ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

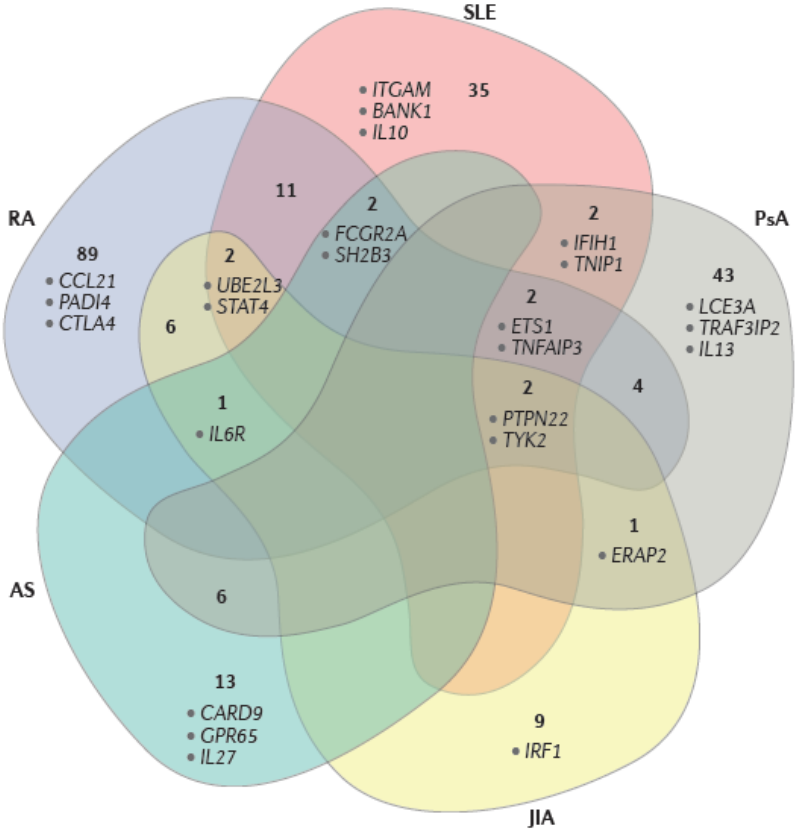
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

& ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ,

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της επικάλυψης σε γενετικό επίπεδο μεταξύ των νοσημάτων της Ρευματοειδούς Αρθρίτιδας και της Ψωριασικής Αρθρίτιδας.



Διδακτορική Διατριβή

Ευσεβία Μυρθιανού

Ηράκλειο 2018

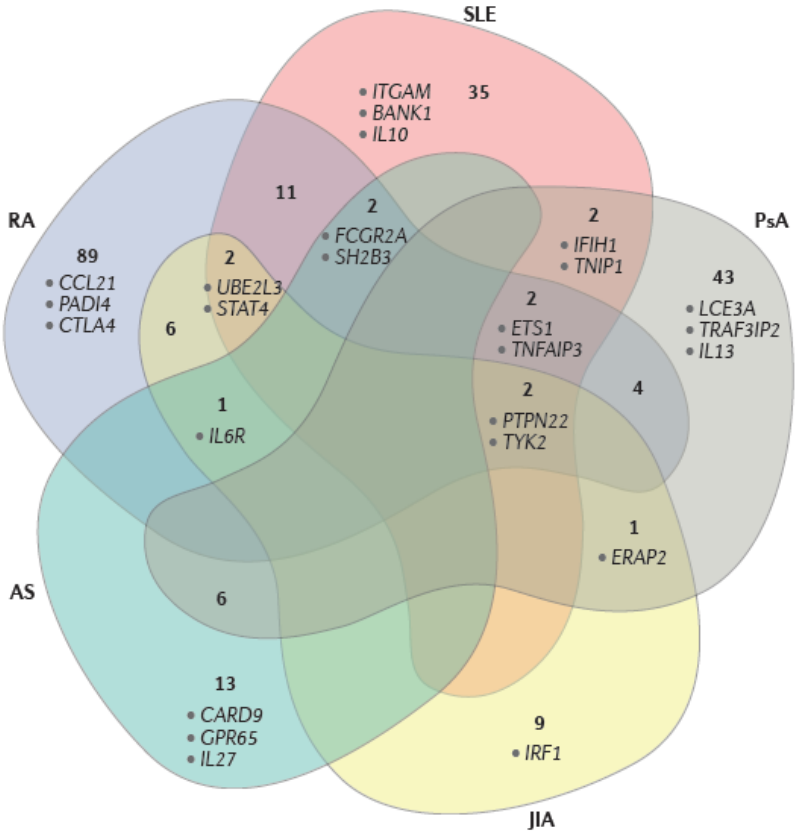
UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF MEDICINE

LABORATORY OF MOLECULAR PATHOLOGY & HUMAN GENETICS,

DEVISION OF INTERNAL MEDICINE

Study of the genetic overlap between the diseases of rheumatoid and psoriatic arthritis.



Ph.D. Thesis

Efsevia Myrthianou

Heraklion 2018

Επιβλέπων Διδακτορικής Διατριβής

Γεώργιος Ν. Γουλιέλμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεώργιος Ν. Γουλιέλμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πρόδρομος Σιδηρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ρευματολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτριος Καρδάσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος Ν. Γουλιέλμος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Πρόδρομος Σιδηρόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ρευματολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτριος Καρδάσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Σουρβίνος, Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κωνσταντίνος Κρασαγάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Μπερτσιάς, Επίκουρος Καθηγητής Ρευματολογίας - Κλινικής Ανοσολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διαμαντής Κοφτερίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Effie Myrthianou

Address : Kritis 10 Gazi, 71 414, Heraklion Crete
Tel. numbers : 6972194190
E- mail : e.myrthianou@med.uoc.gr
Date of birth : 29/04/1988

EDUCATION

2006 - 2010	Bachelor of Science, Degree in Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece.

WORK EXPERIENCE

07/2008 - 09/2008	Microbiology Lab, Private Clinic, Creta InterClinic. (Practice)
05/2011 - 12/2011	Biochemist at Creta InterClinic
12/2011 - 09/2012	Research Assistant at Laboratory of Molecular Medicine and Human Genetics, Medical School, University Of Crete, Heraklion, Crete
10/2012 - today	PhD candidate at Laboratory of Molecular Medicine and Human Genetics, Medical School, University Of Crete, Heraklion, Crete. Thesis title: ‘’Study of the genetic overlap between the diseases of rheumatoid and psoriatic arthritis.’’

FOREIGN LANGUAGES

English	First Certificate in English, University of Cambridge

THESIS

Title : Phylogeny of genus *Saga* using molecular markers, Laboratory of Genetics, Comparative and Evolutionary Biology, University of Thessaly, 2010

COMPUTER QUALIFICATIONS

Excellent knowledge of : The Internet and World Wide Web, Windows XP, Windows Vista, Windows 7, Windows 10 operating systems, Microsoft Office

CONFERENCES

1. Seminar: "Prevention in gynecology, Cancer - Contraception", Scientific Society of Medical Students of Greece, Department of Medicine, Larissa, 2010

2. "59th National Conference of Biochemistry and Molecular Biology", Athens, 2007

3. "International symposium : Genomics & Nanotechnology in Biomedicine", Institute of Biomedical Research and Technology, Larissa

4. "Next Generation Sequencing Technologies & Informatics tools for studying Marine Biodiversity & Adaptation", 1 – 3 October 2012 Institute of Marine Biology and Genetics, Hellenic Centre for Marine Research (HCMR), Crete, Greece.

5. 17th Pancretan Medical Congress, 30 October – 2 November 2014, Hotel Atlantis, Heraklion Crete

6. Laboratory Safety Seminar, IMBB-FORTH, January 2017, Heraklion Crete

PUBLICATIONS

1. Themistoklis Giannoulis, Anne Marie Dutrillaux, Michèle Lemonnier-Darcemont, Christian Darcemont, **Effie Myrthianou**, Costas Stamatis, Bernard Dutrillaux, Zissis Mamuris. Molecular phylogeny of European *Saga*: comparison with chromosomal data. *Bulletin of Insectology* 2011;64 (2): 263-267.

2. V. Vazgiourakis, M.I. Zervou, E. Eliopoulos, S. Sharma, P. Sidiropoulos, B.S. Franek, **E. Myrthianou**, M. Melissourgaki, T. Niewold, D.T. Boumpas and G.N. Goulielmos. Implication of VEGFR2 in Systemic Lupus Erythematosus: A combined genetic and structural biological approach. Clinical and Experimental Rheumatology 2013;31 (1): 97-102.

3. D.G. Dimopoulou, M.I. Zervou**,** M. Trachana, **E. Myrthianou**, J. Pratsidou-Gertsi, A. Garyfallos and G.N. Goulielmos. Investigation of juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci: Results from a Greek population. Human Immunology 74 (2013) 1194–1198.

4. M.I. Zervou, **E. Myrthianou**, I. Flouri, D. Plant, P. Rapsomaniki, D.T. Boumpas, A. Barton, P. Sidiropoulos and G.N. Goulielmos (2013). Genetic association of rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF medication: Results from a homogeneous Greek population. PLoS ONE 8(9):e74375.

5. G.N. Goulielmos, M.I. Zervou, **E. Myrthianou**, A. Burska, T.B. Niewold and F. Ponchel (2016). Genetic data: the new challenge of personalized medicine, insights for Rheumatoid Arthritis patients. GENE 583(2):90-101.

6. Myrthianou E, Zervou MI, Budu-Aggrey A, Eliopoulos E, Kardassis D, Boumpas DT, Kougkas N, Barton A, Sidiropoulos P, Goulielmos GN (2017). Investigation of the genetic overlap between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in a Greek population. Scand J Rheumatol 46(3):180-186.

BOOK CHAPTERS

1. F. Ponchel, A. Burska, G. N. Goulielmos, **E. Myrthianou** (2014). IL-7 in Rheumatoid Arthritis: Pathogenesis, Biomarker and Rational for Anti-IL-7 Therapy. In "Characterization, Clinical Applications and Health Effects", Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788 USA.

ABSTRACTS IN INTERNATIONAL CONFERENCES

1. M.I. Zervou, E. Eliopoulos, V. Vazgiourakis, S. Sharma, P. Sidiropoulos , B.S. Franek, **E. Myrthianou**, M. Melissourgaki, T.B. Niewold, D.T. Boumpas, G.N. Goulielmos (2012). Ann Rheum Dis 2012, in press. Implication of VEGFR2 in systemic lupus erythematosus: a combined genetic and structural biological approach. EULAR Meeting, Berlin, Germany, 6 - 9 June 2012. Annals Rheumatic Diseases 2012;71 (suppl.13):638

2. M.I. Zervou, P. Sidiropoulos, **E. Myrthianou**, I. Flouri, D. Plant, P. Rapsomaniki,, A. Barton, D.T. Boumpas, and G.N. Goulielmos (2013). Lack of association of variants previously associated with anti-TNF medication response in rheumatoid arthritis patients: Results from a homogeneous Greek population. Abstracts of the 33nd European Workshop of Rheumatology Research, , March 23-25. *Ann Rheum Dis* 72 (Suppl. 1): A53.

3. D.G. Dimopoulou, M. Trachana, M.I. Zervou, P. Pratsidou, **E. Myrthianou**, G.N. Goulielmos and A. Garyfallos (2013). Investigation of juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci: Results from a Greek population. EULAR Meeting, Madrid, Spain, 12-15 June 2013. *Ann Rheum Dis* 72 (Suppl. 3): A787.

4. **Myrthianou E.**, Zervou M.I., Kougas N., Repa A., Melissourgaki M., Kabouraki E., Boumpas D.T., Sidiropoulos P. and Goulielmos G.N. (2014). Assessment of the genetic overlap between rheumatoid and psoriatic arthritis in the genetic homogeneous population of Crete, Greece. XV. Mediterranean Congress of Rheumatology, August 28-31, Istanbul, Turkey. Clinical and Experimental Rheumatology (Suppl. 83): S101.

5. **E. Myrthianou**, M. I. Zervou,, N. Kougas, M. Terizaki, D. T. Boumpas, D. Kardassis, P. Sidiropoulos, G. N. Goulielmos (2015). INVESTIGATION OF THE GENETIC OVERLAP BETWEEN RHEUMATOID AND PSORIATIC ARTHRITIS IN A GENETIC HOMOGENEOUS POPULATION OF GREECE. EULAR Meeting, Rome, Italy, 10-13 June 2015. Ann Rheum Dis 74 (Suppl. 2): 892.

6. **E. Myrthianou**, M. I. Zervou, A. Budu-Aggrey, E. Eliopoulos, N. Kougkas, D. Kardassis, A. Barton, D. T. Boumpas, P. Sidiropoulos, G. N. Goulielmos (2016). ASSESSMENT OF RHEUMATOID AND PSORIATIC ARTHRITIS SUSCEPTIBILITY LOCI IN A GENETIC HOMOGENEOUS POPULATION OF GREECE. EULAR Meeting, London, UK, 8-11 June 2016. Ann Rheum Dis 75 (Suppl. 2): 899.

7. G. N. Goulielmos, R. Chiaroni-Clarke, D. G. Dimopoulou, M. I. Zervou, M. Trachana, P. Pratsidou-Gertsi, **E. Myrthianou**, A. Garyfallos, J. Ellis (2016). JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS ASSOCIATION OF PTPN22 RS2476601 SNP IS SPECIFIC TO FEMALES IN A GREEK POPULATION. EULAR Meeting, London, UK, 8-11 June 2016. Ann Rheum Dis 75 (Suppl. 2): 668.

CONTRIBUTION TO APPROVED PROJECTS

National Grants:

a. General secretariat for research and technology

I) Synergasia: (9/12/11-08/06/13) “Targeted strategies for new treatments of cardiovascular and inflammatory diseases based on the protective effects of high density lipoprotein (HDL).”

II) Synergasia: (09/06/13-08/06/14) “Exploring new inflammatory mechanisms in chronic autoinflammatory and autoimmune diseases such as Familial Mediterranean Fever and other periodic fever syndromes, gout, Crohn's disease, rheumatoid arthritis and its subtypes such as Still's disease.”

b. ELKE University of Crete

I) Program: (2012) “Familial Mediterranean fever: Use of modern technologies to find new genes involved in the pathogenesis of the disease.”
II) Program: (2013) “Personalized Medicine in Rheumatology: Finding genetic markers associated with a better response to treatment with biological agents (anti-TNF agents).”
III) Program: (2014) “Juvenile Idiopathic Arthritis: Finding genetic markers associated with increased susceptibility to the disease and possible therapeutic implications.”
IV) Program: (2015) “Rheumatoid Arthritis: Studying the possible association of IL7 / IL-7R signaling pathway with increased susceptibility to the disease and exploring new therapeutic targets.”
V) Program: (2016) “A genetic model composed of the protein IRF5, IFNα and autoantibodies can contribute to the understanding of systemic lupus erythematosus pathogenesis.”

EDUCATION OF YOUNG RESEARCHERS

A) Participation in the preparation and teaching of the undergraduate course "Basic Research in Medicine", Medical School, University of Crete.

B) Participation in the preparation and teaching of the course "Introduction to Research Methodology", Postgraduate Program "Optics and Vision", Medical School, University of Crete.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Παθολογίας και Γενετικής του Ανθρώπου, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για εμένα αποτέλεσε μία τεράστια εμπειρία, με έντονες στιγμές, με απογοητεύσεις και χαρές, γεμάτη ενδιαφέροντες ανθρώπους και με βοήθησε να ωριμάσω τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Τελειώνοντας λοιπόν τη διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν σε αυτή, είτε άμεσα είτε έμμεσα.

Αρχικά και πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής, Γεώργιο Γουλιέλμο, ο οποίος ήταν εκείνος που πίστεψε από την αρχή στις δυνατότητές μου, μου ανέθεσε την παρούσα διατριβή και βρέθηκε συνεχώς δίπλα μου, προσφέροντάς μου απεριόριστη βοήθεια, καθοδήγηση και πολύτιμες συμβουλές. Νοιώθω απόλυτο σεβασμό προς το πρόσωπό του, καθώς υπήρξε σημαντικός δάσκαλος και μου εμφύσησε το πάθος του για την έρευνα, αλλά παράλληλα μου δίδαξε ότι το να είσαι σωστός άνθρωπος είναι το πιο σημαντικό από όλα. Σας ευχαριστώ ειλικρινά.

Ευχαριστώ πολύ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ρευματολογίας κ. Πρόδρομο Σιδηρόπουλο για τη συνεργασία του στη γεφύρωση εργαστηρίου και κλινικής, στην παροχή ερευνητικών δειγμάτων καθώς και για την συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Σημαντική και ουσιαστική η συνεισφορά του καθηγητή κ. Ηλία Ηλιόπουλου από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στην in-silico μελέτη των δομικών μοντέλων και του καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Δημήτρη Καρδάση για το μοντέλο πρόβλεψης της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Τους ευχαριστώ ιδιαιτέρως.

Εξίσου σημαντική και πολύτιμη η συνεισφορά της κας Μαίρης Ζερβού, μέλους Ε.ΔΙ.Π του τομέα παθολογίας της Ιατρικής σχολής Κρήτης, η οποία βοήθησε αποτελεσματικά και προσέφερε τα μέγιστα τόσο επιστημονικά όσο και ηθικά. Μαίρη μου, σε ευχαριστώ θερμά για την άψογη συνεργασία και την ανεκτίμητη βοήθεια.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Ρευματολογικής κλινικής του ΠΑΓΝΗ, για τη συνεργασία κατά τη διάρκεια συλλογής των δεδομένων και των δειγμάτων των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Γ.Σουρβίνο, κ. Κ.Κρασαγάκη, κ. Γ.Μπερτσιά και κ. Δ.Κοφτερίδη για την εξέταση της διατριβής μου.

Τελειώνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου, Μανόλη και Περσεφόνη, καθώς και στις αδερφές μου, οι οποίοι με στήριξαν ηθικά και υλικά σε όλα τα χρόνια της φοιτητικής μου πορείας, στηρίζοντας πάντα τις επιλογές μου, αλλά και στον Χρήστο που πάντα είναι δίπλα μου και με κάνει καλύτερο άνθρωπο.

Τη διδακτορική αυτή διατριβή αφιερώνω,

στην γιαγιά Στέλλα….

Περιεχόμενα

Περίληψη 13

Abstract 16

Συντομογραφίες 19

1. Εισαγωγή 21

Γενετική των νοσημάτων του ανθρώπου 21

Η μοριακή γενετική και η γενετική ανάλυση στα πολυπαραγοντικά νοσήματα 23

Βασικές έννοιες και ορισμοί στη μοριακή γενετική του ανθρώπου 24

Γενετική ποικιλομορφία σε άτομα και πληθυσμούς 26

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα 29

Μελέτες χαρτογράφησης και μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στην απομόνωση γονιδίων που ευθύνονται για νοσήματα 31

Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Genome Wide Association Studies, GWAS) και σύνθετες νόσοι 35

Η «χαμένη» κληρονομικότητα των σύνθετων νόσων 40

Στόχοι της γενετικής έρευνας 43

Αυτοανοσία και αυτοάνοσα νοσήματα 45

Ρευματοειδής αρθρίτιδα 49

Επιδημιολογία και κλινικά χαρακτηριστικά, διάγνωση, θεραπεία και πρόγνωση 49

Παθογενετικοί μηχανισμοί 56

Η μοριακή γενετική της ρευματοειδούς αρθρίτιδας 63

Ψωριασική αρθρίτιδα 65

Επιδημιολογία και κλινικά χαρακτηριστικά, διάγνωση, θεραπεία και πρόγνωση 65

Παθογενετικοί μηχανισμοί 71

Η μοριακή γενετική της ψωριασικής αρθρίτιδας 74

Πλειοτροπισμός των γονιδίων και γενετική επικάλυψη διαφόρων νοσημάτων 75

Γενετική επικάλυψη μεταξύ των νοσημάτων της ρευματοειδούς και της ψωριασικής αρθρίτιδας 78

Σκοπός της παρούσας μελέτης 82

2. Ασθενείς, υλικά & μέθοδοι 83

Ασθενείς και ομάδα ελέγχου 83

Εκχύλιση ολικού γενωμικού DNA 84

Ανάλυση πολυμορφισμών στα γονίδια *PLCL2, CCL21, REL, STAT4, CD226* και *TYK2* . 84

Ανάλυση του πολυμορφισμού rs2476601 του γονιδίου *PTPN22* 86

Κατασκευή τρισδιάστατου μοντέλου της TYK2 87

Στατιστική ανάλυση 88

3. Αποτελέσματα 89

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs2812378 του γονιδίου *CCL21* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 89

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs4535211 του γονιδίου *PLCL2* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 91

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs13017599 του γονιδίου *REL* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 93

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs10181656 του γονιδίου *STAT4* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 96

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs763361 του γονιδίου *CD226* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 98

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs34536443 του γονιδίου *TYK2* στην ΡΑ και στην ΨΑ. 101

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs2476601 του γονιδίου *PTPN22* στην ΡΑ και στην ΨΑ. . 105

4. Συζήτηση 108

5. Βιβλιογραφία 117

Πρωτότυπη δημοσίευση 140

Περίληψη

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) είναι μία αυτοάνοση, φλεγμονώδης κατάσταση των αρθρώσεων με σύνθετο γενετικό υπόβαθρο, που επηρεάζει πάνω από το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού. Εδώ και αρκετά χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει αποκαλυφθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής προδιάθεσης για τη νόσο οφείλεται στο γονίδιο *HLA–DRB1*. Πέρα από το συγκεκριμένο γονίδιο, έχουν μελετηθεί ακόμα πολλά γονίδια και έχουμε φτάσει σήμερα στο σημείο να γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πάνω από 100 γενετικοί τόποι που συνεισφέρουν στην παθογένεια της νόσου. Η ψωριασική αρθρίτιδα (ΨΑ) είναι και αυτή μία σύνθετη νόσος που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονώδη αρθρίτιδα παρουσία ψωρίασης. Συγκεκριμένα, το 30% περίπου των ασθενών με ψωρίαση αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα. Το γενετικό υπόβαθρο της νόσου είναι πολύ ισχυρό.

Οι δύο παραπάνω νόσοι μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι η ανταπόκριση σε παρόμοιες θεραπείες. Επιπλέον, και οι δύο αποτελούν σύνθετες νόσους που συσχετίζονται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου. Τα τελευταία χρόνια έχει επιτελεστεί μεγάλη πρόοδος στο πεδίο της αποκάλυψης γονιδίων προδιάθεσης για την ΡΑ. Αξιοσημείωτη είναι και η πλειοτροπική δράση γονιδίων που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ΡΑ. Τα περισσότερα από αυτά έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως είναι ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 (ΣΔ1), ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ), η Ψωρίαση και η Κοιλιοκάκη. Τα παραπάνω αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων, σε αντίθεση με την ψωριασική αρθρίτιδα που είναι ορορνητική. Εντούτοις, δεδομένης της μεγάλης επικάλυψης των κλινικών χαρακτηριστικών και εκδηλώσεων μεταξύ της ΡΑ με την ΨΑ, αναμένεται να υπάρχει επικάλυψη και στο γενετικό υπόβαθρο. Γι' αυτό το λόγο, κάποιες ερευνητικές ομάδες στο διεθνή χώρο διεξάγουν μελέτες ώστε να αποσαφηνίσουν εάν υπάρχει κοινό γενετικό υπόβαθρο μεταξύ των διαφόρων νοσημάτων.

Η άποψη ότι υπάρχουν γονίδια που προδιαθέτουν για πολλαπλά αυτοάνοσα νοσήματα υπάρχει εδώ και πολλά χρόνια. Πράγματι, τόσον η περιοχή *HLA* όσο και τα γονίδια *PTPN22* και *CTLA-4* είναι γνωστό ότι συσχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων (κυρίως αυτοάνοσων) νοσημάτων. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι ότι μεγάλο

ποσοστό των γενετικών τόπων που σχετίζονται με την ρευματοειδή αρθρίτιδα σχετίζονται επίσης με τη νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα (NIA). Επιπλέον, σημαντικού βαθμού επικάλυψη υπάρχει και στους γενετικούς τόπους που έχουν συσχετιστεί με ΣΔ1, με κοιλιοκάκη, με τη νόσο (κοκκιωμάτωση) του GRAVE'S και τη ΡΑ. Όσον αφορά την ψωριασική αρθρίτιδα (ΨΑ) και την πιθανή γενετική επικάλυψη της με τη ΡΑ, πολύ λίγες μελέτες έχουν γίνει μέχρι σήμερα.

Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το Μάρτιο του 2012, οι ερευνητές επιχείρησαν να ελέγξουν 54 πολυμορφισμούς σε 41 γονίδια που ήταν ήδη γνωστό ότι προδιαθέτουν για την εμφάνιση ΡΑ σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών Ευρωπαϊκής καταγωγής με ΨΑ. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ισχυρή συσχέτιση με τα γονίδια *REL, PLCL2* και *CCL21*. Αυτά τα πρώτα στοιχεία μας παρότρυναν να μελετήσουμε κάποια συγκεκριμένα γονίδια σε διαφορετικό πληθυσμό προκειμένου να εμβαθύνουμε στο θέμα της πιθανής γενετικής επικάλυψης των δύο νοσημάτων και να μπορέσουμε να αποκτήσουμε μια πιο αξιόπιστη εικόνα.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής ύπαρξης γενετικής συσχέτισης μέσω κάποιου κοινού γενετικού υπόβαθρου, μεταξύ των νοσημάτων της ρευματοειδούς και της ψωριασικής αρθρίτιδας σε ασθενείς από τον Κρητικό πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε πολυμορφισμούς των γονιδίων *PLCL2, CCL21, REL, STAT4, CD226, PTPN22* και *TYK2* σε ομάδες ασθενών και υγιών ατόμων. Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση ασθενών και υγιών ατόμων και αφότου έγινε στατιστική επεξεργασία σε επίπεδο αλληλομόρφων και γονοτύπων εξήχθησαν συμπεράσματα για την συσχέτιση του κάθε γενετικού πολυμορφισμού με τα υπό μελέτη νοσήματα. Παράλληλα, στο δεύτερο μέρος, προσεγγίστηκε η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης TYK2 και χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα και αλγόριθμοι βιοπληροφορικής για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις πιθανές λειτουργικές επιπτώσεις κάποιων πολυμορφισμών που μελετήθηκαν στην πρωτείνη αυτή αναφορικά με την ανάπτυξη των υπό μελέτη νοσημάτων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική γενετική συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου GC του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) rs34536443 του γονιδίου *TYK2* και των δύο νοσημάτων, ΡΑ και ΨΑ. Επίσης,

αποκαλύφθηκε ότι το αλληλόμορφο C του συγκεκριμένου SNP συσχετίστηκε μόνο με την ΨΑ. Ταυτόχρονα, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη γενετικής συσχέτισης μεταξύ του γενετικού πολυμορφισμού rs10181656 του γονιδίου *STAT4* με την ΨΑ τόσο σε επίπεδο γονοτύπου (GG γονότυπος) όσο και σε επίπεδο αλληλομόρφων (G αλληλόμορφο). Όσον αφορά στο γονίδιο *CD226,* αποκαλύφθηκε γενετική συσχέτιση του γονοτύπου TC του πολυμορφισμού rs763361 μόνο με την ΨΑ αλλά όχι με τη ΡΑ. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν το γεγονός ότι κανένας από τους υπόλοιπους τέσσερεις γενετικούς πολυμορφισμούς που μελετήσαμε [rs4535211 (*PLCL2*), rs2812378 (*CCL21*), rs13017599 (*REL*) και rs2476601 (*PTPN22*)] δεν βρέθηκε να σχετίζεται με ρευματοειδή ή ψωριασική αρθρίτιδα.

Στην προσπάθεια να διερευνήσουμε τις λειτουργικές επιπτώσεις αυτών των ευρημάτων, ελέγξαμε τον πιθανό ρόλο του γενετικού πολυμορφισμού rs34536443 του γονιδίου *TYK2* χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις της βιοπληροφορικής. Η αμινοξική αλλαγή που προκαλείται πιθανώς αλλάζει την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και επηρεάζει την αναδίπλωση (folding) και τις παραμέτρους αλληλεπίδρασης του μορίου, έχοντας ως τελική επίπτωση κάποιες αλλαγές στη λειτουργικότητά του. Σε ότι αφορά στον μελετηθέντα πολυμορφισμό του γονιδίου *STAT4*, η ανάλυση της αλληλουχίας που εδράζεται ο πολυμορφισμός μας αποκάλυψε ότι το μείζον αλληλόμορφο «C», και όχι το έλασσον «G», συμβάλλει στην δημιουργία μιας πιθανής θέσης πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Pax-4, PPAR/RXR και ZNF99. Για τον πολυμορφισμό που μελετήσαμε στο γονίδιο *CD226,* αναλύσαμε λεπτομερώς το ήδη υπάρχον τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης και προτείνουμε ότι η ύπαρξη σερίνης στην αμινοξική θέση #307 πιθανώς συμμετέχει σε πολικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν γειτονικά φορτισμένα αμινοξέα ή θέσεις φωσφορυλίωσης.

Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαφέρουν σε σχέση με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, κάνει εμφανές το πόσο σημαντική είναι η διεξαγωγή συγκριτικών μελετών, που να περιλαμβάνουν διαφορετικούς εθνικούς ή φυλετικούς πληθυσμούς, σε μια προσπάθεια να επιβεβαιωθεί η όποια γενετική συσχέτιση αποκαλύπτεται προκειμένου να καταστεί εφικτή η αποκάλυψη νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory condition of the joints with a complex genetic background that affects more than 1% of the world's population. It has been extensively studied for several years and it has been revealed that most of the genetic predisposition for the disease is due to the *HLA-DRB1* gene. In addition to this gene, many genes have been studied and we have now come to know that there are over 100 genetic loci contributing to the pathogenesis of the disease. Psoriatic arthritis (PsA) is also a complex disease characterized by chronic inflammatory arthritis in the presence of psoriasis. In particular, about 30% of patients with psoriasis develop psoriatic arthritis. The genetic background of the disease is very strong.

The two diseases share many features. Patients respond to similar treatments and in addition, both are complex diseases that are associated with genetic and environmental risk factors. In recent years, great progress has been made in the field of discovering predisposition genes for RA. A significant observation is the pleiotropic effect of genes that are risk factors for RA. Most of these genes have been associated with the appearance of other autoimmune diseases, such as Type 1 Diabetes (T1D), Lupus (SLE), Psoriasis (PS), and Coeliac Disease. These autoimmune diseases are characterized by the presence of autoantibodies, as opposed to psoriatic arthritis that is seronegative. However, given the large overlap of clinical features and manifestations between RA and PsA, it is expected to overlap on the genetic background as well. For the above reason, various international research teams are conducting studies to clarify whether there is a common genetic background between the various diseases.

The idea that there are genes that predispose to multiple autoimmune diseases has been around for many years. Indeed, both the HLA region and the *PTPN22* and *CTLA-4* genes are known to be associated with various diseases. One notable example is that almost all of the genetic loci associated with rheumatoid arthritis are also associated with juvenile idiopathic arthritis. In addition, a significant degree of overlap is present for the genes recognized for type I diabetes, with diseases such as celiac disease, Grave's disease (granulomatosis) and rheumatoid arthritis. Regarding psoriatic arthritis and its possible genetic overlap with rheumatoid arthritis, few studies have been undertaken so far.

In a study published in March 2012, researchers attempted to analyze 54 polymorphisms in 41 genes, already known to predispose for rheumatoid arthritis, in a large group of patients of European origin with psoriatic arthritis. The results of the analysis showed strong correlation with the *REL*, *PLCL2* and *CCL21* genes. These first encouraging results have prompted us to investigate specific genes in a different ethnic population in order to gain insight in the issue of a potential genetic overlap between RA and PsA. The purpose of the current study was to investigate the possible existence of a shared genetic background, between the diseases of rheumatoid and psoriatic arthritis, in patients from the island of Crete, Greece. More specifically, we selected for our study polymorphisms in the *PLCL2*, *CCL21*, *REL*, *STAT4*, *CD226*, *PTPN22* and *TYK2* genes both in patients and healthy individuals.

In the first part of the study, genotyping of patients and healthy individuals was performed and after statistical analysis at allelic and genotype level, conclusions were drawn for the correlation of the polymorphisms with the two diseases. In parallel, in the second part of the study, three-dimensional imaging methods were applied and bioinformatics tools were used to draw conclusions about the possible functional effects of some of the aforementioned polymorphisms.

The results of the analysis showed that there is a significant genetic association between the GC genotype of rs34536443 (*TYK2*) with PsA but also with RA. The C allele of this SNP was associated with PsA only. We also found correlation data with PsA for the GG genotype and the G allele of the *STAT4* gene (rs10181656 polymorphism). In addition, the TC genotype of the rs763361 polymorphism of the *CD226* gene was only associated with PsA but not with RA. The frequencies of the 1858C / T alleles of the *PTPN22* gene did not show significant difference between rheumatoid arthritis patients and healthy subjects, although the minor allele T was found to be more frequent in healthy individuals than in patients with psoriatic arthritis. However, the difference observed was not statistically significant. One interesting observation was that none of the three remaining polymorphisms that we studied [rs4535211 (*PLCL2*), rs2812378 (*CCL21*) and rs13017599 (*REL*)] were found to be associated with rheumatoid or psoriatic arthritis.

In an attempt to investigate the functional implications of these findings, we tested the polymorphism in *TYK2* by using bioinformatics tools. The nucleotide substitution probably alters the tertiary structure of the TYK2 protein and affects the folding and interaction parameters of the molecule, thus resulting in changes regarding its functionality. As regards with the *STAT4* gene polymorphism, analysis of the polymorphism-based sequence revealed that the major C allele rather than the minor G allele contributes to the creation of a potential binding site for the transcription factors Pax-4, PPAR / RXR and ZNF99. Thus, it can be hypothesized that the minor allele of rs10181656, which was found to have an increased frequency in PsA, may suppress T-cell activation through the disturbance of the binding of the PPARα/RXRα dimer. For the *CD226* gene polymorphism, we analyzed in detail the existing 3D models of this protein and we propose that the Ser307 residue is most likely to be involved in polar interactions associated with proximal charged residues or phosphorylation sites. By affecting the proximal phosphorylation sites or protein–protein subunit recognition, this mutation could alter the signaling cascade.

The different findings of the current study in comparison to previous ones highlights the importance of comparative studies that include different ethnic or racial populations, in any attempt to confirm genetic associations detected.

Συντομογραφίες

PA	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
ΨΑ	Ψωριασική αρθρίτιδα
ΣΔ1	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι
ΣΕΛ	Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος
HLA	Human leukocyte antigen
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4
NIA	Νεανική ιδιοπαθής αρθρίτιδα
PLCL2	Phospholipase C Like 2
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4
CD	Cluster of Differentiation
TYK2	Tyrosine Kinase 2
SNP	Single nucleotide polymorphism
Pax-4	Paired Box 4
PPAR/RXR	Peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor
ZNF99	Zinc Finger Protein 99
PS	Psoriasis
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
NGS	Next generation sequencing
LD	Linkage disequilibrium
MAF	Minor allele frequency
CNV	Copy number variant
GWAS	Genome wide association study
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
PRC	Polymerase chain reaction
AMD	Age-related macular degeneration
OR	Odds ratio
CI	Confidence interval
CD-CV	Common disease-common variant
CD-RV	Common disease-rare variant
IL2RA	Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha
IL2RB	Interleukin 2 Receptor Subunit Beta
AIDs	Autoimmune diseases
MHC	Major histocompatibility complex
PIP	Proximal interphalangeal
MLP	Metacarpophalangeal

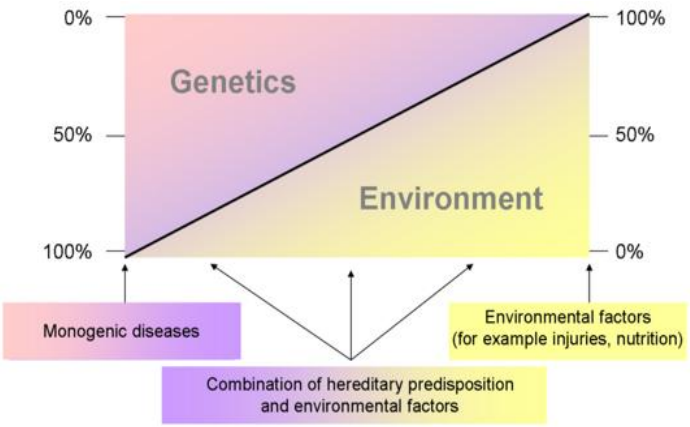
MTP	Metatarsophalangeal
DIP	Distal interphalangeal
TKE	Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών
CRP	C-reactive protein
RF	Rheumatoid factor
anti-CCP	Cyclic Citrullinated Peptide (CCP) Antibody
ACR	American college of rheumatology
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
DMARDs	Disease-modifying antirheumatic drugs
MTX	Methotrexate
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
PADI4	Peptidyl arginine deiminase, type IV
DCs	Dendritic cells
IL	Interleukin
ACPAs	Anti-citrullinated protein antibodies
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
EULAR	European League Against Rheumatism
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HWE	Hardy–Weinberg equilibrium
NK	Natural killer
BCR	B Cell Receptor
IFNγ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
OC	Osteoclast
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
GATA3	GATA Binding Protein 3
CCR6	Chemokine receptor 6
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator
TRAF1-C5	tumor necrosis factor-receptor associated factor 1/complement component 5
CASPAR	ClASsification for Psoriatic Arthritis
TNIP1	TNFAIP3-interacting protein 1
CSF2	Colony Stimulating Factor 2
FBXL19	F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 19
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
IBD	Inflammatory bowel disease
AFF3	AF4/FMR2 Family Member 3

1. *Εισαγωγή*

Γενετική των νοσημάτων του ανθρώπου

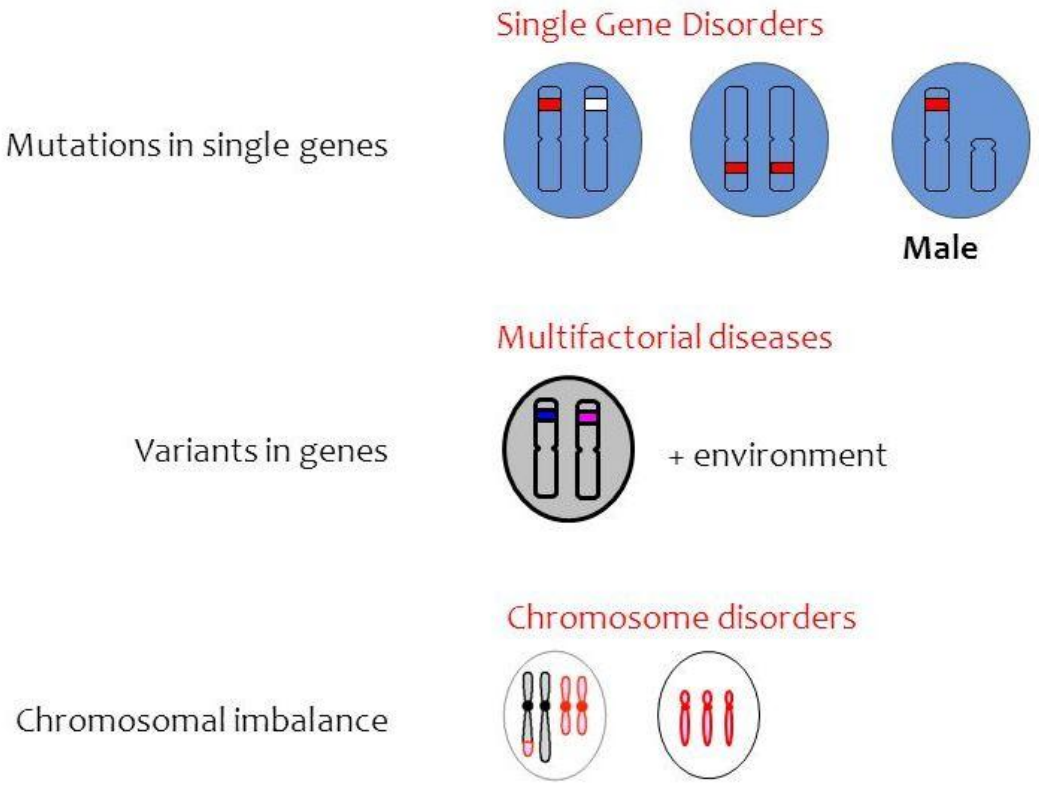
Η Γενετική είναι η επιστήμη των γονιδίων, της κληρονομικότητας και της ποικιλομορφίας των οργανισμών [1]. Αποτελεί έναν από τους σημαντικούς κλάδους της Βιολογίας και θεωρείται ότι είναι μια ραγδαία εξελισσόμενη επιστήμη. Από τα πειράματα του Mendel, που αποτέλεσαν τη βάση για τη ανάπτυξη της Γενετικής Επιστήμης, μέχρι σήμερα που η έρευνα πλέον γίνεται στο μοριακό επίπεδο, η ανάπτυξη της έγινε σε τέτοιο βαθμό που διακρίνεται σε αρκετούς επιμέρους κλάδους, την κλασική (Μενδελική) Γενετική, που βασίζεται στο φαινότυπο και για το λόγο αυτό προσεγγίζει έμμεσα τα γενετικά φαινόμενα, την Κυτταρογενετική, που ασχολείται με το γενετικό υλικό στο επίπεδο του κυττάρου (χρωμοσώματος), την Μοριακή Γενετική, η οποία ασχολείται με το γενετικό υλικό στο επίπεδο του γονιδίου, την Γενωμική, την Πληθυσμιακή Γενετική, την Επιγενετική, την Ιατρική Γενετική, την Φαρμακογενετική και τη Συμβουλευτική Γενετική [2].

Στον άνθρωπο, κάθε πολυπαραγοντικό νόσημα οφείλεται στη συνδυασμένη δράση γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων, αλλά ο ρόλος της γενετικής συνιστώσας μπορεί να είναι είτε σημαντικός είτε λιγότερο σημανικός **(Εικόνα 1.1)** [1].



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στα νοσήματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση και των δύο παραγόντων. (http://humangenetik.imd-berlin.de/en/human-genetics/molecular-genetics.html)

Μεταξύ των διαταραχών που προκαλούνται, εξ ολοκλήρου ή εν μέρει από γενετικούς παράγοντες, αναγνωρίζονται τρεις κύριοι τύποι: 1) οι Μονογονιδιακές διαταραχές (Single-gene disorders) που προκαλούνται από μετάλλαξη σε ένα μόνο γονίδιο και είναι σπάνιες, 2) οι Χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Chromosome disorders) που προκαλούνται από περίσσεια ή έλλειψη χρωμοσωμάτων ή τμημάτων τους και είναι αρκετά συχνές και 3) οι Πολυπαραγοντικές διαταραχές (Multifactorial diseases) που οφείλονται στην επίδραση πολλών γονιδίων σε συνδυασμό με την επίδραση εξωτερικών-περιβαλλοντικών παραγόντων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ορισμένες συγγενείς ανωμαλίες και τα χρόνια νοσήματα της ενηλίκου ζωής **(Εικόνα 1.2)** [3].



Εικόνα 1.2: Κατηγορίες γενετικών διαταραχών. (© 2009 NHS National Genetics Education and Development CentreGenetics and Genomics for Healthcare www.geneticseducation.nhs.uk Classification of Genetic.)

Η μοριακή γενετική και η γενετική ανάλυση στα πολυπαραγοντικά νοσήματα

Ένας από τους πρωταρχικούς στόχους της Ιατρικής Γενετικής και της Γενετικής του Ανθρώπου είναι η κατανόηση, σε μοριακό επίπεδο, της βάσης των μεταλλάξεων που οδηγούν σε γενετικές νόσους και η αξιοποίηση των γνώσεων αυτών για τη βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης και την πιθανή θεραπεία των γενετικών νοσημάτων. Όπως στους περισσότερους τομείς έρευνας, έτσι και στη Μοριακή Γενετική η πρόοδος στην κατανόηση της διευκολύνθηκε σημαντικά από την ανάπτυξη θεμελιωδών μεθοδολογικών και τεχνολογικών προσεγγίσεων. Η εφαρμογή επαναστατικών τεχνικών έχει βελτιώσει την κατανόηση των μοριακών διεργασιών σε όλα τα επίπεδα, από το γονίδιο ως τον πλήρη οργανισμό, και έχει αποτελέσει τη βάση για τον διαρκή εμπλουτισμό των εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης και διάγνωσης των γενετικών νόσων. Η αναγνώριση του ρόλου των γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της ανθρώπινης νόσου έχει κάνει την Κλινική Γενετική έναν από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους κλάδους της ιατρικής. Με την αξιοσημείωτη μείωση των λοιμωδών και των νοσημάτων της διατροφής στις αναπτυγμένες χώρες υπάρχει μια αυξανόμενη συνειδητοποίηση του ρόλου των γενετικών παραμέτρων στην ανθρώπινη νόσο [4][5]. Έχει αποκαλυφθεί (και μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό) ότι οι γενετικοί παράγοντες έχουν σημαντική συμμετοχή στην αιτιολογία των σπουδαιότερων πολυπαραγοντικών νοσημάτων, όπως είναι η στεφανιαία νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, οι μείζονες ψυχώσεις και τα αυτοάνοσα νοσήματα [6]. Μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία από την OMIM, έχουν ταυτοποιηθεί 3.714 γονίδια, μία ή περισσότερες μεταλλάξεις των οποίων αποτελούν την αιτία συγκεκριμένων νοσημάτων. Όσον αφορά τα πολυπαραγοντικά νοσήματα ξεχωριστά, έχουν μελετηθεί, ταυτοποιηθεί και καταχωρηθεί στην OMIM, 500 γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη 701 σύνθετων νόσων [7] **(Εικόνα 1.3)**.

OMIM Gene Map Statistics

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated March 13th, 2017) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	5,953
Total number of genes with phenotype-causing mutation	3,714

Class of phenotype	Phenotype	Gene *
Single gene disorders and traits	4,917	3,331
Susceptibility to complex disease or infection	701	500
"Nondiseases"	143	113
Somatic cell genetic disease	207	117

Εικόνα 1.3: Στοιχεία από τη βάση δεδομένων OMIM. (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {2017}. World Wide Web URL: https://omim.org/)

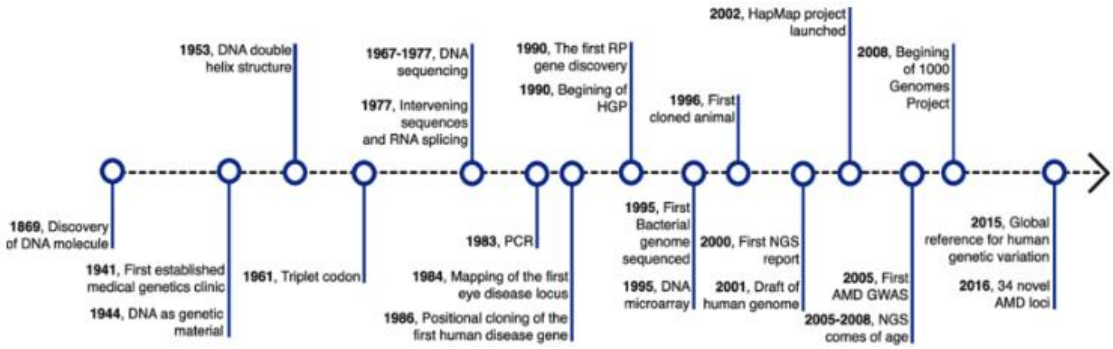
Μεγάλο μέρος αυτής της πληροφορίας έχει βρει άμεση εφαρμογή στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας των νοσημάτων και στην βελτίωση της διάγνωσης, της θεραπείας και του χειρισμού των ασθενών. Σημαντική επίσης είναι η συνεισφορά αυτών των εξελίξεων στον τομέα της πρόληψης ή/και αποφυγής των νοσημάτων μέσω της προγεννητικής διάγνωσης.

