



Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Πτυχιακή Διατριβή**

***«Ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών στην οικογένεια WNT σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση»***

***“SNPs association analysis on WNT genes on patients with Systemic Sclerosis”***

**Νικολέτα Γιοβάνοβιτς**

**Λάρισα 2019**

**Τριμελής επιτροπή :**

- **Μαμούρης Ζήσης(επιβλέπων) : Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- **Σαραφίδου Θεολογία : Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
- **Μπόγδανος Δημήτριος : Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μία σπάνια αυτοάνοση νόσος η οποία προσβάλλει το συνδετικό ιστό και προκαλεί διαταραχές στο δέρμα και σε εσωτερικά όργανα. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια κλινικών εκδηλώσεων και μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο του ασθενούς κυρίως μέσω ανάπτυξης πνευμονικής ίνωσης και πνευμονικής υπέρτασης. Ως πολυπαραγοντική ασθένεια θεωρείται πως εκδηλώνεται σε άτομα με το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο, όταν αυτά έρθουν σε επαφή με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Μέσω μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες έχει χαρακτηριστεί ένας σημαντικός αριθμός μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στο γονιδίωμα οι οποίοι συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου. Η οικογένεια γονιδίων WNT θεωρείται ότι μπορεί να εμπλέκεται στην εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης, καθώς δυσλειτουργία του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης Wnt μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη της ίνωσης που χαρακτηρίζει τη παθοφυσιολογία της νόσου. Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας, διερευνήθηκε ένας μεγάλος αριθμός μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών στα γονίδια της οικογενείας των WNT σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και υγιή άτομα-μάρτυρες στον ελληνικό πληθυσμό.

## ABSTRACT

Systemic sclerosis is a rare autoimmune disease of the connective tissue that causes dermal disorders and dysfunction of the internal organs. It is characterized by a broad spectrum of clinical manifestations and it may lead to death, mainly due to lung fibrosis and pulmonary hypertension. As a multifactorial disorder it is believed to occur on individuals with permissive genetic background, after their exposure to various environmental factors. Through genetic studies during the last decades a significant number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) that contribute to the disease's development has been characterized. The gene family WNT may be involved to systemic sclerosis development, because dysfunction of the canonical Wnt signal pathway may contribute to fibrosis, which characterizes the disease's pathophysiology. During this bachelor thesis a SNP association study was performed on a large number of SNPS on WNTs genes on patients with systemic sclerosis and on a healthy group-control in the Greek population.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

- 1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ
- 1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ
- 1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ
- 1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ
- 1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ
- 1.6 ΤΥΠΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ
- 1.7 WNT ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ- Wnt ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
- 1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

### **2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ)**

- 2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
- 2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA
- 2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ
- 2.4 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ
- 2.5 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ
- 2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- 3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA
- 3.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ
- 3.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ
- 3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗΣ
- 3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

### **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ:**

### **1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η συστηματική σκλήρυνση ή αλλιώς σκληρόδερμα (SSc) είναι ένα πολυπαραγοντικό, αυτοάνοσο νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από προοδευτική ίνωση του δέρματος και των εσωτερικών οργάνων. Παρατηρείται πρόωρη ενδοθηλιακή καταστροφή, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και μη φυσιολογική παραγωγή αυτό-αντισωμάτων (Allanore et al.) Διακρίνεται σε δύο κύριους υποτύπους, ανάλογα με την έκταση προσβολής του δέρματος (Ramos et al.) Η νόσος εμφανίζει ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών και των δύο φύλων, με το γυναικείο φύλο να είναι σημαντικά πιο επιρρεπές, καθώς επίσης και μεταξύ των κλινικών συμπτωμάτων και φαινοτύπων. Οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ενώ φαίνεται να μοιράζεται κοινούς γενετικούς παράγοντες προδιάθεσης με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο.

### **1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Κύρια χαρακτηριστικά της συστηματικής σκλήρυνσης αποτελούν η φλεγμονή και η ίνωση του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων καθώς και η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος με παραγωγή αυτό-αντισωμάτων. Η νόσος εμφανίζει ετερογένεια και ποικιλομορφία μεταξύ των ασθενών και διακρίνεται σε δύο κύριους υποτύπους, οι οποίοι διαχωρίζουν τους ασθενείς ανάλογα με τη σοβαρότητα της εμπλοκής του δέρματος. Συνεπώς προκύπτουν οι ασθενείς με εστιασμένη συστηματική σκλήρυνση (lcSSc) και οι ασθενείς με διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (dcSSc). Και οι δύο κατηγορίες μπορεί να εμφανίσουν προσβολή των εσωτερικών οργάνων, όπως των πνευμόνων, της καρδιάς, των νεφρών, του οισοφάγου και του μυοσκελετικού συστήματος. Ωστόσο εμφανίζουν διαφορές που αφορούν την κατανομή της ίνωσης στο δέρμα, στους πνεύμονες καθώς και τους στόχους των παραγόμενων αυτό-αντισωμάτων. Για παράδειγμα, οι ασθενείς με την εστιασμένη SSc εμφανίζουν εντοπισμένη αλλοίωση του δέρματος, πνευμονική υπέρταση, σκληροδαχτυλία, φαινόμενο Reynaud ενώ ο κύριος στόχος των παραγόμενων αυτό-αντισωμάτων είναι οι πρωτεΐνες του κεντρομερούς (ACA). Στην περίπτωση των ασθενών με διάχυτη σκλήρυνση εμφανίζεται ταχύτατη ίνωση του δέρματος, πνευμονική

ίνωση, επιπλοκές σε νεφρούς και καρδιά ενώ συχνότεροι στόχοι των παραγόμενων αυτό-αντισωμάτων είναι η RNA πολυμεράση III και η τοποισομεράση I (ATA) (Yangyang et al.).

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά κάθε μορφής της νόσου αποτελούν η σταδιακή σκλήρυνση και η ίνωση του δέρματος, η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, η καταστροφή του μικροαγγειακού συστήματος και η γενικευμένη ίνωση εσωτερικών οργάνων (Allanore et al.).

Σχετικά με τη διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, παρατηρείται παραγωγή αυτοαντισωμάτων και ενεργοποίηση των ινοβλαστών. Η δυσλειτουργία των ινοβλαστών οδηγεί στην υπέρμετρη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η οποία αποτελείται από κολλαγόνο, ελασίνη, φμπρονεκτίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες. Η σταδιακά αυξανόμενη και τελικά ανεξέλεγκτη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, η οποία χαρακτηρίζεται ως ίνωση, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ουλώδους ιστού και συνεπώς την πρόκληση αγγειοπάθειας με απόρροια τη μείωση διαπερατότητας των αγγείων και του αγγειακού τόνου. Συνεπώς δημιουργούνται αλλαγές στα τριχοειδή αγγεία των νεφρών, των πνευμόνων, της καρδιάς και των μυών που τα καθιστούν δυσλειτουργικά καθώς χάνουν την ελαστικότητά τους λόγω της εναπόθεσης κολλαγόνου αντικαθιστώντας τη φυσιολογική δομή των ιστών σε συμπαγή, άκαμπτο συνδετικό ιστό. Ο τραυματισμός των αγγείων και η επακόλουθη ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των αγγείων και αποτελεί από τα πρώτα χαρακτηριστικά της νόσου. Η εξέλιξη της καταστροφής οδηγεί σε μείωση των τριχοειδών και λέπτυνση των τοιχωμάτων των αγγείων με αποτέλεσμα την υποξία και το οξειδωτικό στρες. (Allanore et al.). Η ίνωση αποτελεί μια μη αναστρέψιμη διαδικασία και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών όταν αφορά ζωτικά όργανα όπως τους πνεύμονες (Gabrielli et al).

### **1.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ**

Η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση ασθένεια που πυροδοτείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες σε ασθενείς με επιτρεπτό γενετικό υπόβαθρο, που προσβάλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, το μικροαγγειακό δίκτυο και το συνδετικό ιστό (Allanore et al., Agarwal et al.). Θεωρείται μια από τις πιο πολύπλοκες διαταραχές του συνδετικού ιστού και η παθοφυσιολογία της παραμένει όχι πλήρως κατανοητή.

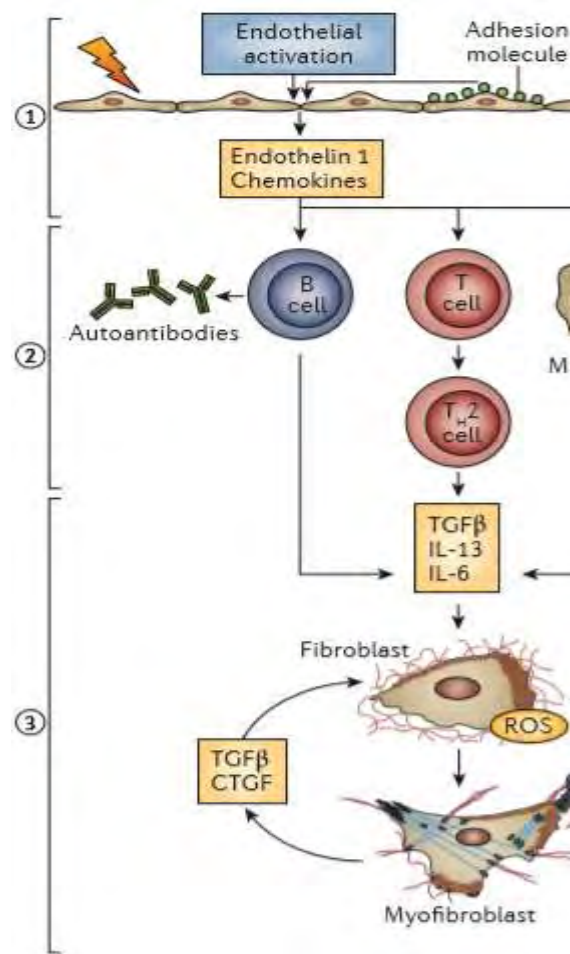
Τα κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στη παθογένεια της νόσου είναι κυρίως ενδοθηλιακά, δομικά όπως ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, μυϊκά λεία κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Σημαντικοί μεσολαβητές της κυτταρικής ενεργοποίησης και της φλεγμονής είναι ο TGF-β (transforming growth factor-β), οι ιντερλευκίνες IL-6 και IL-13, η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη 2 καθώς και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Allanore et al).

Όσον αφορά την ανοσολογική απόκριση παρατηρείται δυσλειτουργία τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης άμυνας. Σε έρευνες παρατηρήθηκε συσσώρευση κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση σε ιστούς όπως το δέρμα και τους πνεύμονες. Πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως έκτοπη παρουσία της ιντερφερόνης τύπου I, που ρυθμίζει και την παραγωγή κολλαγόνου, με αποτέλεσμα την αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου που οδηγεί με τη σειρά της στη δυσκαμψία των ιστών και τη μείωση της ελαστικότητας των οργάνων, καθώς και αυτό-αντισωμάτων στον ορό του αίματος σε ασθενείς με σκληρόδερμα. Όσον αφορά την παραγωγή αυτό-αντισωμάτων έχει βρεθεί ότι αποτελεί συνέπεια της απορρυθμισμένης ενεργοποίησης των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων του οργανισμού (Simms et al.).

Όπως προαναφέρθηκε, το κύριο χαρακτηριστικό της συστηματικής σκλήρυνσης είναι η σταδιακή συσσώρευση ινώδους εξωκυττάρου υλικού στους ιστούς, το οποίο αποτελείται από κολλαγόνο, ελαστίνη, γλυζαμινογλυκάνες και φιβρονεκτίνη, διαδικασία που οδηγεί σε αντικατάσταση της φυσιολογικής δομής των ιστών σε συμπαγή, άκαμπτο συνδετικό ιστό. Η διαδικασία αυτή θεωρείται πως είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής και συσσώρευσης ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών, ως απάντηση σε ιστική βλάβη. Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες είναι οι κεντρικοί κυτταρικοί πληθυσμοί στην παθογένεια της ίνωσης καθώς εκείνοι προκαλούν την αυξημένη σύνθεση εξωκυττάρου υλικού, η οποία σε συνδυασμό με την ελαττωματική αποικοδόμησή του οδηγεί προοδευτικά στην εμφάνιση ίνωσης και ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ουλώδους ιστού (Allanore et al).

Σε άτομα που εμφανίζουν συστηματική σκλήρυνση οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στην απόπτωση και από αυξημένη παραγωγή TGF-β (αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης), συμβάλλοντας έτσι στην όλο και αυξανόμενη συσσώρευση εξωκυττάρου υλικού. Στους συγκεκριμένους κυτταρικούς

πληθυσμούς έχουν παρατηρηθεί ισομορφές μορίων του εξωκυττάριου υλικού όπως είναι η φιβρονεκτίνη που έχουν προκύψει από τη δράση του εναλλακτικού ματίσματος. Οι ισομορφές αυτές προσδένονται άμεσα σε υποδοχείς TLR4 (toll-like receptor, υποδοχείς που αναγνωρίζουν κοινά πρότυπα σε παθογόνα) στην επιφάνεια στρωματικών κυττάρων και επάγουν την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών.. Επομένως θεωρείται πως έχουν κύριο ρόλο στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης και αποτελούν πεδίο έρευνας. (Pattanaik et al).



Εικόνα 1: Η πορεία της συστηματικής σκλήρυνσης (Varga et al.)

#### 1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ο επιπολασμός, η επίπτωση αλλά και οι διαφορετικοί υπότυποι της ασθένειας ποικίλουν τόσο μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών όσο και των δύο φύλων. Πιο αναλυτικά εκτιμάται ότι ο



επιπολασμός της νόσου είναι χαμηλότερος στους Βόρειο-Ευρωπαίους και τους Ιάπωνες (<150/ανά εκατ.) ενώ η επίπτωση αντιστοιχεί σε <10/ανά εκατ. νέα περιστατικά το χρόνο. Αντίστοιχα, όσον αφορά τους Νότιο-Ευρωπαίους, τους Αυστραλούς και τους Βόρειο-Αμερικάνους ο επιπολασμός εκτιμάται στο 276-443/ανά εκατ. Με τις νέες περιπτώσεις να ανέρχονται σε 14-21/ανά εκατ. το χρόνο. (Varga et al.).

Επιπλέον σημαντικό ρόλο στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου κατέχει η εθνικότητα. Μια αμερικανική έρευνα έδειξε ότι οι Αφρο-Αμερικανοί εκδηλώνουν την ασθένεια σε μικρότερες ηλικίες κατά μέσο όρο και εμφανίζουν κυρίως τη διάχυτη μορφή της ασθένειας (dcSSc) σε σχέση με τους λευκούς Αμερικάνους όπου τα 2/3 εμφανίζουν την περιορισμένη μορφή (lcSSc).

Όσον αφορά τα δύο φύλα, το συστηματική σκλήρυνση εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στο γυναικείο φύλο, όπως άλλωστε και η πλειοψηφία των αυτοάνοσων νοσημάτων. Για παράδειγμα, αναφέρεται πως στους Β. Αμερικανούς 75/100.000 γυναίκες του πληθυσμού εμφανίζουν την ασθένεια, (Allanore et al.) ενώ μόλις 13/100.000 άντρες. Στην Ευρώπη, στο σουηδικό πληθυσμό η ασθένεια εμφανίζει επιπολασμό 514/εκατομμύριο σε γυναίκες και 88/ εκατομμύριο σε άντρες. (Salazar et al).

## 1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η συστηματική σκλήρυνση δεν ακολουθεί μενδελική κληρονομικότητα, αντιθέτως αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, που οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε οικογένειες με ιστορικό, κυμαίνεται από 1,5% έως 1,7% σε σύγκριση με 0,026% που παρατηρείται στον γενικό πληθυσμό (Yangyang et al). Επιπλέον, έρευνες σε οικογένειες έδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας είναι 3,07 (95% ΔΕ, 1,25-7,57) σε συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού ασθενών και 2,14 σε συγγενείς σε 3<sup>ου</sup> βαθμού (95% ΔΕ, 1,16-3,95). Η μοναδική έρευνα που αφορούσε διδύμους και περιελάμβανε 24 ζεύγη μονοζυγοτικών διδύμων έδειξε ότι η συχνότητα εμφάνισης κυμαίνεται στο 4,7%. (Allanore et al.).

