονολογική κατανομή των καταγραφών κυμαίνεται επίσης από το 2006 έως το 2020 όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα, με το μεγαλύτερο ποσοστό καταγραφών να εμφανίζεται στα έτη 2012 και 2017.



Γράφημα 2 : Χρονολογική κατανομή μετα-αναλύσεων

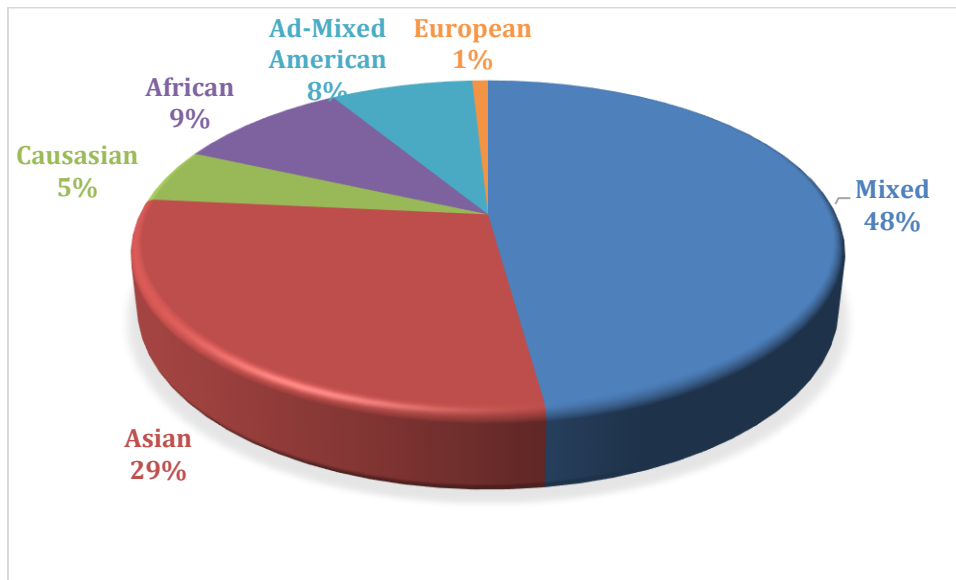
Οι 115 μετα-αναλύσεις που καταγράφηκαν σχετίζονταν με βακτηριακές , παρασιτικές και ιογενείς ασθένειες, πιο συγκεκριμένα όπως παρουσιάζεται και στο Γράφημα 3 οι 88 (76%) από τις 115 μετα-αναλύσεις παρουσιάζουν κάποια ασθένεια που οφείλεται σε βακτήριο, οι 17 (15%) σχετίζονται με ιογενή ασθένεια και οι 10 (9%) μελετούν ασθένειες που προκαλούνται από κάποιο παράσιτο.



Γράφημα 3 : Ποσοστιαία κατανομή του είδους των ασθενειών

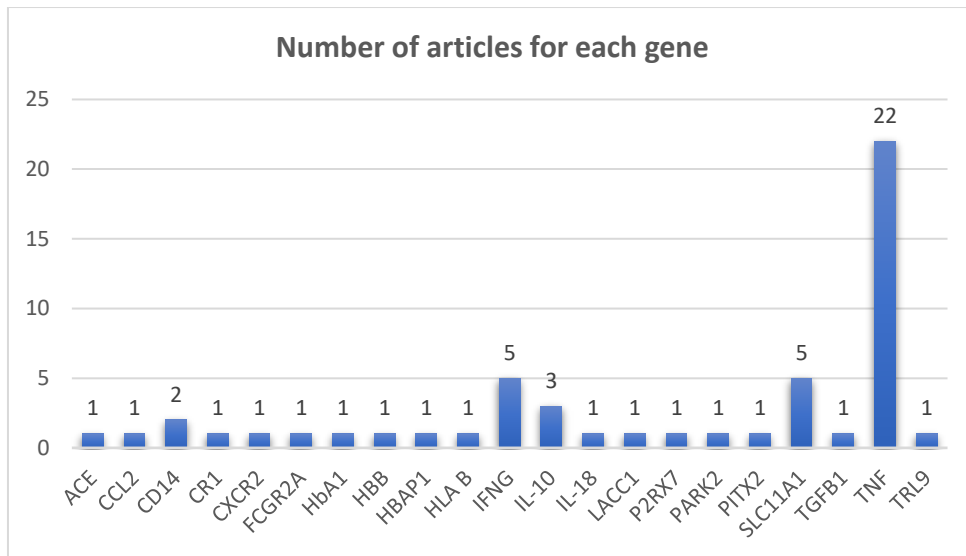
Αν εξεταστούν οι καταγραφές από άποψη εθνικότητας των συμμετεχόντων, τότε η πλειοψηφία περιλαμβάνει άτομα του γενικού πληθυσμού, αγγίζοντας τον αριθμό των 55 μετα-αναλύσεων. Ωστόσο υπάρχει και μία σημαντική μερίδα μελετών που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς και υγιείς ασιατικής καταγωγής (Asian), ακόμα υπάρχουν μελέτες σε αμιγείς σε ευρωπαϊούς πληθυσμούς (European, Caucasian), σε άτομα αφρικανικής προέλευσης (African)

και τέλος σε ομάδες αμερικανών (Ad-mixed American). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες υποομάδες του πληθυσμού, οι μετα-αναλύσεις που αναφέρονται σε άτομα ασιατικής καταγωγής εμφανίζουν αρκετά υψηλό ποσοστό και αυτό οφείλεται στο γεγονός πως αρκετές μετα-αναλύσεις, αλλά και οι ερευνητικοί φορείς που υποστηρίζουν τις μελέτες, είναι από χώρες της Ασίας [Γράφημα 4].



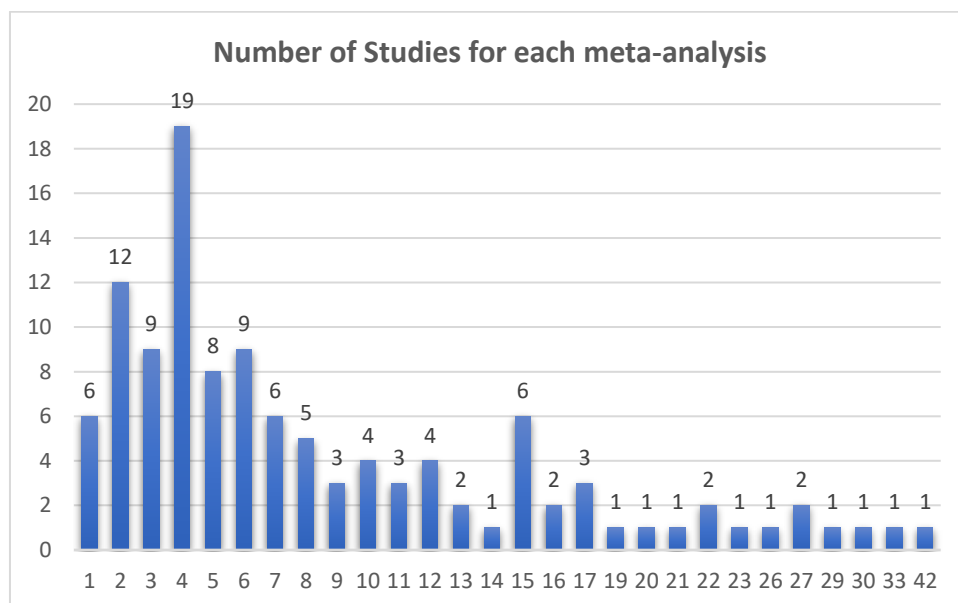
Γράφημα 4 : Ποσοστιαία κατανομή πληθυσμού

Στις 43 μελέτες των οποίων τα δεδομένα καταγράφηκαν εντοπίστηκαν συνολικά 21 γονίδια. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται ο αριθμός των άρθρων που αναφέρεται για κάθε γονίδιο. Υπάρχουν μελέτες που περιέχουν πληροφορίες για περισσότερα από ένα γονίδια, για αυτό το λόγο το σύνολο των μελετών στο συγκεκριμένο γράφημα είναι 53 και όχι 43, όσες δηλαδή και οι μελέτες που καταγράφηκαν. Επιπλέον παρατηρούμε πως τα περισσότερα άρθρα αναφέρονται στο γονίδιο TNF [Γράφημα 5].



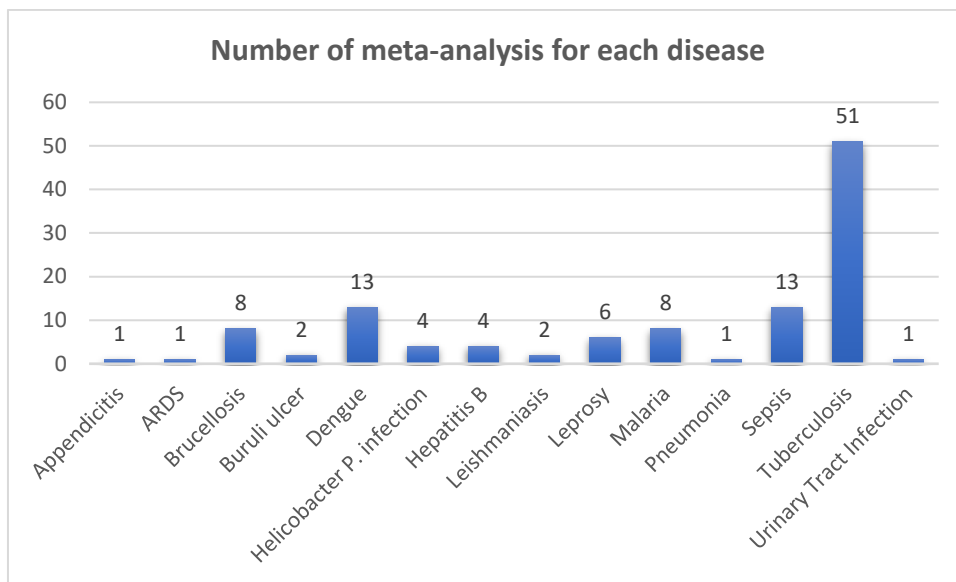
Γράφημα 5 : Αριθμός άρθρων για κάθε γονίδιο

Μελετώντας το πλήθος των κλινικών ερευνών, που περιλαμβάνει κάθε μετα-ανάλυση, αυτό κυμαίνεται σε εύρος από μία έρευνα έως τον μέγιστο αριθμό των 42 ερευνών. Η πλειοψηφία των μετα-αναλύσεων περιλαμβάνουν από 2 έως 6 πρωτότυπες έρευνες. Πιο αναλυτικά ένα 17% των μετα-αναλύσεων έχουν συμπεριλάβει 4 case-controls μελέτες, ένα 10% περιλαμβάνει από 2, ένα 8% από 3 ή 6 μελέτες, ένα 7% από 5 μελέτες, ένα 5% από 1 ή 7 ή 15 μελέτες και τέλος από 4% έως 1% κυμαίνονται οι μετα-αναλύσεις που περιλαμβάνουν από 8 έως 14 και 16 έως 42 μελέτες [Γράφημα 6].