Βασικές έννοιες και ορισμοί στη μοριακή γενετική του ανθρώπου

Τα δεδομένα από την γενετική του ανθρώπου συσσωρεύονται με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό και οι αλληλουχίες ολόκληρου του γονιδιώματος για πολλαπλούς εθνικούς πληθυσμούς είναι τώρα δημόσια διαθέσιμες [8][9][10][11]. Η συνεχώς αυξανόμενη ανακάλυψη της ανθρώπινης γενετικής ποικιλότητας, διευκολύνει την κατανόηση της διαφοροποίησης της προδιάθεσης σε συχνές νόσους μεταξύ ατόμων και πληθυσμών, ενώ οι εξελίξεις στον τομέα της γενετικής έχουν βοηθήσει σημαντικά και στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας των θεραπευτικών φαρμάκων. Η γνώση αυτή

σχετίζεται με το θεμελιώδες ερώτημα της προέλευσης, των ομοιοτήτων και των διαφορών μεταξύ των ανθρώπων.

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της πλήρους αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) και κυρίως κατά την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στο πεδίο της έρευνας της γενετικής του ανθρώπου [12][13]. Σε αυτό συνέβαλλε η αναγνώριση μεγάλων αριθμών γενετικών δεικτών (HapMap Project), κυρίως SNPs, καθώς επίσης η ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς και συστοιχιών (Next Generation Sequencing, SNP arrays) που κατέστησαν δυνατή τη μαζική γονοτύπηση των SNPs και την κατανόηση της σχέσης μεταξύ γειτονικών SNPs και της ανισορροπίας σύνδεσης (LD, Linkage disequilibrium) [14][15]. Μαζί με νέες αναλυτικές τεχνικές, τα νέα αυτά εργαλεία παρέχουν ολοκληρωμένες, μεγάλης κλίμακας, μελέτες συσχέτισης των SNPs για τον προσδιορισμό γονιδίων και περιοχών που συμβάλλουν είτε στην προδιάθεση για ανάπτυξη ενός νοσήματος είτε σε άλλα χαρακτηριστικά [16]. Με αυτόν τον τρόπο, ανακαλύπτονται συνεχώς καινούρια γονίδια, παραλλαγές γονιδίων αλλά και βιολογικά μονοπάτια που συνδέονται με ένα ή περισσότερα σύνθετα χαρακτηριστικά και συχνές νόσους **(Εικόνα 1.4)**.



Εικόνα 1.4: Χρονοδιάγραμμα της γενετικής του ανθρώπου. Οι εφαρμογές που βασίζονται σε NGS, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιοϊατρική έρευνα. Εδώ παρουσιάζονται με χρονολογική σειρά οι πιο σημαντικές επιστημονικές και τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της γενετικής, από την ανακάλυψη του μορίου του DNA μέχρι σήμερα. Η πρώτη μελέτη με τεχνολογία NGS δημοσιεύθηκε μια δεκαετία μετά την έναρξη του Human Genome Project [17].

Πολλοί φαινότυποι είναι ποσοτικής φύσεως και σύνθετης αιτιολογίας με πολλαπλές περιβαλλοντικές και γενετικές αιτίες. Τα διάφορα χαρακτηριστικά ποικίλουν σημαντικά και μπορεί να είναι ψυχιατρικές διαταραχές, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνος, ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, όπως το ύψος και το βάρος, μετρήσεις παραμέτρων στο αίμα καθώς και χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς, όπως η νοημοσύνη. Η παρατήρηση όμως ότι τα σύνθετα αυτά χαρακτηριστικά συναθροίζονται σε σχέση με τη γενετική συγγένεια, υποδηλώνει την παρουσία κληρονομικότητας. Οι πρόοδοι στη θεωρητική και πειραματική γενετική, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων και εργαλείων βιοπληροφορικής αλλά και η υψηλής απόδοσης γενωμική, παρέχουν μία πρωτοφανή θεώρηση στον τρόπο κληρονομικότητας και στη γενετική αρχιτεκτονική των σύνθετων νόσων [18][19].

Γενετική ποικιλομορφία σε άτομα και πληθυσμούς

Ως άτομα, μοιραζόμαστε περίπου το 99,5% - 99,9% της γενετικής μας σύνθεσης. Το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής μας διαφοράς, δεν έχει καμία επίδραση στον φαινότυπο και καμία άμεση επίδραση στην υγεία μας. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι απλά μέρος αυτού που μας κάνει όλους μοναδικούς. Ωστόσο, ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτής της γενετικής ποικιλομορφίας μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές που μπορεί να σχετίζονται είτε με υψηλότερη ευαισθησία για την ανάπτυξη διαφόρων νοσημάτων ή, εναλλακτικά, να δίνουν στο άτομο πλεονέκτημα προστασίας [20][21].

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές παραλλαγές που μπορούν να συμβούν στο γονιδίωμα. Οι όροι που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν αυτές τις αλλαγές είναι οι εξής δύο: πολυμορφισμός και μετάλλαξη. Αν και συχνά, στην γενετική του ανθρώπου, οι δύο αυτοί όροι συγχέονται, υπάρχει μια διαφορά που τους καθορίζει. Η διαφορά αυτή έγκειται στην συχνότητα εμφάνισης της παραλλαγής στον πληθυσμό και όχι στον τύπο της ή στη λειτουργική σημασία της. Η παραλλαγή στο DNA μπορεί να θεωρηθεί ως πολυμορφική ή κοινή (πολυμορφισμός) όταν η συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου (MAF) είναι τουλάχιστον 1%, ή σπάνια (μετάλλαξη), όταν το έλασσον αλληλόμορφο έχει συχνότητα μικρότερη από 1% σε ένα δεδομένο πληθυσμό [22]. Συνήθως, οι σπάνιες παραλλαγές-μεταλλάξεις τείνουν να έχουν ένα λειτουργικό

αποτέλεσμα που αποκλίνει από αυτό του φυσιολογικού (ή του «αγρίου τύπου» ή από την πιο συχνή μορφή) οδηγώντας συχνά σε νοσήματα. Αντιθέτως, οι πολυμορφισμοί τείνουν να αποτελούν λιγότερο λειτουργικές γενετικές παραλλαγές [23]. Ωστόσο, μερικές σπάνιες γενωμικές μεταλλάξεις είναι λειτουργικά ουδέτερες ενώ κάποιοι συχνοί πολυμορφισμοί εμφανίζουν μείζον λειτουργικό αποτέλεσμα. Οι κύριες μορφές γενετικών παραλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα παρουσιάζονται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Τύποι γενετικών παραλλαγών στο γονιδίωμα του ανθρώπου [1].

Type of Variation	Size Range (approx.)	Basis for the Polymorphism	Number of Alleles
Single nucleotide polymorphisms	1 bp	Substitution of one or another base pair at a particular location in the genome	Usually 2
Insertion/deletions (indels)	1 bp to > 100 bp	*Simple*: Presence or absence of a short segment of DNA 100-1000 bp in length *Microsatellites*: Generally, a 2-, 3-, or 4-nucleotide unit repeated in tandem 5-25 times	*Simple*: 2 *Microsatellites*: typically 5 or more
Copy number variants	10 kb to > 1 Mb	Typically the presence or absence of 200-bp to 1.5-Mb segments of DNA, although tandem duplication of 2, 3, 4, or more copies can also occur	2 or more
Inversions	Few bp to > 1 Mb	A DNA segment present in either of two orientations with respect to the surrounding DNA	2

bp, Base pair; kb, kilobase pair; Mb, megabase pair.

Μέχρι στιγμής, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τρίτης φάσης του 1000 Genomes Project που δημοσιεύτηκαν τον Οκτώβριο του 2015, έχουν αλληλουχηθεί πλήρως 2504 διπλοειδή γονιδιώματα ανθρώπων από 26 διαφορετικούς πληθυσμούς [24]. Επίσης, ανεξάρτητες ομάδες από όλον τον κόσμο έχουν προβεί σε αλληλούχιση ατομικών γονιδιωμάτων [25][26]. Από όλες αυτές τις μελέτες επαναλληλούχισης έχουν προκύψει

πολλά σημαντικά ευρήματα σχετικά με τη γενετική ποικιλομορφία στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Συνολικά, το 1000 Genomes Project, κατάφερε να εντοπίσει και να χαρακτηρίσει 80 εκατομμύρια παραλλαγές εκ των οποίων τα 84.7 εκατομμύρια είναι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), τα 3.6 εκατομμύρια είναι μικρές ενθέσεις/απαλοιφές (indels) και οι 60 χιλιάδες είναι δομικές παραλλαγές [24]. Ένα τυπικό γονιδίωμα, φέρει περίπου 4.1–5 εκατομμύρια SNPs και αποτελούν το 99.9% των παραλλαγών του. Αν και αυτοί οι πολυμορφισμοί είναι οι πιο συχνοί, οι δομικές παραλλαγές είναι εκείνες που επηρεάζουν περισσότερες βάσεις του DNA. Κάθε γονιδίωμα περιέχει κατά μέσο όρο 2100-2500 δομικές παραλλαγές. Από τις πιο σημαντικές παραλλαγές αυτού του είδους είναι οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων (Copy Number Variants, CNVs) [27].

Η πλειονότητα των πολυμορφισμών στην αλληλουχία του DNA δεν έχουν λειτουργική σημασία αν και μερικοί τροποποιούν τη δομή του παραγόμενου πεπτιδίου όπως για παράδειγμα οι αμινοξικές αλλαγές, οι αλλαγές μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου και οι αλλαγές που προκαλούν πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης. Τέτοιοι πολυμορφισμοί συμβαίνουν σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου (εξόνια) και έχουν κλασσικά εμπλακεί σε μονογονιδιακές Μενδελικές διαταραχές με προβλέψιμες συνέπειες και επιδεκτικές σε έλεγχο. Αντίθετα υπάρχουν πολυμορφισμοί σε ιντρόνια και διαγονιδιακές περιοχές, όπου επηρεάζουν τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων και των πρωτεϊνών, καθώς και την θέση πρόσδεσης των miRNAs, συμβάλλοντας έτσι στην ευαισθησία για διάφορα νοσήματα [22].

Από τις μέχρι τώρα αναγνωρισμένες μορφές γενετικών παραλλαγών, τα δύο σημαντικότερα συστατικά της ανθρώπινης γενετικής ποικιλομορφίας είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) και οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων (copy-number variants, CNVs). Τα SNPs, ως μεμονωμένα νουκλεοτιδικά ζεύγη βάσεων στο DNA, διαφέρουν μεταξύ των αλληλουχιών DNA διαφορετικών ατόμων (για παράδειγμα, ένα άτομο θα έχει Αδενίνη-Θυμίνη σε μία συγκεκριμένη θέση στο απλοειδές γονιδίωμα, ενώ ένα άλλο άτομο θα έχει Γουανίνη-Κυτοσίνη στην ίδια θέση). Οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων είναι μεγαλύτερες, συνεχόμενες ομάδες από αλληλουχίες DNA (συχνά υπερβαίνοντας τις 1000 bp) που διαφοροποιούνται στον αριθμό των αντιγράφων μεταξύ ατόμων (για παράδειγμα μία ομάδα DNA μπορεί να διπλασιαστεί σε ένα άτομο και να απαλειφθεί σε ένα άλλο) [27].

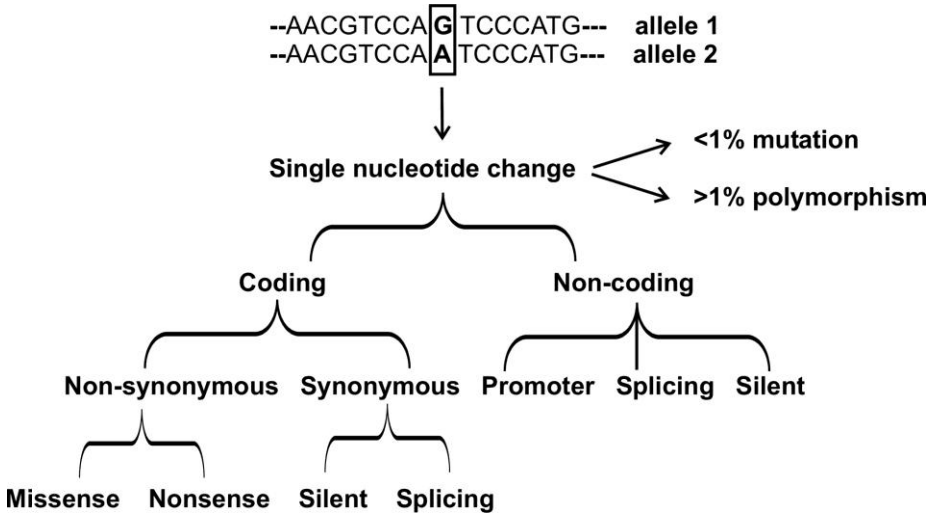
Σύμφωνα με την βάση δεδομένων dpSNP, έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι και τον Μάρτιο του 2017, περίπου 100 εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ δύο άνθρωποι διαφέρουν περίπου σε 1 ανά 1000 bp [28]. Οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων είναι λιγότερο συχνές αλλά επειδή αποτελούνται από μεγαλύτερα τμήματα DNA, καταλαμβάνουν περίπου το 4.8-9.5% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα

Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) είναι μια παραλλαγή της αλληλουχίας του DNA που συμβαίνει όταν ένα νουκλεοτίδιο αδενίνης (A), θυμίνης (T), κυτοσίνης (C), ή γουανίνης (G) στο γονιδίωμα διαφέρει μεταξύ μελών ενός είδους ή μεταξύ του ζεύγους χρωμοσωμάτων σε ένα άτομο. Για παράδειγμα, δύο τμήματα DNA από διαφορετικά άτομα, AAGC**C**TA και AAGC**T**TA, περιέχουν μια διαφορά σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Σε αυτή την περίπτωση μπορούμε να πούμε ότι υπάρχουν δύο αλληλόμορφα: C και T [29]. Μέσα σε έναν πληθυσμό, τα SNPs χαρακτηρίζονται από την συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου (minor allele frequency, MAF) - τη χαμηλότερη δηλαδή συχνότητα αλληλομόρφου σε ένα γενετικό τόπο, που παρατηρείται σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό. Μεταξύ των πληθυσμών, υπάρχουν διαφορές όσον αφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων. Έτσι, ένα αλληλόμορφο ενός πολυμορφισμού που είναι κοινό σε μία γεωγραφική ή εθνική ομάδα μπορεί να είναι πολύ πιο σπάνιο σε μια άλλη [30][31].

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μπορούν να συμβούν είτε σε κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων, είτε σε μη-κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων, ή ακόμα και στις ενδιάμεσες περιοχές μεταξύ των γονιδίων. Τα SNPs εντός μιας κωδικοποιούσας αλληλουχίας δεν αλλάζουν απαραίτητα την αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης που παράγεται, λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα. Ένας πολυμορφισμός του οποίου και οι δύο μορφές οδηγούν στην ίδια πολυπεπτιδική αλληλουχία, ονομάζεται συνώνυμος (synonymous SNP) – ενώ αν παραχθεί μια διαφορετική πολυπεπτιδική αλυσίδα ονομάζεται μη-συνώνυμος (nonsynonymous SNP). Μια μη-συνώνυμη αλλαγή μπορεί είτε να είναι παρερμηνεύσιμη (missense), να οδηγεί δηλαδή στην κωδικοποίηση διαφορετικού αμινοξέος στην πρωτεΐνη, είτε να είναι μη-ερμηνεύσιμη (nonsense), όταν

η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [32]. Τα περισσότερα SNPs εντοπίζονται σε μη-κωδικοποιούσες περιοχές και δεν έχουν κάποια σημαντική επίδραση στην βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης, για αυτόν τον λόγο καλούνται σιωπηλοί πολυμορφισμοί (silent). Υπάρχουν όμως και αρκετοί άλλοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σε αυτές τις μη-κωδικοποιούσες περιοχές αλλά και στις διαγονιδιακές περιοχές που επηρεάζουν το ματίσμα, τη δέσμευση των μεταγραφικών παραγόντων, την πρόσδεση των microRNAs, τη σταθερότητα και τη δομή του mRNA αλλά και την αναδίπλωση της παραγόμενης πρωτεΐνης, επιδρώντας με αυτόν τον τρόπο στην ρύθμιση της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής έκφρασης [29][33] **(Εικόνα 1.5)** [34].



Εικόνα 1.5: Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί. Η "αντικατάσταση" ενός νουκλεοτιδίου με ένα άλλο, όπως η αντικατάσταση της γουανίνης άγριου τύπου (αλληλόμορφο 1) με αδενίνη (αλληλόμορφο 2), αναφέρεται είτε ως μετάλλαξη, εάν υπάρχει σε <1% του γενικού πληθυσμού, ή ως SNP, εάν υπάρχει με συχνότητα >1%. Τα SNPs είναι συχνά και καλύπτουν όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα [34].

Η γενετική του ανθρώπου, έχει ως θεμελιώδη στόχο την αποσαφήνιση των αιτιολογικών παραλλαγών που τροποποιούν τον ανθρώπινο φαινότυπο και ιδιαίτερα τις νόσους, βελτιώνοντας έτσι την πρόγνωση, την διάγνωση αλλά και την θεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη και την διαδεδομένη πλέον χρήση των τεχνικών

αλληλούχισης νέας γενιάς, έχουν δημιουργηθεί αναλυτικοί χάρτες των γενετικών παραλλαγών, συμπεριλαμβανομένων των εκατομμυρίων μονονουκλεοτιδικών παραλλαγών, εκατοντάδων χιλιάδων μικρών ενθέσεων και απαλοιφών και χιλιάδων δομικών παραλλαγών στο τυπικό ανθρώπινο γονιδίωμα [24]. Οι περισσότερες παραλλαγές είναι κοινές (συχνές), υπάρχουν όμως και σπάνιες ή μεμονωμένες [35] **(Πίνακας 2)**.

Πίνακας 2. Συχνότητες γενετικών παραλλαγών στον άνθρωπο [35].

Variant class	Minor allele frequency	Implications for analysis
Very common	Between 5 and 50%	Amenable to association analysis using current genome-wide association methods
Less common	Between 1 and 5%	Amenable to association analysis using variants catalogued in the 1000 Genomes Project
Rare (but not private)	Less than 1% but still polymorphic in one or more major human populations	Amenable to framework of extreme phenotype resequencing, as well as co-segregation in families
Private	Restricted to probands and immediate relatives	Difficult to analyse except through co-segregation in families. As linkage evidence will (by definition) be modest, discovery would be limited to the most recognizable of variants

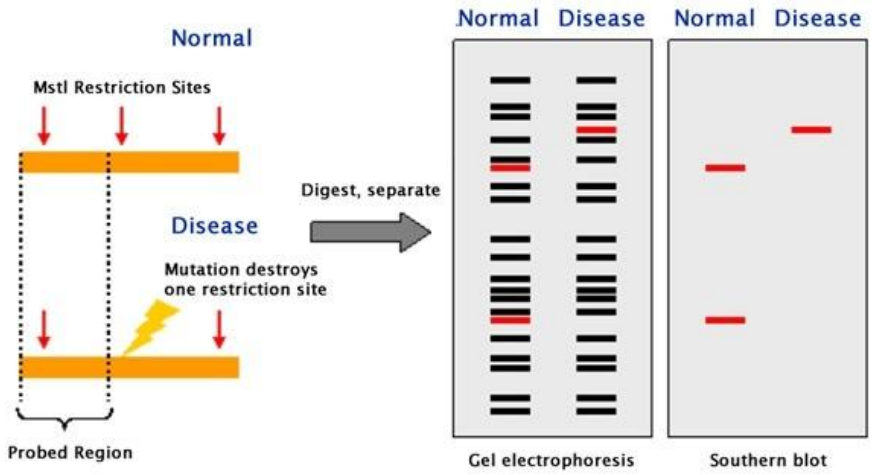
Μελέτες χαρτογράφησης και μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στην απομόνωση γονιδίων που ευθύνονται για νοσήματα

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης για την χαρτογράφηση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση νόσων ή ποσοτικών χαρακτηριστικών μπορούν να διαιρεθούν σε τέσσερις κατηγορίες: τις μελέτες υποψηφίου πολυμορφισμού (Candidate Polymorphism studies), τις μελέτες υποψήφιου γονιδίου (Candidate Gene studies), τις μελέτες λεπτομερούς χαρτογράφησης (Fine mapping studies) και τις μελέτες σάρωσης ενός μέρους ή ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome - wide association studies, GWAS) [36].

Πριν αναπτυχθεί πλήρως η προσέγγιση του υποψηφίου-γονιδίου (candidate gene approach), διάφορες άλλες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων που συνδέονται με νοσήματα. Αυτές οι μέθοδοι μελετούσαν τη γενετική σύνδεση (Genetic Linkage) και την κλωνοποίηση βάσει θέσης (Positional Cloning), και ήταν πολύ αποτελεσματικές στον εντοπισμό γονιδίων κινδύνου για Μεντελικά νοσήματα

[37]. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, οι εντυπωσιακές τεχνικές της σύγχρονης μοριακής γενετικής κατέστησαν δυνατό τον εντοπισμό του γονιδίου, που είναι υπεύθυνο για μία ανθρώπινη νόσο βάσει αποκλειστικά της θέσης του στο γενετικό χάρτη, χωρίς την προυπόθεση ύπαρξης οποιασδήποτε προγενέστερης λειτουργικής πληροφορίας. Αυτή η προσέγγιση ονομάζεται κλωνοποίηση βάσει θέσης (Positional cloning). Η κλωνοποίηση βάσει θέσης ξεκινά από το επίπεδο του γονιδιώματος ως σύνολο ($3x10^9$ ζεύγη βάσεων) και καταλήγει στην ανάλυση μιας μόνο βάσης, επιτρέποντας την ταυτοποίηση των σημειακών μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο. Για να επιτευχθεί αυτή η διαδικασία προηγείται η χαρτογράφηση του γονιδίου σε μια συγκεκριμένη περιοχή του χρωμοσώματος με τη βοήθεια της ανάλυσης σύνδεσης (Linkage study). Με αυτήν την προσέγγιση αναγνωρίστηκαν επιτυχώς στο παρελθόν γονίδια τα οποία ευθύνονται για μονογονιδιακά νοσήματα όπως η Μυϊκή Δυστροφία Duchenne, η νόσος Huntington και η Κυστική ίνωση [38]. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε και σε σύνθετα χαρακτηριστικά με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και τις ψυχιατρικές διαταραχές μεταξύ των πιο πρώιμων νόσων που μελετήθηκαν με ανάλυση σύνδεσης [39][40]. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι δεν αποδείχθηκαν τόσο αποτελεσματικές κατά τη μελέτη σύνθετων πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

Στο παρελθόν, οι ερευνητές βασίστηκαν αποκλειστικά σε RFLPs και διαδοχικά επαναλαμβανόμενες ακολουθίες (tandem repeats) για την χρήση τους ως γενετικοί δείκτες σε μελέτες χαρτογράφησης γονιδίων υπεύθυνων για νοσήματα [41]. Οι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών τμημάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism) προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις στο DNA, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ή την απαλοιφή θέσεων περιορισμού. Η τεχνική RFLPs είναι μια μοριακή μέθοδος γενετικής ανάλυσης που αναπτύχθηκε από τον Botstein και τους συνεργάτες του, το 1980. Στη συγκεκριμένη τεχνική, χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα που κόβουν (πέπτουν) το μόριο του DNA σε ειδικές θέσεις, που ονομάζονται θέσεις περιορισμού, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορετικά τμήματα DNA μεταβλητού μήκους. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, τα διαφορετικά αυτά τμήματα διαχωρίζονται βάσει μεγέθους και λόγω διαφορετικής κινητικότητας, πάνω στο πήκτωμα (**Εικόνα 1.6**).



Εικόνα 1.6: Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών τμημάτων (RFLP). Στο πρώτο δείγμα (normal) υπάρχουν τρεις θέσεις περιορισμού, με αποτέλεσμα να απεικονίζονται δύο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης. Στο δεύτερο δείγμα (disease), η ενδιάμεση από τις τρεις θέσεις περιορισμού χάνεται λόγω μετάλλαξης και συνεπώς απεικονίζεται μία ζώνη μεγαλύτερου μεγέθους στο πήκτωμα.

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν οι μικροδορυφόροι, τα RFLPs χρησιμοποιήθηκαν κυρίως ως γενετικοί δείκτες σε μελέτες συσχέτισης υποψήφιου γονίδιου, κατά τις οποίες εφαρμόστηκε ευρέως ο συνδυασμός PCR-RFLPs για τον προσδιορισμό των γονοτύπων. Ωστόσο, στις μελέτες σύνδεσης χρησιμοποιούνταν ευρέως οι μικροδορυφόροι και συνέχισαν να χρησιμοποιούνται επιτυχώς για 20 χρόνια. Με την ολοκλήρωση, όμως, του Προγράμματος Χαρτογράφησης του ανθρωπίνου γονιδιώματος και την εύρεση εκατομμυρίων SNPs, οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί έγιναν οι κύριοι γενετικοί δείκτες στις μελέτες γενετικής συσχέτισης καθώς είναι διασκορπισμένοι σε όλο το γονιδίωμα, εμφανίζουν σημαντική σταθερότητα λόγω χαμηλού ρυθμού μεταλλάξεων και εκτός του ότι μπορούν να χρησιμεύσουν ως παρένθετοι δείκτες, αρκετοί από αυτούς έχουν και λειτουργικές συνέπειες αν εμφανίζονται σε κωδικοποιούσες ή ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου [31].

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης σε μεγάλους αριθμούς συμμετεχόντων ήρθαν για να δώσουν μία διέξοδο στο πρόβλημα που παρατηρήθηκε με τις σύνθετες νόσους. Στις μελέτες αυτές, οι ασθενείς συγκρίνονται με καλά αντιστοιχισμένους υγιείς μάρτυρες από τον ίδιο πληθυσμό, δίνοντας μεγαλύτερες πιθανότητες ανίχνευσης μικρών

γενετικών επιδράσεων. Οι μελέτες υποψήφιων γονιδίων είναι στην πρώτη γραμμή των μελετών γενετικής συσχέτισης για την ταυτοποίηση παραλλαγών που συνδέονται με μια συγκεκριμένη νόσο και βασίζονται σε μια υπόθεση (hypothesis driven). Είναι σχετικά φθηνές και γρήγορες στην εκτέλεση τους, και επικεντρώνονται στην επιλογή των γονιδίων που κατά κάποιον τρόπο σχετίζονται με τη νόσο. Επομένως απαιτείται προηγούμενη γνώση σχετικά με τη λειτουργία του γονιδίου. Η προσέγγιση υποψήφιου γονιδίου αρχίζει με την επιλογή ενός υποθετικού υποψηφίου γονιδίου, το προϊόν του οποίου εμπλέκεται στον μηχανισμό που οδηγεί στο νόσημα-γνώρισμα που διερευνάται. Ακολούθως αξιολογούνται και επιλέγονται πολύ προσεκτικά οι πολυμορφισμοί, SNPs, που είτε έχουν κάποια λειτουργική συνέπεια επηρεάζοντας το πρωτεϊνικό προϊόν είτε επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση. Τελικά, η παραλλαγή του γονιδίου επαληθεύεται ότι συσχετίζεται με τη νόσο, παρατηρώντας τη συχνότητα εμφάνισής της σε άτομα που πάσχουν από το νόσημα (cases) και σε άτομα που είναι υγιή (controls) [42].

Κατά το σχεδιασμό μίας μελέτης γενετικής συσχέτισης υπάρχουν τέσσερα κύρια χαρακτηριστικά που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη: η νόσος ή το χαρακτηριστικό που θα μελετηθεί, η ομάδα των συμμετεχόντων στους οποίους τα προς μελέτη χαρακτηριστικά αξιολογούνται ή μετρώνται, οι γενετικοί δείκτες που θα ταυτοποιηθούν στους συμμετέχοντες και η αναλυτική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της συσχέτισης μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου [43]. Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μελετών συσχέτισης είναι η έλλειψη επαναληψιμότητας τους. Οι πιθανοί λόγοι για την έλλειψη αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων ουσιαστικά συνοψίζονται σε τρεις κύριες αιτίες: μία ψευδώς θετική συσχέτιση, ορθώς δεν επαληθεύεται, μία αληθής συσχέτιση αποτυγχάνει να επαληθευτεί σε μία χαμηλής ισχύος (underpowered) μελέτη επιβεβαίωσης και μία αληθής συσχέτιση σε ένα πληθυσμό δεν επαναλαμβάνεται σε έναν άλλο λόγω της γενετικής ετερογένειας και των περιβαλλοντικών επιδράσεων [44].

Μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Genome Wide Association Studies, GWAS) και σύνθετες νόσοι

Ο κεντρικός στόχος της γενετικής του ανθρώπου είναι να εντοπίσει γενετικούς παράγοντες κινδύνου για κοινά, σύνθετα νοσήματα όπως η σχιζοφρένεια, ο διαβήτης τύπου ΙΙ και τα αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και για σπάνιες Μεντελικές νόσους όπως η κυστική ίνωση και η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Όπως ανέφερα και προηγουμένως, υπάρχουν πολλές διαφορετικές τεχνολογίες, διαφορετικές προσεγγίσεις και αναλυτικά εργαλεία για τον εντοπισμό των γενετικών παραγόντων κινδύνου [18]. Οι μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, είναι η προσέγγιση που τα τελευταία 10 χρόνια είναι στην πρώτη θέση για την ανίχνευση παραλλαγών σε γενετικούς τόπους, που σχετίζονται με πολύπλοκα γνωρίσματα στον πληθυσμό και, ειδικότερα, για την ανίχνευση συσχετίσεων μεταξύ κοινών SNPs και κοινών νοσημάτων όπως οι καρδιοπάθειες, ο διαβήτης, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι ψυχιατρικές διαταραχές [45][46].

Οι μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα περιλαμβάνουν την γονοτύπηση εκατοντάδων χιλιάδων συχνών SNPs (συχνότητα >5%) σε εκατοντάδες χιλιάδες δείγματα DNA με τη χρήση τεχνολογίας μικροσυστοιχιών. Μετά από αυστηρές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου, κάθε παραλλαγή ελέγχεται για συσχέτιση με το γνώρισμα/νόσημα που μελετάται. Μια θετική συσχέτιση προκύπτει όταν υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα της γενετικής παραλλαγής σε άτομα με μια νόσο ή γνώρισμα σε σχέση με τα μη προσβεβλημένα άτομα. Η θετική αυτή συσχέτιση προσδιορίζει μια περιοχή του γονιδιώματος, που μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη της νόσου ή του χαρακτηριστικού, και όχι ένα συγκεκριμένο αιτιολογικό πολυμορφισμό [45][47]. Στις μελέτες αυτές δεν υπάρχει αρχική υπόθεση (null hypothesis) σχετικά με τη θέση των αιτιολογικών παραλλαγών και επομένως αυτή η προσέγγιση μπορεί να εκμεταλλευθεί τα πλεονεκτήματα των μελετών συσχέτισης χωρίς όμως την προϋπόθεση προϋπάρχουσας γνώσης για τα πιθανά γονίδια. Έτσι, αντιπροσωπεύει μία αμερόληπτη αλλά αρκετά ολοκληρωμένη επιλογή που μπορεί να επιχειρηθεί ακόμα και απουσία πειστικής μαρτυρίας αναφορικά με τη λειτουργία ή την τοποθεσία των αιτιολογικών γονιδίων. Συνεπώς, οι GWAS επιχειρούν να αποκαλύψουν γονίδια που δεν είχαν προηγουμένως εμπλακεί στην αιτιολογία της νόσου, τη γενετική επίδραση των

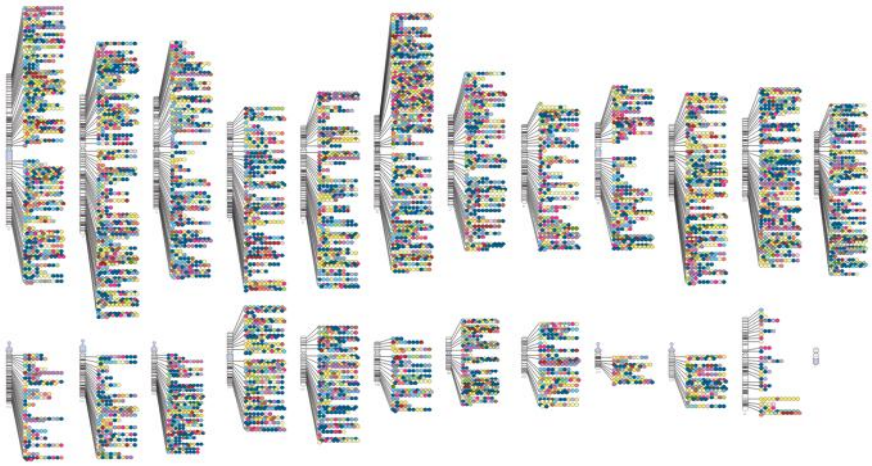
ενδιάμεσων περιοχών και να υπολογίσουν τον πλειοτροπισμό των γονιδίων, με αμερόληπτο τρόπο [48].

Οι μελέτες αυτές προϋποθέτουν γνώση των συχνών παραλλαγών στο γονιδίωμα, αλλά και την ύπαρξη τεχνολογικών μέσων για ταυτόχρονη και γρήγορη γονοτύπηση ενός πολύ μεγάλου αριθμού παραλλαγών σε μεγάλα δείγματα συμμετεχόντων [45]. Η διενέργεια αυτών των μελετών κατέστη δυνατή ως αποτέλεσμα αρκετών επιστημονικών προόδων στις αρχές του 21ου αιώνα. Η ολοκλήρωση του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος βελτίωσε σημαντικά τις γνώσεις μας για το ανθρώπινο γονιδίωμα και παρείχε ένα καλύτερο πλαίσιο για τη μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας [13]. Στη συνέχεια, το διεθνές πρόγραμμα HapMap αναγνώρισε έναν τεράστιο αριθμό μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών και παρείχε λεπτομερείς χάρτες απλοτύπων αλλά και πρότυπα ανισορροπίας σύνδεσης (LD maps) του γονιδιώματος [14]. Αυτές οι επιστημονικές προσπάθειες κατάφεραν να εντοπίσουν έναν σχετικά μικρό αριθμό SNPs, που είναι σε θέση να αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος των συχνών παραλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Tag SNPs). Τέλος, μεγάλες εταιρείες βιοτεχνολογίας, συμπεριλαμβανομένων των Affymetrix, Illumina και Perlegen ανέπτυξαν ανταγωνιστικές πλατφόρμες για την γονοτύπηση εκατοντάδων χιλιάδων SNPs ταυτοχρόνως, παρέχοντας έτσι τα μέσα για την διεξαγωγή των GWAS [49].

Όπως συμβαίνει με τις μελέτες συσχέτισης του υποψήφιου γονιδίου, έτσι και στις μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα πρέπει να γίνεται σωστός σχεδιασμός που να πληροί τα κριτήρια ποιότητας. Επίσης, ένα από τα πιο σημαντικά βήματα είναι η πολύ προσεκτική επιλογή των δεικτών που θα ανιχνευθούν στην ανάλυση. Μερικές εκατοντάδες χιλιάδες καλά επιλεγμένα SNPs θα μπορούσαν να είναι αρκετά ώστε να παρέχουν πληροφορίες για τις περισσότερες συχνές παραλλαγές στο γονιδίωμα. Αυτό εξαρτάται βέβαια και από τον πληθυσμό στον οποίο διεξάγεται η ανάλυση [45]. Για παράδειγμα, σε Αφρικανικούς πληθυσμούς απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός παραλλαγών προς έλεγχο, καθώς αυτοί οι πληθυσμοί περιλαμβάνουν περισσότερες παραλλαγές και λιγότερη ανισορροπία σύνδεσης στο γονιδίωμα τους [50]. Τα ζητήματα λοιπόν που πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά κατά τον σχεδιασμό μιας τέτοιας μελέτης είναι το μέγεθος του δείγματος και ο τρόπος συλλογής, τα εργαλεία στατιστικής ανάλυσης, η στατιστική ισχύς, η διόρθωση για πολλαπλές δοκιμές, η δομή του πληθυσμού και η επιλογή της πλατφόρμας γονοτύπησης. Ορισμένες πλατφόρμες έχουν

σχεδιαστεί για να ελέγχουν όσα περισσότερα SNPs είναι πρακτικά δυνατόν - επί του παρόντος μέχρι περίπου πέντε εκατομμύρια. Άλλες πλατφόρμες έχουν σχεδιαστεί ειδικά για τον έλεγχο SNPs σε κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων. Υπάρχουν πλατφόρμες που εξετάζουν σχετικά μικρό αριθμό SNPs, τα οποία όμως έχουν επιλεγεί προσεκτικά ώστε να εκπροσωπούν αποτελεσματικά όλη την ποικιλομορφία απλοτύπων. Τέλος, έχουν σχεδιαστεί πλατφόρμες για συγκεκριμένους εθνικούς πληθυσμούς ή και για συγκεκριμένα νοσήματα. Επομένως, ανάλογα με τον στόχο της εκάστοτε μελέτης θα πρέπει να επιλέγεται και η κατάλληλη πλατφόρμα γονοτύπησης [51].

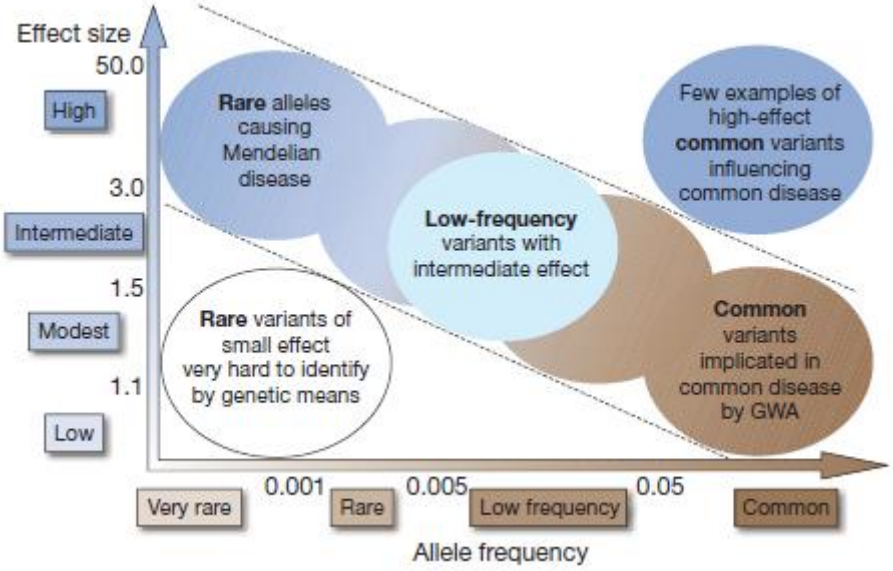
Το Εθνικό Ινστιτούτο Έρευνας Ανθρώπινου Γονιδιώματος και το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (NHGRI-EBI) έχουν καταρτίσει έναν κατάλογο των GWAS (GWAS catalog) που ανανεώνεται σε καθημερινή βάση [45][52]. Σύμφωνα με τον κατάλογο αυτό, η πρώτη μελέτη συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα πραγματοποιήθηκε το 2005 και αφορούσε στην ηλικιακή εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (AMD). Η μελέτη ανέλυσε περίπου 100.000 SNPs σε μόλις 146 άτομα, και αναγνώρισε το γονίδιο *CFH* ως ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της AMD [53]. Το ενθαρρυντικό αυτό εύρημα οδήγησε στη διενέργεια πολυάριθμων GWAS για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης ποικίλων σύνθετων χαρακτηριστικών που τελικά οδήγησε στην έκρηξη δημοσιεύσεων το 2007, που θεωρείται πια ως «το Έτος των GWAS». Μέχρι τον Απρίλιο του 2017, έχουν δημοσιευθεί 2854 μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα και έχουν ανιχνευθεί 33674 συσχετίσεις πολυμορφισμών με χαρακτηριστικά/νοσήματα **(Εικόνα 1.7)**.



Εικόνα 1.7: Συσχετίσεις που έχουν καταχωρηθεί στον κατάλογο GWAS. Αυτό το διάγραμμα δείχνει όλες τις συσχετίσεις των SNPs με p-value $\leq 5.0 \times 10^{-8}$ [52].

Ένα σταθερό εύρημα όλων των GWAS που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα, είναι ότι σχεδόν όλες οι ανιχνεύσιμες παραλλαγές που συσχετίζονται σημαντικά με τη νόσο, έχουν ήπιο ή μικρό μέγεθος επίδρασης στον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (συνήθως με OR<1.1 και σπάνια με OR>1.3) [49]. Επίσης, το συνολικό κληρονομικό φορτίο που αποδίδεται σε αυτές τις παραλλαγές είναι της τάξεως του 5 – 10%, ενώ γνωρίζουμε ότι η συνολική κληρονομικότητα των σύνθετων νοσημάτων είναι τυπικά 40 – 80%. Επομένως, είναι σαφές ότι υπάρχει ένα σημαντικό κενό στην εξήγηση της συνολικής κληρονομικότητας βάσει αυτής της προσέγγισης (missing heritability) [54][55]. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με την θεωρητική βάση των GWAS, που βασίζεται στην υπόθεση Συχνό νόσημα – Συχνή παραλλαγή (Common disease-Common Variant, CD-CV) [56]. Σύμφωνα λοιπόν με αυτήν την υπόθεση, η γενετική προδιάθεση σε συχνά νοσήματα οφείλεται κυρίως σε γενετικές παραλλαγές που είναι σχετικά συχνές στο γενικό πληθυσμό και επίσης έχουν χαμηλή διεισδυτικότητα. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη την πολύπλοκη γενετική αρχιτεκτονική των σύνθετων νόσων όπου πολλαπλές περιοχές εμφανίζουν μικρή επίδραση η κάθε μία στο συνολικό φαινότυπο, οι γενετικές παραλλαγές χαρακτηρίζονται από χαμηλή διεισδυτικότητα και άρα είναι ασθενώς επιβλαβείς, ουδέτερες ή/και θετικές κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εξελικτικής ιστορίας [57][58].

Παρά την εξήγηση αυτή, τα ευρήματα αυτών των μελετών πιθανόν να μην αντανακλούν το πραγματικό φάσμα συχνοτήτων των αλληλομόρφων που σχετίζονται με τις σύνθετες νόσους. Πρώτον, ο αριθμός των παραλλαγών που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου πρέπει να είναι πολύ μεγάλος, τουλάχιστον εκατοντάδες, αν όχι χιλιάδες. Δεύτερον, καθώς η στατιστική ισχύς για την ανίχνευση συσχετιζόμενων παραλλαγών καθορίζεται τόσο από το μέγεθος επίδρασης όσο και από τη συχνότητα του αλληλομόρφου, πολλές παραλλαγές μπορεί να διαφύγουν τον εντοπισμό γιατί είτε έχουν ένα πολύ μικρό μέγεθος επίδρασης (OR<1,2) είτε η συχνότητα του αλληλομόρφου είναι χαμηλή (<5%). Τρίτον, οι περιοχές του γονιδιώματος που καλύπτονται στις περισσότερες μικροσυστοιχίες γονοτύπησης αφορούν κυρίως συχνές παραλλαγές, ενώ η κάλυψη για λιγότερα συχνά ή και σπάνια SNPs είναι πολύ χαμηλή [59]. Τέλος, υπάρχουν και άλλοι τύποι παραλλαγών, όπως τα CNVs, για τα οποία η κάλυψη είναι εξαιρετικά χαμηλή [49]. Επομένως, οι GWAS δεν αποτελούν καλή προσέγγιση για τη μελέτη λιγότερο συχνών ή σπάνιων παραλλαγών **(Εικόνα 1.8)** [54].



Εικόνα 1.8: Διάγραμμα σχέσης συχνότητας αλληλομόρφου με το μέγεθος επίδρασης. Η μεγαλύτερη έμφαση και το ενδιαφέρον εστιάζεται στην αναγνώριση συσχετίσεων με χαρακτηριστικά που φαίνονται ανάμεσα στις διαγώνιες διακεκομμένες γραμμές [54].

Είναι πια ευρέως αποδεκτό ότι οι μεμονωμένες GWAS διαθέτουν περιορισμένη στατιστική ισχύ για να ανιχνεύσουν συχνά αλληλόμορφα αλλά με μικρά μεγέθη επίδρασης (O.R<1.2). Ως αποτέλεσμα, ένας μεγάλος αριθμός μετααναλύσεων έχει πραγματοποιηθεί για να ενισχύσουν την ισχύ μέσω συνδυασμού των δεδομένων από πολλές μελέτες και κατάφεραν επιτυχώς να ανιχνεύσουν επιπρόσθετους γενετικούς τόπους για διάφορες νόσους [60]. Τα επιπρόσθετα SNPs που αναγνωρίστηκαν από αυτές τις μετααναλύσεις είχαν ισοδύναμο ή μικρότερο μέγεθος επίδρασης ενώ σε μερικές περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν και λιγότερο συχνά SNPs με μεγαλύτερο βαθμό επίδρασης [61]. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι οι μετααναλύσεις είναι ικανές να ενισχύσουν τη στατιστική ισχύ στην ανεύρεση συχνών SNPs με χαμηλό μέγεθος επίδρασης αλλά και να ανιχνεύσουν σπανιότερα SNPs με μεγαλύτερο μέγεθος επίδρασης εάν συμπεριληφθούν στην ανάλυση. Παρά τους περιορισμούς τους, οι GWAS εμφάνισαν ορισμένα εντυπωσιακά ευρήματα. Το πρώτο από αυτά αφορά την ανεύρεση συσχετίσεων SNPs εντοπιζόμενων σε γονίδια που αρχικά δεν θεωρούνταν ως έχοντα κάποιο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Επίσης, σήματα που προέρχονταν από μεγάλες γονιδιακές «ερήμους» θεωρήθηκαν αρχικά ως ψευδώς θετικές συσχετίσεις.

Ωστόσο, οι επαναλαμβανόμενες αναπαραγωγές των συσχετίσεων αυτών, επιβεβαίωσαν ότι οι περιοχές αυτές ασκούν ξεκάθαρα επιδράσεις πάνω στις νόσους. Το δεύτερο εντυπωσιακό εύρημα που προέκυψε από τις GWAS είναι η ανεύρεση γενετικών τόπων που είναι κοινοί σε καταστάσεις προηγουμένως θεωρούμενες ως μη σχετιζόμενες μεταξύ τους. Η πιθανότητα κοινών αιτιολογικών μονοπατιών σε αυτές τις ανόμοιες καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η νόσος του Crohn και η νόσος του Parkinson, εγείρουν ενδιαφέροντα ερωτήματα σχετικά με την παθοφυσιολογία των φαινομενικά ανόμοιων αυτών καταστάσεων και την πιθανότητα χρήσης φαρμάκων που είναι αποτελεσματικά στη μία κατάσταση για τη θεραπεία της άλλης [62].

