



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικών και Καποδιστριακών
Πανεπιστημίων Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑΣ
ΣΤΗΝ ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

ΕΙΡΗΝΗ ΜΑΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ
ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΤΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

ΕΙΡΗΝΗ ΜΑΝΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Δρ. Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Δρ. Θεοδώρα Κατσίλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Ε.Ι.Ε.)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρήστος Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Θεοδώρα Κατσίλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Ε.Ι.Ε.

ΑΘΗΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας έγινε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης με τίτλο: *Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική*. Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανακάλυψης Βιοδεικτών & Μεταφραστικής Έρευνας, του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών σε συνεργασία με τον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή, Δρ. Χ. Κοντό, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα εργασία. Τον ευχαριστώ για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη συνεπιβλέπουσα Εντεταλμένη Ερευνήτρια Δρ. Θ. Κατσιλά για την ευκαιρία που μου δόθηκε να συμμετέχω στην ερευνητική της ομάδα. Την ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά της, την καθοδήγησή της, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή Δρ. Α. Σκορίλα για τη συνεργασία του και τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της εργασίας.

Ως προς τη συλλογή των δειγμάτων, ευχαριστώ εγκάρδια τις Δρ. Ν. Κωνσταντινίδου Δρ. Μ. Κανάριου και Κ. Σπανού (Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας, Νοσοκομείο Παιδών *Αγία Σοφία*) και τις Δρ. Μ. Κρινή και Δρ. Ε. Ρώμα, (Τμήμα Παιδιατρικής, ΕΚΠΑ), καθώς και τον Καθηγητή, Δρ. Γ.Π. Πατρινό (Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών). Ευχαριστώ ολόθερμα τον Β.Α. Peters (Complete Genomics and BGI-Shenzhen). Η συμβολή όλων ήταν καθοριστική και πολύτιμη. Επιπρόσθετα, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Α. Μπαλασοπούλου, η οποία στάθηκε δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου που ήταν και είναι πάντα δίπλα μου. Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου και ιδιαίτερα το Σ. Αγγελίδη που με στήριξαν αυτό το απαιτητικό χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	1
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	2
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ.....	5
ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	9
1.1.1. Φυσική ανοσία.....	10
1.1.2. Επίκτητη ανοσία.....	11
1.1.3. Th1 και Th2 διαφοροποίηση.....	12
1.2. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ.....	14
1.2.1. Ιστορική αναδρομή.....	15
1.2.2. Επιδημιολογία.....	15
1.2.3. Κλινική εικόνα.....	17
1.2.4. Παθοφυσιολογία της νόσου.....	21
1.2.5. Ανοσολογική αντίδραση έναντι της γλουτένης.....	25
1.2.6. Διάγνωση της νόσου.....	28
1.2.7. Διαχείριση της νόσου.....	33
1.2.8. Κοιλιοκάκη και Th1 ανοσία.....	36
1.3. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ.....	37
1.3.1. Κοιλιοκάκη και αιματολογικές κακοήθειες.....	39
1.4. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΠΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ-ΒΙΟΜΟΡΙΑ.....	41
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	44
ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
2.1. ΕΞΟΥΥΞΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΚΕΙΜΕΝΟΥ.....	45

2.1.1.	Αναζήτηση δημοσιεύσεων στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed	45
2.1.2.	Χρήση εργαλείου ταξινόμησης BioReader	47
2.1.3.	Συλλογή πληροφορίας μέσω του εργαλείου εύρεσης κειμένου PolySearch2	51
2.1.4.	Αναζήτηση γονιδίων χρησιμοποιώντας το εργαλείο εξόρυξης κειμένου EVEX	52
2.1.5.	Αναζήτηση γονιδίων και γενετικών παραλλαγών χρησιμοποιώντας τον περιηγητή Ensembl.....	54
2.2	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ	57
2.2.1	Αναζήτηση πρωτεϊνικών δικτύων με το υπολογιστικό εργαλείο STRING	57
2.3.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ	59
2.3.1.	Χρήση υπολογιστικού εργαλείου PROVEAN/SIFT	59
2.4.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	63
2.4.1	Πληθυσμιακό δείγμα.....	63
2.4.2	Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος-Whole Genome Sequencing (WGS)	63
2.4.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-Polymerase Chain Reaction (PCR).....	66
2.4.4	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πήκτωμα αγαρόζης.....	68
2.4.5	Καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	69
2.4.6	Αλληλούχηση DNA κατά Sanger -DNA Sanger Sequencing	72
ΚΕΦ. 3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
ΚΕΦ. 4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
ΚΕΦ. 5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... 119

ABSTRACT..... 121

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Τα αντιδραστήρια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	67
Πίνακας 2.2. Το πρωτόκολλο στο θερμικό κυκλοποιητή για την ενίσχυση του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την εκάστοτε παραλλαγή.	68
Πίνακας 3.1 Επιλεγμένες δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=76) από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed.....	74
Πίνακας 3.2 Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.	75
Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικός πίνακας γονιδίων που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη ή/και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/και τους ιούς.	77
Πίνακας 3.4 Συγκεντρωτικός πίνακας γενετικών παραλλαγών που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες.	81
Πίνακας 3.5 Στατιστική ανάλυση πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN.	84
Πίνακας 3.6 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη BACH2 ως κεντρικό κόμβο.	88
Πίνακας 3.7 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη IRF4 ως κεντρικό κόμβο.	91
Πίνακας 3.8 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη MYNN ως κεντρικό κόμβο.	94
Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα υπολογιστικής ανάλυσης του βιοπληροφορικού εργαλείου PROVEAN/SIFT για τη γενετική παραλλαγή rs10936599.	95

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Σχήμα 1.1. Διαφοροποίηση των Τ-βοηθητικών κυττάρων προς τους υποτύπους Th1, Th2, Th17, T _{FH} και T _{regs} (Nurieva and Chung, 2010).....	13
Σχήμα 1.2. Ο παγκόσμιος επιπολασμός της κοιλιοκάκης βασιζόμενος σε θετικές ορολογικές εξετάσεις αντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης 2 και έναντι του ενδομυΐου (Lindfors et al., 2019).....	17
Σχήμα 1.3. Οι κλινικές εκδηλώσεις της κοιλιοκάκης. Στα μπεζ πλαίσια αναφέρονται τα γαστρεντερικά συμπτώματα και στα γαλάζια τα συστηματικά συμπτώματα (Lindfors et al., 2019).....	18
Σχήμα 1.4. Οι κλινικές εκδηλώσεις της κοιλιοκάκης στον παιδιατρικό πληθυσμό (https://coeliac.org.nz/children-with-coeliac/).	19
Σχήμα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του παγόβουνου της κοιλιοκάκης (Fasano, 2005). ..	20
Σχήμα 1.6. Ταξινομική κατάταξη των Αγρωστωδών (Lindfors et al., 2019).	22
Σχήμα 1.7. Συσχέτιση των μορίων HLA τάξης II με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης και διαβήτη τύπου I (Meresse et al., 2012).	23
Σχήμα 1.8. Ανοσολογική αντίδραση έναντι γλουτένης (Lindfors et al., 2019).	26
Σχήμα 1.9. Μηχανισμός φυσικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι γλουτένης (Lindfors et al., 2019).....	27
Σχήμα 1.10. Στρατολόγηση ουδετερόφιλων ως μέρος του μηχανισμού φυσικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι γλουτένης (Leonard et al., 2017).	28
Σχήμα 1.11. Αλλοίωση της αρχιτεκτονικής του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου (Lindfors et al., 2019).....	31
Σχήμα 1.12. Κατάταξη Marsh-Oberhuber των αλλοιώσεων του βλεννογόνου στην κοιλιοκάκη (Schuppan and Zimmer, 2013).	32
Σχήμα 1.13. Αναπαράσταση του αλγόριθμου διάγνωσης της κοιλιοκάκης βάσει των κριτηρίων της ESPGHAN (Husby et al., 2012).....	33
Σχήμα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση προτεινόμενων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία της κοιλιοκάκης (Kaukinen et al., 2014).	36
Σχήμα 2.1. Περιβάλλον αναζήτησης βιβλιογραφίας στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed.	46
Σχήμα 2.2. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου ταξινόμησης BioReader.....	48