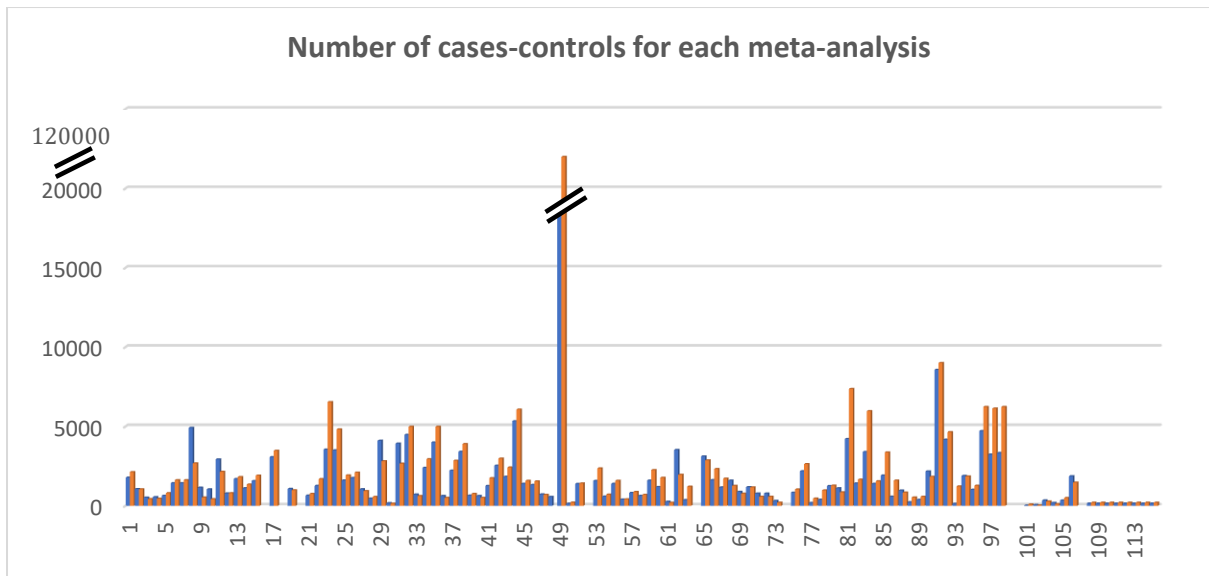
Γράφημα 6 : Κατανομή αριθμού case-control studies σε κάθε μετα-ανάλυση που καταγράφηκε

Όσον αφορά τις ασθένειες συνολικά καταγράφηκαν 14 ασθένειες, από τις οποίες η πιο εξεταζόμενη είναι η φυματίωση (Tuberculosis) σε ποσοστό 43,2%. Σε σειρά συχνότητας εμφάνισης στις μετα-αναλύσεις που καταγράφηκαν ακολουθούν η σήψη (Sepsis) και ο δάγκειος πυρετός (Dengue) με ποσοστό 11%. Έπειτα ακολουθούν η βρουκέλλωση (Brucellosis) και η ελονοσία (Malaria) με ποσοστό περίπου 7%, με ποσοστό 5% η λέπρα (Leprosy), με ποσοστό 3,5% η λοίμωξη του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και η ηπατίτιδα Β και τέλος με ποσοστό 1,7% η λεισμανίαση (Leishmaniasis) και το έλκος Buruli. Τέλος με ποσοστό μικρότερο έχουν καταγραφεί μετα-αναλύσεις από 4 ακόμα ασθένειες, όπου μία εξ αυτών είναι και η πνευμονία [Γράφημα 7].



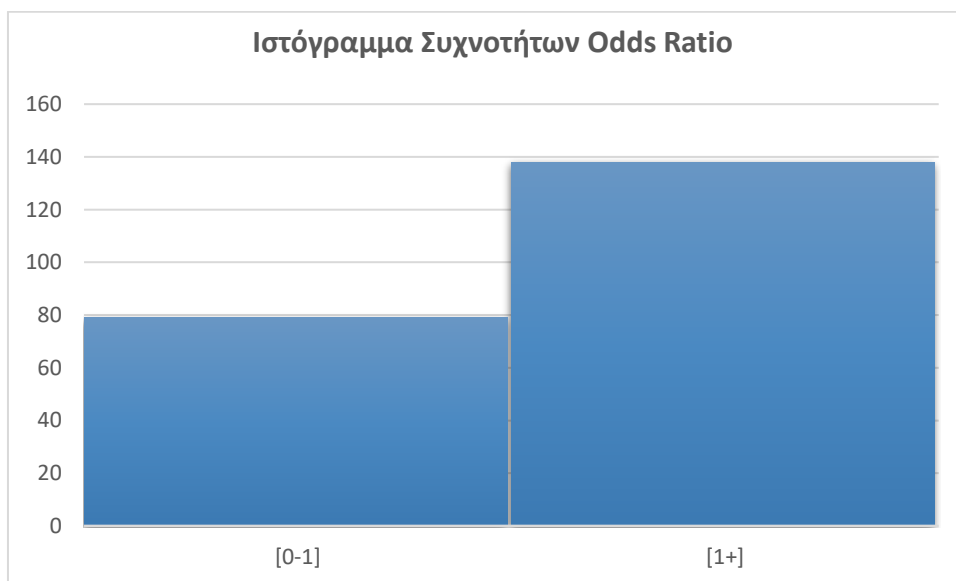
Γράφημα 7 : Κατανομή των καταγραφών ως προς τις ασθένειες

Συνολικά οι μετα-αναλύσεις που συμπεριλήφθηκαν περιλάμβαναν 181.194 ασθενείς και 303.884 υγιείς. Σε κάθε μετα-ανάλυση ο αριθμός των ασθενών και ο αριθμός των υγιών που συμμετείχαν κυμαίνεται για τους ασθενείς από 24 έως 18.773, ενώ για τους υγιείς από 36 έως 114.907 [Γράφημα 8].



Γράφημα 8: Κατανομή αριθμού ασθενών και υγιών ατόμων σε κάθε μετα-ανάλυση που καταγράφηκε

Στα ιστογράμματα συχνοτήτων παρουσιάζονται οι συσχετίσεις των γονιδίων με τις ανθρώπινες ασθένειες που σχετίζονται με τον σίδηρο. Στην παρούσα εργασία ιστόγραμμα δημιουργήθηκε για την παρατήρηση των τιμών odds ratio από όλες τις καταγραφές και σε όλους τους γονοτύπους. Με αυτό τον τρόπο διατυπώνεται αν ο παράγοντας έχει επιβραδυντική ή ενισχυτική δράση δηλαδή αν η υπερέκφραση ή η υποέκφραση του γονιδίου αποτελεί κίνδυνο και κακή πρόγνωση για την επιβίωση ασθενών. Σημαντικό είναι πως η κατανομή των παρατηρήσεων τείνει προς την κανονική κατανομή [Γράφημα 9].



Γράφημα 9: Ιστόγραμμα συχνοτήτων odds ratio όλων των καταγραφών

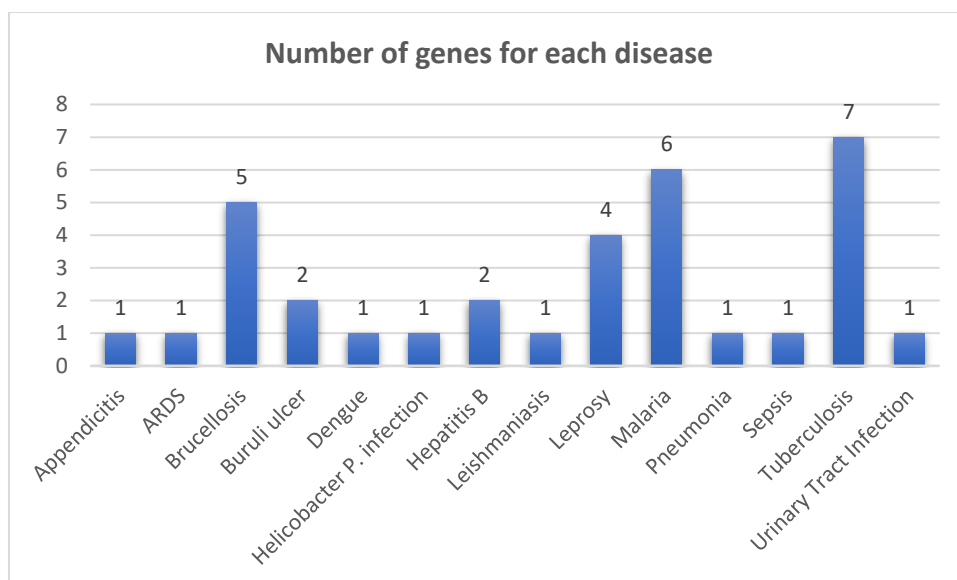
3.4 Έλεγχος Γενετικής Συσχέτισης Γονιδίων με Ανθρώπινες Ασθένειες Σιδήρου

Έπειτα από την ολοκλήρωση της διαδικασίας επιλογής μελετών με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν καταλήξαμε στην ύπαρξη συσχέτισης 21 γονιδίων με 14 ασθένειες. Ο πίνακας που ακολουθεί [Πίνακας 1] παρουσιάζει τα ζεύγη συσχετίσεων των γονιδίων με τις αντίστοιχες ασθένειες. Παρατηρούμε πως υπάρχουν γονίδια που συσχετίζονται με παραπάνω από μία ασθένεια.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων συσχετίσεων γονιδίων με ασθένειες και καταγραφή του αριθμού των μετα-αναλύσεων		
GENES	DISEASES	Αριθμός μετα-αναλύσεων που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα εργασία
ACE	ARDS	1
CCL2	Tuberculosis	3
CD14	Tuberculosis	3
CR1	Malaria	1
CXCR2	Urinary Tract Infection	1
FCGR2A	Malaria	3
HBAP1	Malaria	1
HBB	Malaria	1
HbA1	Malaria	1
IFNG	Brucellosis	2
	Leprosy	1
	Tuberculosis	6
IL-10	Tuberculosis	1
	Brucellosis	1
	Leprosy	1
IL-18	Brucellosis	1
LACC1	Leprosy	2
P2RX7	Tuberculosis	1
PITX2	Appendicitis	1
PRKN	Buruli ulcer	1
SLC11A1	Leishmaniasis	2
	Tuberculosis	27
	Buruli ulcer	1
TGFB1	Brucellosis	2
TLR9	Malaria	1

TNF	Leprosy	2
	Brucellosis	2
	Helicobacter P. infection	4
	Tuberculosis	10
	Sepsis	13
	Pneumonia	1
	Dengue	13
	Hepatitis B	2
HLA B	Hepatitis B	2

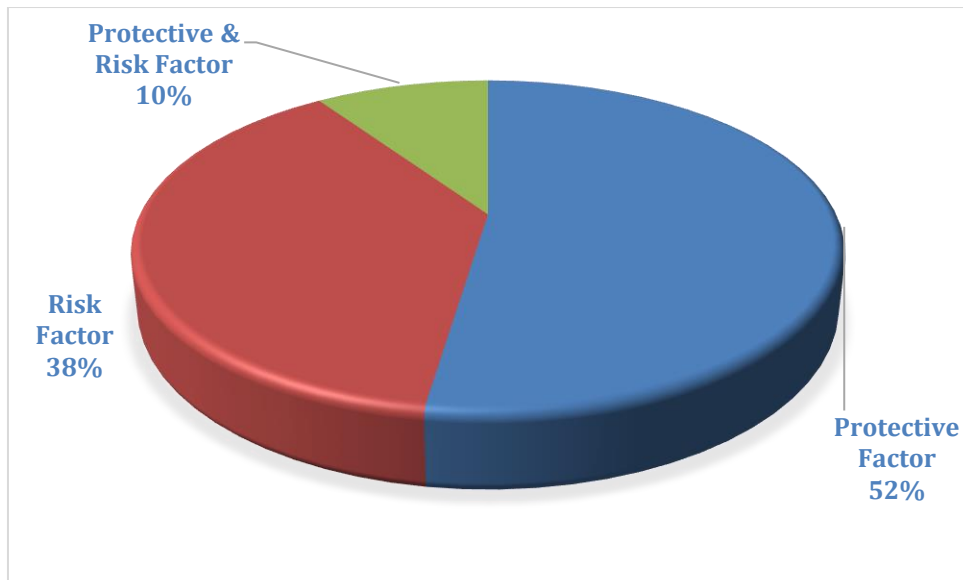
Όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα [Γράφημα 10], τα 21 γονίδια σχετίζονται με 14 ανθρώπινες ασθένειες. Παρατηρήθηκε πως η ασθένεια με τα περισσότερα συσχετιζόμενα γονίδια είναι η φυματίωση και ακολουθούν η ελονοσία και η βρουκέλλωση.



