



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«Ο ρόλος της Wnt σηματοδότησης στη παθοφυσιολογία της  
συστηματικής σκλήρυνσης»**

***“The importance of the Wnt signaling pathway in the  
pathophysiology of systemic sclerosis”***

**Αναγνωστοπούλου Κορνηλία**

**Λάρισα 2019**

**Τριμελής επιτροπή :**

- **Ζήσης Μαμούρης (επιβλέπων) : Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**
  
- **Θεολογία Σαραφίδου : 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 μια σπάνια αυτοάνοση ασθένεια του συνδετικού ιστού. Χαρακτηρίζεται από ίνωση και φλεγμονή του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων. Ως πολυπαραγοντικό νόσημα εκδηλώνεται σε άτομα με επιπρεπτικό γενετικό υπόβαθρο κάτω από κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το μονοπάτι WNT είναι ένα καλά συντηρημένο αναπτυξιακό μονοπάτι σηματοδότησης, το οποίο επιπλέον εμπλέκεται σε μια πληθώρα διεργασιών με στόχο την διατήρηση της ομοιόστασης των ενήλικων ιστών, όπως η ανοσολογική απόκριση αλλά και η ανάπτυξη της ίνωσης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης ενός μεγάλου αριθμού σημειακών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε γενετικούς τόπους σχετικούς με το μονοπάτι σηματοδότησης WNT, σε 134 ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση και σε 56 υγιείς μάρτυρες με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

## **ABSTRACT**

Systemic sclerosis is a rare autoimmune disease of the connective tissue, which affects the skin and internal organs of the patients. The key features of the disease are fibrosis and inflammation of the skin, of the blood vessels and other internal organs. Being a multifactorial disease, it occurs in genetically susceptible individuals, after their exposure to specific environmental triggers. Genetic studies to date have found various mutations in the genome that seem to contribute to the expression of the disease. The WNT pathway is an evolutionarily conserved developmental pathway that is also involved in a number of other processes aiming to the maintenance of adult tissue homeostasis, such as immunologic response and fibrosis. In the present bachelor thesis, a SNP association study was performed on a large number of SNPs located on various genetic loci associated with WNT pathway, on 134 systemic sclerosis patients and 56 healthy controls, utilizing bioinformatics tools.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

- 1.1 Συστηματική σκλήρυνση- Γενικά στοιχεία της νόσου
- 1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου
- 1.3 Επιδημιολογία της νόσου
- 1.4 Παθοφυσιολογία της νόσου
- 1.5 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου
- 1.6 Τύποι γενετικών μελετών
- 1.7 Wnt σηματοδότηση- Γενικά στοιχεία
- 1.8 Ο ρόλος του μονοπατιού Wnt στη συστηματική σκλήρυνση
- 1.9 Πολυμορφισμοί υπό μελέτη
- 1.10 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας

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

- 2.1 Συλλογή δειγμάτων
- 2.2 Απομόνωση του DNA
- 2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- 2.4 Γονοτύπηση
- 2.5 Ποιοτική ανάλυση δεδομένων
- 2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

- 3.1 Απομόνωση του DNA
- 3.2 Γονοτύπηση
- 3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων
- 3.4 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## **1.Εισαγωγή**

### **1.1 Συστηματική σκλήρυνση- Γενικά στοιχεία της νόσου**

Η συστηματική σκλήρυνση (SSc, συστηματικό σκληρόδερμα) είναι ένα σπάνιο αυτοάνοσο νόσημα του συνδετικού ιστού που χαρακτηρίζεται από μικροαγγειακές βλάβες, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και γενική ίνωση σε δέρμα και εσωτερικά όργανα. Η νόσος εμφανίζει ποικιλία φαινοτύπων από ασθενή σε ασθενή, ενώ οι παθολογικές αλλοιώσεις σε όργανα καθορίζουν το κλινικό αποτέλεσμα. Θεωρείται πως προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες σε άτομα που φέρουν γενετική προδιάθεση εμφάνισης της νόσου. Αν και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το περιβαλλοντικό ερέθισμα που προκαλεί τη νόσο, κάποιοι ιοί έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της, και πιο συγκεκριμένα η προσβολή από ιούς όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) και ο ιός Epstein-Barr (EBV). Όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο, υπάρχουν υποθέσεις για τον ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT στην νόσο. Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι WNT ελέγχει ποικίλες αναπτυξιακές διαδικασίες και τη διατήρηση της ομοιόστασης των ενήλικων ιστών, με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών του μονοπατιού να προκαλεί ίνωση. (Varga et al)

### **1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου**

Κύρια χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν η φλεγμονή και ίνωση του δέρματος, των αγγείων και των εσωτερικών οργάνων. Η σταδιακή σκλήρυνση και ίνωση που παρουσιάζεται στο δέρμα είναι δύο χαρακτηριστικά που αντικατοπτρίζουν τις επιπλοκές που έχουν υποστεί τα εσωτερικά όργανα και το αγγειακό σύστημα. (Varga et al)

Η συστηματική σκλήρυνση είναι μια ιδιαίτερα ετερογενής νόσος με τους ασθενείς να κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες με βάση την κατανομή της ίνωσης στο δέρμα καθώς και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά. Η εστιασμένη συστηματική σκλήρυνση (lcSSc) αποτελεί την πρώτη κατηγορία και χαρακτηρίζεται από πνευμονική υπέρταση, το δέρμα εμφανίζει εντοπισμένη σταδιακή αλλοίωση, ενώ στόχος των αυτοαντισωμάτων αποτελούν οι πρωτεΐνες του κεντρομερούς (ACA). Η δεύτερη κατηγορία είναι η διάχυτη συστηματική σκλήρυνση (dsSSc), στην οποία ο στόχος των αυτοαντισωμάτων είναι η RNA πολυμεράση III και η τοποϊσομεράση I (ATA). Οι ασθενείς που πάσχουν από διάχυτη συστηματική σκλήρυνση εμφανίζουν

πνευμονική ίνωση, ενώ το δέρμα εμφανίζει ταχύτατη ίνωση. (Ramos et al, Allanore et al) Ωστόσο, παρά τις προαναφερθείσες διαφορές, οι δύο υπότυποι εμφανίζουν και κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως το σύνδρομο Raynaud, το οποίο χαρακτηρίζεται από αποχρωματισμό των δακτύλων έπειτα από έκθεση σε αλλαγές θερμοκρασίας, λόγω μειωμένης αιματικής παροχής που προκαλείται από αγγεία που έχουν υποστεί βλάβη. Άλλα κοινά χαρακτηριστικά είναι η σκληροδακτυλία και επιπλοκές σε νεφρούς, καρδιά και πνεύμονες. (Yangyang et al, Mayes et al)

Τα γενικά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν οι μικροαγγειακές βλάβες, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και γενική ίνωση σε δέρμα και εσωτερικά όργανα. Κάποια από τα πρώτα και ίσως εναρκτήρια γεγονότα της συστηματικής σκλήρυνσης είναι ο μικροαγγειακός τραυματισμός και η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα παραπάνω, έχουν σαν αποτέλεσμα την προοδευτική βλάβη των αγγείων, που οδηγεί σε μείωση του αριθμού των τριχοειδών αγγείων, σε πάχυνση των τοιχωμάτων των αγγείων και λέπτυνση της κοιλότητας των αγγείων. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε υποξία και οξειδωτικό στρες. (Varga et al)

Όσον αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, παρατηρείται η απορρύθμιση του, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων και στην ενεργοποίηση των ινοβλαστών. Η ενεργοποίηση και η ακόλουθη υπερπαραγωγή των ινοβλαστών προκαλεί την υπέρμετρη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, που αποτελείται από κολλαγόνο, ελαστίνη, φιβρονεκτίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες. Ίνωση ονομάζεται η ανεξέλεγκτη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας και έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ουλώδους ιστού. Ως συνέπεια, προκαλείται αγγειοπάθεια που περιλαμβάνει τη μείωση της διαπερατότητας των αγγείων και του αγγειακού τόνου, παράλληλα με την εμφάνιση τηλεαγγειεκτασίας. Έτσι, δημιουργούνται αλλαγές στα τριχοειδή αγγεία των νεφρών, των πνευμόνων, της καρδιάς και των μυών που τα καθιστούν μη ελαστικά λόγω της εναπόθεσης κολλαγόνου, και έτσι καθίστανται μη λειτουργικά. Η ίνωση είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία, η οποία όταν επηρεάζει τη λειτουργία ζωτικών οργάνων όπως οι πνεύμονες και η καρδιά, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας της νόσου. (Gabrielli et al)

### **1.3 Επιδημιολογία της νόσου**

Διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες φαίνεται να εμφανίζουν διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά τον επιπολασμό και την επίπτωση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της ασθένειας υπολογίζεται περίπου σε 150 ασθενείς/ εκατομμύριο πληθυσμού, ενώ η επίπτωση σε 10 νέα περιστατικά/ εκατομμύριο πληθυσμού το χρόνο σε πληθυσμούς της βόρειου Ευρώπης. Αντίστοιχα, για νότιο-ευρωπαϊκούς,

βόριο-αμερικάνικους και αυστραλιανούς πληθυσμούς οι τιμές επιπολασμού υπολογίζονται από 276 ως 443 ασθενείς/ εκατομμύριο πληθυσμού και η επίπτωση της νόσου από 14 ως 21 νέα περιστατικά/ εκατομμύριο πληθυσμού το χρόνο. (Allanore et al)

Η συστηματική σκλήρυνση εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα σε γυναίκες σε σχέση με τους άντρες, όπως και τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα. Χαρακτηριστικά στοιχεία αποτελούν οι τιμές επιπολασμού που υπολογίστηκαν έπειτα από μελέτη της νόσου σε Σουηδικό πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές που βρέθηκαν είναι 88 άντρες ασθενείς/ εκατομμύριο πληθυσμού, ενώ αντίστοιχα για τις γυναίκες ο επιπολασμός της νόσου υπολογίστηκε σε 514 γυναίκες ασθενείς/ εκατομμύριο πληθυσμού. Ωστόσο, οι άντρες ασθενείς παρουσιάζουν βαρύτερη κλινική εικόνα, και έτσι δε θεωρούνται επαρκής προγνωστικός παράγοντας. (Salazar et al)

Ένας ακόμα παράγοντας που φαίνεται να παίζει ρόλο τόσο στην εμφάνιση, όσο και στη βαρύτητα της νόσου είναι η εθνικότητα. Σε έρευνες που διεξάχθηκαν στις ΗΠΑ, βρέθηκε πως οι Αφροαμερικανοί εμφανίζουν τη νόσο σε κατά μέσο όρο μικρότερη ηλικία σε σύγκριση με τους λευκούς ασθενείς. Επιπλέον, η πλειοψηφία (2/3) των λευκών ασθενών πάσχει από εστιασμένη συστηματική σκλήρυνση, ενώ η πλειοψηφία των Αφροαμερικανών εμφανίζει διάχυτη συστηματική σκλήρυνση, η οποία έχει πιο βαριά κλινική εικόνα. Τέλος, η νόσος εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας στους αφροαμερικανικό πληθυσμό. Η διαφοροποίηση μεταξύ εθνικοτήτων που παρατηρείται στην κλινική εικόνα αποδίδεται στο εύρημα ότι οι Αφροαμερικάνοι με συστηματική σκλήρυνση έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων έναντι της τοποϊσομεράσης I, σε σχέση με την πιθανότητα ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών του κεντρομερούς. (Varga et al)

#### **1.4 Παθοφυσιολογία της νόσου**

Η συστηματική σκλήρυνση είναι ένα χρόνια αυτοάνοσο νόσημα, το οποίο προσβάλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, το αγγειακό σύστημα και τον συνδετικό ιστό. Χαρακτηρίζεται από φλεγμονή, βλάβη του ενδοθηλίου των αγγείων και ίνωση. Η φλεγμονή προκαλείται λόγω της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και την επακόλουθη παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Η ίνωση είναι αποτέλεσμα της ανεξέλεγκτης παραγωγής ινοβλαστών και εξωκυττάρου υλικού. (Allanore et al)

Η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, και πιο συγκεκριμένα η παρατεταμένη και απορρυθμισμένη ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Επιπλέον, η συσσώρευση

υψηλών συγκεντρώσεων προ-φλεγμονώδων μορίων στους ασθενείς συνεισφέρει στην ανάπτυξη αυτοανοσίας. (Varga et al)

Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που εμπλέκονται στην παθογένεια της συστηματικής σκλήρυνσης είναι τα ενοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, οι μυοϊνοβλάστες, τα T και B λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Ακόμα, σημαντικούς μεσολαβητές της κυτταρικής ενεργοποίησης και της φλεγμονής αποτελούν ο TGF-β (transforming growth factor-β), οι ιντερλευκίνες IL6 και IL13, η ενδοθηλίνη 1, η αγγειοτενσίνη 2 και οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). (Allanore et al)

Κάποια από τα αρχικά και ίσως εναρκτήρια γεγονότα που οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου θεωρούνται πως είναι ο τραυματισμός του μικροαγγειακού συστήματος και η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι μικροαγγειακές βλάβες πιθανότατα μεσολαβούνται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως διάφοροι ιοί (π.χ. ο CMV) και από τη δράση των T λεμφοκυττάρων, που ενεργοποιούνται από τα αυτοαντισώματα. (Varga et al)

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της συστηματικής σκλήρυνσης αποτελεί η συσσώρευση ινώδους εξωκυττάριου υλικού στους ιστούς. Το ινώδες εξωκυττάριο υλικό περιέχει κολλαγόνο, ελασίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες και φιβρονεκτίνη. Η παραπάνω διαδικασία εμφανίζεται ως απάντηση σε ιστική βλάβη, και είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής και συσσώρευσης ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες, όπως έχει προαναφερθεί, αποτελούν τους κύριους κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην παθογένεια της ίνωσης, καθώς προκαλούν την αυξημένη σύνθεση εξωκυττάριου υλικού, η οποία σε συνδυασμό με την μειωμένη αποικοδόμηση του, οδηγεί σε σταδιακή εμφάνιση ίνωσης και επακολούθως στην ανάπτυξη ουλώδους ιστού. (Allanore et al)

Στη συστηματική σκλήρυνση, οι κυτταρικοί τύποι των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα απόπτωσης και αυξημένη παραγωγή του παράγοντα TGF-β (αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στη διαδικασία της ίνωσης), και έτσι δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος συσσώρευσης ινώδους εξωκυττάριου υλικού. (Varga et al) Οι παραπάνω κυτταρικοί τύποι εμφανίζουν ισομορφές μορίων του εξωκυττάριου υλικού, όπως η φιβρονεκτίνη, που έχουν προκύψει έπειτα από τη δράση του εναλλακτικού ματίσματος. Οι ισομορφές αυτές προσδένονται άμεσα σε υποδοχείς TLR4 (toll-like receptor που αναγνωρίζουν πρότυπα σε παθογόνα) στην επιφάνεια των στρωματικών κυττάρων. Με την πρόσδεση τους, επάγουν της ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των ινοβλαστών. Ακόμα, οι ιντερφερόνες τύπου I και II, εκτός από γνωστοί ανοσορυθμιστές, κατέχουν και ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής κολλαγόνου. Έτσι, υπάρχει η πιθανότητα οι ιντερφερόνες να παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια



της νόσου. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας ανατροφοδοτικός κύκλος μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης. (Pattanaik et al)

### **1.5 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου**

Η συστηματική σκλήρυνση δεν κληρονομείται με Μεντελικό πρότυπο. Ωστόσο, οι ως τώρα έρευνες έχουν δείξει πως το γενετικό υπόβαθρο επηρεάζει την εμφάνιση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες που έχουν διεξαχθεί έχουν δείξει ότι η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας είναι 1,5-1,7% σε οικογένειες με ιστορικό, ενώ αντίστοιχα σε γενικό πληθυσμό παρατηρείται ένα ποσοστό στα 0,026%, Επιπλέον, έρευνες σε οικογένειες με ιστορικό έδειξαν πως ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της ασθένειας αυξάνεται 15 ως 19 φορές σε αδέρφια των ασθενών και 13 ως 15 φορές σε συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παθογένεια της νόσου οφείλεται σε ένα βαθμό στο γενετικό υπόβαθρο που φέρουν οι ασθενείς. (Yangyang et al)

Ωστόσο, το γενετικό υπόβαθρο δεν αρκεί για την εμφάνιση της νόσου. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζουν και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που προκαλούν επιγενετικές τροποποιήσεις στο γονιδίωμα των ασθενών, και έτσι επηρεάζουν την λειτουργία των γονιδίων. (Salazar et al) Μέσω αυτών των τροποποιήσεων, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επάγουν την παραγωγή αυτοαντισωμάτων και προκαλούν μια σειρά ανοσολογικών αντιδράσεων, μέσω ενός μηχανισμού μοριακού μιμητισμού. (Yangyang et al)

Η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα, που δεν ακολουθεί τα πρότυπα Μεντελικής κληρονομικότητας. Εμφανίζει ποικιλία κλινικών χαρακτηριστικών, τα οποία προκύπτουν από την αλληλεπίδραση διαφορετικών γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι έρευνες ως τώρα έχουν δείξει ότι στην εκδήλωση παθογένειας της νόσου εμπλέκονται πολλά γονίδια, εκ των οποίων το κάθε ένα έχει μικρή συνεισφορά στην εμφάνιση του φαινοτύπου και δρουν αθροιστικά. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης, μπορεί να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης, ή να ασκούν προστατευτική δράση. (Allanore et al)

Σε έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έχει εντοπιστεί μία πληθώρα γενετικών τόπων που σχετίζεται με την εμφάνιση συστηματικής σκλήρυνσης. Από τους γενετικούς τόπους που είναι ως τώρα γνωστό πως εμπλέκονται με την εμφάνιση της νόσου, τα 2/3 φαίνεται να σχετίζονται με τουλάχιστον μια επιπλέον αυτοάνοση ασθένεια, το 46% με τουλάχιστον δύο επιπλέον και μικρότερα ποσοστά με τρεις ή περισσότερες. Κάποιες ασθένειες με τις οποίες η συστηματική σκλήρυνση εμφανίζει κοινούς γενετικούς τόπους είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο ερυθρώδης συστηματικός

λύκος. (Ramos et al) Επιπλέον, έρευνες δείχνουν πως τα αυτοάνοσα νοσήματα είναι δυνατό να ομαδοποιηθούν σε οικογένειες, με πολλούς ασθενείς να πάσχουν ταυτόχρονα από δύο ή και περισσότερα αυτοάνοσα. Πιο συγκεκριμένα, το 38% των ασθενών με συστηματική σκλήρυνση εμφανίζει τουλάχιστον ένα επιπλέον αυτοάνοσο νόσημα. Έτσι, υποστηρίζεται περεταίρω το γεγονός ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα μοιράζονται σε κάποιο βαθμό το γενετικό τους υπόβαθρο. (Salazar et al)

Τα γονίδια που έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη γενετική προδιάθεση, εκδήλωση και εξέλιξη της ασθένειας, είναι αυτά που εμπλέκονται στην επίκτητη και έμφυτη ανοσία, όπως τα γονίδια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) και τα γονίδια των ιντερφερονών, γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία της ίνωσης και φλεγμονής, γονίδια αυξητικών παραγόντων, γονίδια που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών και γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διακυτταρική σηματοδότηση. (Varga et al, Allanore et al) Επιπλέον, σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών έχει βρεθεί να εδράζεται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του DNA, οι οποίες φέρουν ρυθμιστική δράση οι οποία επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις. (Salazar et al)

## **1.6 Τύποι γενετικών μελετών**

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 εθνοικτήτων αποτελούν έναν επιπλέον παράγοντα που δυσκολεύει την έρευνα. Επίσης έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν πολλοί γενετικοί τόποι οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς και με την έκθεση σε περιβαλλοντικές συνθήκες. (Allanore et al)

Όπως προαναφέρθηκε η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα το οποίο δεν εμφανίζει μεντελική 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. (Yangyang et al)

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 υποψηφίου 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 υποψηφίους 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.

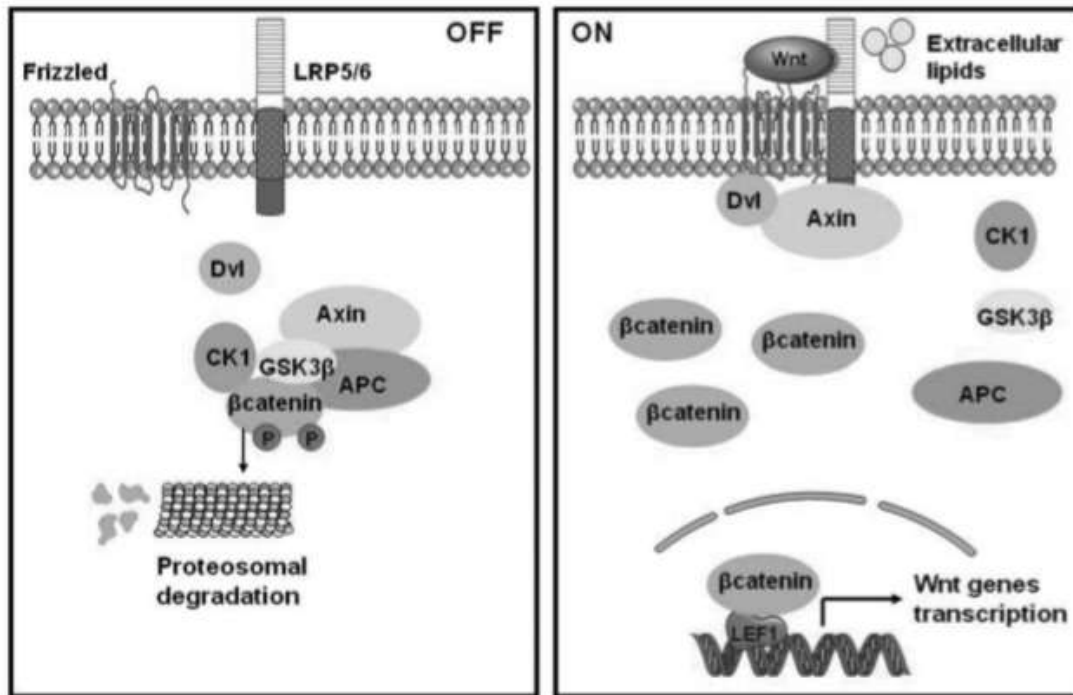
Είναι σημαντικό να τονιστεί πως μια GWAS αναγνωρίζει μια περιοχή ανισορροπίας σύνδεσης που περιέχει παραλλαγές που πιθανώς σχετίζονται με τη νόσο. Συχνά, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες για να περιοριστεί η ακριβής περιοχή σύνδεσης και να προσδιοριστεί η αιτιώδης παραλλαγή, δηλαδή αυτή που πραγματικά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

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. (Patnala et al, Pers et al)

## 1.7 WNT σηματοδότηση- Γενικά στοιχεία

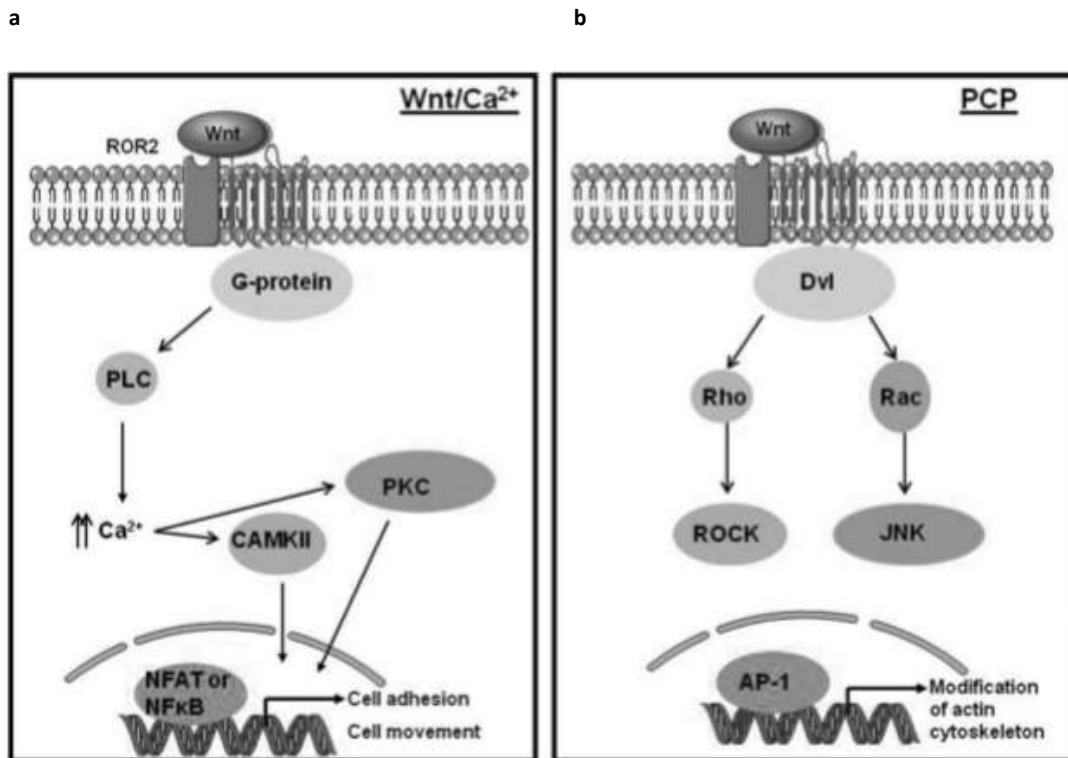
Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι εξελικτικά καλά συντηρημένο, με το όνομα του να προέρχεται από το μετάλλαγμα *wingless* της *Drosophila melanogaster*. Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια σηματοδοτικών πρωτεϊνών που επηρεάζουν μια ποικιλία κυτταρικών και αναπτυξιακών διεργασιών, όπως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την πολικότητα των κυττάρων και την οργανογένεση. Ο ρυθμιστικός ρόλος του μονοπατιού είναι απαραίτητος για την εμβρυονική ανάπτυξη, ενώ ως τώρα πιστευόταν πως σε ενήλικες βρίσκεται υπό πολύ αυστηρή ρύθμιση. Ωστόσο, το μονοπάτι φαίνεται να ενεργοποιείται ξανά σε ενήλικα άτομα κάτω από παθολογικές συνθήκες και σε περιπτώσεις ασθενειών όπως διάφορες νευρολογικές, φλεγμονώδεις και μεταβολικές διαταραχές και σε καρκίνο. (Badimon et al)