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω νούμερα, η μελέτη του γενετικού υλικού δεν αρκεί για να εξηγηθεί η εκδήλωση της συστηματικής σκλήρυνσης. Αντίθετα έχει δειχτεί πως η γενετική

κληρονομικότητα αποτελεί μόλις το 0,008% της αιτίας εμφάνισης της νόσου (Y. Luo et al.) Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι απαιτείται ο συνδυασμός του γενετικού υποβάθρου και περιβαλλοντικών παραγόντων για την πυροδότηση της ανάπτυξης της ασθένειας. (Yang et al). Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες θεωρείται ότι αυτοί διαταράσσουν τη φυσιολογική ανοσολογική ανοχή του οργανισμού μέσω μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων και επάγουν την παραγωγή αυτό-αντισωμάτων μέσω του μοριακού μιμητισμού, ο οποίος οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων του ανοσοποιητικού λόγω λοιμώξεων. (Cusick et al). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη θεωρία, το ανοσοποιητικό σύστημα, λόγω της ομοιότητας εξωγενών αντιγόνων με ενδογενείς πρωτεΐνες και άλλων μορίων, καταλήγει να δημιουργεί αντισώματα που στρέφονται εναντίον πρωτεϊνών του ίδιου του οργανισμού (αυτό-αντιγόνα) (Cusick et al).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι πολλά αυτοάνοσα νοσήματα μοιράζονται κοινές μεταλλάξεις των γονιδίων. Πιο αναλυτικά τα 2/3 των γενετικών περιοχών που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τη συστηματική σκλήρυνση σχετίζονται με τουλάχιστον μία ακόμα αυτοάνοση νόσο. Από αυτά τα 2/3, το 46% σχετίζεται με τουλάχιστον 2 ασθένειες ενώ το 11% αυτών των γενετικών τόπων σχετίζεται με τουλάχιστον 6 διαφορετικές αυτοάνοσες νόσους. Από αυτές τις νόσους, η συστηματική σκλήρυνση μοιράζεται τις περισσότερες γενετικές περιοχές με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (16 γενετικές περιοχές), τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (13 περιοχές) και στη συνέχεια με την πολλαπλή σκλήρυνση και την πρωτοπαθή χολική κίρρωση (8 περιοχές). (Ramos et al.). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, διαπιστώθηκε ότι 38% των ασθενών είχαν δύο ή παραπάνω αλληλεπικαλυπτόμενα αυτοάνοσα νοσήματα, με τα συχνότερα να είναι η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjorgen. Όσον αφορά την οικογενή ομαδοποίηση των αυτοάνοσων ασθενειών το 36% των συγγενών 1<sup>ου</sup> βαθμού είχαν τουλάχιστον ένα αυτοάνοσο νόσημα, δηλώνοντας ότι οι αυτοάνοσες ασθένειες μοιράζονται κοινούς γενετικούς παράγοντες κινδύνου (Allanore et al). Συμπερασματικά, η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα το οποίο δε συμβαδίζει με τους κανόνες της κληρονομικότητας του Μέντελ, αλλά αντίθετα πυροδοτείται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες και γενετικούς τόπους όπου τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους, δρώντας αθροιστικά με πολλά από αυτά να έχουν προστατευτική δράση και άλλα να αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

Μια σειρά μελετών σε ευρωπαϊκούς και αμερικάνικους πληθυσμούς ασθενών έχει αναδείξει πάνω από πενήντα γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την συστηματική σκλήρυνση. Η ισχυρότερη

γενετική προδιάθεση που παρατηρήθηκε για την εκδήλωση και πρόοδο της νόσου φαίνεται πως αφορά γονίδια της επίκτητης και έμφυτης ανοσίας, όπως τα γονίδια HLA του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC). Τα γονίδια του συστήματος HLA βρίσκονται στο χρωμόσωμα 6p21.31 και χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλό πολυμορφισμό ενώ παίζουν κομβικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Όσον αφορά τη συστηματική σκλήρυνση, βρέθηκε ότι συγκεκριμένα αλληλόμορφα των γονιδίων HLA σχετίζονται με την εκδήλωση της νόσου αλλά και με συγκεκριμένους υποτύπους της νόσου και άλλα χαρακτηριστικά (π.χ. παραγωγή συγκεκριμένων αυτό-αντισωμάτων).

Στην περιοχή MHC επιπλέον εδράζονται και δυο ακόμα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο τα οποία δεν κωδικοποιούν για HLA πρωτεΐνες. Πρόκειται για το γονίδιο NOTCH 4 το οποίο συμμετέχει στη σηματοδότηση κατά την εμβρυική ανάπτυξη και το PRORS1C1. Εκτός από την περιοχή MHC μελέτες ολικού γονιδιώματος έχουν αναδείξει αρκετές ακόμα γενετικές περιοχές που φαίνεται να συσχετίζονται με εκδήλωση της νόσου. Γονίδια όπως το INF, γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς κυτοκινών και κυτοκίνες και γονίδια ιντερφερονών, αλλά και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διεργασία της ίνωσης (π.χ. TGF) και της φλεγμονής, γονίδια αυξητικών παραγόντων (π.χ. CTGF), ακόμα και γονίδια που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών (π.χ. PXX) βρίσκονται ανάμεσα σε γενετικούς τόπους που εμφανίζουν συσχέτιση με τη νόσο. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τρία γονίδια στο χρωμόσωμα X IRAK1, FOXP3 και MECP2 τα οποία είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των T-λεμφοκυττάρων, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται και με τον ιδιαίτερα αυξημένο επιπολασμό της νόσου στις γυναίκες. Επιπλέον σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών και μεταλλαγών που σχετίζονται με τη νόσο έχουν βρεθεί σε περιοχές του γονιδιώματος με ρυθμιστική δράση, δηλαδή περιοχές που δέχονται επιγενετική τροποποίηση ή συμμετέχουν σε αυτή όπως για παράδειγμα γενετικές περιοχές που μεταγράφονται σε μικρά ρυθμιστικά RNAs. (Allanore et al, Dieudé et al, Radstake et al, Martin et al, Salazar et al).

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι περίπου το 88% των πολυμορφισμών και μεταλλαγών που εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες έχουν κυρίως ρυθμιστικό ρόλο και περιλαμβάνουν περιοχές όπως υποκινητές, ενισχυτές, αποσιωπητές και ιντρόνια που επιδέχονται επιγενετικές

τροποποιήσεις και εναλλακτικό μάτισμα, διαταράσσοντας τη σωστή λειτουργία των γονιδίων (Salazar et al).

## 1.6 ΤΥΠΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Ο προσδιορισμός των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στο σκληρόδερμα περιπλέκεται λόγω της μεγάλης ετερογένειας της νόσου. Η συστηματική σκλήρυνση μπορεί να χαρακτηριστεί καλύτερα ως σύνδρομο καθώς οι ασθενείς εμφανίζουν ποικιλία μεταξύ των συμπτωμάτων των φαινοτύπων και των οργάνων που προσβάλλονται. Συνεπώς αποτελεί τέλμα στην ταυτοποίηση των γενετικών περιοχών που αποτελούν παράγοντες εμφάνισης της νόσου. Παράλληλα οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των πληθυσμών και των εθνικοτήτων αποτελούν έναν επιπλέον παράγοντα που δυσκολεύει την έρευνα. Επίσης έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν πολλοί γενετικοί τόποι οι οποίοι αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με την έκθεση σε περιβαλλοντικές συνθήκες.

Όπως προαναφέρθηκε η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα το οποίο δεν εμφανίζει μενδελική κληρονομικότητα αλλά εξαρτάται από πολλούς γενετικούς τόπους καθώς και παράγοντες του περιβάλλοντος. Ωστόσο μελέτες έδειξαν ότι το οικογενειακό ιστορικό αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου.

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

Η πρώτη προσέγγιση αφορά τον τύπο μελέτης του υποψηφίου γονιδίου και η δεύτερη αφορά τη μελέτη της συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος. Και οι δύο προσεγγίσεις βασίζονται στην ταυτοποίηση των γενετικών διαφορών μεταξύ των SNPs και προσδιορίζουν ένα λόγο πιθανότητας,

δηλαδή την πιθανότητα ότι μία αλλαγή συμβαίνει με μικρή ή μεγάλη συχνότητα μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών.

α) Προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου (Candidate Gene Approach ή CGA) : Η επιλογή του υποψήφιου προς μελέτη γονιδίου μπορεί να γίνει με δυο τρόπους. Η μια εκδοχή είναι να έχει δειχθεί ότι το προϊόν του συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια που, πιθανώς, σχετίζονται με τη νόσο. Στην περίπτωση του σκληροδέρματος η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων υποδεικνύει το γενετικό τόπο του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας ως μια καλή αρχική προσέγγιση. Η άλλη εκδοχή βασίζεται στο γεγονός ότι συχνά «συνυπάρχουν» διαφορετικές αυτοάνοσες διαταραχές μέσα στην ίδια οικογένεια. Αυτό με τη σειρά του υποδηλώνει πως υπάρχει κοινό γενετικό υπόβαθρο στις διαταραχές αυτές. Έτσι λοιπόν, πολυμορφισμοί οι οποίοι έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν στην εκδήλωση κάποιας άλλης αυτοάνοσης διαταραχής αποτελούν καλούς υποψήφιους για τη μελέτη του σκληροδέρματος.

β) Genome Wide Association Studies (GWAS) :

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται σε tag SNPs, δηλαδή SNPs που να είναι αντιπροσωπευτικά για μια περιοχή του γονιδιώματος. Αυτά βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με μια ομάδα από SNPs που όλα μαζί συνιστούν έναν απλότυπο. Κατά αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι γενετικές παραλλαγές και η συσχέτισή τους με φαινοτύπους χωρίς να μελετηθεί κάθε SNP σε μια χρωμοσωμική περιοχή. Αυτό μειώνει το κόστος και το χρόνο της χαρτογράφησης των περιοχών γονιδιώματος που σχετίζονται με την ασθένεια, καθώς εξαλείφει την ανάγκη μελέτης κάθε μεμονωμένου SNP. Τα tag SNPs είναι χρήσιμα σε μελέτες GWAS.

Τα tag SNPs δεν εντοπίζονται μόνο εντός των γονιδίων, αλλά και σε μη μεταγραφόμενες περιοχές. Έτσι λοιπόν, στη μελέτη αυτή ελέγχεται με σάρωση ολόκληρο το γονιδίωμα ώστε να ανιχνευτούν SNPs που να συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι αμερόληπτη (δηλαδή δεν υπάρχει κάποια αρχική υπόθεση που αναμένεται να επιβεβαιωθεί ή να απορριφθεί) και δεν απαιτείται προϋπάρχουσα γνώση για τη διεξαγωγή της. Ωστόσο καλύπτει περίπου το 80% των SNPs και δεν περιλαμβάνει σπάνια αλληλόμορφα.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως μια GWAS αναγνωρίζει μια περιοχή ανισορροπίας σύνδεσης που περιέχει παραλλαγές που πιθανώς σχετίζονται με τη νόσο. Συχνά, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες για να περιοριστεί η ακριβής περιοχή σύνδεσης και να προσδιοριστεί η αιτιώδης

παραλλαγή, δηλαδή αυτή που πραγματικά συνεισφέρει στην ευαισθησία για τη νόσο.(Patnala et al.)

Συνοψίζοντας, και οι δυο μελέτες γενετικής σύνδεσης προσπαθούν να εντοπίζουν τους πολυμορφισμούς οι οποίοι έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί παράγοντες ευαισθησίας που εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην αγγειακή βλάβη, και στις ινωτικές διεργασίες.

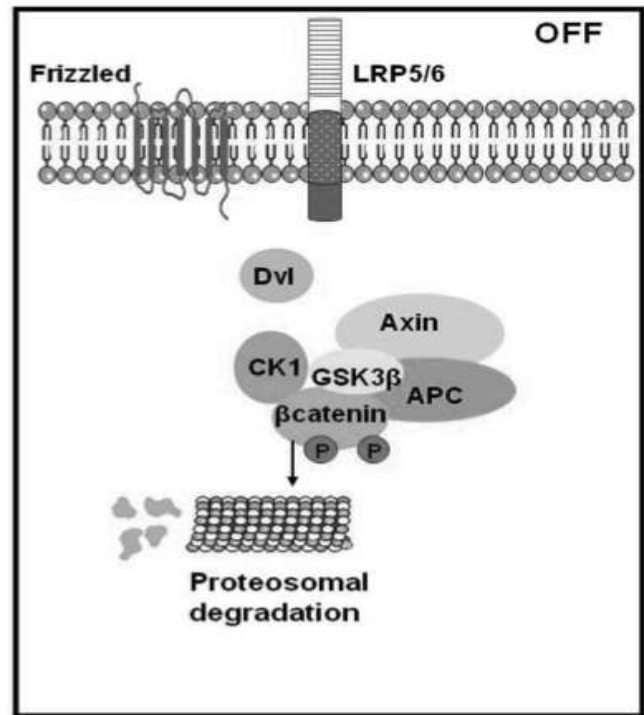
### 1.7 WNT ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ-Wnt ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Όπως έχει προαναφερθεί η συστηματική σκλήρυνση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα το οποίο χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, αυτοανοσία, αγγειοπάθεια και ίνωση τόσο του δέρματος όσο και των εσωτερικών οργάνων (Varga et al.). Ιδιαίτερα η παθογένεια της ίνωσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει εξωκυτταρικά σήματα σημαντικά για την έναρξη και την εξάπλωση της. (Rosenbloom et al.). Στην παρούσα εργασία θα εξεταστεί ο ρόλος της οικογενείας των γονιδίων *WNT* στην ίνωση ασθενών με συστηματική σκλήρυνση.

Οι WNT πρωτεΐνες πήραν το όνομα τους από το μετάλλαγμα *wingless* της *Drosophila melanogaster*. Η Wnt σηματοδότηση ρυθμίζει μεγάλο αριθμό βιολογικών διεργασιών κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής ανάπτυξης συμβάλλοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την πολικότητα των κυττάρων και την οργανογένεση. Στους ενήλικες έχει βρεθεί ότι επανερργοποιείται σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών στην αναγέννηση του δέρματος, του ήπατος και των πνευμόνων μετά από τραυματισμό, στη μετανάστευση και στην απόπτωση των κυττάρων. Επιπλέον η μη φυσιολογική λειτουργία της σηματοδότησης έχει βρεθεί ότι προκαλεί διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με νευρολογικές, μεταβολικές, διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και σε διάφορες νεοπλασίες (Badimon et al.). Είναι γνωστό, ότι στη συστηματική σκλήρυνση το δέρμα και οι πνεύμονες αποτελούν τους πιο συχνούς στόχους της ίνωσης, με τα κύτταρα των προσβληθέντων ιστών να εκφράζουν όλα τα συστατικά των Wnt μονοπατιών καθώς και τους προσδέτες, τους υποδοχείς και τους αναστολείς τους (Wei et al.).

Οι Wnt προσδέτες είναι μία οικογένεια 19 λιποφιλικών γλυκοπρωτεϊνών που προσδέονται σε 10 διαφορετικές ομάδες διαμεμβρανικών υποδοχέων της οικογενείας Frizzled. Οι επιδράσεις των μονοπατιών των Wnts εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και τους υποδοχείς που εκφράζονται.

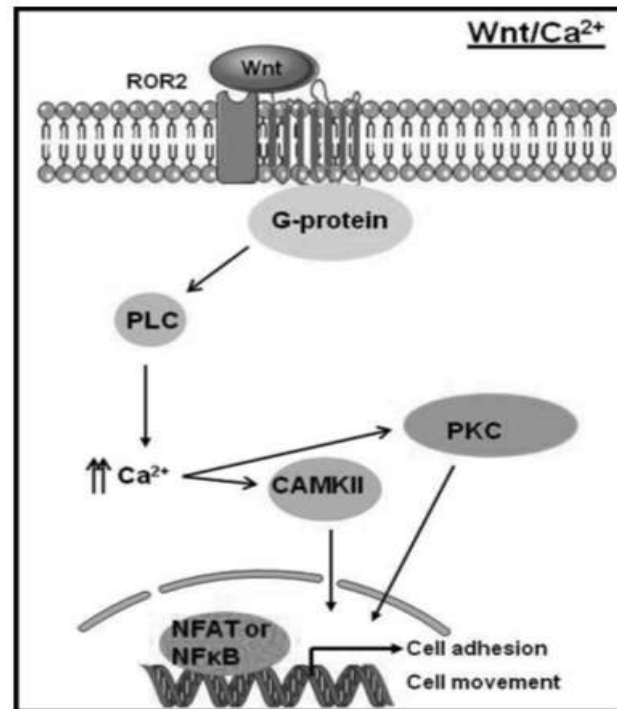
Η Wnt σηματοδότηση χωρίζεται σε δύο βασικά μονοπάτια, το κανονικό Wnt μονοπάτι και το εναλλακτικό Wnt μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, το κανονικό Wnt μονοπάτι είναι εξαρτώμενο από τη β-κατενίνη, η οποία είναι μία πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη με ρόλους στην κυτταρική προσκόλληση με μεσολάβηση της καντχερίνης και στη μεταγωγή σήματος του Wnt μονοπατιού. Η ενεργοποίηση του κανονικού Wnt μονοπατιού πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης προσδετών της οικογένειας WNT στους υποδοχείς Frizzled (7 διαφορετικές ομάδες διαμεμβρανικών υποδοχέων) ή στους υποδοχείς LRP (LDL receptor-related proteins 5 ή 6) στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων που εκκινούν έναν καταρράκτη σηματοδότησης που οδηγεί στην ενεργοποίηση της β-κατενίνης. Η συγκέντρωση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα είναι χαμηλή λόγω της φωσφορυλίωσης της από δύο κινάσες. Ωστόσο η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης, τη μεταφορά της στον πυρήνα και την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων. (Begmann et al., MacDonald et al.). Όσον αφορά το εναλλακτικό Wnt μονοπάτι, αυτό δεν εξαρτάται από τη β-κατενίνη. Διακρίνεται σε δύο μονοπάτια. Το πρώτο είναι το Wnt/ $Ca^{2+}$  εξαρτώμενο και το δεύτερο το PCP μονοπάτι, απαραίτητο για την πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων.



**Εικόνα 2: Κανονική Wnt σηματοδότηση (Badimon et al.)**

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες παρουσία των Wnt προσδετών, αυτοί προσδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς, προσελκύοντας την Axin και τον Dvl με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η β-κατενίνη, η οποία απουσία Wnt προσδετών βρίσκεται ανενεργή σε σύμπλεγμα, φωσφορυλιώνεται από την GSK3β μεταφέρεται στο πρωτεόσωμα για αποικοδόμηση. Έτσι η β-κατενίνη, όντας πλέον ελεύθερη, εισέρχεται στον πυρήνα, αλληλοεπιδρά με την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων LEF1 και οδηγεί στην έκφρασή τους γονιδίων, με αποτέλεσμα ένα νέο καταρράκτη σηματοδότησης.





Εικόνα 3: Εναλλακτική Wnt σηματοδότηση (Badimon et al.)

Στις δύο εικόνες φαίνεται η σηματοδότηση του εναλλακτικού Wnt μονοπατιού.

- a) Κατά την ενεργοποίηση του Wnt/Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενο εναλλακτικού μονοπατιού η ενεργοποιημένη G-πρωτεΐνη επιδρά στο PLC οδηγώντας σε αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup> το οποίο αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της κινάσης PKC και της CAMKII οι οποίες στη συνέχεια πυροδοτούν τη μετακίνηση των NFAT ή NFkB στον πυρήνα οι οποίοι με τη σειρά τους επάγουν τη μεταγραφή ρυθμιστικών γονιδίων καθοδικά του μονοπατιού που σχετίζονται με την κυτταρική προσκόλληση και κίνηση .
- b) Όσον αφορά το PCP εναλλακτικό μονοπάτι το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρείται ενεργοποίηση των ρ και Rac κινασών μετά την πρόσδεση των Wnt και έπειτα ενεργοποίηση των ROCK και JNK οι οποίοι σχετίζονται με τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την πολικότητα των κυττάρων, τη μετανάστευση τους και την οργάνωση του κυτταροσκελετού. (Badimon et al.).