Γράφημα 10: Κατανομή των γονιδίων στις ανθρώπινες ασθένειες

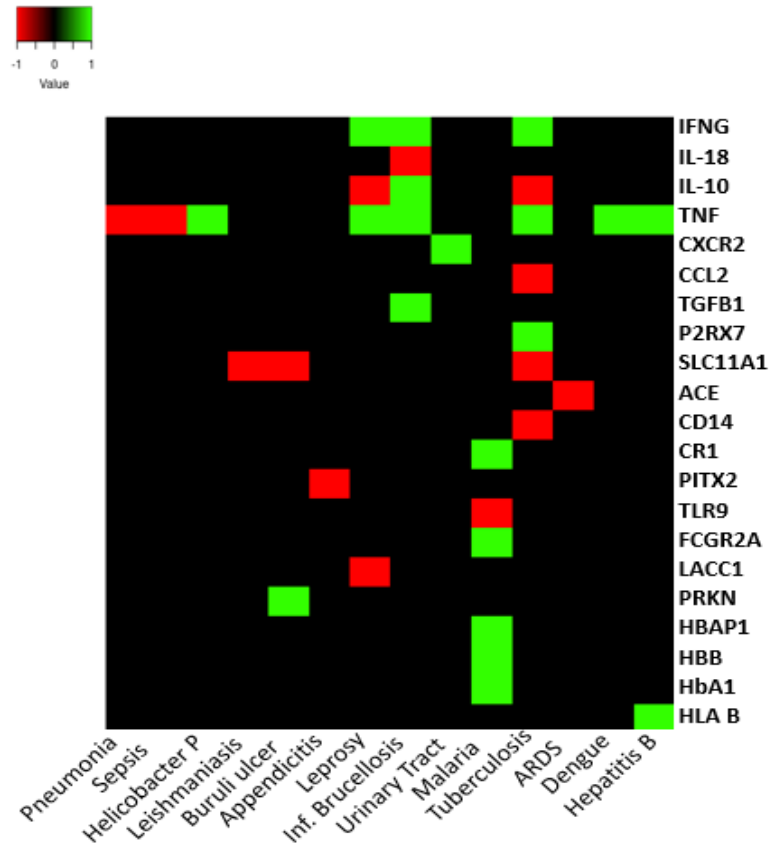
Ο πολυμορφισμός ενός γονιδίου μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ρίσκου για κάποιες ασθένειες, ενώ σε άλλα γονίδια ο πολυμορφισμός τους μπορεί να λειτουργήσει ως προστατευτικός παράγοντας. Από τα γονίδια που καταγράψαμε στην παρούσα εργασία τα 11 εξ αυτών λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες, ενώ 8 πολυμορφισμοί γονιδίων αποτελούν παράγοντες ρίσκου. Ωστόσο υπάρχουν 2 γονίδια, πιο συγκεκριμένα το γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF) και η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), τα οποία εμφανίζονται και ως παράγοντες ρίσκου και ως προστατευτικοί ανάλογα με την ασθένεια.[Πίνακας 2]

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων σχετικά με τη συμπεριφορά των πολυμορφισμών των γονιδίων στις ασθένειες		
DISEASES	Protective Factor	Risk Factor
Pneumonia		TNF
Sepsis		TNF
Helicobacter P.	TNF	
Leishmaniasis		SLC11A1
Buruli ulcer	PRKN	SLC11A1
Appendicitis		PITX2
Leprosy	IFNG,TNF	IL-10,LACC1
Inf. Brucellosis	IFNG,IL-10,TNF,TGFB1	IL-18
Urinary Tract	CXCR2	
Malaria	CR1, FCGR2A, HBAP1, HBB, HbA1	TLR9
Tuberculosis	IFNG,TNF,P2RX7	IL-10,CCL2,SLC11A1,CD14
ARDS		ACE
Dengue	TNF	
Hepatitis B	TNF,HLAB	



Γράφημα 11: Ποσοστιαία κατανομή των γονιδίων ως προς την έκφρασή τους στις ασθένειες που μελετήθηκαν

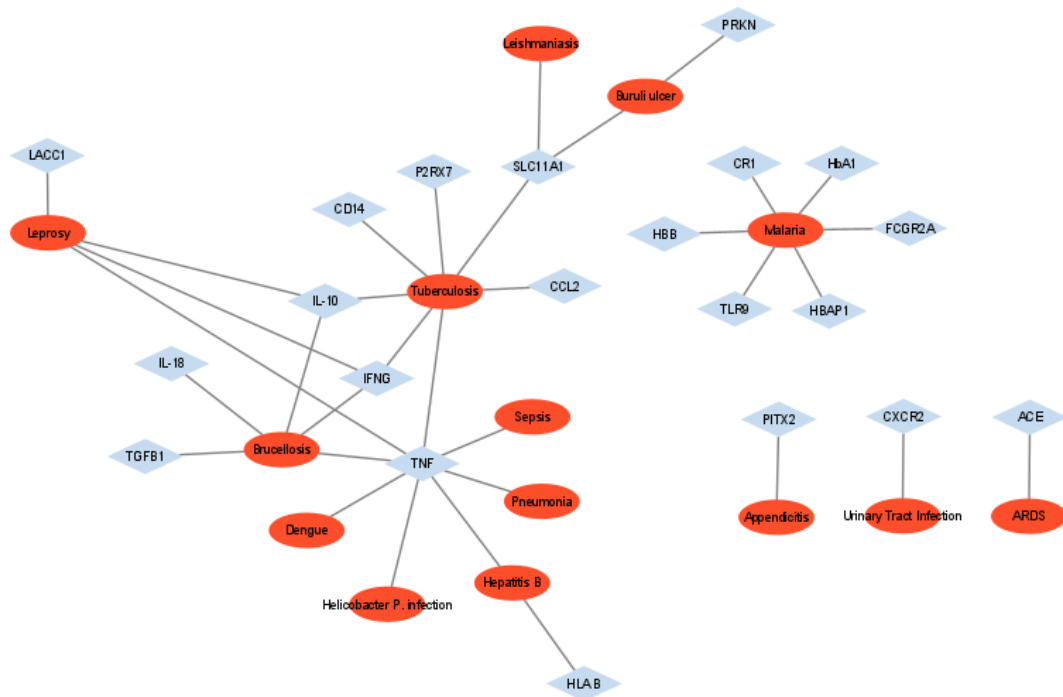
Η οπτικοποίηση των δεδομένων που σχετίζονται με την έκφραση των γονιδίων στις ασθένειες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου Heatmapper, πιο συγκεκριμένα αποτυπώθηκε η υπερέκφραση ή υποέκφραση των γονιδίων στις ασθένειες. Αναλυτικότερα όταν η τιμή του Odds Ratio είναι μεγαλύτερη από τη μονάδα τότε ο πολυμορφισμός του γονιδίου αποτελεί ρίσκο (Risk) και αυτό το γεγονός στο θερμικό χάρτη απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, ενώ αν η τιμή του Odds Ratio είναι μικρότερη της μονάδας τότε έχει προστατευτικό ρόλο (Protective) και απεικονίζεται στον θερμικό χάρτη με πράσινο χρώμα.



Εικόνα 11 : Heatmap

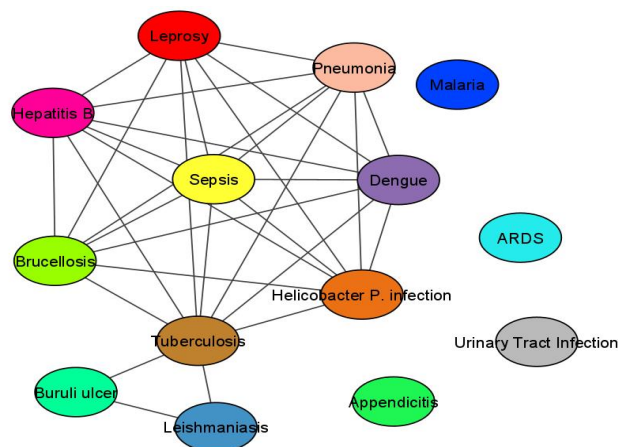
3.5 Δημιουργία, Ανάλυση και Αξιολόγηση Δικτύων Συσχετίσεων

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του δικτύου συσχετίσεων είναι το Cytoscape. Στο δίκτυο που προκύπτει αναπαρίστανται οι συσχετίσεις των 21 γονιδίων με τις 14 ασθένειες που καταγράφηκαν, είναι εμφανές ότι κάποια γονίδια εμφανίζουν συσχέτιση με περισσότερες από μία ασθένειες, ενώ άλλα συσχετίζονται με μία μόνο ασθένεια. Σε σχήμα ρόμβου και με μπλε ανοιχτό χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια, ενώ σε σχήμα έλλειψης και με πορτοκαλί χρώμα οι ασθένειες. Συνολικά παρατηρούμε 34 συσχετίσεις.



Εικόνα 12.1 : Δίκτυο Συσχετίσεων Γονιδίων-Ασθενειών. Απεικόνιση γονιδίων με μπλε χρώμα και σχήμα ρόμβου και απεικόνιση ασθενειών με πορτοκαλί χρώμα και σχήμα έλλειψης.