Σχήμα 2.3. Διαγραμματική παρουσίαση μεθοδολογίας επιλογής των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά της μελέτης.....	50
Σχήμα 2.4. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου εύρεσης κειμένου PolySearch2.....	52
Σχήμα 2.5. Περιβάλλον εργασίας του εργαλείου εξόρυξης κειμένου EVEX, μετά την αναζήτηση του γονιδίου <i>IL-15</i>	54
Σχήμα 2.6. Περιβάλλον εργασίας του περιηγητή Ensembl μετά την αναζήτηση της γενετικής παραλλαγής rs699.	55
Σχήμα 2.7. Παράδειγμα στατιστικής ανάλυσης πρωτεϊνικού δικτύου στο STRING μετά την εισαγωγή των πρωτεϊνών BACH2, IRF4, MYNN.....	58
Σχήμα 2.8. Περιβάλλον αναζήτησης πρωτεϊνικών δικτύων με το υπολογιστικό εργαλείο STRING εισάγοντας το όνομα/αναγνωριστικό της επιθυμητής πρωτεΐνης (https://string-db.org/).....	59
Σχήμα 2.9. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου PROVEAN/SIFT (http://provean.jcvi.org)....	61
Σχήμα 2.10. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου PROVEAN/SIFT (PROVEAN Genome Variants), έχοντας εισάγει τη γενετική παραλλαγή rs10936599 (http://provean.jcvi.org).....	62
Σχήμα 2.11. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας της πλατφόρμας BGISEQ-500 της εταιρείας BGI Genomics (https://www.bgi.com).	65
Σχήμα 2.12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Παπανικολάου et al., 2015).....	67
Σχήμα 2.13. Σχηματική αναπαράσταση της ενζυμικής μεθόδου καθαρισμού ExoSAP-IT (www.thermofisher.com).	70
Σχήμα 2.14. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής του προτυποποιημένου συστήματος NucleoSpin PCR Clean-up της εταιρείας Macherey-Nagel (https://www.mn-net.com/bioanalysis/bio-brands/nucleospin-information/).	71
Σχήμα 2.15. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger (https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html).	73
Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη και την Th1 κυτταρική ανοσία και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/ και τα υκά βιομόρια-ερεθίσματα.	80

Σχήμα 3.2. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN βάσει δεδομένων.....	82
Σχήμα 3.3. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN βάσει εμπιστοσύνης.....	83
Σχήμα 3.4. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN βάσει μοριακής δράσης.....	84
Σχήμα 3.5. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη BACH2 βάσει δεδομένων.....	86
Σχήμα 3.6. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη BACH2 βάσει εμπιστοσύνης.....	87
Σχήμα 3.7. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη BACH2 βάσει μοριακής δράσης.....	88
Σχήμα 3.8. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει δεδομένων.....	89
Σχήμα 3.9. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει εμπιστοσύνης.....	90
Σχήμα 3.10. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει μοριακής δράσης.....	91
Σχήμα 3.11. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει δεδομένων.....	92
Σχήμα 3.12. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει εμπιστοσύνης.....	93
Σχήμα 3.13. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει μοριακής δράσης.....	94

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟΙ ΟΡΟΙ

Αλκαλική φωσφατάση γαρίδας (Shrimp Alkaline Phosphatase, rSAP)

Αλληλεπίδραση πρωτεΐνης- πρωτεΐνης (Protein-Protein Interaction, PPI)

Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS)

Αλληλούχηση κατά Sanger (Sanger Sequencing)

Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS)

Αλληλούχηση όλων των εξωνίων του γονιδιώματος (Whole Exome Sequencing, WES)

Αλληλούχηση τερματισμού αλυσίδας (chain termination sequencing)

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer)

Αντιγόνο Ανθρωπίνων Λευκοκυττάρων (Human Leukocyte Antigen, HLA)

Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-presenting cells, APCs)

Αντισώματα έναντι των απαμινωμένων πεπτιδίων της γλιαδίνης (deamidated gliadin peptide antibodies, DGPA)

Αξιοπιστία μεταξύ δύο βαθμολογητών (Interrater reliability)

Αυτοάνοση ηπατίτιδα (autoimmune hepatitis, AIH)

Αυτο-συναρμολογούμενες νανοδιατάξεις DNA (Self-Assembling DNA Nanoarrays)

Βαθμολογία (Score)

Βαθμολογία ευθυγράμμισης *δέλτα* (Delta alignment score)

Γραμμική ισοθερμική αντιγραφή κυλιόμενου κύκλου (Linear isothermal Rolling-Circle Replication)

Δεοξυνουκλεοτίδια (Deoxynucleotides, dNTPs)

Δίαιτα ελεύθερη γλουτένης (Gluten Free Diet, GFD)

Διασταυρωτή ρύθμιση (cross-regulation)

Διδεοξυνουκλεοτίδια (Dideoxynucleotides, ddNTPs)

Διμερή εκκινητών (Primer dimers)

Έμφυτη ανοσία (innate immunity)

Ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (Intraepithelial Lymphocytes, IELs)

Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Εξωνουκλεάση I (Exonuclease I, Exo I)

Ερπητοειδής δερματίτιδα (Dermatitis herpetiformis)

Ευθύς εκκινητής (Forward primer)

Θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler)

Θερμοκρασία τήξης (Melting Temperature, T_m)

Θυλακιώδη βοηθητικά T-κύτταρα (Follicular helper T-cells, T_{FH})

Ιντερλευκίνη 15 (interleukin 15, IL-15)

Ιντερλευκίνη 18 (interleukin 18, IL-18)

Ιντερλευκίνη 2 (interleukin 2, IL-2)

Ιντερλευκίνη 21 (interleukin 21, IL-21)

Ιντερλευκίνη 4 (interleukin 4, IL-4)

Ιντερφερόνη- α (interferon- α , IFN- α)

Ιντερφερόνη- γ (interferon- γ , IFN- γ)

Ιός Epstein-Barr (Epstein-Barr virus, EBV)

Ιός της ηπατίτιδας C (Hepatitis C virus, HCV)

Ιός της ηπατίτιδας B (Hepatitis Virus B, HBV)

Ιστική τρανσγλουταμινάση τύπου 2 (tissue transglutaminase, tTG2)

Κοιλιοκάκη (celiac/ coeliac disease, CD)

Κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus, CMV)

Λέμφωμα οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphoma)

Λέμφωμα του μανδύα (Mantle Cell Lymphoma)

Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC)

Μελέτες χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS)

Μεταγραφικός παράγοντας T-bet (T-box transcription factor 21)

Μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 1 (Signal transducer and activator of transcription 1, STAT-1)

Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs)

Μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs)

Μοριακή μίμηση (molecular mimicry)

Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (Tumor Necrosis Factor β , TNF- β)

Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)

Παραλλαγές Αριθμού Αντιγράφων (Copy Number Variations – CNVs)

Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project)

Προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR Product)

Προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity)

Πρωτογενές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL)

Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (primary sclerosing cholangitis, PSC)

Πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (primary biliary cirrhosis, PBC)

Συντελεστής απήχησης (Impact factor)

Συντελεστής ομαδοποίησης (Clustering coefficient)

T-βοηθητικά κύτταρα (T helper cells, T_H)

T-κυτταρική λευχαιμία και λέμφωμα (Adult T-cell Leukemia and Lymphoma, ATLL)

T-κυτταροτοξικά κύτταρα (T cytotoxic cells, T_C)

T-λέμφωμα εντεροπαθούς εκδήλωσης (Enteropathy associated T-cell lymphoma, EATL)

T-ρυθμιστικά κύτταρα (T regulatory, T_{reg})

Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (Food and Drug Administration, FDA)

Υποδοχέας T-κυττάρου (T-cell receptor, TCR)

Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs)

Υποδοχείς T-κυττάρου (T-cell receptors, TCRs)

Φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer, NK)

Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL)

ΚΕΦ. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα εξαιρετικά ευπροσάρμοστο αμυντικό σύστημα, που αποτελείται από μια πληθώρα κυττάρων και χημικών ουσιών. Τα κύτταρα και τα χημικά αυτά μόρια δρουν συντονισμένα, έχοντας έναν κοινό στόχο, την προστασία του οργανισμού από αντιγόνα, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και οι τοξίνες αυτών, οι ιοί, αλλά και καρκινικά κύτταρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει την ικανότητα να διακρίνει τα ενδογενή μόρια/κύτταρα του οργανισμού από τα ξενοβιοτικά (διάκριση εαυτού/μη εαυτού). Η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσα νοσήματα, ανοσοανεπάρκειες και κακοήθειες. Όταν το ανοσοποιητικό σύστημα χάνει την ικανότητα διάκρισης εαυτού και μη εαυτού, επιτίθεται έναντι του ίδιου του οργανισμού, καταλήγοντας στην αυτοανοσία.