Διάφορες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ανάμειξη του κανονικού μονοπατιού Wnt στην εκδήλωση της ίνωσης καθώς φαίνεται ότι είναι υπέρ-ενεργό σε διάφορες ινωτικές νόσους

Η ενεργοποίηση του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης οδηγεί στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες και στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων κολλαγόνου (Dees C, et al). Σε έρευνες σε Νότιο-Αφρικανούς βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση των *WNT7A* και *WNT7B* αυξάνει την έκφραση του COL1 οδηγώντας σε αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου σε προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ για το *WNT10A* έχει αναφερθεί ότι έχει προ-ινωτικό ρόλο στην ανάπτυξη ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Frost et al.). Επίσης βρέθηκε υπερέκφραση σε ασθενείς με σκληρόδερμα του *WNT1* και του *WNT10B*. Σε ποντικούς στους οποίους εισήχθη *WNT10B* παρατηρήθηκε αντικατάσταση των υποδόριων λιπιδών στρωμάτων από ινοβλάστες κάτι που εμφανίζεται στο σκληρόδερμα (αντικατάσταση λιπώδη από ινώδη ιστό), αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου ενώ διάφορα γονίδια που σχετίζονται με τη λιπογένεση φάνηκαν να καταστέλλονται. Έτσι προκύπτει μία αμοιβαία σχέση μεταξύ δημιουργίας λιπώδους και ινώδους ιστού η οποία ρυθμίζεται εν μέρει από τη κανονική σηματοδότηση Wnt, που χρήζει περαιτέρω μελέτη (Wei et al.).

## **1.8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση πολυμορφισμών στα γονίδια της οικογένειας WNT σε έναν ελληνικό πληθυσμό ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και η διενέργεια μιας μελέτης ασθενών-μαρτύρων με στόχο την ανάδειξη πολυμορφισμών που μπορεί να εμπλέκονται στη παθογένεση της νόσου. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών μαρτύρων και στη συνέχεια διενεργήθηκε γονοτύπηση με την πλατφόρμα αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina. Η γονοτύπηση αφορούσε τον προσδιορισμό πολυμορφισμών τόσο σε κωδικές όσο και μη κωδικές περιοχές ολόκληρου του γονιδιώματος. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 675 πολυμορφισμοί σε 19 διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Τα δεδομένα από την γονοτύπηση αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής *Plink v 1.07* (Purcell et al).

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Τα δείγματα των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή προήλθαν από την Ρευματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης που έχουν θεσπιστεί για τη νόσο. Ως υγιείς μάρτυρες ορίστηκαν άτομα μέσης ηλικίας και των δύο φύλων οι οποίοι δεν πάσχουν από συστηματική σκλήρυνση είτε από κάποιο άλλο αυτοάνοσο νόσημα ή νεοπλασία.

## **2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού γενωμικού DNA από 190 άτομα. Συγκεκριμένα από 134 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και από 56 υγιείς μάρτυρες, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με kit της εταιρίας Macherey Nagel.

## **2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Η ύπαρξη γενετικού υλικού στα προϊόντα της απομόνωσης DNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση 3μl προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%, κατά την οποία γίνεται διαχωρισμός των τμημάτων DNA ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (ladder) στην πηκτή .

### Παρασκευή της πηκτής αγαρόζης:

Ανάμειξη αγαρόζης με 40ml TAE 1x και θέρμανση του μείγματος μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως Προσθήκη 1μl SERVA. (χρωστική που προσδένεται στο DNA και καθιστά εφικτή την παρατήρηση του DNA υπό υπεριώδες φως μέσω φθορισμού.)

Τοποθέτηση του διαλύματος σε ειδικό καλούπι όπου πολυμερίζεται και αποκτά το επιθυμητό σχήμα, το καλούπι περιέχει ειδικά χτενάκια τα οποία αφαιρούνται μετά τον πολυμερισμό, αφήνοντας χαρακτηριστικές οπές.

Έπειτα στις οπές που δημιουργήθηκαν τοποθετήθηκε ποσότητα του δείγματος με προσθήκη 3μl loading buffer και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση στα 100 Volts για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών η πηκτή παρατηρήθηκε σε λάμπα υπεριώδους.

### ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ LOADING BUFFER 6x ΚΑΙ TAE 50x

### **Loading buffer 6x**

- Bromophenol blue 1ml 1% w/v
- TBE 20x 0,5ml
- Glycerol 5ml
- ddH<sub>2</sub>O έως τα 10ml

TAE 1x: αραιώση 20 ml διαλύματος stock 50x με την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού σε τελικό V=1L

### **TAE 50x**

- Tris Base 121gr
- Acetic Acid 28,5ml
- EDTA 0,5M 50ml
- ddH<sub>2</sub>O έως τα 500ml

## **2.4 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ**

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε χρήση δειγμάτων που γονοτυπήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Πλαγερά Δημητρίου. Συγκεκριμένα μετά την απομόνωση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης DNA στα δείγματα των ασθενών και των υγιών μαρτύρων αυτά σταλήθηκαν σε εταιρεία ώστε να γονοτυπηθούν με την πλατφόρμα αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina . Αυτή η πλατφόρμα αλληλούχησης της Illumina επιτρέπει τον προσδιορισμό περισσότερων των 650.000 μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών σε όλο το μήκος του γονιδιώματος οι οποίοι βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με επιπλέον πολυμορφισμούς με αποτέλεσμα να προσδιορίζονται πάνω από 2.500.000 SNPs. Στην πλατφόρμα περιλαμβάνονται τόσο κωδικές όσο και μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος.

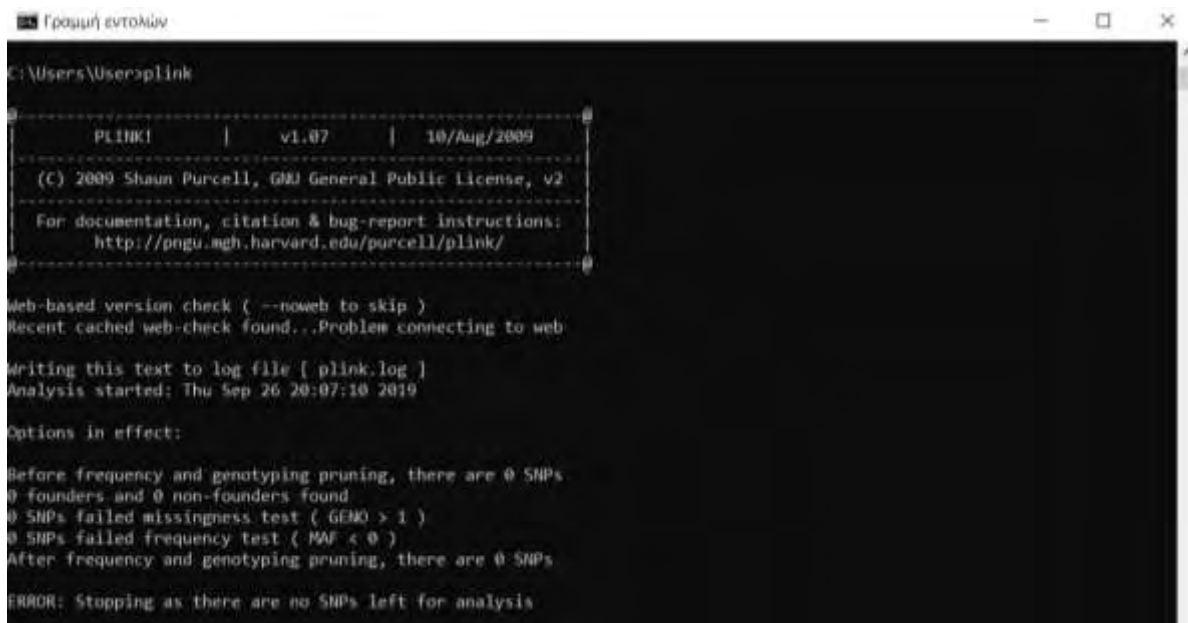
## **2.5 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ**

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη γονοτύπηση αναλύθηκαν με χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής Plink. Το Plink είναι μια εφαρμογή για την ανάλυση δεδομένων γονοτύπησης και τη πραγματοποίηση μελετών σε επίπεδο ολικού γονιδιώματος. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή

διατριβή έγινε χρήση του προγράμματος για τον ποιοτικό έλεγχο των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης και την μελέτη των συσχετίσεων ανάμεσα στους ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και τους υγιείς μάρτυρες. Όλες οι πληροφορίες για τα υπό μελέτη γονίδια και πολυμορφισμούς αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων Ensembl και το εργαλείο άντλησης δεδομένων Biomart.

## 2.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά την ανίχνευση και ανάλυση συσχετίσεων ανάμεσα στις συχνότητες των γονοτύπων μεταξύ του υγιούς πληθυσμού και των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των συχνοτήτων του σπάνιου αλληλομόρφου (MAF) στους δύο αυτούς πληθυσμούς και στατιστική ανάλυση με χρήση της δοκιμασίας σημαντικότητας  $\chi^2$  κατά Pearson, μέσω του προγράμματος Plink (Purcell et al).



```
Γραμμή εντολών
C:\Users\User>plink

-----
Plink | v1.07 | 10/Aug/2009
-----
(C) 2009 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
For documentation, citation & bug-report instructions:
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----

Web-based version check ( --noweb to skip )
Recent cached web-check found...Problem connecting to web

Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Thu Sep 26 20:07:10 2019

Options in effect:

Before frequency and genotyping pruning, there are 0 SNPs
0 founders and 0 non-founders found
0 SNPs failed missingness test ( GEMO > 1 )
0 SNPs failed frequency test ( MAF < 0 )
After frequency and genotyping pruning, there are 0 SNPs

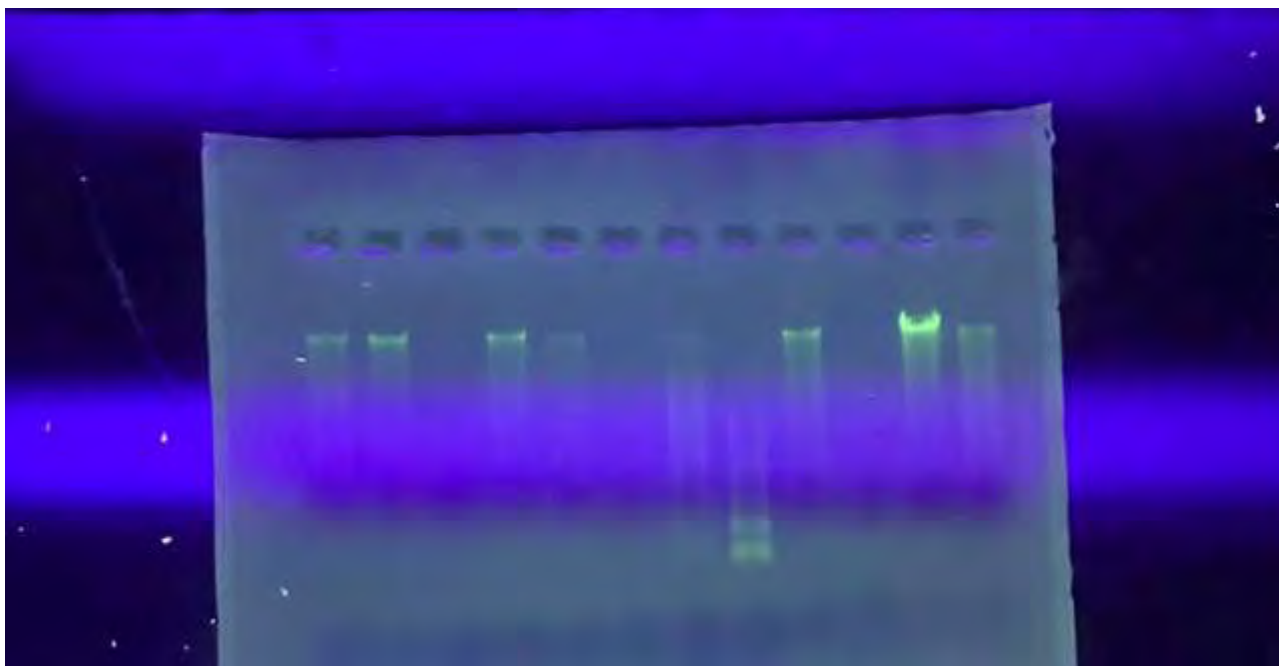
ERROR: Stopping as there are no SNPs left for analysis
```

Εικόνα 4: Περιβάλλον εργασίας Plink

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η επιβεβαίωση της επιτυχημένης απομόνωσης DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται ορισμένα από τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της απομόνωσης ολικού γενωμικού DNA από ορισμένα δείγματα αίματος.



Εικόνα 5: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης

### 3.2 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ

Συνολικά για τη γονοτύπηση μέσω της πλατφόρμας αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina χρησιμοποιήθηκαν 190 δείγματα. Αναλυτικά 134 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και 56 υγιείς μάρτυρες.

### 3.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που προήλθαν από τη γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής Plink v 1.07. Αρχικά έγινε ποιοτικός έλεγχος στα αποτελέσματα έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα δείγματα και οι πολυμορφισμοί κακής ποιότητας γονοτύπησης, δηλαδή αυτά που δεν πληρούσαν τα κριτήρια που τέθηκαν σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και άλλες παρόμοιες αναλύσεις. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα που έγιναν αποδεκτά έπρεπε να τηρούν 3 κριτήρια. Ως προς την ποιότητα γονοτύπησης των δειγμάτων, έπρεπε να εμφανίζουν genotyping call >99%, ενώ ως προς τα αποτελέσματα της γονοτύπησης ανά πολυμορφισμό επιλέχθηκαν πολυμορφισμοί με genotyping call >90%. Τέλος τα αποτελέσματα που έγιναν αποδεκτά έπρεπε να μην αποκλίνουν από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Μετά τον έλεγχο

ποιότητας και την απομάκρυνση των πολυμορφισμών και των δειγμάτων που δεν πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια πραγματοποιήθηκε χρήση του εργαλείου άντλησης δεδομένων Biomart της βάσης δεδομένων Ensembl και του προγράμματος Plink ώστε να γίνει άντληση μόνο των πολυμορφισμών που περιέχονταν στο μήκος των γενετικών τόπων των 19 υπό εξέταση γονιδίων. Έτσι, προέκυψαν συνολικά 675 πολυμορφισμοί από τους 19 υπό εξέταση γενετικούς τόπους, οι οποίοι παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1 : Γονίδια και αριθμός πολυμορφισμών που αναλύθηκαν**

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΟΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ
WNT1	12	22
WNT2	7	25
WNT2B	1	26
WNT3	17	34
WNT3A	1	21
WNT4	1	39
WNT5A	3	38
WNT5B	12	106
WNT6	2	29
WNT7A	3	44
WNT7B	22	60
WNT8A	5	15
WNT8B	10	12
WNT9A	1	23
WNT9B	17	42
WNT10A	2	30
WNT10B	12	23
WNT11	11	51
WNT16	7	35
		<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ:675</b>

### 3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Συνολικά αναλύθηκαν 675 σημειακοί πολυμορφισμοί σε 19 γενετικούς τόπους σχετικούς με την οικογένεια WNT. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής *Plink*, οι συχνότητες των γονοτύπων και η συχνότητα εμφάνισης του σπανίου αλληλομόρφου (MAF) για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς και στους δύο πληθυσμούς και

ακολούθησαν ζευγαρωτές δοκιμασίες σημαντικότητας για κάθε έναν από αυτούς. Στη συνέχεια απομακρύνθηκαν οι πολυμορφισμοί των οποίων οι συχνότητες εμφάνισης μεταξύ ασθενών και υγείων μαρτύρων δεν διαφοροποιούνταν στατιστικά σημαντικά και εμφανιζόταν είτε στους ασθενείς είτε στους υγιείς με συχνότητα >1%.

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

## 1. *WNT1*

Πίνακας 2: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT1*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
12	rs833480	G	0,2388	0,1964	A	0,8101	0,3681	1,283
12	rs3825184	C	0,4851	0,4554	T	0,2797	0,5969	1,127
12	rs78877829	T	0,05224	0,03571	C	0,478	0,4893	1,488
12	rs4760600	G	0,3619	0,3929	A	0,3235	0,5695	0,8767
12	rs117927481	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
12	rs41291977	G	0,04478	0,02679	T	0,6743	0,4116	1,703
12	rs79640667	C	0,05224	0,05357	T	0,002813	0,9577	0,9738
12	rs116932687	T	0,02239	0,008929	C	0,7914	0,3737	2,542
12	rs117686149	T	0,03731	0,04464	C	0,1119	0,738	0,8295
<b>12</b>	<b>rs118115924</b>	<b>T</b>	<b>0,003731</b>	<b>0,04464</b>	<b>G</b>	<b>8,508</b>	<b>0,003537</b>	<b>0,08015</b>
12	rs76573653	G	0,02985	0,008929	T	1,495	0,2214	3,415
12	rs7311091	T	0,08209	0,08036	C	0,003164	0,9551	1,023
12	rs10783298	G	0,06343	0,09821	A	1,4	0,2367	0,6219
12	rs10658818	A	0,3172	0,3661	G	0,8525	0,3559	0,8043
12	rs1054442	G	0,3582	0,4464	T	2,598	0,107	0,6921
12	rs74891052	A	0,04478	0,01786	G	1,613	0,2041	2,578
12	rs10875912	C	0,3134	0,3661	T	0,9915	0,3194	0,7906
12	rs11168830	A	0,02632	0,04464	G	0,8612	0,3534	0,5784
12	rs80132640	G	0,04478	0,01786	A	1,613	0,2041	2,578
12	rs56026363	A	0,02985	0,04464	G	0,5231	0,4695	0,6585
12	rs55865069	T	0,04478	0,01786	C	1,613	0,2041	2,578
12	rs12821008	T	0,3731	0,4732	C	3,289	0,06973	0,6626

Όσον αφορά το γονίδιο *WNT1* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 22 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2. Παράλληλα αναγράφονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό



μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson, μόνο ένας πολυμορφισμός φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων (**rs118115926**) ο οποίος αφορά σε μια αντικατάσταση μιας βάσης γουανίνης από θυμίνη και εδράζεται σε ρυθμιστική περιοχή. Η συχνότητα εμφάνισης του στο γενικό πληθυσμό κατά την Ensembl είναι μικρότερη του 1%.