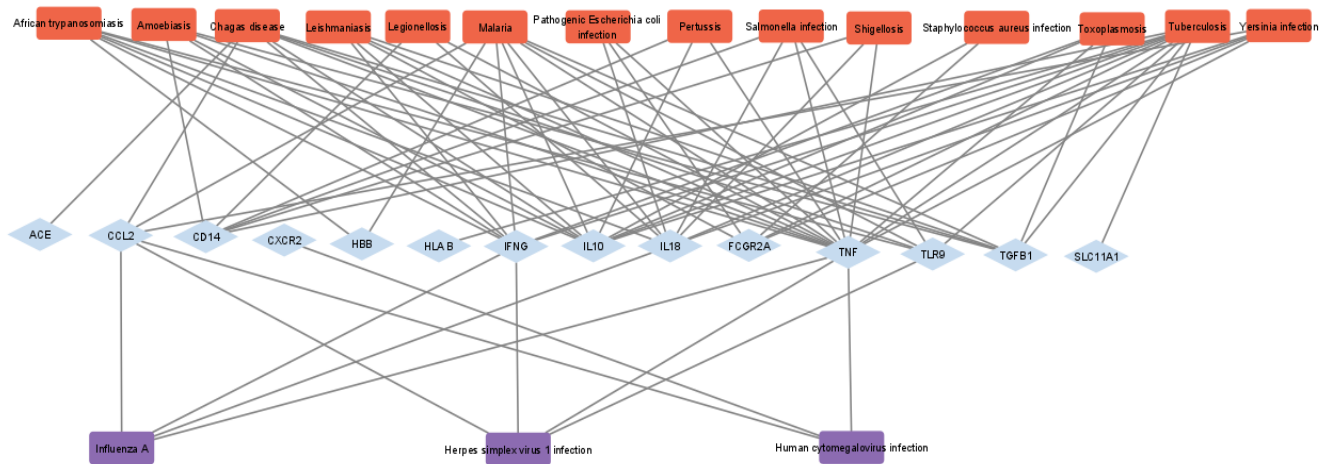
Έπειτα θεωρώντας ως συσχετιζόμενες ασθένειες αυτές που μοιράζονται κάποιο κοινό πολυμορφισμό γονιδίου, με τον οποίο συσχετίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά, δημιουργήσαμε ένα δίκτυο συσχετιζόμενων ασθενειών. Στο συγκεκριμένο δίκτυο παρατηρούμε πως υπάρχουν ασθένειες που δεν συσχετίζονται με καμία άλλη ασθένεια, αλλά και ασθένειες που συσχετίζονται με παραπάνω από μία ασθένεια. Συνολικά παρατηρούμε 31 συσχετίσεις.



Εικόνα 12.2: Δίκτυο Συσχετίσεων Ασθενειών.

Στη συνέχεια ακολουθούν τα δίκτυα συσχετίσεων γονιδίων της παρούσας έρευνας που προέκυψαν από τη βάση KEGG Pathways. Κάνοντας μία αναζήτηση στη βάση

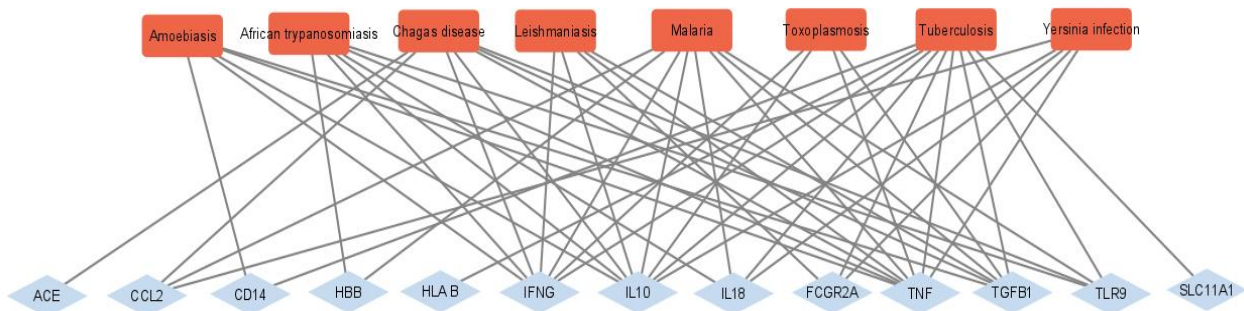
χρησιμοποιώντας τα γονίδια που έχουμε συγκεντρώσει από την βιβλιογραφική αναζήτηση λάβαμε ως αποτέλεσμα ορισμένες συσχετιζόμενες ασθένειες. Επιπλέον χρησιμοποιήσαμε δύο περιπτώσεις σφάλματος $FDR < 0.05$ και $FDR < 0.001$, ώστε στη δεύτερη περίπτωση να συμπεριλάβουμε αποτελέσματα με ακόμα μικρότερο ποσοστό λάθους.



Εικόνα 13: Δίκτυο Συσχετίσεων Γονιδίων-Ασθενειών από την KEGG Pathways με $FDR < 0.05$.

Απεικόνιση γονιδίων με μπλε χρώμα και σχήμα ρόμβου, απεικόνιση βακτηριακών ή παρασιτικών λοιμώξεων με πορτοκαλί χρώμα και σχήμα παραλληλεπίπεδου και απεικόνιση ιογενών λοιμώξεων με μωβ χρώμα και σχήμα παραλληλεπίπεδου.

Στο παραπάνω δίκτυο παρατηρούμε πως 14 από τα γονίδια που συγκεντρώσαμε στην αναζήτησή μας συσχετίζονται με 17 ασθένειες που πληρούν τα κριτήρια της έρευνάς μας, με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται οι ασθένειες που σχετίζονται με βακτήρια ή παράσιτα, ενώ με μωβ χρώμα οι ασθένειες που σχετίζονται με κάποιον ιό. Συνολικά παρατηρούμε 79 συσχετίσεις. Επιπρόσθετα στο δίκτυο που ακολουθεί, στο οποίο τα αποτελέσματα είχαν $FDR < 0.001$ παρατηρούμε πως 13 από τα γονίδια της έρευνάς μας συσχετίζονται με 8 ασθένειες, οι οποίες σχετίζονται όλες με βακτήρια ή παράσιτα. Τέλος, παρατηρούμε 50 συσχετίσεις.



Εικόνα 14: Δίκτυο Συσχετίσεων Γονιδίων-Ασθενειών από την KEGG Pathways με $FDR < 0.001$. Απεικόνιση γονιδίων με μπλε χρώμα και σχήμα ρόμβου και απεικόνιση βακτηριακών ή παρασιτικών λοιμώξεων με πορτοκαλί χρώμα.

3.6 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από KEGG Database

Μέσω της KEGG Database πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τις ασθένειες που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία, για τις οποίες η KEGG έδειχνε συσχέτιση με τα γονίδια που καταγράφηκαν από την βιβλιογραφική αναζήτηση. Επαληθεύτηκαν 7 κοινές με τη δική μας έρευνα συσχετίσεις γονιδίων ασθενειών, εκ των οποίων όλες σχετίζονταν με ασθένειες που προκαλούνται είτε από βακτήρια είτε από παράσιτα. Επιπλέον υπήρξε μία ασθένεια, συγκεκριμένα η Λεισμανίαση, η οποία καταγράφηκε στη δική μας έρευνα να συσχετίζεται με το γονίδιο SLC11A1, ωστόσο ενώ υπάρχουν καταγραφές στην KEGG για την ασθένεια αυτή δεν έχει εμφανιστεί συσχέτιση με το συγκεκριμένο γονίδιο.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας συσχετίσεων γονιδίων ασθενειών στη δική μας έρευνα και στην KEGG Pathway και καταγραφή των κοινών συσχετίσεων			
Genes	Present Study Diseases	Associated Diseases according to KEGG db	Common
ACE	ARDS	Chagas Disease	
CCL2	Tuberculosis	Malaria	
	-	Chagas disease	
	-	Yersinia infection	
	-	Influenza A	
	-	Herpes simplex virus 1 infection	
	-	Human cytomegalovirus infection	

CD14	Tuberculosis	Tuberculosis	✓
	-	Amoebiasis	
	-	Legionellosis	
	-	Salmonella infection	
	-	Pertussis	
	-	Shigellosis	
CR1	Malaria	-	
CXCR2	Urinary Tract Infection	Human cytomegalovirus infection	
FCGR2A	Malaria	Tuberculosis	
	-	Leishmaniasis	
	-	Yersinia infection	
	-	Pathogenic Escherichia coli infection	
	-	Staphylococcus aureus infection	
HBAP1	Malaria	-	
HBB	Malaria	Malaria	✓
	-	African trypanosomiasis	
HbA1	Malaria	-	
IFNG	Brucellosis	Malaria	
	Leprosy	African trypanosomiasis	
	Tuberculosis	Tuberculosis	✓
	-	Chagas disease	
	-	Leishmaniasis	
	-	Amoebiasis	
	-	Toxoplasmosis	
	-	Influenza A	
	-	Herpes simplex virus 1 infection	
IL-10	Tuberculosis	Tuberculosis	✓
	Brucellosis	African trypanosomiasis	
	Leprosy	Malaria	
	-	Chagas disease	
	-	Leishmaniasis	
	-	Amoebiasis	
	-	Yersinia infection	
	-	Toxoplasmosis	
	-	Pertussis	
	-	Staphylococcus aureus infection	
IL-18	Brucellosis	Legionellosis	
	-	Salmonella infection	
	-	Malaria	
	-	Tuberculosis	

	-	African trypanosomiasis	
	-	Yersinia infection	
	-	Influenza A	
	-	Pathogenic Escherichia coli infection	
	-	Shigellosis	
LACC1	Leprosy	-	
P2RX7	Tuberculosis	-	
PITX2	Appendicitis	-	
PRKN	Buruli ulcer	-	
SLC11A1	Tuberculosis	Tuberculosis	✓
	Leishmaniasis	-	
	Buruli ulcer	-	
TGFB1	Brucellosis	Malaria	
	-	Tuberculosis	
	-	Chagas disease	
	-	Leishmaniasis	
	-	Amoebiasis	
	-	Toxoplasmosis	
TLR9	Malaria	Malaria	✓
	-	African trypanosomiasis	
	-	Tuberculosis	
	-	Chagas disease	
	-	Salmonella infection	
	-	Herpes simplex virus 1 infection	
TNF	Leprosy	Malaria	
	Brucellosis	African trypanosomiasis	
	Helicobacter P. infection	Chagas disease	
	Tuberculosis	Tuberculosis	✓
	Sepsis	Leishmaniasis	
	Pneumonia	Amoebiasis	
	Dengue	Yersinia infection	
	Hepatitis B	Toxoplasmosis	
	-	Influenza A	
	-	Legionellosis	
	-	Salmonella infection	
	-	Pertussis	
	-	Pathogenic Escherichia coli infection	
	-	Herpes simplex virus 1 infection	
-	Shigellosis		

	-	Human cytomegalovirus infection	
HLA B	Hepatitis B	Tuberculosis	

Στη συνέχεια ακολουθεί ο πίνακας με τη συμφωνία (Concordance %) για τα δεδομένα της παρούσας μελέτης με αυτά από τη βάση δεδομένων KEGG Pathway.

Πίνακας 4 : Πίνακας συμφωνίας (Concordance %) δεδομένων παρούσας μελέτης με δεδομένα από τη βάση δεδομένων KEGG Pathway			
Genes	Number of associated diseases according to present study	Number of associated diseases according to KEGG db	% Concordance with diseases from KEGG db
ACE	1	1	0%
CCL2	1	6	0%
CD14	1	6	100%
CR1	1	0	0%
CXCR2	1	1	0%
FCGR2A	1	5	0%
HBAP1	1	0	0%
HBB	1	2	100%
HbA1	1	0	0%
IFNG	3	9	33%
IL-10	3	10	33%
IL-18	1	9	0%
LACC1	1	0	0%
P2RX7	1	0	0%
PITX2	1	0	0%
PRKN	1	0	0%
SLC11A1	3	1	33%
TGFB1	1	6	0%

TLR9	1	6	100%
TNF	8	16	12,5%
HLA B	1	1	0%

Οι 7 κοινές συσχετίσεις γονιδίων ασθενειών που βρέθηκαν ανάμεσα στη παρούσα μελέτη και τη βάση KEGG Pathway καταγράφονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5 : Συγκεντρωτικός πίνακας κοινών συσχετίσεων	
Genes	Common in KEGG Disease
CD14	Tuberculosis
IFNG	Tuberculosis
IL-10	Tuberculosis
HBB	Malaria
TNF	Tuberculosis
TLR9	Malaria
SLC11A1	Tuberculosis

3.7 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από STRING Database

Μέσω της STRING Database αναζητήσαμε τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν τα γονίδια που συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφική αναζήτηση. Πιο συγκεκριμένα η βάση μας έδωσε σαν αποτελέσματα ότι 16 από τα γονίδια της παρούσας έρευνας σχετίζονται με την πρωτεϊνική δέσμευση, 12 σχετίζονται με κυτοκίνες και με τη μεταγωγή σήματος, ενώ 19 από τα γονίδια σχετίζονται με μεμβράνες.