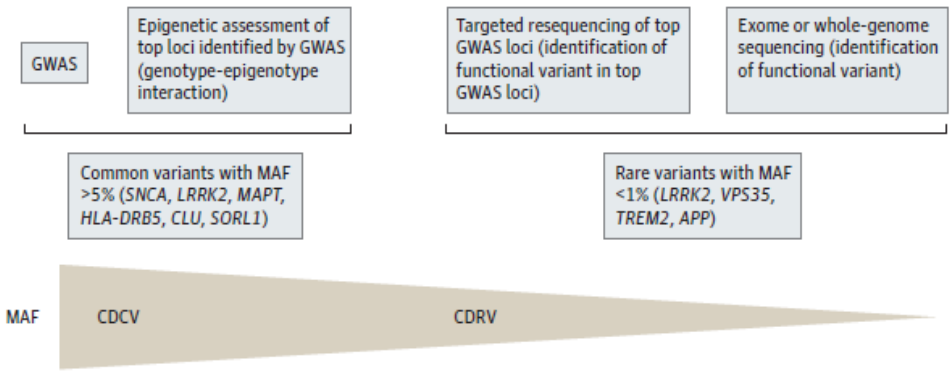
Η «χαμένη» κληρονομικότητα των σύνθετων νόσων

Ενώ οι μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα ήταν εξαιρετικά επιτυχημένες στον εντοπισμό παραλλαγών που εμπλέκονται σε σύνθετα νοσήματα, τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έχουν επίσης εγείρει μια σειρά από ερωτήματα. Ακόμα κι αν εντοπίστηκαν εκατοντάδες παραλλαγές που ενοχοποιούνται ότι εμπλέκονται σε κάποια χαρακτηριστικά ή νοσήματα, η συνολική συμβολή τους εξηγεί μόνο ένα μικρό ποσοστό της συνολικής γενετικής συμβολής, η οποία είναι γνωστή από μελέτες σε διδύμους (twin studies) [49]. Για παράδειγμα, η συνδυασμένη συμβολή 50 γονιδίων που ανακαλύφθηκαν ότι συνεισφέρουν στον καθορισμό του ύψους χρησιμοποιώντας GWASs, αντιπροσωπεύει μόνο το 5% της φαινοτυπικής διακύμανσης, ποσοστό που είναι κατά πολύ μικρότερο από το 80% της κληρονομικότητας που έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχει από μελέτες διδύμων [63]. Το χάσμα μεταξύ της γνωστής κληρονομικότητας και της συνολικής γενετικής συνεισφοράς από όλες τις παραλλαγές που έχουν ανιχνευθεί από μελέτες στο γονιδίωμα αναφέρεται ως «χαμένη κληρονομικότητα» [54][64].

Οι πιθανοί λόγοι για την ύπαρξη του προβλήματος της χαμένης κληρονομικότητας, περιλαμβάνουν μυριάδες συχνών παραλλαγών με μικρές επιδράσεις που μένει να εντοπιστούν, σπάνιες παραλλαγές με μεγαλύτερα μεγέθη επίδρασης αλλά και δομικές παραλλαγές (προσθήκες, απαλοιφές, επαναλήψεις, αναστροφές, μεταθέσεις, καθώς και CNVs) που δεν μπορούν να ανιχνευτούν σωστά από τις διαθέσιμες συστοιχίες

γονοτύπησης, ανεπαρκή ικανότητα ανίχνευσης επιστατικών επιδράσεων, επιγενετικών επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων γονιδίων - περιβάλλοντος (G × E) [54][65].

Κατ 'αρχήν, για τις πιο συχνές διαταραχές, γνωρίζουμε πολύ λίγα πράγματα όσον αφορά την γενετική τους αρχιτεκτονική. Αφενός, το μεγαλύτερο μέρος του κινδύνου μπορεί να προέρχεται από συχνές παραλλαγές, SNPs, σύμφωνα με την υπόθεση συχνό νόσημα – συχνή παραλλαγή. Εναλλακτικά, σύμφωνα με την υπόθεση συχνό νόσημα – σπάνια παραλλαγή (Common disease – Rare variant hypothesis), ο συνδυασμός πιο σπάνιων παραλλαγών μπορεί να είναι πολύ σημαντικός [49][66]. Σε σύγκριση με τις συχνές λειτουργικές παραλλαγές, που είναι πιθανό να έχουν προκύψει από αρχαίες μεταλλάξεις και έχουν προσαρμοστεί στο υπόλοιπο γονιδίωμα, οι σπάνιες λειτουργικές παραλλαγές έχουν πιο πρόσφατη προέλευση, είναι πολυάριθμες, και είναι λιγότερο καλά προσαρμοσμένες στο υπόλοιπο γονιδίωμα. Για τους λόγους αυτούς, οι σπάνιες λειτουργικές παραλλαγές μπορεί να τείνουν να έχουν μια μεγαλύτερη επίδραση στον κίνδυνο της νόσου, και συλλογικά να εξηγούν ένα ουσιαστικό ποσοστό της διακύμανσης του πληθυσμού στην ευαισθησία για μια νόσο [67]. Με δεδομένη λοιπόν την αδυναμία των GWASs να ανιχνεύσουν αποτελεσματικά τέτοιου είδους παραλλαγές, και αξιοποιώντας τις τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next generation sequencing) σε ολόκληρο το γονιδίωμα (Whole genome sequencing) ή σε ένα μέρος αυτού (Whole exome sequencing), έχει καταστεί δυνατή η αναζήτηση και η ανίχνευση σπάνιων παραλλαγών σε σύνθετα νοσήματα **(Εικόνα 1.9)** [68].

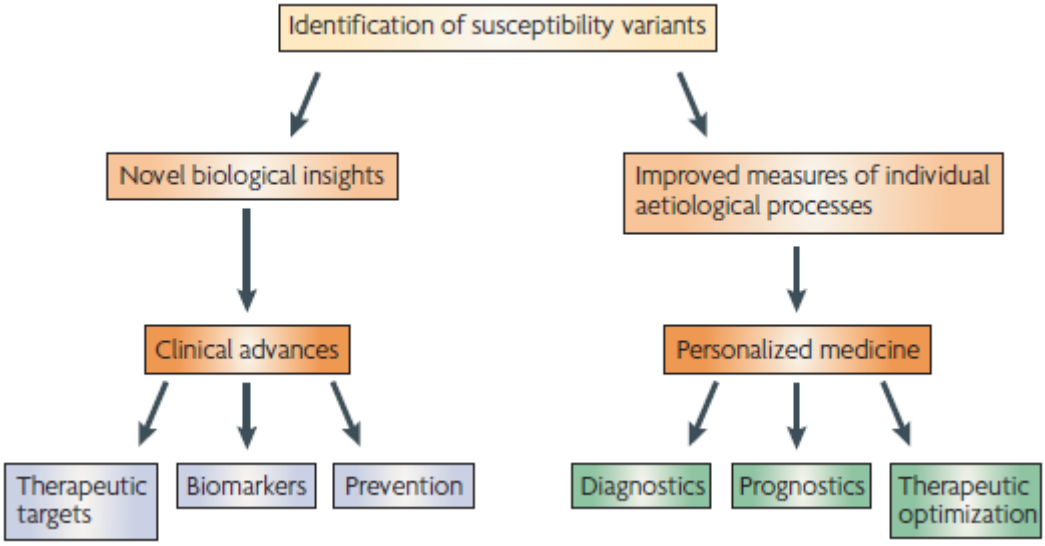


Εικόνα 1.9: Προσεγγίσεις Συχνή νόσος-Συχνή παραλλαγή / Συχνή νόσος-Σπάνια παραλλαγή. Οι μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό συχνών παραλλαγών με MAF μεγαλύτερη από 5%. Οι συχνές παραλλαγές που εντοπίζονται πιθανότατα δεν είναι οι ίδιες η αιτία, αλλά είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με τις αιτιώδεις παραλλαγές (Υπόθεση συχνή νόσος-συχνή παραλλαγή [CD-CV]). Οι προσεγγίσεις νέας γενιάς που εφαρμόζονται τώρα αποτελούνται από στοχευμένη επαναλληλούχιση των κορυφαίων γενετικών τόπων που έχουν προκύψει από GWAS ή από μελέτες whole-exome sequencing, σε μεγάλο αριθμό ασθενών, με σκοπό τον εντοπισμό σπάνιων (MAF<1%) αιτιατών παραλλαγών (Υπόθεση συχνή νόσος-σπάνια παραλλαγή [CD-RV]) [68].

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα σπάνιων και χαμηλής συχνότητας παραλλαγών που σχετίζονται με πολύπλοκα χαρακτηριστικά. Η πρώτη μελέτη είναι μια μεγάλη προσπάθεια επαναλληλούχισης 25 γονιδίων που έχουν αναγνωριστεί από μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, για έξι αυτοάνοσα νοσήματα σε 24.892 ασθενή και 17.019 υγιή άτομα. Συνολικά, 2990 παραλλαγές ανιχνεύθηκαν σε κωδικοποιούσες περιοχές αυτών των γονιδίων, μεταξύ των οποίων το 73,6% ήταν καινούριες, το 97,1% είχαν συχνότητες <0,5% (το όριο συχνότητας σπάνιων παραλλαγών) και το 68,9% υπήρξε μόνο σε ένα ή δύο άτομα [69]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν σε μία μελέτη σε 202 γονίδια που θεωρούνται στόχοι φαρμάκων και αλληλουχήθηκαν σε 14.002 άτομα [70][71]. Τέλος, όσον αφορά τη Ρευματοειδή αρθρίτιδα, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες ανίχνευσης σπάνιων παραλλαγών σε ήδη αναγνωρισμένα γονίδια που προσδίδουν ευαισθησία στη νόσο. Ο Diogo και η ομάδα του, πραγματοποιώντας αλληλούχιση εξωνίων των γονιδίων *IL2RA*, *IL2RB* και *TYK2*, ανίχνευσαν μη-συνώνυμες σπάνιες παραλλαγές που έδειξαν να συσχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [72][73].

Στόχοι της γενετικής έρευνας

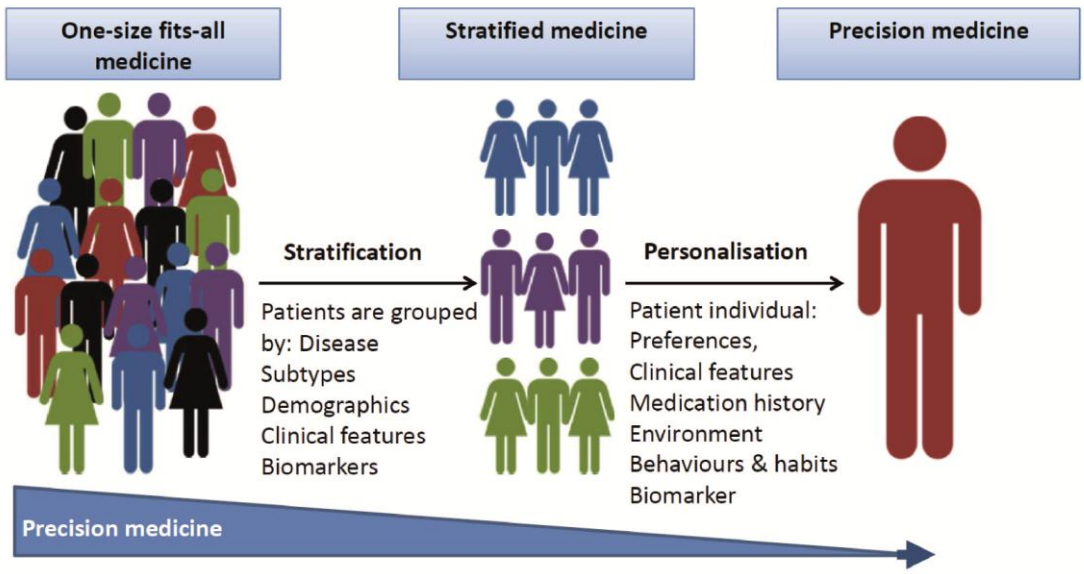
Τα αποτελέσματα της γενετικής έρευνας στην αναγνώριση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για διάφορα νοσήματα συσσωρεύονται με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό και ταυτόχρονα έχουν παραχθεί πολύτιμες βιολογικές γνώσεις σχετικά με μονοπάτια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένα νοσήματα, αλλά έχουν αποσαφηνιστεί και αρκετοί λειτουργικοί μηχανισμοί γονιδίων που επηρεάζουν τη νόσο [58]. Ο απώτερος στόχος, όμως, των ερευνητών είναι η μετάφραση αυτών των ευρημάτων σε προόδους που θα έχουν άμεση αντανάκλαση στην κλινική πράξη **(Εικόνα 1.10)** [74].



Εικόνα 1.10: Μετάφραση των ευρημάτων στην κλινική πράξη. Τα ευρήματα από τις γενετικές συσχετίσεις μεταφράζονται σε προόδους στην κλινική πράξη σε ότι αφορά νέους θεραπευτικούς στόχους και βιοδείκτες αλλά και σε ότι αφορά στην πρόληψη νοσημάτων. Σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά τους στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής, τόσο στην διάγνωση και την πρόγνωση όσο και στην θεραπεία [74].

Για την ενσωμάτωση των ευρημάτων της γενετικής έρευνας στην κλινική πράξη μπορούν να ακολουθηθούν δύο κύριες οδοί. Στην πρώτη, ο εντοπισμός των νέων αιτιολογικών μονοπατιών παρέχει νέες ευκαιρίες για κλινικές προόδους γενικού οφέλους για όλους όσους πάσχουν ή κινδυνεύουν να νοσήσουν από το εν λόγω νόσημα.

Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει την αναγνώριση θεραπευτικών στόχων μέσα στα παθογενετικά μονοπάτια, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων για την θεραπεία και/ή την πρόληψη νοσημάτων. Η αναγνώριση των αιτιολογικών μονοπατιών συμβάλλει επίσης στον εντοπισμό βιοδεικτών, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη βελτίωση της πρόγνωσης της νόσου αλλά και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και της απόκρισης στην θεραπεία [74]. Μερικές φορές, τα αποτελέσματα της γενετικής έρευνας μπορούν να αναδείξουν σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που συμβάλλουν στη νόσο, επιτρέποντας τη λήψη μέτρων πρόληψης των νοσημάτων. Η δεύτερη μεταφραστική οδός αφορά μεμονωμένα άτομα και τη χρήση του ατομικού γενετικού προφίλ για εξατομικευμένη φροντίδα υγείας (Personalized Medicine). Ένας νεότερος όρος που περιλαμβάνει τον όρο της εξατομικευμένης ιατρικής είναι αυτός της «ιατρικής ακριβείας» (Precision Medicine). Η ιατρική ακριβείας είναι μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία και την πρόληψη νοσημάτων που λαμβάνει υπόψη την ατομική ποικιλομορφία στο γενετικό υπόβαθρο, στο περιβάλλον και στον τρόπο ζωής για κάθε άτομο. Η προσέγγιση αυτή, επιτρέπει στους γιατρούς και τους ερευνητές να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια ποιά θεραπεία και ποιές στρατηγικές πρόληψης μιας συγκεκριμένης νόσου θα λειτουργήσουν αποτελεσματικά σε συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων. Βρίσκεται σε αντίθεση με την προσέγγιση "one size για όλους", στην οποία η θεραπεία της νόσου και οι στρατηγικές πρόληψης αναπτύσσονται γενικευμένα, με μικρότερη συνεκτίμηση των διαφορών μεταξύ των ατόμων [75]. Τώρα που το κόστος της αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος ενός ατόμου είναι προσιτό, το πεδίο της εξατομικευμένης ιατρικής αναπτύσσεται συνεχώς και έχει βρει το δρόμο του στην κλινική πράξη. Συμβάλλει στην εκτίμηση του κινδύνου για την ανάπτυξη μιας νόσου, υπολογίζοντας την προδιάθεση μέσω του γενετικού ελέγχου (genetic testing). Σημαντικός επίσης είναι ο ρόλος της προσέγγισης αυτής στην πρόληψη νοσημάτων μέσω χορήγησης κατάλληλης θεραπείας αλλά και αλλαγής του τρόπου ζωής καθώς επίσης και στην έγκαιρη διάγνωση. Τέλος, η συμβολή της εξατομικευμένης ιατρικής είναι πολύ σημαντική σε ότι αφορά την θεραπεία, η οποία με την συμβολή της φαρμακογενωμικής, σχεδιάζεται έτσι ώστε να είναι στοχευόμενη και αποτελεσματική, μειώνοντας ταυτόχρονα τις ανεπιθύμητες παρενέργειες **(Εικόνα 1.11)** [76][77].



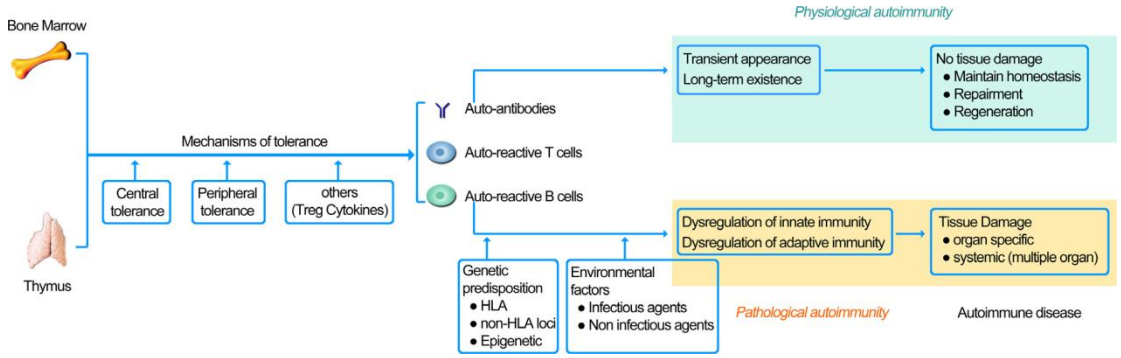
Εικόνα 1.11: Ιατρική ακριβείας (Precision Medicine)

Αυτοανοσία και αυτοάνοσα νοσήματα

Πριν από έναν αιώνα, ο Γερμανός Νομπελίστας ανοσολόγος Paul Erlich, συνέλαβε την ιδέα της «αχαλίνωτης» αντιδραστικότητας έναντι συστατικών του ίδιου του οργανισμού (αυτοαντιγόνα) και της έδωσε το όνομα «αυτοτοξικός τρόμος» (horror autotoxicus), αυτό που σήμερα ορίζουμε ως αυτοανοσία. Το υγιές ανθρώπινο σώμα είναι εξοπλισμένο με ένα ισχυρό σύνολο «εργαλείων» που του επιτρέπουν να εντοπίζει και να καταπολεμά μολυσματικούς παράγοντες και άλλα ξένα αντιγόνα (όπως είναι οι ιοί, τα βακτήρια και τα παράσιτα). Σε αυτή την διαδικασία είναι πολύ σημαντική η διάκριση μεταξύ «εαυτού» και «ξένου». Δυστυχώς, αυτό το σύνολο εργαλείων, γνωστό ως ανοσοποιητικό σύστημα, μερικές φορές εκτρέπεται σε λάθος κατεύθυνση, χάνεται η αυτοανοχή (Self-tolerance), και επιτίθεται στον ίδιο τον οργανισμό. Αυτές οι άστοχες ανοσολογικές αποκρίσεις αναφέρονται ως αυτοανοσία, η οποία μπορεί να αποδειχθεί με την παρουσία αυτοαντισωμάτων ή Τ λεμφοκυττάρων που αντιδρούν με τα αντιγόνα του ξενιστή [78][79].

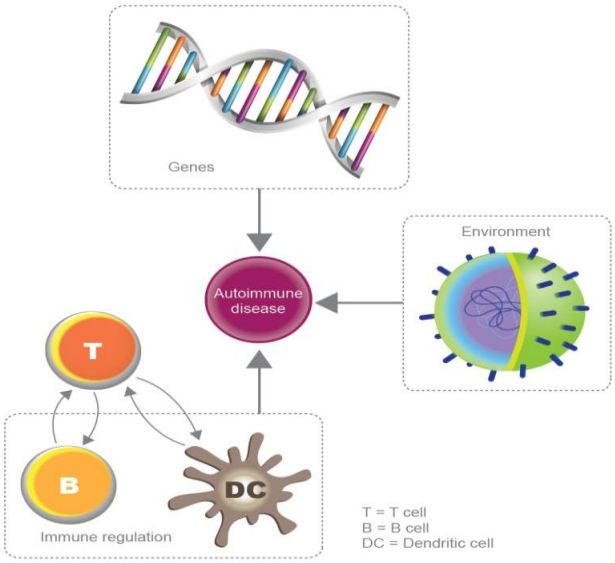
Κατά την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που αντιδρούν κατά των ιστών του ίδιου οργανισμού απαλείφονται, παρέχοντας έτσι ένα ανοσοποιητικό σύστημα που είναι «ανεκτικό» στον εαυτό.

Ιστορικά, η αυτοανοσία ή αλλιώς η αντιδραστικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτοαντιγόνα θεωρήθηκε ως ασυνήθιστη απόκριση. Οι ερευνητές όμως, συνειδητοποίησαν ότι η αυτοανοσία είναι ένα φυσικό φαινόμενο, με αυτοαντιδραστικά αντισώματα και αυτοάνοσα κύτταρα να υπάρχουν σε όλα τα φυσιολογικά άτομα. Ωστόσο, η αυτοανοσία μπορεί να είναι η αιτία ενός μεγάλου φάσματος ανθρώπινων νοσημάτων, γνωστών ως αυτοάνοσων νοσημάτων (Autoimmune Diseases, AIDs). Η έννοια της αυτοανοσίας ως αιτία της ανθρώπινης νόσου είναι σχετικά νέα και δεν έγινε δεκτή στην επικρατούσα ιατρική σκέψη μέχρι τη δεκαετία του 1960 [80]. Τα αυτοάνοσα νοσήματα δημιουργούνται, επομένως, όταν η καλοήθης αυτοανοσία εξελίσσεται σε παθογόνο αυτοανοσία **(Εικόνα 1.12)** [81].



Εικόνα 1.12: Η εξέλιξη της αυτοάνοσης νόσου. Ακόμη και υπό τον πιο αυστηρό έλεγχο από την κεντρική και περιφερειακή ανοχή, ένας μικρός αριθμός αυτοαντιδραστικών Τ και Β κυττάρων «διαρρέουν» στην περιφέρεια σε φυσιολογικά άτομα. Ωστόσο, παραμένουν αβλαβή, αν δεν υπάρχουν η γενετική προδιάθεση και κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες για να ‘’σπάσει’’ η ανοχή [81].

Το αινιγματικό ζήτημα του γιατί το ανοσοποιητικό σύστημα θα προκαλούσε επίθεση στους ιστούς του ίδιου του οργανισμού είναι ένας τομέας συνεχούς έρευνας. Η αυτοανοσία έχει αποδοθεί σε μια σειρά υποψήφιων αιτιών, όπως είναι η γενετική προδιάθεση, οι περιβαλλοντικές αιτίες όπως οι λοιμώξεις και οι τοξίνες αλλά και η απορύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [82]. Ενώ αυτές οι αιτίες μπορούν να επικαλύπτονται και να αλληλεπιδρούν, δεν υπάρχει αυτή τη στιγμή κανένας μεμονωμένος αιτιολογικός παράγοντας **(Εικόνα 1.13)**.

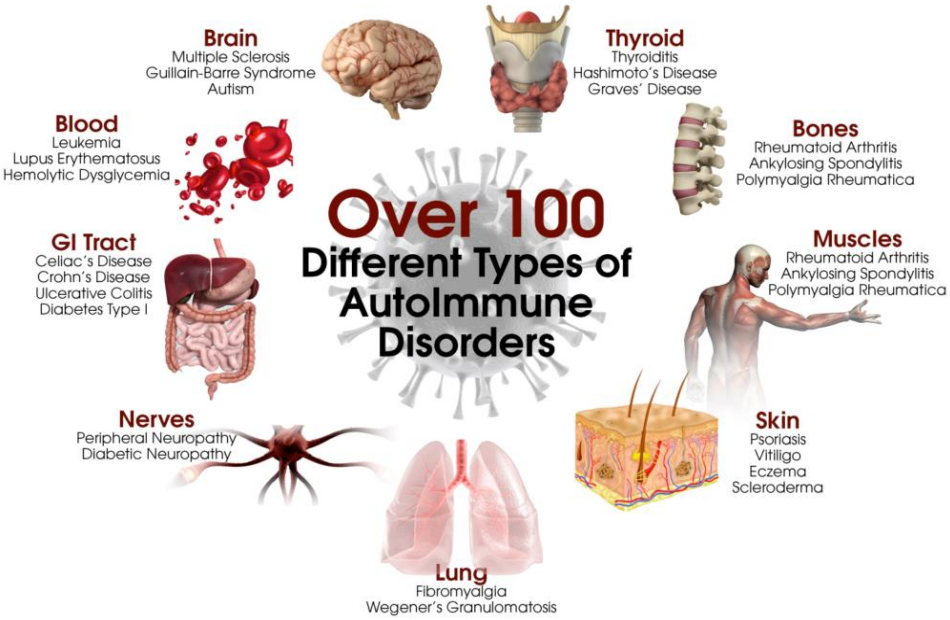


Εικόνα 1.13: Παράγοντας που συμβάλλουν στις αυτοάνοσες νόσους. (https://neuroendoimmune.wordpress.com/2013/04/16/horror-autotoxicus-the-story-of-autoimmunity/)

Οι περισσότερες αυτοάνοσες νόσοι θεωρούνται ότι είναι πολυγονιδιακές και η ιδέα αυτή προέκυψε από τις κλινικές αναφορές ασθενών, οι οποίοι συχνά περιγράφουν οικογενειακό ιστορικό αυτοάνοσων νοσημάτων. Η πιο σταθερή συσχέτιση της ευπάθειας σε αυτοάνοσα νοσήματα βρέθηκε με συγκεκριμένα αλληλόμορφα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), όμως υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις ότι πολλά ακόμα γονίδια προσδίδουν ευαισθησία σε αυτοάνοσα νοσήματα [80][83]. Οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι ορμόνες, η διατροφή, τα φάρμακα, οι τοξίνες και οι λοιμώξεις είναι καθοριστικοί για το αν ένα άτομο θα αναπτύξει αυτοάνοση νόσο. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι σε θέση να ενισχύσουν την αυτοανοσία σε άτομα με γενετική προδιάθεση και να αναστείλουν την ανοχή (self-tolerance), αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσης νόσου [83][84]. Τέλος, σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αυτοανοσίας διαδραματίζει η απορύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να συμβεί αυτό ποικίλουν και περιλαμβάνουν την απελευθέρωση αντιγόνων από θέσεις περιορισμού, τη δημιουργία καινούριων αντιγόνων μέσω μοριακών αλλαγών, τον μοριακό μιμητισμό (molecular mimicry) όπου ο οργανισμός επιτίθεται σε δικά του αντιγόνα, τα οποία όμως μοιάζουν σημαντικά με εξωγενή αντιγόνα, τις ανωμαλίες των λεμφοκυττάρων, την

αποτυχία των μηχανισμών της κεντρικής (central tolerance) και της περιφερικής (peripheral tolerance) ανοχής αλλά και την πολυκλωνική διέγερση των λεμφοκυττάρων [84][85].

Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των αυτοάνοσων νοσημάτων είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων, φλεγμονής, μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, αυτοαντιδραστικών Τ λεμφοκύτταρων και πλασματοκυττάρων [80][84]. Τα αυτοάνοσα νοσήματα μπορούν να ταξινομηθούν ως όργανο-ειδικά ή μη όργανο-ειδικά συστηματικά (systemic), ανάλογα με το αν η αυτοάνοση απόκριση κατευθύνεται εναντίον ενός συγκεκριμένου ιστού, όπως ο θυρεοειδής στην θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Hashimoto's thyroiditis) ή κατά αντιγόνων που βρίσκονται διασκορπισμένα σε διάφορα όργανα και ιστούς, όπως στον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ) και στη Ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ). Εντούτοις, το όριο μεταξύ συστηματικών και μη συστηματικών αυτοάνοσων διαταραχών γίνεται ασαφές κατά τη διάρκεια της νόσου, καθώς συχνά η εντοπισμένη αυτοάνοση απόκριση εκτείνεται πέραν των αρχικά στοχευόμενων περιοχών [79][81]. Οι αυτοάνοσες νόσοι είναι χρόνιες καταστάσεις και έχει πλέον αποδειχθεί ότι επηρεάζουν το 3-5% του παγκόσμιου πληθυσμού, με το 80% να είναι γυναίκες [86]. Οι πιο συχνές από αυτές τις καταστάσεις είναι η αυτοάνοση νόσος του θυρεοειδούς και ο διαβήτης τύπου Ι, ενώ μέχρι σήμερα, σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Αυτοάνοσων Νοσημάτων (AARDA), έχουν αναγνωριστεί 134 διαφορετικές αυτοάνοσες παθήσεις **(Εικόνα 1.14)**.



Εικόνα 1.14: Πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι αυτοάνοσων νοσημάτων. (http://functionalmedsystem.com/el/aytoanosa-nosimata/)

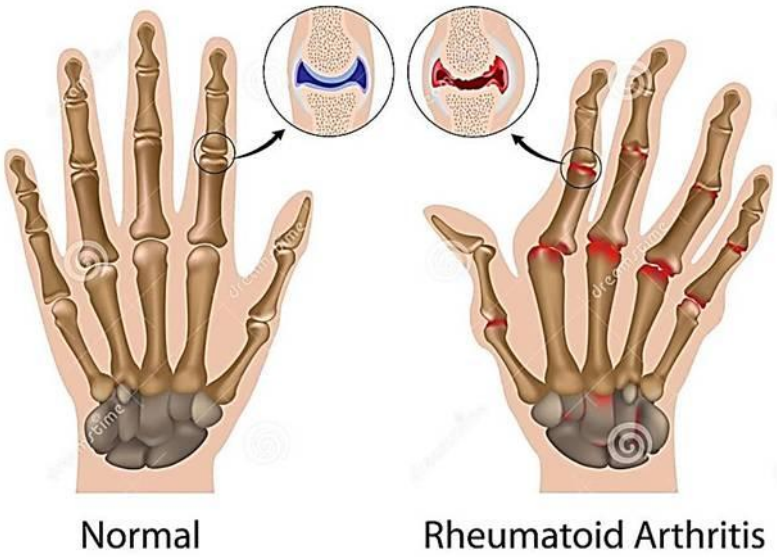
Το γεγονός ότι τα νοσήματα αυτά μοιράζονται αρκετά κλινικά σημεία και συμπτώματα, φυσιοπαθολογικούς μηχανισμούς και γενετικούς παράγοντες, ονομάζεται αυτοάνοση ταυτολογία (autoimmune tautology) και δείχνει ότι έχουν σε ένα βαθμό κάποια κοινή προέλευση [87].

Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Επιδημιολογία και κλινικά χαρακτηριστικά, διάγνωση, θεραπεία και πρόγνωση

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια, συστηματική, αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος [88]. Η πρωταρχική έκφραση της νόσου εμφανίζεται στον αρθρικό υμένα και χαρακτηρίζεται από συμμετρική φλεγμονή των περιφερικών αρθρώσεων, η οποία οδηγεί σε οίδημα, δυσκαμψία, οστική διάβρωση, καταστροφή του χόνδρου και τελικώς

σε αποσταθεροποίηση της συνεκτικότητας της άρθρωσης, με συχνό επακόλουθο την καταστροφή της **(Εικόνα 1.15)** [88][89].



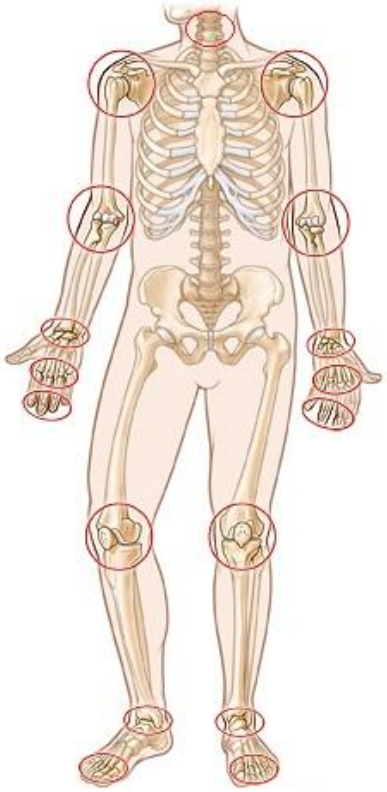
Εικόνα 1.15: Φυσιολογικό χέρι vs χέρι με ρευματοειδή αρθρίτιδα. (http://www.healthweb.gr/category/news/page/52/)

Ως αποτέλεσμα, η ΡΑ σχετίζεται με σημαντική λειτουργική αναπηρία, νοσηρότητα και επιτάχυνση της θνησιμότητας [88].

Η ΡΑ είναι ίσως η πιο κοινή φλεγμονώδης αρθρίτιδα και επηρεάζει περίπου το 0,5% με 1% του πληθυσμού παγκοσμίως, με τις γυναίκες να νοσούν σε αναλογία 3:1 σε σχέση με τους άντρες [88]. Αν και η ΡΑ μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικιακή ομάδα, η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου παρατηρείται μεταξύ των ηλικιών 30 – 55 [90]. Γενικά, ο επιπολασμός της νόσου είναι εκπληκτικά σταθερός σε ολόκληρο τον κόσμο, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική περιοχή και την φυλή, υπάρχουν όμως κάποιες εξαιρέσεις. Η εμφάνιση της ΡΑ είναι κάπως σπανιότερη στην Κίνα (~ 0,3%), ενώ είναι σημαντικά συχνότερη σε άλλες ομάδες, όπως οι Ινδιάνοι Pima στη Βόρεια Αμερική (~ 5%) [91]. Το θετικό οικογενειακό ιστορικό αυξάνει τον κίνδυνο για ΡΑ περίπου τρεις με πέντε φορές και οι μελέτες σε διδύμους έχουν αποδείξει ότι γενετικοί παράγοντες συμβάλουν στην παθογένεια της νόσου, ενώ η κληρονομικότητα της νόσου

υπολογίζεται επί του παρόντος σε 40-65% για την οροθετική ΡΑ [92][93]. Εξαιτίας του μεγάλου επιπολασμού της και της άμεσης προσβασιμότητας σε δείγματα για εργαστηριακή έρευνα, η ΡΑ έχει αποδειχθεί χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη όλων των φλεγμονωδών και ανοσοδιαμεσολαβούμενων νοσημάτων.

Η τυπική περίπτωση της ΡΑ ξεκινάει με την αργή ανάπτυξη συμπτωμάτων σε διάστημα εβδομάδων έως λίγων μηνών. Συχνά, ο ασθενής παρατηρεί πρώτα δυσκαμψία σε μία ή περισσότερες αρθρώσεις, η οποία συνήθως συνοδεύεται με πόνο στην κίνηση και ευαισθησία στην άρθρωση. Ο αριθμός των εμπλεκόμενων αρθρώσεων είναι μεταβλητός, αλλά σχεδόν πάντοτε η διαδικασία είναι τελικά πολυαρθρική και περιλαμβάνει πέντε ή περισσότερες αρθρώσεις. Περιστασιακά, οι ασθενείς εμφανίζουν εκρηκτική πολυαρθρική εκδήλωση που εμφανίζεται σε διάστημα 24 έως 48 ωρών. Ένα άλλο μοτίβο είναι η παλινδρομική παρουσίαση, στην οποία οι ασθενείς περιγράφουν διόγκωση σε μία ή δύο αρθρώσεις, η οποία μπορεί να διαρκέσει λίγες μέρες έως εβδομάδες, στη συνέχεια να απομακρυνθεί πλήρως, αργότερα να επιστρέψει στις ίδιες ή άλλες αρθρώσεις, με ένα πρότυπο αυξανόμενο με την πάροδο του χρόνου [94]. Οι αρθρώσεις που εμπλέκονται συχνότερα είναι οι εγγύς μεσοφαλαγγικές (PIP) και μετακαρποφαλαγγικές (MCP) αρθρώσεις των χεριών, των καρπών και των μικρών αρθρώσεων των ποδιών, συμπεριλαμβανομένων των μεταταρσιοφαλαγγικών (MTP) αρθρώσεων. Οι ώμοι, οι αγκώνες, τα γόνατα και οι αστράγαλοι επηρεάζονται επίσης σε πολλούς ασθενείς. Οι άπω μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις (DIP) σπανίως προσβάλλονται ενώ με εξαίρεση την αυχενική σπονδυλική στήλη, η σπονδυλική στήλη δεν επηρεάζεται **(Εικόνα 1.16)** [88].



Εικόνα 1.16: Σημειώνονται οι αρθρώσεις που προσβάλλονται συχνότερα στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. (Healthwise, Incorporated)

Τα μη ειδικά συστηματικά συμπτώματα περιλαμβάνουν κυρίως κόπωση, αδυναμία, δυσφορία, κατάθλιψη, ανορεξία και απώλεια βάρους, ενώ περιστασιακά εμφανίζεται χαμηλός πυρετός (37 έως 38 °C) [89].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ΡΑ είναι συστηματική νόσος με ποικιλία εξωαρθρικών εκδηλώσεων, αρκετές από τις οποίες, μολονότι συνήθεις, δεν έχουν κλινική σημασία. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις, αυτές οι εκδηλώσεις μπορεί να αποτελούν την κυριότερη ένδειξη δραστηριότητας της νόσου και την πηγή της νοσηρότητας και να χρήζουν θεραπευτικής αντιμετώπισης. Κατά κανόνα, οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις εμφανίζονται σε ασθενείς με υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων (seropositive) και παρουσιάζουν κακή πρόγνωση, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της νοσηρότητα και της θνησιμότητας [89][95]. Οι πιο συχνές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν ρευματοειδή οζίδια (nodules), αμυλοείδωση, αγγειίτιδα, δευτερογενές σύνδρομο Sjögren, παθήσεις του οφθαλμού, δευτεροπαθή οστεοπόρωση, μυϊκές ατροφίες, αναιμία, θρομβοκυττάρωση, σύνδρομο Felty,

πλευροπνευμονικές και νευρολογικές εκδηλώσεις καθώς επίσης καρδιαγγειακή νόσο, η οποία είναι η κύρια αιτία της αυξημένης θνησιμότητας στη ΡΑ [88].

Η ΡΑ μπορεί να είναι δύσκολο να διαγνωστεί στα πρώιμα στάδια για διάφορους λόγους. Πρώτον, δεν υπάρχει κάποια μεμονωμένη εξέταση για τη νόσο και τα συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν ως προς τη σοβαρότητα τους από άτομο σε άτομο. Επίσης, το πλήρες φάσμα των συμπτωμάτων αναπτύσσεται με την πάροδο του χρόνου και όχι από την έναρξη της νόσου. Τέλος, επειδή τα συμπτώματα μπορούν να μιμηθούν εκείνα άλλων τύπων αρθρίτιδας όπως η οστεοαρθρίτιδα, απαιτείται χρόνος για την προσεκτική διαφορική διάγνωση. Η παρουσία εξω-αρθρικών εκδηλώσεων, η απώλεια βάρους, ο πυρετός, η αναιμία, η οροσίτιδα (φλεγμονή των ορολογικών ιστών), το σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα και η αγγειίτιδα συναινούν στη διάγνωση της ΡΑ [90]. Η διάγνωση βασίζεται σε ένα εμπεριστατωμένο ιατρικό ιστορικό, στην κλινική εξέταση και στις απεικονιστικές και αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν δείκτες φλεγμονής, όπως η ΤΚΕ και η CRP, μέτρηση ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και άλλων αυτοαντισωμάτων όπως είναι τα anti-CCP αντισώματα [96]. Για μία τέτοια νόσο με τόσο ευμετάβλητα στοιχεία και ποικίλλουσα πορεία, το Αμερικανικό Κολλέγιο Ρευματολογίας (ACR), αρχικά το 1987, θέσπισε κριτήρια διάγνωσης και ταξινόμησης τα οποία αντικαταστάθηκαν με νέα κριτήρια ταξινόμησης το 2010 για την εξάλειψη των αδυναμιών των αρχικών **(Πίνακας 3)** [97][98].

Πίνακας 3. Διαγνωστικά κριτήρια για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα
(http://www.elire.gr/info_det.php?di=11) [98].

Κριτήρια	Παράμετροι Κριτηρίων	Σκορ
	1 μεγάλη άρθρωση	0
Αρθρίτιδα σε	2-10 μεγάλες αρθρώσεις	1
	1-3 μικρές αρθρώσεις	2
	4-10 μικρές αρθρώσεις	3
	>10 αρθρώσεις (με ≥1 μικρή άρθρωση)	**5**
PA test ή Αντι-CCP αντισώματα	Θετικά σε χαμηλό τίτλο	2
	Θετικά σε υψηλό τίτλο	**3**
ΤΚΕ ή CRP	Φυσιολογικές	0
	Αυξημένη ΤΚΕ ή CRP	**1**
Διάρκεια αρθρίτιδας		
	<6 εβδομάδες	0
	≥6 εβδομάδες	**1**
Μεγαλύτερο δυνατό σκορ		**10**

Σύμφωνα με αυτήν την ταξινόμηση, προκειμένου να τεθεί η διάγνωση του νοσήματος θα πρέπει ο ασθενής να σημειώσει σκορ τουλάχιστον 6 στα 10. Ωστόσο, η ταξινόμηση δεν είναι συνώνυμη με τη διάγνωση. Ενώ η διάγνωση έχει απώτερο στόχο να είναι σωστή στο επίπεδο του μεμονωμένου ασθενούς, η ταξινόμηση στοχεύει στη μεγιστοποίηση αποκάλυψης ομοιογενών πληθυσμών για λόγους μελέτης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για να υποστηρίξει τη διάγνωση.

Για τη θεραπεία της ΡΑ χρησιμοποιείται μια ποικιλία προσεγγίσεων. Οι προσεγγίσεις αυτές εφαρμόζονται σε διαφορετικούς συνδυασμούς και σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια της νόσου, και επιλέγονται ανάλογα με την ατομική κατάσταση του ασθενούς. Όποια και αν είναι η θεραπεία που ο γιατρός και ο ασθενής επιλέγουν, οι στόχοι της θεραπευτικής αγωγής παραμένουν οι ίδιοι: να ανακουφιστεί ο ασθενής από τον πόνο και τα άλλα συμπτώματα, να μειωθεί η φλεγμονή επιτυγχάνοντας το χαμηλότερο δυνατό επίπεδο δραστηριότητας της νόσου, να επιβραδυνθεί ή να σταματήσει η καταστροφή των αρθρώσεων, να βελτιωθεί η ποιότητα ζωής και η ικανότητα του ατόμου να λειτουργεί στην καθημερινότητά του και να μειωθούν οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές [88]. Η βέλτιστη θεραπεία της ΡΑ απαιτεί ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα που συνδυάζει ιατρική, κοινωνική και συναισθηματική υποστήριξη για τον ασθενή καθώς και τη συνεργασία αρκετών ειδικοτήτων. Επίσης, είναι σημαντικό ο ασθενής και η οικογένεια του, να εκπαιδεύονται σχετικά με τη φύση και την πορεία της νόσου. Οι επιλογές θεραπείας περιλαμβάνουν φάρμακα, μείωση του στρες στις αρθρώσεις, φυσικοθεραπείες και χειρουργική επέμβαση.

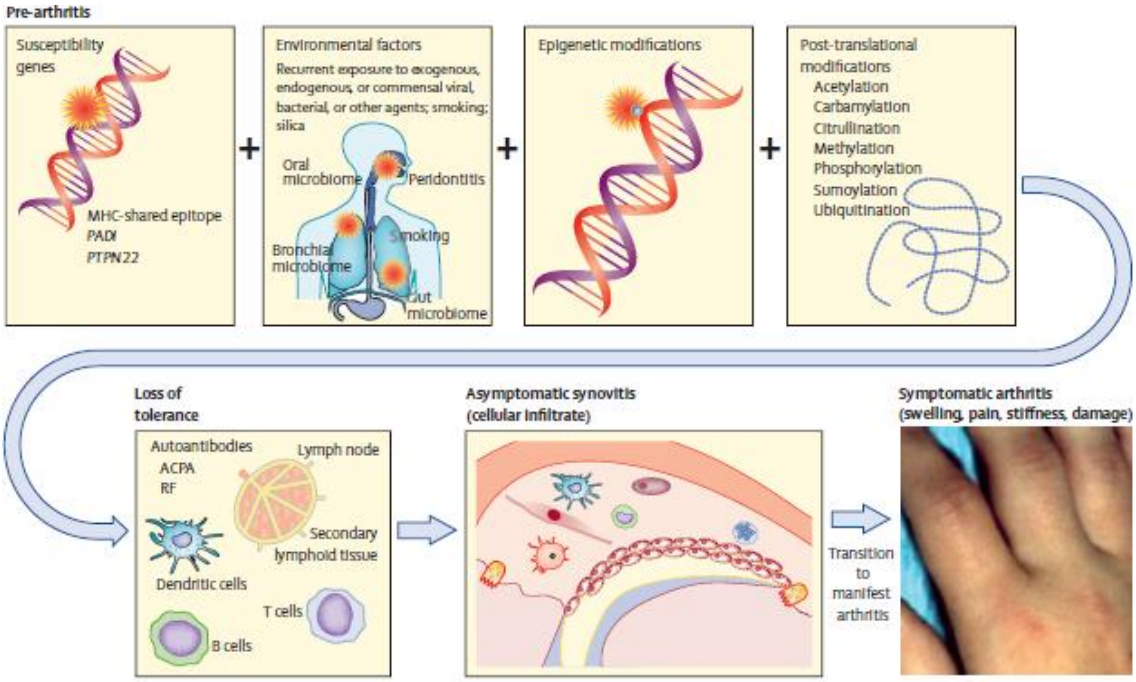
Υπάρχουν τρεις γενικές κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται συνήθως στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας: τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), τα κορτικοστεροειδή και τα αντιρευματικά τροποποιητικά της νόσου φάρμακα (DMARDs). Τα NSAIDs και τα κορτικοστεροειδή δρουν γρήγορα, ενώ με τα DMARDs μπορεί να περάσουν αρκετές εβδομάδες ή μήνες για να αποφέρουν κάποια κλινική επίδραση. Τα NSAIDs (ibuprofen, naproxen κ.α.) και τα απλά αναλγητικά χορηγούνται για τον γρήγορο έλεγχο των συμπτωμάτων και των σημείων της τοπικής φλεγμονής. Τα φάρμακα αυτά βελτιώνουν ταχέως τα συμπτώματα, αλλά επηρεάζουν ελάχιστα την εξέλιξη της νόσου. Οι χαμηλές δόσεις κορτικοστεροειδών (prednisone, prednisolone κ.α.) καταστέλλουν επίσης τα συμπτώματα αλλά ταυτόχρονα επιβραδύνουν την ανάπτυξη και πρόοδο της οστικής διάβρωσης. Από την άλλη πλευρά,

τα DMARDs, δρουν τροποποιώντας την παράμετρο της φλεγμονής άρα και την καταστροφική της ικανότητα. Τα παραδοσιακά DMARDs περιλαμβάνουν μεθοτρεξάτη (MTX), υδροξυχολλορκίνη, σουλφασαλαζίνη, λεφλουνομίδη, κυκλοφωσφαμίδη και αζαθειοπρίνη [99]. Σε αυτήν την κατηγορία επίσης ανήκουν οι βιολογικοί παράγοντες (etanercept, adalimumab, infliximab, abatacept, rituximab, tocilizumab, anakinra, JAK inhibitors κ.α.), που χρησιμοποιούνται συνήθως σε ασθενείς με πιο προχωρημένη νόσο. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι γενετικά τροποποιημένα φάρμακα που συμβάλλουν στη μείωση της φλεγμονής και της δομικής βλάβης στις αρθρώσεις, διακόπτοντας την αλληλουχία των γεγονότων που προκαλούν την φλεγμονή. Επειδή στοχεύουν σε συγκεκριμένα βήματα της φλεγμονώδους διαδικασίας (αναστέλλουν τον TNFα, διάφορες κυτταροκίνες, αναστέλλουν στοχευμένα τα Τ και Β λεμφοκύτταρα), δεν εξαλείφουν ολόκληρη την ανοσολογική απάντηση, όπως κάνουν κάποιες άλλες θεραπείες. Σε πολλούς ασθενείς, ένας βιολογικός παράγοντας μπορεί να επιβραδύνει, να τροποποιήσει ή να σταματήσει τη νόσο - ακόμα και όταν άλλες θεραπείες δεν έχουν βοηθήσει σε μεγάλο βαθμό [100].