## WNT2

Πίνακας 3: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT2*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
7	rs117192522	A	0,01493	0,02679	G	0,6145	0,4331	0,5505
7	rs193579	C	0,25	0,2679	T	0,1319	0,7165	0,9111
7	rs193580	C	0,2444	0,25	A	0,01351	0,9075	0,9701
7	rs38893	C	0,05224	0,08036	T	1,098	0,2946	0,6308
7	rs35196356	T	0,007463	0,008929	G	0,02167	0,883	0,8346
7	rs12532165	A	0,06343	0,07143	G	0,08216	0,7744	0,8805
7	rs38900	G	0,03358	0,03571	A	0,01087	0,917	0,9382
7	rs5004797	C	0,194	0,125	T	2,623	0,1053	1,685
7	rs38901	A	0,04478	0,05357	G	0,1354	0,7129	0,8281
7	rs11763514	T	0,194	0,125	G	2,623	0,1053	1,685
7	rs38903	T	0,1866	0,1339	C	1,544	0,2141	1,483
7	rs7776871	C	0,05224	0,04464	A	0,09595	0,7567	1,18
7	rs7457422	T	0,2481	0,1786	G	2,169	0,1408	1,518
7	rs6466608	C	0,1978	0,1339	T	2,191	0,1389	1,594
7	rs73714617	A	0,02239	0,05357	G	2,512	0,113	0,4046
7	rs4730774	A	0,05224	0,05357	G	0,002813	0,9577	0,9738
7	rs887574	A	0,1978	0,1607	C	0,7135	0,3983	1,287
7	TOP-rs4730775	C	0,5	0,4018	T	3,058	0,08034	1,489
7	rs2228946	T	0,2015	0,1429	C	1,807	0,1788	1,514
7	rs916725	T	0,4291	0,3929	C	0,4265	0,5137	1,162
7	rs79665929	G	0,02632	0,01786	A	0,2426	0,6223	1,486
<b>7</b>	<b>rs4727847</b>	<b>T</b>	<b>0,5037</b>	<b>0,3839</b>	<b>G</b>	<b>4,553</b>	<b>0,03286</b>	<b>1,629</b>
7	rs17139625	A	0,06343	0,05357	G	0,1351	0,7132	1,197
7	rs148324787	G	0,007463	0,02679	A	2,271	0,1318	0,2732
7	rs1029396	G	0,05597	0,03571	T	0,6823	0,4088	1,601

Όσον αφορά το γενετικό τόπο του γονίδιο του *WNT2* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 25 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 3. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson, ένας πολυμορφισμός φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά

σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων με κωδικό (**rs4727847**), ο οποίος αφορά σε μια αντικατάσταση μιας βάσης γουανίνης από θυμίνη. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα η συχνότητα στη περίπτωση των ασθενών έφτανε το 50% ενώ στη περίπτωση των υγιών μαρτύρων κυμαινόταν γύρω στο 38%. Η διαφορά αυτή φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντική με  $p = 0.03286$ . Ανατρέχοντας στη βάση δεδομένων Ensembl με στόχο την ανάκτηση πληροφοριών σχετικά με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, προκύπτει ότι πρόκειται για ένα SNP που βρίσκεται σε ιντρονική θέση ενώ η μέση παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλομόρφου (Global MAF) σύμφωνα με την Ensembl υπολογίζεται στο 40% .

## 2. WTN2B

Πίνακας 4: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT2B*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
1	rs77335651	T	0,02239	0,008929	C	0,7914	0,3737	2,542
1	rs77847499	A	0,05597	0,03571	G	0,6823	0,4088	1,601
1	rs115762346	C	0,03008	0,02778	T	0,0142	0,9051	1,085
1	rs2483350	A	0,3571	0,3214	C	0,4439	0,5052	1,173
1	rs72697100	C	0,02256	0,01786	T	0,08401	0,7719	1,269
1	rs77447859	G	0,01866	0,008929	A	0,481	0,488	2,11
1	rs2492530	T	0,3582	0,3214	G	0,4713	0,4924	1,178
1	rs55894221	C	0,02985	0,03571	T	0,0888	0,7657	0,8308
1	rs76356632	A	0,02985	0,05357	G	1,253	0,2631	0,5436
1	rs61820466	C	0,01119	0,01786	T	0,2701	0,6033	0,6226
1	rs1777606	A	0,1604	0,2143	G	1,577	0,2093	0,7007
<b>1</b>	<b>rs351354</b>	<b>T</b>	<b>0,2331</b>	<b>0,1161</b>	<b>C</b>	<b>6,785</b>	<b>0,009193</b>	<b>2,314</b>
1	rs351360	G	0,4774	0,5357	A	1,071	0,3008	0,7918
1	rs112788151	G	0,04511	0,0625	A	0,4991	0,4799	0,7087
1	rs351367	C	0,4813	0,5357	T	0,9341	0,3338	0,8043
1	rs36006679	A	0,02612	0,01786	G	0,2332	0,6292	1,475
1	rs351370	C	0,4142	0,3571	T	1,073	0,3003	1,273
1	rs3790608	A	0,1418	0,1429	G	0,000736	0,9784	0,9913
1	rs58118553	C	0,05224	0,05357	A	0,002813	0,9577	0,9738
1	rs3737136	G	0,1716	0,1786	A	0,02643	0,8709	0,9532
1	rs11102489	G	0,03358	0,03571	A	0,01087	0,917	0,9382
1	rs3790611	G	0,2649	0,25	A	0,09134	0,7625	1,081
1	rs12728001	C	0,4701	0,4821	T	0,04558	0,8309	0,9531
1	rs7551933	C	0,2687	0,25	T	0,1418	0,7065	1,102
1	rs116119045	A	0,02985	0,04464	G	0,5231	0,4695	0,6585
1	rs80042498	C	0,07836	0,05357	T	0,7353	0,3912	1,502

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT2B* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 26 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Όπως φαίνεται και στον πίνακα όπου αναγράφονται επίσης τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους, μόνο ένας πολυμορφισμός φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Πρόκειται για τον πολυμορφισμό με κωδικό (**rs351254**), ο οποίος αφορά σε μια αντικατάσταση μιας βάσης κυτοκίνης από θυμίνη. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, η μέση συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στον πληθυσμό των υγιών ήταν γύρω στο 16% ενώ στον πληθυσμό των ασθενών υπολογίστηκε περίπου στο 23%.

### 3. *WNT3*

Πίνακας 5: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT3*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
17	rs183211	A	0,2276	0,25	G	0,2207	0,6385	0,8841
17	rs116845508	T	0,003731	0,008929	C	0,4075	0,5232	0,4157
17	rs117936104	G	0,01493	0,008929	A	0,2188	0,64	1,682
17	rs199533	T	0,194	0,2054	C	0,06398	0,8003	0,9316
17	rs67143796	C	0,007463	0,008929	T	0,02167	0,883	0,8346
17	rs199515	G	0,1978	0,2182	C	0,2005	0,6543	0,8833
17	rs199513	A	0,1978	0,2143	G	0,1335	0,7148	0,9039
17	rs72628338	G	0,007463	0,008929	T	0,02167	0,883	0,8346
17	rs199501	A	0,218	0,2679	G	1,095	0,2954	0,7622
17	rs2074404	G	0,2201	0,2232	T	0,00431	0,9477	0,9824
17	rs2074405	A	0,194	0,2636	C	2,244	0,1341	0,6724
17	rs11658976	G	0,3459	0,3661	A	0,1411	0,7072	0,9156
17	rs117188157	T	0,0597	0,05357	C	0,05442	0,8155	1,122
17	rs111725813	A	0,01866	0,02679	G	0,2533	0,6148	0,6907
17	rs111769	T	0,4104	0,4018	C	0,02454	0,8755	1,037
17	rs8080199	G	0,06716	0,1161	A	2,522	0,1123	0,5483
17	rs118184955	T	0,003731	0,008929	C	0,4075	0,5232	0,4157
17	rs3851781	C	0,4963	0,4821	T	0,06306	0,8017	1,058
17	rs118086135	A	0,01866	0,02679	G	0,2533	0,6148	0,6907
17	rs16941107	T	0,1642	0,1964	C	0,5724	0,4493	0,8036
17	rs62071979	A	0,04104	0,09091	G	3,696	0,05455	0,428
17	rs9894638	C	0,2164	0,1964	T	0,1899	0,663	1,13
17	rs1373089	C	0,4478	0,3909	T	1,028	0,3107	1,263
17	rs56158829	A	0,1007	0,08929	C	0,118	0,7312	1,143
17	rs58897475	C	0,1429	0,125	T	0,2118	0,6453	1,167

17	rs6504583	G	0,3806	0,4091	A	0,2664	0,6057	0,8876
17	rs60947935	G	0,03008	0,01786	A	0,4568	0,4991	1,705
17	rs59788647	G	0,03759	0,01786	A	0,9988	0,3176	2,148
17	rs79877551	C	0,07836	0,09821	T	0,4038	0,5251	0,7806
17	rs62071992	C	0,04851	0,04464	T	0,02614	0,8716	1,091
17	rs12951527	T	0,02239	0,03571	C	0,5475	0,4594	0,6183
<b>17</b>	<b>rs4968282</b>	<b>G</b>	<b>0,306</b>	<b>0,4464</b>	<b>A</b>	<b>6,874</b>	<b>0,008746</b>	<b>0,5467</b>
17	rs78539656	T	0,04851	0,03571	G	0,3025	0,5823	1,376
17	rs16941186	T	0,04851	0,03571	C	0,3025	0,5823	1,376

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT3* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 34 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Όπως φαίνεται και στον πίνακα όπου αναγράφονται επίσης τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους, από τα 34 SNPs ένα μόνο παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους δύο πληθυσμούς. Συγκεκριμένα το SNP με κωδικό (**rs4968282**) (A ->G), το οποίο βρίσκεται σε ιντρονική θέση με συχνότητα εμφάνισης 30% στην περίπτωση των ασθενών και 44% στην περίπτωση των υγιών μαρτύρων. Στο γενικό πληθυσμό το MAF υπολογίζεται γύρω στο 32%.

#### 4. *WNT3A*

Πίνακας 6: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT3A*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
1	rs4518905	T	0,1269	0,08929	C	1,09	0,2966	1,482
1	rs34418349	A	0,09701	0,1429	G	1,689	0,1938	0,6446
1	rs12748472	A	0,3433	0,4	G	1,089	0,2967	0,7841
1	rs12040881	C	0,3507	0,4091	T	1,142	0,2853	0,7803
1	rs7529664	T	0,007463	0,008929	C	0,02167	0,883	0,8346
1	rs78590291	C	0,0597	0,04464	T	0,3431	0,5581	1,359
1	rs849903	G	0,459	0,5089	A	0,7912	0,3737	0,8185
1	rs6665129	G	0,08955	0,125	A	1,103	0,2936	0,6885
1	rs849898	C	0,3609	0,3839	T	0,1797	0,6716	0,9062
1	rs6426488	C	0,08582	0,125	T	1,38	0,2402	0,6571
1	rs1636195	A	0,3022	0,3036	G	0,000665	0,9794	0,9937
1	rs708122	T	0,3985	0,4018	G	0,003555	0,9525	0,9864
1	rs6672422	C	0,08209	0,1161	T	1,091	0,2963	0,6811
1	rs3121309	A	0,1679	0,1909	G	0,2862	0,5926	0,8552
1	rs115670157	C	0,01493	0,008929	T	0,2188	0,64	1,682
1	rs72756213	A	0,01493	0,01786	G	0,04369	0,8344	0,8333
1	rs115890192	T	0,01504	0,008929	C	0,2253	0,635	1,695
1	rs114964251	A	0,003731	0,009091	G	0,4257	0,5141	0,4082

1	rs116271163	G	0,01119	0,02679	A	1,236	0,2663	0,4113
1	rs849749	G	0,2724	0,2589	A	0,07287	0,7872	1,071
1	rs10916266	C	0,04851	0,03571	A	0,3025	0,5823	1,376

Όσον αφορά το γονίδιο *WNT3A* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 34 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, δεν προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης ( $p < 0,05$ ).

## 5. *WNT4*

Πίνακας 7: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT4*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
1	rs10917123	A	0,1791	0,2232	G	0,9903	0,3197	0,7593
1	rs79223209	A	0,04104	0,07143	G	1,535	0,2153	0,5564
1	rs116825850	T	0,05224	0,02679	C	1,197	0,2738	2,003
1	rs2501276	A	0,06343	0,09821	G	1,4	0,2367	0,6219
1	rs16826452	C	0,02985	0,01786	T	0,4434	0,5055	1,692
1	rs11800014	T	0,1828	0,2232	C	0,8213	0,3648	0,7786
1	rs74778002	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
1	rs115384208	C	0,04851	0,02679	T	0,9241	0,3364	1,852
1	rs3765350	C	0,1791	0,2143	T	0,6366	0,4249	0,8
1	rs72647409	T	0,04851	0,04464	C	0,02614	0,8716	1,091
1	rs2235529	A	0,1194	0,125	G	0,02326	0,8788	0,9492
1	rs7544210	G	0,4328	0,5	A	1,438	0,2304	0,7632
1	rs11805891	G	0,04104	0,05357	T	0,29	0,5902	0,7562
1	rs3820282	A	0,1194	0,1339	G	0,1538	0,695	0,8768
1	rs72881075	T	0,02239	0,02679	C	0,06606	0,7972	0,8321
1	rs10917162	C	0,3582	0,3482	T	0,03445	0,8528	1,045
1	rs12410251	T	0,1828	0,1964	G	0,09606	0,7566	0,9153
1	rs12729516	T	0,1866	0,1607	C	0,3593	0,5489	1,198
1	rs16826659	A	0,01866	0,02679	C	0,2533	0,6148	0,6907
1	rs2744721	T	0,3507	0,4	C	0,8162	0,3663	0,8103
1	rs7521902	A	0,1617	0,1786	C	0,1624	0,687	0,887
1	rs16826677	T	0,02239	0,03571	C	0,5475	0,4594	0,6183
1	rs17360017	A	0,2649	0,3393	G	2,135	0,144	0,7018
<b>1</b>	<b>rs17360053</b>	<b>C</b>	<b>0,2687</b>	<b>0,375</b>	<b>T</b>	<b>4,254</b>	<b>0,03916</b>	<b>0,6122</b>
1	rs742356	G	0,2724	0,2946	A	0,1945	0,6592	0,8962
1	rs114328394	C	0,02239	0,008929	A	0,7914	0,3737	2,542
1	rs2744706	T	0,2873	0,2143	C	2,159	0,1418	1,478

1	rs879637549	T	0,1769	0,1667	G	0,03009	0,8623	1,075
1	rs10753531	T	0,3022	0,25	C	1,054	0,3047	1,299
1	rs72647433	A	0,01866	0,02679	G	0,2533	0,6148	0,6907
1	rs12734979	C	0,25	0,2727	T	0,2112	0,6459	0,8889
<b>1</b>	<b>rs17356059</b>	<b>T</b>	<b>0,2649</b>	<b>0,3661</b>	<b>C</b>	<b>3,888</b>	<b>0,04864</b>	<b>0,6241</b>
1	rs2807348	T	0,3209	0,2321	C	2,993	0,08361	1,563
1	rs2473249	T	0,4398	0,4464	C	0,01383	0,9064	0,9737
1	rs76142969	A	0,03731	0,03571	G	0,005693	0,9399	1,047
1	rs2473250	G	0,2218	0,1696	A	1,309	0,2525	1,395
1	rs2505722	T	0,4925	0,4911	G	0,000679	0,9792	1,006
1	rs12749135	T	0,2351	0,2857	G	1,08	0,2986	0,7683
<b>1</b>	<b>rs1033455</b>	<b>A</b>	<b>0,4851</b>	<b>0,375</b>	<b>G</b>	<b>3,863</b>	<b>0,04936</b>	<b>1,57</b>

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT4* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 39 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Όπως φαίνεται και στον πίνακα όπου αναγράφονται επίσης τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους, από τα 39 SNPs τα 3 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους δύο πληθυσμούς. Συγκεκριμένα το SNP με κωδικό (**rs17360053**) (T →C), το SNP με κωδικό (**rs17356059**) (C→T) και το SNP με κωδικό (**rs1033455**) όπου εμφανίζεται αντικατάσταση της γουανίνης από την αδενίνη ενώ η συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς αγγίζει το 48%. Όσον αφορά τα δύο τελευταία SNPs, το  $p$  βρίσκεται λίγο κάτω από το όριο της στατιστικής σημαντικότητας ( $p < 0.05$ ). Ο πολυμορφισμός με κωδικό (**rs1033455**) ο οποίος εδράζεται σε περιοχή μεταξύ γονιδίων, ενώ εμφανίζεται σε μεγάλα ποσοστά δεν μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα σημαντικός επειδή στους υγιείς του δείγματος εμφανίζεται σε ποσοστό κοντά στο 37% ενώ στο γενικό πληθυσμό κατά την Ensembl σε ποσοστό 50%.