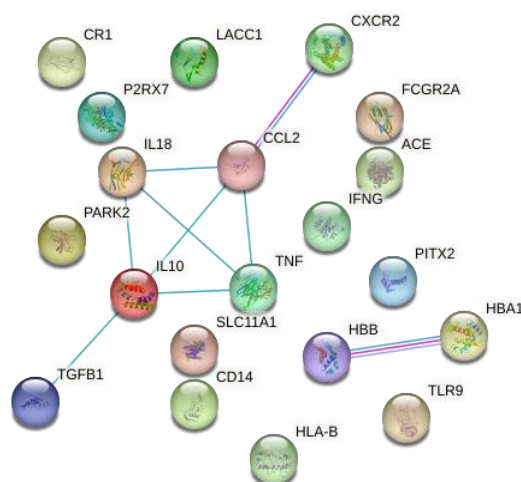
Πίνακας 6 : Πίνακας Molecular Function (Gene Ontology) των 21 γονιδίων της παρούσας έρευνας				
#term ID	term description	observed gene count	false discovery rate	Proteins identify in the present study
GO:0005126	Cytokine receptor binding	7	1.93e-05	TGFB1, CCL2, IFNG, IL18, TLR9, TNF, IL10

GO:0005102	Signaling receptor binding	11	0.00014	TGFB1, CCL2, IFNG, IL18, ACE, P2RX7, TLR9, PARK2, TNF, HLA-B, IL10
GO:0005125	Cytokine activity	6	0.00014	TGFB1, CCL2, IFNG, IL18, TNF, IL10
GO:0001847	Opsonin receptor activity	2	0.0069	CD14, CR1
GO:0005515	Protein binding	16	0.0292	TGFB1, CCL2, IFNG, SLC11A1, IL18, ACE, PITX2, CXCR, P2RX7, HBB, TLR9, PARK2, CR1, TNF, HLA-B, IL10
GO:0005344	Oxygen carrier activity	2	0.0424	HBA1, HBB
GO:0005488	Binding	20	0.0429	TGFB1, CCL2, IFNG, SLC11A1, FCGR2A, IL18, ACE, PIT2, CD14, CXCR2, HBA1, P2RX7, HBB, TLR9, PARK2, CR1, LACC1, TNF, HLA-B, IL10

Πίνακας 7 : Πίνακας Cellular Component (Gene Ontology) των 21 γονιδίων της παρούσας έρευνας

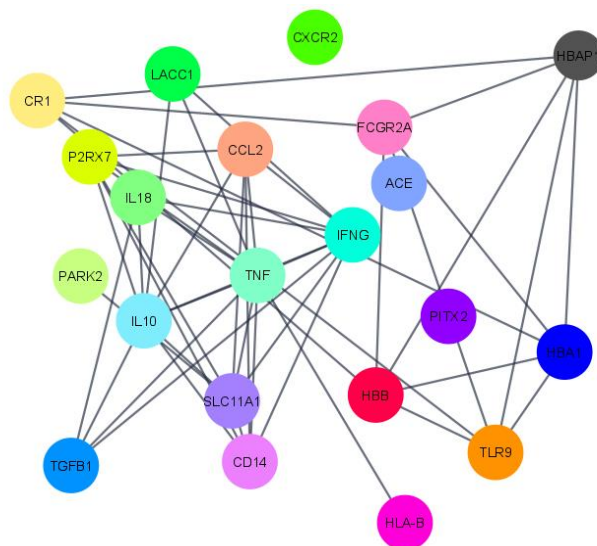
#term ID	term description	observed gene count	false discovery rate	Proteins identify in the present study
GO:0009986	Cell surface	8	0.00076	TGFB1, ACE, CD14, CXCR2, P2RX7, CR1, TNF, HLA-B
GO:0030141	Secretory granule	8	0.00076	TGFB1, SLC11A1, FCGR2A, CD14, CXCR2, HBB, CR1, HLA-B
GO:0030667	Secretory granule membrane	6	0.00076	SLC11A1, FCGR2A, CD14, CXCR2, CR1, HLA-B
GO:0031410	Cytoplasmic vesicle	12	0.00076	TGFB1, SLC11A1, FCGR2A, ACE, CD14, CXCR2, HBA1, HBB, TLR9, CR1, TNF, HLA-B
GO:0005615	Extracellular space	12	0.0028	TGFB1, CCL2, IFNG, IL18, ACE, CD14, HBA1, HBB, CR1, TNF, HLA-B, IL10
GO:0009897	External side of plasma membrane	5	0.0028	ACE, CD14, CXCR2, P2RX7, TNF
GO:0012505	Endomembrane system	14	0.0028	TGFB1, SLC11A1, FCGR2A, ACE, CD14, CXCR2, P2RX7, HBB, TLR9, PARK2, CR1, LACC1, TNF, HLA-B

GO:0030139	Endocytic vesicle	5	0.0028	SLC11A1, HBA1, HBB, TLR9, HLA-B
GO:0098552	Side of membrane	6	0.0028	ACE, CD14, CXCR2, P2RX7, TNF, HLA-B
GO:0005576	Extracellular region	13	0.0044	TGFB1, CCL2, IFNG, IL18, ACE, CD14, HBA1, HBB, TLR9, CR1, TNF, HLA-B, IL10
GO:0031838	Haptoglobin-hemoglobin complex	2	0.0100	HBA1, HBB
GO:0005833	Hemoglobin complex	2	0.0109	HBA1, HBB
GO:0031226	Intrinsic component of plasma membrane	8	0.0152	SLC11A1, FCGR2A, CD14, CXCR2, P2RX7, CR1, TNF, HLA-B
GO:0098805	Whole membrane	8	0.0152	SLC11A1, FCGR2A, CD14, CXCR2, TLR9, CR1, TNF, HLA-B
GO:0071682	Endocytic vesicle lumen	2	0.0192	HBA1, HBB
GO:0072562	Blood microparticle	3	0.0192	TGFB1, HBA1, HBB
GO:0005768	Endosome	6	0.0232	SLC11A1, ACE, CD14, TLR9, TNF, HLA-B
GO:0045335	Phagocytic vesicle	3	0.0275	SLC11A1, TLR9, HLA-B
GO:0070820	Tertiary granule	3	0.0442	SLC11A1, HBB, CR1



Εικόνα 15: Δίκτυο Protein-protein interaction για τα 21 γονίδια της παρούσας μελέτης.

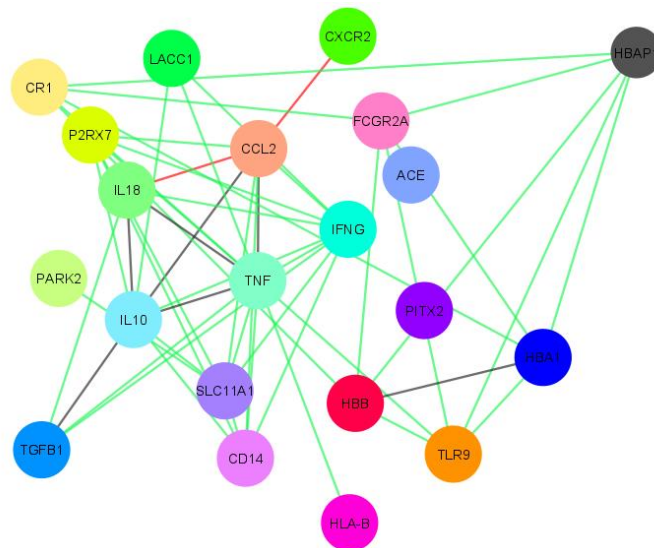
Στο παραπάνω δίκτυο οι ακμές αντιπροσωπεύουν τις συσχετίσεις των πρωτεϊνών, επομένως η μπλε γραμμή δηλώνει ότι η συσχέτιση προήλθε από αποτελέσματα επιλεγμένων βάσεων και η μωβ γραμμή δηλώνει ότι η συσχέτιση οφείλεται σε πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 16: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των 21 γονιδίων της παρούσας έρευνας.

Στο παραπάνω δίκτυο απεικονίζονται οι συσχετίσεις των γονιδίων που προέκυψαν από τη δική μας έρευνα. Συνολικά παρατηρούμε 48 συσχετίσεις, ενώ 3 γονίδια δεν εμφανίζουν καμία αλληλεπίδραση με άλλα γονίδια. Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα και αυτά που προέκυψαν από τη βάση δεδομένων STRING (Εικόνα 15) παρατηρούμε πως υπάρχουν 7 κοινές αλληλεπιδράσεις γονιδίων, οι οποίες απεικονίζονται πιο αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8). Οι υπόλοιπες 2 συσχετίσεις που παρατηρούνται στα αποτελέσματα της βάσης STRING χρήζουν περαιτέρω έρευνας καθώς μπορεί να αποτελούν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο.

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας κοινών αλληλεπιδράσεων	
HBB	HbA1
IL-10	TNF
IL-10	IL-18
IL-10	CCL2
IL-18	TNF
TNF	CCL2
TGFB1	IL-10

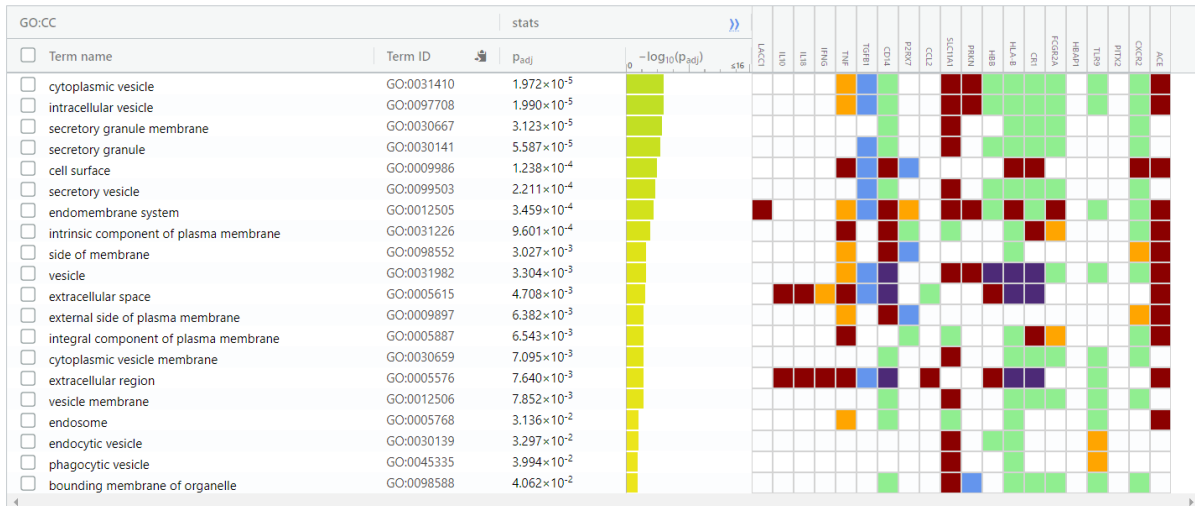


Εικόνα 17: Κοινό δίκτυο αλληλεπιδράσεων των 21 γονιδίων. Οι πράσινες ακμές αντιπροσωπεύουν τις συσχετίσεις της δικής μας έρευνας, οι κόκκινες ακμές αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα της STRING, ενώ οι γκρι ακμές παρουσιάζουν τις κοινές συσχετίσεις που εντοπίστηκαν