Οι σημερινές θεραπευτικές επιλογές και η τεχνολογική επανάσταση στην ιατρική, μπορούν να οδηγήσουν σε πολύ πιο θετική πρόγνωση από ό, τι στο παρελθόν. Πολλοί ασθενείς με ΡΑ είναι σε θέση να διατηρούν μια υγιή ποιότητα ζωής και να συνεχίζουν την εργασία, την εκπαίδευση και τις σωματικές και κοινωνικές δραστηριότητες τους. Ωστόσο, η ακριβής πρόγνωση είναι πολύ δύσκολη για τους γιατρούς να επιτευχθεί. Η πρόοδος της ΡΑ μπορεί να ποικίλει σημαντικά από ασθενή σε ασθενή. Το γεγονός ότι ακόμα δεν ξέρουμε τι ακριβώς προκαλεί τη νόσο, καθιστά πολύ δύσκολο να καθοριστεί ένα ακριβές αποτέλεσμα. Υπάρχουν μερικά πιθανά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένων επιπλοκών που μπορούν να αναπτυχθούν σε ασθενείς με ΡΑ. Μερικοί ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν χρόνιες ενεργές καταστάσεις της νόσου με συχνές φλεγμονές. Άλλοι ασθενείς μπορεί να είναι σε θέση να βιώσουν μακρές περιόδους ύφεσης, στις οποίες τα συμπτώματα δεν είναι ενεργά. Γενικότερα όμως, οι ασθενείς με εξωαρθρικές εκδηλώσεις, με θετικά anti-CCP αντισώματα, θετικό ρευματοειδή παράγοντα, με οστικές διαβρώσεις και συνοσηρότητες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας [101].

Παθογενετικοί μηχανισμοί

Αν και το αίτιο της ΡΑ δεν είναι γνωστό, η σύγχρονη αντίληψη είναι ότι αποτελεί μία πολύπλοκη, γενετικά καθοριζόμενη νόσο. Αυτό σημαίνει ότι ένας συνδυασμός γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων οδηγεί στην εμφάνιση της χαρακτηριστικής παθολογίας αυτής [102]. Στην **Εικόνα 1.17** περιγράφονται συνοπτικά οι μηχανισμοί που αλληλεπιδρούν και οδηγούν στην δημιουργία της νόσου [90].



Εικόνα 1.17: Παθογενετικά μονοπάτια που οδηγούν στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Σε έναν γενετικά προδιατεθειμένο ξενιστή με γονίδια ευαισθησίας, οι περιβαλλοντικές επιδράσεις, οι επιγενετικές τροποποιήσεις και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια της ανοσιακής ανοχής με επακόλουθη ασυμπτωματική αρθρίτιδα, οδηγώντας τελικά σε κλινικά εμφανή αρθρίτιδα [103].

Η έναρξη της ΡΑ, συμβαίνει χρόνια πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Περιλαμβάνει συγκεκριμένα γονίδια που οδηγούν στην παραγωγή παθογόνων αντισωμάτων, τα οποία δεσμεύονται με τροποποιημένες πρωτεΐνες, βοηθούν στην ρήξη της ανοχής και εν τέλει στην αυτοδραστικότητα. Στην πρώτη φάση ο οργανισμός επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, είτε μέσω τοξικών εκθέσεων είτε μέσω ενεργοποίησης της έμφυτης ανοσίας [102]. Το κάπνισμα

[104], τα βακτηριακά προϊόντα [105], τα ιικά συστατικά αλλά και ορμονικοί παράγοντες όπως τα οιστρογόνα επηρεάζουν αυτές τις αποκρίσεις [106]. Το κάπνισμα μάλιστα είναι ο περιβαλλοντικός παράγοντας που έχει συσχετιστεί ισχυρότερα από κάθε άλλον με την εμφάνιση της νόσου [107]. Τα ερεθίσματα αυτά λοιπόν, ενεργοποιούν ένζυμα που οδηγούν στην τροποποίηση φυσιολογικών πεπτιδίων, συνηθέστερα μέσω της μετατροπής της αργινίνης σε κιτρουλλίνη, αλλά πιθανόν και μέσω άλλων οδών (π.χ., της μετατροπής της λυσίνης σε ομοκιτρουλλίνη). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συχνά στα υγιή άτομα, αν και ορισμένοι πληθυσμοί, κυρίως οι Ασιάτες, φέρουν γενετικές παραλλαγές που ευνοούν την κιτρουλλινοποίηση, μέσω της αυξημένης έκφρασης της PADI 4 (peptidyl arginine deiminase). Στα περισσότερα όμως άτομα, η διαδικασία είναι αυτοπεριοριζόμενη και δεν υπάρχουν δυσάρεστες επιδράσεις. Ωστόσο, σε άτομα με γονίδια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης ΙΙ που εμπλέκονται στην ΡΑ, αυτά τα τροποποιημένα πεπτίδια δεσμεύονται πολύ ισχυρά στις θέσεις δέσμευσης των αντιγόνων και παρουσιάζονται πολύ πιο αποτελεσματικά στα Τ κύτταρα, σε σχέση με τις μη τροποποιημένες πρωτεΐνες. Επειδή τα Τ κύτταρα δεν εκτίθενται στα τροποποιημένα πεπτίδια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, δεν απαλείφονται στον θύμο και έτσι απαντούν με μια φυσιολογική ανοσοαπόκριση εναντίον αυτών των νέων επιτόπων [88].

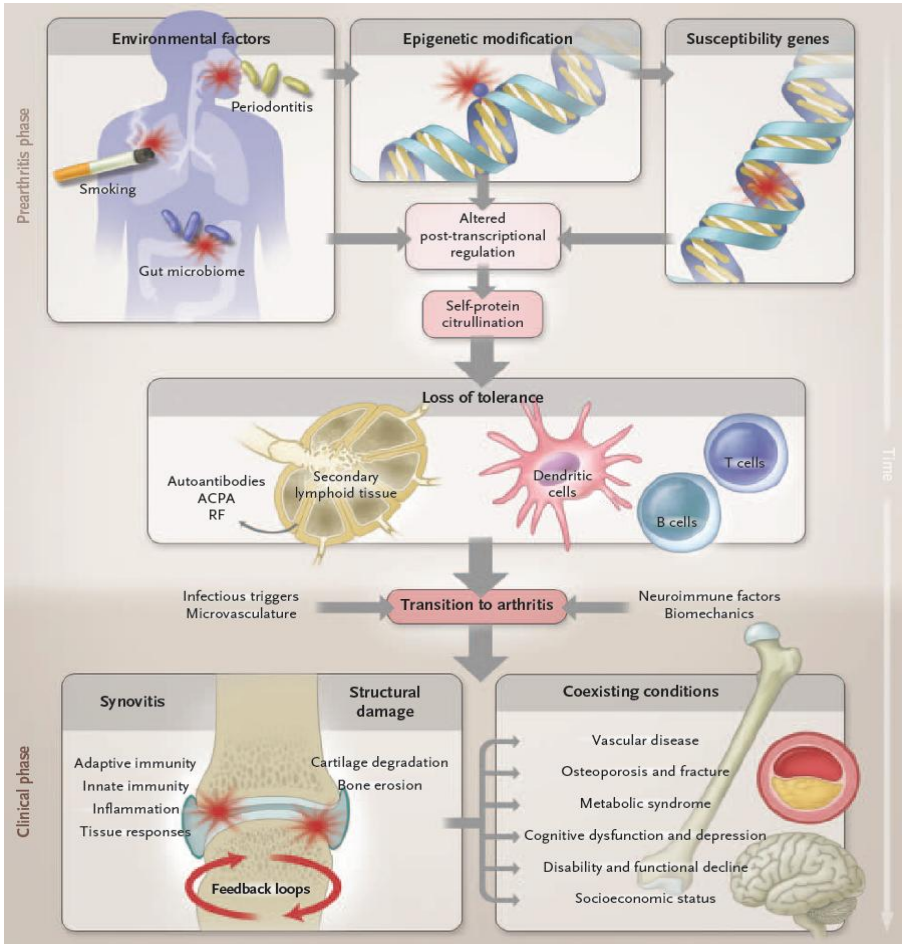
Αυτές οι διαδικασίες πιθανότατα συμβαίνουν στις επιφάνειες των βλεννογόνων, όπως ο πνεύμονας, το έντερο και η στοματική κοιλότητα, αν και οι τροποποιήσεις των πεπτιδίων μπορούν να συμβούν και στον ίδιο τον αρθρικό υμένα. Τα τροποποιημένα πεπτίδια ‘’φορτώνονται’’ στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και η αντιγόνο-παρουσίαση πραγματοποιείται στα αρθρικά βλαστοκυτταρικά κέντρα ή, πιο συχνά, στα κεντρικά λεμφοειδή όργανα μετά τη μετακίνηση των DCs μέσω των λεμφαγγείων. Τα Τ κύτταρα ενεργοποιούνται και παράγουν παθογόνες κυτταροκίνες, όπως η IL-17, ενεργοποιώντας παράλληλα τα Β κύτταρα να παράγουν αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά, κατευθύνονται κυρίως έναντι των κιτρουλλινοποιημένων πεπτιδίων, αλλά μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν πεπτίδια που έχουν τροποποιηθεί μέσω της καρβαμυλίωσης. Τα αντισώματα έναντι κιτρουλλινοποιημένων πρωτεϊνών (ACPAs) παράγονται έναντι μιας ποικιλίας πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της ινονεκτίνης, της βιμεντίνης, της α- ενολάσης, των ιστονών και πολλών άλλων [108].

Τα ACPAs από μόνα τους δεν αρκούν για να ξεκινήσουν την φλεγμονή του αρθρικού θύλακα (synovitis), και ένα "δεύτερο χτύπημα" είναι σαφώς απαραίτητο. Η φύση του δεύτερου σήματος δεν είναι καλά καθορισμένη, αλλά σε ζωικά μοντέλα μπορεί να συμβεί με το σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων. Τα συμπλέγματα αυτά, δεν χρειάζεται να είναι ειδικά για τα τροποποιημένα πεπτίδια, αλλά μπορεί να είναι τελείως άσχετα. Μπορούν να συμπλεχθούν με τους Fc υποδοχείς στον αρθρικό υμένα, ειδικά στα μαστοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια οδηγούν σε τοπική απελευθέρωση αγγειοδραστικών μεσολαβητών και αυξάνουν την πρόσβαση των ACPAs στην άρθρωση. Μόλις τα αντισώματα βρεθούν στην άρθρωση, αναγνωρίζουν τα αντιγόνα τους, ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και ξεκινάει μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγεί στην στρατολόγηση κυττάρων της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας, στην παραγωγή επιπλέον κυτταροκινών και χημειοκινών, και στην ενεργοποίηση τοπικών ινοβλαστικών αρθροκυττάρων (FLS) και μακροφάγων [109]. Καθώς τα κύτταρα συνεχώς συρρέουν και ενεργοποιούνται, επιτυγχάνεται τελικά ένα κρίσιμο σημείο και εμφανίζεται κλινική αρθρίτιδα.

Επιπλέον γενετικές συσχετίσεις ενισχύουν την ανοσοαπόκριση στις τροποποιημένες πρωτεΐνες, αυξάνουν την αυτοδραστικότητα έναντι των πρωτεϊνών μέσω της εξάπλωσης της επιτόπου και ενισχύουν τις αρθρικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Επίσης, οι επιγενετικές αλλαγές στα αρθρικά κύτταρα μέσω μεθυλίωσης του DNA [110], μέσω παραγωγής microRNA (miRNA) [111] ή μέσω τροποποιήσεων των ιστονών [112], μπορούν να ενισχύσουν αυτήν την δυσλειτουργική ανοσολογική απόκριση.

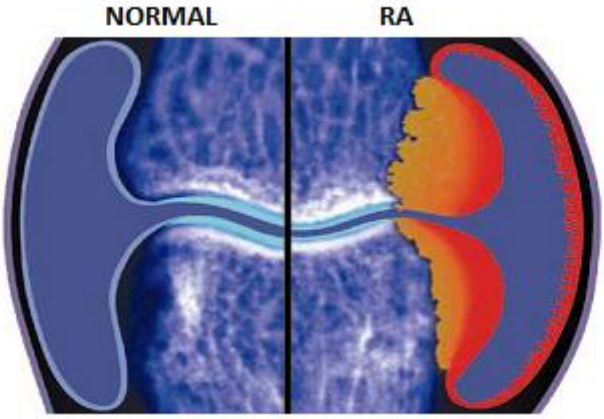
Τελικά, ξεκινάει μια καταστροφική φάση, η οποία διαμεσολαβείται από μεσεγχυματικά στοιχεία όπως οι ινοβλάστες και τα αρθρικά κύτταρα. Οι ενεργοποιημένοι οστεοκλάστες με τη σειρά τους προκαλούν διαβρώσεις στα οστά, ενώ η διάλυση του χόνδρου είναι αποτέλεσμα της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων που παράγονται από τα αρθρικά κύτταρα στον πάνο (pannus) ή από τα ουδετερόφιλα του αρθρικού υγρού. Οι αντιφλεγμονώδεις μηχανισμοί, όπως οι διαλυτοί υποδοχείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), οι κατασταλτικές κυτταροκίνες, οι πρωτεΐνες δέσμευσης κυτταροκινών, οι αναστολείς πρωτεασών, οι λιποξίνες, τα αντιοξειδωτικά, οι αντι-αγγειογόνοι παράγοντες και οι φυσικοί ανταγωνιστές των κυτταροκινών δεν βρίσκονται σε επαρκείς συγκεντρώσεις ώστε να ανακόψουν την φλεγμονώδη και καταστροφική διαδικασία [113].

Αν και υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις, ορισμένοι ασθενείς έχουν νόσο εξαρτώμενη κυρίως από κυτταροκίνες (π.χ. TNF ή IL-6), σε άλλους η νόσος είναι εξαρτώμενη από τα κύτταρα B, και σε άλλους από τα T-κύτταρα . Αυτές οι κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι η PA δεν είναι μία παθολογική οντότητα αλλά ένα σύνολο διαταραχών που ποικίλλουν ανάλογα με τη γενετική ‘’συγκρότηση’’ και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις σε ένα άτομο. Επίσης, η νόσος εξελίσσεται σε αρκετά διακριτά στάδια-φάσεις [114]. Στην πρώτη φάση, ένα προ-κλινικό γεγονός οδηγεί στην απώλεια της ανοχής στα αυτό-αντιγόνα. Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από την κλινική πλέον φάση της αρθρίτιδας, όπου η φλεγμονή στην άρθρωση είναι εμφανής και ο ασθενής προσέρχεται στην κλινική (**Εικόνα 1.18)** [115].



Εικόνα 1.18: Η προοδευτική ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Τα γονίδια αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες και σε συνδυασμό με τις επιγενετικές τροποποιήσεις προάγουν την απώλεια της ανοσιακής ανοχής. Αρχικά η φλεγμονή εντοπίζεται στην άρθρωση, από εκεί σε μετέπειτα στάδια γίνεται συστηματική έως ότου τελικά να εμφανιστούν πολλές εξωαρθρικές εκδηλώσεις [116].

Η τρίτη και καταστροφική φάση, συμβαίνει όταν ο χόνδρος, το οστό και οι περιαρθρικές δομές υπόκεινται σε διάβρωση και χάνεται η δομική ακεραιότητα της αρθρικής επιφάνειας, μια διαδικασία που ονομάζεται σχηματισμός πάνου (pannus formation) **(Εικόνα 1.19)** [117].

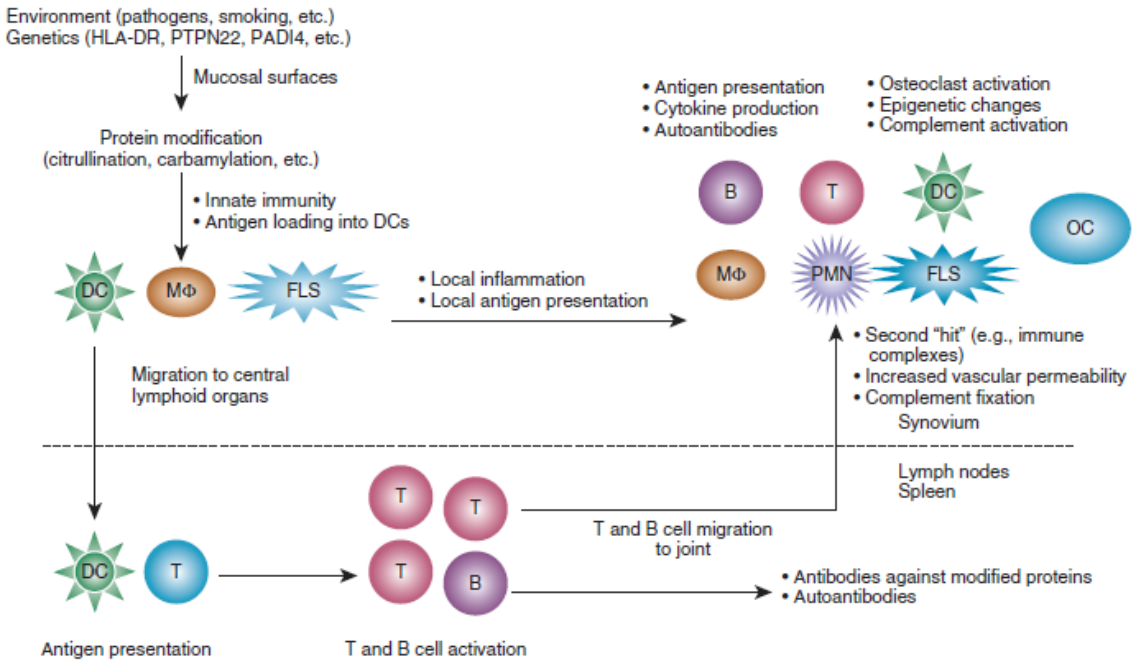


Εικόνα 1.19: Pannus. Ο πάννος είναι η περιοχή του φλεγμονώδους κοκκιώδους ιστού που εκτείνεται από τον αρθρικό υμένα και εισβάλλει στην άρθρωση, προκαλώντας ινώδη αγκύλωση [118].

Με τον καιρό, η νόσος περνάει στην τελευταία φάση, που περιλαμβάνει εκτεταμένες παραμορφώσεις, αναπηρίες αλλά και πολλές εξωαρθρικές εκδηλώσεις [116].

Στο δεύτερο στάδιο της αρθρίτιδας, το στάδιο δηλαδή που ξεκινάει η δημιουργία της φλεγμονής, συμμετέχουν πολλοί κυτταρικοί πληθυσμοί **(Εικόνα 1.20)**. Αντιγόνα που συνδέονται με την εμφάνιση της αρθρίτιδας παρουσιάζονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα ή ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα σε ειδικά Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία και ενεργοποιούνται. Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων από το ειδικό γι᾽ αυτά αντιγόνο απαιτεί και ένα δεύτερο ερέθισμα, το οποίο και παρέχεται σε αυτά με τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 που βρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τα μόρια αυτά συνδέονται με το μόριο CD28 στην επιφάνεια των Τ κυττάρων και οδηγούν στην πλήρη ενεργοποίησή τους. Στην πλειονότητά τους τα Τ λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στον αρθρικό υμένα είναι

ενεργοποιημένα και εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και ιντερφερόνη γ (IFNγ), οι οποίες και οδηγούν σε ενεργοποίηση μακροφάγων, Β λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών και οστεοκλαστών. Τα Β λεμφοκύτταρα εκκρίνουν αυτοαντισώματα έναντι ανοσοσφαιρίνης γ (IgG) (ρευματοειδής παράγοντας), κιτρουλινοποιημένων πεπτιδίων (anti-CCP), ινωδογόνου, βιμεντίνης ή του αντιγόνου της PA 33kDa (RA33) [113][119]. Τα αυτοαντισώματα αυτά μετά την αναγνώριση και πρόσδεση του ειδικού αντιγόνου σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα, τα οποία με τη σειρά τους ενισχύουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF, μέσω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και των υποδοχέων της ανοσοσφαιρίνης Fc (FcγR). Τα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα αποκτούν και ρόλο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ενεργοποιώντας έτσι και άλλα Τ λεμφοκύτταρα που εισέρχονται στον αρθρικό υμένα. Με αυτόν το μηχανισμό δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος ενίσχυσης της αυτοάνοσης αντίδρασης στη PA [88][120].



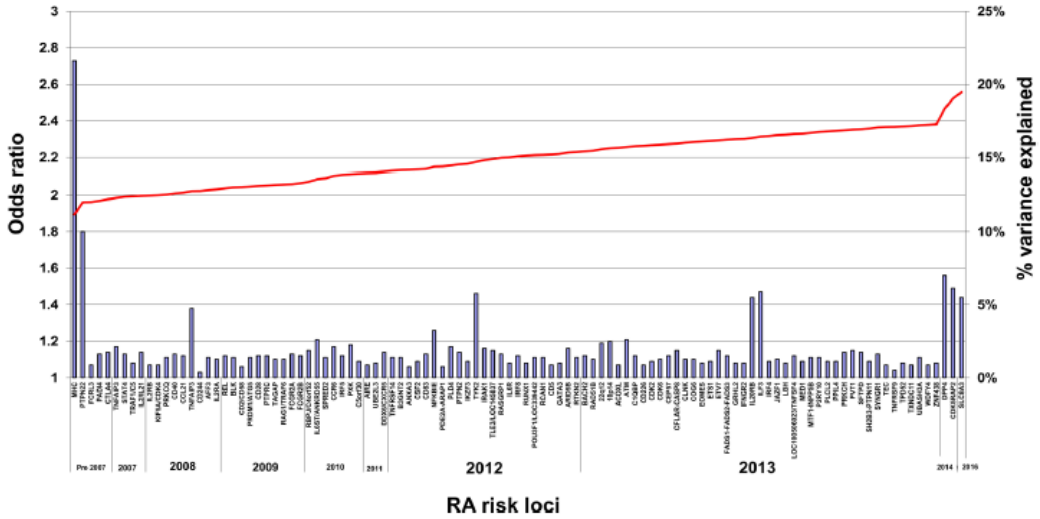
Εικόνα 1.20: Μηχανισμοί που πιθανόν ενεργοποιούνται κατά την παθογένεση της ΡΑ. Η έμφυτη ανοσία θα μπορούσε να ενεργοποιήσει τα FLS, τα δενδριτικά κύτταρα (DC), και τα μακροφάγα (ΜΦ) στα πολύ αρχικά στάδια, σε άτομα με αυξημένη υπερδραστηριότητα εναντίον τροποποιημένων πεπτιδίων, μέσω κιτρουλινοποίησης με παραγωγή αντισωμάτων. Το γενετικό προφίλ του ατόμου, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας συγκεκριμένων πολυμορφισμών σε γονίδια που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, είναι και τα δύο απαραίτητα. Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε κιτρουλινοποίηση των πρωτεϊνών σε διάφορα σημεία, συμπεριλαμβανομένων των βλεννογόνων επιφανειών όπως οι πνεύμονες ή οι αρθρώσεις. Σε ένα γενετικά προδιατεθειμένο άτομο, αυτά τα τροποποιημένα πεπτίδια επεξεργάζονται από τα DCs, τα οποία μπορούν να μεταναστεύσουν στα κεντρικά λεμφοειδή όργανα ώστε να παρουσιάσουν το αντιγόνο και να ενεργοποιήσουν τα Τ κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα Β κύτταρα. Τα αντισώματα μπορούν να ενεργοποιήσουν την φλεγμονή μέσω ενός δεύτερου ‘’χτυπήματος’’, ίσως σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων από ανοσοσυμπλέγματα. Τα αντισώματα μπορούν να ενεργοποιήσουν το συμπλήρωμα στην άρθρωση και να απελευθερωθούν χημειοτακτικοί παράγοντες που θα προσελκύσουν λεμφοκύτταρα στον αρθρικό υμένα και θα ενισχύσουν την επίκτητη ανοσία στο όργανο-στόχο. Επιπλέον, η επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας μπορεί άμεσα να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή και αντιγονο-παρουσίαση στον αρθρικό θύλακα. Στο τελευταίο στάδιο της νόσου, πολλοί κυτταρικοί τύποι ενεργοποιούν τους οστεοκλάστες (OC) μέσω του συστήματος RANK/RANKL. Η αυτόνομη ενεργοποίηση των FLS, μπορεί επίσης να συμβάλει στη διαδικασία αυτή.

Η μοριακή γενετική της ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Αν και η ακριβής αιτία της ΡΑ παραμένει άγνωστη, υπεύθυνη είναι η αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων, και με τις δύο παραμέτρους να είναι απαραίτητες, αλλά όχι επαρκείς για την πλήρη έκφραση της νόσου [88]. Το πιο πειστικό στοιχείο για τη γενετική συνιστώσα προκύπτει από τις μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα, στα οποία ο βαθμός συμφωνίας είναι 12% έως 15% όταν επηρεάζεται ένας δίδυμος, σε σύγκριση με 1% για τον γενικό πληθυσμό. Το γεγονός ότι η συμφωνία δεν είναι υψηλότερη παρέχει βασικές ενδείξεις ότι υπάρχουν κι άλλες επιρροές όπως το περιβάλλον, η επιγενετική ή ο μικροχειμερισμός που μπορούν να είναι εξίσου σημαντικές ή και πιο σημαντικές από τη γενετική επίδραση [121]. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έχουν δείξει ότι περίπου το 60% των περιπτώσεων ΡΑ είναι κληρονομικές [122][123].

Ένας από τους πιο καλά μελετημένους, και ίσως με την μεγαλύτερη επιρροή, γενετικός παράγοντας κινδύνου είναι ο απλότυπος του MHC II που φέρει ένα άτομο. Η δομή των μορίων MHC τάξης II στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συσχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στην ΡΑ και αυξημένη σοβαρότητα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 40% της γενετική επιρροής στη νόσο [124]. Η γενετική σύνδεση μεταξύ του *HLA-DR* και της ΡΑ περιγράφηκε αρχικά στη δεκαετία του 1970 από τον Peter Stastny, ο οποίος παρατήρησε ότι ο τύπος HLA-DR4 εμφανιζόταν στο 70% των ασθενών με ΡΑ, σε σύγκριση με το 30% των φυσιολογικών ατόμων, δίνοντας σχετικό κίνδυνο εμφάνισης ΡΑ 4-5 φορές μεγαλύτερο στα άτομα με το HLA-DR4 [125][126]. Το 1987, ο Peter Gregersen και οι συνάδελφοί του [127] διατύπωσαν μια υπόθεση με βάση την παρατήρηση ότι όλα τα συσχετιζόμενα αλληλόμορφα είχαν μια αλληλουχία 5 αμινοξέων στην τρίτη υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου DRB1, στις αμινοξικά κατάλοιπα 70-74, που ήταν είτε 70QRRAA74, είτε 70QKRAA74 ή 70RRRAA74. Αυτή η αλληλουχία αναφέρεται ως ο κοινός επίτοπος (Shared Epitope) [128]. Επειδή τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται στην θέση δέσμευσης του πεπτιδίου στην πρωτεΐνη HLA-DRβ1, η παραπάνω παρατήρηση συσχέτισε ισχυρά την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης με την αιτιολογία της νόσου. Στην πορεία, εντοπίστηκαν αλληλόμορφα του DR4, που προσδίδουν ένα βαθμό προστασίας έναντι στη νόσο [129].

Η γενετική επίδραση στην ΡΑ οδήγησε επίσης σε μελέτες αξιολόγησης γονίδιων εκτός του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (non-MHC). SNPs σε περιοχές εκκινητών, σε κωδικοποιούσες και μη περιοχές ή σε περιοχές που δεν έχουν γνωστή λειτουργία, έχουν εκτεταμένα διερευνηθεί στην ΡΑ με ποικίλες μεθόδους. Το γονίδιο *PTPN22* [130], το γονίδιο *PADI4* [131] και το γονίδιο *CTLA-4* [132] ήταν τα πρώτα non-HLA γονίδια που προσδιορίστηκαν ως παράγοντες κινδύνου για την ΡΑ. Τα χρόνια που ακολούθησαν, με την εξέλιξη της τεχνολογίας, ανακαλύφθηκαν πολλά περισσότερα γονίδια ευαισθησίας στην ΡΑ, και έως τώρα, μέσα από μεγάλες μελέτες σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς [133][134], έχουν συσχετιστεί περίπου 110 γενετικοί τόποι [135][136][137] **(Εικόνα 1.21)** [124].



Εικόνα 1.21: Γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με την ρευματοειδή αρθρίτιδα έως και το 2016.

Το εντυπωσιακό είναι, ότι αυτοί οι γενετικοί τόποι αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 50% της συνολικής κληρονομικότητας [135], υποδηλώνοντας ότι υπάρχει ένα σημαντικό μέρος της γενετικής αρχιτεκτονικής της ΡΑ που παραμένει άγνωστο.

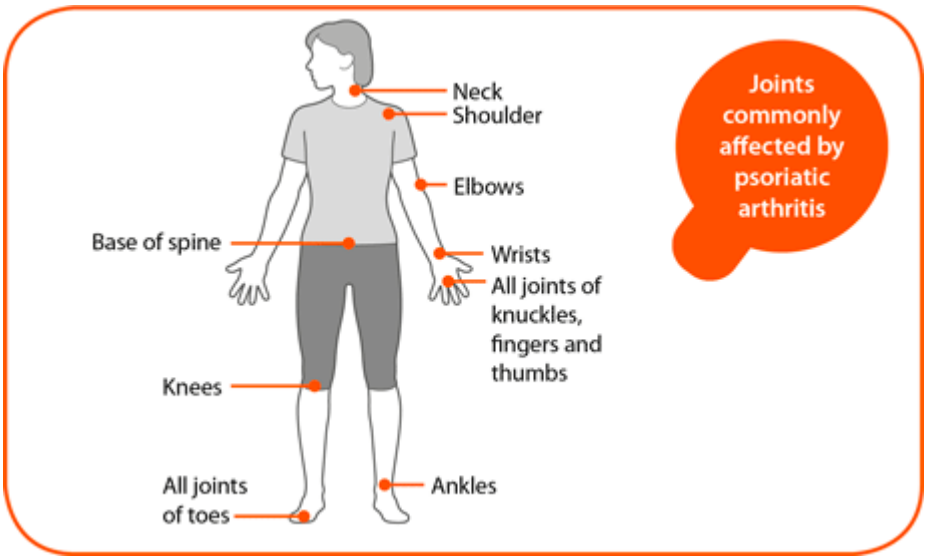
Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλοί από αυτούς τους γενετικούς τόπους συμμετέχουν σε μία κύρια βιολογική οδό που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων και την μετέπειτα σηματοδότηση (*HLA-DRB1, PTPN22, PTPN2, STAT4, CD40, CTLA4, IL2, IL21, IL-6R, GATA3, CCR6, IL-2R, IL-7R, CD28*) [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144]. Γενικότερα, τα γονίδια που σχετίζονται με την ΡΑ εμπλέκονται σταθερά στην

ανοσολογική ρύθμιση, και πολλά είναι κοινά με αυτά που σχετίζονται με άλλες νόσους που προκαλούνται από διαταραχές του ανοσοποιητικού, όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος, ο Διαβήτης τύπου 1, και η Κοιλιοκάκη. Πολυμορφισμοί στα γονίδια των κυτταροκινών, όπως για παράδειγμα στον TNF [145] και στον αναστολέα της IL-1, IL-1Ra, σχετίζονται επίσης με την ΡΑ. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με την λειτουργία των Β κυττάρων και / ή την αντιγονοπαρουσίαση, όπως το *BTLA* [146], τα γονίδια των Fc υποδοχέων και το *CD40* επίσης εμπλέκονται στη νόσο [147]. Έχουν βρεθεί επίσης πολυμορφισμοί σε γονίδια που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση όπως το *TRAF1-C5* και το *STAT4* [148][149]. Το συμπέρασμα που προκύπτει λοιπόν είναι ότι τα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης ΡΑ αποτελούν ως επί το πλείστον συστατικά της έμφυτης ανοσίας, της επίκτητης ανοσίας, της μεταγωγής σήματος και της φλεγμονώδους απόκρισης.

Ψωριασική αρθρίτιδα

Επιδημιολογία και κλινικά χαρακτηριστικά, διάγνωση, θεραπεία και πρόγνωση

Η Ψωριασική αρθρίτιδα (ΨΑ) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης οροαρνητική και δυνητικά παραμορφωτική αρθρίτιδα που αναπτύσσεται σε ασθενείς με ψωρίαση. Προσβάλει κυρίως τις περιφερικές αρθρώσεις ή/και την σπονδυλική στήλη και το δέρμα **(Εικόνα 1.22)** [150].



Εικόνα 1.22: Αρθρώσεις που επηρεάζονται στην ψωριασική αρθρίτιδα. (https://www.jointconsciouschiro.com/single-post/Psoriatic-Arthritis-The-Signs-and-Symptoms)

Η σχέση μεταξύ της ψωρίασης και της ΨΑ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1818 από τον Γάλλο γιατρό Baron Jean Louis Alibert [151], ωστόσο μόνο το 1964 η Αμερικανική Ένωση Ρευματολογίας (ACR) αναγνώρισε την ΨΑ ως μια μοναδική οντότητα που είναι ξεχωριστή από τη ΡΑ και προσδιόρισε τον ορισμό της νόσου ως εξής: φλεγμονώδης αρθρίτιδα, παρουσία ψωρίασης και απουσία ρευματοειδούς παράγοντα [152].

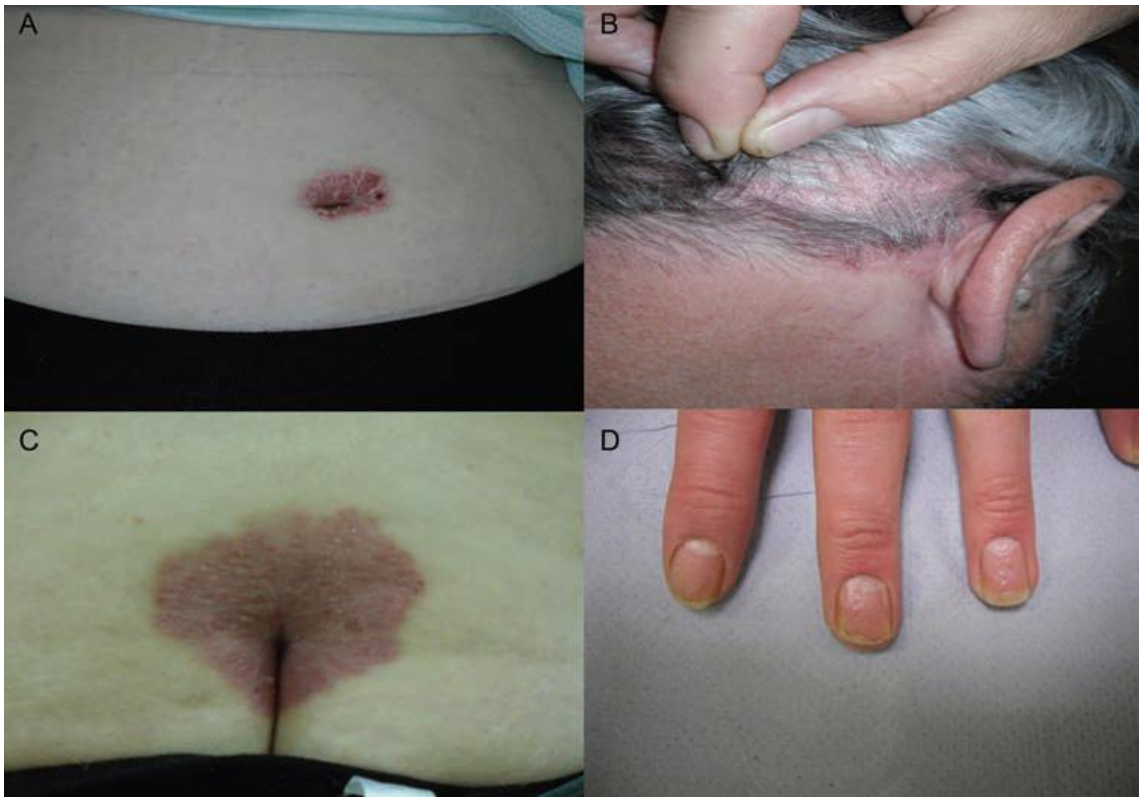
Η ΨΑ εμφανίζεται περίπου στο 2-3% του παγκόσμιου πληθυσμού, με αναλογία φύλου άντρες προς γυναίκες περίπου 1:1 [153]. Η συνήθης ηλικία έναρξης της νόσου είναι μεταξύ 30-45 ετών, ενώ το 10-15% των ασθενών με ψωρίαση αναπτύσσει τελικά ΨΑ [150]. Η ψωρίαση συνήθως προηγείται της ΨΑ σε ποσοστό 70% και με απόσταση μεταξύ τους περίπου επτά έτη, στο 15% των ασθενών η εμφάνιση είναι σχεδόν ταυτόχρονη σε διάστημα ενός έτους, ενώ στο υπόλοιπο 15% των ασθενών η αρθρίτιδα προηγείται της ψωρίασης [154]. Η συχνότητα της νόσου είναι μεγαλύτερη στους Καυκάσιους και μικρότερη στους Ασιάτες, Αφρικανούς και Ιάπωνες.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ΨΑ περιλαμβάνουν την αρθρίτιδα άνω ή κάτω άκρων, συχνότερα στις άπω μεσοφαλαγγικές αρθρώσεις των δακτύλων των χεριών, με τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της φλεγμονής που περιλαμβάνουν πόνο, οίδημα,

θερμότητα στα σημεία και πρωινή δυσκαμψία. Χαρακτηριστικό επίσης σύμπτωμα της νόσου είναι η ενθεσίτιδα, η φλεγμονή δηλαδή στις θέσεις όπου οι τένοντες, οι σύνδεσμοι και οι κάψες των αρθρώσεων (αρθρικοί θύλακες) προσφύονται πάνω στα οστά. Άλλα συμπτώματα είναι η τενοντοελυτρίτιδα, η φλεγμονή δηλαδή στο έλυτρο των τενόντων και η δακτυλίτιδα, η διόγκωση δηλαδή ενός ολόκληρου δακτύλου. Σε μερικούς ασθενείς προσβάλλεται τόσο η ιερολαγόνια άρθρωση όσο και η σπονδυλική στήλη **(Εικόνα 1.23)** [155][156].

Εικόνα 1.23: Κλινικές εκδηλώσεις ψωριασικής αρθρίτιδας. (https://www.jointconsciouschiro.com/single-post/Psoriatic-Arthritis-The-Signs-and-Symptoms)

Τέλος, παρούσες είναι και οι χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες που προκαλεί η ψωρίαση. Οι δερματικές βλάβες της ψωρίασης μπορεί να είναι εκτεταμένες ή περιορισμένες και μπορεί να εντοπίζονται σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος. Οι πιο συνηθισμένες θέσεις πάντως είναι οι αγκώνες και η εκτατική επιφάνεια των αντιβραχίων, το τριχωτό της κεφαλής και ιδιαίτερα η ινιοαυχενική περιοχή, τα γόνατα, ο αφαλός, η μεσογλουτιαία πτυχή και η περιοχή πίσω από τα αυτιά [155] **(Εικόνα 1.24)**.

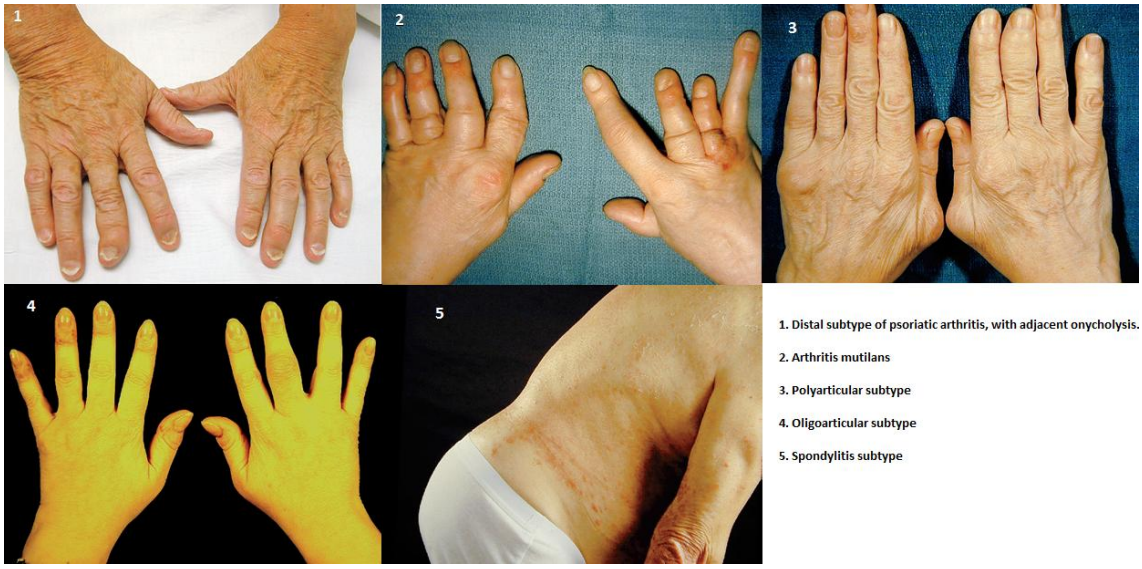


Εικόνα 1.24: Συνήθεις δερματικές βλάβες στην ψωριασική αρθρίτιδα. Τυπική «κρυμμένη» ψωρίαση στην περι-ομφαλική περιοχή (A), στο τριχωτό της κεφαλής (B), στην γενέθλια σχισμή (C) και στα νύχια (D) [155].

Ιδιαίτερη σημασία στην ΨΑ έχουν οι εξωαρθρικές εκδηλώσεις, οι οποίες είναι πολύ πιο συχνές από ό,τι είχε προηγουμένως θεωρηθεί και φαίνεται να συνδέονται με την αξονική νόσο. Η πρώτη μελέτη που εστίασε αποκλειστικά στις εξωαρθρικές εκδηλώσεις πραγματοποιήθηκε από τον Peluso και τους συνεργάτες του το 2015 [156] και καταδεικνύει ότι οι περισσότεροι ασθενείς με εξωαρθρικές εκδηλώσεις ήταν άνδρες με αξονική νόσο, και με σημαντικά μεγαλύτερη διάρκεια της νόσου από τους ασθενείς χωρίς εξωαρθρικές εκδηλώσεις. Οι πιο κοινές από αυτές τις εκδηλώσεις αφορούν στο γαστρεντερικό σύστημα (νόσος του Crohn, ελκώδης κολίτιδα), το καρδιαγγειακό σύστημα (αορτική ανεπάρκεια), το ουρογεννητικό σύστημα (ουρηθρίτιδα, προστατίτιδα) και τον οφθαλμό (ραγοειδίτιδα ή ιριδοκυκλίτιδα, επιπεφυκίτιδα).

Όσον αφορά τη συμμετοχή των αρθρώσεων στη νόσο, οι Moll και Wright πρότειναν πέντε μοτίβα – υποτύπους: (1) αρθρίτιδα των άπω μεσοφαλαγγικών αρθρώσεων των δακτύλων (DIP) που παρουσιάζει περίπου το 5%, (2) πυρρωτική/παραμορφωτική

αρθρίτιδα ή arthritis mutilans που παρουσιάζει περίπου το 5%, (3) συμμετρική πολυαρθρίτιδα που παρουσιάζει περίπου το 15% και μοιάζει με την ΡΑ, (4) ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα ή μονοαρθρίτιδα που παρουσιάζει περίπου το 70% και (5) αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα που παρουσιάζει το υπόλοιπο 5% [157]. Το πιο συχνό μοτίβο ΨΑ, θεωρείται η ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα αν και το μοτίβο των προσβεβλημένων αρθρώσεων συχνά αλλάζει με την διάρκεια και την πρόοδο της νόσου [158] **(Εικόνα 1.25)**.



Εικόνα 1.25: Οι πέντε υπότυποι της ψωριασικής αρθρίτιδας. 1. DIP 2. Παραμορφωτική αρθρίτιδα 3. Συμμετρική πολυαρθρίτιδα 4. Ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα 5.Αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα [158].

Η διάγνωση της ΨΑ, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της νόσου, δεν είναι εύκολη υπόθεση διότι συγχέεται με άλλες μορφές πολυαρθρίτιδας. Εντούτοις, υπάρχουν κάποιες εξετάσεις και ακτινολογικές βλάβες ικανές να την διαφοροποιήσουν από άλλα νοσήματα. Η διάγνωση λοιπόν βασίζεται σε ένα συνδυασμό λήψης ατομικού/οικογενειακού ιστορικού, κλινικών, εργαστηριακών και απεικονιστικών ευρημάτων αλλά και η χρήση κριτηρίων ταξινόμησης. Στοιχεία που συναινούν στην διάγνωση είναι η διάβρωση των οστών με παράλληλη οστεογένεση, το οίδημα των μαλακών μορίων, η ασύμμετρη ιερολαγονίτιδα, η ελαφριά αύξηση της ΤΚΕ και της

CRP, το αρθρικό υγρό με μέτρια λευκοκυττάρωση, η ήπια αναιμία, οι δερματικές αλλοιώσεις, οι αλλοιώσεις των ονύχων και συνήθως οι αρνητικοί τίτλοι αντισωμάτων [159]. Τα κριτήρια για την ταξινόμηση της ΨΑ (**Cl**A**S**sification criteria for **P**soriatic **A**rthritis, CASPAR criteria) [160], δημοσιεύθηκαν το 2006 και χρησιμοποιούνται τόσο για τη διάγνωση όσο και για τον καθολικό ορισμό των περιπτώσεων για ερευνητικούς σκοπούς, έχοντας υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση για τη νόσο (91,4% και 98,7%, αντίστοιχα). Για να πληροί τα κριτήρια CASPAR ένας ασθενής, θα πρέπει να παρουσιάζει φλεγμονώδη αρθρίτιδα (αρθρώσεις, σπονδυλική στήλη, ενθέσεις) και να εμφανίζει σκορ τουλάχιστον 3 πόντων από τον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4)**.

Πίνακας 4: Διαγνωστικά κριτήρια ψωριασικής αρθρίτιδας.