## 6. *WNT5A*

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT5A*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
3	rs9843897	G	0,2276	0,1696	A	1,597	0,2063	1,442
3	rs114926985	T	0,003731	0,01786	C	2,012	0,156	0,206
3	rs7430468	G	0,02256	0,01786	A	0,08401	0,7719	1,269
3	rs1829555	C	0,02239	0,01786	A	0,07868	0,7791	1,26
<b>3</b>	<b>rs73073456</b>	<b>G</b>	<b>0,007463</b>	<b>0,03636</b>	<b>A</b>	<b>4,17</b>	<b>0,04114</b>	<b>0,1992</b>
3	rs11716743	T	0,1828	0,1161	C	2,579	0,1083	1,704
3	rs3846040	C	0,02239	0,01786	T	0,07868	0,7791	1,26
3	rs3846041	G	0,3731	0,3304	A	0,627	0,4285	1,207
3	rs115512440	T	0,02985	0,008929	C	1,495	0,2214	3,415

3	rs2885451	A	0,3097	0,3214	G	0,0505	0,8222	0,9471
3	rs1373634	G	0,06716	0,05357	A	0,2467	0,6194	1,272
3	rs1822811	C	0,3582	0,2768	T	2,353	0,125	1,458
3	rs865235	A	0,2351	0,2946	G	1,484	0,2231	0,7357
3	rs73830622	C	0,05224	0,02679	T	1,197	0,2738	2,003
3	rs476986	C	0,1791	0,2411	A	1,915	0,1664	0,6869
3	rs60454539	A	0,05224	0,05357	G	0,002813	0,9577	0,9738
3	rs78672886	A	0,04851	0,01786	G	1,957	0,1618	2,804
3	rs2649870	T	0,08955	0,08036	C	0,08422	0,7717	1,126
3	rs472631	T	0,4104	0,4821	C	1,655	0,1983	0,7478
3	rs648872	T	0,1455	0,1518	C	0,02466	0,8752	0,9517
3	rs114304198	G	0,01493	0,04464	A	3,017	0,08241	0,3242
3	rs116446509	A	0,04478	0,02679	G	0,6743	0,4116	1,703
3	rs1818728	A	0,194	0,1964	G	0,002898	0,9571	0,9848
3	rs62249135	A	0,01866	0,03571	C	0,9939	0,3188	0,5133
3	rs665643	T	0,2836	0,2589	C	0,2401	0,6241	1,133
3	rs73075476	T	0,01493	0,01786	C	0,04369	0,8344	0,8333
3	rs62249159	C	0,04511	0,03571	T	0,1717	0,6786	1,276
3	rs511843	G	0,2687	0,2589	A	0,03831	0,8448	1,051
3	rs528574	T	0,4254	0,4286	C	0,003304	0,9542	0,987
3	rs62251466	G	0,01493	0,03571	A	1,656	0,1981	0,4091
3	rs55912611	T	0,003731	0,008929	C	0,4075	0,5232	0,4157
3	rs115924554	T	0,03358	0,01786	C	0,6949	0,4045	1,911
3	rs2047566	T	0,2649	0,2679	C	0,003479	0,953	0,9851
3	rs79611953	A	0,05597	0,02679	G	1,491	0,2221	2,154
3	rs6765264	T	0,2351	0,2768	C	0,7382	0,3903	0,803
3	rs141661050	G	0,01866	0,008929	A	0,481	0,488	2,11
3	rs6772485	T	0,1493	0,1875	C	0,8574	0,3545	0,7602
3	rs78284213	T	0,04851	0,02727	C	0,8675	0,3516	1,818

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT5A* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 38 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 8 όπου αναγράφονται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, μόνο ένα από τα SNPs εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα διαφοροποίησης με  $p=0.04114$  (**rs73073456**), ωστόσο επειδή το MAF και στις δύο ομάδες είναι πολύ μικρό, και καθώς πρόκειται για ένα σπάνιο πολυμορφισμό στο γενικό πληθυσμό με μέσο MAF μικρότερο του 1% η παρατηρούμενη σημαντικότητα δεν μπορεί να αξιολογηθεί στη παρούσα φάση.

## 7. *WNT5B*

Πίνακας 9: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT5B*

CHR	SNP id	Minor	MAF	MAF	Major	CHISQ	P	OR
-----	--------	-------	-----	-----	-------	-------	---	----

		Allele	(cases)	(controls)	Allele			
12	rs4766374	G	0,03358	0,03571	A	0,01087	0,917	0,9382
12	rs11829753	T	0,03358	0,03571	C	0,01087	0,917	0,9382
12	rs12305562	C	0,3172	0,3036	T	0,06785	0,7945	1,066
12	rs61912172	A	0,04104	0,03571	G	0,0592	0,8078	1,156
12	rs67797372	T	0,1007	0,1071	C	0,03509	0,8514	0,9336
12	rs4765822	G	0,3955	0,4643	A	1,538	0,215	0,755
<b>12</b>	<b>rs7301199</b>	<b>A</b>	<b>0,2406</b>	<b>0,3393</b>	<b>G</b>	<b>3,896</b>	<b>0,04841</b>	<b>0,617</b>
12	rs28670851	T	0,07836	0,03571	C	2,337	0,1263	2,296
12	rs4766378	G	0,3346	0,4196	A	2,475	0,1156	0,6954
12	rs77865442	C	0,01493	0,008929	T	0,2188	0,64	1,682
12	rs4238025	T	0,3022	0,3661	C	1,477	0,2243	0,7501
12	rs75267651	T	0,01493	0,008929	C	0,2188	0,64	1,682
12	rs4238028	G	0,3694	0,3929	A	0,1851	0,667	0,9053
12	rs8181665	C	0,3582	0,2857	T	1,858	0,1728	1,395
12	rs2369853	G	0,08582	0,08929	T	0,01196	0,9129	0,9576
12	rs9783502	T	0,1455	0,125	C	0,2772	0,5986	1,192
12	rs7977105	T	0,1455	0,125	C	0,2772	0,5986	1,192
12	rs7960982	A	0,08582	0,08929	C	0,01196	0,9129	0,9576
12	rs6489294	T	0,05597	0,0625	C	0,06175	0,8038	0,8893
12	rs80261425	T	0,01119	0,01786	C	0,2701	0,6033	0,6226
12	rs7957787	T	0,3433	0,375	C	0,3481	0,5552	0,8712
<b>12</b>	<b>rs79734443</b>	<b>T</b>	<b>0,003731</b>	<b>0,04464</b>	<b>C</b>	<b>8,508</b>	<b>0,003537</b>	<b>0,08015</b>
<b>12</b>	<b>rs111894978</b>	<b>A</b>	<b>0,03358</b>	<b>0,08929</b>	<b>G</b>	<b>5,16</b>	<b>0,02311</b>	<b>0,3544</b>
12	rs11061817	G	0,1493	0,1161	A	0,7246	0,3946	1,336
12	rs6489297	G	0,3321	0,3661	A	0,4053	0,5244	0,861
12	rs4283041	T	0,2873	0,2232	C	1,653	0,1986	1,403
12	rs2887571	G	0,2799	0,2232	A	1,307	0,253	1,352
12	rs7978841	G	0,3806	0,4107	A	0,3013	0,5831	0,8816
12	rs78033176	T	0,04478	0,03571	C	0,1608	0,6884	1,266
12	rs12049927	A	0,02612	0,05357	G	1,802	0,1795	0,4738
12	rs61050251	G	0,2687	0,2946	A	0,2667	0,6055	0,8794
12	rs11061823	A	0,1007	0,09821	C	0,005627	0,9402	1,029
12	rs112551581	A	0,02239	0,04464	G	1,392	0,2381	0,4901
12	rs80178741	G	0,02239	0,04464	A	1,392	0,2381	0,4901
12	rs183415945	T	0,01128	0,01818	C	0,2827	0,595	0,616
12	rs11061829	A	0,06343	0,01786	G	3,454	0,06309	3,725
12	rs76494432	T	0,02612	0,008929	C	1,133	0,2872	2,977
12	rs10773958	A	0,2127	0,1696	G	0,9147	0,3389	1,322
12	rs78104193	G	0,1791	0,1964	A	0,1578	0,6912	0,8926
12	rs11061839	G	0,3881	0,4286	A	0,5402	0,4624	0,8455
12	rs1029504	A	0,3507	0,3571	G	0,01416	0,9053	0,9724
12	rs1012093	G	0,3308	0,3036	A	0,2679	0,6048	1,134



12	rs12581146	G	0,06716	0,05357	A	0,2467	0,6194	1,272
12	rs11061840	T	0,1679	0,1607	C	0,02958	0,8635	1,054
12	rs12425453	G	0,1082	0,1339	A	0,5104	0,475	0,7847
12	rs7315539	A	0,4291	0,4545	G	0,2052	0,6505	0,902
12	rs10083130	T	0,06343	0,02679	C	2,128	0,1447	2,461
12	rs4766389	C	0,4699	0,4643	T	0,01007	0,9201	1,023
12	rs10848519	T	0,2612	0,2679	C	0,01809	0,893	0,9663
12	rs11061849	T	0,4776	0,5179	C	0,512	0,4743	0,8512
12	rs61630794	A	0,01493	0,02679	G	0,6145	0,4331	0,5505
12	rs1018970	A	0,2015	0,1429	G	1,807	0,1788	1,514
<b>12</b>	<b>rs16928551</b>	<b>A</b>	<b>0,06716</b>	<b>0,008929</b>	<b>G</b>	<b>5,64</b>	<b>0,01756</b>	<b>7,992</b>
12	rs16928559	G	0,02256	0,02679	T	0,06065	0,8055	0,8385
12	rs76833567	G	0,01119	0,03571	A	2,627	0,1051	0,3057
12	rs2107525	C	0,3209	0,3125	T	0,02565	0,8727	1,04
12	rs12825260	G	0,1045	0,09259	A	0,1197	0,7294	1,143
12	rs74750890	A	0,04851	0,01786	G	1,957	0,1618	2,804
12	rs10848523	A	0,3545	0,3571	G	0,00245	0,9605	0,9884
12	rs9804888	T	0,1716	0,1429	C	0,4793	0,4887	1,243
12	rs75008933	T	0,06343	0,05357	G	0,1351	0,7132	1,197
12	rs11830202	A	0,1045	0,0625	G	1,665	0,197	1,75
12	rs11837673	T	0,02985	0,02679	C	0,0264	0,8709	1,118
12	rs7303661	G	0,07463	0,03571	A	2,021	0,1551	2,177
12	rs12311873	A	0,06716	0,03571	G	1,432	0,2314	1,944
12	rs7308793	G	0,1617	0,1429	T	0,2114	0,6457	1,157
12	rs73032603	A	0,04851	0,0625	G	0,3102	0,5776	0,7647
12	rs61912253	A	0,04851	0,0625	G	0,3102	0,5776	0,7647
12	rs4765829	C	0,2015	0,2232	T	0,2263	0,6343	0,8781
12	rs28384795	A	0,04478	0,0625	G	0,5224	0,4698	0,7031
12	rs4766396	A	0,1119	0,1607	G	1,703	0,1919	0,6583
12	rs4765834	G	0,2351	0,2589	T	0,2449	0,6207	0,8796
12	rs4765835	G	0,194	0,1875	T	0,0217	0,8829	1,043
12	rs7138832	C	0,3134	0,3482	A	0,4365	0,5088	0,8545
12	rs12827111	C	0,4888	0,4286	T	1,15	0,2835	1,275
<b>12</b>	<b>rs118117982</b>	<b>T</b>	<b>0,06716</b>	<b>0,008929</b>	<b>C</b>	<b>5,64</b>	<b>0,01756</b>	<b>7,992</b>
12	rs4766399	G	0,3993	0,3929	T	0,0135	0,9075	1,027
12	rs4766400	C	0,2687	0,3214	A	1,081	0,2984	0,7755
12	rs76365491	G	0,02985	0,01786	T	0,4434	0,5055	1,692
12	rs2270033	C	0,3284	0,3393	T	0,04256	0,8366	0,952
12	rs11061887	C	0,02239	0,008929	A	0,7914	0,3737	2,542
12	rs7134091	T	0,306	0,3571	C	0,9489	0,33	0,7935
12	rs117656917	C	0,02239	0,02679	T	0,06606	0,7972	0,8321
12	rs28384808	A	0,01504	0,008929	G	0,2253	0,635	1,695
12	rs2240510	T	0,06767	0,08036	G	0,1913	0,6618	0,8306

12	rs2240512	C	0,1642	0,2143	T	1,35	0,2453	0,7202
12	rs61914791	G	0,003731	0,01786	T	2,012	0,156	0,206
12	rs2010851	C	0,3545	0,4375	A	2,313	0,1283	0,706
12	rs12819505	G	0,0709	0,04464	A	0,9201	0,3375	1,633
12	rs1003939	G	0,2537	0,2411	A	0,06752	0,795	1,07
12	rs4766402	C	0,5037	0,4286	T	1,787	0,1813	1,353
12	rs56814764	G	0,05224	0,09821	A	2,717	0,09931	0,5061
12	rs78101921	A	0,05224	0,02679	G	1,197	0,2738	2,003
12	rs4766403	C	0,3955	0,3125	A	2,333	0,1267	1,44
12	rs10848542	T	0,2388	0,1696	C	2,213	0,1368	1,536
12	rs11061898	C	0,3172	0,3929	T	2,018	0,1554	0,7178
12	rs117363748	A	0,04478	0,08929	G	2,869	0,0903	0,4781
12	rs2058032	A	0,06343	0,08929	G	0,7999	0,3711	0,6908
12	rs11612778	A	0,1455	0,2143	G	2,701	0,1003	0,6245
12	rs7311218	A	0,1604	0,1071	G	1,813	0,1781	1,593
12	rs12821922	G	0,4739	0,4464	A	0,2392	0,6248	1,117
12	rs11061907	T	0,312	0,3393	C	0,269	0,604	0,8832
12	rs78371688	A	0,03731	0,04464	G	0,1119	0,738	0,8295
12	rs35120706	T	0,1866	0,1518	C	0,658	0,4173	1,282
12	rs10848550	G	0,4552	0,4375	A	0,1003	0,7515	1,074
12	rs144797655	C	0,01119	0,01786	T	0,2701	0,6033	0,6226

Όσον αφορά το γονίδιο *WNT5B* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 106 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Στον πίνακα 9 όπου αναγράφονται και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους. Έτσι προκύπτουν 5 SNPs (τα οποία σημειώνονται με έντονο χρώμα στον πίνακα) που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός που έχει κωδικό (**rs7301199**) εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους υγιείς μάρτυρες με ποσοστό εμφάνισης στο 33% και  $p$  οριακά μικρότερο του κατωφλίου της στατιστικής σημαντικότητας διαφοροποίησης ( $p=0.04841$ ). Αφορά αντικατάσταση της βάσης γουανίνη από τη βάση αδενίνη και βρίσκεται σε long non coding RNA, ωστόσο επειδή στην υγιή ομάδα εμφανίζεται με ποσοστό 33% ενώ στο γενικό πληθυσμό μόνο στο 7% θα πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη με αύξηση του δείγματος ασθενών και υγιών. Ο πολυμορφισμός με κωδικό (**rs79734443**) εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό σε ποσοστό 4% καθώς επίσης και στην υγιή ομάδα, εδράζεται σε ρυθμιστική περιοχή και έχει βρεθεί ενεργοποιημένος στα Β-λεμφοκύτταρα ενώ στους ασθενείς εμφανίζεται μόλις με συχνότητα 0.3%. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό (**rs111894978**) εκδηλώνεται με μεγαλύτερη εμφάνιση τον υγιή πληθυσμό παρά στους ασθενείς του δείγματος και εδράζεται σε περιοχή μεταξύ γονιδίων, ωστόσο δεν προκύπτουν περαιτέρω πληροφορίες από την Ensembl. Ο πολυμορφισμός (**rs16928551**) εδράζεται σε ιντρονική περιοχή και πρόκειται για μία αντικατάσταση αδενίνης από γουανίνη, εμφανίζεται μόλις στο 0.8% των υγιών μαρτύρων ενώ στο 3% του γενικού πληθυσμού. Τέλος το SNP (**rs118117982**) πρόκειται για αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη με εμφάνιση στο γενικό πληθυσμό μόλις 1% και στους

ασθενείς του δείγματος μας εμφάνιση με συχνότητα 6%. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εδράζεται σε ιντρονική περιοχή.

## 8. WNT6

Πίνακας 10: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του WNT6

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
2	rs13033409	G	0,4403	0,4643	T	0,1838	0,6681	0,9077
2	rs6436089	G	0,4356	0,4911	A	0,9766	0,323	0,7999
2	rs11677711	G	0,01866	0,01786	T	0,002793	0,9579	1,046
2	rs34252444	G	0,02985	0,03571	T	0,0888	0,7657	0,8308
2	rs41272687	T	0,03731	0,02679	C	0,265	0,6067	1,408
2	rs33985460	A	0,05224	0,05357	G	0,002813	0,9577	0,9738
2	rs76174834	T	0,02612	0,008929	C	1,133	0,2872	2,977
<b>2</b>	<b>rs16859382</b>	<b>C</b>	<b>0,003731</b>	<b>0,02679</b>	<b>T</b>	<b>4,031</b>	<b>0,04468</b>	<b>0,1361</b>
2	rs35658907	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
2	rs78058190	A	0,06343	0,08036	G	0,355	0,5513	0,7751
<b>2</b>	<b>rs6716964</b>	<b>A</b>	<b>0,1007</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>5,942</b>	<b>0,01478</b>	<b>4,071</b>
2	rs2385196	C	0,1343	0,1429	T	0,04864	0,8254	0,931
2	rs13397379	T	0,01866	0,008929	C	0,481	0,488	2,11
2	rs751135	C	0,2235	0,1696	T	1,387	0,239	1,409
<b>2</b>	<b>rs113789188</b>	<b>T</b>	<b>0,08955</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>4,715</b>	<b>0,02991</b>	<b>3,574</b>
2	rs12053317	C	0,2068	0,1339	T	2,771	0,09598	1,686
2	rs13417214	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
2	rs10177996	C	0,2293	0,1518	T	2,893	0,08895	1,663
2	rs11680244	A	0,01119	0,03571	G	2,627	0,1051	0,3057
2	rs7349332	T	0,1119	0,1071	C	0,01849	0,8918	1,05
2	rs114698684	A	0,03358	0,03571	G	0,01087	0,917	0,9382
2	rs77157375	A	0,02239	0,02679	G	0,06606	0,7972	0,8321
2	rs13402354	C	0,06343	0,01786	T	3,454	0,06309	3,725
2	rs11694036	T	0,02612	0,04464	C	0,8862	0,3465	0,5739
2	rs112253950	A	0,02239	0,01786	G	0,07868	0,7791	1,26
2	rs72966085	C	0,04478	0,04464	T	3,28E-05	0,9954	1,003
2	rs36115038	A	0,02239	0,03636	G	0,5914	0,4419	0,6069
2	rs359982	C	0,1119	0,0625	T	2,197	0,1383	1,891
2	rs359980	C	0,09328	0,05357	T	1,663	0,1972	1,818

Όσον αφορά το γονίδιο WNT6 γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 29 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 10 όπου αναγράφονται και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους. Οι σημειακοί

μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που προκύπτουν και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων είναι τρεις, με το **(rs6716964)** να εμφανίζει MAF πάνω από το 10% στην ομάδα των ασθενών και να βρίσκεται σε περιοχή πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό **(rs16859382)** εδράζεται σε ιντρονική περιοχή και εμφανίζεται με συχνότητα 21% στο γενικό πληθυσμό ενώ μόλις στο 2% του υγιούς δείγματος οπότε δεν μπορούμε να εξαγάγουμε αποτέλεσμα και πρέπει να διεξάγουμε την έρευνα σε μεγαλύτερο δείγμα. Τέλος ο πολυμορφισμός **(rs113789188)** εδράζεται σε ιντρονική περιοχή και πρόκειται για αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης από τη βάση θυμίνη και εμφανίζεται στο υγιές δείγμα με ποσοστό 2% ενώ στους ασθενείς εμφανίζεται σε ποσοστό κοντά στο 9%.