3.8 Ανάλυση και Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων από g:Profiler

Χρησιμοποιώντας το g:Profiler πραγματοποιήσαμε μία ανάλυση εμπλουτισμού (Enrichment Analysis) των 21 γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται μέσω ενός διαδραστικού διαγράμματος Manhattan βασισμένο στα αποτελέσματα των επιλεγμένων βάσεων δεδομένων. Συγκεκριμένα, πρόκειται ουσιαστικά για έναν τύπο γραφικής παράστασης διασποράς, που χρησιμοποιείται συνήθως για την προβολή δεδομένων με μεγάλο αριθμό σημείων δεδομένων, πολλά μη μηδενικού πλάτους και με κατανομή τιμών υψηλότερου μεγέθους. Στο εν λόγω διάγραμμα (Εικόνα 18) στο x άξονα απεικονίζονται οι λειτουργικοί όροι (functional terms) χρωματισμένοι ανάλογα με τη βάση δεδομένων στην οποία αντιστοιχούν. Ο κάθετος y άξονας αντιστοιχεί στον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο των διορθωμένων τιμών p-value ($-\log_{10}(p\text{-value})$). Σημεία που εμφανίζονται ψηλά στο διάγραμμα αντιστοιχούν έτσι σε λειτουργικούς όρους με μικρή τιμή p-value που είναι κατά συνέπεια στατιστικά σημαντικά για τη μελετώμενη γονιδιακή λίστα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρούμε πως ένα αποτέλεσμα από τη βάση KEGG που αφορά την ασθένεια της ελονοσίας βρίσκεται ψηλότερα από τα υπόλοιπα, συνεπώς αποτελεί ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Σημαντικό όμως εύρημα αποτελεί και το γεγονός ότι αυτά τα γονίδια εντοπίζονται σε μεμβρανοειδείς σχηματισμούς(μεμβράνες, κυστίδια) ή σε εκκριτικά κοκκία. Όλες οι περιοχές αυτές εμπλέκονται στην (ή ρυθμίζουν την) αλληλεπίδραση του κυττάρου με το περιβάλλον, καθώς επίσης και σε βιολογικές λειτουργίες, όπως η είσοδος και η έξοδος μορίων από το κύτταρο.



Εικόνα 20: Αποτελέσματα της g:Profiler που αφορούν τον κυτταρικό εντοπισμό των 21 γονιδίων της παρούσας εργασίας.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Ο σίδηρος αποτελεί ένα από τα απαραίτητα συστατικά του οργανισμού και η κατανόηση της μεταφοράς και της ομοιόστασής του αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης των σύγχρονων βιολογικών επιστημών. Στις μέρες μας η εξέλιξη της τεχνολογίας έχει οδηγήσει στην ύπαρξη πληθώρας πληροφοριών σε διάφορους τομείς, καθώς επίσης και στην δημιουργία νέων μεθόδων αναλύσεων για την παροχή γρηγορότερων και εγκυρότερων αποτελεσμάτων. Ραγδαία εξέλιξη έχει γνωρίσει και ο κλάδος της βιοπληροφορικής, όπου αρχικά ο στόχος της ήταν η ανάλυση ακολουθιών νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, αλλά πλέον περιλαμβάνει και τη χρήση μεθόδων πληροφορικής στη γονιδιωματική και την πρωτεϊνική, στη δομική και συστημική βιολογία αλλά και στην ιατρική. Οι τομείς έρευνας της βιοπληροφορικής μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (analysis of gene expression), την ανάλυση γονιδιακής ρύθμισης (analysis of regulation) και την ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (analysis of protein expression). Ειδικότερα, η ανάλυση γονιδιακής έκφρασης αναφέρεται στην προσπάθεια αποσαφήνισης των γεγονότων που διέπουν την γονιδιακή ρύθμιση, μία διαδικασία που περιλαμβάνει την εξωκυτταρική σηματοδότηση και επεκτείνεται μέχρι την μεταβολή της δραστηριότητας των πρωτεϊνικών μορίων, ενώ η ανάλυση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης αποδίδει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ή της πρωτεΐνης αντίστοιχα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Επιπλέον το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών για τη μελέτη των γονιδίων βασίζεται στη σημασία αυτών για τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η προσπάθεια της ενίσχυσης της ποιότητας ζωής των ανθρώπων οδηγεί στη δημοσίευση πολλών μελετών και μετα-αναλύσεων με σκοπό τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των γονιδίων και συσχετισμό αυτών με τις ανθρώπινες ασθένειες.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο εμφανές ότι η απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου συσχετίζεται με μια πληθώρα ασθενειών, ενώ προσπάθειες εύρεσης γονιδιακών υπογραφών έκφρασης αυτών των γονιδίων για συγκεκριμένες ασθένειες στέφονται με μεγάλη επιτυχία. Στην παρούσα λοιπόν εργασία πραγματοποιήσαμε μία συστηματική ανασκόπηση όλων των δημοσιευμένων μετα-αναλύσεων που περιέχουν πληροφορίες για την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου και συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, δηλαδή πρωτόζωα, βακτήρια, μύκητες και από ιούς. Τα δεδομένα από όλες τις έρευνες που πληρούσαν τα κριτήρια αναζήτησης ανασύρθηκαν, μελετήθηκαν και καταγράφηκαν τα δεδομένα αυτών που πληρούσαν τα κριτήρια αναζήτησης. Πιο

συγκεκριμένα καταγράφηκαν τα στατιστικά σημαντικά δεδομένα που αφορούσαν τα μεγέθη Odds Ratio (OR) στους γονοτύπους Dominant , Recessive, Allelic , Homozygous, Heterozygous. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις 115 μετα-αναλύσεις υπέδειξαν τον συσχετισμό 21 γονιδίων με 14 ασθένειες , δημιουργώντας 34 ζεύγη γονιδίων-ασθενειών , από τα οποία τα 31 ζεύγη αφορούσαν ασθένειες που προκαλούνται είτε από βακτήρια είτε από παράσιτα και 3 ζεύγη σχετίζονταν με ιογενείς ασθένειες. Ο πολυμορφισμός 11 γονιδίων λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας, ενώ 8 γονιδίων ως παράγοντας ρίσκου.

Στην έρευνά μας έγινε χρήση πολλών βάσεων και εργαλείων βιοπληροφορικής όπως PubMed για βιβλιογραφικές αναζητήσεις, GO για την αναζήτηση των γονιδίων του σιδήρου, Cytoscape για την κατασκευή βιολογικών δικτύων με στόχο την αναπαράσταση των συσχετίσεων που καταγράψαμε στην έρευνας μας και Heatmapper για την οπτικοποίηση του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων στις ασθένειες που συγκεντρώθηκαν. Τα 21 γονίδια που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη μαζί με τις συσχετίσεις τους συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα από τη βάση δεδομένων KEGG Pathway , όπου παρατηρήθηκε πως μεταξύ της δικής μας μελέτης και των αποτελεσμάτων της KEGG υπήρχαν 7 κοινές συσχετίσεις γονιδίων-ασθενειών. Επιπλέον προτείνουμε περαιτέρω διερεύνηση των υπόλοιπων 72 συσχετίσεων που προέκυψαν από την KEGG, διότι μπορεί να αποτελούν ζεύγη γονιδίων-ασθενειών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του σιδήρου, καθώς επίσης και εμπλουτισμό της βάσης δεδομένων KEGG με τα ζεύγη γονιδίων-ασθενειών που προέκυψαν από τη δική μας έρευνα. Οι συσχετίσεις αυτές μπορεί να αποτελέσουν τη βάση τόσο για μελλοντικές έρευνες , όσο και για τη διερεύνηση της γνώση στο πεδίο της χρησιμότητας των γονιδίων ως διαγνωστικούς δείκτες. Με τη αναζήτηση στη βάση δεδομένων STRING παρατηρήσαμε πως 16 από τα γονίδια της παρούσας έρευνας σχετίζονται με την πρωτεϊνική δέσμευση, ενώ 19 από τα γονίδια σχετίζονται με μεμβράνες. Τέλος, μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 21 γονιδίων της μελέτης μας, προκύπτουν 48 συσχετίσεις, οι οποίες συγκρίθηκαν με αυτές της βάσης δεδομένων STRING και βρέθηκαν 7 κοινές αλληλεπιδράσεις. Οι υπόλοιπες 2 αλληλεπιδράσεις που προέκυψαν ως αποτέλεσμα της STRING χρήζουν περαιτέρω έρευνας καθώς μπορεί να αποτελούν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις γονιδίων που σχετίζονται με το σίδηρο.

5. Βιβλιογραφία

- [1] Peter J. Russel. *Genetics – A Mendelian Approach* (2013).
- [2] Pearson H (2006). "Genetics: what is a gene?". *Nature* 441 (7092): 398–401. doi:10.1038/441398a. PMID 16724031.
- [3] Elizabeth Pennisi (2007). "DNA Study Forces Rethink of What It Means to Be a Gene". *Science* 316 (5831): 1556–1557. doi:10.1126/science.316.5831.1556. PMID 17569836.
- [4] Caselle M, Di Cunto F, Provero P. Correlating overrepresented upstream motifs to gene expression: a computational approach to regulatory element discovery in eukaryotes. *BMC Bioinformatics*. 2002; 3:7. doi: 10.1186/1471-2105-3-7. Epub 2002 Feb 14. PMID: 11876822; PMCID: PMC77394.
- [5] Λασκαράτος Ι. «Ιστορία της Ιατρικής» εκδ. Πασχαλίδης.
- [6] Maclean GS, Lee AK, Withers PC. Haematological adjustments with diurnal changes in body temperature in a lizard and a mouse. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1975 May 1;51(1A):241-9. doi: 10.1016/0300-9629(75)90443-0. PMID: 236881.
- [7] Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):19906-12. doi: 10.1074/jbc.M000713200. PMID: 10747949.
- [8] Φώτης Ν. Μπέρης, Ελένη Α. Παπαδάκη, Κωνσταντίνος Τσαταλάς και Θεόδωρος Π. Βασιλακόπουλος “Αίμα/HAEMA”(2016)Ιούλιος-Σεπτέμβριος.
- [9] Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090-3. doi: 10.1126/science.1104742. Epub 2004 Oct 28. PMID: 15514116.
- [10] Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Feb;290(2): G199-203. doi: 10.1152/ajpgi.00412.2005. PMID: 16407589.
- [11] Ganz T, Nemeth E. The heparin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:538-42. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.538. PMID: 22160086; PMCID: PMC4034574.
- [12] Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*. 2013 May 15;13(5):509-519. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.010. PMID: 23684303; PMCID: PMC3676888
- [13] Davidson's "Παθολογία", ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 19η έκδοση, 2005.