Οι πρωτεΐνες του μονοπατιού WNT είναι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες με τροποποιημένα λιπίδια. Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί 19 προσδέτες Wnt και 10 διαφορετικοί υποδοχείς Frizzled (FZD). Η μεταγωγή σήματος του Wnt γίνεται μέσω 2 κατηγοριών μονοπατιών: του κανονικού, που εξαρτάται από τη β-κατενίνη και διαφόρων μη κανονικών μονοπατιών, ανεξάρτητων της β-κατενίνης. (Bergmann et al)



**Εικόνα 1 Το κανονικό μονοπάτι WNT (Badimon et al)**

Το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις γλυκοπρωτεΐνες WNT ή από εξωκυτταρικά λιπίδια που προσδένονται στις LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) και στους υποδοχείς Frizzled. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας προσελκύει τις πρωτεΐνες Dishevelled (Dsh) και Axin, οι οποίες αποσταθεροποιούν το σύμπλοκο αποικοδόμησης της β-κατενίνης. Αυτή η αλληλεπίδραση προστατεύει τη β-κατενίνη από τη φωσφορυλίωση της από την GSK3β και την επακόλουθη αποικοδόμηση της. Έτσι, συσσωρεύεται β-κατενίνη στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων LEF1 και έτσι ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. (Badimon et al, Bergmann et al)



**Εικόνα 2 Μη κανονικά μονοπάτια WNT (Badimon et al)**

**a)** Όταν ενεργοποιείται το μη κανονικό μονοπάτι WNT/Ca<sup>2+</sup>, οι G-πρωτεΐνες ενεργοποιούν την PLC, που επάγει την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup>, το οποίο επακολούθως προκαλεί την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των κινασών PKC και CAMKII, οι οποίες θα προκαλέσουν την μεταφορά των NFAT ( nuclear factors of activated T-cells) και NFκB (κ-light chain enhancer of activated B-cells) στον πυρήνα και έτσι επάγουν την μεταγραφή ρυθμιστικών γονιδίων καθοδικά του μονοπατιού.

**b)** Στο μονοπάτι PCP, οι ρ και Rac κινάσες ενεργοποιούνται με την πρόσδεση του WNT στον υποδοχέα, και ενεργοποιούν την ρ-associated πρωτεϊνική κινάση και την JNK (Jun N-terminal kinase) που οδηγούν στη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην εγκαθίδρυση πολικότητας των κυττάρων, την κυτταρική μετανάστευση και την οργάνωση του κυτταροσκελετού. (Badimon et al)

Το κανονικό μονοπάτι WNT ρυθμίζεται στενά από την ισορροπία μεταξύ των προσδετών WNT και των ανταγωνιστών τους. Κάποιοι ανταγωνιστές είναι: οι εκκρινόμενες frizzled-related πρωτεΐνες (SFRP), οι πρωτεΐνες Dickkopf (DKK) και ο ανασταλτικός παράγοντας των Wnt (WIF). Οι SFRPs και ο WIF αποτρέπουν την αλληλεπίδραση των προσδετών WNT με τους υποδοχείς FZD με την άμεση πρόσδεσή τους στις WNT πρωτεΐνες, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία του μονοπατιού. Οι SFRPs έχουν την επιπρόσθετη ιδιότητα να διμερίζονται με τους υποδοχείς FZD, με αποτέλεσμα να ενισχύουν ή να αναστέλλουν την πρόσδεση

των WNT στους υποδοχείς. Οι DKKs έχουν την ιδιότητα να παρεμβαίνουν στην σύνθεση του συμπλόκου Fzd-LRP5/6 μέσω της σύνδεσης τους στις LRP. Η δημιουργία του συμπλόκου είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η έκφραση των πρωτεϊνών DKK1 αναστέλλεται από τον TGF-β, που φαίνεται να ενεργοποιεί το μονοπάτι Wnt. (Wei et al, Bergmann et al)

Επιπλέον ρύθμιση στο μονοπάτι WNT/β-κατενίνης, παρέχουν οι υποδοχείς και μεταγραφικοί παράγοντες PPARγ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma). Οι PPARs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από προσδέτες και εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης και της φλεγμονής. Το κανονικό μονοπάτι Wnt αλληλεπιδρά με τους PPARγ μέσω μιας περιοχής TCF/LEF της β-κατενίνης και μια περιοχής πρόσδεσης στην β-κατενίνη του PPARγ. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, η υπερέκφραση του PPARγ έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της σηματοδότησης μέσω της β-κατενίνης. Επιπλέον, οι αγωνιστές του PPARγ ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες DKK και την κινάση GSK3β και έτσι ασκούν ανασταλτική δράση στο μονοπάτι. (Vallée et al) Ακόμα, έχει βρεθεί η πρωτεΐνη WNT3a να αναστέλλει τους μεταγραφικούς παράγοντες PPARγ, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών με την επαγωγή του κολλαγόνου τύπου I, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω τον ρόλο των PPARγ στην εμφάνιση της νόσου. (Wei et al)

## 1.8 Ο ρόλος του μονοπατιού WNT στη συστηματική σκλήρυνση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις πως το κανονικό μονοπάτι WNT έχει κεντρικό ρόλο στην ίνωση, και φαίνεται να είναι ενεργό σε διάφορες ινωτικές νόσους. Σε ινοβλάστες ασθενών με συστηματική σκλήρυνση, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των WNT πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με μειωμένη έκφραση ενδογενών ανταγωνιστών του μονοπατιού, όπως οι DKK1, SFRP και WIF. Επιπλέον, σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση β-κατενίνης στον πυρήνα σε σχέση με υγιή άτομα. (Bergmann et al)

Το κανονικό μονοπάτι WNT αλληλεπιδρά στενά με τη σηματοδότηση μέσω TGF-β, ένα από τα βασικά μονοπάτια της ίνωσης. In vivo, η ενεργοποίηση του TGF-β στο δέρμα, έπειτα από την υπερέκφραση του ιδιοσυστάτα ενεργού υποδοχέα του TGF-β τύπου I, προκαλεί τη συσσώρευση της β-κατενίνης στον πυρήνα και έτσι αυξάνεται η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Ο TGF-β μάλλον ρυθμίζει το μονοπάτι WNT μέσω της αναστολής των ενδογενών ανταγωνιστών του. Σε ζωικά μοντέλα με υπερέκφραση του υποδοχέα του TGF-β τύπου I, έχει βρεθεί μειωμένη η έκφραση του DKK1, ενώ με υπερέκφραση του DKK1, προλαμβάνεται η πάχυνση του

δέρματος. Επιπλέον, οι υποκινητές των DKK, SFRP και WIF έχουν βρεθεί να είναι υπερμεθυλιωμένοι σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση, κάτι που προκαλεί τη μείωση της έκφρασης του. (Bergmann et al, Dees et al)

## **1.9 Γενετικοί τόποι υπό μελέτη**

Οι γενετικοί τόποι που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν για την οικογένεια πρωτεϊνών Frizzled (FZD), PPAR $\gamma$ , SFRP, DKK1 και WIF1. Οι παραπάνω πρωτεΐνες είναι υποδοχείς και αναστολείς που ρυθμίζουν τη λειτουργία του μονοπατιού Wnt.

### **α)Frizzled**

Η οικογένεια πρωτεϊνών Frizzled αποτελεί τους υποδοχείς των πρωτεϊνών WNT. Είναι μεμβρανικοί υποδοχείς που αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές. Στα θηλαστικά υπάρχουν 10 διαφορετικά γονίδια FZD, τα οποία διαφέρουν στον βαθμό ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού. (MacDonald et al) Στα γονιδιώματα των ασθενών που μελετήθηκαν αναλύθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες: FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD9 και FZD10.

### **β)PPAR $\gamma$**

Οι υποδοχείς και μεταγραφικοί παράγοντες PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ρυθμίζουν μέσω της  $\beta$ -κατενίνης, αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Οι PPARs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από προσδέτες και εμπλέκονται σε διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης και της φλεγμονής. (Vallée et al) Στα γονιδιώματα των ασθενών που μελετήθηκαν αναλύθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες: PPARG, PPARGC1a και PPARGC1b.

### **γ)SFRP**

Οι SFRPs είναι αναστολείς του μονοπατιού και αποτρέπουν την αλληλεπίδραση των προσδετών WNT με τους υποδοχείς FZD με την άμεση πρόσδεσή τους στις WNT πρωτεΐνες, ενώ έχουν και την επιπρόσθετη ιδιότητα να διμερίζονται με τους υποδοχείς FZD, με αποτέλεσμα να ενισχύουν ή να αναστέλλουν την πρόσδεση των WNT. (Bergmann et al) Στα γονιδιώματα των ασθενών που μελετήθηκαν αναλύθηκαν



πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες: SFRP1, SFRP2 και SFRP4.

#### **δ)DKK1**

Οι DKKs είναι αναστολείς του μονοπατιού έχουν την ιδιότητα να παρεμβαίνουν στην σύνθεση του συμπλόκου FZD-LRP5/6 μέσω της σύνδεσης τους στις LRP. Οι LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) είναι και αυτές υποδοχείς των πρωτεϊνών WNT. (Badimon et al)

#### **ε)WIF1**

Ο ανασταλτικός παράγοντας των WNT, WIF, αποτρέπει την αλληλεπίδραση των προσδετών WNT με τους υποδοχείς FZD με την άμεση πρόσδεσή τους στις WNT πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι και το σηματοδοτικό μονοπάτι. (Dees et al)

### **1.10 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας**

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου των γενετικών σημειακών πολυμορφισμών σε 16 γενετικούς τόπους σχετικούς με τη σηματοδότηση WNT, στην εμφάνιση της συστηματικής σκλήρυνσης στους ασθενείς. Ακόμα, προσδιορίστηκαν και οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες για το προσδιορισμό του βαθμού με τον οποίο επηρεάζουν στην εκδήλωση και την ανάπτυξη της νόσου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών μαρτύρων το οποίο έπειτα γονοτυπήθηκε με την πλατφόρμα αλληλούχησης αλληλούχησης Infinium™ GlobalScreening Array-24 v2.0 της Illumina. Η γονοτύπηση αφορούσε τον προσδιορισμό συνολικά 650.000 πολυμορφισμών σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές ολόκληρου του γονιδιώματος. Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν πολυμορφισμοί σε 16 γενετικούς τόπους, και τα δεδομένα της γονοτύπησης αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής Plink v1.07 (Purcell et al)

## **2. Πειραματικό μέρος**

### **2.1 Συλλογή δειγμάτων**

Αρχικά, έγινε λήψη δειγμάτων ασθενών που φέρουν τόσο τη διάχυτη όσο και την εστιασμένη μορφή της νόσου από τη Ρευματολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλοι οι ασθενείς εμφάνιζαν τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί όσον αφορά τη συστηματική σκλήρυνση, ενώ οι υγιείς μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άτομα μέσης ηλικίας, χωρίς ιστορικό συστηματικής σκλήρυνσης, κάποιας άλλης αυτοάνοσης ασθένειας ή νεοπλασίας.