## 9. WNT7A

Πίνακας 11: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του WNT7A

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
3	rs7634577	T	0,3993	0,4375	C	0,4775	0,4896	0,8545
3	rs7612896	G	0,1591	0,1727	A	0,1058	0,745	0,9061
3	rs4525847	C	0,2463	0,2411	A	0,01154	0,9144	1,029
3	rs11716601	T	0,2649	0,2589	G	0,01465	0,9037	1,032
3	rs4591488	T	0,2836	0,3125	C	0,3194	0,5719	0,8708
3	rs79240753	C	0,02985	0,02679	T	0,0264	0,8709	1,118
3	rs12630792	C	0,05224	0,02679	T	1,197	0,2738	2,003
3	rs6782697	T	0,2313	0,2589	C	0,33	0,5656	0,8614
3	rs76746614	C	0,05224	0,02679	A	1,197	0,2738	2,003
3	rs729639	T	0,3209	0,3125	C	0,02565	0,8727	1,04
3	rs75933758	A	0,02985	0,01786	G	0,4434	0,5055	1,692
3	rs13079210	A	0,2575	0,2679	G	0,0443	0,8333	0,9477
3	rs78991974	T	0,02985	0,03571	C	0,0888	0,7657	0,8308
3	rs12639016	A	0,02612	0,01786	G	0,2332	0,6292	1,475
3	rs934448	C	0,3134	0,3571	T	0,6865	0,4074	0,8217
3	rs62232724	G	0,04104	0,01786	T	1,285	0,2569	2,354
3	rs4685023	A	0,09328	0,07143	G	0,4758	0,4903	1,337
3	rs11128658	T	0,3195	0,3818	C	1,349	0,2455	0,7603
3	rs73139985	G	0,07836	0,07143	A	0,05381	0,8166	1,105
3	rs12495493	G	0,209	0,2589	A	1,136	0,2865	0,756
3	rs11711324	A	0,04851	0,08036	G	1,469	0,2255	0,5834
3	rs6442412	T	0,4627	0,375	C	2,469	0,1161	1,435
3	rs35816263	T	0,3769	0,3214	G	1,053	0,3048	1,277
3	rs7617314	A	0,403	0,4554	G	0,8903	0,3454	0,8074
3	rs1124479	G	0,297	0,3214	A	0,2223	0,6373	0,8919
3	rs1124480	C	0,4515	0,5268	T	1,796	0,1802	0,7394

3	rs73817628	A	0,03731	0,01786	G	0,9777	0,3228	2,132
3	rs873853	T	0,1418	0,1429	C	0,000736	0,9784	0,9913
3	rs9819358	A	0,09328	0,09821	G	0,02239	0,881	0,9446
3	rs80021098	A	0,05597	0,08036	G	0,7939	0,3729	0,6785
3	rs73019603	A	0,003731	0,008929	G	0,4075	0,5232	0,4157
3	rs9863149	C	0,406	0,3571	T	0,7902	0,374	1,23
3	rs1368576	C	0,3769	0,3839	T	0,01674	0,897	0,9705
3	rs56300905	A	0,3022	0,3125	G	0,03922	0,843	0,9529
3	rs13059544	C	0,3209	0,2946	A	0,2531	0,6149	1,131
3	rs13069140	A	0,0597	0,08036	G	0,5483	0,459	0,7266
3	rs6788472	C	0,3806	0,3393	T	0,5793	0,4466	1,197
3	rs6442416	C	0,3507	0,3393	T	0,04576	0,8306	1,052
3	rs113156257	A	0,01119	0,008929	G	0,03892	0,8436	1,257
3	rs9874847	T	0,2425	0,1875	C	1,366	0,2424	1,388
3	rs66577627	T	0,2425	0,1875	C	1,366	0,2424	1,388
3	rs11128667	T	0,3008	0,3929	C	3,033	0,08158	0,6647
3	rs12498112	C	0,2537	0,2768	A	0,2179	0,6406	0,8884
3	rs13077668	A	0,4366	0,3304	G	3,697	0,05451	1,571

Όσον αφορά το γονίδιο του WNT7A γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 44 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 11. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, δεν προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης.

## 10. WNT7B

Πίνακας 12: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του WNT7B

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
22	rs9614525	T	0,01119	0,01786	C	0,2701	0,6033	0,6226
22	rs11704609	A	0,3806	0,3214	G	1,196	0,2742	1,297
22	rs136033	A	0,1493	0,09091	G	2,313	0,1283	1,754
22	rs9614799	T	0,02239	0,04464	C	1,392	0,2381	0,4901
22	rs56112134	A	0,02239	0,03571	G	0,5475	0,4594	0,6183
22	rs136037	G	0,07836	0,02679	A	3,551	0,05952	3,089
22	rs136042	C	0,06391	0,02679	T	2,168	0,1409	2,481
22	rs116945524	A	0,02239	0,05357	G	2,512	0,113	0,4046
22	rs136051	C	0,0597	0,02679	A	1,802	0,1795	2,307
22	rs112090150	T	0,05597	0,04464	C	0,2033	0,6521	1,269
22	rs74507317	T	0,01119	0,01786	C	0,2701	0,6033	0,6226

22	rs74677197	A	0,04851	0,04464	G	0,02614	0,8716	1,091
22	rs57514815	T	0,1866	0,1339	C	1,544	0,2141	1,483
22	rs28561624	T	0,04851	0,02679	C	0,9241	0,3364	1,852
22	rs112100263	G	0,04887	0,009091	T	3,435	0,06381	5,601
22	rs28601573	C	0,1082	0,125	T	0,2219	0,6376	0,8494
22	rs28587491	A	0,125	0,1818	C	2,061	0,1511	0,6429
22	rs28480017	A	0,3797	0,4554	G	1,876	0,1707	0,7321
22	rs9777732	T	0,03358	0,02727	C	0,101	0,7506	1,239
22	rs10453443	A	0,1082	0,08929	G	0,3071	0,5795	1,238
22	rs73452309	A	0,04851	0,02679	C	0,9241	0,3364	1,852
22	rs9286457	C	0,5	0,5	A	0	1	1
22	rs117551517	T	0,04478	0,05357	C	0,1354	0,7129	0,8281
22	rs76895390	T	0,1045	0,09821	C	0,03365	0,8545	1,071
22	rs28421618	C	0,1418	0,125	T	0,1885	0,6641	1,157
22	rs112963801	T	0,02239	0,02679	C	0,06606	0,7972	0,8321
22	rs113343186	T	0,08209	0,04464	C	1,678	0,1952	1,914
22	rs9286452	G	0,2463	0,2364	A	0,04155	0,8385	1,056
22	rs79233925	T	0,04851	0,04464	C	0,02614	0,8716	1,091
22	rs56398559	T	0,2519	0,2364	C	0,1006	0,7511	1,088
22	rs28755830	C	0,03383	0,03571	T	0,008386	0,927	0,9455
22	rs75832228	T	0,02239	0,02679	C	0,06606	0,7972	0,8321
22	rs184823118	T	0,04478	0,04464	C	3,28E-05	0,9954	1,003
22	rs75662824	C	0,03731	0,08036	T	3,081	0,07921	0,4436
22	rs76104782	A	0,01866	0,02679	C	0,2533	0,6148	0,6907
22	rs9330790	C	0,2985	0,2857	T	0,06219	0,8031	1,064
22	rs56115219	C	0,1866	0,1964	T	0,05002	0,823	0,9383
22	rs10448589	C	0,4067	0,3909	A	0,08106	0,7759	1,068
22	rs10448600	T	0,3835	0,3929	C	0,02937	0,8639	0,9612
22	rs28446149	A	0,003731	0,01786	G	2,012	0,156	0,206
22	rs28668243	A	0,01493	0,03571	G	1,656	0,1981	0,4091
22	rs10448585	C	0,2351	0,2411	T	0,01572	0,9002	0,9675
22	rs10453441	G	0,3694	0,4286	A	1,166	0,2803	0,7811
22	rs9330813	A	0,2276	0,2321	G	0,009186	0,9236	0,9747
22	rs28615830	T	0,07576	0,1091	C	1,103	0,2937	0,6694
22	rs10453460	T	0,3172	0,4018	C	2,513	0,1129	0,6916
22	rs113951080	A	0,2985	0,3482	G	0,9074	0,3408	0,7965
22	rs113108216	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
22	rs35877437	C	0,2985	0,3482	T	0,9074	0,3408	0,7965
<b>22</b>	<b>rs112022355</b>	<b>C</b>	<b>0,01493</b>	<b>0,05357</b>	<b>T</b>	<b>4,604</b>	<b>0,0319</b>	<b>0,2677</b>
22	rs28419158	T	0,04104	0,05357	C	0,29	0,5902	0,7562
22	rs28562363	G	0,306	0,3214	A	0,08816	0,7665	0,9307
22	rs4077498	C	0,3172	0,3304	T	0,06307	0,8017	0,9415
22	rs28685663	C	0,4963	0,4375	T	1,093	0,2958	1,267

22	rs116990915	A	0,01866	0,01786	G	0,002793	0,9579	1,046
22	rs79665205	T	0,02985	0,03571	C	0,0888	0,7657	0,8308
22	rs6519955	T	0,4328	0,4018	G	0,3119	0,5765	1,136
22	rs73175102	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
22	rs78211501	A	0,007463	0,008929	G	0,02167	0,883	0,8346
22	rs9626908	C	0,3358	0,3482	T	0,05411	0,8161	0,9464

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT7B* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 60 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 12. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψε μόνο ένας πολυμορφισμός που να εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης. Πρόκειται για το SNP με κωδικό (**rs112022355**) όπου παρατηρείται αντικατάσταση της βάσης θυμίνης από τη βάση κυτοσίνη με  $p=0.0319$ . Βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή και εμφανίζεται με MAF στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα 2%. Επίσης προέκυψε ότι βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με 11 πολυμορφισμούς οι οποίοι δε φαίνεται να συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου σύμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία.

## 11. *WNT8A*

Πίνακας 13: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT8A*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
5	rs13169864	T	0,2201	0,3571	G	7,695	0,005538	0,5081
5	rs6873072	G	0,1791	0,2589	A	3,115	0,07757	0,6245
5	rs76826760	T	0,01866	0,01786	G	0,002793	0,9579	1,046
5	rs72801664	A	0,04104	0,02727	G	0,4148	0,5196	1,527
5	rs217259	C	0,2201	0,2411	T	0,1975	0,6568	0,8887
5	rs10440755	T	0,09328	0,1964	C	7,753	0,005361	0,4209
5	rs2040862	T	0,1343	0,1696	C	0,7958	0,3724	0,7595
5	rs114987272	T	0,03358	0,01786	C	0,6949	0,4045	1,911
5	rs12332207	A	0,0709	0,02679	G	2,818	0,09323	2,772
5	rs7720650	A	0,1791	0,2589	G	3,115	0,07757	0,6245
5	rs75253033	A	0,03731	0,05357	C	0,5177	0,4718	0,6848
5	rs79921495	C	0,01119	0,02679	A	1,236	0,2663	0,4113
5	rs217272	C	0,1343	0,1161	T	0,2344	0,6283	1,182
5	rs115502334	A	0,02239	0,008929	G	0,7914	0,3737	2,542
5	rs62381764	C	0,02612	0,008929	T	1,133	0,2872	2,977

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT8A* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 15 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψαν δύο

πολυμορφισμοί που να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης. Πρόκειται για το SNP (**rs13169864**) με κωδικό όπου παρατηρείται αντικατάσταση της βάσης γουανίνης από τη βάση θυμίνη και εδράζεται σε ιντρονική θέση επίσης εμφανίζει διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του γενικού πληθυσμού και του υγιούς δείγματος κοντά στο 20% οπότε χρειάζεται μεγαλύτερο δείγμα για να εξάγουμε πιο ασφαλή αποτελέσματα και του SNP (**rs10440755**) με εισαγωγή θυμίνης στη θέση κυτοσίνης και  $p=0.005361$ .

## 12. *WNT8B*

Πίνακας 14: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT8B*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
10	rs10883466	C	0,02985	0,03571	T	0,0888	0,7657	0,8308
10	rs117628976	T	0,04104	0,0625	G	0,8058	0,3694	0,642
10	rs1539089	G	0,2276	0,1786	A	1,133	0,2872	1,356
10	rs118140129	C	0,007463	0,02679	T	2,271	0,1318	0,2732
10	rs10883500	G	0,2276	0,1786	T	1,133	0,2872	1,356
10	rs12268460	G	0,04135	0,03571	A	0,06577	0,7976	1,165
10	rs41290542	T	0,01493	0,01786	C	0,04369	0,8344	0,8333
10	rs2273696	G	0,3396	0,4018	T	1,331	0,2486	0,7655
10	rs2295774	C	0,2239	0,1607	A	1,932	0,1645	1,506
10	rs11190604	G	0,2239	0,1607	A	1,932	0,1645	1,506
10	rs113791644	G	0,2239	0,1607	T	1,932	0,1645	1,506
10	rs78707311	C	0,01894	0,009091	A	0,4771	0,4897	2,104

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT8B* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 12 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς μεταξύ των δύο πληθυσμών, κανένας δε φάνηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες, όπως αναγράφεται και στον πίνακα 14.

## 13. *WNT9A*

Πίνακας 15: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT9A*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
-----	--------	--------------	-------------	----------------	--------------	-------	---	----



1	rs6426481	A	0,1604	0,1786	C	0,1876	0,6649	0,8791
1	rs12565154	A	0,02239	0,05357	G	2,512	0,113	0,4046
1	rs12752947	C	0,4615	0,4833	T	0,07832	0,7796	0,9163
1	rs57935191	T	0,0597	0,08929	C	1,085	0,2977	0,6476
1	rs74140390	C	0,1381	0,1339	T	0,01141	0,9149	1,036
1	rs2000206	A	0,02239	0,008929	C	0,7914	0,3737	2,542
1	rs114434194	A	0,02239	0,008929	G	0,7914	0,3737	2,542
1	rs73104870	C	0,1269	0,1607	T	0,7662	0,3814	0,7588
1	rs4653883	G	0,1119	0,1161	A	0,01343	0,9077	0,9599
1	rs10916239	C	0,3806	0,3839	T	0,003715	0,9514	0,986
1	rs4518905	T	0,1269	0,08929	C	1,09	0,2966	1,482
1	rs34418349	A	0,09701	0,1429	G	1,689	0,1938	0,6446
1	rs12748472	A	0,3433	0,4	G	1,089	0,2967	0,7841
1	rs12040881	C	0,3507	0,4091	T	1,142	0,2853	0,7803
1	rs7529664	T	0,007463	0,008929	C	0,02167	0,883	0,8346
1	rs78590291	C	0,0597	0,04464	T	0,3431	0,5581	1,359
1	rs849903	G	0,459	0,5089	A	0,7912	0,3737	0,8185
1	rs6665129	G	0,08955	0,125	A	1,103	0,2936	0,6885
1	rs849898	C	0,3609	0,3839	T	0,1797	0,6716	0,9062
1	rs6426488	C	0,08582	0,125	T	1,38	0,2402	0,6571
1	rs1636195	A	0,3022	0,3036	G	0,000665	0,9794	0,9937
1	rs708122	T	0,3985	0,4018	G	0,003555	0,9525	0,9864
1	rs6672422	C	0,08209	0,1161	T	1,091	0,2963	0,6811

Ίδια με το προηγούμενο γονίδιο είναι και τα αποτελέσματα που προκύπτουν για το γονίδιο *WNT9A* όπου από τους 23 σημειακούς μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν κανείς δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης του μεταξύ των δύο πληθυσμών.