- [14] Σιδηροπενική αναιμία - Βικιπαίδεια (wikipedia.org)
- [15] <http://geneontology.org/docs/introduction-to-go-resource/>
- [16] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009 Jul 21;6(7):e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097. Epub 2009 Jul 21. PMID: 19621072; PMCID: PMC2707599.
- [17] Glass G. V. "Primary, secondary, and meta-analysis of research". *Educational Researcher*.5 (10) (1976): 3–8.
- [18] Arindam Basu. "How to conduct meta-analysis: A Basic Tutorial". University of Canterbury (May 12, 2017).
- [19] Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185-91. doi: 10.1261/rna.5167604. PMID: 14730017; PMCID: PMC1370530.
- [20] <https://himmelfarb.gwu.edu/tutorials/studydesign101/metaanalyses.cfm>
- [21] Szumilas M. Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Aug;19(3):227-9. Erratum in: *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015 Winter;24(1):58. PMID: 20842279; PMCID: PMC2938757.
- [22] Pannucci CJ, Wilkins EG. Identifying and avoiding bias in research. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Aug;126(2):619-625. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181de24bc. PMID: 20679844; PMCID: PMC2917255.
- [23] Welsh, Matthew; Begg, Steve. "What have we learned? Insights from a decade of bias research". *The APPEA Journal*. 56 (1) (2016): 435.
- [24] https://handbook51.cochrane.org/chapter_9/9_6_2_what_are_subgroup_analyses.htm
- [25] Tawfik GM, Dila KAS, Mohamed MYF, Tam DNH, Kien ND, Ahmed AM, Huy NT. A step by step guide for conducting a systematic review and meta-analysis with simulation data. *Trop Med Health*. 2019 Aug 1; 47:46. doi: 10.1186/s41182-019-0165-6. PMID: 31388330; PMCID: PMC6670166.
- [26] Oxman AD, Guyatt GH. A consumer's guide to subgroup analyses. *Ann Intern Med*. 1992 Jan 1;116(1):78-84. doi: 10.7326/0003-4819-116-1-78. PMID: 1530753.
- [27] Yusuf S, Wittes J, Probstfield J, Tyroler HA. Analysis and interpretation of treatment effects in subgroups of patients in randomized clinical trials. *JAMA*. 1991 Jul 3;266(1):93-8. PMID: 2046134.
- [28] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses

of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009 Jul 21;6(7): e1000100. doi: 10.1371/journal.pmed.1000100. Epub 2009 Jul 21. PMID: 19621070; PMCID: PMC2707010.

[29] Oxman AD, Clarke MJ, Stewart LA. From science to practice. Meta-analyses using individual patient data are needed. *JAMA.* 1995 Sep 13;274(10):845-6. doi: 10.1001/jama.274.10.845. PMID: 7650811.

[30] Pearson K. "Report on certain enteric fever inoculation statistics". *BMJ.*2(2288): (1904) 1243–1246.

[31] <https://en.wikipedia.org/wiki/PubMed>

[32] Roberts RJ. PubMed Central: The GenBank of the published literature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):381-2. doi: 10.1073/pnas.98.2.381. PMID: 11209037; PMCID: PMC33354.

[33] Canese K, Weis S. PubMed: the bibliographic database. *The NCBI handbook.* 2013;2(1).

[34] https://el.wikipedia.org/wiki/Microsoft_Excel

[35] Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 8;44(W1):W147-53. doi: 10.1093/nar/gkw419. Epub 2016 May 17. PMID: 27190236; PMCID: PMC4987948.

[36] Kohl M, Wiese S, Warscheid B. Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol Biol.* 2011; 696:291-303. doi: 10.1007/978-1-60761-987-1_18. PMID: 21063955.

[37] Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Found Symp.* 2002; 247:91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52. PMID: 12539951.

[38] <https://en.wikipedia.org/wiki/STRING>

[39] <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>

[40] Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, Huang QH, Huang J. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 Jan;10(1):3-12. PMID: 16466030.

[41] Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet.* 2008 Jun;123(5):477-84. doi: 10.1007/s00439-008-0497-5. Epub 2008 Apr 15. PMID: 18414898.

[42] Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar;10(2):174-80. doi: 10.1038/gene.2008.97. Epub 2008 Dec 25. PMID: 19110537.

[43] Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review

and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2010 Jan;38(1):276-82. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181b42af0. PMID: 19789454.

[44] Li X, Yang Y, Zhou F, Zhang Y, Lu H, Jin Q, Gao L. SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e15831. doi: 10.1371/journal.pone.0015831. PMID: 21283567; PMCID: PMC3026788.

[45] Wang Q, Zhan P, Qiu LX, Qian Q, Yu LK. TNF-308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis involving 18 studies. *Mol Biol Rep.* 2012 Apr;39(4):3393-400. doi: 10.1007/s11033-011-1110-x. Epub 2011 Jul 7. PMID: 21735105.

[46] Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, Francio ÂS, Vanderborght PR, Parelli FP, Alter A, Salgado JL, Sampaio EP, Santos AR, Oliveira ML, Sarno EN, Schurr E, Mira MT, Pacheco AG, Moraes MO. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011 Oct 15;204(8):1256-63. doi: 10.1093/infdis/jir521. PMID: 21917899.

[47] Meilang Q, Zhang Y, Zhang J, Zhao Y, Tian C, Huang J, Fan H. Polymorphisms in the SLC11A1 gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012 Apr;16(4):437-46. doi: 10.5588/ijtld.10.0743. PMID: 22326178.

[48] Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012 Jun;12(6):457-68. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70055-5. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22445352; PMCID: PMC3404513.

[49] Zhang Y, Zhang J, Zeng L, Huang H, Yang M, Fu X, Tian C, Xiang Z, Huang J, Fan H. The -2518A/G polymorphism in the MCP-1 gene and tuberculosis risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(7): e38918. doi: 10.1371/journal.pone.0038918. Epub 2012 Jul 30. PMID: 22859936; PMCID: PMC3408439.

[50] Zhu H, Zhang Z, Lei X, Feng J, Zhang F, Wang Y. Tumor necrosis factor alpha -308G>A, -863C>A, -857C>T gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Gene.* 2012 Nov 10;509(2):206-14. doi: 10.1016/j.gene.2012.08.027. Epub 2012 Aug 25. PMID: 22940143.

[51] Panda AK, Panda M, Tripathy R, Pattanaik SS, Ravindran B, Das BK. Complement receptor 1 variants confer protection from severe malaria in Odisha, India. *PLoS One.* 2012;7(11):e49420. doi: 10.1371/journal.pone.0049420. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23152904; PMCID: PMC3496672.

[52] Li L, Nie W, Li W, Yuan W, Huang W. Associations between TNF- α polymorphisms and pneumonia: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(4): e61039. doi: 10.1371/journal.pone.0061039. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23577187; PMCID: PMC3620059.

[53] Tsantes AE, Kopterides P, Bonovas S, Bagos P, Antonakos G, Nikolopoulos GK, Gialeraki A, Kapsimali V, Kyriakou E, Kokori S, Dima K, Armaganidis A, Tsangaris I. Effect of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism and its expression on clinical outcome in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol.* 2013 Aug;79(8):861-70. Epub 2013 May 2. PMID: 23635999.

[54] Areeshi MY, Mandal RK, Panda AK, Bisht SC, Haque S. CD14 -159 C>T gene polymorphism with increased risk of tuberculosis: evidence from a meta-analysis. *PLoS One.* 2013 May 31;8(5): e64747. doi: 10.1371/journal.pone.0064747. PMID: 23741383; PMCID: PMC3669331.

- [55] Silva GA, Naveca FG, Ramasawmy R, Boechat AL. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: a meta-analysis. *Cytokine*. 2014 Feb;65(2):130-3. doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.002. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24389160.
- [56] Zhao J, Ma L, Chen S, Xie Y, Xie L, Deng Y, He Y, Li T, Wang J, Li S, Qin X. Association between Fc-gamma receptor IIa (CD32) gene polymorphism and malaria susceptibility: a meta-analysis based on 6928 subjects. *Infect Genet Evol*. 2014 Apr; 23:169-75. doi: 10.1016/j.meegid.2014.02.011. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24594077.
- [57] Yuan Q, Chen H, Zheng X, Chen X, Li Q, Zhang Y, Zhang X, Shi T, Zhou J, Chen Q, Yu S. The association between C-159T polymorphism in CD14 gene and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014 Nov;41(11):7623-9. doi: 10.1007/s11033-014-3652-1. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25091944.
- [58] Lee YH, Song GG. Associations between tumor necrosis factor- α polymorphisms and susceptibility to pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015 Jul 31;14(3):8602-12. doi: 10.4238/2015.July.31.8. PMID: 26345791.
- [59] Ge HB, Chen S. A meta-analysis of P2X7 gene-1513A/C polymorphism and pulmonary tuberculosis susceptibility. *Hum Immunol*. 2016 Jan;77(1): 126130. doi: 10.1016/j.humimm.2015.11.009. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26585364.
- [60] Sun X, Xu Y, Wang L, Zhang F, Zhang J, Fu X, Jing T, Han J. Association between TNFA Gene Polymorphisms and Helicobacter pylori Infection: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jan 27;11(1): e0147410. doi: 10.1371/journal.pone.0147410. PMID: 26815578; PMCID: PMC4729674.
- [61] Yi YX, Han JB, Zhao L, Fang Y, Zhang YF, Zhou GY. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism contributes to pulmonary tuberculosis susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Nov 15;8(11):20690-700. PMID: 26884992; PMCID: PMC4723837.
- [62] Zhang M, Zhao Y, Liu Q. Tumor necrosis factor- α -308G/A and -238G/A polymorphisms are associated with increased risks of sepsis: evidence from an updated meta-analysis. *APMIS*. 2017 May;125(5):459-467. doi: 10.1111/apm.12661. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28294408.
- [63] Dhangadamajhi G, Kar A, Rout R, Dhangadamajhi P. A meta-analysis of TLR4 and TLR9 SNPs implicated in severe malaria. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017 Mar-Apr;50(2):153-160. doi: 10.1590/0037-8682-0475-2016. PMID: 28562749.
- [64] Wei Z, Wenhao S, Yuanyuan M, Yang L, Daming Z, Jiangchun X, Jijun J. A single nucleotide polymorphism in the interferon- γ gene (*IFNG* +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. *Oncotarget*. 2017 Apr 20;8(31):50415-50429. doi: 10.18632/oncotarget.17304. PMID: 28881572; PMCID: PMC5584145.
- [65] Areeshi MY, Mandal RK, Dar SA, Jawed A, Wahid M, Lohani M, Panda AK, Mishra BN, Akhter N, Haque S. Impact of *TNF* -308 G>A (rs1800629) gene polymorphism in modulation of leprosy risk: a reappraise meta-analysis of 14 case-control studies. *Biosci Rep*. 2017 Oct 27;37(5):BSR20170806. doi: 10.1042/BSR20170806. PMID: 28935761; PMCID: PMC5664359.
- [66] Wang H, Guo S, Wan C, Yang T, Zeng N, Wu Y, Chen L, Shen Y, Wen F. Tumor necrosis factor- α -308 G/A polymorphism and risk of sepsis, septic shock, and mortality: an updated meta-analysis.