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο γραμμές άμυνας: τη φυσική/έμφυτη ανοσία (innate immunity) και την επίκτητη/προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity) (Kuby et al., 2013; Marshall et al., 2018). Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι κάθε ξένου παράγοντα, χωρίς να έχει εξειδίκευση. Αντίθετα, η επίκτητη ανοσία έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να επιτίθεται με ειδικό τρόπο σε συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους. Τα δύο προαναφερθέντα είδη ανοσίας αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση του ατόμου, δηλαδή η ικανότητα του οργανισμού να διατηρεί σταθερό το εσωτερικό του περιβάλλον παρά τις εξωτερικές μεταβολές. Με τη συντονισμένη δράση των κυττάρων της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας επιτυγχάνεται η διάκριση εαυτού/μη εαυτού και η διακυτταρική τους επικοινωνία, προκειμένου να προστατευτεί ο οργανισμός από τα παθογόνα, τις τοξίνες, την αυτοανοσία και τα νεοπλάσματα, με απώτερο σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης (Crimeen-Irwin et al., 2005)(Kuby et al., 2013).

1.1.1. Φυσική ανοσία

Η φυσική ανοσία είναι ο παλαιότερος αμυντικός μηχανισμός των σπονδυλωτών. Αποτελείται από όλους τους αμυντικούς μηχανισμούς, που στρατολογούνται έναντι μιας μόλυνσης. Η φυσική ανοσία παρουσιάζει γρήγορη απόκριση έναντι του αντιγόνου, είναι περιορισμένη και γενετικά καθορισμένη και δε διαθέτει ανοσολογική μνήμη. Επιπλέον, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της επίκτητης ανοσίας (Kuby et al., 2013; Marshall et al., 2018). Περιλαμβάνει διαφορετικούς φραγμούς, τόσο ανατομικούς, όσο και κυτταρικούς, αλλά και χημικούς. Ενδεικτικά, ανατομικοί φραγμοί στην είσοδο των αντιγόνων είναι το δέρμα και οι βλεννογόνοι. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στο μηχανισμό της φυσικής ανοσίας είναι τα φαγοκύτταρα, συγκεκριμένα τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer, NK). Τα φαγοκύτταρα λειτουργούν, εγκολπώνοντας (φαγοκυτταρώνοντας) τους μικροοργανισμούς και στη συνέχεια θανατώνοντάς τους. Τα μακροφάγα, επιπλέον, λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen-presenting cells, APCs) όπως και τα δενδριτικά κύτταρα. Ως αντιγονοπαρουσιαστικά ορίζονται τα κύτταρα που μπορούν να αναγνωρίζουν και να φαγοκυτταρώνουν αντιγόνα, να τα διασπούν σε αντιγονικά πεπτιδικά θραύσματα και στη συνέχεια να τα εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Σε αυτά ανήκουν τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα Β-κύτταρα, αλλά και όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού. Στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων εκφράζονται πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility complex), το οποίο διακρίνεται σε τάξης I και τάξης II. Συγκεκριμένα, στα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα εκφράζονται πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC τάξης II). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδένουν πεπτίδια αντιγόνων, όταν ένα κύτταρο έχει προσβληθεί από ένα ενδοκυττάριο παθογόνο, όπως ένας ιός ή κατόπιν φαγοκυττάρωσης ξένων πρωτεϊνών ή μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την παρουσίαση των πεπτιδίων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε κύτταρα της επίκτητης ανοσίας (Marshall et al., 2018). Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν ένα σύνδεσμο μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) ενέχουν σημαντικό ρόλο έναντι διαφόρων ικών μολύνσεων, καθώς στοχεύουν και καταστρέφουν τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή. Μέσω έκφρασης μορίων FasL (Fas Ligand) στην επιφάνειά τους, προσδένονται σε κύτταρα που εκφράζουν

τον υποδοχέα Fas και επάγουν την απόπτωση αυτών των κυττάρων-στόχων. Επίσης εκκρίνουν ιντερφερόνη- γ (interferon- γ , IFN- γ) και TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), κυτταροκίνες που προωθούν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Επιπλέον, η IFN- γ ενεργοποιεί τα μακροφάγα και προωθεί τη διαφοροποίηση των T-βοηθητικών κυττάρων προς τον υπότυπο Th1, ευνοώντας την Th1 ανοσία (Kuby et al., 2013).

Με την εισβολή ενός παθογόνου, οι ειδικοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs), αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα, τα οποία ονομάζονται «μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα» (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs). Αυτά τα πρότυπα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος. Από την αλληλεπίδραση PRRs-PAMPs ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, που οδηγούν στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, τύπου I ιντερφερονών και χημειοκινών, με στόχο την εξάλειψη των αντιγόνων και την προσέλκυση κυττάρων της φυσικής ανοσίας στο σημείο της φλεγμονής (Kuby et al., 2013; Marshall et al., 2018; Taguchi; and Mukai, 2019).

1.1.2. Επίκτητη ανοσία

Η επίκτητη ανοσία κρίνεται απαραίτητη, όταν η φυσική καθίσταται αναποτελεσματική στην εξάλειψη ενός αντιγόνου. Πρωταρχικές λειτουργίες της επίκτητης ανοσίας είναι η αναγνώριση ειδικών αντιγόνων *μη-εαυτού* και η διάκρισή τους από τα αντιγόνα *εαυτού*, η δημιουργία ειδικών μηχανισμών εξάλειψης συγκεκριμένων παθογόνων ή κυττάρων που έχουν προσβληθεί από αυτά (αντιγονική ειδικότητα) και η δημιουργία ανοσολογικής μνήμης, ώστε σε επόμενη έκθεση του ατόμου στο ίδιο αντιγόνο, η απόκριση να είναι ταχύτερη. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην επίκτητη ανοσία είναι τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται, κατόπιν ερεθίσματος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και τα B-λεμφοκύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν προς πλασματοκύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων (Marshall et al., 2018).

Τα B-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών, όπου και περνούν μέσω διάφορων αναπτυξιακών σταδίων. Φέρουν στην επιφάνειά τους γλυκοπρωτεΐνες, που καλούνται ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα. Προτού έρθουν σε επαφή με κάποιο αντιγόνο, τα