#### 14. *WNT9B*

Πίνακας 16: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT9B*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
17	rs199515	G	0,1978	0,2182	C	0,2005	0,6543	0,8833
17	rs199513	A	0,1978	0,2143	G	0,1335	0,7148	0,9039
17	rs72628338	G	0,007463	0,008929	T	0,02167	0,883	0,8346
17	rs199501	A	0,218	0,2679	G	1,095	0,2954	0,7622
17	rs2074404	G	0,2201	0,2232	T	0,00431	0,9477	0,9824
17	rs2074405	A	0,194	0,2636	C	2,244	0,1341	0,6724
17	rs11658976	G	0,3459	0,3661	A	0,1411	0,7072	0,9156
17	rs117188157	T	0,0597	0,05357	C	0,05442	0,8155	1,122

17	rs111725813	A	0,01866	0,02679	G	0,2533	0,6148	0,6907
17	rs111769	T	0,4104	0,4018	C	0,02454	0,8755	1,037
17	rs8080199	G	0,06716	0,1161	A	2,522	0,1123	0,5483
17	rs118184955	T	0,003731	0,008929	C	0,4075	0,5232	0,4157
17	rs3851781	C	0,4963	0,4821	T	0,06306	0,8017	1,058
17	rs118086135	A	0,01866	0,02679	G	0,2533	0,6148	0,6907
17	rs16941107	T	0,1642	0,1964	C	0,5724	0,4493	0,8036
17	rs62071979	A	0,04104	0,09091	G	3,696	0,05455	0,428
17	rs9894638	C	0,2164	0,1964	T	0,1899	0,663	1,13
17	rs1373089	C	0,4478	0,3909	T	1,028	0,3107	1,263
17	rs56158829	A	0,1007	0,08929	C	0,118	0,7312	1,143
17	rs58897475	C	0,1429	0,125	T	0,2118	0,6453	1,167
17	rs6504583	G	0,3806	0,4091	A	0,2664	0,6057	0,8876
17	rs60947935	G	0,03008	0,01786	A	0,4568	0,4991	1,705
17	rs59788647	G	0,03759	0,01786	A	0,9988	0,3176	2,148
17	rs79877551	C	0,07836	0,09821	T	0,4038	0,5251	0,7806
17	rs62071992	C	0,04851	0,04464	T	0,02614	0,8716	1,091
17	rs12951527	T	0,02239	0,03571	C	0,5475	0,4594	0,6183
<b>17</b>	<b>rs4968282</b>	<b>G</b>	<b>0,306</b>	<b>0,4464</b>	<b>A</b>	<b>6,874</b>	<b>0,008746</b>	<b>0,5467</b>
17	rs78539656	T	0,04851	0,03571	G	0,3025	0,5823	1,376
17	rs16941186	T	0,04851	0,03571	C	0,3025	0,5823	1,376
<b>17</b>	<b>rs197932</b>	<b>C</b>	<b>0,3657</b>	<b>0,5</b>	<b>T</b>	<b>5,913</b>	<b>0,01503</b>	<b>0,5765</b>
17	rs16941211	C	0,04851	0,03571	T	0,3025	0,5823	1,376
17	rs197943	C	0,06343	0,04464	A	0,5113	0,4746	1,449
17	rs4968247	C	0,2948	0,2545	T	0,622	0,4303	1,224
17	rs77424371	A	0,03358	0,02679	G	0,1193	0,7298	1,263
17	rs12944167	A	0,02612	0,04464	C	0,8862	0,3465	0,5739
17	rs78702317	G	0,05597	0,05357	A	0,008705	0,9257	1,047
17	rs197922	A	0,2948	0,3036	G	0,02924	0,8642	0,9589
17	rs16941306	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
17	rs76198864	G	0,1082	0,09821	A	0,08378	0,7722	1,114
17	rs1052586	T	0,4739	0,4643	C	0,02919	0,8644	1,039
17	rs11079742	T	0,4098	0,4018	C	0,02083	0,8852	1,034
17	rs10491149	A	0,1119	0,09821	C	0,1546	0,6942	1,157

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT9B* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 42 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Ενώ από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψαν οι εξής πολυμορφισμοί που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης. Πρόκειται για τον μονονουκλεοτιδικό σημειακό πολυμορφισμό (**rs4968282**) όπου παρατηρείται αντικατάσταση της βάσης αδενίνης από τη βάση γουανίνη. Πιο αναλυτικά σύμφωνα με την Ensembl πρόκειται για ένα SNP που βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή και εμφανίζει MAF στο γενικό πληθυσμό 8% κάτι που δε συμφωνεί με αυτό της υγιούς ομάδας. Όσον αφορά το SNP (**rs197932**), αντικατάσταση της βάσης θυμίνη από τη βάση

κυτοσίνη η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στον πληθυσμό των υγιών ήταν 50% ενώ στον πληθυσμό των ασθενών υπολογίστηκε περίπου στο 36% και το οποίο βρίσκεται σε μη κωδικοποιούμενη περιοχή ανάμεσα σε δύο γονίδια.

## 15. *WNT10A*

Πίνακας 17: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT10A*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
2	rs13033409	G	0,4403	0,4643	T	0,1838	0,6681	0,9077
2	rs6436089	G	0,4356	0,4911	A	0,9766	0,323	0,7999
2	rs11677711	G	0,01866	0,01786	T	0,002793	0,9579	1,046
2	rs34252444	G	0,02985	0,03571	T	0,0888	0,7657	0,8308
2	rs41272687	T	0,03731	0,02679	C	0,265	0,6067	1,408
2	rs33985460	A	0,05224	0,05357	G	0,002813	0,9577	0,9738
2	rs76174834	T	0,02612	0,008929	C	1,133	0,2872	2,977
<b>2</b>	<b>rs16859382</b>	<b>C</b>	<b>0,003731</b>	<b>0,02679</b>	<b>T</b>	<b>4,031</b>	<b>0,04468</b>	<b>0,1361</b>
2	rs35658907	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
2	rs78058190	A	0,06343	0,08036	G	0,355	0,5513	0,7751
<b>2</b>	<b>rs6716964</b>	<b>A</b>	<b>0,1007</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>5,942</b>	<b>0,01478</b>	<b>4,071</b>
2	rs2385196	C	0,1343	0,1429	T	0,04864	0,8254	0,931
2	rs13397379	T	0,01866	0,008929	C	0,481	0,488	2,11
2	rs751135	C	0,2235	0,1696	T	1,387	0,239	1,409
<b>2</b>	<b>rs113789188</b>	<b>T</b>	<b>0,08955</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>4,715</b>	<b>0,02991</b>	<b>3,574</b>
2	rs12053317	C	0,2068	0,1339	T	2,771	0,09598	1,686
2	rs13417214	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
2	rs10177996	C	0,2293	0,1518	T	2,893	0,08895	1,663
2	rs11680244	A	0,01119	0,03571	G	2,627	0,1051	0,3057
2	rs7349332	T	0,1119	0,1071	C	0,01849	0,8918	1,05
2	rs114698684	A	0,03358	0,03571	G	0,01087	0,917	0,9382
2	rs77157375	A	0,02239	0,02679	G	0,06606	0,7972	0,8321
2	rs13402354	C	0,06343	0,01786	T	3,454	0,06309	3,725
2	rs11694036	T	0,02612	0,04464	C	0,8862	0,3465	0,5739
2	rs112253950	A	0,02239	0,01786	G	0,07868	0,7791	1,26
2	rs72966085	C	0,04478	0,04464	T	3,28E-05	0,9954	1,003
2	rs36115038	A	0,02239	0,03636	G	0,5914	0,4419	0,6069
2	rs359982	C	0,1119	0,0625	T	2,197	0,1383	1,891
2	rs359980	C	0,09328	0,05357	T	1,663	0,1972	1,818
2	rs359965	A	0,02612	0,03571	G	0,2587	0,611	0,7241

Όσον αφορά το γονίδιο του *WNT10A* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 30 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων όπως φαίνονται στον πίνακα 17. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται τα δυο

αλληλόμορφα για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, καθώς και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για τη συχνότητα των αλληλομόρφων του κάθε πολυμορφισμού, τρεις από τους φάνηκαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Ο πρώτος από τους πολυμορφισμούς, με κωδικό (**rs16859382**) εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα 21% ενώ στους υγιείς του δείγματος με συχνότητα 2%, οπότε δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα. Ο δεύτερος με κωδικό (**rs6716964**) (C->A) και  $p=0,01478$ , και ο τρίτος με κωδικό (**rs113789188**) ο οποίος αφορά αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνης από τη βάση θυμίνη και εμφανίζεται στους ασθενείς με συχνότητα μόλις 8% και εδράζεται σε ιντρονική περιοχή.

## 16. WNT10B

Πίνακας 18: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του WNT10B

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
12	rs76108232	G	0,05224	0,03571	A	0,478	0,4893	1,488
12	rs2926806	A	0,4888	0,4911	G	0,001622	0,9679	0,991
12	rs833480	G	0,2388	0,1964	A	0,8101	0,3681	1,283
12	rs3825184	C	0,4851	0,4554	T	0,2797	0,5969	1,127
12	rs78877829	T	0,05224	0,03571	C	0,478	0,4893	1,488
12	rs4760600	G	0,3619	0,3929	A	0,3235	0,5695	0,8767
12	rs117927481	A	0,01493	0,008929	G	0,2188	0,64	1,682
12	rs41291977	G	0,04478	0,02679	T	0,6743	0,4116	1,703
12	rs79640667	C	0,05224	0,05357	T	0,002813	0,9577	0,9738
12	rs116932687	T	0,02239	0,008929	C	0,7914	0,3737	2,542
12	rs117686149	T	0,03731	0,04464	C	0,1119	0,738	0,8295
<b>12</b>	<b>rs118115924</b>	<b>T</b>	<b>0,003731</b>	<b>0,04464</b>	<b>G</b>	<b>8,508</b>	<b>0,003537</b>	<b>0,08015</b>
12	rs76573653	G	0,02985	0,008929	T	1,495	0,2214	3,415
12	rs7311091	T	0,08209	0,08036	C	0,003164	0,9551	1,023
12	rs10783298	G	0,06343	0,09821	A	1,4	0,2367	0,6219
12	rs10658818	A	0,3172	0,3661	G	0,8525	0,3559	0,8043
12	rs1054442	G	0,3582	0,4464	T	2,598	0,107	0,6921
12	rs74891052	A	0,04478	0,01786	G	1,613	0,2041	2,578
12	rs10875912	C	0,3134	0,3661	T	0,9915	0,3194	0,7906
12	rs11168830	A	0,02632	0,04464	G	0,8612	0,3534	0,5784
12	rs80132640	G	0,04478	0,01786	A	1,613	0,2041	2,578
12	rs56026363	A	0,02985	0,04464	G	0,5231	0,4695	0,6585
12	rs55865069	T	0,04478	0,01786	C	1,613	0,2041	2,578

Στην περίπτωση του γονιδίου WNT10B γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 23 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη

δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψε ο πολυμορφισμός με κωδικό (**rs118115924**) που εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης ( $p=0,003537$ ). Ωστόσο παρουσιάζει πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης και στις δύο ομάδες που μελετήθηκαν καθώς και στο γενικό πληθυσμό όπου εμφανίζεται με συχνότητα μικρότερη του 1%.

## 17. WNT11

Πίνακας 19: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του WNT11

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
11	rs77249863	G	0,04478	0,0625	A	0,5224	0,4698	0,7031
11	rs7952260	C	0,02239	0,04464	T	1,392	0,2381	0,4901
11	rs7109579	G	0,02239	0,04464	A	1,392	0,2381	0,4901
11	rs11825311	G	0,02239	0,04464	T	1,392	0,2381	0,4901
11	rs7928420	T	0,03358	0,02679	C	0,1193	0,7298	1,263
11	rs7946584	G	0,02256	0,04464	T	1,361	0,2434	0,4938
11	rs59400584	A	0,02239	0,04464	G	1,392	0,2381	0,4901
11	rs73500020	T	0,04478	0,03571	G	0,1608	0,6884	1,266
11	rs57208533	G	0,02239	0,04464	A	1,392	0,2381	0,4901
11	rs7120205	A	0,07463	0,08929	G	0,2334	0,629	0,8226
11	rs2851570	T	0,09328	0,07143	C	0,4758	0,4903	1,337
11	rs605771	T	0,4552	0,3929	G	1,249	0,2638	1,291
11	rs7113747	G	0,02612	0,01786	A	0,2332	0,6292	1,475
11	rs7117041	C	0,02612	0,01786	T	0,2332	0,6292	1,475
11	rs4477460	A	0,09328	0,07143	G	0,4758	0,4903	1,337
11	rs4945036	A	0,3881	0,3125	G	1,944	0,1632	1,395
11	rs113704753	A	0,3872	0,3036	G	2,386	0,1224	1,45
11	rs11820956	G	0,4586	0,5714	A	4,011	0,0452	0,6354
11	rs7934078	G	0,4211	0,3393	A	2,202	0,1379	1,416
11	rs7945646	G	0,4962	0,4018	A	2,824	0,09286	1,467
11	rs626207	A	0,4699	0,4182	G	0,8403	0,3593	1,233
11	rs582132	A	0,01493	0,03571	G	1,656	0,1981	0,4091
11	rs75130836	C	0,003731	0,008929	T	0,4075	0,5232	0,4157
11	rs11236644	A	0,3396	0,2857	C	1,046	0,3065	1,285
11	rs17749202	C	0,3409	0,2545	T	2,682	0,1015	1,515
11	rs882151	T	0,1978	0,1545	C	0,9653	0,3259	1,349
11	rs4944092	G	0,2985	0,2589	A	0,6049	0,4367	1,218
11	rs12222797	T	0,2218	0,2589	C	0,6082	0,4355	0,8158
11	rs689095	G	0,3209	0,3125	A	0,02565	0,8727	1,04
11	rs663907	T	0,05224	0,08036	C	1,098	0,2946	0,6308

11	rs652673	G	0,2052	0,2143	A	0,03939	0,8427	0,9468
11	rs56098622	T	0,007463	0,008929	C	0,02167	0,883	0,8346
11	rs1215071	A	0,3097	0,2909	G	0,1301	0,7183	1,094
11	rs7103530	C	0,3358	0,375	A	0,5348	0,4646	0,8427
11	rs593241	T	0,06015	0,08036	C	0,521	0,4704	0,7324
11	rs649196	C	0,3881	0,4286	T	0,5402	0,4624	0,8455
<b>11</b>	<b>rs684065</b>	<b>G</b>	<b>0,2687</b>	<b>0,4455</b>	<b>T</b>	<b>11,2</b>	<b>0,000818</b>	<b>0,4573</b>
11	rs619564	T	0,1082	0,07143	C	1,216	0,2702	1,577
11	rs4944098	T	0,1767	0,1518	G	0,3476	0,5555	1,199
11	rs12807555	T	0,1381	0,2232	G	4,195	0,04054	0,5574
11	rs77200546	A	0,007463	0,01786	C	0,8194	0,3654	0,4135
11	rs17448977	C	0,05597	0,08036	T	0,7939	0,3729	0,6785
<b>11</b>	<b>rs2371933</b>	<b>A</b>	<b>0,4248</b>	<b>0,25</b>	<b>G</b>	<b>10,3</b>	<b>0,001332</b>	<b>2,216</b>
<b>11</b>	<b>rs4945061</b>	<b>A</b>	<b>0,4511</b>	<b>0,5625</b>	<b>G</b>	<b>3,914</b>	<b>0,04788</b>	<b>0,6393</b>
11	rs12801806	T	0,03731	0,04464	C	0,1119	0,738	0,8295
11	rs76282174	T	0,003731	0,008929	C	0,4075	0,5232	0,4157
11	rs2851161	A	0,2649	0,3571	C	3,249	0,07149	0,6487
11	rs4944101	G	0,3022	0,3839	A	2,398	0,1215	0,6951
11	rs78484856	A	0,01866	0,01786	G	0,002793	0,9579	1,046
<b>11</b>	<b>rs747925</b>	<b>C</b>	<b>0,3722</b>	<b>0,4911</b>	<b>T</b>	<b>4,614</b>	<b>0,0317</b>	<b>0,6144</b>
<b>11</b>	<b>rs2097118</b>	<b>C</b>	<b>0,194</b>	<b>0,3393</b>	<b>A</b>	<b>9,221</b>	<b>0,002393</b>	<b>0,4688</b>

Στην περίπτωση του γονιδίου *WNT11* γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν 51 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψαν οι εξής πολυμορφισμοί οι οποίοι εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης. Πρόκειται για το SNP (**rs684065**) όπου παρατηρείται αντικατάσταση της βάσης θυμίνης από τη βάση γουανίνη. Επίσης προέκυψαν οι πολυμορφισμοί (**rs2371933**), (**rs4945061**), (**rs747925**) και (**rs2097118**). Το πρώτο SNP βρίσκεται σε μη κωδικοποιητική θέση μεταξύ γονιδίων ενώ δεν υπάρχουν πληροφορίες στην Ensembl για το εάν βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλα SNPs. Ίδιες είναι οι πληροφορίες και για τους πολυμορφισμούς (**rs2371933**), (**rs747925**) και (**rs2097118**). Ο πολυμορφισμός (**rs747925**) όπου παρατηρείται αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη και εμφανίζεται κυρίως στην υγιή ομάδα του δείγματος με MAF=0.49, βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με πολυμορφισμούς που βρίσκονται μεταξύ γονιδίων με ένα SNP να βρίσκεται σε ρυθμιστική περιοχή, ενεργό μεταξύ άλλων σε T- και B-λεμφοκύτταρα (**rs4944102**). Τέλος ο πολυμορφισμός με κωδικό (**rs4945061**) εδράζεται σε ρυθμιστική περιοχή ενώ η συχνότητα εμφάνισης του στο γενικό πληθυσμό σε σχέση με τους υγιείς της μελέτης εμφανίζει μια απόκλιση κοντά στο 10%.