### **2.2 Απομόνωση του DNA**

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 134 δείγματα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση για την απομόνωση DNA και 56 υγιείς μάρτυρες. Η απομόνωση έγινε βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή του kit της εταιρίας Machery Nagel.

### **2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της απομόνωσης. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ηλεκτροφόρηση 3μl προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1%, ώστε να διαχωριστούν τα τμήματα DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους επιτυγχάνεται με την παρουσία μάρτυρα μοριακού βάρους DNA (ladder), που προστίθεται στην πηκτή κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης, αναμιγνύεται αγαρόζη με 40 μl TAE 1x. Έπειτα το δείγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και προστίθεται 1μl χρωστικής SERVA, η οποία έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και να φθορίζει κάτω από υπεριώδεις φως. Το μείγμα τοποθετείται σε ειδικό εκμαγείο, στο οποίο επίσης τοποθετούνται και ειδικά χτενάκια για τη δημιουργία των χαρακτηριστικών οπών μέσα στις οποίες τοποθετείται το δείγμα. Μέσα στο εκμαγείο, το διάλυμα πολυμερίζεται, αποκτώντας έτσι και το επιθυμητό σχήμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100volts για 20 λεπτά, μετά το πέρας των οποίων παρατηρείται η πηκτή σε λάμπα υπεριώδους φωτός. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη αλλάζει ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων που ηλεκτροφορούνται.

Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, προστίθεται σε αυτά 3μl loading buffer, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

#### **Loading buffer 6x**

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

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

#### **TAE 50x**

- TrisBase 121gr
- AceticAcid 28,5ml
- EDTA 0,5M 50ml
- ddH<sub>2</sub>O έως τα 500ml

## **2.4 Γονοτύπηση**

Για τη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που είχαν γονοτυπηθεί στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Πλαγερά Δημητρίου. Μετά την φωτομέτρηση και τον καθαρισμό των δειγμάτων, 4-10 μl από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ειδικό plate 96 θέσεων. Κατά την διαδικασία αυτή, η ποσότητα που προστέθηκε από κάθε δείγμα υπολογίστηκε καθ' αυτό τον τρόπο, ώστε σε κάθε μία από τις 96 θέσεις του plate να υπάρχει τελικά γενετικό υλικό συγκέντρωσης τουλάχιστον 200 ng. Μετά από την παραπάνω διαδικασία, τα δείγματα σταλθήκαν σε εταιρεία για την πραγματοποίηση γονοτύπησης με την πλατφόρμα αλληλούχησης Infinium™ GlobalScreening Array-24 v2.0 της Illumina . Η συγκεκριμένη πλατφόρμα αλληλούχησης επιτρέπει τον προσδιορισμό >650.000 μονονουκλεοτιδικών σημειακών πολυμορφισμών, που καλύπτουν όλο το μήκος του γονιδιώματος , περιλαμβάνοντας τόσο κωδικές όσο και μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, προσδιορίζοντας επίσης και έναν σημαντικό αριθμό σπάνιων (MAF<0.01) πολυμορφισμών.

## 2.5 Ποιοτική ανάλυση δεδομένων

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης αναλύθηκαν με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής και ειδικότερα με τη χρήση του προγράμματος Plink. Το Plink αποτελεί μια εφαρμογή για την ανάλυση δεδομένων γονοτύπησης και τη πραγματοποίηση μελετών σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος. Λειτουργεί σε περιβάλλον γραμμής εντολών και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό έλεγχο αποτελεσμάτων γονοτύπησης και την πραγματοποίηση ανάλυσης συσχέτισεων μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Ακόμα, επιτρέπει την ανάκτηση πληροφοριών για συγκεκριμένους πολυμορφισμούς όπως και την εστιασμένη ανάλυση τους.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την ανίχνευση συσχέτισεων ανάμεσα στις συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων των πολυμορφισμών υπό εξέταση μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, δηλαδή την συστηματική σκλήρυνση και τη λειτουργία του μονοπατιού WNT στον ορό, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των συχνοτήτων του σπάνιου αλληλομόρφου (MAF) στους δύο διαφορετικούς πληθυσμούς και στατιστική ανάλυση της εμφάνισης του με χρήση της δοκιμασίας σημαντικότητας  $\chi^2$  κατά Pearson. Οι παραπάνω αναλύσεις έγιναν με χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής Plink. (Purcell et al)

```
C:\Users\Korνηλία>plink --file pparg --assoc --out pparg

-----@
|          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 [ pparg.log ]
Analysis started: Wed Oct 09 23:46:22 2019

Options in effect:
  --file pparg
  --assoc
  --out pparg

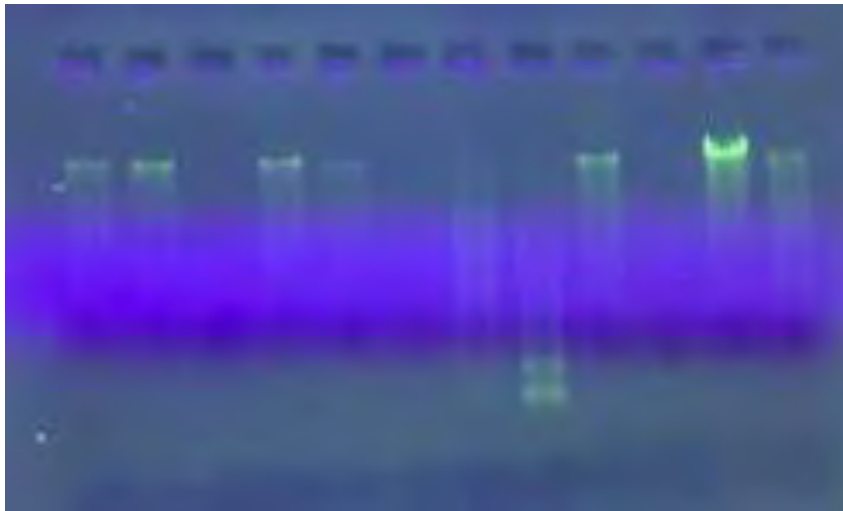
43 (of 43) markers to be included from [ pparg.map ]
```

Εικόνα 3 Το περιβάλλον εργασίας του προγράμματος Plink

### **3. Αποτελέσματα**

#### **3.1 Απομόνωση του DNA**

Για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της απομόνωσης DNA, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Ενδεικτικά παρατίθενται στην παρακάτω εικόνα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης της απομόνωσης ολικού γενωμικού DNA από ορισμένα δείγματα αίματος.



#### **3.2 Γονοτύπηση**

Συνολικά για τη γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκαν 190 δείγματα και πιο συγκεκριμένα 134 από ασθενείς με συστηματικό σκληρόδερμα και 56 από υγιείς μάρτυρες.

#### **3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γονοτύπησης έγινε με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής Plink. Αρχικά έγινε έλεγχος ποιότητας με σκοπό την εκκαθάριση των δεδομένων από δείγματα και πολυμορφισμούς κακής ποιότητας γονοτύπησης. Έτσι, τέθηκαν συγκεκριμένα κατώφλια ως προς κάποιους παράγοντες ποιότητας σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Ως προς την ποιότητα γονοτύπησης των δειγμάτων μη αποδεκτά θεωρήθηκαν αυτά με genotyping call <99%, ενώ ως προς τα αποτελέσματα γονοτύπησης ανά πολυμορφισμό τέθηκε όριο το 90%. Επιπλέον, μη αποδεκτά κρίθηκαν τα αποτελέσματα που αποκλίνουν από την ισορροπία Hardy-

Weinberg. Έτσι, προσδιορίστηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 469 πολυμορφισμοί σε 16 γενετικούς τόπους όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΟΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ
<i>FZD1</i>	7	12
<i>FZD2</i>	17	14
<i>FZD3</i>	8	43
<i>FZD4</i>	11	54
<i>FZD5</i>	2	20
<i>FZD6</i>	8	21
<i>FZD9</i>	7	24
<i>FZD10</i>	12	85
<i>PPARG</i>	3	47
<i>PPARGC1A</i>	4	61
<i>PPARGC1B</i>	5	29
<i>SFRP1</i>	8	15
<i>SFRP2</i>	4	2
<i>SFRP4</i>	7	28
<i>DKK1</i>	10	1
<i>WIF1</i>	12	4
		<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ:469</b>

### 3.4 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Για την ανάλυση ασθενών/ υγιών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την γονοτύπηση 134 ασθενών με συστηματική σκλήρυνση και 56 υγιών μαρτύρων. Συνολικά αναλύθηκαν 469 σημειακοί πολυμορφισμοί σε 16 γενετικούς τόπους σχετικούς με το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Για κάθε έναν από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν με τη χρήση του *Plink* οι συχνότητες των γονοτύπων και το MAF στον πληθυσμό των ασθενών και στον πληθυσμό των υγιών μαρτύρων. Τέλος έγινε στατιστική ανάλυση σημαντικότητας  $\chi^2$  κατά Pearson.

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

**Πίνακας 1 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD1***

Όσον αφορά το γονίδιο του *FZD1* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 12 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$ , δυο πολυμορφισμοί φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων τους στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs11976442	A	0.1381	0.1518	G	0.1221	0.7268	0.8951
rs76175706	C	0.007463	0.008929	T	0.02167	0.883	0.8346
rs6963218	C	0.1418	0.1518	A	0.06374	0.8007	0.9233
rs6955473	G	0.3769	0.4554	A	2.028	0.1545	0.7234
<b>rs10277895</b>	<b>G</b>	<b>0.04851</b>	<b>0.1161</b>	<b>T</b>	<b>5.657</b>	<b>0.01739</b>	<b>0.3882</b>
rs6969413	T	0.3396	0.3214	C	0.1166	0.7328	1.085
rs11771236	A	0.1231	0.1339	G	0.0834	0.7727	0.9081
rs10240068	G	0.1978	0.2679	A	2.273	0.1316	0.6738
rs6465306	G	0.1978	0.2679	A	2.273	0.1316	0.6738
rs12540728	T	0.153	0.2143	C	2.093	0.1479	0.6623
<b>rs12537425</b>	<b>G</b>	<b>0.403</b>	<b>0.2946</b>	<b>A</b>	<b>3.973</b>	<b>0.04624</b>	<b>1.616</b>
rs117569247	T	0.007463	0.008929	C	0.02167	0.883	0.8346

## Πίνακας 2 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD2*

Όσον αφορά το γονίδιο του *FZD2* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 14 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$ , δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs77911255	T	0.08582	0.03571	C	3.005	0.08303	2.535
rs78965384	C	0.03358	0.03571	T	0.01087	0.917	0.9382
rs7223926	G	0.3097	0.2589	A	0.9796	0.3223	1.284
rs76379328	T	0.007463	0.008929	C	0.02167	0.883	0.8346
rs4793119	A	0.4739	0.5179	G	0.6115	0.4342	0.8386
rs117833714	T	0.003788	0.01818	C	2.022	0.1551	0.2053
rs4098686	A	0.2782	0.2857	C	0.02208	0.8819	0.9635
rs72824776	T	0.007463	0.008929	C	0.02167	0.883	0.8346
rs9910962	A	0.2724	0.2589	G	0.07287	0.7872	1.071
rs9944407	C	0.3321	0.2411	T	3.086	0.07899	1.565
rs8066162	T	0.07463	0.0625	C	0.176	0.6748	1.21
rs9908517	A	0.1082	0.1071	G	0.0009327	0.9756	1.011
rs8074387	G	0.4328	0.4643	A	0.3168	0.5736	0.8806
rs8077795	G	0.1716	0.1964	T	0.3303	0.5655	0.8477