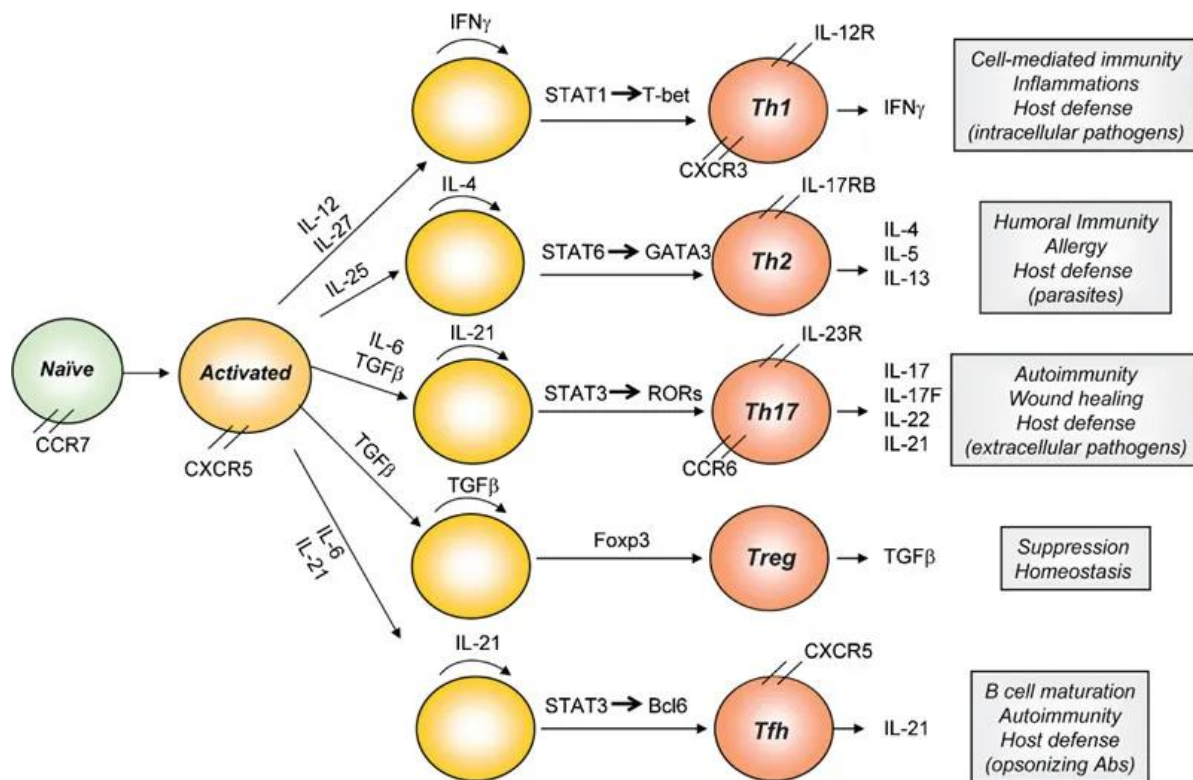
B-λεμφοκύτταρα, που έχουν εξέλθει από το μυελό των οστών, φέρουν στην επιφάνειά τους τις ανοσοσφαιρίνες IgD και IgM. Κατόπιν της επαφής με κάποιο αντιγόνο, τα B-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται, είτε προς B-κύτταρα μνήμης, είτε προς πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν μεγάλο αριθμό αντισωμάτων (Bonilla and Oettgen, 2010). Τα αντισώματα συμμετέχουν στην εξάλειψη των αντιγόνων μέσω εξουδετέρωσης, οφωνοποίησης και ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Karingidza et al., 2020).

Τα T-λεμφοκύτταρα προέρχονται, επίσης, από το μυελό των οστών, όμως, ωριμάζουν στο θύμο αδένα και εκφράζουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς T-κυττάρου (T-cell receptor, TCR). Τα πρόδρομα T-κύτταρα δεν εκφράζουν τους συνυποδοχείς CD4 και CD8. Ύστερα από αναδιάταξη του TCR δημιουργούνται CD4+CD8+ *διπλά θετικά* θυμοκύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στην περιφέρεια (B. V. Kumar et al., 2018). Κατόπιν περαιτέρω διαφοροποίησης προς *μονά θετικά*, τα T-λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε T-βοηθητικά (T helper, T_H), T-κυτταροτοξικά (T cytotoxic, T_C) και T-ρυθμιστικά (T regulatory, T_{reg}) κύτταρα. Τα T-βοηθητικά χαρακτηρίζονται από την έκφραση του συνυποδοχέα CD4 στην επιφάνειά τους και T-κυτταροτοξικά από την έκφραση του συνυποδοχέα CD8. Ο υποδοχέας του T-κυττάρου αναγνωρίζει αντιγόνα συνδεδεμένα με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Τα μόρια MHC τάξης I εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και τα μόρια MHC τάξης II εκφράζονται μόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Έτσι, όταν ένα πρόδρομο T-κύτταρο ενεργοποιηθεί, ερχόμενο σε επαφή με ένα αντιγόνο συνδεδεμένο με ένα μόριο MHC ενός κυττάρου, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται προς T-δραστικά κύτταρα, είτε βοηθητικά, είτε κυτταροτοξικά και προς T-κύτταρα μνήμης. (Kuby et al., 2013).

1.1.3. Th1 και Th2 διαφοροποίηση

Τα CD4+ βοηθητικά T-κύτταρα έχουν την ικανότητα περαιτέρω διαφοροποίησης προς τους υποτύπους Th1, Th2, Th17, θυλακιδώδη βοηθητικά (follicular helper T, T_{FH}) και ρυθμιστικά T-κύτταρα (regulatory T-cells, T_{regs}) (Σχήμα 1.1) (Nurieva and Chung, 2010). Τα πρόδρομα CD4+ T-κύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται από διαφορετικούς προσδέτες στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, σε συνδυασμό με τις κυτταροκίνες του

μικροπεριβάλλοντος. Ο κάθε υπότυπος T-βοηθητικών κυττάρων καθορίζεται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες και τη μεταγραφή γονιδίων, που ελέγχονται από αυτούς τους παράγοντες (Azuma, 2019; Zhang et al., 2014). Η ιντερλευκίνη 12 (IL-12) και η ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) προωθούν την έκφραση T-bet και STAT4 στα πρόδρομα T-κύτταρα, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίησή τους προς τον υπότυπο Th1, ενώ μέσω ιντερλευκίνης 4 (IL-4) προωθείται η έκφραση των STAT6 και GATA3, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να διαφοροποιούνται προς Th2. Παρ' όλο που οι μεταγραφικοί παράγοντες T-bet και GATA3 θεωρούνται κύριοι ρυθμιστές της διαφοροποίησης των κυττάρων Th1/Th2, υπάρχουν πολλοί ακόμα μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να μεσολαβήσουν αυτή τη διαφοροποίηση, όπως οι IRF4, FOXP3 και οι πρωτεΐνες της οικογένειας RUNX (Zhang et al., 2014).



Σχήμα 1.1. Διαφοροποίηση των T-βοηθητικών κυττάρων προς τους υποτύπους Th1, Th2, Th17, T_{FH} και T_{regs} (Nurieva and Chung, 2010).

Οι κυτταροκίνες, που βρίσκονται στο περιβάλλον, όπου γίνεται η διαφοροποίηση των T-βοηθητικών κυττάρων, καθορίζουν τον υπότυπο που θα προκύψει, αλλά και τα ίδια τα Th1 και Th2 κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες χαρακτηριστικές για κάθε υπότυπο. Συγκεκριμένα,

τα κύτταρα της Th1 ανοσίας εκκρίνουν IFN- γ , ιντερλευκίνη 2 (interleukin 2, IL-2) και TNF- β (Tumor Necrosis Factor β). Η IFN- γ έχει την ικανότητα ενεργοποίησης των μακροφάγων και προώθησης της φαγοκυττάρωσης και ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Σε συνέργεια με τον TNF- β , η IFN- γ προωθεί τη διαδικασία της φλεγμονής, συνδέοντας, έτσι, τα Th1 κύτταρα με φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Οι IFN- γ και IL-2 προάγουν τη διαφοροποίηση των CD8+ κυττάρων προς T-κυτταροτοξικά κύτταρα. Συνεπώς, η Th1 ανοσία είναι κατάλληλη για την απόκριση έναντι παθογόνων και ιών. Ταυτόχρονα, όμως, η IFN- γ έχει τη δυνατότητα αναστολής της διαφοροποίησης προς τον υπότυπο Th2. Το γεγονός αυτό είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα διασταυρωτής ρύθμισης (cross-regulation). Οι κυτταροκίνες, που παράγονται από τους δύο υποτύπους, προωθούν την ανάπτυξη του πληθυσμού που τις εκκρίνει, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλουν την ανάπτυξη του άλλου υποτύπου. Έτσι, η IFN- γ προωθεί την Th1 ανοσία και καταστέλλει την Th2, ενώ η IL-4 και η IL-10, που εκκρίνονται από τα Th2 κύτταρα, προωθούν την Th2 ανοσία και καταστέλλουν την Th1 (Kuby et al., 2013; Romagnani, 2000).