Βασικά κριτήρια:
Παρούσα ψωρίαση ή Ιστορικό ψωρίασης ή Προσβολή ονύχων
Αρνητικός ρευματοειδής παράγων
Και 1 από τις παρακάτω κλινικές υποκατηγορίες
Ολιγοαρθρίτιδα (<5 ευαίσθητες και οιδηματώδεις αρθρώσεις
Πολυαρθρίτιδα (Όμοια με ρευματοειδή αρθρίτιδα)
Αρθρίτιδα των άπω φαλαγγικών αρθρώσεων
Κυρίως αξονική προσβολή / σπονδυλίτιδα
Ακρωτηριαστική / πυρωτική αρθρίτιδα

Η θεραπεία της ΨΑ στοχεύει στον έλεγχο τόσο των δερματικών βλαβών όσο και της φλεγμονής των αρθρώσεων, για να μειωθούν τα συμπτώματα και να αποφευχθούν οι βλάβες στις αρθρώσεις. Η θεραπεία ξεκινάει συνήθως με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) που μπορούν να ελέγξουν ικανοποιητικά την ήπια αρθρίτιδα, την ενθεσίτιδα και την σπονδυλίτιδα. Οι θεραπείες δεύτερης γραμμής ενδείκνυνται όταν η αρθρίτιδα δεν ανταποκρίνεται στα ΜΣΑΦ και γενικότερα είναι σοβαρότερης μορφής. Πολλά από τα τροποποιητικά της νόσου αντιρευματικά φάρμακα (DMARDs), που χορηγούνται στους ασθενείς με ΡΑ, όπως η μεθοτρεξάτη, η λεφλουνομίδη, η σουλφασαλαζίνη, η κυκλοσπορίνη και η αζαθειοπρίνη, χορηγούνται και για τη θεραπεία της περιφερικής αρθρίτιδας στην ΨΑ [161]. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης φαρμάκων αποκλειστικά για την θεραπεία της ΨΑ.

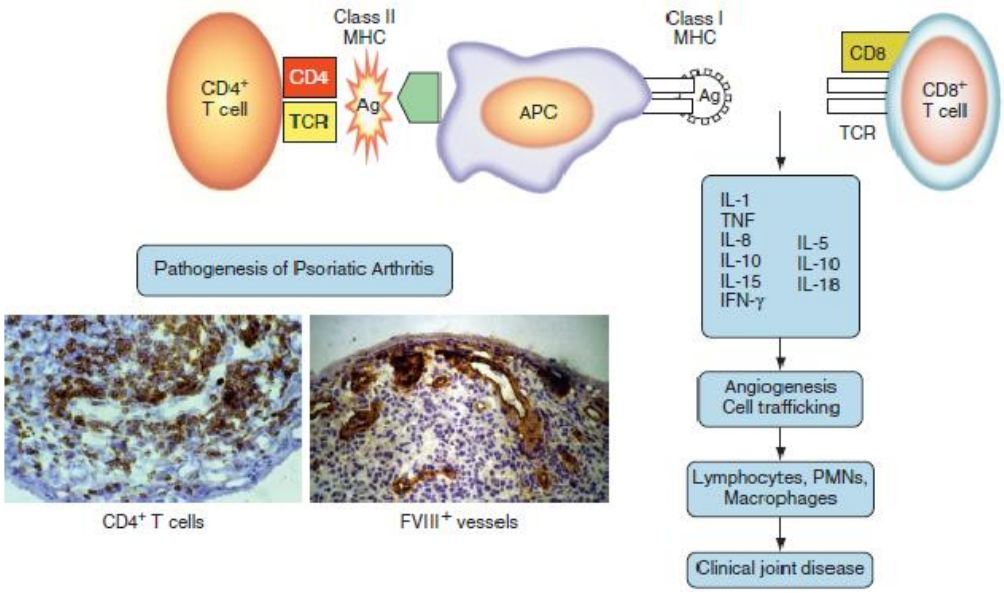
Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν είτε την IL12/23 (Ustekinumab), είτε την IL17 (Secukinumab) ή την φωσφοδιεστεράση 4 (Apremilast) και είναι πολύ αποτελεσματικά όσον αφορά τις δερματικές βλάβες [162]. Οι νέες στοχευμένες βιολογικές θεραπείες, ιδιαίτερα τα anti TNF φάρμακα (Etanercept, Remicade, και Humira), είναι πολύ αποτελεσματικές εναντίον όλων τον πτυχών της νόσου, δερματικών και αρθρικών [163].

Στους περισσότερους ασθενείς η πορεία της νόσου είναι προοδευτική, αν και αρκετοί ασθενείς καταφέρνουν να μπουν σε πλήρη ύφεση. Η γενική εντύπωση είναι ότι η ΨΑ έχει σαφώς καλύτερη πρόγνωση και μικρότερου βαθμού ανικανότητα από τη ΡΑ [157]. Καθολική επίσης είναι η άποψη ότι η πολυαρθρική ΨΑ σχετίζεται με μεγαλύτερη ανικανότητα. Οι ασθενείς με πέντε τουλάχιστον οιδηματώδεις αρθρώσεις έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αναπτύξουν μελλοντικά παραμορφώσεις και αναπηρία. Ειδικότερα, δυσμενείς προγνωστικοί δείκτες θεωρούνται η παρουσία των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας HLA-B27, B39 και Qw342, η πρώιμη έναρξη της νόσου, το οικογενειακό ιστορικό, η πολυαρθρική νόσος, η εκτεταμένη δακτυλίτιδα, η σπονδυλική νόσος, η εκτεταμένη ενθεσίτιδα, οι πρώιμες διαβρώσεις, οι αυξημένοι φλεγμονώδεις δείκτες, η χρήση νοσοτροποποιητικών φαρμάκων και οι βαριές ακτινολογικές βλάβες. Όπως επίσης αναφέρθηκε προηγουμένως, η ΨΑ εμφανίζει συννοσηρότητα με μεταβολικό σύνδρομο, καρδιαγγειακά νοσήματα, κακοήθειες, νόσο του Crohn’s κ.α. στοιχείο που επιβαρύνει περαιτέρω την πρόγνωσή τους [164].

Παθογενετικοί μηχανισμοί

Η αιτιολογία της ΨΑ παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, έχουν διερευνηθεί εκτεταμένα οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην ανάπτυξη και διαιώνιση της νόσου. Οι παράγοντες που πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην δημιουργία της ΨΑ είναι γενετικοί, περιβαλλοντικοί και ανοσολογικοί. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για τη διερεύνηση των βασικών συστατικών της παθογένειας της νόσου, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών παραγόντων, του ρόλου των λοιμώξεων και του τραύματος, μελέτες σε ζωικά μοντέλα καθώς επίσης μελέτες που εξετάζουν τη σημασία των συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως οι κυτταροκίνες [162][165].

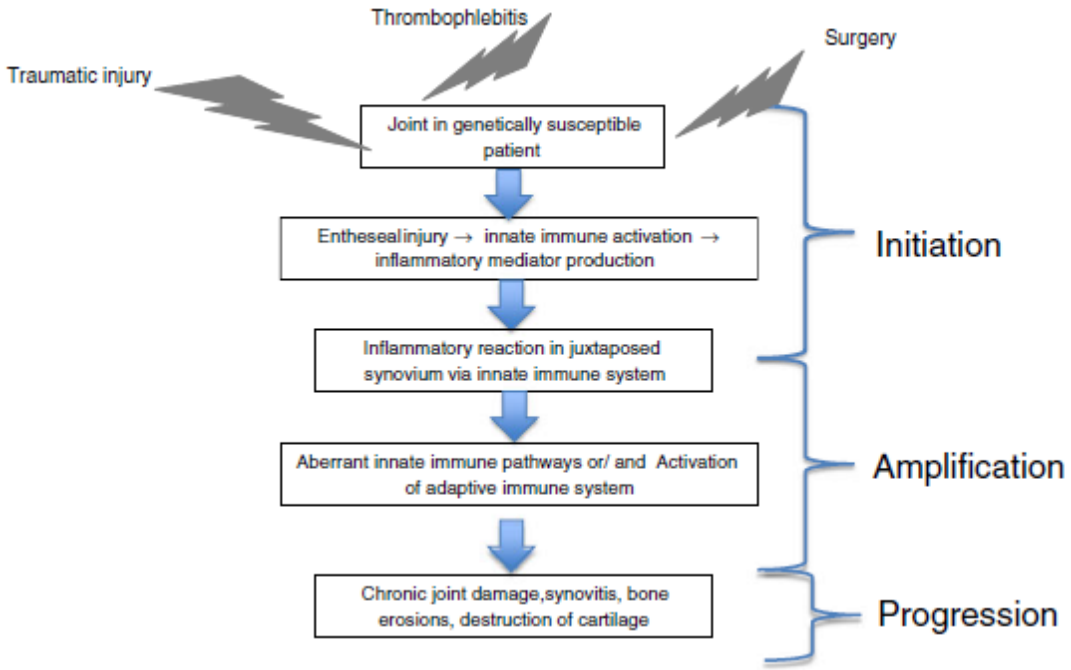
Αυτή τη στιγμή, δύο σημαντικές υποθέσεις, σχετικά με την παθογένεια της ΨΑ βρίσκονται υπό συζήτηση. Η μια υπόθεση θεωρεί την ΨΑ ως μια κλασική αυτοάνοση νόσο, ενώ η άλλη σαν μια νόσο που προέρχεται κυρίως από τη φλεγμονή στις ενθέσεις μετά από τραύμα ή σωματικό στρες [161]. Η υπόθεση ότι πρόκειται για ένα αυτοάνοσο νόσημα υποστηρίζεται από τις μελέτες που έχουν δείξει συσχέτιση της νόσου με συγκεκριμένα αλληλόμορφα HLA τάξης I [166][167]. Επιπλέον, η παρατήρηση της μείωσης των CD4+ T λεμφοκυττάρων και της επιμονής της νόσου σε ασθενείς με ΨΑ και παράλληλα θετικούς στον HIV, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η νόσος καθορίζεται από αυτοδραστικά CD8+ T λεμφοκύτταρα, που ενεργοποιούνται μέσω της παρουσίασης αυτοαντιγόνων από μόρια HLA τάξης I [168]. Επιπροσθέτως, η απουσία αυτοαντισωμάτων και η υπεροχή των CD8+ T κυττάρων στο αρθρικό υγρό και στον αρθρικό υμένα, ενισχύουν τον ισχυρισμό ότι η ΨΑ είναι μια αυτοάνοση νόσος που σχετίζεται με τα μόρια HLA τάξης I και προκαλείται από τα CD8+ T κύτταρα **(Εικόνα 1.26)**.



Εικόνα 1.26: Το παραδοσιακό μοντέλο παθογένεσης στην ψωριασική αρθρίτιδα [88].

Η δεύτερη υπόθεση, που θεωρεί την ΨΑ μια φλεγμονώδη νόσο εξαιτίας αρχικού τραύματος, προτάθηκε αρχικά το 1998 από τον McGonagle και τους συνεργάτες.

Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, η αρθρίτιδα στις σπονδυλοαρθροπάθειες μπορεί να είναι δευτερογενής σε σχέση με την φλεγμονή στις ενθέσεις, και εμφανίζεται ως επιφαινόμενο της δράσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών και αναπτυξιακών παραγόντων που έχουν απελευθερωθεί κατά την δημιουργία της ενθεσίτιδας [161][169]. Λόγω του ότι η ένθεση και ο αρθρικός υμένας βρίσκονται ανατομικά πολύ κοντά, κάποιος μικροτραυματισμός (φαινόμενο Koebner) [170] ή και μηχανικό στρες, προκαλεί την έκκριση ανοσοδιαμεσολαβητών που προάγουν την φλεγμονή, η οποία σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα εξελίσσεται σε κλινικά σημαντική φλεγμονή των αρθρώσεων και ανάπτυξη ΨΑ [171] **(Εικόνα 1.27)**.



Εικόνα 1.27: Προτεινόμενα βήματα στην εξέλιξη της ψωριασικής αρθρίτιδας [171].

Η επίκτητη ανοσία φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ΨΑ. Οι περισσότεροι από τους κλώνους των Τ λεμφοκυττάρων που εντοπίζονται στο αρθρικό υγρό είναι CD8+. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν κοινοί κλώνοι Τ λεμφοκυττάρων τόσο στο αρθρικό υγρό όσο και στις δερματικές αλλοιώσεις, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι ένα κοινό αντιγόνο οδηγεί την ανοσοαπόκριση στις αρθρώσεις και στο δέρμα [172]. Τα Τ

κύτταρα διηθούν στις δερματικές περιοχές και επάγουν την έκκριση Th17 κυτταροκινών (IL-17, IL-22, IL-21) και IFNγ [173]. Ο ρόλος των Β λεμφοκυττάρων στην ΨΑ δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός, αν και μια μελέτη έχει δείξει την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων που πιθανότατα παράγονται στην αρθρική μεμβράνη [174]. Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι τόσο η επίκτητη όσο και η έμφυτη ανοσία εμπλέκονται στην παθογένεση της ΨΑ και ότι ο άξονας IL-23 / IL-17 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο. Η IL-23 ενεργοποιεί τα Th17, που παράγουν με τη σειρά τους IL-17, η οποία ενεργοποιεί τα δενδριτικά κύτταρα και αυτά παράγουν IL-12, επομένως διεγείρονται τα Th1 κύτταρα για την καταπολέμηση των παθογόνων και την δημιουργία φλεγμονής [175].

Η μοριακή γενετική της ψωριασικής αρθρίτιδας

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά της ΨΑ είναι ότι περίπου το 50% των ασθενών με ΨΑ έχει οικογενειακό ιστορικό που περιλαμβάνει μία ή μερικές φορές πολλές περιπτώσεις ΨΑ, ψωρίασης ή άλλων οροαρνητικών σπονδυλοαρθροπαθειών σε εξ αίματος συγγενείς [176]. Σε μια μεγάλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον Ισλανδικό πληθυσμό, υπολογίστηκε ο κίνδυνος επανεμφάνισης της νόσου (λ_1) σε συγγενείς πρώτου βαθμού, να είναι περίπου 40, ενώ σε αντίστοιχη μελέτη στην ψωρίαση έχει υπολογιστεί περίπου 8 [177]. Τα παραπάνω ευρήματα, σε συνδυασμό με μελέτες σε διδύμους [178], υποδηλώνουν ότι υπάρχει ουσιαστική διαφορά στην γενετική αρχιτεκτονική των δύο νοσημάτων, με την γενετική προδιάθεση να είναι ισχυρότερη για την ΨΑ. Ενώ είναι πλέον γνωστό ότι η γενετική διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΨΑ, ο εντοπισμός «ειδικών για την ΨΑ» υπεύθυνων γονιδίων δεν είναι εύκολη υπόθεση. Τα περισσότερα από τα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ΨΑ, είναι κοινά με αυτά που συσχετίζονται με την ψωρίαση, λόγω κοινής παθολογίας του δέρματος στις δύο νόσους. Γνωρίζοντας όμως την ισχυρή γενετική συνιστώσα στην ΨΑ, είναι λογικό να θεωρούμε ότι υπάρχουν συγκεκριμένα-ειδικά για την ΨΑ γονίδια ευαισθησίας [179].

Οι GWASs και οι μετααναλύσεις που έχουν διεξαχθεί κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν αποκαλύψει σχεδόν 70 γενετικούς τόπους που περιλαμβάνουν παραλλαγές

κινδύνου για την ψωρίαση [180][181]. Αντίθετα, μόνο τρεις GWASs έχουν δημοσιευθεί για την ΨΑ [182][183][184], που μαζί με αναλύσεις υποψηφίων γονιδίων σε μεγαλύτερα δείγματα και την σχετικά πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη με την χρήση του Immunochip [179], έχουν προσδιοριστεί 13 γενετικοί τόποι που συσχετίζονται σημαντικά με την ΨΑ. Σε αντίθεση με την ΡΑ, η οποία σχετίζεται με αλληλόμορφα HLA τάξης ΙΙ, η ψωρίαση και η ΨΑ σχετίζονται με αλληλόμορφα HLA τάξης Ι. Πιο συγκεκριμένα, το HLA-C*06 αποτελεί σημαντικό παράγοντα κίνδυνου για την ψωρίαση αλλά όχι για την ΨΑ. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι το συγκεκριμένο αλληλόμορφο έχει προστατευτικό ρόλο στην ΨΑ [167], αλλά μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι δεν συσχετίζεται με την ΨΑ αλλά μόνο με την ψωρίαση [185]. Επίσης, τα αλληλόμορφα HLA-B*08, B*27, B*38 και B*39, συσχετίζονται με διαφορετικού τύπου ΨΑ, όπως συμμετρική ή ασύμμετρη αξονική νόσο, ενθεσίτιδα, δακτυλίτιδα και υμενίτιδα [186].

Εκτός από τα HLA αλληλόμορφα, έχουν αναγνωριστεί αρκετές παραλλαγές και σε άλλους γενετικούς τόπους, που σχετίζονται ειδικά με την ΨΑ. Οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου περιλαμβάνουν τους *IL12B, IL23R, IL23A, TNIP1, TRAF3IP2, CSF2, FBXL19, REL, RUNX3, TYK2, NOS2, PTPN22, IFIH1* κ.α. [179][187][188][189]. Πολλά από τα γονίδια που απαριθμούνται παραπάνω κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι σημαντικές στην ανοσοαπόκριση, υποδηλώνοντας ότι οι γενετικοί παράγοντες μπορούν να ασκήσουν την επίδρασή τους μέσω ανοσοποιητικών μηχανισμών [153].

Πλειοτροπισμός των γονιδίων και γενετική επικάλυψη διαφόρων νοσημάτων

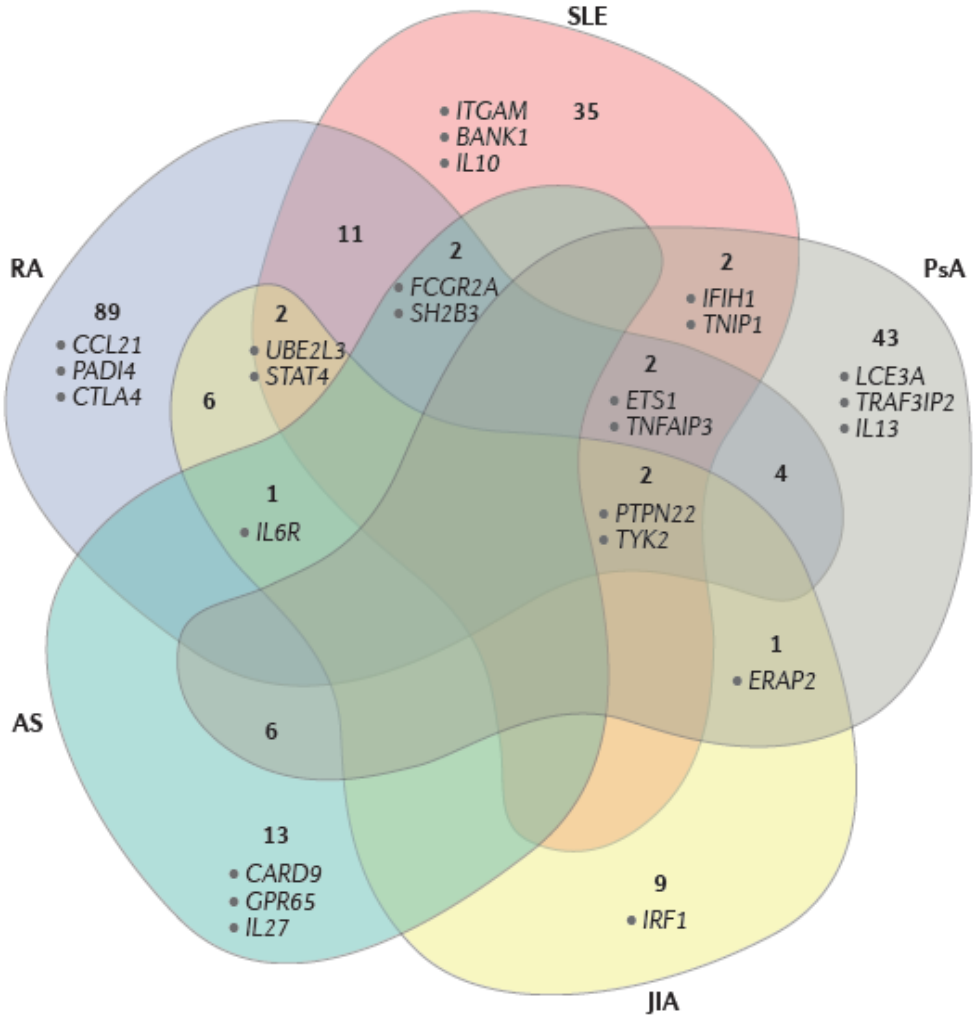
Γενετικός πλειοτροπισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μια γενετική παραλλαγή σε έναν γενετικό τόπο, επιδρά σε περισσότερους από έναν φαινοτύπους [190]. Οι μοριακοί μηχανισμοί του πλειοτροπισμού μπορούν να διχοτομηθούν σε πολλαπλές μοριακές λειτουργίες ενός γονιδιακού προϊόντος και σε πολλαπλές διαφορετικές επιπτώσεις μιας μοριακής λειτουργίας [191]. Αν και ο πλειοτροπισμός έχει προταθεί ως βασικό χαρακτηριστικό της γενετικής αρχιτεκτονικής των σύνθετων νοσημάτων, μέχρι

σήμερα, τα στοιχεία για την παρουσία του δεν έχουν αξιολογηθεί συστηματικά παρά τις υποδείξεις ότι αυτό θα μπορούσε να είναι χρήσιμο [192].

Παρ' όλα αυτά, διάφορες μελέτες, έχουν χρησιμοποιήσει αποτελέσματα από GWAS για να εντοπίσουν συστηματικά γενετικές παραλλαγές που συνδέονται με πολλαπλά χαρακτηριστικά, τόσο σε όλο το φάσμα των ανθρωπίνων βιοϊατρικών χαρακτηριστικών και διαταραχών [190], όσο και σε ομάδες συσχετιζόμενων νοσημάτων με προηγούμενες ενδείξεις για κοινή αιτιολογία [193]. Για παράδειγμα, μια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε μία τέτοια μελέτη, χρησιμοποιώντας το Immunochip, σε μια ομάδα ανοσοδιαμεσολαβούμενων νοσημάτων και όπως ήταν αναμενόμενο εντοπίστηκαν παραλλαγές με πλειοτροπική επίδραση σε δύο ή περισσότερες από τις έξι νόσους που μελετήθηκαν [194]. Παράλληλα, όμως, ανιχνεύθηκαν παραλλαγές των οποίων η επίδραση είχε διαφορετική κατεύθυνση (opposite effect) σε διαφορετικά νοσήματα. Η ύπαρξη μιας συγκεκριμένης παραλλαγής οδηγούσε σε αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση αγκυλοποιητικής σπονδυλαρθρίτιδας, ενώ η παρουσία της ίδιας παραλλαγής προσέφερε προστασία έναντι της ΡΑ [193]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίθετης επίδρασης είναι αυτό του πολυμορφισμού R620W του γονιδίου *PTPN22*, όπου προσδίδει προδιάθεση για ΡΑ αλλά προστατεύει έναντι της νόσου του Crohn's [195].

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί αρκετές γενετικές αναλύσεις που προσπαθούν να αποκαλύψουν τις γενετικές ομοιότητες μεταξύ νοσημάτων. Για παράδειγμα, με τη χρήση συνδυασμένων δεδομένων από αναλύσεις πολλαπλών ροαρνητικών νοσημάτων, μία μελέτη έδειξε ότι η νόσος του Crohn's και η φλεγμονώδης εντεροπάθεια (IBD) μοιράζονται αρκετούς γενετικούς τόπους που σχετίζονται και με την αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ) (20 και 48 γενετικοί τόποι, αντίστοιχα) [196]. Άλλες γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι IL-17/IL-23 παίζει σημαντικό ρόλο στην επικάλυψη που παρατηρείται μεταξύ των αυτοάνοσων νοσημάτων, πράγμα το οποίο εγείρει ερωτήματα σχετικά με την διεύρυνση του στόχου κάποιων φαρμάκων, όπως το Ustekinumab [197]. Όπως φαίνεται από κάποιες στατιστικές αναλύσεις, η Νεανική Ιδιοπαθής Αρθρίτιδα (ΝΙΑ) παρομοιάζει σε γενετικό επίπεδο με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι, που εμφανίζεται και αυτός σε νεανική ηλικία, σε σχέση με άλλες ρευματικές παθήσεις [198]. Αυτή η επικάλυψη οφείλεται στα γονίδια *IL2, IL2RA* και *IL2RB*. Ομοίως, γονίδια που σχετίζονται με την ΨΑ παρουσιάζουν κάποια επικάλυψη με γονίδια που σχετίζονται με την ΡΑ, αλλά η ΨΑ έχει κυρίως γενετική

επικάλυψη με την ψωρίαση και ισχυρή επικάλυψη με τη Φλεγμονώδη Εντεροπάθεια (IBD) [179] **(Εικόνα 1.28)**.



Εικόνα 1.28: Επικάλυψη γενετικών τόπων μεταξύ πέντε ρευματικών παθήσεων. Οι κοινοί γενετικοί τόποι ευαισθησίας μεταξύ των ρευματικών νοσημάτων, υποδηλώνουν ότι αυτά τα νοσήματα μοιράζονται κάποιους κοινούς βιολογικούς παθογενετικούς μηχανισμούς καθώς και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αυτό το σχήμα απεικονίζει τον αριθμό των αλληλεπικαλυπτόμενων γενετικών τόπων που παρατηρήθηκαν μεταξύ των πιο σημαντικών ρευματικών παθήσεων (για τις μη αριθμημένες περιοχές, η αλληλεπικάλυψη είναι μηδέν) και επισημαίνει μερικά σχετικά γονίδια που σχετίζονται με τις νόσους [199].

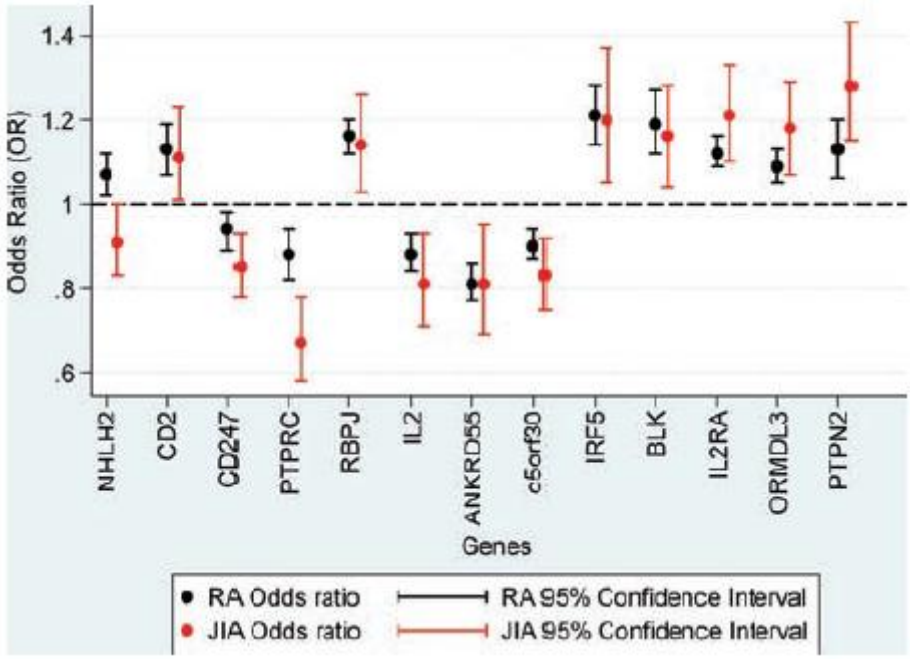
Η μελέτη του πλειοτροπισμού των γονιδίων και της γενετικής επικάλυψης μεταξύ διαφορετικών νοσημάτων είναι υψίστης σημασίας και μπορεί να φωτίσει τον δρόμο για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, να προωθήσει τον επαναπροσδιορισμό της χορήγησης φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία μιας νόσου στην θεραπεία μιας άλλης, να βοηθήσει στον περιορισμό των παρενεργειών και να βελτιώσει την ταξινόμηση-ομαδοποίηση των νοσημάτων, σε μια εποχή που έχει χαρακτηριστεί ως η εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής **[200]**.

Γενετική επικάλυψη μεταξύ των νοσημάτων της ρευματοειδούς και της ψωριασικής αρθρίτιδας

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της ΡΑ μοιάζουν πολύ με εκείνα άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων και ιδιαίτερα με αυτά της ΨΑ. Για παράδειγμα, και οι δύο νόσοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία φλεγμονώδους αρθρίτιδας στις περιφερικές αρθρώσεις. Επίσης οι ασθενείς υποβάλλονται και ανταποκρίνονται σε παρόμοιες θεραπείες συμπεριλαμβανομένης της μεθοτρεξάτης καθώς και των anti-TNF βιολογικών παραγόντων. Επιπλέον, και οι δύο αποτελούν σύνθετες νόσους που συσχετίζονται με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου [201][202].

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτελεστεί μεγάλη πρόοδος στο πεδίο της αποκάλυψης γονιδίων προδιάθεσης για την ΡΑ, ως αποτέλεσμα μελετών γενετικής συσχέτισης που καλύπτουν πλήρως το γονιδίωμα (GWAS). Αξιοσημείωτο εύρημα αυτών των μελετών είναι η πλειοτροπική δράση γονιδίων που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την RA. Τα περισσότερα από αυτά έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση και άλλων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως είναι ο ΣΔ1, ο ΣΕΛ, η Ψωρίαση και η Κοιλιοκάκη [203]. Τα παραπάνω αυτοάνοσα νοσήματα χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυτοαντισωμάτων, σε αντίθεση με την ΨΑ που είναι ορροαρνητική. Εντούτοις, δεδομένης της μεγάλης επικάλυψης των κλινικών χαρακτηριστικών και εκδηλώσεων μεταξύ της ΡΑ με την ΨΑ, αναμένεται να υπάρχει επικάλυψη και σε γενετικό επίπεδο. Η ιδέα ότι υπάρχουν γονίδια που προδιαθέτουν για πολλαπλές αυτοάνοσες νόσους υπάρχει εδώ και πολλά χρόνια. Πράγματι, τόσο η περιοχή *HLA* όσο και τα γονίδια *PTPN22* και *CTLA-4* είναι γνωστό ότι συσχετίζονται με διάφορα νοσήματα [201]. Ένα

αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι ότι όλοι σχεδόν οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη ΡΑ σχετίζονται επίσης με τη ΝΙΑ [204] **(Εικόνα 1.29)**.



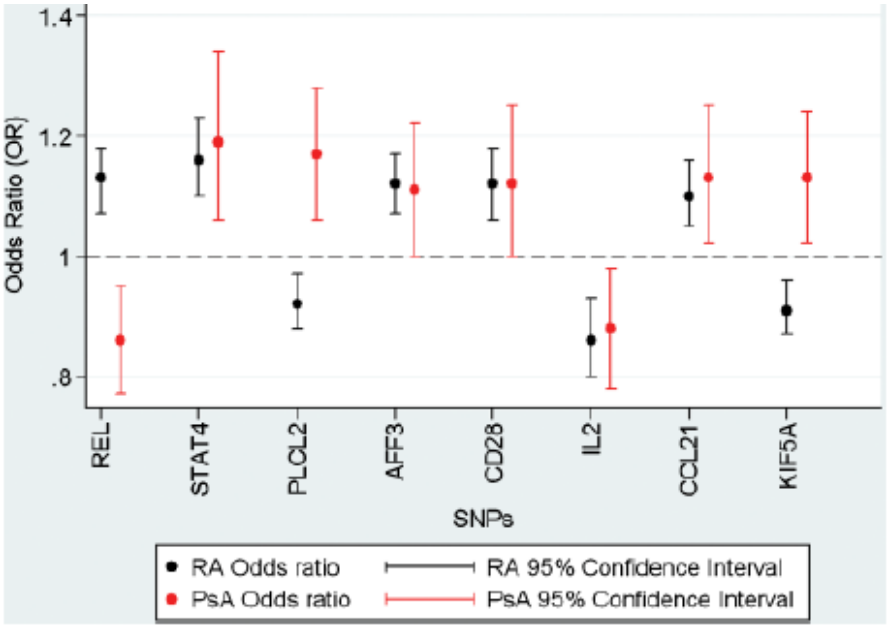
Εικόνα 1.29: Διάγραμμα με 13 γενετικούς τόπους που συσχετίζονται με τα νοσήματα της ρευματοειδούς και της νεανικής ιδιοπαθούς αρθρίτιδας [204].

Επιπλέον, σημαντικού βαθμού επικάλυψη υπάρχει για τους γενετικούς τόπους που έχουν αναγνωριστεί για τον διαβήτη τύπου Ι, με νοσήματα όπως η κοιλιοκάκη, η νόσος (κοκκιωμάτωση) του GRAVE'S και η ΡΑ.

Όσον αφορά την ΨΑ και την πιθανή γενετική επικάλυψη της με την ΡΑ, λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα. Ο κοινός επίτοπος (shared epitope), μία ομάδα αλληλομόρφων του γονιδίου *HLA-DRB1* (όπως προαναφέρθηκε) που κωδικοποιεί μία κοινή αμινοξική αλληλουχία, είναι ο παράγοντας που προσδίδει το μεγαλύτερο γενετικό κίνδυνο για την ανάπτυξη της ΡΑ. Αρκετές μικρές μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν πρότειναν ότι ίσως σχετίζεται και με την ευαισθησία στην ΨΑ. Εντούτοις, σε μία μεγαλύτερη μελέτη, δεν βρέθηκε κανένα στοιχείο συσχέτισης [205]. Ομοίως, μια παραλλαγή του γονιδίου *PTPN22* σχετίζεται με πολλές αυτοάνοσες νόσους, όπως η ΡΑ, ο ΣΔ1, η αυτοάνοση νόσος του θυρεοειδούς και η ΝΙΑ. Όταν μελετήθηκε το

συγκεκριμένο γονίδιο σε ασθενείς με ΨΑ από το Ηνωμένο Βασίλειο δεν προέκυψαν συμπεράσματα που να το συνδέουν με τη νόσο [206]. Αντίθετα, ανάλογη μελέτη σε ασθενείς από το Τορόντο έδειξε θετική συσχέτιση [207]. Σε μία άλλη μελέτη του 2011, οι ερευνητές προτείνουν ότι ίσως υπάρχει κάποιος βαθμός συσχέτισης του πολυμορφισμού μόνο με ασθενείς αρσενικού φύλου (male restricted) [208].

Σε μια μελέτη, που δημοσιεύτηκε το Μάρτιο του 2012 και αποτέλεσε το πρώτο βήμα στην μελέτη των γενετικών ομοιοτήτων των δύο νοσημάτων, οι ερευνητές επιχείρησαν να ελέγξουν 54 πολυμορφισμούς σε 41 γονίδια που είναι γνωστό ότι προδιαθέτουν για την εμφάνιση ρευματοειδούς αρθρίτιδας, σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών Ευρωπαϊκής καταγωγής με ΨΑ [201]. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ισχυρή συσχέτιση με τα γονίδια *REL*, *PLCL2* και *CCL21*, πιθανή συσχέτιση με κάποια άλλα (*AFF3*, *STAT4*), ενώ για τα υπόλοιπα δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση **(Εικόνα 1.30)**.



Εικόνα 1.30: Διάγραμμα με οκτώ πολυμορφισμούς σε γονίδια που συσχετίζονται τόσο με την ρευματοειδή όσο και με την ψωριασική αρθρίτιδα [201].

Δεδομένου, λοιπόν, ότι οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου για την ΡΑ τείνουν να επικαλύπτονται σε ένα βαθμό με εκείνους για την ΨΑ [209], διεξήχθη η τρέχουσα μελέτη για τη διερεύνηση της γενετικής επικάλυψης των δύο νοσημάτων, αναλύοντας

υποθετικά ή επιβεβαιωμένα και για τα δύο νοσήματα γονίδια κινδύνου καθώς και άλλα πλειοτροπικά γονίδια που παίζουν ρόλο-κλειδί στην παθογένεση πολλαπλών αυτοάνοσων νοσημάτων. Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στον γενετικά ομοιογενή πληθυσμό του νησιού της Κρήτης (650.000 χιλιάδες κάτοικοι), πληθυσμό που μοιράζεται κοινό γενετικό και πολιτιστικό υπόβαθρο, εμφανίζει χαμηλά ποσοστά μετανάστευσης και χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφες περιβαλλοντικές επιρροές.

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα μελέτη, στοχεύοντας στη διερεύνηση της πιθανής γενετικής επικάλυψης μεταξύ ΡΑ και ΨΑ, επιλέχθηκαν γονίδια που είτε έχουν συσχετιστεί και με τα δύο νοσήματα σε προηγούμενες αναλύσεις σε διαφορετικούς εθνικούς πληθυσμούς, είτε έχουν συσχετιστεί μέχρι τώρα με ένα μόνο από τα δύο αυτά νοσήματα, και επιχειρήθηκε η ανάλυση τους στον Κρητικό πληθυσμό. Τα γονίδια των οποίων αναλύθηκαν επιλεγμένοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), είναι τα γονίδια *CCL21*, *PLCL2*, *REL*, *STAT4*, *CD226*, *TYK2* και *PTPN22* δεδομένου ότι υπάρχουν πολλά αποτελέσματα μελετών που τα συσχετίζουν με αρκετά διαφορετικά αυτοάνοσα νοσήματα [141][210][211]. Απώτερος στόχος ήταν η επιβεβαίωση της γενετικής συσχέτισης κάποιων γενετικών πολυμορφισμών με την ΡΑ και τη ΨΑ σε έναν ακόμα πληθυσμό διαφορετικής εθνικής προέλευσης, προκειμένου να αντληθεί περισσότερη πληροφορία αναφορικά με την πιθανή χρησιμοποίηση κάποιου εξ αυτών των γονιδίων ως πιθανού μελλοντικού θεραπευτικού στόχου.

2. *Ασθενείς, υλικά & μέθοδοι*

Ασθενείς και ομάδα ελέγχου

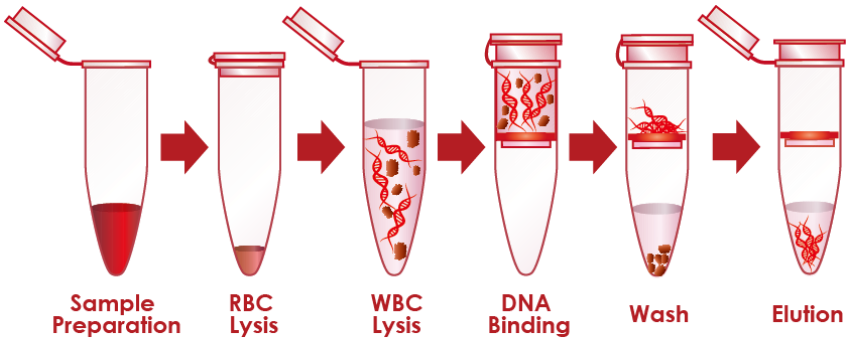
Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε μία γενετική ανάλυση ασθενών-μαρτύρων, για να ελεγχθεί η συσχέτιση των επτά υπό μελέτη πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης ρευματοειδούς ή/και ψωριασικής αρθρίτιδας. Η ομάδα ασθενών με ΡΑ αποτελούνταν από 392 ασθενείς, οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια του Αμερικάνικου Κολλεγίου Ρευματολογίας (2010 ACR/EULAR RA classification criteria) [98]. Στην ομάδα της ΨΑ συμμετείχαν 126 ασθενείς με ΨΑ, οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια CASPAR (ClASsification criteria for Psoriatic ARthritis) [160]. Όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνταν στην Ρευματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης (ΠΑ.Γ.Ν.Η.). Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 521 υγιείς εθελοντές, ανάλογης ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς, που επιλέχθηκαν από το τμήμα Αιμοδοσίας του ΠΑ.Γ.Ν.Η. και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του ΠΑ.Γ.Ν.Η. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Δημογραφικά στοιχεία των ομάδων της μελέτης.

	Ασθενείς με ΡΑ (392)	**Ασθενείς με ΨΑ (126)**	**Ομάδα ελέγχου (521)**
Φύλο			
Άντρες	157 (40%)	68 (54%)	257 (49,3%)
Γυναίκες	235 (60%)	58 (46%)	264 (50,7%)
Ηλικία			
Μέση τιμή±SD	61±10,6	52,1±15,5	37,5±11,8

Εκχύλιση ολικού γενωμικού DNA

Το γενωμικό DNA ασθενών και μαρτύρων εκχυλίστηκε από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος, που είχε συλλεχθεί σε σωληνάρια που περιείχαν EDTA, χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο κιτ της Invitrogen (PureLink® Genomic DNA Mini Kit) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή **(Εικόνα 2.1)**.



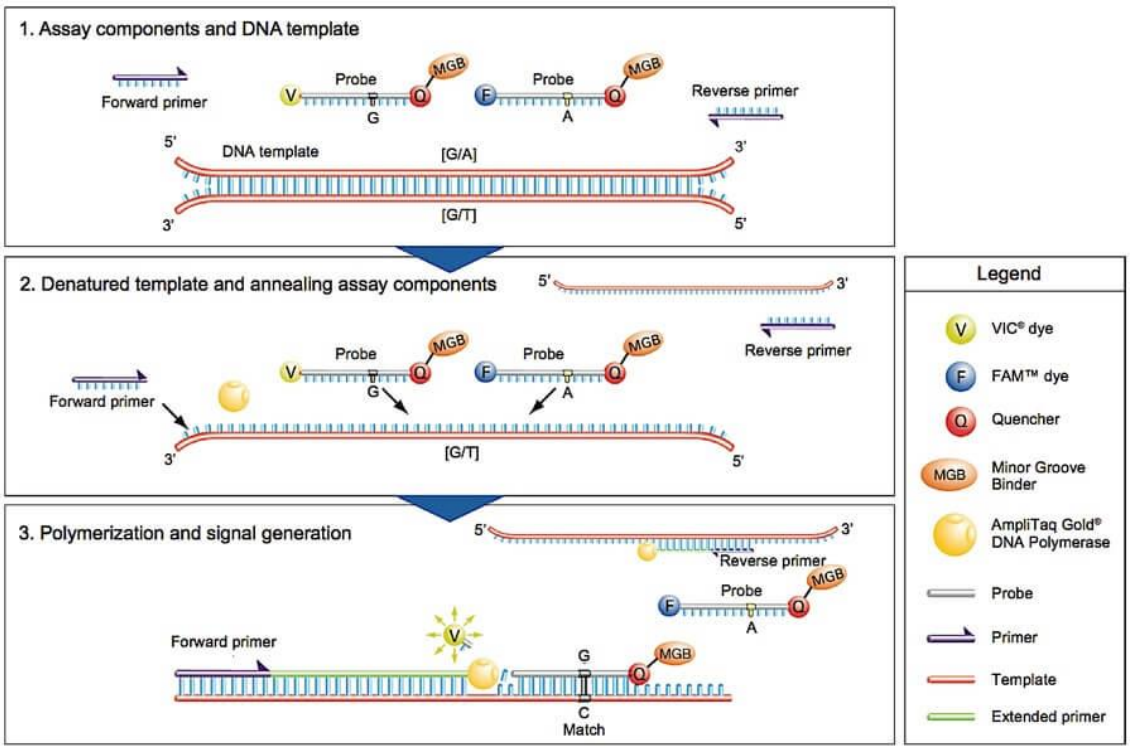
Εικόνα 2.1: Διαδικασία εκχύλισης γενωμικού DNA από ολικό αίμα.

Στη συνέχεια, το εκχυλισμένο DNA αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

Ανάλυση πολυμορφισμών στα γονίδια *PLCL2, CCL21, REL, STAT4, CD226* και *TYK2*

Η γονοτύπηση των δειγμάτων τόσο των ασθενών όσο και των υγιών μαρτύρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Taqman® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, assay numbers: C__481392_10 για τον πολυμορφισμό rs4535211 του γονιδίου *PLCL2*, C__16113556_10 για τον πολυμορφισμό rs2812378 του γονιδίου *CCL21*, C__2833757_10 για τον πολυμορφισμό rs13017599 του γονιδίου *REL*, C__30530761_10 για τον πολυμορφισμό rs10181656 του γονιδίου *STAT4*, C__1464836_20 για τον πολυμορφισμό rs763361 του γονιδίου *CD226* και C__60866522_10 για τον πολυμορφισμό rs34536443 του γονιδίου *TYK2*) στην

πλατφόρμα ViiA™ 7 Real-Time PCR System, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή **(Εικόνα 2.2)**.



Εικόνα 2.2: Taqman Genotyping. Το TaqMan είναι μια τεχνική γονοτύπησης SNP που αναπτύχθηκε από την Life Technologies. Κάθε TaqMan assay περιέχει δύο εκκινητές (primers) για την ενίσχυση της αλληλουχίας ενδιαφέροντος και δύο ειδικούς ανιχνευτές (probes), έναν για κάθε αλληλόμορφο. Οι ανιχνευτές έχουν ένα φθοροφόρο συνδεδεμένο με το 5 'άκρο τους και ένα μόριο αποσβέστη συνδεδεμένο στο 3' άκρο τους. Όταν ο ανιχνευτής είναι ελεύθερος, η εγγύτητα του αποσβέστη προς τη βαφή αναφοράς (reporter dye, VIC/FAM) καταστέλλει τον φθορισμό της. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ενίσχυσης της PCR, αν ο ειδικός για κάθε αλληλόμορφο εκκινητής είναι απολύτως συμπληρωματικός προς το αλληλόμορφο, θα υβριδοποιηθεί στο DNA του στόχου και στη συνέχεια θα αποικοδομηθεί από την δραστικότητα 5'-νουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Η αποικοδόμηση του ανιχνευτή έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό του φθοροφόρου από το μόριο απόσβεσης, δημιουργώντας ένα ανιχνεύσιμο φθορίζον σήμα. Εάν ο ανιχνευτής-εκκινητής που είναι ειδικός για το αλληλόμορφο δεν είναι απολύτως συμπληρωματικός, θα έχει χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης και δεν θα υβριδίζεται αποτελεσματικά στο DNA στόχο. Αυτό εμποδίζει τη δράση της νουκλεάσης στον ανιχνευτή και έτσι δεν υπάρχει το αντίστοιχο φθορίζον σήμα.

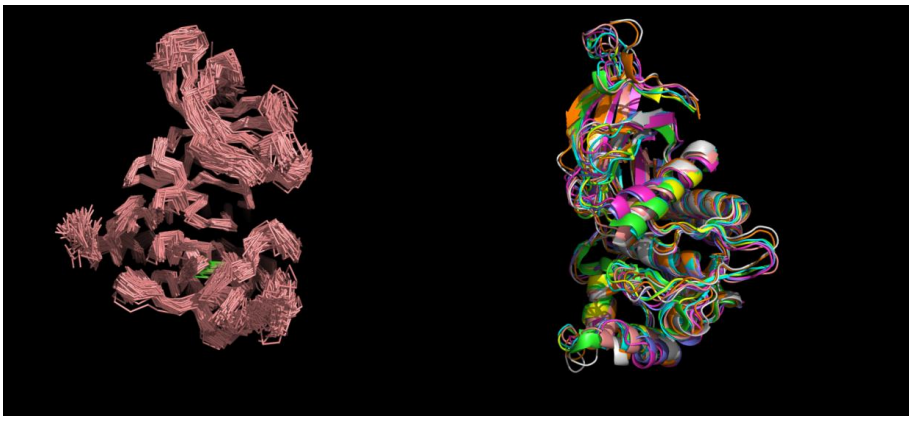
Ανάλυση του πολυμορφισμού rs2476601 του γονιδίου *PTPN22*

Η γονοτύπηση για τον πολυμορφισμό rs2476601 στο γονίδιο *PTPN22* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ανάλυση μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP). Ο ευθύς εκκινητής 5' - TCA CCA GCT TCC TCA ACC ACA - 3' και ο ανάστροφος εκκινητής 5' - GAT AAT GTT GCT TCA ACG GAA TTT - 3' χρησιμοποιήθηκαν για να πολλαπλασιάσουν μία περιοχή 220 bp του γονιδίου *PTPN22* μέσα στην οποία εντοπίζεται ο πολυμορφισμός rs2476601. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl χρησιμοποιώντας 100ng γενωμικού DNA, 1x ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης, 1.5mM MgCl2, 200μM από κάθε dNTP, 0.20μM από κάθε εκκινητή και 1.25U Taq πολυμεράση (OneTaq DNA Polymerase, New England BioLabs). Μετά από την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά, η PCR πραγματοποιήθηκε για 34 κύκλους που ο κάθε ένας περιελάμβανε αποδιάταξη του προϊόντος (94 ^{o}C, 30 δευτερόλεπτα), υβριδοποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία στόχο (58 ^{o}C, 30 δευτερόλεπτα) και επέκταση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας (72 ^{o}C, 30 δευτερόλεπτα). Στο τέλος των 34 κύκλων πραγματοποιήθηκε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης στους 72 ^{o}C για 5 λεπτά και τα προϊόντα της PCR φυλάχθηκαν στους 4 ^{o}C [212].

Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε με περιοριστική ενδονουκλεάση *Xcm*I (New England BioLabs, Ipswich, MA) για 3 ώρες στους 37 ^{o}C σε μία αντίδραση όγκου 20μl αποτελούμενη από 6 μl προϊόντος της PCR και 1x ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου. Το ένζυμο πέπτει το προϊόν της PCR σε 2 θραύσματα μεγέθους 176 bp και 40 bp όταν περιέχεται το T αλληλόμορφο ενώ το αφήνει άκοπο όταν περιέχει το C αλληλόμορφο. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε 2.5% πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρήθηκαν μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο [213]. Η γονοτύπηση έγινε τυφλά και επαναλήφθηκε για όλα τα αμφίβολα αποτελέσματα. Ένα ποσοστό 10% των δειγμάτων αναλύθηκε ξανά για να ελεγχθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν 100%.

Κατασκευή τρισδιάστατου μοντέλου της TYK2

Το στερεοδομικό πρότυπο της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TYK2 δημιουργήθηκε σε συνεργασία με τον καθηγητή Βιοχημείας κ. Ηλία Ηλιόπουλο (Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) **(Εικόνα 2.3)**.



Εικόνα 2.3: Δημιουργία τρισδιάστατου μοντέλου της TYK2.

Η μοντελοποίηση (ή προτυποποίηση) με βάση την ομολογία (homology modeling), είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής μιας άγνωστης πρωτεΐνης με βάση την υπάρχουσα ήδη γνωστή δομή μιας ομόλογης πρωτεΐνης. Ομόλογες δομικά πρωτεΐνες είναι αυτές που ανεξάρτητα από την προέλευση τους έχουν περισσότερο από 30% σύμπτωση αμινοξικών καταλοίπων στην πρωτοταγή τους δομή. Στη μέθοδο αυτή, η οποία μπορεί και να χαρακτηριστεί και ως το αντίστροφο της υπέρθεσης δομών, η στοίχιση αλληλουχιών και μόνο αυτή είναι που κατευθύνει τη δημιουργία του μοντέλου. Τα βασικά βήματα της μοντελοποίησης με βάση την ομολογία είναι τα εξής:

- Εύρεση του προτύπου και πραγματοποίηση της στοίχισης
- Διόρθωση της ευθυγράμμισης
- Κατασκευή του σκελετού της κύριας ανθρακικής αλυσίδας
- Μοντελοποίηση των βρόχων και των πλευρικών αλυσίδων
- Απ’ αρχής κατασκευή βρόγχων
- Βελτιστοποίηση συνολικού προτύπου (ενεργειακή ελαχιστοποίηση)
- Επιβεβαίωση προτύπου με επανάληψη σταδίων

Η τρισδιάστατη δομή της μεταλλαγμένης TYK2 κατασκευάστηκε με βάση την φυσιολογική πρωτεΐνη TYK2 (tyrosine kinase 2, PDB code 4GVJ). Οι αμινοξικές ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με το πρόγραμμα BlastP [214] ενώ οι τρισδιάστατες δομές κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα Pymol [215]. Η προσομοίωση που προέκυψε ελέγχθηκε με το πρόγραμμα Maestro and Desmond για πιθανά λάθη διπλώματος και πακεταρίσματος της πρωτεϊνικής αλυσίδας ώστε να προκύψει ένα συνδυαστικό μοντέλο, χωρίς μη επιτρεπτές επαφές ατόμων, που θα φέρει την βέλτιστη (σταθερότερη) στερεοδιάταξη των πλευρικών αλυσίδων [216].

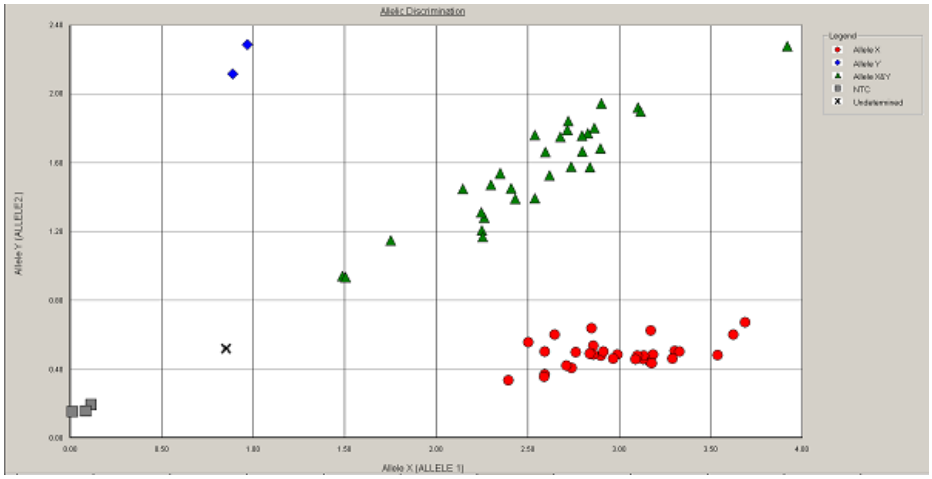
Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Στις συγκρίσεις γενετικής συσχέτισης συμμετείχαν μόνο μη συγγενικά άτομα. Για την μελέτη διαφορών στις συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων εφαρμόστηκε η δοκιμασία x^2, με έναν ή δύο βαθμούς ελευθερίας και διόρθωση κατά Fisher (Fisher exact test) όπου ήταν αναγκαίο. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε όλες τις περιπτώσεις ορίστηκε σε τιμή κριτηρίου p μικρότερη του 0.05 και όλες οι αναλύσεις ήταν διπλής κατεύθυνσης (two-tailed). Οι επτά υπό μελέτη πολυμορφισμοί ελέγχθηκαν για αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy–Weinberg (HWE) με σύγκριση των αναμενόμενων και των παρατηρούμενων συχνοτήτων των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου, με τη δοκιμασία x^2 (χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα 'Calculate'; Copyright TRG, SR, INMD, 2008). Η κατανομή των γονοτύπων στις ομάδες ασθενών και υγιών και για τους επτά υπό μελέτη πολυμορφισμούς βρέθηκε να είναι σε ισορροπία HWE ($p > 0.01$). Τα Odds ratios (OR) μαζί με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους (95% CI) υπολογίστηκαν ως δείκτης του σχετικού κινδύνου ενώ η δύναμη της μελέτης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα QUANTO, έκδοση 1.2.4 [217][218][219][220].

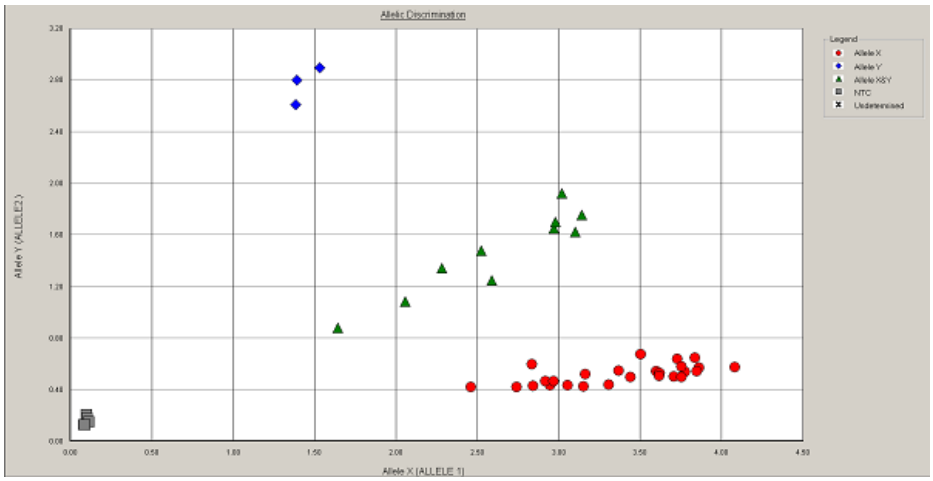
3. *Αποτελέσματα*

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs2812378 του γονιδίου *CCL21* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2812378 του γονιδίου *CCL21* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.1** για τη ΡΑ και της **Εικόνας 3.2** για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ABI Prism 7000 SDS της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.1: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs2812378 A/G του γονιδίου *CCL21* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G, με κόκκινο ο γονότυπος A/A και με πράσινο ο γονότυπος A/G.



Εικόνα 3.2: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs2812378 A/G του γονιδίου *CCL21* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G, με κόκκινο ο γονότυπος A/A και με πράσινο ο γονότυπος A/G.

Τα ποσοστά εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs2812378 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Η ανάλυση για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στο γονίδιο *CCL21*, δείχνει ότι η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του ελάσσονος αλληλομόρφου G μεταξύ των ασθενών με ΡΑ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου, δεν είναι σημαντική (p=0.72). Παρομοίως, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά όταν ελέγχεται ο πολυμορφισμός στο νόσημα της ΨΑ (p=0.081).

Πίνακας 6. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs2812378 του γονιδίου *CCL21* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς με PA N=392	Ομάδα ελέγχου N=521	p value	OR (95% CI)	Ασθενείς με ΨΑ N=126	Ομάδα ελέγχου N=521	p value	OR (95% CI)
Γονότυπος								
A/A	203 (51.79%)	277 (53.17%)			76 (60.32%)	277 (53.17%)		
A/G	167 (42.60%)	199 (38.20%)	0.36*	0.87 (0.66-1.15)*	44 (34.92%)	199 (38.20%)	0.36*	1.24 (0.82-1.87)*
G/G	22 (5.61%)	45 (8.63%)	0.15**	1.5 (0.87-2.57)**	6 (4.76%)	45 (8.63%)	0.13**	2.059 (0.85-5.006)**
Αλληλόμορφα								
A	573 (73.09%)	753 (72.26%)			196 (77.78%)	753 (72.26%)		
G	211 (26.91%)	289 (27.74%)	0.72***	1.042 (0.84-1.28)	56 (22.22%)	289 (27.74%)	0.081***	1.34 (0.97-1.86)

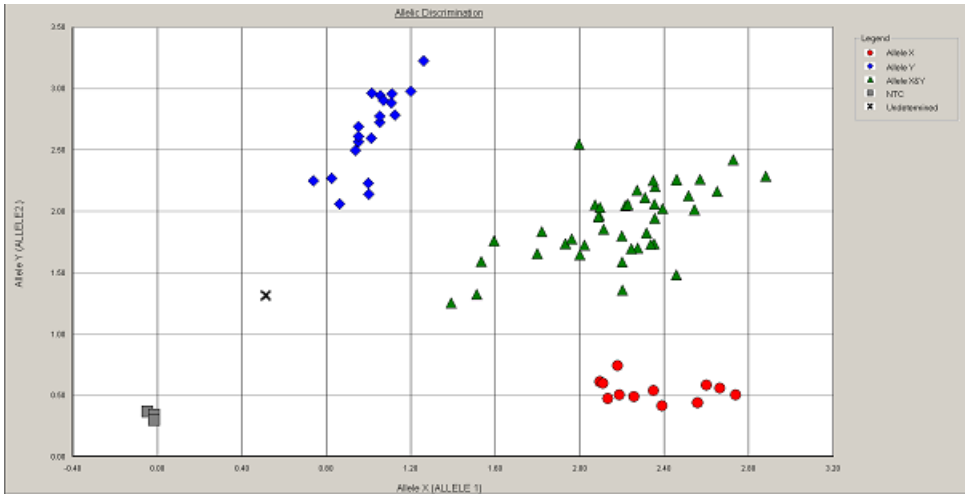
**Για την παρουσία των γονοτύπων A/A versus A/G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

***Για την παρουσία των γονοτύπων A/A versus G/G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

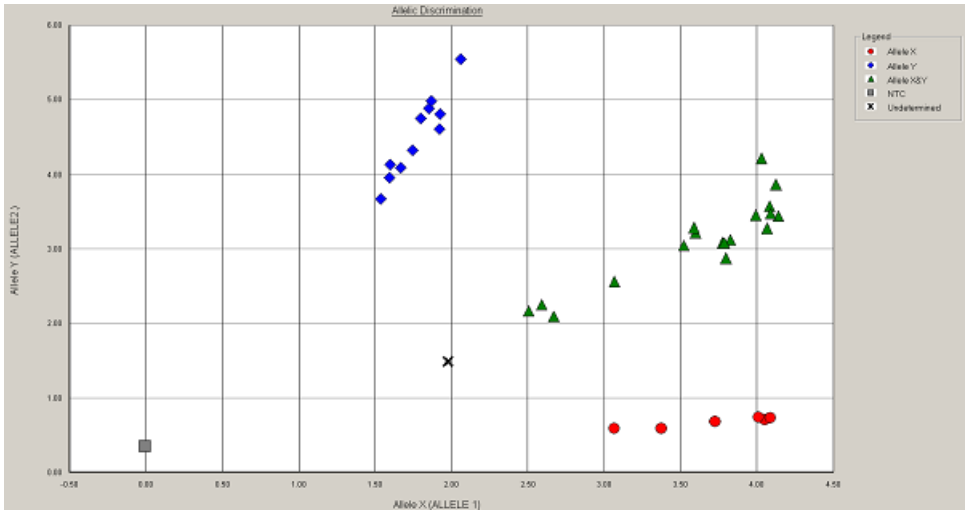
****Για την παρουσία του αλληλομόρφου G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs4535211 του γονιδίου *PLCL2* στην PA και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs4535211 του γονιδίου *PLCL2* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.3** για την PA και της **Εικόνας 3.4** για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ABI Prism 7000 SDS της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.3: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs4535211 G/A του γονιδίου *PLCL2* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος A/A, με κόκκινο ο γονότυπος G/G και με πράσινο ο γονότυπος A/G.



Εικόνα 3.4: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs4535211 G/A του γονιδίου *PLCL2* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος A/A, με κόκκινο ο γονότυπος G/G και με πράσινο ο γονότυπος A/G.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs4535211 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Η ανάλυση για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στο γονίδιο *CCL21*, δείχνει ότι η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του ελάσσονος αλληλομόρφου A μεταξύ των

ασθενών με ΡΑ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου, δεν είναι σημαντική (p=0.34). Παρομοίως, δεν προκύπτει σημαντική διαφορά όταν ελέγχεται ο πολυμορφισμός στο νόσημα της ΨΑ (p=0.26).

Πίνακας 7. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs4535211 του γονιδίου *PLCL2* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς με ΡΑ N=392	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=126**	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
G/G	104 (26.53%)	156 (29.94%)			30 (23.81%)	156 (29.94%)		
G/A	198 (50.51%)	251 (48.18%)	0.31*	0.84 (0.62-1.15)*	66 (52.38%)	251 (48.18%)	0.24*	0.73 (0.45-1.77)*
A/A	90 (22.96%)	114 (21.88%)	0.39**	0.84 (0.58-1.22)**	30 (23.81%)	114 (21.88%)	0.31**	0.73 (0.42-1.28)**
Αλληλόμορφα								
G	406 (51.79%)	563 (54.03%)			126 (50%)	563 (54.03%)		
A	378 (48.21%)	479 (45.97%)	0.34***	0.91 (0.76-1.1)	126 (50%)	479 (45.97%)	0.26***	0.85 (0.65-1.12)

**Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus G/A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

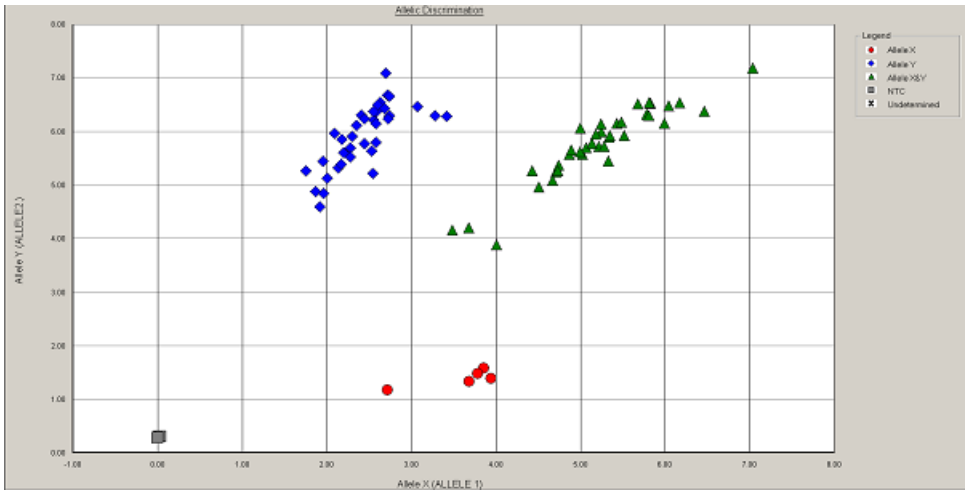
***Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus A/A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

****Για την παρουσία του αλληλομόρφου A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

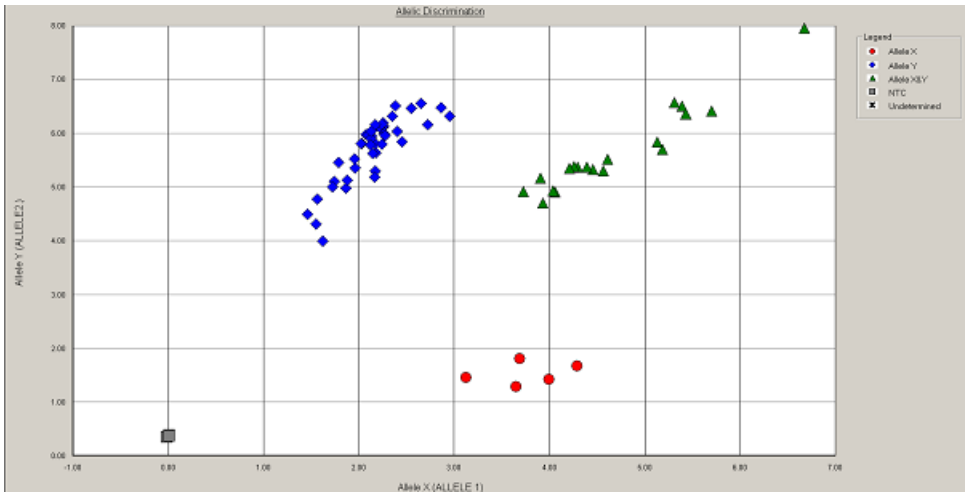
Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs13017599 του γονιδίου *REL* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs13017599 του γονιδίου *REL* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.5** για την ΡΑ και της **Εικόνας 3.6**

για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ABI Prism 7000 SDS της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.5: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs13017599 G/A του γονιδίου *REL* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος A/A, με κόκκινο ο γονότυπος G/G και με πράσινο ο γονότυπος A/G.



Εικόνα 3.6: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs13017599 G/A του γονιδίου *REL* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος A/A, με κόκκινο ο γονότυπος G/G και με πράσινο ο γονότυπος A/G.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs13017599 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον

πίνακα 8. Η ανάλυση για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό στο γονίδιο *REL*, δείχνει ότι η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του ελάσσονος αλληλομόρφου Α μεταξύ των ασθενών με ΡΑ και των ατόμων της ομάδας ελέγχου, δεν είναι σημαντική (p=0.19). Παρομοίως, δεν προκύπτει σημαντική διαφορά όταν ελέγχεται ο πολυμορφισμός στο νόσημα της ΨΑ (p=0.095).

Πίνακας 8. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs13017599 του γονιδίου *REL* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς με ΡΑ N=392	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=126**	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
G/G	165 (42.09%)	238 (45.68%)			69 (54.76%)	238 (45.68%)		
G/A	178 (45.41%)	230 (44.15%)	0.477*	0.89 (0.67-1.18)*	47 (37.30%)	230 (44.15%)	0.098*	1.42 (0.94-2.14)*
A/A	49 (12.50%)	53 (10.17%)	0.22**	0.75 (0.48-1.16)**	10 (7.94%)	53 (10.17%)	0.311**	1.54 (0.74-3.18)**
Αλληλόμορφα								
G	508 (64.80%)	706 (67.75%)			185 (73.40%)	706 (67.75%)		
A	276 (35.20%)	336 (32.25%)	0.19***	0.876 (0.72-1.06)	67 (26.60%)	336 (32.25%)	0.095***	1.314 (0.96-1.79)

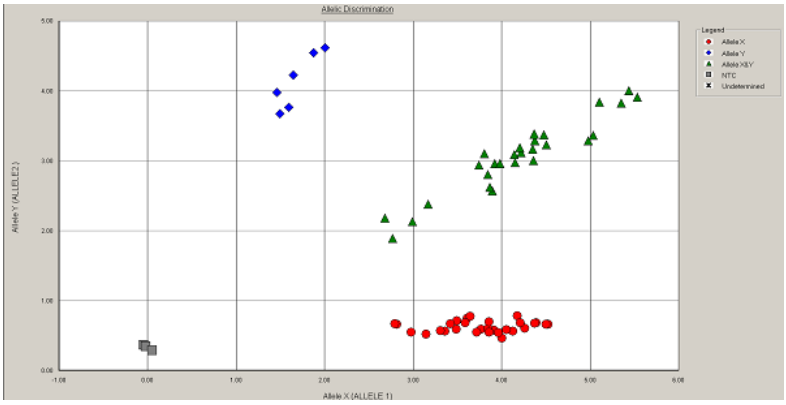
**Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus G/A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

***Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus A/A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

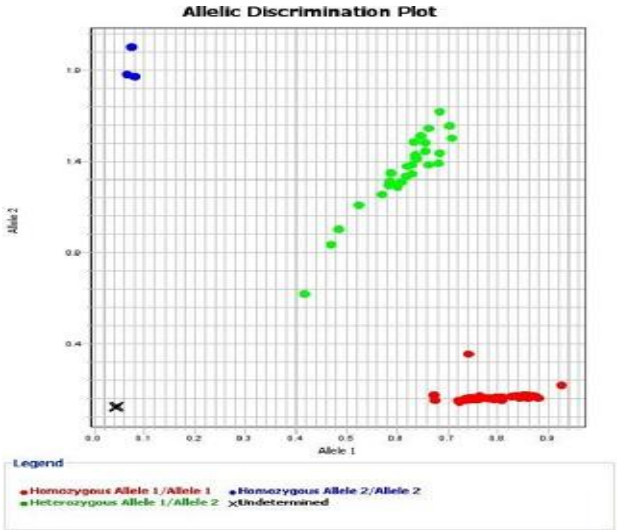
****Για την παρουσία του αλληλομόρφου A στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs10181656 του γονιδίου *STAT4* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs10181656 του γονιδίου *STAT4* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.7** για την ΡΑ και της **Εικόνας 3.8** για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ViiA™ 7 Real-Time PCR System της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.7: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs10181656 C/G του γονιδίου *STAT4* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G, με κόκκινο ο γονότυπος C/C και με πράσινο ο γονότυπος C/G.



Εικόνα 3.8. Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs10181656 C/G του γονιδίου *STAT4* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G, με κόκκινο ο γονότυπος C/C και με πράσινο ο γονότυπος C/G.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs10181656 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **πίνακα 9**. Όπως φαίνεται από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, οι ασθενείς με ΨΑ εμφάνισαν λιγότερο συχνά την ομοζυγωτία GG (p = 0.04, OR=4.3, 95% CI 1.01-18.39) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το έλασσον αλληλόμορφο (G) του πολυμορφισμού rs10181656 του γονιδίου *STAT4*, να εμφανίζει σημαντικά αυξημένη συχνότητα στους υγιείς μάρτυρες σε σχέση με τους ασθενείς (p = 0.03, OR=1.46, 95% CI 1.03-2.08). Εντούτοις, δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με τη ΡΑ είτε σε επίπεδο γονοτύπων είτε σε επίπεδο αλληλομόρφων.

Πίνακας 9. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs10181656 του γονιδίου *STAT4* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

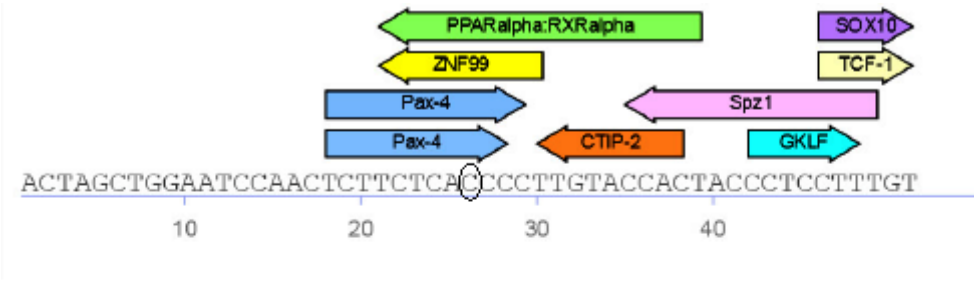
	Ασθενείς με ΡΑ N=392	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=126**	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
C/C	202 (51.53%)	295 (56.62%)			82 (65.08%)	295 (56.62%)		
C/G	157 (40.05%)	195 (37.43%)	0.26*	0.85 (0.64-1.12)*	42 (33.33%)	195 (37.43%)	0.26*	1.29 (0.85-1.95)*
G/G	33 (8.42%)	31 (5.95%)	0.10**	0.64 (0.38-1.08)**	2 (1.59%)	31 (5.95%)	**0.04****	**4.3 (1.01-18.39)****
Αλληλόμορφα								
C	561 (71.56%)	785 (75.34%)			206 (81.75%)	785 (75.34%)		
G	223 (28.44%)	257 (24.66%)	0.07***	0.82 (0.67-1.016)	46 (18.25%)	257 (24.66%)	**0.03*****	**1.46 (1.03-2.08)**

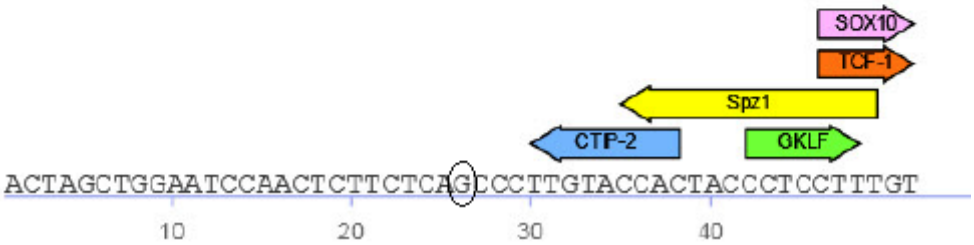
**Για την παρουσία των γονοτύπων C/C versus C/G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

***Για την παρουσία των γονοτύπων C/C versus G/G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

****Για την παρουσία του αλληλομόρφου G στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

Παράλληλα, σε μια προσπάθεια να διερευνήσουμε τις πιθανές λειτουργικές επιπτώσεις αυτού του πολυμορφισμού, πραγματοποιήσαμε ανάλυση της αλληλουχίας του DNA της περιοχής του γονιδίου *STAT4* όπου εδράζεται ο πολυμορφισμός C/G, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gene2Promoter. Η ανάλυση αυτή μας αποκάλυψε ότι η παρουσία του μείζονος αλληλομόρφου C, και όχι του ελάσσονος G, συμβάλλει στην δημιουργία μιας πιθανής θέσης πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Pax-4, PPAR/RXR και ZNF99 **(Εικόνα 3.9)**.



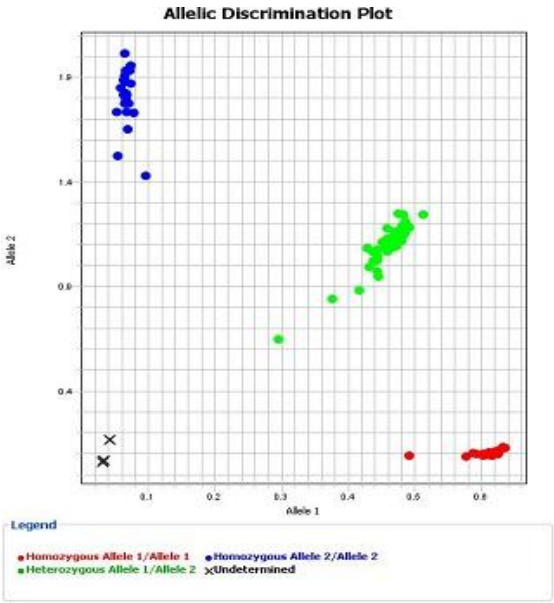


Εικόνα 3.9: Ανάλυση της αλληλουχίας που εδράζεται ο C/G πολυμορφισμός στο γονίδιο *STAT4*. Πάνω: παρουσία του μείζονος αλληλομόρφου C προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Pax-4, PPAR/RXR και ZNF99. Κάτω: παρουσία του ελάσσονος αλληλομόρφου G, η θέση πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Pax-4, PPAR/RXR και ZNF99 εξαλείφεται.

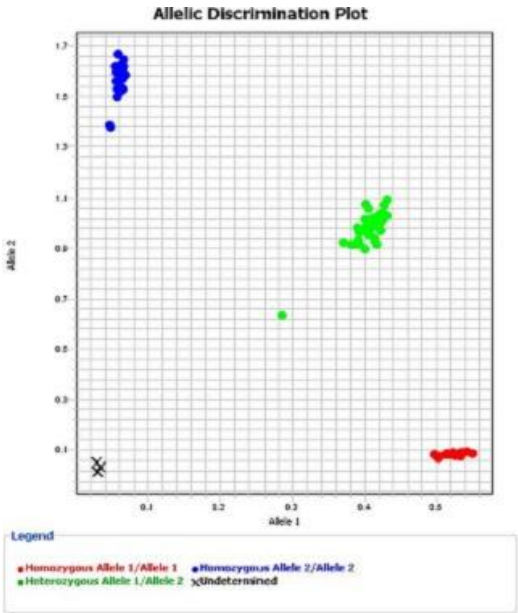
Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs763361 του γονιδίου *CD226* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs763361 του γονιδίου *CD226* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.10** για την ΡΑ και της **Εικόνας 3.11**

για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ViiA™ 7 Real-Time PCR System της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.10: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs763361 T/C του γονιδίου *CD226* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος C/C, με κόκκινο ο γονότυπος T/T και με πράσινο ο γονότυπος T/C.



Εικόνα 3.11: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs763361 T/C του γονιδίου *CD226* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος C/C, με κόκκινο ο γονότυπος T/T και με πράσινο ο γονότυπος T/C.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs763361 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10**. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης αποκάλυψαν συσχέτιση του πολυμορφισμού rs763361 του γονιδίου *CD226* με το νόσημα της ΨΑ. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΨΑ εμφάνισαν λιγότερο συχνά την ετερόζυγη κατάσταση T/C σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (p = 0.0388, OR=0,61, 95% CI 0,39-0,95). Όσον αφορά την ΡΑ, δεν ανιχνεύθηκε σημαντική διαφορά στην συχνότητα των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 10. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs763361 του γονιδίου *CD226* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς με ΡΑ N=392	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=126**	**Ομάδα ελέγχου N=521**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
T/T	121 (30.9%)	148 (28.4%)			48 (38.1%)	148 (28.4%)		
T/C	187 (47.7%)	260 (49.9%)	0.43*	0.88 (0.64-1.19)*	52 (41.3%)	260 (49.9%)	**0.0388***	**0.61 (0.39-0.95)***
C/C	84 (21.4%)	113 (21.7%)	0.64**	0.91 (0.62-1.31)**	26 (20.6%)	113 (21.7%)	0.23**	0.71 (0.41-1.21)**
Αλληλόμορφα								
T	429 (54.7%)	556 (53.4%)			148 (58.7%)	556 (53.4%)		
C	355 (45.3%)	486 (46.6%)	0.57***	0.95 (0.78-1.14)	104 (41.3%)	486 (46.6%)	0.14***	0.80 (0.61-1.06)

**Για την παρουσία των γονοτύπων T/T versus T/C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

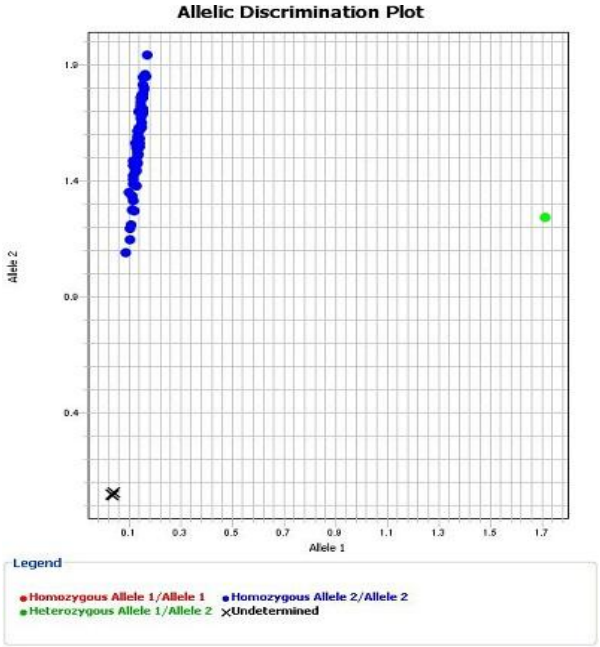
***Για την παρουσία των γονοτύπων T/T versus C/C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

****Για την παρουσία του αλληλομόρφου C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

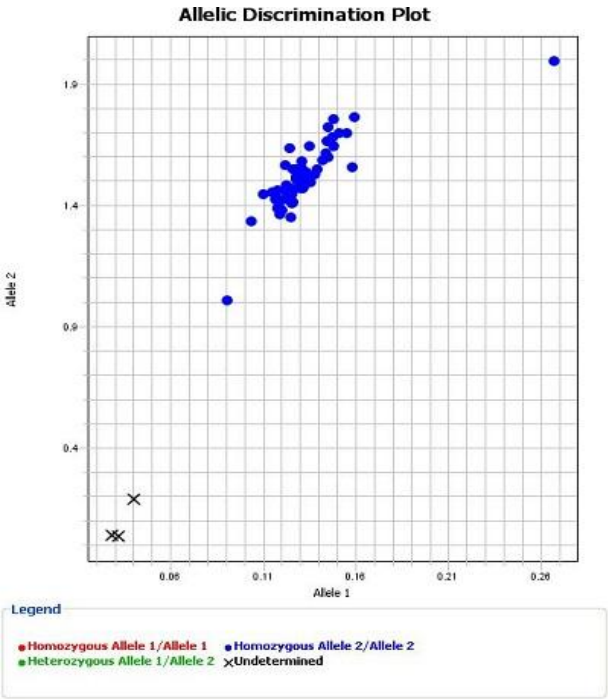
Θέλοντας να ερευνήσουμε τον ρόλο αυτού του πολυμορφισμού στην ανάπτυξη πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων, αναλύσαμε λεπτομερώς το ήδη υπάρχον τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης CD226 [221]. Ο πολυμορφισμός rs763361 έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της γλυκίνης στην θέση #307 της πρωτεΐνης από μια σερίνη (Gly307Ser). Αυτή η θέση βρίσκεται στην αμινοξική αλληλουχία προς το καρβοξυτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου CD226. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη σερίνης σε αυτήν την θέση αλλάζει το μάτισμα (ή συναρμογή) του μεταγράφου, πράγμα το οποίο επηρεάζει την μετέπειτα σηματοδότηση και αυξάνει την ενεργοποίηση των Τ και των NK κυττάρων. Η περιοχή αυτή αποτελείται από πολλά φορτισμένα και πολικά αμινοξικά κατάλοιπα και επίσης περιέχει αρκετές πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης (Y249, T250, S290, T293, S302, S305, S313, Y322, Y325, S329). Αν και δε μπορούμε να εξάγουμε σίγουρα συμπεράσματα για μια πιθανή δομική αλλαγή, η σερίνη στην θέση #307 πιθανώς συμμετέχει σε πολικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν γειτονικά φορτισμένα κατάλοιπα ή θέσεις φωσφορυλίωσης.

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs34536443 του γονιδίου *TYK2* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs34536343 του γονιδίου *TYK2* απεικονίζονται στο Taqman Allelic Discrimination Plot της **Εικόνας 3.12** για την ΡΑ και της **Εικόνας 3.13** για την ΨΑ, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα γονοτύπησης ViiA™ 7 Real-Time PCR System της Applied Biosystems.



Εικόνα 3.12: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs34536443 G/C του γονιδίου *TYK2* σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G και με πράσινο ο γονότυπος G/C.



Εικόνα 3.13: Allelic Discrimination Plot του πολυμορφισμού rs34536443 G/C του γονιδίου *TYK2* σε ασθενείς με Ψωριασική Αρθρίτιδα. Με μπλε απεικονίζεται ο γονότυπος G/G.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs34536443 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**. Τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό rs34536443 του γονιδίου *TYK2* έδειξαν ότι ο γονότυπος G/C ήταν λιγότερο συχνός στους ασθενείς με ρευματοειδή και ψωριασική αρθρίτιδα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [p=0.0347, OR=0.33, 95% CI (0.123-0.90) και p=0.0194, OR=0.099, 95% CI (0.005-1,65), αντίστοιχα], ενώ παράλληλα το αλληλόμορφο C παρατηρήθηκε συχνότερα στους υγιείς μάρτυρες σε σχέση με τους ασθενείς με ΨΑ (p=0,0203, OR=0.10, 95% CI 0.006-1.681). Αντίθετα, το συγκεκριμένο αλληλόμορφο δεν εμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ασθενών με ΡΑ και των υγιών ατόμων.

Πίνακας 11. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs34536443 του γονιδίου *TYK2* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

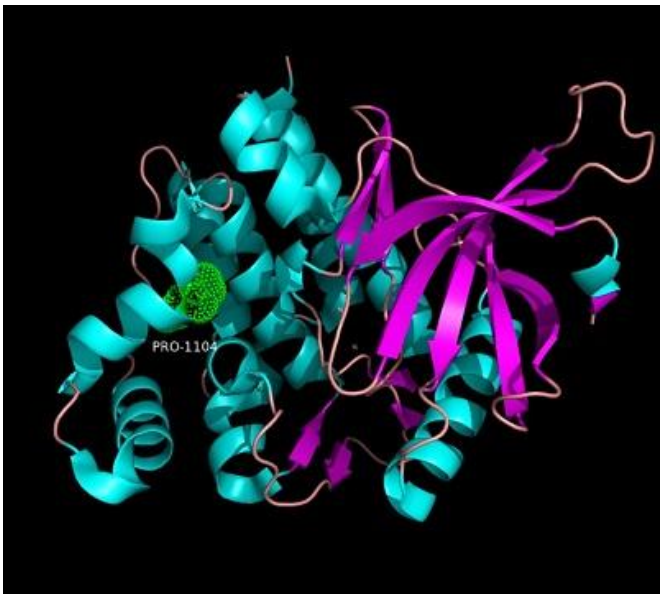
	Ασθενείς με ΡΑ N=392	**Ομάδα ελέγχου N=507**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=126**	**Ομάδα ελέγχου N=507**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
G/G	385 (98.2%)	488 (96.3%)			126 (100%)	488 (96.3%)		
G/C	5 (1.3%)	19 (3.7%)	**0.0347***	**0.33 (0.123-0.90)***	0 (0%)	19 (3.7%)	**0.0194***	**0.099 (0.005-1.65)***
C/C	2 (0.5%)	0 (0%)	0.1953**	6.33 (0.3-132.5)**	0 (0%)	0 (0%)		
Αλληλόμορφα								
G	775 (98.9%)	995 (98.1%)			252 (100%)	995 (98.1%)		
C	9 (1.1%)	19 (1.9%)	0.25***	0.60 (0.27-1.352)	0 (0%)	19 (1.9%)	**0.0203*** **	**0.10 (0.006-1.681)**

**Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus G/C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

***Για την παρουσία των γονοτύπων G/G versus C/C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

****Για την παρουσία του αλληλομόρφου C στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

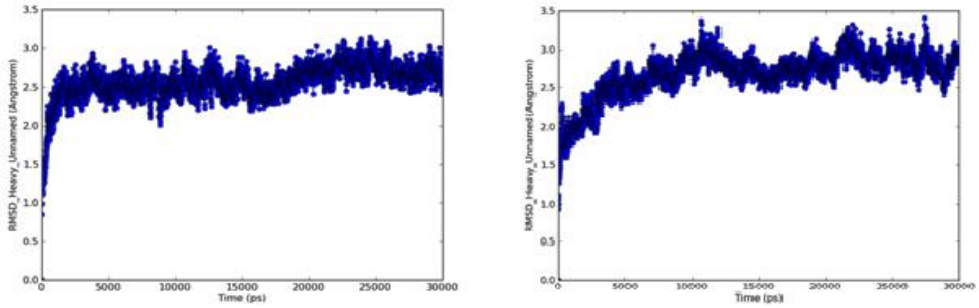
Μετά τα παραπάνω αποτελέσματα και αφού δημιουργήσαμε το στερεοδομικό πρότυπο της μεταλλαγμένης TYK2, πραγματοποιήσαμε ανάλυση της δομής της πρωτεΐνης. Η ανάλυση με εργαλεία βιοπληροφορικής αποκάλυψε ότι η μεταστροφή της γουανίνης σε κυτοσίνη (G σε C), που οφείλεται στον πολυμορφισμό rs34536443 του γονιδίου *TYK2* έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της προλίνης στην θέση 1104 από αλανίνη στην πρωτεΐνη TYK2. Συγκεκριμένα η αντικατάσταση του Pro1104 αμινοξικού καταλοίπου της TYK2 (α-helical structure disruptor) με αλανίνη (α-helical former), μπορεί να επάγει στο τμήμα της α-έλικας (κατάλοιπα 1104-1113) μια διαμορφωτική αλλαγή που επεκτείνει το τμήμα της α-έλικας για πέντε επιπλέον κατάλοιπα (1099-1113). Μια τέτοιου είδους αλλαγή πιθανώς να επηρεάζει την τοπική 3D δομή, την αναδίπλωση και τις παραμέτρους αλληλεπίδρασης του μορίου και επομένως να επάγει αλλαγές στην λειτουργικότητά του **(Εικόνα 3.14)**.



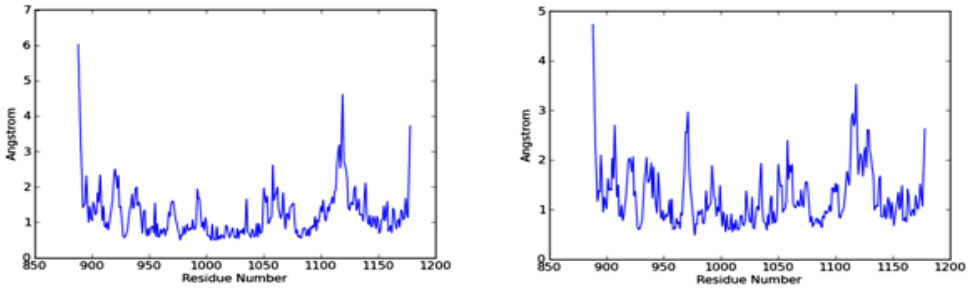
Εικόνα 3.14: Τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης TYK2 που περιέχει την θέση του πολυμορφισμού P1104A. Με κυανό απεικονίζονται οι α-έλικες και με μωβ οι β-πτυχωτές επιφάνειες.

Μελέτες μοριακής δυναμικής που διεξήχθησαν στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, δείχνουν διάδοση των αλλαγών αναδίπλωσης κατά μήκος της μοριακής δομής, αυξάνοντας τη

μέση ταλάντωση στο χρόνο αλλά και την ταλάντωση κατά μήκος όλης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας **(Εικόνες 3.15 και 3.16)**.



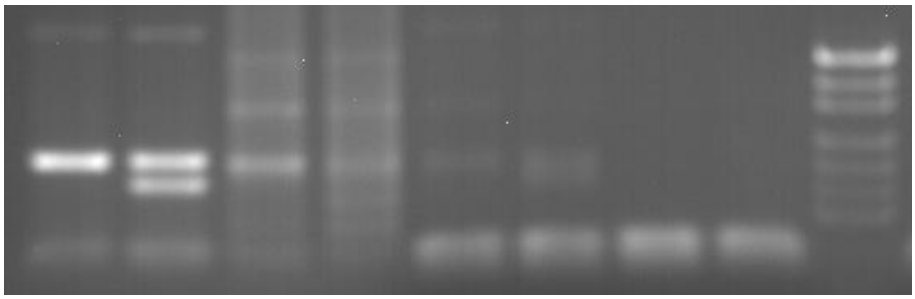
Εικόνα 3.15: Μέση ταλάντωση στο χρόνο, εμφανώς αυξημένη στα δεξιά όπου απεικονίζεται η μεταλλαγμένη TYK2.



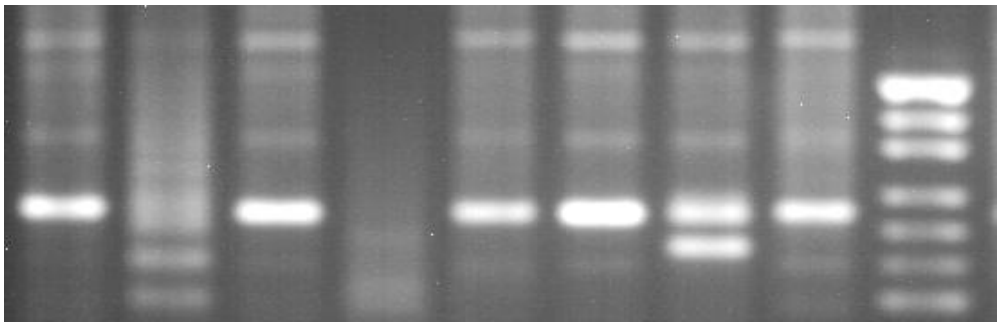
Εικόνα 3.16: Ταλάντωση κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της TYK2.

Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs2476601 του γονιδίου *PTPN22* στην ΡΑ και στην ΨΑ.

Τέλος, τα αποτελέσματα της γονοτύπησης των δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους βάσει γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2476601 του γονιδίου *PTPN22,* απεικονίζονται στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο της **Εικόνας 3.17** για την ΡΑ και της **Εικόνας 3.18** για την ΨΑ, όπως προέκυψαν μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *XcmI*.



Εικόνα 3.17: Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων ΡΑ για τον πολυμορφισμό rs2476601 του γονιδίου *PTPN22*. Οι γονότυποι των δειγμάτων που παρουσιάζονται είναι οι εξής: 1ο C/C, 2ο C/T, 3ο-5ο C/C, 6ο-8ο απροσδιόριστο, 9^{ο} ladder.



Εικόνα 3.18: Ηλεκτροφορητική ανάλυση δειγμάτων ΨΑ για τον πολυμορφισμό rs2476601 του γονιδίου *PTPN22*. Οι γονότυποι των δειγμάτων που παρουσιάζονται είναι οι εξής: 1ο C/C, 2ο απροσδ/στο, 3ο C/C, 4ο απροσδ/στο, 5ο-6ο C/C, 7ο C/T, 8ο C/C, 9^{ο} ladder.