### Πίνακας 3 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD3*

Όσον αφορά το γονίδιο του *FZD3* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 43 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$ , δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs924184	T	0.3545	0.3839	C	0.2962	0.5863	0.8812
rs13275553	G	0.3246	0.3482	A	0.1983	0.6561	0.8997
rs11775158	C	0.3097	0.3482	T	0.5375	0.4635	0.8398
rs6558061	A	0.4925	0.5089	G	0.08489	0.7708	0.9365
rs2291792	C	0.007463	0.008929	T	0.02167	0.883	0.8346
rs1060411	C	0.3955	0.3214	A	1.853	0.1735	1.381
rs2323099	A	0.4328	0.3393	G	2.868	0.09035	1.486
rs7016831	T	0.04104	0.01786	G	1.285	0.2569	2.354
rs6994108	A	0.03358	0.01786	G	0.6949	0.4045	1.911
rs41495145	T	0.03358	0.02679	C	0.1193	0.7298	1.263
rs76109501	A	0.03731	0.008929	G	2.264	0.1324	4.302
rs117294400	C	0.03731	0.02679	A	0.265	0.6067	1.408
rs36044791	T	0.2537	0.2411	C	0.06752	0.795	1.07
rs59284065	C	0.01119	0.01786	T	0.2701	0.6033	0.6226
rs10503829	A	0.4739	0.4554	G	0.1088	0.7415	1.077
rs6985590	T	0.4366	0.3929	C	0.6181	0.4318	1.197
rs79841876	A	0.03008	0.01786	G	0.4568	0.4991	1.705
rs13248834	C	0.08209	0.08036	T	0.003164	0.9551	1.023

rs62502443	G	0.2948	0.3304	A	0.4715	0.4923	0.8473
rs6992823	G	0.09328	0.08929	A	0.0151	0.9022	1.049
rs118063582	A	0.02985	0.01786	G	0.4434	0.5055	1.692
rs7001034	A	0.3731	0.4107	G	0.4715	0.4923	0.854
rs75723988	A	0.007463	0.008929	C	0.02167	0.883	0.8346
rs2241802	A	0.3993	0.4375	G	0.4775	0.4896	0.8545
rs67983471	T	0.06343	0.0625	G	0.001162	0.9728	1.016
rs117592349	C	0.01119	0.008929	T	0.03892	0.8436	1.257
rs117218564	T	0.03358	0.02679	C	0.1193	0.7298	1.263
rs117225628	C	0.01119	0.008929	T	0.03892	0.8436	1.257
rs62504289	T	0.01493	0.02679	C	0.6145	0.4331	0.5505
rs74399437	G	0.003731	0.008929	A	0.4075	0.5232	0.4157
rs12681261	T	0.2724	0.3304	C	1.291	0.2559	0.7588
rs352199	G	0.3195	0.3839	A	1.459	0.2272	0.7536
rs34979186	G	0.0597	0.07143	A	0.1836	0.6683	0.8254
rs79688113	T	0.02612	0.03571	C	0.2587	0.611	0.7241
rs6983363	C	0.02612	0.01786	T	0.2332	0.6292	1.475
rs67564143	A	0.09701	0.1429	G	1.689	0.1938	0.6446
rs6992319	C	0.1007	0.1339	T	0.8847	0.3469	0.7245
rs7008984	C	0.02239	0.0625	T	3.847	0.04985	0.3435
rs7839487	G	0.02612	0.03571	A	0.2587	0.611	0.7241
rs9644143	G	0.2276	0.1875	T	0.751	0.3862	1.277
rs352428	A	0.1828	0.125	G	1.91	0.1669	1.566
rs1441706	A	0.2388	0.2321	G	0.0194	0.8892	1.038
rs7837539	G	0.01119	0.02679	T	1.236	0.2663	0.4113

#### Πίνακας 4 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD4*

Όσον αφορά το γονίδιο του *FZD4* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 54 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$ , 4 πολυμορφισμοί βρέθηκαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων τους στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs10898540	T	0.3881	0.4732	G	2.362	0.1243	0.7059
rs2511876	A	0.1978	0.2182	G	0.2005	0.6543	0.8833
rs1939108	G	0.3712	0.3929	A	0.1568	0.6922	0.9124
rs12577230	T	0.1642	0.1429	C	0.2701	0.6033	1.179
rs10501630	T	0.05224	0.07143	G	0.5333	0.4652	0.7165
rs75216473	T	0.01866	0.01786	G	0.002793	0.9579	1.046
rs117244685	G	0.007463	0.01786	A	0.8194	0.3654	0.4135
rs2433447	A	0.4776	0.4464	G	0.3085	0.5786	1.134
rs75714561	A	0.02239	0.03571	G	0.5475	0.4594	0.6183
rs7107991	T	0.1828	0.1786	C	0.009666	0.9217	1.029
rs10898546	C	0.306	0.375	T	1.712	0.1907	0.7348
rs10501631	A	0.04478	0.08036	G	1.915	0.1664	0.5365
rs117471793	C	0.007463	0.02679	T	2.271	0.1318	0.2732

rs17820361	G	0.01493	0.02679	A	0.6145	0.4331	0.5505
rs75357973	G	0.02239	0.03571	T	0.5475	0.4594	0.6183
rs72961422	A	0.02612	0.01786	G	0.2332	0.6292	1.475
rs7108680	G	0.1157	0.1429	A	0.5386	0.463	0.7848
rs17149517	T	0.1269	0.09821	C	0.6211	0.4306	1.334
rs12800898	G	0.3769	0.3125	T	1.424	0.2327	1.331
rs56400716	T	0.03731	0.0625	C	1.173	0.2789	0.5814
rs2212766	A	0.3097	0.2768	G	0.4075	0.5232	1.172
rs2212761	A	0.02239	0.03571	G	0.5475	0.4594	0.6183
rs76420145	C	0.01866	0.01786	A	0.002793	0.9579	1.046
rs7119097	T	0.2052	0.25	C	0.9277	0.3355	0.7746
rs1048338	G	0.07463	0.0625	A	0.176	0.6748	1.21
rs11234881	C	0.02612	0.02679	T	0.001369	0.9705	0.9745
rs11234885	A	0.007463	0.01786	G	0.8194	0.3654	0.4135
rs10898563	G	0.4291	0.3571	A	1.694	0.1931	1.353
rs11234890	A	0.03731	0.01786	G	0.9777	0.3228	2.132
rs3802892	G	0.2724	0.3304	A	1.291	0.2559	0.7588
rs61735303	A	0.01493	0.008929	G	0.2188	0.64	1.682
rs117822848	G	0.03358	0.01786	A	0.6949	0.4045	1.911
rs7925666	T	0.1791	0.1696	C	0.04869	0.8254	1.068
rs873676	A	0.08209	0.05357	G	0.9412	0.332	1.58
<b>rs17758720</b>	<b>A</b>	<b>0.03008</b>	<b>0.08929</b>	<b>G</b>	<b>6.093</b>	<b>0.01357</b>	<b>0.3163</b>
rs78447244	G	0.04104	0.08036	A	2.448	0.1177	0.4898
rs12575890	T	0.4328	0.3571	C	1.87	0.1715	1.374
rs78325122	A	0.01493	0.01786	G	0.04369	0.8344	0.8333
rs11605057	C	0.1455	0.1429	T	0.004533	0.9463	1.022
rs11234901	T	0.1604	0.1518	C	0.04457	0.8328	1.068
rs7122009	T	0.1978	0.2321	C	0.567	0.4514	0.8154
rs117719164	T	0.01493	0.008929	C	0.2188	0.64	1.682
rs11606641	A	0.06343	0.07143	G	0.08216	0.7744	0.8805
<b>rs17149642</b>	<b>G</b>	<b>0.02985</b>	<b>0.08036</b>	<b>A</b>	<b>4.715</b>	<b>0.0299</b>	<b>0.3521</b>
rs17149645	T	0.1455	0.1786	C	0.6578	0.4173	0.7834
<b>rs17149659</b>	<b>T</b>	<b>0.02985</b>	<b>0.08036</b>	<b>C</b>	<b>4.715</b>	<b>0.0299</b>	<b>0.3521</b>
rs4944662	C	0.2239	0.1964	T	0.3518	0.5531	1.18
rs61906168	C	0.0597	0.0625	T	0.01088	0.9169	0.9524
rs79377015	T	0.02239	0.01786	C	0.07868	0.7791	1.26
rs11234925	T	0.04104	0.05357	G	0.29	0.5902	0.7562
rs2512502	G	0.459	0.3929	A	1.401	0.2366	1.311
<b>rs117417096</b>	<b>A</b>	<b>0.02239</b>	<b>0.08036</b>	<b>C</b>	<b>7.001</b>	<b>0.008148</b>	<b>0.2621</b>
rs117428464	A	0.03358	0.02679	G	0.1193	0.7298	1.263
rs60574631	T	0.003731	0.008929	G	0.4075	0.5232	0.4157

**Πίνακας 5 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD5***

Στη περίπτωση του γονιδίου του *FZD5* προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 21 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 21 πολυμορφισμούς προέκυψε ότι 2 πολυμορφισμοί παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές συχνότητες γονοτύπων στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs2551968	A	0.4701	0.4286	C	0.5501	0.4583	1.183
rs6710439	T	0.3321	0.4375	G	3.795	0.05141	0.6393
rs906848	A	0.4739	0.4464	G	0.2392	0.6248	1.117
rs2663867	C	0.444	0.3482	T	2.985	0.08402	1.495
rs76100888	C	0.04851	0.0625	T	0.3102	0.5776	0.7647
rs112111951	A	0.02239	0.05357	C	2.512	0.113	0.4046
rs116181048	A	0.007463	0.008929	G	0.02167	0.883	0.8346
rs2663879	G	0.08582	0.08929	A	0.01196	0.9129	0.9576
rs9636269	G	0.4328	0.5	A	1.438	0.2304	0.7632
rs72962202	A	0.01866	0.008929	G	0.481	0.488	2.11
<b>rs116740700</b>	<b>G</b>	<b>0.007463</b>	<b>0.05357</b>	<b>A</b>	<b>8.148</b>	<b>0.00431</b>	<b>0.1328</b>
rs59528203	A	0.08582	0.03571	G	3.005	0.08303	2.535
rs73060899	T	0.01866	0.05357	C	3.426	0.06419	0.3359
<b>rs62189221</b>	<b>A</b>	<b>0.01493</b>	<b>0.05357</b>	<b>G</b>	<b>4.604</b>	<b>0.0319</b>	<b>0.2677</b>
rs62189223	A	0.2313	0.1696	C	1.793	0.1806	1.473
rs62189226	C	0.02239	0.05357	A	2.512	0.113	0.4046
rs114176833	A	0.02239	0.008929	G	0.7914	0.3737	2.542
rs6732700	A	0.03731	0.008929	G	2.264	0.1324	4.302
rs35562999	T	0.02612	0.01786	C	0.2332	0.6292	1.475
rs116404230	T	0.02985	0.03571	C	0.0888	0.7657	0.8308

**Πίνακας 6 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *FZD6***

Στη περίπτωση του γονιδίου του *FZD6* προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 21 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 21 πολυμορφισμούς προέκυψε ότι ένας πολυμορφισμός παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά διαφορετικές συχνότητες γονοτύπων στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs11785583	G	0.2239	0.2946	A	2.14	0.1435	0.6906
rs74979977	A	0.03731	0.008929	G	2.264	0.1324	4.302
rs3104033	C	0.4813	0.4375	T	0.6098	0.4349	1.193
rs827540	T	0.2761	0.3182	C	0.6724	0.4122	0.8174
rs827528	G	0.25	0.3125	A	1.571	0.21	0.7333
rs2948448	A	0.01493	0.02679	G	0.6145	0.4331	0.5505
rs2131860	C	0.1828	0.1607	T	0.2662	0.6059	1.168
rs67763699	T	0.09701	0.07143	C	0.6347	0.4256	1.397
rs16870364	C	0.291	0.2679	T	0.2088	0.6477	1.122
rs844137	T	0.459	0.4375	C	0.1468	0.7017	1.091
rs2575700	C	0.1866	0.2321	A	1.025	0.3112	0.7586
<b>rs113284507</b>	<b>A</b>	<b>0.003731</b>	<b>0.03571</b>	<b>C</b>	<b>6.223</b>	<b>0.01261</b>	<b>0.1011</b>
rs10105450	G	0.2127	0.2054	A	0.02553	0.8731	1.045
rs827597	T	0.01493	0.02679	G	0.6145	0.4331	0.5505
rs6995597	G	0.02239	0.03571	A	0.5475	0.4594	0.6183
rs3098229	G	0.1082	0.1518	A	1.41	0.2351	0.6781
rs4512347	C	0.02239	0.03571	T	0.5475	0.4594	0.6183
rs3133805	G	0.1082	0.1518	T	1.41	0.2351	0.6781
rs72675442	C	0.03383	0.04545	T	0.2931	0.5882	0.7354
rs1061196	A	0.2164	0.2143	G	0.002122	0.9633	1.013
rs3134296	T	0.1306	0.1875	C	2.036	0.1537	0.6509