1.2. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ

Η κοιλιοκάκη (celiac/ coeliac disease, CD) είναι μια χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη διαταραχή του λεπτού εντέρου, η οποία πυροδοτείται από την κατανάλωση γλουτένης και πρωτεϊνών, σχετιζόμενων με τη γλουτένη, που βρίσκονται στο σιτάρι, στη σίκαλη και στο κριθάρι, σε άτομα με γενετική προδιάθεση (Gutierrez-Achury et al., 2011). Η κατανάλωση γλουτένης έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του εντερικού επιθηλίου. Αποτελεί την πιο κοινή εντεροπάθεια του δυτικού κόσμου και χαρακτηρίζεται από δυσκολία στη διαφοροδιάγνωσή της από άλλες ασθένειες που μπορεί να προκαλούν εντερική φλεγμονή. Ως «διαφορική διάγνωση» ή «διαφοροδιάγνωση» ορίζεται η διαγνωστική διαδικασία μέσω της οποίας αποκλείονται παθήσεις με παρόμοια συμπτώματα, ώστε να επιλεγθεί η επικρατέστερη διάγνωση (Ludvigsson et al., 2013).

1.2.1. Ιστορική αναδρομή

Η κοιλιοκάκη περιγράφηκε από τον Samuel J. Gee το 1888 και η εν λόγω αναφορά καταγράφεται στα αρχεία του νοσοκομείου St. Bartholomew. Ο Gee συνέδεσε τη νόσο με όλες τις ηλικίες, αλλά τόνισε την αυξημένη συχνότητα εμφάνισής της σε παιδιά, ηλικίας ενός έως πέντε ετών (Fasano, 2005). Ο Ολλανδός παιδίατρος W. K Dicke, κατά τη δεκαετία του 1930, συνέδεσε για πρώτη φορά την κατανάλωση σιταριού με την ασθένεια. Παρατηρώντας την κλινική εικόνα ενός παιδιού, παρατήρησε την ύφεση των συμπτωμάτων μετά από την αφαίρεση του ψωμιού από τη διατροφή του (Schuppan and Zimmer, 2013; van Berge-Henegouwen and Mulder, 1993). Ο χαρακτηρισμός της γλουτένης ως κύριος παράγοντας εκδήλωσης των συμπτωμάτων της κοιλιοκάκης έγινε από τους Dicke, Weyers και van de Kamer στις αρχές της δεκαετίας του 1950, καταγράφοντας πως η γλουτένη ήταν υπεύθυνη για τη δυσαπορρόφηση των λιπών σε ασθενείς με κοιλιοκάκη, εντείνοντας, έτσι, τα συμπτώματά της (van Berge-Henegouwen and Mulder, 1993). Συνεπώς, η γλουτένη υπερίσχυσε της επικρατούσας πεποίθησης ότι το διαιτητικό άμυλο ήταν αιτιοκρατικός παράγοντας της νόσου (Marsh, 1992; Schuppan and Zimmer, 2013).

Η συσχέτιση της ατροφίας των λαχνών και της υπερπλασίας των κρυπτών με την κοιλιοκάκη μελετήθηκε, εκτενώς, από τους Paulley (Ιπσουιτς, 1954) και Shiner (Λονδίνο, 1956). Λίγα χρόνια αργότερα, ανακαλύφθηκαν αντισώματα έναντι της γλιαδίνης από τον Berger (Βασιλεία, 1958) και έναντι του ενδομυΐου από τον Chorzelski (Βαρσοβία, 1983). Η ανακάλυψη της ιστικής τρανσγλουταμινάσης τύπου 2 (tissue transglutaminase, tTG2) ως αυτοαντιγόνο στην κοιλιοκάκη έγινε το 1997 (Dieterich et al., 1997; Schuppan and Zimmer, 2013).

1.2.2. Επιδημιολογία

Η κοιλιοκάκη, αρχικά, θεωρούνταν μια σπάνια διαταραχή, που επηρέαζε, κυρίως, παιδιά ευρωπαϊκής καταγωγής (P. Singh et al., 2018). Ο παγκόσμιος επιπολασμός της κοιλιοκάκης, βασιζόμενος σε θετικές ορολογικές εξετάσεις είναι 1,4%, ενώ ο επιπολασμός της νόσου ύστερα από επιβεβαίωση με βιοψίες είναι 0,7% (P. Singh et al., 2018). Όπως

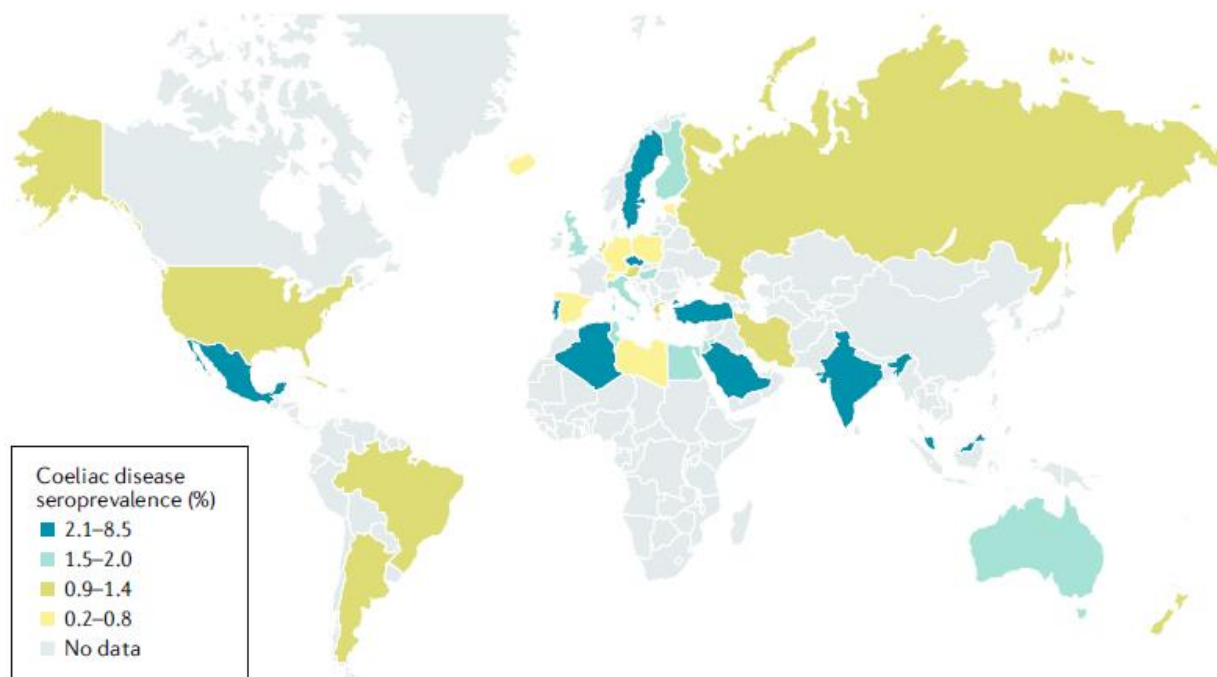
διαφαίνεται, με την πάροδο του χρόνου, ο επιπολασμός της κοιλιοκάκης αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς (Lindfors et al., 2019).

Ο επιπολασμός της κοιλιοκάκης, που βασίζεται σε θετικές ορολογικές εξετάσεις (1,4%), αφορά στην παρουσία αντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης και έναντι του ενδομυΐου (Σχήμα 1.2). Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στην Ευρώπη, με τον υψηλότερο επιπολασμό να εντοπίζεται μεταξύ άλλων στη Φιλανδία (2,4%), την Τουρκία (1.3%), το Ηνωμένο Βασίλειο (1.2%) και την Ιταλία (0,7%) (Elsurer et al., 2005; Mustalahti et al., 2010; West et al., 2003). Αντίθετα, στη Ρωσία (0.2–0.6%) (Savvateeva et al., 2017), την Εσθονία, την Ισλανδία, την Πολωνία και την Ελβετία, η παρουσία της νόσου δεν είναι τόσο συχνή (0.2–0.4%) (Singh et al., 2018). Πληθυσμιακά και επιδημιολογικά δεδομένα για τον επιπολασμό της κοιλιοκάκης έχουν ληφθεί και από άλλες χώρες, όπως η Ινδία και ορισμένες χώρες της Αφρικής και της μέσης ανατολικής Ασίας, αλλά απουσιάζουν από χώρες, όπως η Κίνα, η Ινδονησία, κ.ά. Τα δεδομένα για αυτές τις χώρες είναι ελλιπή, με τη διάγνωση της νόσου, πολλές φορές να είναι λανθασμένη (Lindfors et al., 2019; Makharia et al., 2014; Yuan et al., 2017). Συγκεκριμένα, στην Υποσαχάρια Αφρική η μόνη μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί ήταν σε 600 άτομα στην Μπουρκίνα Φάσο, εκ των οποίων κανένα δεν έφερε θετικές ορολογικές εξετάσεις (P. Singh et al., 2018).