Οι συχνότητες εμφάνισης των τριών γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs2476601 σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 12**. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων 1858C/T του γονιδίου *PTPN22* δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών ΡΑ και υγιών ατόμων, ενώ βρέθηκε ότι το έλασσον αλληλόμορφο T ήταν πιο συχνό στους υγιείς απ' ότι στους ασθενείς με ΨΑ. Ωστόσο, η διαφορά που παρατηρήθηκε δεν ήταν στατιστικά σημαντική όταν ελέγχθηκε με την δοκιμή χ^2 [(p=0.069, OR=3.70, 95% CI (0.87-15.57)].

Πίνακας 12. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό rs2476601 του γονιδίου *PTPN22* σε ασθενείς και ομάδα ελέγχου.

	Ασθενείς με ΡΑ N=443	**Ομάδα ελέγχου N=510**	**p value**	**OR (95% CI)**	**Ασθενείς με ΨΑ N=119**	**Ομάδα ελέγχου N=510**	**p value**	**OR (95% CI)**
Γονότυπος								
C/C	427 (94.10%)	479 (93.90%)			117 (98.30%)	479 (93.90%)		
C/T	26 (5.90%)	31 (6.10%)	0.89*	1.063 (0.62-1.82)*	2 (1.70%)	31 (6.10%)	0.065*	3.78 (0.89-16.05)*
T/T	0 (0%)	0 (0%)			0 (0%)	0 (0%)		
Αλληλόμορφα								
C	860 (97.10%)	989 (97%)			236 (99.20%)	989 (97%)		
T	26 (2.90%)	31 (3%)	1.0**	1.037 (0.61-1.76)**	2 (0.8%)	31 (3%)	0.069**	3.70 (0.87-15.57)**

**Για την παρουσία των γονοτύπων C/C versus C/T στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

***Για την παρουσία του αλληλομόρφου T στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.*

4. *Συζήτηση*

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αποκαλυφθεί πολλά γονίδια που συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΡΑ και η αυξημένη συχνότητά τους έχει επαληθευθεί σε ανεξάρτητους πληθυσμούς ασθενών. Δεδομένου ότι πολλές γενετικές μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία κοινών γονιδιακών τόπων που σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, οδηγώντας σε ορισμένες περιπτώσεις στην ανάπτυξη κοινών θεραπευτικών προσεγγίσεων, θεωρήθηκε ότι οι γενετικοί αυτοί τόποι θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικά υποψήφια γονίδια για τον έλεγχο της πιθανής επικάλυψης σε γενετικό επίπεδο, μεταξύ των νοσημάτων της ρευματοειδούς και της ψωριασικής αρθρίτιδας.

Η στρατηγική της μελέτης του πιθανού ρόλου των γονιδίων προδιάθεσης της ΡΑ, στην ανάπτυξη της ΨΑ, έχει αποδειχθεί πολύ επιτυχημένη μέχρι στιγμής [201]. Επιπλέον, τα συσσωρευμένα στοιχεία γενετικών αναλύσεων δείχνουν ότι υπάρχει έντονη εθνική ετερογένεια των γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τις ρευματικές παθήσεις [212][222][223][224][225][226][227][228][229]. Επομένως, η κατανόηση της ομοιογένειας ή της ετερογένειας των προδιαθεσικών παραγόντων μεταξύ αυτών των νοσημάτων παρέχει μια εικόνα για κοινή γονιδιακή λειτουργία και κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια [194]. Η παρούσα εργασία παρέχει δεδομένα που διερευνούν την ύπαρξη γενετικής συσχέτισης διαφόρων πολυμορφισμών, με τα νοσήματα της ρευματοειδούς και της ψωριασικής αρθρίτιδας στον Κρητικό πληθυσμό.

Συγκεκριμένα, έπειτα από γενετικές αναλύσεις επτά συχνών πολυμορφισμών σε επτά διαφορετικά γονίδια, τα πειράματα που διεξήχθησαν αποκάλυψαν κάποιες συσχετίσεις με τα δύο νοσήματα και ταυτόχρονα μελετήθηκε το πιθανό γενετικό υπόβαθρο αυτών των δύο αυτοάνοσων νοσημάτων. Τα γονίδια που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, και οι αντίστοιχοι πολυμορφισμοί τους, επιλέχθηκαν βάσει προηγούμενης συσχέτισής τους με τα δύο νοσήματα σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλους εθνικούς πληθυσμούς, αλλά και βάσει της εμπλοκής τους σε σημαντικά για την αυτοανοσία και την ανοσολογική ρύθμιση σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα γονίδια στα οποία πραγματοποιήθηκε η γενετική ανάλυση είναι τα εξής: *PLCL2, CCL21, REL, STAT4, CD226, PTPN22* και *TYK2*.

Το γονίδιο *CCL21* κωδικοποιεί για μια κυτταροκίνη η οποία όταν προσδεθεί στον υποδοχέα της συμμετέχει στον έλεγχο της ανοσορύθμισης και της φλεγμονής. Ο πολυμορφισμός rs2812378 του γονιδίου *CCL21* έχει συσχετιστεί με την ρευματοειδή αρθρίτιδα και ειδικά με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα σε περιπτώσεις πολυαρθρίτιδας [230][231]. Ο ίδιος πολυμορφισμός βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά και με την ψωριασική αρθρίτιδα [201], αποτελώντας έναν από τους κοινούς γενετικούς τόπους των δύο νοσημάτων. Μια άλλη μελέτη ανίχνευσε σημαντική συσχέτιση με την ενδομητρίωση [232], ενώ δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα και την ψωρίαση [233].

Το γονίδιο *PLCL2* κωδικοποιεί για μια καταλυτικά ανενεργή πρωτεΐνη που συμμετέχει στην ανοσορύθμιση, μέσω αρνητικής ρύθμισης της BCR σηματοδότησης [234]. Ο πολυμορφισμός rs4535211 έχει συσχετιστεί τόσο με την ΡΑ όσο και με την ΨΑ [201].

Το γονίδιο *REL* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας NF-Κβ, που ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση, τη φλεγμονή, την ανοσοαπόκριση και τις ογκογονικές διεργασίες, διαδραματίζοντας μάλιστα σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων [235]. Ο πολυμορφισμός rs13017599 έχει συσχετιστεί και με τα δύο υπό μελέτη νοσήματα [184][201] καθώς και με άλλα αυτοάνοσα όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου [236].

Το γονίδιο *STAT4* κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος όταν διμεριστεί ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων, σημαντικών συστατικών της ανοσοαπόκρισης. Αυτή η πρωτεΐνη είναι επίσης απαραίτητη στην διαμεσολάβηση των αποκρίσεων των λεμφοκυττάρων στην IL12 αλλά και για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων [237]. Ο πολυμορφισμός rs10181656 στο συγκεκριμένο γονίδιο έχει αναλυθεί σε αρκετές μελέτες και έχει ανιχνευτεί συσχέτιση με την ΡΑ, την ΨΑ [201] καθώς και με την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και τον διαβήτη τύπου Ι [238]. Η ισχυρότερη συσχέτιση όμως για αυτόν τον πολυμορφισμό έχει εντοπιστεί σε ασθενείς με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ) [149].

Το γονίδιο *CD226* κωδικοποιεί για μια μεμβρανική πρωτεΐνη, που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Ig), και εκφράζεται στην επιφάνεια των NK

κυττάρων, των αιμοπεταλίων, των μονοκυττάρων και ενός υποσυνόλου Τ λεμφοκυττάρων, συμμετέχοντας έτσι στις ανοσολογικές διεργασίες [239]. Ο μη-συνώνυμος πολυμορφισμός rs763361 του γονιδίου *CD226*, που έχει ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση Gly307Ser, έχει προταθεί ότι μεταβάλλει την ακολουθία ESS (exon-splicing silencer) και αυτό δυνητικά μπορεί να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση. Ο πολυμορφισμός rs763361 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για πολλά αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ), ο διαβήτης τύπου Ι (ΣΔ1), η πολλαπλή σκλήρυνση (ΠΣ) και η νόσος Grave's [240][241][242]. Όσον αφορά την ΨΑ δεν έχει ανιχνευτεί κάποια συσχέτιση με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, όμως υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτισή του με την βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων της ψωρίασης [243].

Το γονίδιο *TYK2* κωδικοποιεί για μια κινάση τυροσίνης της οικογένειας των JAK κινασών. Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη εμπλέκεται στο σηματοδοτικό μονοπάτι των STAT, και είναι σημαντική για τη σηματοδότηση μέσω της ιντερφερόνης τύπου Ι (IFN) και την επαγωγή της διαφοροποίησης των Τ-βοηθητικών κυττάρων (Th) 1 κατά την διέγερση των δενδριτικών κυττάρων από αντιγόνα [244]. Μία μεγάλη μετα-ανάλυση, που χρησιμοποίησε τα δεδομένα από το Immunochip και το Exomechip, κατέδειξε ότι το έλασσον αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs34536443 του γονιδίου *TYK2* ήταν προστατευτικό έναντι σε ΡΑ, ΣΕΛ και φλεγμονώδη νόσο του εντέρου [72], ενώ η ίδια παραλλαγή υπήρξε προηγουμένως παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης ψωρίασης [181] και ΝΙΑ [204]. Ο πολυμορφισμός rs34536443, συσχετίζεται επίσης με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης πολλαπλής σκλήρυνσης [245], ενώ έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο υπογονιμότητας λόγω ενδομητρίωσης [246].

Τέλος, Το γονίδιο *PTPN22* κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης, ένα ενδοκυττάριο μόριο που συμβάλει στη ρύθμιση της αρνητικής επιλογής των Τ κυττάρων στο θύμο αδένα και των αυτοαντιδρώντων Τ κυττάρων στην περιφέρεια. Από πολύ νωρίς θεωρήθηκε ιδανικό υποψήφιο γονίδιο για γενετικές μελέτες συσχέτισης με αυτοάνοσα νοσήματα [247]. Ο πολυμορφισμός rs2476601 (R620W) είναι από τους πλέον μελετημένους σε πολλά διαφορετικά νοσήματα και πληθυσμούς. Μάλιστα θεωρείται το αρχέτυπο γονίδιο αυτοανοσίας μετά τα *HLA*. Συσχετίσεις για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό έχουν ανιχνευτεί επανειλημμένα στην ΡΑ, όπου αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό γενετικό παράγοντα κινδύνου μετά το *HLA* [248].

Σημαντική συσχέτιση έχει εντοπιστεί και για την ΨΑ, τη ΝΙΑ, τον ΣΔ1, τον ΣΕΛ, την συστηματική σκλήρυνση, την αγγειίτιδα, την αυτοάνοση νόσο του θυρεοειδούς, τη νόσο του Crohn, την ελκώδη κολίτιδα, την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, τη νόσο του Addison και το σύνδρομο Behcet [249][250][251][252].

Ανακεφαλαιώνοντας, οι πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν στα γονίδια *PLCL2, REL, CCL21, STAT4* και *PTPN22* είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη, ότι είναι κοινοί μεταξύ της ΡΑ και της ΨΑ. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου *TYK2,* διερευνήθηκε στην παρούσα μελέτη καθώς θεωρήθηκε, από προηγούμενα αποτελέσματα, ως ένας γενετικός τόπος που σχετίζεται με την ΡΑ, αλλά και με την ΝΙΑ, την ψωρίαση, την πολλαπλή σκλήρυνση και τον ΣΕΛ. Επομένως, η ανάλυση μας για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό είχε ως σκοπό να μελετήσει την πιθανή συσχέτιση και με την ΨΑ. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός που αναλύθηκε στο γονίδιο *CD226,* έχει μέχρι στιγμής συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΡΑ, ΣΕΛ, ΣΔ1, πολλαπλής σκλήρυνσης, νόσου του GRAVE'S, αλλά έχει επίσης συσχετιστεί και με την βαρύτητα των κλινικών εκδηλώσεων της ψωρίασης. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, διερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση του και με την ΨΑ στον Κρητικό πληθυσμό.

Η επιλογή του Κρητικού πληθυσμού για τις γενετικές μας αναλύσεις αποτελεί ισχυρό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μελέτης. Η Κρήτη είναι το μεγαλύτερο νησί της Ελλάδας. Γεωγραφικά τοποθετείται στο νοτιοανατολικότερο άκρο της χώρας (25ºΕ και 35ºΝ) και αποτελείται από 650000 κατοίκους με κοινό γενετικό, περιβαλλοντικό και πολιτιστικό υπόβαθρο, ισχυρούς οικογενειακούς δεσμούς και μικρές τάσεις μετανάστευσης [253]. Η επιλογή του νησιού για τη μελέτη γενετικών νοσημάτων παρέχει αναμφισβήτητα πλεονεκτήματα καθώς θεωρείται ένας μάλλον απομονωμένος πληθυσμός και οι απομονωμένοι πληθυσμοί μπορεί να είναι χρήσιμοι λόγω του δυναμικού τους να είναι εμπλουτισμένοι σε μοναδικές παραλλαγές [254]. Η μελέτη γενετικών νοσημάτων σε μία τέτοια κλειστή, γεωγραφικά «απομονωμένη» (geographic isolated) «δεξαμενή γονιδίων» (gene pool), επιτρέπει την ανίχνευση σπάνιων, ειδικών για πληθυσμούς (population specific), μεταλλαγών αλλά και την ανίχνευση μικρών διαφορών στη συχνότητα ορισμένων αλληλομόρφων σε σχέση με μεγαλύτερους και ανομοιογενείς πληθυσμούς, για παράδειγμα, στον πληθυσμό της ηπειρωτικής Ελλάδας. Πράγματι, δεδομένα από πολλές μελέτες τεκμηριώνουν ότι οι Κρητικοί παρουσιάζουν διαφορές και ιδιαιτερότητες συγκρινόμενοι με άλλους πληθυσμούς [255]. Οι γηγενείς

Κρητικοί παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά μετανάστευσης, γεγονός που παρέχει το μεγάλο βαθμό γενετικής ομοιογένειας του συγκεκριμένου πληθυσμού. Ο αποκαλούμενος «θόρυβος υποβάθρου» (background noise) που αποτελείται από όλους τους πιθανούς συνδυασμούς περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων που είναι παρόντες σε ένα μη ομοιογενή πληθυσμό, ελαχιστοποιείται σε ένα τέτοιο ομοιογενή πληθυσμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεδομένων των μικρών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων και της γενετικής δομής του υπό μελέτη πληθυσμού, δεν απαιτείται η εξέταση μεγάλου μεγέθους δείγματος και προφανώς δεν είναι και εφικτή σε μια περιορισμένη γεωγραφική περιοχή [256]. Επιπρόσθετα, λόγω της παρατεταμένης περιόδου γενετικής απομόνωσης και του μικρού ποσοστού «νόθευσης» του γονιδιώματος από εξωγενείς πηγές, έχει επιτελεσθεί σημαντική γενετική καθήλωση. Τα σίγουρα πλεονεκτήματα απομονωμένων πληθυσμών, όπως ο Κρητικός, συνίστανται σε ένα δυναμικά υψηλότερο επιπολασμό ορισμένων νόσων, καλές γενεαλογικές καταγραφές και ομοιόμορφες περιβαλλοντικές επιδράσεις [257].

Συνοπτικά, στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η γενετική συσχέτιση του γονιδίου *STAT4* (rs10181656) και του γονιδίου *CD226* (rs763361) με την ΨΑ αλλά όχι και με τη ΡΑ, στον ομοιογενή Κρητικό πληθυσμό, ενώ παρατηρήθηκε γενετική αλληλεπικάλυψη μεταξύ ΨΑ και ΡΑ για τον πολυμορφισμό rs34536443 του γονιδίου *TYK2*. Ενδιαφέρον, προκαλεί, ότι το υπό μελέτη αλληλόμορφο του *STAT4* είχε επίσης βρεθεί να έχει προστατευτικό ρόλο στην ΨΑ σε προηγούμενη μελέτη [201]. Σημαντικό επίσης εύρημα, θεωρείται η συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο *CD226* με την ΨΑ, η οποία δεν είχε ανιχνευθεί προηγουμένως σε άλλες γενετικές μελέτες [240].

Το γονίδιο *TYK2* είναι ένας γενετικός τόπος, ο οποίος έχει επιβεβαιωθεί ότι συσχετίζεται σε σημαντικά επίπεδα με τη ΡΑ και μάλιστα διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο σύμφωνα με αρκετές μελέτες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ήταν σύμφωνα με αυτά προηγούμενων μελετών. Το ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι το έλασσον αλληλόμορφο του υπό μελέτη πολυμορφισμού μειώνει τον κίνδυνο τόσο για την ανάπτυξη ΡΑ όσο και για την ανάπτυξη ΨΑ στον Ελληνικό πληθυσμό, διαδραματίζοντας προστατευτικό ρόλο. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα και θέλοντας να διερευνήσουμε την πιθανή λειτουργική συνέπεια αυτής της παραλλαγής, αναλύσαμε

την δομή της πρωτεΐνης κατασκευάζοντας το στερεοδομικό πρότυπό της. Η θέση της μετάλλαξης Pro1104Ala, στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης TYK2, μπορεί να επηρεάσει δομικά και δυναμικά στοιχεία του μορίου. Η εισαγωγή του αμινοξέος της αλανίνης που κατά κανόνα οδηγεί στη δημιουργία α–έλικας, και η αντικατάσταση του αμινοξέος της προλίνης που αποτρέπει τη δημιουργία α–έλικας, επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή αυτής της περιοχής, επάγοντας την επέκταση της α-έλικας στο συγκεκριμένο σημείο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (κατάλοιπα 1099-1113). Αυτή η αναδιαμόρφωση ενδεχομένως μεταβάλλει τις ιδιότητες αναδίπλωσης του μορίου καθώς και την δυναμική του, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε επηρεασμό της λειτουργικότητάς του.

Σε ότι αφορά στο γονίδιο *STAT4,* η ανάλυση που διεξήγαμε με προγράμματα βιοπληροφορικής, έδειξε ότι το έλασσον αλληλόμορφο G του πολυμορφισμού rs10181656, μπορεί να καταστρέψει μια πιθανή θέση πρόσδεσης του ετεροδιμερούς των μεταγραφικών παραγόντων PPARα / RXRα. Ο PPARα είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας που εκφράζεται στα μακροφάγα, στα κοκκιοκύτταρα και στα λεμφοκύτταρα [258][259] και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή αυτοάνοσων νοσημάτων ρυθμίζοντας την παραγωγή Th2 κυτταροκινών [260]. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι οι προσδέτες του PPARa μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ-κυττάρων ή την παραγωγή της IFN-γ από τα Τ κύτταρα που διεγείρονται από αντιγόνα [261]. Έτσι, μπορεί να προταθεί ότι το έλασσον αλληλόμορφο του rs10181656, το οποίο βρέθηκε ότι έχει αυξημένη συχνότητα στους υγιείς σε σχέση με τους ασθενείς με ΨΑ στον Κρητικό πληθυσμό, μπορεί να καταστείλει την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων μέσω της διαταραχής της πρόσδεσης του διμερούς PPARa / RXRa, διαδραματίζοντας επίσης προστατευτικό ρόλο.

Όπως προανέφερα, ο πολυμορφισμός στο γονίδιο *CD226,* έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με πλειάδα νοσημάτων και, για πρώτη φορά, παρουσιάζουμε τη συσχέτισή του και με την ΨΑ. Βασιζόμενοι λοιπόν στην λεπτομερή ανάλυση των υφιστάμενων τρισδιάστατων (3-D) μοντέλων αυτής της πρωτεΐνης [221][262] και αποσκοπώντας στο να διασαφηνίσουμε τον ρόλο αυτού του πολυμορφισμού, προτείνουμε ότι το κατάλοιπο σερίνης στη θέση #307 (Ser307) πιθανότατα εμπλέκεται σε πολικές αλληλεπιδράσεις,

που σχετίζονται με τα κοντινά φορτισμένα αμινοξέα ή με τις θέσεις φωσφορυλίωσης. Επηρεάζοντας τις εγγύς θέσεις φωσφορυλίωσης ή την αναγνώριση της υπομονάδας μιας πρωτεΐνης από κάποια άλλη, αυτή η μετάλλαξη θα μπορούσε να μεταβάλει τη σηματοδοτική ακολουθία.

Όπως σε όλες σχεδόν τις γενετικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε αυτοάνοσες παθήσεις, έτσι και στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση του πολυμορφισμού rs2476601 στον Κρητικό πληθυσμό, τόσο στην ΡΑ όσο και στην ΨΑ. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων 1858C/T του γονιδίου *PTPN22* δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών ρευματοειδούς αρθρίτιδας και υγιών ατόμων, ενώ βρέθηκε ότι το έλασσον αλληλόμορφο T ήταν πιο συχνό στους υγιείς απ' ότι στους ασθενείς με ΨΑ. Η διαφορά αυτή που παρατηρήθηκε δεν είναι ικανή να μας οδηγήσει σε συμπεράσματα, καθώς δεν έφτασε τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Η απουσία συσχέτισης του πιο ευρέως αναγνωρισμένου πολυμορφισμού προδιάθεσης για ΡΑ, στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να οφείλεται στο φαινόμενο της ευρείας διαφοροποίησης της συχνότητας του T αλληλομόρφου μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Έχει αποτυπωθεί σε αρκετές μελέτες στο παρελθόν διαβάθμιση στην συχνότητα αυτή, μεταξύ Βορρά και Νότου στην Ευρώπη. Αυτή η διαβάθμιση κυμαίνεται μεταξύ 15,5% στον Βορρά και 2,1% στο Νότο [209]. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2012, αναφέρθηκε ότι η συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου (MAF) ήταν μεταξύ 15,8% και 8,7% σε ασθενείς με νεανική ιδιοπαθή αρθρίτιδα και 11,6% με 7,8% σε υγιή άτομα [263]. Επιπροσθέτως, σε μία εργασία στον ελληνικό πληθυσμό αναφέρεται ότι η παρουσία του ελάσσονος αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs2476601 στην Ελλάδα είναι πολύ χαμηλή (3% στη ΡΑ, 5% στον ΣΕΛ και 2,7% στους υγιείς), συγκρινόμενη με τη συχνότητα σε βόρειους ή κεντρικούς Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ είναι παραπλήσια με τη συχνότητα στον πληθυσμό της Τουρκίας, που γεωγραφικά είναι κοντά στην Ελλάδα [264][212]. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη τη χαμηλή συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου στον Ελληνικό πληθυσμό (2,7-3%), θα χρειαζόταν να αναλυθούν πάνω από 5000 δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων ώστε να αποκαλυφθεί έστω και κάποια επίδραση μεγάλου μεγέθους σε αυτόν τον γενετικό τόπο. Συνοψίζοντας, ο γενετικός τόπος *PTPN22* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε αυτό το πλαίσιο, δεδομένου ότι η γενετική παραλλαγή που εξετάζεται

παρουσιάζεται με πολύ χαμηλή συχνότητα στον Ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς [228].

Όπως συνέβη με το γονίδιο *PTPN22*, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών, και στα υπόλοιπα τρία γονίδια της παρούσας μελέτης. Στα υγιή άτομα από την Ελλάδα έχει παρατηρηθεί χαμηλότερη τιμή στις συχνότητες ελάσσονος αλληλομόρφου (MAFs) των πολυμορφισμών των γονιδίων *PLCL2* (rs4535211), *CCL21* (rs2812378) και *REL* (rs13017599) σε σχέση με άλλες μελέτες όπως αυτή του Bowes [201], ένα εύρημα που σκιαγραφεί τον ρόλο ορισμένων υφιστάμενων, ειδικών για κάθε πληθυσμό, διαφορών στη συχνότητα αυτών των αλληλομόρφων.

Ένα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μελέτης όπως προαναφέραμε είναι η κοινή εθνική προέλευση των ασθενών και των υγιών ατόμων. Επομένως, τα αποτελέσματα είναι απίθανο να επηρεάζονται από μια πιθανή γενετική ετερογένεια του δείγματος. Μια αδυναμία της μελέτης ωστόσο, είναι το περιορισμένο μέγεθος του δείγματος, ειδικά για την ΨΑ. Η έλλειψη συμφωνίας μεταξύ των διάφορων μελετών που έχουν διεξαχθεί για την αποκάλυψη γενετικών τόπων που αυξάνουν την προδιάθεση για την ανάπτυξη ρευματοειδούς και ψωριασικής αρθρίτιδας ίσως οφείλεται στην έλλειψη δύναμης (power) των μεμονωμένων μελετών να εντοπίζουν ήπια μεγέθη επίδρασης που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν για τους περισσότερους γενετικούς τόπους. Αν και πολλοί εθνικοί πληθυσμοί μοιράζονται μεγάλο μέρος από τις γενετικές παραλλαγές που εντοπίστηκαν μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος, παρατηρήθηκε μια σημαντική μεταβλητότητα στη συχνότητα πολλών αλληλομόρφων. Τέλος, το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης διαφέρουν εν μέρει σε σχέση με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, κάνει εμφανές το πόσο σημαντική είναι η διενέργεια συγκριτικών μελετών, που να περιλαμβάνουν διαφορετικούς εθνικούς ή φυλετικούς πληθυσμούς, σε μια προσπάθεια να επιβεβαιωθεί η γενετική συσχέτιση που ανιχνεύεται.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα μας συνηγορούν υπέρ της συσχέτισης των πολυμορφισμών στα γονίδια *STAT4* και *CD226* με το νόσημα της ΨΑ και του πολυμορφισμού στο γονίδιο *TYK2* τόσο με την ρευματοειδή όσο και με την ψωριασική αρθρίτιδα. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά, βρέθηκε συσχέτιση της

ΨΑ με το γονίδιο *CD226*. Τα ερωτήματα της συγκεκριμένης μελέτης αφορούσαν το γενετικό υπόβαθρο και των δύο αυτοάνοσων νοσημάτων, το οποίο διερευνήθηκε στον ελληνικό πληθυσμό, αλλά και την πιθανή γενετική τους επικάλυψη. Ελέγχοντας τους ίδιους πολυμορφισμούς ταυτόχρονα και στα δύο νοσήματα, καταφέραμε να καλύψουμε τα παραπάνω ερωτήματα. Θέλοντας να πάμε ένα βήμα παρακάτω και να διερευνήσουμε πιθανές λειτουργικές συνέπειες των πολυμορφισμών αυτών, πραγματοποιήσαμε ανάλυση της αλληλουχίας του DNA της περιοχής του γονιδίου *STAT4* και βρήκαμε ότι διαταράσσεται η θέση πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Pax-4, PPAR/RXR και ZNF99. Επίσης μελετήσαμε την τρισδιάστατη δομή και την δυναμική του μορίου CD226 που φέρει το έλασσον αλληλόμορφο και ανακαλύψαμε ότι η σερίνη στην θέση 307 πιθανώς συμμετέχει σε πολικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν γειτονικά φορτισμένα κατάλοιπα ή θέσεις φωσφορυλίωσης. Τέλος, κατασκευάσαμε το στερεοδομικό πρότυπο της μεταλλαγμένης TYK2 και αναλύσαμε την δομή της. Καταλήξαμε στο ότι μια τέτοια αλλαγή πιθανόν να επηρεάζει την τοπική 3D δομή, την αναδίπλωση και τις παραμέτρους αλληλεπίδρασης του μορίου και επομένως να επάγει αλλαγές στην λειτουργικότητά του. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σημασία της γενετικής ανάλυσης στα σύνθετα νοσήματα και την ανεύρεση πλειοτροπικών γονιδίων που θα μπορούσαν να συσχετίζονται με διάφορα νοσήματα, και επίσης τονίζουν τη σημασία διενέργειας μελετών συσχέτισης σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς συνδυαζόμενες με περαιτέρω λειτουργική ανάλυση για την αποσαφήνιση αλλά και την ανεύρεση μηχανισμών της νόσου και πιθανά νέων θεραπευτικών στόχων και προσεγγίσεων.

5. *Βιβλιογραφία*

1. Robert L. Nussbaum, MD, FACP, FACMG, Roderick R. McInnes, CM, MD, PhD, FRS(C), FCAHS, FCCMG and Huntington F Willard, PhD. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 2016;8th Edition.
2. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. C R Biol. 2016;339:225-30.
3. Asad K., Ihsan K., Suleman S., Khan Z., Ghulam N. A Comprehensive Review on Various Aspects of Genetic Disorders. Journal of Biology and Life Science. 2015;6:2.
4. Emil Alexov. Advances in Human Biology: Combining Genetics and Molecular Biophysics to Pave the Way for Personalized Diagnostics and Medicine. Advances in Biology. 2014;Article ID 471836,16 pages.
5. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg. Principles of Medical Genetics. 1998;2nd Edition.
6. Motulsky Arno G. Genetics of complex diseases. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 2006;7:167-168.
7. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), {2017} World Wide Web URL: https://omim.org/
8. Mao Q, Ciotlos S, Zhang RY, Ball MP, Chin R, Carnevali P, et al. The whole genome sequences and experimentally phased haplotypes of over 100 personal genomes. Gigascience. 2016;5:42.
9. Tong P, Prendergast JG, Lohan AJ, Farrington SM, Cronin S, Friel N, et al. Sequencing and analysis of an Irish human genome. Genome Biol. 2010;11:R91.
10. Lilleoja R, Sarapik A, Reimann E, Reemann P, Jaakma Ü, Vasar E, et al. Sequencing and annotated analysis of an Estonian human genome. Gene. 2012;493:69-76.
11. Telenti A, Pierce LC, Biggs WH, di Iulio J, Wong EH, Fabani MM, et al. Deep sequencing of 10,000 human genomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:11901-11906.

12. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody M.C., Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409:860-921.
13. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.C., et al. The sequence of the human genome. Science. 2001;291:1304–1351.
14. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. Nature. 2003;426:789–796.
15. Bahassi el M, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. Mutagenesis. 2014;29:303-10.
16. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. Hum Genomics. 2011;5:577-622.
17. Chaitankar V, Karakülah G, Ratnapriya R, Giuste FO, Brooks MJ, Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. Prog Retin Eye Res. 2016;55:1-31.
18. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. Am J Hum Genet. 2012;90:7-24.
19. Visscher PM. Human Complex Trait Genetics in the 21st Century. Genetics. 2016;202:377-9.
20. Check E. Human genome: patchwork people. Nature. 2005;437:1084-1086.
21. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. PLoS Biol. 2007;5:e254.
22. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. BMC Med Genomics. 2015;8:37.
23. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet. 2006;7:85-97.
24. 1000 Genomes Project Consortium., Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. Nature. 2015;526:68-74.
25. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. Annu Rev Med. 2012;63:35-61.

26. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. Nature. 2008;452:872-6.
27. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. Nat Rev Genet. 2015;16:172-83.
28. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res. 2001;29:308-11.
29. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature. 2001;409:928-33.
30. Xing J, Watkins WS, Witherspoon DJ, Zhang Y, Guthery SL, Thara R, et al. Fine-scaled human genetic structure revealed by SNP microarrays. Genome Res. 2009;19:815-25.
31. Ku CS, Loy EY, Salim A, Pawitan Y, Chia KS. The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. J Hum Genet. 2010;55:403-15.
32. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet. 1999;22:231-8.
33. Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. Hum Mol Genet. 2015;24:R102-10.
34. Pollex RL, Hegele RA. Copy number variation in the human genome and its implications for cardiovascular disease. Circulation. 2007;115:3130-8.
35. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Nat Rev Genet. 2010;11:415-25.
36. A.S. Foulkes. Applied Statistical Genetics with R: For Population-based Association Studies, Use R. ISBN 978-0-387-89554-3. 2009
37. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. Lancet. 2005;366:1036-44.
38. Lehrach H, Wanker EE. Huntington's disease: from gene to potential therapy. Dialogues in Clinical Neuroscience. 2001;3:17-23.

39. Florez JC, Hirschhorn J, Altshuler D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003;4:257-291.
40. Sklar P. Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002;3:371-413.
41. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980;32:314-31.
42. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. BMC Genet. 2013;14:39.
43. Hancock DB, Scott WK. Population-based case-control association studies. Curr Protoc Hum Genet. 2012;Chapter 1:Unit1.17.
44. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. British Journal of Clinical Pharmacology. 2001;52:489-499.
45. Scherer A, Christensen GB. Concepts and relevance of genome-wide association studies. Sci Prog. 2016;99:59-67.
46. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. PLoS Comput Biol. 2012;8(12):e1002822.
47. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. Nat Rev Genet. 2005;6:95-108.
48. Goulielmos GN, Zervou MI, Myrthianou E, Burska A, Niewold TB, Ponchel F. Genetic data: The new challenge of personalized medicine, insights for rheumatoid arthritis patients. Gene. 2016;583:90-101.
49. Eleftheria Zeggini, Andrew Morris. Analysis of Complex Disease Association Studies: A Practical Guide. 2011;1st Edition
50. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science. 2002;296:2225-9.
51. Spencer CCA, Su Z, Donnelly P, Marchini J. Designing Genome-Wide Association Studies: Sample Size, Power, Imputation, and the Choice of Genotyping Chip. Storey JD, ed. PLoS Genetics. 2009;5:e1000477.

52. MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, te al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). Nucleic Acids Research. 2017;45:D896-D901.
53. Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. Science. 2005;308:421-4.
54. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature. 2009;461:747-53.
55. Blanco-Gómez A, Castillo-Lluva S, Del Mar Sáez-Freire M, Hontecillas-Prieto L, Mao JH, Castellanos-Martín A, et al. Missing heritability of complex diseases: Enlightenment by genetic variants from intermediate phenotypes. Bioessays. 2016;38:664-73.
56. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. Curr Opin Genet Dev. 2009;19:212-9.
57. Frayling TM. Genome-wide association studies: the good, the bad and the ugly. Clin Med (Lond). 2014;14:428-31.
58. Price AL, Spencer CC, Donnelly P. Progress and promise in understanding the genetic basis of common diseases. Proc Biol Sci. 2015;282:20151684.
59. McCarthy MI, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. Human Molecular Genetics. 2008;17:R156-R165.
60. Lee YH. Meta-Analysis of Genetic Association Studies. Annals of Laboratory Medicine. 2015;35:283-287.
61. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. Nat Genet. 2009;41:776-82.
62. Kingsmore SF, Lindquist IE, Mudge J, Gessler DD, Beavis WD. Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov. 2008;7:221-30.
63. Yanhui Fan, You-Qiang Song. Finding the Missing Heritability of Genome-wide Association Study Using Genotype Imputation. Matters. 2016; 10.19185/matters.201604000013

64. Eleazar Eskin. Discovering Genes Involved in Disease and the Mystery of Missing Heritability. Communications of the ACM. 2015;58: 1169246
65. Marian AJ. Elements of 'missing heritability'. Curr Opin Cardiol. 2012;27:197-201.
66. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. Rare Allele Hypotheses for Complex Diseases. Current opinion in genetics & development. 2009;19:212-219.
67. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. Nature genetics. 2008;40:695-701.
68. Sharma M, Krüger R, Gasser T. From genome-wide association studies to next-generation sequencing: lessons from the past and planning for the future. JAMA Neurol. 2014;71:5-6.
69. Hunt KA, Mistry V, Bockett NA, Ahmad T, Ban M, Barker JN, et al. Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability. Nature. 2013;498:232-5.
70. Nelson MR, Wegmann D, Ehm MG, Kessner D, St Jean P, Verzilli C, et al. An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. Science. 2012;337:100-4.
71. Saint Pierre A, Génin E. How important are rare variants in common disease? Brief Funct Genomics. 2014;13:353-61.
72. Diogo, D., Bastarache, L., Liao, K. P., Graham, R. R., Fulton, R. S., Greenberg, J. D., et al. TYK2 Protein-Coding Variants Protect against Rheumatoid Arthritis and Autoimmunity, with No Evidence of Major Pleiotropic Effects on Non-Autoimmune Complex Traits. PLoS ONE. 2015; 10:e0122271.
73. Chung SA, Shum AK. Rare Variants, Autoimmune Disease, and Arthritis. Current opinion in rheumatology. 2016;28:346-351.
74. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nat Rev Genet. 2008;9:356-69.
75. Ashley EA. Towards precision medicine. Nat Rev Genet. 2016;17:507-22.
76. Redekop WK, Mladsi D. The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. Value Health. 2013;16:S4-9.

77. Rogowski W, Payne K, Schnell-Inderst P, et al. Concepts of “personalization” in personalized medicine: implications for economic evaluation. PharmacoEconomics. 2015;33:49-59.
78. Bell, E. and Bird, E. Autoimmunity. Nature Reviews. 2005;7042:583.
79. Ahsan H. Selfie: Autoimmunity, boon or bane. J Immunoassay Immunochem. 2017;38:235-246.
80. DeLisa Fairweather. Autoimmune Disease: Mechanisms. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. 2007.
81. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. J Intern Med. 2015;278:369-95.
82. Benson RA, Brewer JM, Platt AM. Mechanisms of autoimmunity in human diseases: a critical review of current dogma. Curr Opin Rheumatol. 2014;26:197-203.
83. Simmonds MJ, Gough SC. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. Br Med Bull. 2005;71:93-113.
84. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. J Clin Invest. 2015;125:2228-33.
85. Bolon B. Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease. Toxicol Pathol. 2012;40:216-29.
86. Atassi MZ, Casali P. Molecular mechanisms of autoimmunity. Autoimmunity. 2008;41:123-32.
87. Anaya JM. Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). Autoimmun Rev. 2012;11:781-4.
88. Gary Firestein Ralph Budd Sherine E Gabriel Iain B McInnes James O'Dell. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10th Edition
89. Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition
90. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016;388:2023-2038.
91. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2010;376:1094-108.

92. Silman AJ, Pearson JE, Pincus T, et al. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2002;4:S265–72.
93. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. Br J Rheumatol. 1993;32:903-7.
94. Catherine A. Olubummo. Rheumatoid arthritis A chronic inflammation. 2009.
95. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GM, Gentileschi S, Tripoli A, Tani C, et al. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2016;34:793-801.
96. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes . Caspian Journal of Internal Medicine. 2011;2:161-170.
97. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24.
98. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010;62:2569-81.
99. Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, Valentini E, Tani C, Alunno A. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2015;33:551-8.
100. Alghasham A, Rasheed Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: Progress and promises. Autoimmunity. 2014;47:77-94.
101. Barhamain, A. S., Magliah, R. F., Shaheen, M. H., Munassar, S. F., Falemban, A. M., Alshareef, M. M.,et al. The journey of rheumatoid arthritis patients: a review of reported lag times from the onset of symptoms. Open Access Rheumatology : Research and Reviews. 2017;9:139–150.
102. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. Nat Rev Rheumatol. 2012;8:573-86.
103. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 2007;370:1861-74.
104. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may

trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. Arthritis Rheum. 2006;54:38-46.

105. Li S, Yu Y, Yue Y, Zhang Z, Su K. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. Journal of clinical & cellular immunology. 2013;4:174.

106. Masi AT. Sex hormones and rheumatoid arthritis: cause or effect relationships in a complex pathophysiology? Clin Exp Rheumatol. 1995;13:227-40.

107. Lundsröm E, Källberg H, Alfredsson L, Klareskog L, Padyukov L. Gene-environment interaction between DRB1 shared epitope and smoking regarding risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis - all alleles are important. Arthritis and rheumatism. 2009;60:1597-1603.

108. Sokolove, J., Bromberg, R., Deane, K. D., Lahey, L. J., Derber, L. A., Chandra, P. E., et al. Autoantibody Epitope Spreading in the Pre-Clinical Phase Predicts Progression to Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE. 2012;7:e35296.

109. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. Biomed Pharmacother. 2017;92:615-633.

110. Frank-Bertoncelj M, Klein K, Gay S. Interplay between genetic and epigenetic mechanisms in rheumatoid arthritis. Epigenomics. 2017;9:493-504.

111. Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. Semin Immunopathol. 2017;39:409-419.

112. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2013;9:141-53.

113. Veale DJ, Orr C, Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. Semin Immunopathol. 2017;39:343-354.

114. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol. 2007;7:429-42.

115. van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol. 1995;34:74-8.

116. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2011;365:2205-19.

117. Otero M, Goldring MB. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. Arthritis Research & Therapy. 2007;9:220.

118. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 1996;14:397-440.

119. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. Arthritis Research & Therapy. 2007;9:202.

120. van de Sande MG, de Hair MJ, van der Leij C, Klarenbeek PL, Bos WH, Smith MD, et al. Different stages of rheumatoid arthritis: features of the synovium in the preclinical phase. Ann Rheum Dis. 2011;70:772-7.

121. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. Br J Rheumatol. 1993;32:903-7.

122. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. Arthritis Rheum. 2000;43:30-7.

123. Song X, Lin Q. Genomics, transcriptomics and proteomics to elucidate the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2017;37:1257-1265.

124. Viatte S, Barton A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. Seminars in Immunopathology. 2017;39:395-408.

125. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. Journal of Clinical Investigation. 1976;57:1148-1157.

126. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 1978;298:869–871.

127. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1987;30:1205-13.

128. Morgan AW, Haroon-Rashid L, Martin SG, Gooi HC, Worthington J, Thomson W, et al. The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK Caucasian cohort. Arthritis Rheum. 2008;58:1275-83.

129. Raychaudhuri, S., Sandor, C., Stahl, E. A., Freudenberg, J., Lee, H.-S., Jia, X., et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. Nature Genetics. 2012;44:291–296.

130. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet. 2004;36:337–8.

131. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiro S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2003;34:395-402.

132. Plenge, R. M., Padyukov, L., Remmers, E. F., Purcell, S., Lee, A. T., Karlson, E. W., et al. Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. American Journal of Human Genetics. 2005;77:1044–1060.

133. Zhu, H., Xia, W., Mo, X.-B., Lin, X., Qiu, Y.-H., Yi, N.-J., et al. Gene-Based Genome-Wide Association Analysis in European and Asian Populations Identified Novel Genes for Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE. 2016;11:e0167212.

134. Govind, N., Choudhury, A., Hodkinson, B., Ickinger, C., Frost, J., Lee, A., et al. Immunochip Identifies Novel, and Replicates Known, Genetic Risk Loci for Rheumatoid Arthritis in Black South Africans. Molecular Medicine. 2014;20:341–349.

135. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature. 2014;506:376–81.

136. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2012;44:1336–40.

137. Gisela Orozco Sebastien Viatte John Bowes Paul Martin Anthony G. Wilson Ann W. Morgan et al. Novel Rheumatoid Arthritis Susceptibility Locus at 22q12 Identified in an Extended UK Genome-Wide Association Study. Arthritis and Rheumatology. 2014;66:24-30.

138. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis–a genomewide study. N Engl J Med. 2007;357:1199–209.

139. Martínez A, Varadé J, Márquez A, Cénit MC, Espino L, Perdigones N, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. Arthritis Rheum. 2008;58:2598–602.

140. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2008;40:1216–23.

141. Barton, A., Eyre, S., Ke, X., Hinks, A., Bowes, J., Flynn, E., et al. Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. Hum. Mol. Genet. 2009;18:2518–2522.

142. Orozco, G., Hinks, A., Eyre, S., Ke, X., Gibbons, L.J., Bowes, J. Combined effects of three independent SNPs greatly increase the risk estimate for RA at 6q23. Hum. Mol. Genet. 2009;18:2693–2699.

143. Cobb JE, Plant D, Flynn E, Tadjeddine M, Dieudé P, Cornélis F, et al. Identification of the tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2 as a rheumatoid arthritis susceptibility locus in europeans. PLoS One. 2013;8:e66456.

144. Stahl, E. A., Raychaudhuri, S., Remmers, E. F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B. P., et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nature Genetics. 2010;42:508–514.

145. Lee YH, Bae SC. Association between susceptibility to rheumatoid arthritis and PADI4 polymorphisms: a meta-analysis. Clin Rheumatol. 2016;35:961-71.

146. Oki, M., Watanabe, N., Owada, T., Oya, Y., Ikeda, K., Saito, Y., et al. A Functional Polymorphism in B and T Lymphocyte Attenuator Is Associated with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. Clinical and Developmental Immunology. 2011:2011:305656.

147. Orozco, G., Eyre, S., Hinks, A., Ke, X., Wellcome Trust Case Control consortium YEAR Consortium, Wilson, A. G., et al. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. Annals of the Rheumatic Diseases. 2010;69:813–816.

148. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Associations between TRAF1-C5 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Immunol Invest. 2014;43:97-112.

149. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2007;357:977–86.

150. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. Ann Rheum Dis. 2005;64:ii14–7.

151. Alibert JL (ed.): Précis théorique et pratique sur les maladies de la peau. Paris: Caille et Ravier;1818.

152. Nomenclature, Definition and Classification of Rheumatic Diseases. Canadian Medical Association Journal. 1964;90:1276-1277.

153. Gladman DD. Recent advances in understanding and managing psoriatic arthritis. F1000Research. 2016;5:2670.

154. Gladman D (ed.): Psoriatic arthritis. Berlin: Springer-Verlag; 2005.

155. Coates LC, Helliwell PS. Psoriatic arthritis: state of the art review. Clin Med (Lond). 2017;17:65-70.

156. Peluso R, Iervolino S, Vitiello M, Bruner V, Lupoli G, Di Minno MND. Extra-articular manifestations in psoriatic arthritispatients. ClinRheumatol. 2015;34:745–53.

157. Moll J, Wright V. Psoriatic arthritis. SeminArthritisRheum. 1973;3:55–78.

158. Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. Psoriatic Arthritis. N Engl J Med. 2017;376:2095-6.

159. Richard MA, Paul C. Risk factors, diagnosis and management of psoriatic arthritis: systematic literature reviews and expert opinion of a panel of dermatologists. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014;28:1-2.

160. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. Arthritis Rheum. 2006;54:2665–73.

161. Kerschbaumer A, Fenzl KH, Erlacher L, Aletaha D. An overview of psoriatic arthritis – epidemiology, clinical features, pathophysiology and novel treatment targets. Wiener Klinische Wochenschrift. 2016;128:791-795.

162. Coates LC, FitzGerald O, Helliwell PS, Paul C. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same? Semin Arthritis Rheum. 2016;46:291-304.

163. Braun J. New targets in psoriatic arthritis. Rheumatology (Oxford). 2016;55:ii30-ii37.

164. Mumtaz A, Gallagher P, Kirby B, Waxman R, Coates LC, Veale J D, et al. Development of a preliminary composite disease activity index in psoriatic arthritis. Ann Rheum Dis. 2011;70:272-7.

165. FitzGerald O, Haroon M, Giles JT, Winchester R. Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. Arthritis Research & Therapy. 2015;17:115.

166. Barnas JL, RitchlinCT. Etiology and Pathogenesis of PsoriaticArthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2015;41:643–63.

167. Eder L, Chandran V, Pellet F, Shanmugarajah S, Rosen CF, Bull SB, et al. Human leucocyte antigen risk alleles for psoriatic arthritis among patients with psoriasis. Ann RheumDis. 2012;71:50–5.

168. CurranS A, FitzGerald OM, Costello PJ, Selby JM, Kane DJ, Bresnihan B, et al. Nucleotide sequencing of psoriatic arthritis tissue before and during methotrexate administration reveals a complex inflammatory T cell infiltrate with very few clones exhibiting features that suggest they drive the inflammatory process by recognizing aut. J Immunol. 2004;172:1935–44.

169. McGonagle D, Gibbon W, Emery P. Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. Lancet. 1998;352:1137–40.

170. Benjamin M, Toumi H, Suzuki D, Redman S, Emery P, McGonagle D. Microdamage and altered vascularity at the enthesis-bone interface provides an anatomic explanation for bone involvement in the HLA-B27-associated spondylarthritides and allied disorders. Arthritis Rheum. 2007;56:224–33.

171. Hsieh J, Kadavath S, Efthimiou P. Can traumatic injury trigger psoriatic arthritis? A review of the literature. Clin Rheumatol. 2014;33:601-8.

172. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. Nat Commun. 2014;5:5621.