**Πίνακας 7 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του FZD9**

Όσον αφορά το γονίδιο του FZD9 γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 24 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία, δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs79771773	T	0.05224	0.05357	G	0.002813	0.9577	0.9738
rs1178970	C	0.1381	0.125	T	0.1159	0.7335	1.121
rs7779909	G	0.1381	0.125	T	0.1159	0.7335	1.121
rs7793764	G	0.1381	0.125	T	0.1159	0.7335	1.121
rs2237285	C	0.1391	0.125	T	0.1342	0.7141	1.131
rs2108235	T	0.1381	0.125	C	0.1159	0.7335	1.121
rs117022969	A	0.01119	0.01786	G	0.2701	0.6033	0.6226
rs73133087	A	0.05597	0.03571	G	0.6823	0.4088	1.601
rs117435351	C	0.01866	0.02679	T	0.2533	0.6148	0.6907
rs4717763	A	0.4664	0.3839	G	2.179	0.1399	1.403
rs73133091	T	0.08015	0.05357	G	0.8277	0.363	1.539
rs74366373	T	0.01866	0.01786	C	0.002793	0.9579	1.046
rs73134914	C	0.04851	0.02679	A	0.9241	0.3364	1.852
rs2240466	T	0.1119	0.08036	C	0.8555	0.355	1.443
rs1178977	G	0.1866	0.1429	A	1.052	0.3052	1.376
rs714052	C	0.1119	0.08036	T	0.8555	0.355	1.443
rs35797675	G	0.2015	0.1429	T	1.807	0.1788	1.514
rs35695283	G	0.1119	0.08036	A	0.8555	0.355	1.443
rs75229905	C	0.1119	0.08036	T	0.8555	0.355	1.443
rs7797566	C	0.1119	0.08036	A	0.8555	0.355	1.443
rs117528284	A	0.03358	0.03571	G	0.01087	0.917	0.9382
rs17145713	T	0.1866	0.1429	C	1.052	0.3052	1.376
rs13244268	C	0.1119	0.08036	T	0.8555	0.355	1.443
rs79024510	T	0.02985	0.01786	C	0.4434	0.5055	1.692

**Πίνακας 8 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του FZD10**

Στη περίπτωση του γονιδίου του FZD10 προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 85 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 85 πολυμορφισμούς προέκυψε ότι τρεις πολυμορφισμοί παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές συχνότητες γονοτύπων στους ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs57113999	G	0.1231	0.1696	A	1.447	0.2291	0.6873
rs697792	C	0.291	0.3929	T	3.756	0.05261	0.6344
rs10847989	G	0.1493	0.1518	A	0.003972	0.9497	0.9804
rs713149	T	0.4739	0.4286	C	0.6527	0.4191	1.201
rs76717598	T	0.01119	0.01818	C	0.2918	0.5891	0.6113
rs78233971	G	0.3545	0.3214	A	0.3819	0.5366	1.159
rs12820311	T	0.01493	0.02679	C	0.6145	0.4331	0.5505
rs826914	G	0.4552	0.4455	A	0.03005	0.8624	1.04
rs35577533	A	0.3396	0.3304	G	0.0299	0.8627	1.042
rs11610672	T	0.2649	0.3125	C	0.8889	0.3458	0.7929
rs7961950	T	0.0597	0.05357	C	0.05442	0.8155	1.122
rs115657763	A	0.02612	0.05357	C	1.802	0.1795	0.4738
rs12578132	A	0.3797	0.4286	C	0.7883	0.3746	0.8162
rs11060700	T	0.1082	0.08929	C	0.3071	0.5795	1.238
rs11060702	T	0.4699	0.4464	C	0.175	0.6757	1.099
rs12296476	C	0.2127	0.1607	T	1.347	0.2458	1.411
rs12579318	A	0.02985	0.05357	G	1.253	0.2631	0.5436
<b>rs4760049</b>	<b>A</b>	<b>0.01866</b>	<b>0.0625</b>	<b>G</b>	<b>4.965</b>	<b>0.02587</b>	<b>0.2852</b>
rs2126296	G	0.2761	0.1964	T	2.657	0.1031	1.56
rs937529	A	0.06716	0.02679	G	2.467	0.1163	2.616
rs904631	T	0.3993	0.4107	C	0.04314	0.8355	0.9536
rs10848011	T	0.4627	0.4554	C	0.01708	0.896	1.03
rs73165637	T	0.06343	0.04464	C	0.5113	0.4746	1.449



rs10773737	T	0.2164	0.2636	C	0.9814	0.3219	0.7714
rs11060727	A	0.2556	0.2679	G	0.06126	0.8045	0.9387
rs1393447	G	0.25	0.2411	A	0.03382	0.8541	1.049
rs7963685	G	0.2313	0.2143	T	0.1313	0.7171	1.104
rs78127007	G	0.08209	0.0625	A	0.43	0.512	1.341
rs117469815	C	0.007519	0.01786	T	0.8046	0.3697	0.4167
rs11060741	T	0.3172	0.3393	C	0.1766	0.6743	0.9045
rs6486526	C	0.08955	0.0625	T	0.7715	0.3797	1.475
rs12829740	T	0.2537	0.2768	C	0.2179	0.6406	0.8884
rs11060748	G	0.02239	0.02679	A	0.06606	0.7972	0.8321
rs7314441	C	0.06716	0.03571	T	1.432	0.2314	1.944
rs1502456	A	0.2276	0.1455	G	3.245	0.07163	1.731
rs4760083	G	0.4478	0.5268	A	1.98	0.1594	0.7284
rs1046895	A	0.1045	0.1518	G	1.693	0.1932	0.652
rs4760086	G	0.3433	0.2857	A	1.191	0.2752	1.307
rs11060760	G	0.3246	0.2411	A	2.626	0.1051	1.513
rs4760087	C	0.3172	0.2818	T	0.4581	0.4985	1.184
rs2055347	T	0.05597	0.04464	C	0.2033	0.6521	1.269
rs61940071	A	0.2276	0.2054	G	0.2272	0.6336	1.14
rs79989369	C	0.04478	0.08929	T	2.869	0.0903	0.4781
rs904632	A	0.2632	0.3393	G	2.238	0.1346	0.6955
rs55959640	A	0.2201	0.2679	G	1.002	0.3167	0.7716
rs7134674	A	0.2594	0.2232	G	0.5523	0.4574	1.219
rs11060767	G	0.3571	0.3636	A	0.01426	0.905	0.9722
rs12821791	T	0.4366	0.3929	C	0.6181	0.4318	1.197
rs76367443	A	0.01493	0.008929	G	0.2188	0.64	1.682
rs10848031	A	0.4216	0.5	G	1.964	0.1611	0.729
rs10848032	T	0.1343	0.1161	C	0.2344	0.6283	1.182
rs73148943	T	0.1326	0.09821	C	0.8647	0.3524	1.403
rs73148950	T	0.05224	0.02679	C	1.197	0.2738	2.003
rs78467251	T	0.003731	0.01786	C	2.012	0.156	0.206
rs6486530	G	0.3769	0.3482	A	0.2787	0.5976	1.132
rs61940090	C	0.01866	0.008929	T	0.481	0.488	2.11
rs7304152	G	0.4664	0.4018	A	1.335	0.248	1.301
rs117042529	A	0.01866	0.008929	G	0.481	0.488	2.11

rs871818	G	0.4254	0.3929	A	0.3438	0.5576	1.144
rs11060780	A	0.4436	0.4545	G	0.03766	0.8461	0.9568
rs12425911	A	0.2351	0.2091	G	0.2996	0.5841	1.162
<b>rs10773753</b>	<b>G</b>	<b>0.08955</b>	<b>0.01818</b>	<b>T</b>	<b>6.202</b>	<b>0.01276</b>	<b>5.311</b>
rs12580471	T	0.347	0.3214	C	0.2306	0.6311	1.122
rs10848039	T	0.1119	0.0625	C	2.197	0.1383	1.891
rs117478721	T	0.04478	0.04464	C	3,28E-02	0.9954	1.003
rs11611897	A	0.1866	0.1696	G	0.1522	0.6964	1.123
rs10848042	C	0.0709	0.0625	T	0.08735	0.7676	1.145
rs79863833	T	0.1866	0.2054	C	0.1797	0.6716	0.8875
rs34875425	C	0.06343	0.01786	T	3.454	0.06309	3.725
rs10773755	A	0.1828	0.1696	G	0.09357	0.7597	1.095
rs118133155	T	0.04851	0.02679	G	0.9241	0.3364	1.852
rs421130	G	0.194	0.2054	A	0.06398	0.8003	0.9316
rs12426839	T	0.1119	0.08036	C	0.8555	0.355	1.443
rs80129859	C	0.01504	0.01786	A	0.04011	0.8413	0.8397
rs80288022	C	0.1343	0.1339	T	0.0001086	0.9917	1.003
rs34142665	T	0.05639	0.02679	C	1.523	0.2171	2.171
rs420645	C	0.291	0.2321	T	1.379	0.2403	1.358
<b>rs4759637</b>	<b>A</b>	<b>0.1157</b>	<b>0.04464</b>	<b>G</b>	<b>4.647</b>	<b>0.03111</b>	<b>2.799</b>
rs4759440	C	0.5	0.4196	T	2.045	0.1527	1.383
rs60670599	C	0.04511	0.03571	T	0.1717	0.6786	1.276
rs35200980	G	0.04478	0.03571	A	0.1608	0.6884	1.266
rs13377602	C	0.291	0.2679	T	0.2088	0.6477	1.122
rs1258562	G	0.01119	0.01786	A	0.2701	0.6033	0.6226
rs10437804	G	0.2164	0.2321	A	0.1134	0.7363	0.9136
rs76318890	C	0.1567	0.1339	T	0.3217	0.5706	1.202

**Πίνακας 9 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *PPARG***

Στη περίπτωση του γονιδίου του *PPARG* προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 47 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους φαίνονται στον πίνακα 9. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 47 πολυμορφισμούς, δύο φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων. Συγκεκριμένα, επρόκειτο για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs10510410, μια αντικατάσταση C από A, και για τον πολυμορφισμό με κωδικό rs17819328, μια αντικατάσταση G από T.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs2920499	G	0.3993	0.4554	A	1.024	0.3117	0.7949
rs2960421	G	0.1381	0.2054	A	2.69	0.1009	0.6198
rs2920500	A	0.4366	0.4821	G	0.6629	0.4155	0.8322
rs17036160	T	0.08582	0.07143	C	0.2184	0.6403	1.22
rs17036170	A	0.02612	0.008929	G	1.133	0.2872	2.977
rs2972164	C	0.4398	0.4911	T	0.8339	0.3612	0.8138
rs6785890	A	0.2612	0.1786	C	2.983	0.08413	1.626
rs6768587	G	0.2649	0.1786	A	3.234	0.07212	1.658
rs11128596	C	0.2687	0.1786	A	3.494	0.06161	1.69
rs7620165	G	0.3881	0.3661	A	0.1618	0.6875	1.098
<b>rs10510410</b>	<b>C</b>	<b>0.25</b>	<b>0.1518</b>	<b>A</b>	<b>4.425</b>	<b>0.03542</b>	<b>1.863</b>
rs3112394	T	0.04104	0.008929	C	2.664	0.1026	4.751
rs111698017	G	0.01493	0.03571	A	1.656	0.1981	0.4091
rs11128599	A	0.2425	0.1607	G	3.098	0.0784	1.672
rs12490265	A	0.3881	0.3482	G	0.5343	0.4648	1.187
rs17036328	C	0.08209	0.0625	T	0.43	0.512	1.341
rs7649970	T	0.08209	0.0625	C	0.43	0.512	1.341
rs1801282	G	0.07836	0.0625	C	0.291	0.5896	1.275
rs4135247	G	0.3694	0.4732	A	3.547	0.05966	0.6521
rs12629751	T	0.1418	0.09821	C	1.335	0.2478	1.517
rs73025253	C	0.04851	0.03571	A	0.3025	0.5823	1.376
rs2120825	G	0.06343	0.05357	T	0.1351	0.7132	1.197
rs111892873	G	0.03008	0.02679	A	0.03018	0.8621	1.127

rs2938395	C	0.4173	0.4018	T	0.0782	0.7798	1.066
rs4135268	G	0.04511	0.0625	C	0.4991	0.4799	0.7087
rs4135275	G	0.153	0.2232	A	2.715	0.09944	0.6285
rs709149	T	0.4179	0.4018	C	0.08471	0.771	1.069
rs79877613	T	0.04615	0.06667	C	0.3464	0.5561	0.6774
rs7645903	T	0.2444	0.1875	A	1.45	0.2285	1.401
rs1175542	G	0.3955	0.4375	A	0.5763	0.4478	0.8413
rs1177809	G	0.3619	0.3661	A	0.005829	0.9391	0.9823
rs1797912	C	0.3918	0.3839	A	0.02054	0.8861	1.034
rs6782475	G	0.2463	0.1786	T	2.067	0.1505	1.503
rs35520264	C	0.007463	0.02679	T	2.271	0.1318	0.2732
rs7650895	C	0.2351	0.1786	A	1.477	0.2242	1.414
rs3856806	T	0.06716	0.08036	C	0.2083	0.6481	0.824
rs4498025	T	0.2201	0.2411	C	0.1975	0.6568	0.8887
rs1152004	G	0.2612	0.2679	A	0.01809	0.893	0.9663
rs6778400	G	0.1015	0.1518	A	1.937	0.164	0.6313
rs13088214	C	0.291	0.2232	T	1.839	0.175	1.429
rs7618046	C	0.4776	0.4464	T	0.3085	0.5786	1.134
<b>rs17819328</b>	<b>G</b>	<b>0.3545</b>	<b>0.4821</b>	<b>T</b>	<b>5.401</b>	<b>0.02012</b>	<b>0.5898</b>
rs2249407	C	0.4963	0.4107	A	2.32	0.1277	1.414
rs73029206	G	0.1343	0.1071	A	0.529	0.467	1.293
rs75972002	A	0.02239	0.03571	G	0.5475	0.4594	0.6183
rs1699348	C	0.4552	0.4821	T	0.2302	0.6314	0.8975
rs13064830	T	0.0597	0.01786	C	3.065	0.08	3.492