Επιπλέον, διαφορές εντοπίζονται στην εμφάνιση της κοιλιοκάκης και ανάμεσα στα δύο φύλα. Έχει φανεί πως η εμφάνιση της νόσου είναι πιο συχνή στις γυναίκες, με αναλογία θηλυκών/αρσενικών ατόμων δύο προς ένα (2/1). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικούς παράγοντες. Οι γυναίκες έχει βρεθεί πως πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα σε υψηλότερο βαθμό από τους άνδρες, καθώς και ότι λαμβάνουν φροντίδα υγείας πιο συχνά από τους άνδρες, ενώ παρακολουθούνται πιο συχνά από ιατρούς, συγκριτικά με τους άνδρες. Ως εκ τούτου, φαίνεται πως η διάγνωση της νόσου είναι πιο συχνή στις γυναίκες, λόγω της συχνότερης προσέλευσης σε ιατρεία και κέντρα υγείας (Bardella et al., 2005; Dixit et al., 2014; Green et al., 2015).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, ο επιπολασμός της κοιλιοκάκης είναι δύο έως πέντε φορές υψηλότερος, σε σχέση με τους ενήλικες (Ciccocioppo et al., 2015; Mariné et al., 2011; Poddar, 2013). Πριν 10 έτη υπολογίστηκε πως υπάρχουν 2,2 εκατομμύρια

παιδιά, παγκοσμίως, που νοσούν με κοιλιοκάκη, με θνητότητα 42,000 παιδιών, ετησίως. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η ευαισθητοποίηση, διάγνωση και θεραπεία ως προς την παιδιατρική κοιλιοκάκη (Newton and Singer, 2012).



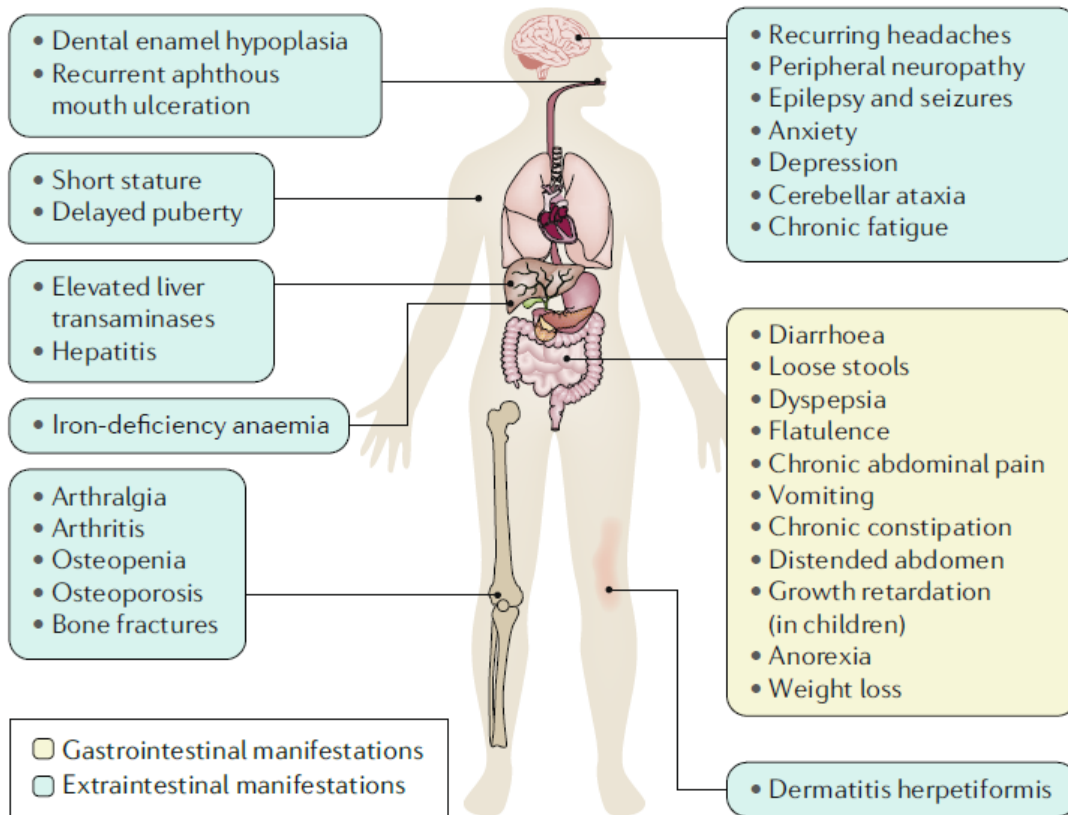
Σχήμα 1.2. Ο παγκόσμιος επιπολασμός της κοιλιοκάκης βασιζόμενος σε θετικές ορολογικές εξετάσεις αντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης 2 και έναντι του ενδομυΐου (Lindfors et al., 2019).

1.2.3. Κλινική εικόνα

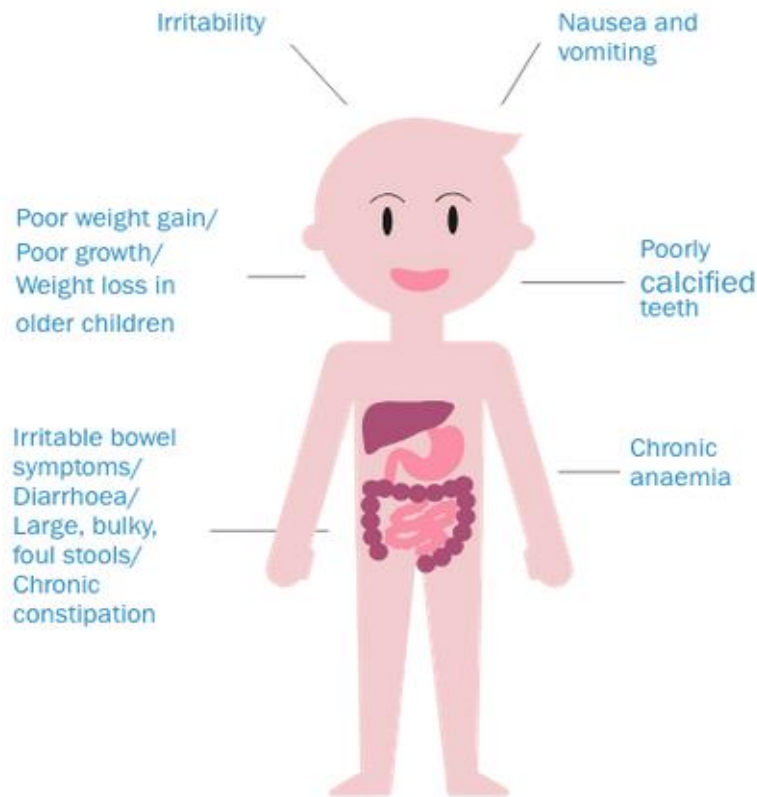
Στην κοιλιοκάκη παρουσιάζονται συμπτώματα δυσαπορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, λόγω της καταστροφής του εντερικού επιθηλίου, ειδικά στην παιδική ηλικία, αλλά και συμπτώματα στα διάφορα όργανα του οργανισμού, αποτελώντας τη συστηματική εκδήλωση της νόσου, τόσο στην παιδική, όσο και στην ενήλικη ζωή (Σχήματα 1.3 και 1.4).

Στα γαστρεντερικά συμπτώματα περιλαμβάνεται η διάρροια, το κοιλιακό άλγος, ο κοιλιακός μετεωρισμός, η δυσπεψία, ο εμετός, η χρόνια δυσκοιλιότητα, η καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά, η ανορεξία και η απώλεια βάρους. Στα συστηματικά συμπτώματα

ανήκουν η οστεοπόρωση και η οστεοπενία, η αρθραλγία, η αρθρίτιδα, τα κατάγματα οστών, η χρόνια κόπωση, η κατάθλιψη, το άγχος, η εγκεφαλική αταξία, οι επιληπτικές κρίσεις, η περιφερική νευροπάθεια, η αναιμία λόγω έλλειψης σιδήρου, η καθυστέρηση εφηβείας και το κοντό ανάστημα, η υποπλασία του οδοντικού σμάλτου, κ.ά. (Lindfors et al., 2019).