173. Tassiulas I, Duncan SR, Centola M, Theofilopoulos AN, Boumpas DT. Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis. Hum Immunol. 1999;60:479–91.

174. DolcinoM, Lunardi C, Ottria A, Tinazzi E, Patuzzo G, Puccetti A. Crossreactive autoantibodies directed against cutaneous and joint antigens are present in psoriatic arthritis. PLoS One. 2014;9:e115424.

175. Sakkas LI, Bogdanos DP. Are psoriasis and psoriatic arthritis the same disease? The IL-23/IL-17 axis data. Autoimmun Rev. 2017;16:10-15.

176. Wright V. Psoriasis and arthritis. Ann Rheum Dis. 1956;15:348.

177. Chandran V, Schentag CT, Brockbank JE, Pellett FJ, Shanmugarajah S, Toloza SMA, et al. Familial aggregation of psoriatic arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2009;68:664-667.

178. Pedersen OB, Svendsen AJ, Ejstrup L, Skytthe A, Junker P: On the heritability of psoriatic arthritis. Disease concordance among monozygotic and dizygotic twins. Annals of the Rheumatic Diseases. 2008;67:1417-1421.

179. Bowes J, Budu-Aggrey A, Huffmeier U, Uebe S, Steel K, Hebert HL, et al. Dense genotyping of immune-related susceptibility loci reveals new insights into the genetics of psoriatic arthritis. Nat Commun. 2015;6:6046.

180. Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C., Knight, J., Weale, M. E., Allen, M. H., et al. Genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. Nature Genetics. 2010;42:985–990.

181. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. Nat Genet. 2012;44:1341–8.

182. Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L.C., Duan, S., Gardner, J., et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. PLoS Genet. 2008;4:e1000041.

183. Hu¨ffmeier, U., Uebe, S., Ekici, A.B., Bowes, J., Giardina, E., Korendowych, E., et al. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. Nat. Genet. 2010;42:996–999.

184. Ellinghaus, E., Stuart, P.E., Ellinghaus, D., Nair, R.P., Debrus, S., Raelson, J.V., et al. Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies susceptibility locus at REL. J. Invest. Dermatol. 2012;132:1133–1140.

185. Julià A, Tortosa R, Hernanz JM, Cañete JD, Fonseca E, Ferrándiz C, et al. Risk variants for psoriasis vulgaris in a large case-control collection and association with clinical subphenotypes. Hum Mol Genet. 2012;21:4549-57.

186. Bowes, J., Ashcroft, J., Dand, N., Jalali-najafabadi, F., Bellou, E., Ho, P., et al. Cross-phenotype association mapping of the MHC identifies genetic variants that differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2017;76:1774–1779.

187. Stuart, P. E., Nair, R. P., Ellinghaus, E., Ding, J., Tejasvi, T., Gudjonsson, J. E., et al. Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. Nature Genetics. 2010;42:1000–1004.

188. Bowes, J., Loehr, S., Budu-Aggrey, A., Uebe, S., Bruce, I. N., Feletar, M., et al. PTPN22 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis but not psoriasis: evidence for a further PsA-specific risk locus. Annals of the Rheumatic Diseases. 2015;74:1882–1885.

189. Stuart, P. E., Nair, R. P., Tsoi, L. C., Tejasvi, T., Das, S., Kang, H. M., et al. Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture. American Journal of Human Genetics. 2015;97:816–836.

190. Sivakumaran, S., Agakov, F., Theodoratou, E., Prendergast, J. G., Zgaga, L., Manolio, T., et al. Abundant Pleiotropy in Human Complex Diseases and Traits. American Journal of Human Genetics. 2011;89:607–618.

191. He, X., and Zhang, J. Toward a molecular understanding of pleiotropy. Genetics. 2006;173:1885–1891.

192. Karasik, D., and Kiel, D.P. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. Bone. 2010;46:1226–1237.

193. Gratten J, Visscher PM. Genetic pleiotropy in complex traits and diseases: implications for genomic medicine. Genome Medicine. 2016;8:78.

194. Parkes M, Cortes A, van Heel DA, Brown MA. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. Nat Rev Genet. 2013;14:661–73.

195. Sharp RC, Abdulrahim M, Naser ES, Naser SA. Genetic Variations of PTPN2 and PTPN22: Role in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Crohn's Disease. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2015;5:95.

196. Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., et al. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. Nature Genetics. 2016;48:510–518.

197. Gaffen, S. L., Jain, R., Garg, A. V. & Cua, D. J. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. Nat. Rev. Immunol. 2014;14:585–600.

198. Onengut-Gumuscu, S., Chen, W.-M., Burren, O., Cooper, N. J., Quinlan, A. R., Mychaleckyj, J. C., et al. Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. Nature Genetics. 2015;47:381–386.

199. Eyre S, Orozco G, Worthington J. The genetics revolution in rheumatology: large scale genomic arrays and genetic mapping. Nat Rev Rheumatol. 2017;13:421-432.

200. Price AL, Spencer CCA, Donnelly P. Progress and promise in understanding the genetic basis of common diseases. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015;282:20151684.

201. Bowes J, Ho P, Flynn EF, Marzo-Ortega H, Coates LC, et al. Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. Ann Rheum Dis 2012;71:1350–4.

202. Jani M, Barton A, Ho P. Pharmacogenetics of treatment response in psoriatic arthritis. Curr Rheumatol Rep. 2015;17:44.

203. Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Flynn, E., Martin, P., Wilson, A. G., et al. Overlapping genetic susceptibility variants between three autoimmune disorders: rheumatoid arthritis, type 1 diabetes and coeliac disease. Arthritis Research & Therapy. 2010;12:R175.

204. Hinks, A., Cobb, J., Sudman, M., Eyre, S., Martin, P., Flynn, E., et al. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility loci in juvenile idiopathic arthritis confirms high degree of overlap. Annals of the Rheumatic Diseases. 2012;71:1117–1121.

205. Ho, P. Y. P. C., Barton, A., Worthington, J., Plant, D., Griffiths, C. E. M., Young, H. S., et al. Investigating the role of the HLA-Cw*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2008;67:677–682.

206. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. Arthritis Rheum. 2005;52:1694–9.

207. Butt C, Peddle L, Greenwood C, Hamilton S, Gladman D, Rahman P. Association of functional variants of PTPN22 and tp53 in psoriatic arthritis: a case-control study. Arthritis Research & Therapy. 2006;8:R27.

208. Hüffmeier U, Reis A, Steffens M, Lascorz J, Böhm B, Lohmann J, et al. Male restricted genetic association of variant R620W in PTPN22 with psoriatic arthritis. J Invest Dermatol. 2006;126:932-5.

209. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. Annu Rev Immunol. 2009;27:363–91.

210. Gutierrez-Arcelus M, Rich SS, Raychaudhuri S. Autoimmune diseases — connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. Nature reviews Genetics. 2016;17:160-174.

211. Kurreeman FA, Goulielmos GN, Alizadeh BZ, Rueda B, Houwing- Duistermaat J, Sanchez E, et al. The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. Ann Rheum Dis. 2010;69:696–9.

212. Eliopoulos, E., Zervou, M., Andreou, A., Dimopoulou, K., Cosmidis, N., Voloudakis, G., et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. Lupus. 2011;20:501–506.

213. Skórka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, Nauman J, Ploski R. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish

population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;62:679-82.

214. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 1990;215:403-410.

215. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

216. Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2016. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY.

217. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. Stat Med 2002;21:35–50.

218. Gauderman WJ. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. Am J Epidemiol 2002;155:478–84.

219. Gauderman WJ. Candidate gene association analysis for a quantitative trait, using parent-offspring trios. Genet Epidemiol 2003;25:327–38.

220. Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies 2006 (http://biostats.usc.edu/software). Accessed 16 June 2016.

221. Liu J, Qian X, Chen Z, Xu X, Gao F, Zhang S, et al. Crystal Structure of Cell Adhesion Molecule Nectin-2/CD112 and Its Binding to Immune Receptor DNAM-1/CD226. J Immunol 2012;188:5511–20.

222. Zervou MI, Sidiropoulos P, Petraki E, Vazgiourakis V, Krasoudaki E, Raptopoulou A, et al. Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population. Hum Immunol. 2008;69:567–71.

223. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. Hum Immunol. 2009;70:738-41.

224. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Boumpas DT, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. A CD40 and an NCOA5 gene polymorphism confer susceptibility to psoriasis in a Southern European population: a case-control study. Hum Immunol. 2011;72:761-5.

225. Zervou MI, Vazgiourakis VM, Yilmaz N, Kontaki E, Trouw LA, Toes RE, Bicakcigil M, Boumpas DT, Yavuz S, Goulielmos GN. TRAF1/C5, eNOS, C1q, but not STAT4 and PTPN22 gene polymorphisms are associated with genetic

susceptibility to systemic lupus erythematosus in Turkey. Hum Immunol. 2011;72:1210-3.

226. Vazgiourakis VM, Zervou MI, Eliopoulos E, Sharma S, Sidiropoulos P, Franek BS, Myrthianou E, Melissourgaki M, Niewold TB, Boumpas DT, Goulielmos GN. Implication of VEGFR2 in systemic lupus erythematosus: a combined genetic and structural biological approach. Clin Exp Rheumatol. 2013;31:97-102.

227. Dimopoulou DG, Zervou MI, Trachana M, Myrthianou E, Pratsidou-Gertsi P, Kardassis D, Garyfallos A, et al. Investigation of juvenile idiopathic arthritis susceptibility loci: results from a Greek population. Hum Immunol. 2013;74:1194-8.

228. Goulielmos, G. N., Chiaroni-Clarke, R. C., Dimopoulou, D. G., Zervou, M. I., Trachana, M., Pratsidou-Gertsi, P., et al. Association of juvenile idiopathic arthritis with PTPN22 rs2476601 is specific to females in a Greek population. Pediatric Rheumatology Online Journal. 2016;14:25.

229. Goulielmos GN, Zervou MI, Vazgiourakis VM, Ghodke-Puranik Y, Garyfallos A, Niewold TB. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. Gene. 2018;pii: S0378-1119(18)30530-4.

230. Li G, Zhao J, Li B, Ma J, Zhao Q, Wang X, et al. Associations between CCL21 gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatol Int. 2017;37:1673-1681.

231. Farragher, T. M., Plant, D., Flynn, E., Eyre, S., Bunn, D., Thomson, W., et al. Association of a rheumatoid arthritis susceptibility variant at the CCL21 locus with premature mortality in inflammatory polyarthritis patients. Arthritis Care & Research. 2010;62:676–682.

232. Sundqvist J, Falconer H, Seddighzadeh M, Vodolazkaia A, Fassbender A, Kyama C, et al. Endometriosis and autoimmune disease: association of susceptibility to moderate/severe endometriosis with CCL21 and HLA-DRB1. Fertil Steril. 2011;95:437-40.

233. Warren RB, Smith RL, Flynn E, Bowes J; UKRAG Consortium., Eyre S, et al. A systematic investigation of confirmed autoimmune loci in early-onset psoriasis reveals an association with IL2/IL21. Br J Dermatol. 2011;164:660-4.

234. Takenaka, K., Fukami, K., Otsuki, M., Nakamura, Y., Kataoka, Y., Wada, M., et al. Role of Phospholipase C-L2, a Novel Phospholipase C-Like Protein That Lacks

Lipase Activity, in B-Cell Receptor Signaling. Molecular and Cellular Biology. 2003;23:7329–7338.

235. Gilmore TD, Gerondakis S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. Genes & Cancer. 2011;2:695-711.

236. Cho JH, Brant SR. Recent Insights Into the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 2011;140:1704-1712.

237. Lars Rogge, Daniele D'Ambrosio, Mauro Biffi, Giuseppe Penna, Lisa J. Minetti, David H. Presky, et al. The Role of Stat4 in Species-Specific Regulation of Th Cell Development by Type I IFNs. J Immunol. 1998;161:6567-6574

238. Zervou MI, Mamoulakis D, Panierakis C, Boumpas DT, Goulielmos GN. STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? Hum Immunol. 2008;69:647–50.

239. Wagner, A. K., Kadri, N., Snäll, J., Brodin, P., Gilfillan, S., Colonna, M, et al. Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education. Nature Communications. 2017;8:15627.

240. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune ndiseases. Genes Immun. 2009;10:5–10.

241. Reinards TH, Albers HM, Brinkman DM, Kamphuis SS, van Rossum MA, Girschick HJ, et al. CD226 (DNAM-1) is associated with susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis. 2015;74:2193–8.

242. Qiu ZX, Zhang K, Qiu XS, Zhou M, Li WM. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases: a meta-analysis. Hum Immunol. 2013;74:249-55.

243. Douroudis K, Kingo K, Silm H, Reimann E, Traks T, Vasar E, et al. The CD226 Gly307Ser gene polymorphism is associated with severity of psoriasis. J Dermatol Sci. 2010;58:160-1.

244. Tokumasa N, Suto A, Kagami S, Furuta S, Hirose K, Watanabe N, et al. Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN-gamma production and the induction of Th1 cell differentiation. Blood. 2007;110:553–60.

245. Ban, M., Goris, A., Lorentzen, Å. R., Baker, A., Mihalova, T., Ingram, G., et al. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. European Journal of Human Genetics. 2009;17:1309–1313.

246. Peluso C, Christofolini DM, Goldman CS, Mafra FA, Cavalcanti V, Barbosa CP, et al. TYK2 rs34536443 polymorphism is associated with a decreased susceptibility to endometriosis-related infertility. Hum Immunol. 2013;74:93-7.

247. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? FEBS Lett. 2011;585:3689-98.

248. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. Arthritis Rheum. 2005;52:1694–9.

249. Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, et al. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 2005;52:4039–43.

250. Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, Cáliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2005;52:219–24.

251. Vandiedonck C, Capdevielle C, Giraud M, Krumeich S, Jais JP, Eymard B, et al. Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. Ann Neurol. 2006;59:404–7.

252. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Hachulla E, Diot E, et al. The PTPN22 620W allele confers susceptibility to systemic sclerosis: findings of a large case control study of European Caucasians and a meta-analysis. Arthritis Rheum. 2008;58:2183–8.

253. Spanaki C, Plaitakis A. Bilineal transmission of Parkinson disease on Crete suggests a complex inheritance. Neurology. 2004;62:815-817.

254. Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of population isolates for mapping complex traits. Nat Rev Genet. 2000;1:182-190.

255. Arnaiz-Villena A, Iliakis P, et al. The origin of Cretan populations as determined by characterization of HLA alleles. Tissue Antigens. 1999;53:213-226.

256. Heutink P, Oostra BA. Gene finding in genetically isolated populations. Hum Mol Genet. 2002;11:2507-2515.

257. Peltonen L, Jalanko A, Varilo T. Molecular genetics of the Finnish disease heritage. Hum Mol Genet. 1999;8:1913-1923.

258. Jones DC, Ding X, Daynes RA. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. J Biol Chem 2002;277:6838–45.

259. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:7355–9.

260. Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. Mol Cells 2012;33:217–22.

261. Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. J Immunol 2002;168:2795–802.

262. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, et al. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. J Exp Med 2003;198:1829–39.

263. Lee YH, Bae S-C, Song GG. The association between the functional PTPN22 1858 C/T and MIF 2173 C/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: a meta-analysis. Inflamm Res. 2012;61:411–415.

264. Zervou MI, Vazgiourakis V, Yilmaz N, Kontaki E, Trouw LA, Bicakcigi M, et al. TRAF1/C5, eNOS, C1q, but not STAT4 and PTPN22 gene polymorphisms are associated with genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Turkey. Hum Immunol. 2011;72:1210–1213.

Πρωτότυπη δημοσίευση

Scandinavian Journal of Rheumatology

ISSN: 0300-9742 (Print) 1502-7732 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/irhe20

Investigation of the genetic overlap between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in a Greek population

E Myrthianou, MI Zervou, A Budu-Aggrey, E Eliopoulos, D Kardassis, DT Boumpas, N Kougkas, A Barton, P Sidiropoulos & GN Goulielmos

To cite this article: E Myrthianou, MI Zervou, A Budu-Aggrey, E Eliopoulos, D Kardassis, DT Boumpas, N Kougkas, A Barton, P Sidiropoulos & GN Goulielmos (2017) Investigation of the genetic overlap between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in a Greek population, Scandinavian Journal of Rheumatology, 46:3, 180-186, DOI: 10.1080/03009742.2016.1199734

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/03009742.2016.1199734

Published online: 20 Jul 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 62

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 1 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=irhe20

Download by: [176.92.32.104] **Date:** 02 May 2017, At: 07:49

Investigation of the genetic overlap between rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis in a Greek population

E Myrthianou[1], MI Zervou[1], A Budu-Aggrey[2,3], E Eliopoulos[4], D Kardassis[5,6], DT Boumpas[6,7], N Kougkas[8], A Barton[2,3,9], P Sidiropoulos[8], GN Goulielmos[1]

[1]Laboratory of Molecular Medicine and Human Genetics, Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece
[2]Arthritis Research UK Centre for Genetics and Genomics, Centre for Musculoskeletal Research, Institute for Inflammation and Repair, Manchester Academic Health Science Centre, The University of Manchester, Manchester, UK
[3]NIHR Manchester Musculoskeletal Biomedical Research Unit, Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK
[4]Laboratory of Genetics, Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece
[5]Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Crete and Institute of Molecular Biology and Biotechnology of Crete, Heraklion, Greece
[6]Institute of Molecular Biology and Biotechnology, FORTH, Heraklion, Crete, Greece
[7]Faculty of Medicine, University of Athens, Athens, Greece
[8]Department of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece
[9]The Kellgren Centre for Rheumatology, Central Manchester Foundation Trust, NIHR Manchester Biomedical Research Centre, Manchester, UK

Objectives: Several rheumatoid arthritis (RA) susceptibility loci have also been found to be associated with psoriatic arthritis (PsA), demonstrating that there is a degree of genetic overlap between various autoimmune diseases. We sought to investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) mapping to previously reported RA and/or PsA susceptibility loci, including *PLCL2, CCL21, REL, STAT4, CD226, PTPN22*, and *TYK2*, are associated with risk for the two diseases in a genetically homogeneous Greek population.
Method: This study included 392 RA patients, 126 PsA patients, and 521 healthy age- and sex-matched controls from Greece. Genotyping of the SNPs was performed with Taqman primer/probe sets. Bioinformatic analysis was performed using BlastP, PyMOL, and Maestro and Desmond.
Results: A significant association was detected between the GC genotype of rs34536443 (*TYK2*) in both the PsA and RA cohorts. The C allele of this SNP was associated with PsA only. Evidence for association with PsA was also found for the GG genotype and G allele of the rs10181656 SNP of *STAT4*. The TC genotype of the rs763361 SNP of *CD226* was associated with PsA only.
Conclusions: Genetic overlap between PsA and RA was detected for the rs34536443 SNP of the *TYK2* gene within a Greek population. An association of *STAT4* (rs10181656) with PsA was confirmed whereas *CD226* (rs763361) was associated with PsA but not with RA, in contrast to previous reports. The different findings of this study compared to previous ones highlights the importance of comparative studies that include various ethnic or racial populations.

Autoimmune diseases affect approximately 5% of the human population; however, the genes and mechanisms involved still remain obscure. There is accumulating evidence that common genetic factors might predispose to multiple autoimmune disorders, thus indicating the pleiotropic effect of these gene polymorphisms. Such variants are by definition known as primary causal risk factors. In this framework, it has been documented that common variants of *PTPN22* (1–7), *CTLA-4* (8–12), *STAT4* (13–16), *TRAF1/C5* (17, 18), and *CD40* (19–22) are associated with different autoimmune disorders.

In recent years, a large number of novel genes associated with rheumatoid arthritis (RA) have been identified (23), especially with the use of the Immunochip, which has brought the number of RA-susceptibility loci in Caucasians to 48 (45 non-*HLA* loci plus three *HLA* loci) (24) and in all populations to 101 (25). RA is a systemic multifactorial disease that results from a complex interplay between genetic and environmental factors (26). The serum of most RA patients contains various

George N. Goulielmos, Laboratory of Molecular Medicine and Human Genetics, School of Medicine, University of Crete, Voutes, 715 00 Heraklion, Crete, Greece.
E-mail: goulielmos@med.uoc.gr

Accepted 6 June 2016

© 2017 Informa Healthcare on license from Scandinavian Rheumatology Research Foundation

DOI: 10.1080/03009742.2016.1199734

autoantibodies, such as rheumatoid factor (RF) or anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs), the presence of which constitutes one of the new classification criteria for RA (27).

The clinical features of RA resemble those of other autoimmune diseases, especially that of psoriatic arthritis (PsA), an inflammatory arthritis that is associated with psoriasis (PS). For example, both diseases are characterized by the occurrence of an inflammatory arthritis in peripheral synovial joints. Patients also respond to similar therapies including methotrexate and anti-tumour necrosis factor biologic treatment (28). This observation suggests a possible overlap in the genetic susceptibility between the two diseases. This has been supported by previous studies that have reported a degree of genetic background that is shared between RA and PsA (29). PsA is a seronegative chronic inflammatory joint disease with prevalence rates ranging between 0.3% and 1% worldwide (30). It is interesting to note that 14% of a UK psoriasis cohort has been found to have coexisting PsA in a previous study (31), while 34.85% of a Greek PS cohort in a separate study was found to have PsA (22). The spectrum of PsA symptoms includes inflammatory changes in attachments of articular capsules, tendons, and ligaments to bone surface (32).

Several candidate gene studies have been carried out in PsA, reporting associations with risk loci such as *RUNX3, IL23A*, and *TNIP1* (33). Furthermore, a strong correlation between an increased risk of PsA- and RA-predisposing genes has been identified (29). To date, only one genome-wide association study (GWAS) has been published that has focused solely on PsA (34). However, use of the Immunochip has identified novel genome-wide significant PsA susceptibility loci, including *PTPN22* (rs2476601) (35).

As genetic RA-risk factors tend to overlap with PsA (29, 36), the current study was undertaken to investigate the association of both diseases with suggestive or confirmed RA- and/or PsA-risk genes as well as others that play a key role in the pathogenesis of multiple autoimmune diseases. This study focused on the genetic homogeneous population of the island of Crete (0.65 million), a population sharing a common genetic and cultural background, showing low migration rates and characterized by good genealogical records and uniform environmental influences.

Method

Patient population and study design

In this case–control association study, 392 RA patients and 126 PsA patients followed in the Department of Rheumatology, University Hospital of Heraklion were included. Only RA patients who met the 2010 American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) RA classification criteria (37) and PsA patients who fulfilled the CASPAR criteria (38) and also gave their informed consent were eligible for the study. A total of 521 unrelated, age- and ethnically matched healthy volunteers from the Department of Transfusion Medicine of the University Hospital of Crete served as controls. The study was performed in the Laboratory of Molecular Medicine and Human Genetics of the Medical School of Crete, after obtaining the approval of the research committee of the University Hospital of Heraklion.

Analysis of gene polymorphisms

A panel of single nucleotide polymorphisms (SNPs) mapping to seven previously analysed RA and/or PsA susceptibility loci were selected for genotyping in the Greek cohorts of RA and PsA patients as well as in the healthy controls. These SNPs included *PLCL2* (rs4535211), *CCL21* (rs2812378), *REL* (rs13017599), *STAT4* (rs10181656), *CD226* (rs763361), *PTPN22* (rs2476601), and *TYK2* (rs34536443). Genomic DNA was isolated from peripheral blood leucocytes using a commercial kit supplied by Invitrogen (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Allelic discrimination of all SNPs was carried out using TaqMan SNP genotyping assays on a ViiA™ 7 Real-Time PCR System from Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). Genotyping of rs2476601 SNP of *PTPN22* was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described elsewhere (39). All allelic discrimination plots were manually reviewed individually for quality. To ensure accuracy of the results, 10% of the samples were amplified twice.

Construction of a three-dimensional (3D) model

Bioinformatic analysis was performed using BlastP (for sequence analysis) on the Uniprot sequence database PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) for 3D structural positioning and visualization and Maestro and Desmond (Schrodinger Inc, Mannheim, Germany) for mutations and stability analysis as well as molecular dynamics. The crystal structure of human TYK2 (pdb code 4GVJ) (40) was used as the initial model.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism statistical program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In case–control comparisons, only unrelated individuals were included. The χ^2 test, with one or two degrees of freedom, or Fisher's exact test was used to examine differences of genotype and allele frequencies between patients and controls, where all SNPs had a call rate > 98%. A two-tailed p-value < 0.05 was defined as statistically significant. The gene variants under investigation were evaluated for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) by comparing observed and expected genotype frequencies by means of the χ^2 test or Fisher's exact test in the control groups (by using the program 'Calculate'; Copyright TRG, SR, INMD, 2008). The distribution of genotypes in the case

and control groups for all seven SNPs examined was found to be under HWE ($p > 0.01$). Power analysis was conducted using QUANTO version 1.2.4 (41–44).

Results

The average age of the Greek RA cohort was 60.96 ± 12.8 years, and 59.9% of the subjects were female. Within the Greek PsA cohort, the average age was 52.12 ± 15.41 years and 46% of the subjects were female. Unrelated healthy controls (n = 521) consisted of 264 women (50.7%) and 257 men (49.3%) of similar ages. The genotyping was performed using TaqMan 5′ allelic discrimination technology with predesigned SNP genotyping assays provided by Applied Biosystems. The genotyping success for all the SNPs analysed was > 98%.

Allele and genotype frequencies of the analysed samples for the *TYK2* polymorphism (rs34536443) are depicted in Table 1. Our results show that the G/C genotype was more frequent in PsA and RA cases than in controls [p = 0.019, odds ratio (OR) 0.099, 95% confidence interval (CI) 0.005–1.65 and p = 0.033, OR 0.33, 95% CI 0.123–0.90, respectively], while the C allele was more frequently observed in PsA patients compared to controls (p = 0.02, OR 0.10, 95% CI 0.006–1.681). Of note, the frequency of this allele did not seem to have any statistically significant difference between RA patients and controls, although previously it was reported to have a potential protective role in RA (45). Bioinformatic analysis revealed that the substitution of a G to a C nucleotide caused by the rs34536443 SNP generates a Pro1104Ala mutation in the TYK2 protein. In particular, the replacement of the Pro^{1104} amino acid residue of TYK2 (an α-helical structure disruptor) with an alanine (an α-helical former) (Figure 1) may induce into the α-helical segment (residues 1104–1113) a conformational change extending the α-helical segment by five more residues (1099–1113). Such a conformational change will probably alter the local 3D structure, affect the folding and the interaction parameters of the molecule and therefore induce changes in the functionality of the molecule. Molecular dynamics studies of the mutant indicate propagation of the folding changes along the molecular structure.

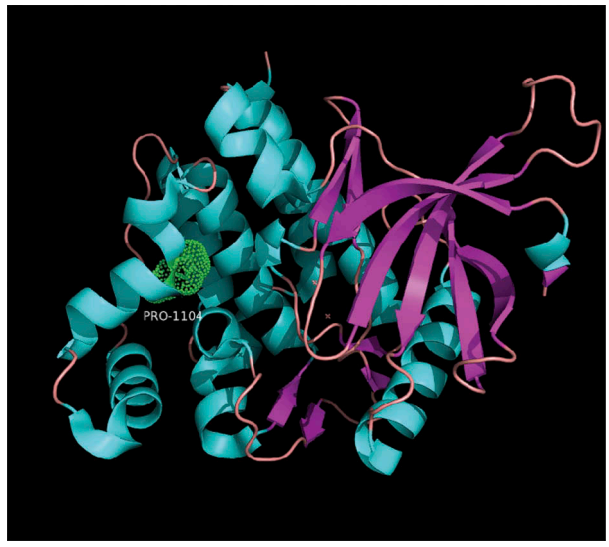


Figure 1. 3D ribbon diagram of the TYK2 native structure (PDB code 4GVJ) containing the position of the P1104A polymorphism. Helical regular segments are represented in cyan and beta strands in magenta colour. Diagram created using program PyMOL (DeLano Scientific LLC, Schrödinger, Inc. Mannheim, Germany).

Patients with PsA presented more frequently with the GG genotype and the G allele of the *STAT4* rs10181656 SNP (p = 0.04, OR 4.3, 95% CI 1.01–18.39 and p = 0.03, OR 1.46, 95% CI 1.03–2.08, respectively) (Table 2). These findings support the implication of this SNP in the development of PsA in the Greek population. However, no association was found between RA cases and controls at either the genotypic or the allelic level (data not shown), contrary to previous results (29). In a first attempt to study the functional consequence of the rs10181656 SNP of *STAT4*, we performed a DNA sequence analysis using Gene2Promoter (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany). This analysis revealed that the major C allele, but not the minor G allele, of the rs10181656 SNP of *STAT4* is located within a putative binding site for transcription factors Pax-4, PPAR/RXR, and ZNF99.

Table 1. Genotype and allele frequencies of the *TYK2* rs34536443 polymorphism analysed in 392 RA patients, 126 PsA patients, and 507 healthy controls.

	Controls (n = 507)	RA (n = 392)			PsA (n = 126)		
	n (%)	n (%)	p-value	OR (95% CI)	n (%)	p-value	OR (95% CI)
rs34536443 genotype							
G/G	488 (96.3)	385 (98.2)			126 (100)		
G/C	19 (3.7)	5 (1.3)	**0.0347**	0.33 (0.123–0.90)	0 (0)	**0.0194**	0.099 (0.005–1.65)
C/C	0 (0)	2 (0.5)	0.1953	6.33 (0.3–132.5)	0 (0)		
Allele							
G	995/1014 (98.1)	775/784 (98.9)			252/252 (100)		
C	19/1014 (1.9)	9/784 (1.1)	0.25	0.60 (0.27–1.352)	0/252 (0)	**0.0203**	0.10 (0.006–1.681)

RA, Rheumatoid arthritis; PsA, psoriatic arthritis; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
Statistically significant differences in p-values between cases and controls are emphasized with bold types.

Table 2. Genotype and allele frequencies of the *STAT4* rs10181656 polymorphism analysed in 126 PsA patients and 521 healthy controls.

	PsA (n = 126)	Controls (n = 521)	p-value	OR (95% CI)
rs10181656 genotype				
C/C	82 (65.08)	295 (56.62)		
C/G	42 (33.33)	195 (37.43)	0.13	3.34 (0.77–14.5)
G/G	2 (1.59)	31 (5.95)	**0.04**	4.3 (1.01–18.39)
Allele				
G	206/252 (81.75)	785/1042 (75.34)		
C	46/252 (18.25)	257/1042 (24.66)	**0.03**	1.46 (1.03–2.08)

PsA, Psoriatic arthritis; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
Frequencies given as n (%).
Statistically significant differences in p-values between cases and controls are emphasized with bold types.

Association with PsA only was also found for the TC genotype of the rs763361 SNP of *CD226* (p = 0.04, OR 0.61, 95% CI 0.39–0.95) (Table 3). In an attempt to clarify the role of this SNP in the development of multiple autoimmune diseases, we analysed in detail the existing 3D models of this protein (46). The rs763361 SNP results in a Gly307Ser substitution; this position is located on the amino acid sequence towards the C-terminal end of the CD226 polypeptide. In particular, the Ser^{307} variant alters splicing of the *CD226* transcript, which affects downstream signalling and increases the activation of T and natural killer (NK) cells (47). This region is characterized as the cytoplasmic terminal region after the membrane-integrated anchoring α-helical part (46). It is populated by many charged and polar residues and contains several putative phosphorylation sites (Y^{249}, T^{250}, S^{290}, T^{293}, S^{302}, S^{305}, S^{313}, Y^{322}, Y^{325}, S^{329}) conserved between species. Although no definite conclusions could be drawn about a putative structural change, the Ser^{307} residue in the protein's cytoplasmic region is most likely to be involved in polar interactions associated with proximal charged residues or phosphorylation sites.

The distribution of the *PTPN22* 1858C/T alleles in the Cretan population was not significantly different between RA patients and controls (data not shown), while it was found that the minor allele T was more common in control individuals than in PsA patients. However, the observed difference was not statistically significant when it was evaluated with a χ^2 test of independence (p = 0.056, OR 0.27, 95% CI 0.06–1.14, detailed data not shown).

Of interest, none of the remaining three SNPs examined [rs4535211 (*PLCL2*), rs2812378 (*CCL21*), and rs13017599 (*REL*)] were found to be associated with either RA or PsA (data not shown).

Our study had 80% power to detect effect sizes of 1.3–1.4 for RA and 1.5–1.8 for PsA assuming minor allele frequencies (MAFs) of between 10% and 40% at the 5% significance level.

Discussion

The strategy of studying the putative role of RA susceptibility genetic factors in the development of PsA has proven to be highly successful so far (29). Moreover, accumulated evidence indicates that an ethnic heterogeneity of genetic factors exists for rheumatic disorders. Thus, understanding the allelic homogeneity and heterogeneity among these diseases provides an insight into common gene function and pathways. To date, the *TYK2* rs34536443 (24), *CCL21* rs2812378 (24), *PTPN22* rs2476601 (24), and *PLCL2* rs4535211 (48) SNPs have been associated with RA, while the rs13017599 SNP of *REL* has been associated with both PsA (49) and RA (50), attaining a genome-wide level of significance ($p < 5 \times 10^{-8}$) in all cases. Moreover, the aforementioned *CCL21, PTPN22, PLCL2, REL*, and *STAT4* (rs10181656) SNPs were found to be overlapping between RA and PsA in a previous study (29), whereas *CD226* rs763361 SNP has been associated

Table 3. Genotype and allele frequencies of the *CD226* rs763361 polymorphism analysed in 126 PsA patients and 521 healthy controls.

	PsA (n = 126)	Controls (n = 521)	p-value	OR (95% CI)
rs763361 genotype				
T/T	48 (38.1)	148 (28.4)		
T/C	52 (41.3)	260 (49.9)	**0.0388**	0.61 (0.39–0.95)
C/C	26 (20.6)	113 (21.7)	0.23	0.71 (0.41–1.21)
Allele				
T	148/252 (58.7)	556/1042 (53.4)		
C	104/252 (41.3)	486/1042 (46.6)	0.14	0.80 (0.61–1.06)

PsA, Psoriatic arthritis; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
Frequencies given as n (%).
Statistically significant differences in p-values between cases and controls are emphasized with bold types.

with an increased risk for the development of RA and other autoimmune diseases (51).

In the current study, the genetic association of *STAT4* (rs10181656) and *CD226* (rs763361) with PsA but not with RA was confirmed in a Greek population, while a genetic overlap between PsA and RA was detected with the rs34536443 SNP of *TYK2*. The PsA-associated allele of the *STAT4* SNP was protective for RA and not a risk, as reported previously in other populations (29). Importantly, to the best of our knowledge, the *CD226* SNP has not previously been associated with PsA (51).

TYK2 is a locus that has been confirmed to be associated with RA at genome-wide significance levels (24). The encoded protein is a tyrosine kinase in the STAT signalling pathway, important for signalling by type I interferon (IFN) and induction of T-helper (Th)1 cell differentiation upon antigen stimulation of dendritic cells (52). A meta-analysis of Immunochip, Exomechip, and targeted exon-sequencing data recently demonstrated that the minor allele of rs34536443 SNP of *TYK2* was protective against RA, systemic lupus erythematosus (SLE) and inflammatory bowel disease (IBD) (45), while the same variant has been previously reported as conferring risk for PS (53) and juvenile idiopathic arthritis (JIA) (54). Of interest, we found the minor allele to increase the susceptibility for RA as well as PsA in the Greek population. However, the possibility that the results of our present study are spurious should be considered. The location of the Pro1104Ala mutation on the 3D structure of *TYK2* may affect structural and dynamical elements of the molecule. The introduction of a helical former alanine residue to replace the rather constrained helical breaker proline influences the secondary structure of this region with an α-helical conformation extension (residues 1099–1113), which may alter folding properties as well as dynamic aspects of the molecule, which in turn affect its functionality.

STAT4 encodes a transcription factor that transmits signals induced by several key cytokines, including interleukin (IL)-12, IL-23, and type 1 IFNs. STAT4-dependent signalling by IL-12 receptors plays a crucial role in the development of a Th1-type T-cell response (13). Our bioinformatic analysis shows that the minor G allele of the rs10181656 SNP of *STAT4* may destroy a putative binding site of the heterodimer of transcription factors PPARα/RXRα. PPARα is a nuclear receptor expressed in macrophages, granulocytes, and lymphocytes (55, 56) and plays an important role in suppressing autoimmune diseases by regulating Th2 cytokine production (57). Notably, it has been demonstrated that PPARα ligands can inhibit T-cell proliferation or the production of IFN-γ by T cells stimulated by antigens (58). Thus, it can be hypothesized that the minor allele of rs10181656, which was found to have increased frequency in PsA, may suppress T-cell activation through the disturbance of the binding of the PPARα/RXRα dimer.

CD226 is a type 1 membrane protein that belongs to the immunoglobulin (Ig) superfamily and is involved in the adhesion and co-stimulation of T cells and NK cells (59–61). The non-synonymous rs763361 polymorphism of *CD226*, resulting in a Gly307Ser substitution, was suggested to alter the exon-splicing silencer sequence, which may affect gene expression. The rs763361 SNP has been found to be associated with RA (51), JIA (62), SLE (63), type 1 diabetes (T1D) (51), multiple sclerosis (MS) (51), Wegener's granulomatosis (WG) (64), systemic sclerosis (SSc) (65), and autoimmune thyroid disease (AITD) (51) and, for the first time, we present its association with PsA. Based on a detailed analysis of the existing 3D models of this protein (46), we propose that the Ser^{307} residue is most likely to be involved in polar interactions associated with proximal charged residues or phosphorylation sites. By affecting the proximal phosphorylation sites or protein–protein subunit recognition, this mutation could alter the signalling cascade (51).

A lower rate of the MAFs of *PLCL2* (rs4535211), *CCL21* (rs2812378) *REL* (rs13017599), and *PTPN22* (rs2476601) SNPs has been observed in the healthy individuals from Greece compared to those previously described by Bowes et al (29), a finding that delineates the role of some existing population-specific differences in the frequency of these alleles. A North–South gradient in the frequency of the *PTPN22* minor allele across Europe has been widely reported previously, ranging between 15.5% and 2.1% (36), and will impact on the power to detect an association. Thus, there is still the possibility that, by increasing the size of the cohort, an association of the rs2476601 *PTPN22* SNP with RA and/or PsA could be detected. Considering the low MAF of the *PTPN22* variant in the Greek control samples (2.7–3%), more than 5000 patient and control samples would be required to detect even a large effect at this locus (i.e. a 50% increase in risk with 80% power at $p = 0.05$).

An advantage of our study is the ethnic matching of the cohort and control group. As a consequence, the results are unlikely to be biased by sampling. A clear weakness of the study is the limited sample size, especially for PsA. The lack of consistency between studies of various RA and PsA susceptibility loci may be due to the lack of power of individual studies to detect the modest effect sizes reported previously at most loci.

Although multiple ethnic populations share some of the enormous genetic variation detected after the completion of the human genome sequence, a substantial variability has been seen in the frequency of many alleles. The different findings of this current study from previous ones highlights the importance of comparative studies that include different ethnic or racial populations in any attempt to confirm genetic associations detected.

Acknowledgements

We are indebted to all colleagues and staff in the Department of Rheumatology, University Hospital of Heraklion, for cooperation and sample collection. This study was supported in part from the European Union Seventh Framework Programme IMI-funded project BeTheCure, contract no. 115142-2.

References

1. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. Am J Hum Genet 2004;75:330–7.
2. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet 2004;36:337–8.
3. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. Arthritis Rheum 2005;52:1694–9.
4. Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, et al. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 2005;52:4039–43.
5. Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, Cáliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005;52:219–24.
6. Vandiedonck C, Capdevielle C, Giraud M, Krumeich S, Jais JP, Eymard B, et al. Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. Ann Neurol 2006;59:404–7.
7. Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Hachulla E, Diot E, et al. The PTPN22 620W allele confers susceptibility to systemic sclerosis: findings of a large case control study of European Caucasians and a meta-analysis. Arthritis Rheum 2008;58:2183–8.
8. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. Clin Endocrinol (Oxf) 1997;46:551–4.
9. Vaidya B, Pearce SH, Charlton S, Marshall N, Rowan AD, Griffiths ID, et al. An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. Rheumatology (Oxford) 2002;41:180–3.
10. Mochizuki M, Amemiya S, Kobayashi K, Kobayashi K, Shimura Y, Ishihara T, et al. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. Diabetes Care 2003;26:843–7.
11. Lee YH, Bae SC, Song GG. Association between the CTLA-4, CD226, FAS polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. Hum Immunol 2015;76:83–9.
12. Wolff AS, Mitchell AL, Cordell HJ, Short A, Skinningsrud B, Ollier W, et al. CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease. Genes Immun 2015;16:430–6.
13. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2007;357:977–86.
14. Martínez A, Varadé J, Márquez A, Cénit MC, Espino L, Perdigones N, et al. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. Arthritis Rheum 2008;58:2598–602.
15. Zervou MI, Sidiropoulos P, Petraki E, Vazgiourakis V, Krasoudaki E, Raptopoulou A, et al. Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population. Hum Immunol 2008;69:567–71.
16. Zervou MI, Mamoulakis D, Panierakis C, Boumpas DT, Goulielmos GN. STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? Hum Immunol 2008;69:647–50.
17. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis–a genomewide study. N Engl J Med 2007;357:1199–209.
18. Kurreeman FA, Goulielmos GN, Alizadeh BZ, Rueda B, Houwing-Duistermaat J, Sanchez E, et al. The TRAF1-C5 region on chromosome 9q33 is associated with multiple autoimmune diseases. Ann Rheum Dis 2010;69:696–9.
19. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. A new Graves disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. Am J Hum Genet 1998;63:1749–56.
20. Thompson SD, Moroldo MB, Guyer L, Ryan M, Tombragel EM, Shear ES, et al. A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. Arthritis Rheum 2004;50:2920–30.
21. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burtt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. Nat Genet 2008;40:1216–23.
22. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Boumpas DT, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. A CD40 and an NCOA5 gene polymorphism confer susceptibility to psoriasis in a Southern European population: a case-control study. Hum Immunol 2011;72:761–5.
23. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nat Genet 2010;42:508–14.
24. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. Nat Genet 2012;44:1336–40.
25. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature 2014;506:376–81.
26. McAllister KM, Eyre S, Orozco G. Genetics of rheumatoid arthritis: GWAS and beyond. Open Access Rheumatology: Res Rev 2011;3:31–46.
27. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. Biochem Biophys Res Commun 2014;452:254–62.
28. Jani M, Barton A, Ho P. Pharmacogenetics of treatment response in psoriatic arthritis. Curr Rheumatol Rep 2015;17:44.
29. Bowes J, Ho P, Flynn EF, Marzo-Ortega H, Coates LC, et al. Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. Ann Rheum Dis 2012;71:1350–4.
30. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. Ann Rheum Dis 2005;64(Suppl 2):ii14–7.
31. Ibrahim G, Waxman R, Helliwell PS. The prevalence of psoriatic arthritis in people with psoriasis. Arthritis Rheum 2009;61:1373–8.
32. Sankowski AJ, Lebkowska UM, Cwikła J, Walecka I, Walecki J. Psoriatic arthritis. Pol J Radiol 2013;78:7–17.
33. Bowes J, Orozco G, Flynn E, Ho P, Brier R, Marzo-Ortega H, et al. Confirmation of TNIP1 and IL23A as susceptibility loci for psoriatic arthritis. Ann Rheum Dis 2011;70:1641–4.
34. Budu-Aggrey A, Bowes J, Barton A. Identifying a novel locus for psoriatic arthritis. Rheumatology (Oxford) 2016;55:25–32.
35. Bowes J, Budu-Aggrey A, Huffmeier U, Uebe S, Steel K, Hebert HL, et al. Dense genotyping of immune-related susceptibility loci reveals new insights into the genetics of psoriatic arthritis. Nat Commun 2015;6:6046.
36. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. Annu Rev Immunol 2009;27:363–91.
37. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 2010;62:2569–81.
38. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. Arthritis Rheum 2006;54:2665–73.
39. Eliopoulos E, Zervou MI, Andreou A, Dimopoulou K, Cosmidis N, Voloudakis G, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetic homogeneous population of Crete. Lupus 2011;20:501–6.
40. Liang J, Tsui V, Van Abbema A, Bao L, Barrett K, Beresini M, et al. Lead identification of novel and selective TYK2 inhibitors. Eur J Med Chem 2013;67:175–87.

41. Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. Stat Med 2002;21:35–50.
42. Gauderman WJ. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. Am J Epidemiol 2002;155:478–84.
43. Gauderman WJ. Candidate gene association analysis for a quantitative trait, using parent-offspring trios. Genet Epidemiol 2003;25:327–38.
44. Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies 2006 (http://biostats.usc.edu/software). Accessed 16 June 2016.
45. Diogo D, Bastarache L, Liao KP, Graham RR, Fulton RS, Greenberg JD, et al. TYK2 protein-coding variants protect against rheumatoid arthritis and autoimmunity, with no evidence of major pleiotropic effects on non-autoimmune complex traits. PLoS One 2015;10:e0122271.
46. Liu J, Qian X, Chen Z, Xu X, Gao F, Zhang S, et al. Crystal Structure of Cell Adhesion Molecule Nectin-2/CD112 and Its Binding to Immune Receptor DNAM-1/CD226. J Immunol 2012;188:5511–20.
47. Löfgren SE, Delgado-Vega AM, Gallant CJ, Sánchez E, Frostegård J, Truedsson L, et al. A 3′-untranslated region variant is associated with impaired expression of CD226 in T and natural killer T cells and is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2010;62:3404–14.
48. Cobb JE, Plant D, Flynn E, Tadjeddine M, Dieudé P, Cornélis F, et al. Identification of the tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2 as a rheumatoid arthritis susceptibility locus in europeans. PLoS One 2013;8:e66456.
49. Ellinghaus E, Stuart PE, Ellinghaus D, Nair RP, Debrus S, Raelson JV, et al. Genome-wide meta-analysis of psoriatic arthritis identifies susceptibility locus at REL. J Invest Dermatol 2012;132:1133–40.
50. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu Y, Remmers EF, Kastner DL, et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. Nat Genet 2009;41:820–3.
51. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. Genes Immun 2009;10:5–10.
52. Tokumasa N, Suto A, Kagami S, Furuta S, Hirose K, Watanabe N, et al. Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN-gamma production and the induction of Th1 cell differentiation. Blood 2007;110:553–60.
53. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. Nat Genet 2012;44:1341–8.
54. Hinks A, Cobb J, Sudman M, Eyre S, Martin P, Flynn E, et al. Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility loci in juvenile idiopathic arthritis confirms high degree of overlap. Ann Rheum Dis 2012;71:1117–21.
55. Jones DC, Ding X, Daynes RA. Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. J Biol Chem 2002;277:6838–45.
56. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:7355–9.
57. Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. Mol Cells 2012;33:217–22.
58. Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. J Immunol 2002;168:2795–802.
59. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. Immunity 1996;4:573–81.
60. Shibuya K, Lanier LL, Phillips JH, Ochs HD, Shimizu K, Nakayama E, et al. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. Immunity 1999;11:615–23.
61. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, et al. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. J Exp Med 2003;198:1829–39.
62. Reinards TH, Albers HM, Brinkman DM, Kamphuis SS, van Rossum MA, Girschick HJ, et al. CD226 (DNAM-1) is associated with susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis 2015;74:2193–8.
63. Song G, Bae SC, Choi S, Ji J, Lee Y. Association between the CD226 rs763361 polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. Lupus 2012;21:1522–30.
64. Wieczorek S, Hoffjan S, Chan A, Rey L, Harper L, Fricke H, et al. Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. Genes Immun 2009;10:591–5.
65. Dieudé P, Guedj M, Truchetet ME, Wipff J, Revillod L, Riemekasten G, et al. Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. Arthritis Rheum 2011;63:1097–105.