#### Πίνακας 10 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *PPARGC1a*

Όσον αφορά το γονίδιο του *PPARGC1a* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 61 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία, προέκυψαν 2 πολυμορφισμοί που να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs28718041	T	0.05597	0.02679	C	1.491	0.2221	2.154
rs10517023	C	0.3396	0.2679	A	1.871	0.1714	1.405
rs1491389	T	0.3947	0.4643	C	1.57	0.2102	0.7525
rs28560006	G	0.0597	0.02679	A	1.802	0.1795	2.307
rs143567377	T	0.02239	0.02679	C	0.06606	0.7972	0.8321
rs7656180	C	0.2879	0.3571	T	1.768	0.1836	0.7277
rs1565537	G	0.1679	0.1071	A	2.288	0.1304	1.682
rs1491384	C	0.3993	0.3571	T	0.5905	0.4422	1.196
rs17573178	A	0.01128	0.03704	G	2.775	0.09575	0.2966
rs16874096	G	0.06343	0.03571	A	1.162	0.281	1.829
rs1159937	G	0.2388	0.2054	A	0.5006	0.4792	1.214
rs13122003	C	0.4328	0.4643	T	0.3168	0.5736	0.8806
rs6811168	A	0.1194	0.08929	G	0.7288	0.3933	1.383
rs78674864	T	0.04851	0.04464	C	0.02614	0.8716	1.091
rs78605654	C	0.3902	0.4196	A	0.2852	0.5933	0.8848
rs76369738	T	0.02612	0.05357	C	1.802	0.1795	0.4738
rs10005147	G	0.02612	0.01786	A	0.2332	0.6292	1.475
rs885395	A	0.08209	0.03571	G	2.665	0.1026	2.415
rs115192829	A	0.02612	0.02679	G	0.001369	0.9705	0.9745
rs2932978	G	0.3769	0.2857	A	2.885	0.08942	1.512
rs114820830	G	0.01866	0.01786	A	0.002793	0.9579	1.046
rs79633314	C	0.04851	0.03571	T	0.3025	0.5823	1.376
rs60498536	G	0.01119	0.02679	A	1.236	0.2663	0.4113
rs2279525	C	0.3134	0.2589	T	1.123	0.2893	1.307
rs2932965	A	0.1679	0.2411	G	2.753	0.09707	0.6353
<b>rs2970847</b>	<b>T</b>	<b>0.1455</b>	<b>0.2321</b>	<b>C</b>	<b>4.18</b>	<b>0.04091</b>	<b>0.5633</b>
rs1472095	T	0.2873	0.25	C	0.55	0.4583	1.209
rs28575865	C	0.04478	0.07143	T	1.125	0.2888	0.6094
rs2932971	T	0.2873	0.25	C	0.55	0.4583	1.209
rs60744128	A	0.01493	0.02679	G	0.6145	0.4331	0.5505
rs2290602	T	0.2873	0.3304	G	0.6969	0.4038	0.8172
rs112202002	T	0.04851	0.03571	C	0.3025	0.5823	1.376
<b>rs3774908</b>	<b>G</b>	<b>0.09701</b>	<b>0.03571</b>	<b>A</b>	<b>4.082</b>	<b>0.04334</b>	<b>2.901</b>
rs10938964	G	0.2575	0.3214	A	1.616	0.2036	0.732
rs61261762	A	0.02239	0.01786	G	0.07868	0.7791	1.26
rs17885261	A	0.403	0.4286	G	0.2137	0.6439	0.9
rs76712476	G	0.02612	0.01786	A	0.2332	0.6292	1.475
rs6850464	G	0.1194	0.1339	A	0.1538	0.695	0.8768

rs114492700	C	0.03358	0.0625	T	1.638	0.2006	0.5212
rs4697424	T	0.2313	0.2589	C	0.33	0.5656	0.8614
rs4235308	C	0.4104	0.4107	T	2,32E-02	0.9962	0.9989
rs7656250	C	0.3097	0.3304	T	0.156	0.6929	0.9094
rs10213440	C	0.1791	0.1607	T	0.1861	0.6662	1.139
rs60239302	A	0.03731	0.03571	G	0.005693	0.9399	1.047
rs59161679	C	0.06343	0.05357	A	0.1351	0.7132	1.197
rs4637388	G	0.1955	0.2143	A	0.1734	0.6771	0.891
rs6838600	A	0.2948	0.2589	G	0.499	0.48	1.196
rs13128633	G	0.1082	0.125	T	0.2219	0.6376	0.8494
rs61076774	T	0.05224	0.05357	C	0.002813	0.9577	0.9738
rs11734408	G	0.2724	0.25	A	0.2029	0.6524	1.123
rs2305682	A	0.03383	0.02679	G	0.1274	0.7211	1.272
rs2946385	T	0.4549	0.5089	G	0.9238	0.3365	0.8052
rs2970876	T	0.4776	0.4554	C	0.157	0.6919	1.094
rs2970863	C	0.2575	0.2321	T	0.2701	0.6033	1.147
rs2970860	T	0.291	0.2321	C	1.379	0.2403	1.358
rs10030083	A	0.1007	0.1339	C	0.8847	0.3469	0.7245
rs13108219	A	0.1791	0.1875	C	0.03746	0.8465	0.9455
rs11734980	C	0.4067	0.4464	A	0.5119	0.4743	0.8501
rs66497744	G	0.3694	0.3214	A	0.7937	0.373	1.237
rs2946403	A	0.3694	0.3125	G	1.12	0.2898	1.289
rs16874355	C	0.05224	0.08036	A	1.098	0.2946	0.6308

#### Πίνακας 11 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *PPARGC1b*

Στη περίπτωση του γονιδίου του *PPARGC1b* προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 29 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 29 πολυμορφισμούς, δύο φάνηκε να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs10080122	G	0.194	0.1607	A	0.5834	0.445	1.257
rs10054990	C	0.3993	0.3839	T	0.07765	0.7805	1.066
rs13158830	A	0.07836	0.08929	G	0.1259	0.7227	0.8672
rs72830245	G	0.2836	0.2857	T	0.001765	0.9665	0.9896
rs12717846	T	0.25	0.2143	G	0.5532	0.457	1.222
<b>rs75465608</b>	<b>T</b>	<b>0.1455</b>	<b>0.2321</b>	<b>G</b>	<b>4.18</b>	<b>0.04091</b>	<b>0.5633</b>
rs17110439	T	0.209	0.1696	C	0.7706	0.38	1.293
rs2161257	G	0.4627	0.4732	A	0.03518	0.8512	0.9586
rs80069564	A	0.02612	0.04464	G	0.8862	0.3465	0.5739
rs251460	G	0.3022	0.2946	A	0.0217	0.8829	1.037
rs741580	G	0.04478	0.04464	A	3,28E-02	0.9954	1.003
rs10463291	A	0.01866	0.01786	G	0.002793	0.9579	1.046
rs144488714	C	0.02239	0.01786	T	0.07868	0.7791	1.26
rs45520937	A	0.02612	0.04464	G	0.8862	0.3465	0.5739
rs45588534	T	0.02612	0.04464	C	0.8862	0.3465	0.5739
rs45543631	T	0.02612	0.04464	C	0.8862	0.3465	0.5739
rs76206609	T	0.02239	0.01786	C	0.07868	0.7791	1.26
rs25847	T	0.02985	0.04464	G	0.5231	0.4695	0.6585
rs4705386	A	0.04478	0.07143	G	1.125	0.2888	0.6094
rs888895	G	0.4398	0.4196	A	0.131	0.7174	1.086
rs4705390	A	0.03358	0.03571	G	0.01087	0.917	0.9382
rs60254740	T	0.01493	0.03571	C	1.656	0.1981	0.4091
rs245083	T	0.0709	0.09821	C	0.8107	0.3679	0.7006
rs76734221	A	0.07836	0.08036	G	0.004341	0.9475	0.973
rs112771183	C	0.08955	0.08929	T	6,89E-02	0.9934	1.003
<b>rs77187626</b>	<b>G</b>	<b>0.003731</b>	<b>0.02679</b>	<b>A</b>	<b>4.031</b>	<b>0.04468</b>	<b>0.1361</b>
rs10053292	C	0.1203	0.1071	T	0.1327	0.7157	1.14
rs30827	T	0.3731	0.3393	C	0.3913	0.5316	1.159
rs3733666	C	0.08209	0.04464	T	1.678	0.1952	1.914

**Πίνακας 12 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *SFRP1***

Στη περίπτωση του γονιδίου του *SFRP1* προσδιορίστηκαν συνολικά οι γονότυποι σε 15 σημειακούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Οι κωδικοί, καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων των πολυμορφισμών στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητες των γονοτύπων σε κάθε έναν από τους 15 πολυμορφισμούς δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να διαφοροποιείται στατιστικώς σημαντικά.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs117452764	G	0,04851	0,04464	A	0,02614	0,8716	1,091
rs7013368	A	0,4254	0,4643	G	0,4862	0,4856	0,8541
rs72642720	C	0,01493	0,008929	A	0,2188	0,64	1,682
rs13254926	A	0,4403	0,4554	G	0,07253	0,7877	0,9409
rs6989786	T	0,06343	0,04464	C	0,5113	0,4746	1,449
rs7843510	G	0,485	0,4911	A	0,01177	0,9136	0,9758
rs77550034	C	0,01894	0,03571	T	0,9472	0,3304	0,5212
rs72642749	T	0,03358	0,02679	C	0,1193	0,7298	1,263
rs17652488	A	0,4515	0,4464	G	0,008184	0,9279	1,021
rs77744593	A	0,02612	0,04464	G	0,8862	0,3465	0,5739
rs10958672	C	0,4291	0,4375	T	0,0227	0,8803	0,9664
rs747417	A	0,2985	0,3571	C	1,257	0,2622	0,766
rs16890444	T	0,04851	0,03571	C	0,3025	0,5823	1,376
rs9694405	G	0,4586	0,5357	A	1,875	0,1709	0,7343
rs7829419	C	0,2164	0,2768	T	1,605	0,2052	0,7217



**Πίνακας 13 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *SFRP2***

Όσον αφορά το γονίδιο του *SFRP2* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 2 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία  $\chi^2$ , δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs78176516	T	0,01493	0,01786	C	0,04369	0,8344	0,8333
rs4643790	A	0,1679	0,25	G	3,43	0,06404	0,6054