Oncotarget. 2017 Sep 13;8(55):94910-94919. doi: 10.18632/oncotarget.20862. PMID: 29212277; PMCID: PMC5706923.

[67] Zhang Y, Cui X, Ning L, Wei D. The effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) rs1800629 and rs361525 polymorphisms on sepsis risk. *Oncotarget*. 2017 Nov 30;8(67):111456-111469. doi: 10.18632/oncotarget.22824. PMID: 29340067; PMCID: PMC5762335.

[68] Han SS, Lu Y, Chen M, Xu YQ, Wang Y. Association between interleukin 8-receptor gene (CXCR1 and CXCR2) polymorphisms and urinary tract infection: Evidence from 4097 subjects. *Nephrology (Carlton)*. 2019 Apr;24(4):464-471. doi: 10.1111/nep.13260. PMID: 29577511.

[69] Wang D, Fan Y, Malhi M, Bi R, Wu Y, Xu M, Yu XF, Long H, Li YY, Zhang DF, Yao YG. Missense Variants in HIF1A and LACC1 Contribute to Leprosy Risk in Han Chinese. *Am J Hum Genet*. 2018 May 3;102(5):794-805. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.03.006. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29706348; PMCID: PMC5986702.

[70] Eskandari-Nasab E, Moghadampour M. The relationship between IFN- γ and TNF- α gene polymorphisms and brucellosis: A meta-analysis. *Adv Clin Exp Med*. 2018 Dec;27(12):1701-1709. doi: 10.17219/acem/75869. PMID: 30066989.

[71] Orlova E, Yeh A, Shi M, Firek B, Ranganathan S; 23andMe Research Team; Whitcomb DC, Finegold DN, Ferrell RE, Barmada MM, Marazita ML, Hinds DA, Shaffer JR, Morowitz MJ. Genetic association and differential expression of PITX2 with acute appendicitis. *Hum Genet*. 2019 Jan;138(1):37-47. doi: 10.1007/s00439-018-1956-2. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30392061; PMCID: PMC6514078.

[72] Huang W, Zhou R, Li J, Wang J, Xiao H. Association of the TNF- α -308, TNF- α -238 gene polymorphisms with risk of bone-joint and spinal tuberculosis: a meta-analysis. *Biosci Rep*. 2019 May 31;39(5):BSR20182217. doi: 10.1042/BSR20182217. PMID: 31072917; PMCID: PMC6542758.

[73] Braliou GG, Kontou PI, Boleti H, Bagos PG. Susceptibility to leishmaniasis is affected by host SLC11A1 gene polymorphisms: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res*. 2019 Aug;118(8):2329-2342. doi: 10.1007/s00436-019-06374-y. Epub 2019 Jun 23. PMID: 31230160.

[74] Zafari P, Zarifian A, Alizadeh-Navaei R, Taghadosi M, Rafiei A. Association between polymorphisms of cytokine genes and brucellosis: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2020 Mar; 127:154949. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154949. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31816580.

[75] Fevereiro J, Sajjadi N, Fraga AG, Teixeira PM, Pedrosa J. Individual and clinical variables associated with the risk of Buruli ulcer acquisition: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Apr 8;14(4):e0008161. doi: 10.1371/journal.pntd.0008161. PMID: 32267838; PMCID: PMC7170268.

[76] Pabalan N, Chaisri S, Tabunhan S, Tarasuk M, Jarjanazi H, Steiner T. Associations of tumor necrosis factor- α -308 polymorphism with dengue infection: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2017 Sep; 173:17-22. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.007. Epub 2017 May 8. PMID: 28495402.

- [77] Seshasubramanian V, Soundararajan G, Ramasamy P. Human leukocyte antigen A, B and Hepatitis B infection outcome: A meta-analysis. *Infect Genet Evol.* 2018 Dec; 66:392-398. doi: 10.1016/j.meegid.2017.07.027. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28757339.
- [78] Naing C, Htet NH, Siew Tung W, Basavaraj AK, Mak JW. Association of tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene polymorphisms (-308 G>A and -238 G>A) and the risk of severe dengue: A meta-analysis and trial sequential analysis. *PLoS One.* 2018 Oct 9;13(10): e0205413. doi: 10.1371/journal.pone.0205413. PMID: 30300401; PMCID: PMC6177181.
- [79] Santos AC, de Moura EL, Ferreira JM, Santos BR, Alves VM, de Farias KF, de Souza Figueiredo EV. Meta-Analysis of the Relationship between TNF- α (-308G/A) and IL-10 (-819C/T) Gene Polymorphisms and Susceptibility to Dengue. *Immunol Invest.* 2017 Feb;46(2):201-220. doi: 10.1080/08820139.2016.1248560. Epub 2016 Dec 16. PMID: 27982730.
- [80] Liu Y, Guo Z, Chen Q, Wang S. [Association of TNF- α -308 polymorphisms with risk of chronic HBV infection in the Chinese population: a meta-analysis]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Mar;35(3):312-6. Chinese. PMID: 24831634.
- [81] Zheng MH, Xiao DD, Lin XF, Wu SJ, Peng MM, Yu XY, Liu WY, Li LF, Shi KQ, Fan YC, Chen YP. The tumour necrosis factor- α -238A allele increases the risk of chronic HBV infection in European populations. *J Viral Hepat.* 2012 Feb;19(2): e11-7. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01491. x. Epub 2011 Jul 22. PMID: 22239507.
- [82] Santos NCD, Gomes TN, Góis IAF, Oliveira JS, Coelho LFL, Ferreira GP, Silva FRPD, Pereira ACTDC. Association of single nucleotide polymorphisms in TNF- α (-308G/A and -238G/A) to dengue: Case-control and meta-analysis study. *Cytokine.* 2020 Oct; 134:155183. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155183. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32731142.

6. Παράρτημα

Πίνακας 6.1 αποτελεσμάτων συσχετίσεων γονιδίων με ασθένειες , καταγραφή αριθμού μετα-αναλύσεων και αριθμού μελετών.			
GENES	DISEASES	<i>Number of meta-analyses included in this study</i>	<i>Number of studies</i>
ACE	ARDS	1	6
CCL2	Tuberculosis	3	23
CD14	Tuberculosis	3	19
CR1	Malaria	1	6
CXCR2	Urinary Tract Infection	1	1
FCGR2A	Malaria	3	12
HBAP1	Malaria	1	4
HBB	Malaria	1	3
HbA1	Malaria	1	6
IFNG	Brucellosis	2	8
	Leprosy	1	4
	Tuberculosis	6	95
IL-10	Tuberculosis	1	8
	Brucellosis	1	3
	Leprosy	1	4
IL-18	Brucellosis	1	2
LACC1	Leprosy	2	20
P2RX7	Tuberculosis	1	2
PITX2	Appendicitis	1	4
PRKN	Buruli ulcer	1	2
SLC11A1	Leishmaniasis	2	9
	Tuberculosis	27	305
	Buruli ulcer	1	2
TGFB1	Brucellosis	2	8
TLR9	Malaria	1	6
TNF	Leprosy	2	16
	Brucellosis	2	14
	Helicobacter P. infection	4	34
	Tuberculosis	10	74
	Sepsis	13	173
	Pneumonia	1	3
	Dengue	13	109
	Hepatitis B	2	13
HLA B	Hepatitis B	2	9

Πίνακας 6.2 αποτελεσμάτων ασθενειών από τη βάση KEGG και καταγραφή του FDR.

<i>Term Description</i>	<i>false discovery rate</i>	<i>Matching proteins in our network (labels)</i>
Malaria	4.82e-14	TGFB1,CCL2,IFNG,IL18,HBB,TLR9,TNF,IL10
African trypanosomiasis	2.99e-10	IFNG,IL18,HBB,TLR9TNF, IL10
Tuberculosis	2.99e-10	TGFB1,IFNG,FCGR2A,IL18,CD14,TLR9,TNF,IL10, HLA B,SLC11A1
Chagas disease	4.46e-10	TGFB1,CCL2,IFNG,ACE,TLR9,TNF,IL10
Leishmaniasis	3.85e-07	TGFB1,IFNG,FCGR2A,TNF,IL10
Amoebiasis	1.48e-06	TGFB1,IFNG,CD14,TNF,IL10
Yersinia infection	3.93e-06	CCL2,FCGR2A,IL18,TNF,IL10
Toxoplasmosis	7.92e-05	TGFB1,IFNG,TNF,IL10
Influenza A	0.00037	CCL2,IFNG,IL18,TNF
Legionellosis	0.00043	IL18,CD14,TNF
Salmonella infection	0.00078	IL18,CD14,TLR9,TNF
Pertussis	0.00087	CD14,TNF,IL10
Pathogenic Escherichia coli infection	0.0084	FCGR2A,IL18,TNF
Herpes simplex virus 1 infection	0.0107	CCL2,IFNG,TLR9,TNF
Shigellosis	0.0119	IL18,CD14,TNF
Human cytomegalovirus infection	0.0119	CCL2,CXCR2,TNF
Staphylococcus aureus infection	0.0287	FCGR2A,IL10

Πίνακας 6.3 αποτελεσμάτων από τη βάση KEGG τα οποία δεν σχετίζονται με βακτηριακές, παρασιτικές ή ιογενείς λοιμώξεις.	
<i>Term Description</i>	<i>Matching proteins in our network (labels)</i>
Inflammatory bowel disease	TGFB1,IFNG,IL18,TNF,IL10
Cytokine-cytokine receptor interaction	TGFB1,CCL2,IFNG,IL18,CXCR2,TNF,IL10
Rheumatoid arthritis	TGFB1,CCL2,IFNG,IL18,TNF
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	CCL2,IL18,CXCR2,TNF,IL10
TGF-beta signaling pathway	TGFB1,IFNG,PITX2,TNF
Systemic lupus erythematosus	IFNG,FCGR2A,TNF,IL10
Osteoclast differentiation	TGFB1,IFNG,FCGR2A,TNF
Allograft rejection	IFNG,TNF,IL10
NOD-like receptor signaling pathway	CCL2,IL18,P2RX7,TNF
Hypertrophic cardiomyopathy	TGFB1,ACE,TNF
IL-17 signaling pathway	CCL2,IFNG,TNF
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	TGFB1,CCL2,TNF
Toll-like receptor signaling pathway	CD14,TLR9,TNF
T cell receptor signaling pathway	IFNG,TNF,IL10
Fluid shear stress and atherosclerosis	CCL2,IFNG,TNF
Asthma	TNF,IL10
Graft-versus-host disease	IFNG,TNF
Type I diabetes mellitus	IFNG,TNF
Intestinal immune network for IgA production	TGFB1,IL10
Antigen processing and presentation	IFNG,TNF

MAPK signaling pathway	TGFB1,CD14,TNF
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	IFNG,TLR9
Hematopoietic cell lineage	CD14,TNF
Dilated cardiomyopathy	TGFB1,TNF
NF-kappa B signaling pathway	CD14,TNF
C-type lectin receptor signaling pathway	TNF,IL10
Th17 cell differentiation	TGFB1,IFNG
TNF signaling pathway	CCL2,TNF
Natural killer cell mediated cytotoxicity	IFNG,TNF
FoxO signaling pathway	TGFB1,IL10