Σχήμα 1.3. Οι κλινικές εκδηλώσεις της κοιλιοκάκης. Στα μπεζ πλαίσια αναφέρονται τα γαστρεντερικά συμπτώματα και στα γαλάζια τα συστηματικά συμπτώματα (Lindfors et al., 2019).



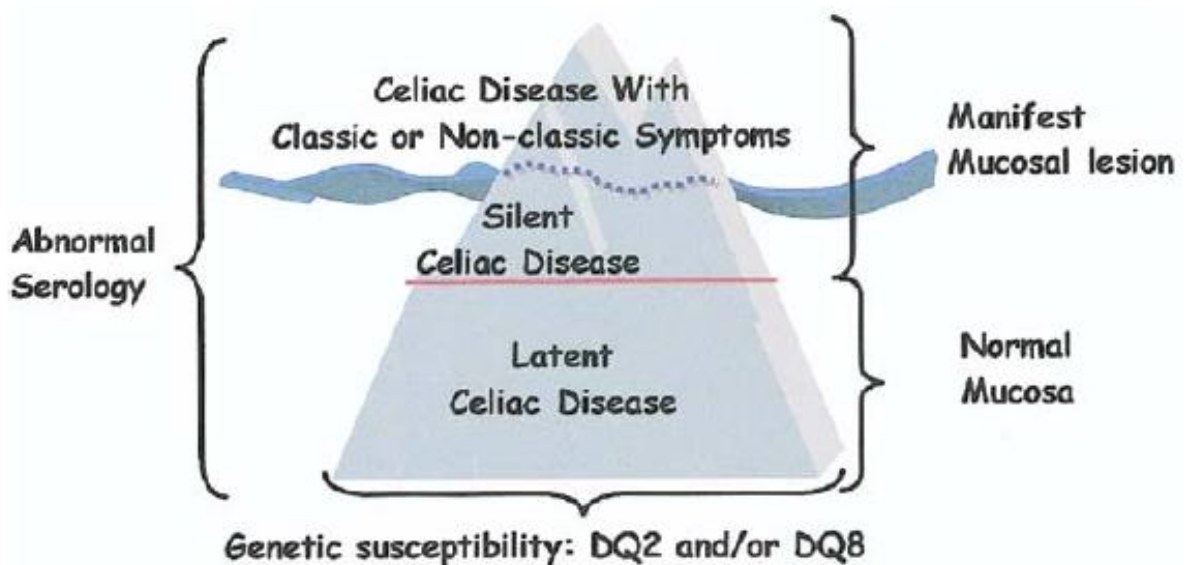
Σχήμα 1.4. Οι κλινικές εκδηλώσεις της κοιλιοκάκης στον παιδιατρικό πληθυσμό (<https://coeliac.org.nz/children-with-coeliac/>).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η κοιλιοκάκη μπορεί να ταξινομηθεί κλινικά στις παρακάτω τέσσερις μορφές, που μπορούν να απεικονιστούν και κατανεμηθούν υπό τη μορφή παγόβουνου (Σχήμα 1.5). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.5, στην κορυφή του παγόβουνου τοποθετούνται οι κλινικά διαγνωσμένες περιπτώσεις (η κλασική και η μη κλασική μορφή), με εκδήλωση συμπτωμάτων της κοιλιοκάκης. Στη βάση του παγόβουνου κάτω από την επιφάνεια του νερού, τοποθετούνται η ασυμπτωματική (σιωπηλή) και η λανθάνουσα μορφή της κοιλιοκάκης, με τη διάγνωση της νόσου να καθίσταται δύσκολη.

Η κλασική μορφή της νόσου διαγιγνώσκεται, κυρίως, σε παιδιά ηλικίας 6 έως 18 μηνών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ατροφία των εντερικών λαχνών, δυσαπορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, διάρροια και επιπλέον, ατροφία των μυών, μειωμένη όρεξη, κοιλιακή διάταση και αδυναμία ανάπτυξης (Ludvigsson et al., 2013; Tack et al., 2010). Παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας διαγιγνώσκονται με τη μη κλασική (άτυπη) μορφή της νόσου (Fasano,

2005; Paul et al., 2015). Η μη κλασική μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου και ελαφρά εντερικά συμπτώματα. Παρουσιάζονται και εξωεντερικά συμπτώματα, όπως η οστεοπόρωση, η αναιμία, η περιφερική νευροπάθεια και η υπογονιμότητα.

Η λανθάνουσα μορφή της κοιλιοκάκης χαρακτηρίζεται από θετικές ορολογικές διαγνωστικές εξετάσεις, αλλά φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο βάσει βιοψίας. Ένα ποσοστό ατόμων που πάσχουν από τη λανθάνουσα μορφή της νόσου, εάν συνεχίσουν να καταναλώνουν γλουτένη θα αναπτύξουν ατροφία των λαχνών ως αποτέλεσμα αυτής της κατανάλωσης. Άλλα άτομα μπορεί να μην εμφανίσουν ατροφία, με τον ορολογικό τους έλεγχο να καθίσταται αρνητικός (Tack et al., 2010).



Σχήμα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση του παγόβουνου της κοιλιοκάκης (Fasano, 2005).

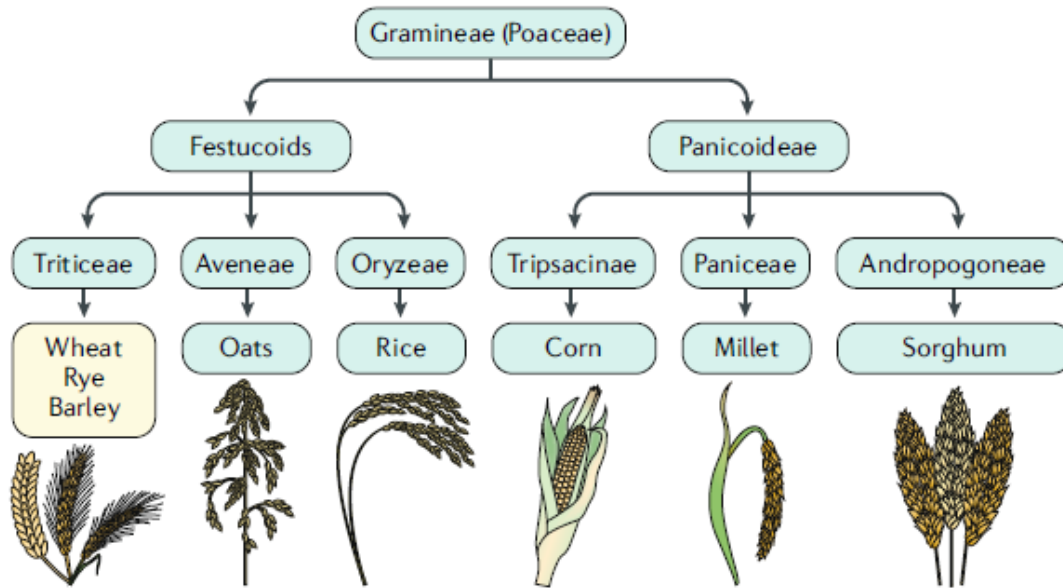
Τέλος, όσον αφορά την ασυμπτωματική (σιωπηλή) μορφή της νόσου, αυτή χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από θετικές ορολογικές διαγνωστικές εξετάσεις και μικρές εντερικές ανωμαλίες. Τα άτομα με την ασυμπτωματική μορφή της κοιλιοκάκης δεν εκδηλώνουν συμπτώματα χαρακτηριστικά της κοιλιοκάκης. Οι ασθενείς αυτοί διαγιγνώσκονται, συνήθως, μέσω της συμμετοχής τους σε πληθυσμιακούς ελέγχους ή σε στοχευμένες στρατηγικές για την ανίχνευση κοιλιοκάκης σε ασθενείς που πάσχουν από

νόσου, που συσχετίζονται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης (Ludvigsson et al., 2013; Tack et al., 2010).