**Πίνακας 14 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *SFRP4***

Όσον αφορά το γονίδιο του *SFRP4* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 28 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία, δε βρέθηκε κάποιος πολυμορφισμός να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs1450856	C	0,02985	0,03571	T	0,0888	0,7657	0,8308
rs1132553	C	0,4552	0,4643	T	0,02613	0,8716	0,9642
rs1376264	T	0,3271	0,3661	C	0,5354	0,4644	0,8417
rs77616258	G	0,01866	0,008929	A	0,481	0,488	2,11
rs117476319	A	0,01493	0,04464	G	3,017	0,08241	0,3242
rs7778651	A	0,02985	0,02679	G	0,0264	0,8709	1,118
rs2598096	C	0,4701	0,4375	T	0,3389	0,5605	1,141
rs3816415	T	0,1269	0,1071	C	0,2888	0,591	1,211
rs2044831	G	0,2127	0,2589	A	0,9646	0,326	0,7732
rs16879765	T	0,09701	0,09821	C	0,001293	0,9713	0,9865
rs2722276	G	0,4403	0,5	A	1,134	0,2869	0,7867
rs2722278	A	0,06716	0,07143	G	0,02254	0,8807	0,936
rs2722280	T	0,09328	0,09821	C	0,02239	0,881	0,9446
rs55821827	A	0,2015	0,1339	G	2,426	0,1193	1,632
rs1717742	C	0,06716	0,07143	T	0,02254	0,8807	0,936
rs1668349	T	0,3881	0,3839	C	0,005683	0,9399	1,018
rs2722299	T	0,4179	0,3214	C	3,092	0,07866	1,516
rs2722348	G	0,194	0,2411	A	1,061	0,3029	0,7579
rs117318096	G	0,007463	0,008929	T	0,02167	0,883	0,8346
rs17171245	T	0,03846	0,1	G	2,85	0,09135	0,36
rs117167593	G	0,02239	0,008929	T	0,7914	0,3737	2,542
rs118008598	G	0,0597	0,05357	A	0,05442	0,8155	1,122
rs75828528	G	0,02612	0,03571	A	0,2587	0,611	0,7241
rs36056459	C	0,01866	0,03571	T	0,9939	0,3188	0,5133
rs1524078	G	0,3657	0,3571	T	0,02484	0,8748	1,038
rs76840945	T	0,03731	0,04464	G	0,1119	0,738	0,8295
rs1721400	T	0,1716	0,1875	C	0,1368	0,7115	0,8979
rs17171260	G	0,05597	0,04464	T	0,2033	0,6521	1,269

#### Πίνακας 15 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *DKK1*

Στη περίπτωση του γονιδίου του *DKK1* προσδιορίστηκε και αναλύθηκε ένας σημειακός μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός. Ο κωδικός, καθώς και οι συχνότητα του πολυμορφισμού στις δυο ομάδες που αναλύθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  για τις συχνότητα του πολυμορφισμού δε φάνηκε να διαφοροποιείται στατιστικώς σημαντικά.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs149268042	T	0,02985	0,02679	G	0,0264	0,8709	1,118

#### Πίνακας 16 Αποτελέσματα από την ανάλυση στο γονίδιο του *WIF1*

Όσον αφορά το γονίδιο του *WIF1* γονοτυπήθηκαν και αναλύθηκαν συνολικά 4 σημειακοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Οι κωδικοί των πολυμορφισμών καθώς και οι συχνότητες των γονοτύπων στις δυο ομάδες μελέτης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα αναγράφονται επίσης και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας  $\chi^2$  για τον κάθε έναν από τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων τους. Με βάση τη δοκιμασία, δε προέκυψε κάποιος πολυμορφισμός που να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων του στους πληθυσμούς των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

SNP id	Minor Allele	MAF(cases)	MAF(controls)	Major Allele	CHISQ	P	OR
rs6581601	T	0,2799	0,2768	C	0,003689	0,9516	1,015
rs61924762	G	0,04851	0,008929	A	3,487	0,06185	5,659
rs7299766	C	0,3684	0,3839	T	0,08104	0,7759	0,936
rs17101043	C	0,09328	0,09821	T	0,02239	0,881	0,9446

#### **4. Συζήτηση- Συμπεράσματα**

Η συστηματική σκλήρυνση αποτελεί ένα πολύπλοκο αυτοάνοσο νόσημα και ταυτόχρονα εμφανίζει χαρακτηριστικά ινωτικής νόσου. (Varga et al) Εκτός από το δέρμα, επηρεάζει και διάφορα ζωτικά όργανα, όπως οι πνεύμονες και οι νεφροί, ενώ επιπλέον εμφανίζει και υψηλή θνησιμότητα. Χαρακτηριστικά της νόσου είναι οι δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού και αγγειακού συστήματος και προκαλούνται από δυσλειτουργίες κυτταρικών τύπων όπως τα ενδοθηλιακά κυτταρα του αγγειακού συστήματος, οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες. (Gabrielli et al) Αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί παράγουν εξωκυττάρια ουσία και έτσι συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας. Επιπλέον, στην εκδήλωση της ασθένειας συμβάλλουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η μόλυνση από ορισμένους ιούς, ενώ η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου. (Varga et al)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt είναι ένα εξελικτικά καλά συντηρημένο μονοπάτι, που εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες απαραίτητες για την εμβρυονική ανάπτυξη, όπως η εγκαθίδρυση πολικότητας των κυττάρων, η κυτταρική μετανάστευση και η οργάνωση του κυτταροσκελετού. (Badimon et al, Bergmann et al). Το μονοπάτι, φαίνεται να ενεργοποιείται ξανά σε ενήλικα άτομα υπό παθολογικές συνθήκες όπως σε φλεγμονώδεις και μεταβολικές διαταραχές. (Badimon et al) Η ρύθμιση του μονοπατιού Wnt γίνεται από διάφορους αναστολείς του, όπως οι SFRP, DKK και WIF που παρεμποδίζουν τη λειτουργία του. Επιπλέον, το μονοπάτι αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς και μεταγραφικούς παράγοντες PPAR $\gamma$ , οι οποίοι μέσω της πρόσδεσης τους στη  $\beta$ -κατενίνη μειώνουν τη σηματοδότηση και έτσι ασκούν ανασταλτική δράση στο μονοπάτι. (Dees et al, Vallée et al)

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκαν πολυμορφισμοί από 16 γενετικούς τόπους σχετικούς με το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt, και πιο συγκεκριμένα σε γονίδια που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς Frizzled και τους αναστολείς του μονοπατιού που προαναφέρθηκαν. Οι πολυμορφισμοί σε αυτούς τους γενετικούς τόπους γονοτυπήθηκαν με τη χρήση της πλατφόρμας αλληλούχησης Infinium™ Global Screening Array-24 v2.0 της Illumina και αναλύθηκαν με τη χρήση εφαρμογών βιοπληροφορικής. Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε είναι ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών ασθενών-υγιών μαρτύρων με στόχο την ανάδειξη διαφοροποιήσεων στις συχνότητες εμφάνισης πολυμορφισμών ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Από την ανάλυση συσχέτισης φάνηκε ότι οι συχνότητες εμφάνισης 17 πολυμορφισμών σε 10 από τους 16 γενετικούς τόπους που μελετήθηκαν διαφοροποιούνται στατιστικά σημαντικά, και ταυτόχρονα έχουν σχετικά συχνή

συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλομόρφου στους δύο πληθυσμούς υπό μελέτη (MAF>0,01).

Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, ενδιαφέρον παρουσιάζει ο rs10277895, ο οποίος εντοπίζεται σε ρυθμιστική περιοχή του γενετικού τόπου του γονιδίου *FZD1* και ταυτόχρονα βρίσκεται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με άλλους τρεις πολυμορφισμούς (rs4269465, rs9886318, rs28367367) που επίσης βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γενετικού τόπου του *FZD1*. Ακόμα, ο πολυμορφισμός σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι ενεργός σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών δέρματος. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης του στα υγιή άτομα είναι 0,11, που έρχεται σε αντίθεση με τη συχνότητα που εμφανίζεται στον γενικό πληθυσμό (MAF=0,22), γεγονός που δείχνει ότι το δείγμα δεν είναι αντιπροσωπευτικό και δε μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τον πιθανό ρόλο του στη νόσο. Επιπλέον, ο rs12537425 που εντοπίζεται επίσης στο γενετικό τόπο του *FZD1*, ενώ εντοπίζεται σε θέση μεταξύ γονιδίων βρίσκεται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με δύο πολυμορφισμούς (rs10953043, rs2115651) που έχουν βρεθεί σε ρυθμιστικές περιοχές του γενετικού τόπου του *FZD1*. Ακόμα, ο πολυμορφισμός rs113284507 του γενετικού τόπου του *FZD6* φαίνεται να έχει πιθανό ρόλο στη παθογένεια της ασθένειας, καθώς βρίσκεται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με έναν πολυμορφισμό, τον rs111403153, ο οποίος εδράζεται σε ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *FZD6*.

Ακόμα ένας πολυμορφισμός που εμφανίζει ενδιαφέρον, είναι ο rs10510410, ο οποίος εδράζεται σε ιντρόνιο του γενετικού τόπου του *PPARG*, και επιπλέον έχει βρεθεί ενεργό σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών του δέρματος ενώ ταυτόχρονα βρίσκεται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης με άλλα ιντρονικά SNP του ίδιου γενετικού τόπου.

Ως προς τους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν να διαφοροποιούνται στην ανάλυση, απαιτείται να διερευνηθεί ο λειτουργικός τους ρόλος, καθώς και το ενδεχόμενο να αποτελούν δείκτες για άλλους πολυμορφισμούς με τους οποίους βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης. Επίσης είναι απαραίτητες οι έρευνες σε μεγαλύτερο πληθυσμό για καλύτερο προσδιορισμό των πολυμορφισμών που διαφοροποιούνται.

Ακόμα, τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν φαίνεται να είναι καλοί υποψήφιοι για περεταίρω έρευνα, με σκοπό τη κατανόηση της ανοσορρυθμιστικής τους δράσης και τη συμμετοχή τους σε παθολογικές καταστάσεις όπως η συστηματική σκλήρυνση, προκειμένου να αποτελέσουν στόχο για τη θεραπεία και πρόληψη της νόσου.

## **Βιβλιογραφία**

1. Allanore, Y., Simms, R., Distler, O., Trojanowska, M., Pope, J., Denton, C. P., & Varga, J. Systemic sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 1 (2015).
2. Paula S. Ramos, Richard M. Silver, Carol A. Feghali – Bostwick ‘Genetics of Systemic Sclerosis’ *Current Opinion*, 2015
3. Yannick Allanore, Philippe Dieude and Catherine Boileau, ‘Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage’ *RHEUMATOLOGY*, 2010
4. Gloria Salazar, MD and Maureen D. Mayes, ‘Genetics, Epigenetics and Genomics of Systemic Sclerosis’ *HHS Public Access*, 2015
5. Yangyang Luo, Yaoyao Wang, Qing Yang, Rong Xiao, Qianjin Lu. Systemic sclerosis: Genetics and epigenetics, *Journal of Autoimmunity* 41(2013)
6. Gabrielli A., Avvendimento EV., Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* (2009) 360: 1989-2003
7. Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, Postlethwaite AE. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6(JUN). doi:10.3389/fimmu.2015.00272
8. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* (2007) 117:557–67.10.1172/JCI31139
9. Patnala R. et al Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genetics* 2013, 14:39
10. Pers T.H et al. Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions. *Nat Commun.* 6, 5890 (2015)
11. Lina Badimon and Maria Borrell-Pages, Wnt signaling in the vessel wall, Vol. 24 No. 3, May 2017
12. Christina Bergmann and Jörg HW Distler, Canonical Wnt signaling in systemic sclerosis, *Laboratory Investigation* (2016) 96, 151–155
13. 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
14. Alexandre Vallée, Jean-Noël Vallée, Yves Lecarpentier. Metabolic reprogramming in atherosclerosis: Opposed interplay between the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway and PPAR $\gamma$ . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 133 (2019)

15. Dees C., Schlottmann I., Funke R. et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73:1232-1239
16. MacDonald BT., Tamai K., He X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms and diseases
17. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira MAR, Bender D., Maller J., Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ and Sham PC (2007) PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*
18. Jun Wei, Feng Fang, Anna P. Lam, Jennifer L. Sargent, Emily Hamburg, Monique E. Hinchcliff, Cara J. Gottardi, Radhika Atit, Michael L. Whitfield, and John Varga, 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
19. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* (2007) 117:557–67.10.1172/JCI31139
20. Allanore, Y. et al. Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet.* 7, e1002091 (2011).
21. Corman BD., Ciswell LA. Recent advances in the genetics of systemic sclerosis: Toward biological and clinical significance. *Curr Rheumatol Rep* (2015) 17:21
22. Agarwal SK., Tan FK., Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma. *Rheum Dis Clin N An* 34(2008) 17-40
23. Agarwal SK. The genetics of Systemic Sclerosis. *Discov Med.* 2010 August; 10(51): 134-143
24. Maureen D. Mayes. The genetics of scleroderma: looking into the postgenomic era. *Curr Opin Rheumatol.* 2012 November; 24(6): 677-684
25. 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
26. Karl Willert and Roel Nusse, Wnt Proteins, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:a007864
27. Frost J., Estivilli X., Ramsay M., Tikly M. Dysregulation of the Wnt signaling pathway in South African patients with diffuse systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*, September (2018)
28. Akhmetshina A., Palumbo K., Dees C., Bergmann C., Venalis P., Zerr P., Horn A., Kireva T., Beyer C., Zwerina J., Schneider H., Sadowski A., Riemer MO., MacDougald OA., Distler O., Schett G., Distler J. Activation of canonical Wnt signaling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nature Communications.* March(2012)

29. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul; 13(7): 513–532.