## 18. *WNT16*

Πίνακας 20: Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WNT16*

CHR	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
7	rs74384357	A	0,04851	0,05357	G	0,04264	0,8364	0,9007
7	rs73217364	G	0,02256	0,02679	A	0,06065	0,8055	0,8385
7	rs12706333	T	0,4432	0,5179	C	1,763	0,1843	0,741
7	rs62621839	A	0,01866	0,008929	G	0,481	0,488	2,11
7	rs4609139	T	0,3939	0,4286	A	0,3916	0,5314	0,8667
7	rs79831918	A	0,003731	0,008929	G	0,4075	0,5232	0,4157
7	rs798918	G	0,04478	0,08036	A	1,915	0,1664	0,5365
7	rs2536149	T	0,1567	0,1786	C	0,2763	0,5991	0,8549
7	rs798905	G	0,2276	0,2857	A	1,443	0,2297	0,7367
7	rs798901	G	0,4664	0,4107	A	0,9903	0,3197	1,254
7	rs10241888	A	0,3694	0,4554	G	2,443	0,1181	0,7007
7	rs62476332	T	0,01493	0,008929	C	0,2188	0,64	1,682
7	rs10231005	A	0,3797	0,4643	C	2,341	0,126	0,7063
7	rs73438293	A	0,01866	0,01786	G	0,002793	0,9579	1,046
7	rs2908007	C	0,4366	0,5089	T	1,666	0,1968	0,7476
7	rs2908006	A	0,06343	0,07143	G	0,08216	0,7744	0,8805
7	rs17143281	T	0,04104	0,04464	C	0,02535	0,8735	0,916
7	rs4727920	G	0,007519	0,008929	A	0,01989	0,8878	0,8409
7	rs3779381	C	0,2425	0,3036	T	1,527	0,2165	0,7346
7	rs62476343	C	0,02612	0,04464	T	0,8862	0,3465	0,5739
7	rs2908004	T	0,444	0,5	C	0,9835	0,3213	0,7987
7	rs3801387	C	0,2575	0,3214	T	1,616	0,2036	0,732
7	rs2707466	A	0,4478	0,4911	G	0,5964	0,44	0,8403
7	rs117154265	C	0,01866	0,03571	T	0,9939	0,3188	0,5133
7	rs2240982	C	0,02239	0,01786	T	0,07868	0,7791	1,26
7	rs917727	A	0,25	0,3214	G	2,04	0,1532	0,7037
7	rs62476349	G	0,02239	0,04464	A	1,392	0,2381	0,4901
7	rs7776725	C	0,2463	0,3214	T	2,272	0,1317	0,6898
7	rs13240092	A	0,03731	0,008929	G	2,264	0,1324	4,302
7	rs62476354	T	0,02239	0,02679	C	0,06606	0,7972	0,8321
<b>7</b>	<b>rs2950815</b>	<b>A</b>	<b>0,2276</b>	<b>0,1339</b>	<b>G</b>	<b>4,333</b>	<b>0,03738</b>	<b>1,906</b>
7	rs2697180	G	0,02239	0,02679	T	0,06606	0,7972	0,8321
7	rs6950058	G	0,02239	0,02679	A	0,06606	0,7972	0,8321
7	rs6974427	C	0,02239	0,02679	T	0,06606	0,7972	0,8321
7	rs11974013	T	0,02239	0,02679	G	0,06606	0,7972	0,8321

Τέλος όσον αφορά το γονίδιο *WNT16* από τους 35 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που γονοτυπήθηκαν συνολικά και αναλύθηκαν και από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  κατά Pearson για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς, προέκυψε μόνο πολυμορφισμός που εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων του ανάμεσα στους δυο πληθυσμούς μελέτης με κωδικό (**rs2950815**) και  $p=0,03738$ . Η συχνότητα με την οποία εμφανίζεται στην υγιή ομάδα είναι

13% ενώ στους ασθενείς αγγίζει το 23%. Η θέση στην οποία βρίσκεται είναι μη κωδικοποιούμενη μεταξύ δύο γονιδίων και ο ρόλος του δεν είναι γνωστός.

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί μια από τις πιο πολύπλοκες συστηματικές αυτοάνοσες νόσους. Χαρακτηρίζεται από επιπλοκές στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και του αγγειακού οι οποίες προκαλούν ίνωση τόσο στο δέρμα όσο και σε εσωτερικά όργανα όπως οι πνεύμονες και οι νεφροί οδηγώντας σε θάνατο των ασθενών (Varga et al). Η ετερογένεια στην εκδήλωση της νόσου μεταξύ των ασθενών αποτελεί απόρροια της αλληλεπίδρασης μεταξύ πολλών διαφορετικών γονιδίων καθώς και περιβαλλοντικών παραγόντων που πυροδοτούν και συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας, με το γυναικείο φύλο να είναι πιο επιρρεπές στην εκδήλωση της νόσου. Η οικογένεια των γονιδίων *WNT* φαίνεται να συσχετίζεται με τη συστηματική σκλήρυνση και κυρίως η δυσλειτουργία του κανονικού Wnt σηματοδοτικού μονοπατιού, καθώς έχει αποδειχτεί πως η ανεξέλεγκτη και έκτοπος ενεργοποίηση του μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης, η οποία μεταναστεύει στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση άλλων σηματοδοτικών γονιδίων που οδηγούν σε διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων σε ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες και τελικά σε ίνωση.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια της οικογενείας WNT. Οι πολυμορφισμοί αυτοί γονοτυπήθηκαν με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina και αναλύθηκαν με τη χρήση εφαρμογών βιοπληροφορικής Plink. Η στατιστική ανάλυση περιελάμβανε την πραγματοποίηση ανάλυσης συσχέτισης πολυμορφισμών μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων σε ελληνικό πληθυσμό με



στόχο την ανάδειξη διαφοροποιήσεων στις συχνότητες εμφάνισης πολυμορφισμών στις δύο ομάδες.

Από την ανάλυση 134 ασθενών και 56 υγιών μαρτύρων φάνηκε ότι συνολικά οι συχνότητες εμφάνισης 19 σημειακών πολυμορφισμών σε 11 από τους 19 γενετικούς τόπους που εξετάστηκαν διαφοροποιούνταν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς. Ωστόσο βρέθηκαν και επιπλέον πολυμορφισμοί οι οποίοι εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.05$ ) και  $MAF > 0.01$  αλλά δεν εμφανίζονται με παραπλήσια συχνότητα στο γενικό πληθυσμό βάσει της Ensembl σε σχέση με το δείγμα, συνεπώς δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη ως σημαντικοί πολυμορφισμοί καθώς δεν προκύπτουν αξιόπιστα συμπεράσματα, δεδομένου του περιορισμένου δείγματος της μελέτης. Επιπλέον πολυμορφισμοί που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα κοντά στο 50% δε λαμβάνονται υπόψη καθώς είναι πολύ συχνοί. Τέλος δε φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, στην παρούσα μελέτη, πολυμορφισμοί που βρίσκονται σε μη κωδικές θέσεις μεταξύ γονιδίων και δεν βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλους πολυμορφισμούς που να παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη συστηματική σκλήρυνση. Είναι επομένως απαραίτητη η χρήση μεγαλύτερου δείγματος τόσο ασθενών με συστηματική σκλήρυνση όσο και υγιών μαρτύρων για την διασαφήνιση αυτών των ευρημάτων.

Οι 19 πολυμορφισμοί αυτοί παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 21 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την ανάλυση ασθενών/υγιών μαρτύρων**

GENE	SNP id	Minor Allele	MAF (cases)	MAF (controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
<b>WNT1</b>	rs118115924	T	0,003731	0,04464	G	8,508	0,003537	0,08015
<b>WNT2</b>	<b>rs4727847</b>	<b>T</b>	<b>0,5037</b>	<b>0,3839</b>	<b>G</b>	<b>4,553</b>	<b>0,03286</b>	<b>1,629</b>
<b>WNT2B</b>	rs351354	T	0,2331	0,1161	C	6,785	0,009193	2,314
<b>WNT3</b>	rs4968282	G	0,306	0,4464	A	6,874	0,008746	0,008746
<b>WNT4</b>	rs17360053	C	0,2687	0,375	T	4,254	0,03916	0,6122
	rs17356059	T	0,2649	0,3661	C	3,888	0,04864	0,6241
	rs1033455	A	0,4851	0,375	G	3,863	0,04936	1,57

<b>WNT5A</b>	rs73073456	G	0,007463	0,03636	A	4,17	0,04114	0,1992
<b>WNT5B</b>	rs7301199	A	0,2406	0,3393	G	3,896	0,04841	0,617
	rs79734443	T	0,003731	0,04464	C	8,508	0,003537	0,08015
	rs111894978	A	0,03358	0,08929	G	5,16	0,02311	0,3544
	rs16928551	A	0,06716	0,008929	G	5,64	0,01756	7,992
<b>WNT6</b>	<b>rs6716964</b>	<b>A</b>	<b>0,1007</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>5,942</b>	<b>0,01478</b>	<b>4,071</b>
	rs16859382	C	0,003731	0,02679	T	4,031	0,04468	0,1361
	rs113789188	T	0,08955	0,02679	C	4,715	0,02991	3,574
<b>WNT7B</b>	rs112022355	C	0,01493	0,05357	T	4,604	0,0319	0,2677
<b>WNT8A</b>	rs13169864	T	0,2201	0,3571	G	7,695	0,005538	0,5081
	rs10440755	T	0,09328	0,1964	C	7,753	0,005361	0,4209
<b>WNT9B</b>	rs4968282	G	0,306	0,4464	A	6,874	0,008746	0,5467
	rs197932	C	0,3657	0,5	T	5,913	0,01503	0,5765
<b>WNT10A</b>	<b>rs6716964</b>	<b>A</b>	<b>0,1007</b>	<b>0,02679</b>	<b>C</b>	<b>5,942</b>	<b>0,01478</b>	<b>4,071</b>
	rs113789188	C	0,08955	0,02679	C	4,715	0,02991	3,574
<b>WNT10B</b>	rs118115924	T	0,003731	0,04464	G	8,508	0,003537	0,08015
<b>WNT11</b>	rs684065	G	0,2687	0,4455	T	11,2	0,000818	0,4573
	rs2371933	A	0,4248	0,25	G	10,3	0,001332	2,216
	rs4945061	A	0,4511	0,5625	G	3,914	0,04788	0,6393
	rs747925	C	0,3722	0,4911	T	4,614	0,0317	0,6144
	rs2097118	C	0,194	0,3393	A	9,221	0,002393	0,4688
<b>WNT16</b>	rs2950815	A	0,2276	0,1339	G	4,333	0,03738	1,906

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν βρίσκονται κυρίως σε θέσεις μεταξύ γονιδίων ή σε ιντρονικές περιοχές, η συχνότητα εμφάνισης μεταξύ γενικού πληθυσμού και υγιών ατόμων του δείγματος διαφέρει σε μεγάλο βαθμό ενώ βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με πολυμορφισμούς που από τις έως τώρα μελέτες δεν έχουν φανεί να σχετίζονται με τη νόσο. Από αυτούς τους πολυμορφισμούς ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός με κωδικό **(rs4727847)** ο οποίος στους ασθενείς εμφανίζεται με συχνότητα 50% και έχει συσχετιστεί σε προηγούμενες μελέτες ολικού γονιδιώματος με την εκδήλωση αυτισμού και σχιζοφρένειας. Συγκεκριμένα πρόκειται για αντικατάσταση της γουανίνης από θυμίνη και σύμφωνα με την Ensembl εδράζεται σε ιντρονική περιοχή ενώ εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό σε ποσοστό 40%. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πολυμορφισμός **(rs6716964)** ο οποίος βρίσκεται σε θέση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων ανοδικά των γονιδίων *WNT6* και *WNT10A* και φαίνεται ότι η παρουσία του επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα σε μυοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, σύμφωνα με την Ensembl. Ο παραπάνω πολυμορφισμός εμφανίζεται στους ασθενείς του δείγματος με ποσοστό 10% οπότε θα άξιζε να διερευνηθεί η επίπτωση του στην έκφραση σε κύτταρα από ασθενείς αλλά και υγιείς μάρτυρες. Από τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας δεν επιβεβαιώθηκαν ευρήματα από προηγούμενες έρευνες που προαναφέρθηκαν και αφορούν τη συμμετοχή συγκεκριμένων γονιδίων της οικογενείας Wnt, όπως του *WNT1*, *WNT7A*, *WNT7B* και του *WNT10B*, καθώς στα δείγματα που αναλύθηκαν οι εν λόγω πολυμορφισμοί δε βρέθηκαν να εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο η έως τώρα βιβλιογραφία έχει δείξει ότι το γονίδιο *WNT10A* έχει προ-ινωτικό ρόλο στην ανάπτυξη ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης το οποίο από τη μελέτη μας μπορεί να θεωρηθεί ότι ενδεχομένως σχετίζεται με τη νόσο.

Γενικά είναι απαραίτητο να ακολουθήσει περαιτέρω ανάλυση αυτών των πολυμορφισμών καθώς και του ρόλου που μπορεί να έχουν στην έκφραση των γονιδίων όσων βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές ή σε περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Επίσης όσον αφορά τους πολυμορφισμούς που εδράζονται σε ιντρονικές περιοχές πρέπει να ερευνηθεί εάν εμπλέκονται σε διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος ή στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μικρών RNAs. Στην περίπτωση των SNPs που βρίσκονται σε μη κωδικές περιοχές μεταξύ γονιδίων πρέπει να εξεταστεί η τυχών συν-κληρονόμηση με άλλους πολυμορφισμούς οι οποίοι συμμετέχουν στην εκδήλωση της νόσου καθώς και το ενδεχόμενο να αποτελούν δείκτες για άλλους πολυμορφισμούς με τους οποίους βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης.

Συμπερασματικά βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αρκετά από τα γονίδια της οικογενείας Wnt φαίνεται πως αποτελούν καλούς υποψηφίους στόχους για επιπλέον έρευνα, με σκοπό την διασαφήνιση της δράσης τους μέσω της συμμετοχής τους στο κανονικό Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι. Παράλληλα θα πρέπει να μελετηθούν επιπλέον γονίδια που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό όπως υποδοχείς των WNT, αναστολείς κ.α. Προκειμένου να ενισχυθεί η αξιοπιστία και η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, απαιτείται συνέχιση της έρευνας με χρήση περισσότερων δειγμάτων από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, απαιτείται διεύρυνση της έρευνας σε μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών, εκτός των αλληλουχιών των 19 γενετικών τόπων του *WNT*, όπως για παράδειγμα πολυμορφισμούς σε μη κωδικές και ρυθμιστικές περιοχές καθώς και πολυμορφισμούς σε περιοχές σχετικές με ρύθμιση μέσω μικρών μορίων RNA, τα οποία έχει ήδη δειχθεί πως εμπλέκονται στη παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Allanore, Y., Simms, R., Distler, O., Trojanowska, M., Pope, J., Denton, C. P., & Varga, J. Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*,1 (2015).
2. Yannick Allanore, Philippe Dieude and Catherine Boileau, 'Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage' *RHEUMATOLOGY*, 2010
3. Gloria Salazar, MD and Maureen D. Mayes, 'Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis' HHS Public Access, 2015
4. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6(JUN). doi:10.3389/fimmu.2015.00272
5. Varga J, Abraham D. 'Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder'. *J Clin Invest* (2015) 117:557–67.10.1172/JCI31139
6. Christina Bergmann and Jörg HW Distler, Canonical Wnt signaling in systemic sclerosis, *Laboratory Investigation* (2016) 96, 151–155
7. Jun Wei, PhD1, Feng Fang, PhD1, Anna P. Lam, MD2, Jennifer L. Sargent, PhD3, Emily Hamburg, PhD candidate4, Monique E. Hinchcliff, MD1, Cara J. Gottardi, PhD2, Radhika Atit, PhD4, Michael L. Whitfield, PhD3, and John Varga, MD1,\* , Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells, *Arthritis Rheum* . 2012 August ; 64(8): 2734–2745
8. Frank J. T. Staal, Tiago C. Luis and Machteld M. Tiemessen, WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings, *NATurE rEViEWS | immunology, voLuME 8 | AuGuST 2008*
9. Karl Willert<sup>1</sup> and Roel Nusse<sup>2</sup>, Wnt Proteins, Cite this article as *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012
10. Jun Wei, Denisa Melichian, Kazuhiro Komura, Monique Hinchcliff, Anna P. Lam, Robert Lafyatis, Cara J. Gottardi, Ormond A. MacDougald, and John Varga, 'Canonical Wnt Signaling Induces Skin Fibrosis and Subcutaneous Lipatrophy', *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 63, No. 6, June 2011, pp 1707–1717
11. Lina Badimon and Maria Borrell-Pages, 'Wnt signaling in the vessel wall', Vol. 24 No. 3, May 2017
12. Maurer, B. et al. 'MicroRNA 29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis'. *Arthritis Rheum*. 62, 1733–1743 (2010).
13. H, Li Y, Qu S, Luo H, Zhou Y, Wang Y, et al. 'MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma' *J Clin Immunol*. 2012;32:514–22Z
14. Wang Z, Jinnin M, Nakamura K, Harada M, Kudo H, Nakayama W, et al. Long non-coding RNA TSIX is upregulated in scleroderma dermal fibroblasts and controls collagen mRNA stabilization. *Exp Dermatol*. 2016;25:131–6.
15. Bryan T. MacDonald, Keiko Tamai, and Xi He, 'Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases', *Dev Cell*. 2009 July ; 17(1): 9–26.
16. Frank J. T. Staal, Tiago C. Luis and Machteld M. Tiemessen, 'WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings', *Nature Reviews* (2018)

17. Karl Willert and Roel Nusse, 'Wnt Proteins', Cold Spring Harb Perspect Biol (2012)
18. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. 'Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease'. Clin Rev Allergy Immunol. 2012;42(1):102-111. doi:10.1007/s12016-011-8294-7
19. Sara M. Garret, DeAnna Baker Frost, and Carol Feghali-Bostwick 'The mighty fibroblast and its utility in scleroderma research', HHS Public Access 2017
20. Pearce SH, Merriman TR. 'Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity'. Trends Mol Med 2006;12:90-8
21. Dieudé, P. et al. 'BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4', Arthritis Rheum. 60, 3447–3454 (2009)
22. Jacqueline Frost & Xavier Estivill & Michèle Ramsay & Mohammed Tikly, 'Dysregulation of the Wnt signaling pathway in South African patients with diffuse systemic sclerosis', Clinical Rheumatology (2018)
23. Alfiya Akhmetshina, Katrin Palumbo, Clara Dees, Christina Bergmann, Paulius Venalis, Pawel Zerr, Angelika Horn, Trayana Kireva, Christian Beyer, Jochen Zwerina, Holm schneider, Anika sadowski, marc-oliver Riener, ormond A. macDougald, oliver Distler, Georg schett & Jörg H.W. Distler, 'Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis', nATuRE COMMUNICATIONS (2012)
24. Allanore, Y. et al. 'Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis', PLoS Genet. 7, e1002091 (2011).
25. Gorlova O, Martin JE, Rueda B, et al. 'Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genomewide association strategy', PLoS Genet 2011;7:e1002178
26. Clara Dees, Inga Schlottmann, Robin Funke, Alfiya Distler, Katrin Palumbo-Zerr, Pawel Zerr, Neng-Yu Lin, Christian Beyer, Oliver Distler, Georg Schett, Jörg H W Distler 'The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis', Rheum Dis 2014;73:1232–1239. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203194
27. Jacqueline Frost & Xavier Estivill & Michèle Ramsay & Mohammed Tikly, 'Dysregulation of the Wnt signaling pathway in South African patients with diffuse systemic sclerosis', Clinical Rheumatology (2018)