1.2.4. Παθοφυσιολογία της νόσου

Η κοιλιοκάκη είναι μια χρόνια, πολύπλοκη ανοσοδιαμεσολαβούμενη διαταραχή, η οποία βασίζεται σε ποικίλους παράγοντες, συμπεριλαμβάνοντας γενετικούς παράγοντες προδιάθεσης για τη νόσο, αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Καίριο παράγοντα στην παθογένεση της κοιλιοκάκης αποτελεί η γλουτένη. Ο όρος *γλουτένη* προέρχεται από τη λατινική λέξη *glue* που σημαίνει «κόλλα». Η γλουτένη είναι η κύρια πηγή πρωτεϊνών στα σιτηρά στην οικογένεια των Αγρωστωδών (Gramineae) και στην τάξη των Triticeae, όπως το σιτάρι, η σίκαλη και το κριθάρι (Σχήμα 1.6) (Lebwohl et al., 2018). Η γλουτένη αποτελείται από τις γλιαδίνες, οι οποίες είναι διαλυτές στην αλκοόλη και τις γλουτενίνες, οι οποίες δεν είναι διαλυτές στην αλκοόλη. Στις γλιαδίνες συμπεριλαμβάνονται οι α-, γ- και ω-γλιαδίνες, ενώ οι γλουτενίνες διακρίνονται στις γλουτενίνες υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πλούσιες σε προλίνη και γλουταμινικό οξύ. Λόγω του υψηλού περιεχομένου σε προλίνη, είναι ανθεκτικές στην πέψη από γαστρικά και παγκρεατικά ένζυμα, αλλά και ένζυμα της ψηκτροειδούς παρυφής στο λεπτό έντερο. Συνεπώς, λόγω της ατελούς πέψης δημιουργούνται μακριά πεπτίδια γλιαδίνης, με το πεπτίδιο των 33 αμινοξέων να είναι το πιο ανοσογονικό (Lindfors et al., 2019).

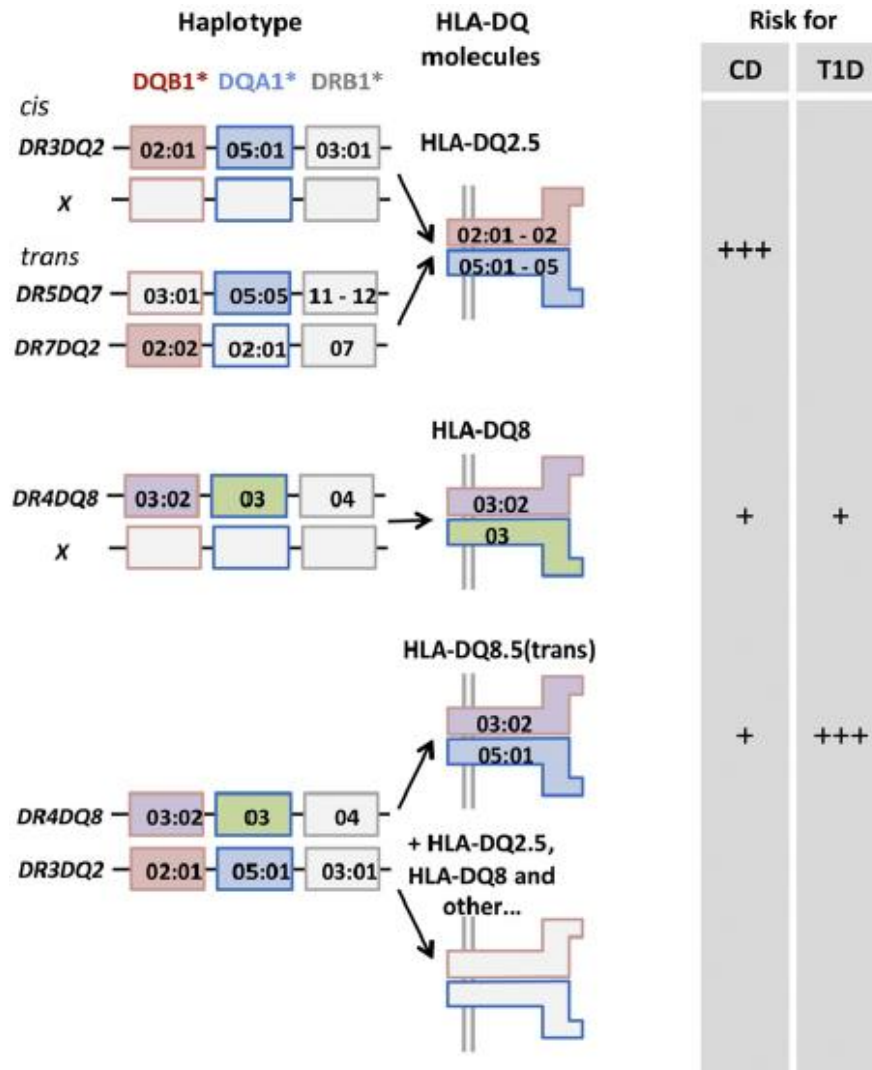


Σχήμα 1.6. Ταξινομική κατάταξη των Αγρωστωδών (Lindfors et al., 2019).

Η κοιλιοκάκη μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση, ύστερα από την κατανάλωση γλουτένης. Οι κύριοι γενετικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου είναι τα γονίδια *HLA-DQ2* και *HLA-DQ8* και εκτιμάται πως συνεισφέρουν στο 25%-40% στην εμφάνιση της κοιλιοκάκης (Lindfors et al., 2019). Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με κοιλιοκάκη φέρουν τα γονίδια HLA τάξης II, *HLA-DQA1* και *HLA-DQB1*, που κωδικοποιούν τις δύο αλυσίδες, α και β, του ετεροδιμερούς των πρωτεϊνών DQ2 και DQ8 στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Lebwohl et al., 2018). Το μόριο HLA-DQ2 (ή HLA-DQ2.5) κωδικοποιείται από τα αλληλόμορφα *HLADQA1*05:01* και *HLADQB1*02:01*, ενώ το HLA-DQ8 από τα *HLADQA1*03* και *HLADQB1*03:02*. Περισσότεροι από το 90% των ασθενών φέρουν το HLA-DQ2 και σχεδόν όλοι οι ασθενείς το HLA-DQ8. Ομοζυγώτες για το *HLA-DQ2.5* φέρουν τον υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Lindfors et al., 2019). Το 30-40% του γενικού πληθυσμού φέρει τουλάχιστον ένα εκ των προαναφερθέντων αλληλίων, αλλά η απουσία είτε του *HLA-DQ2* είτε του *HLA-DQ8* έχει αρνητική προγνωστική αξία της τάξης του 100%, αποκλείοντας τη διάγνωση της κοιλιοκάκης (Green et al., 2015).

Η πλειοψηφία των ασθενών εκφράζουν το HLA-DQ2.5 ετεροδιμερές. Τα αλληλόμορφα *HLADQA1*05:01* και *HLADQB1*02:01* μπορούν να βρίσκονται σε *cis* διάταξη στον *DR3DQ2* απλότυπο ή σε *trans* διάταξη σε ετεροζυγώτες *DR5DQ7* και *DR7DQ2*. Το HLA-

DQ8, που κωδικοποιείται από τον απλότυπο *DR4DQ8*, ενέχει μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, όπως και οι ετεροζυγώτες *DR3DQ2* και *DR4DQ8*, με τους τελευταίους να ενέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου I, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.7. (Meresse et al., 2012).



Σχήμα 1.7. Συσχέτιση των μορίων *HLA* τάξης II με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης και διαβήτη τύπου I (Meresse et al., 2012).

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως ενώ τα γονίδια *HLA* φαίνεται να ενέχουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου, μόνο το 3% των ατόμων που φέρουν τα DQ2 και DQ8 μόρια εμφανίζουν τη νόσο, υποδηλώνοντας πως τα γονίδια αυτά είναι αναγκαία, αλλά όχι ικανά για την εμφάνιση κοιλιοκάκης. Πρόσφατες μελέτες χαρτογράφησης ολόκληρου του

γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν εντοπίσει μη-HLA γενετικούς τόπους, που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη (Gutierrez-Achury et al., 2011). Τα περισσότερα μη-HLA γονίδια συσχετίζονται με την ανοσία, τα T- και B-λεμφοκύτταρα και τις κυτταροκίνες, που συσχετίζονται με αυτά (Meresse et al., 2012).

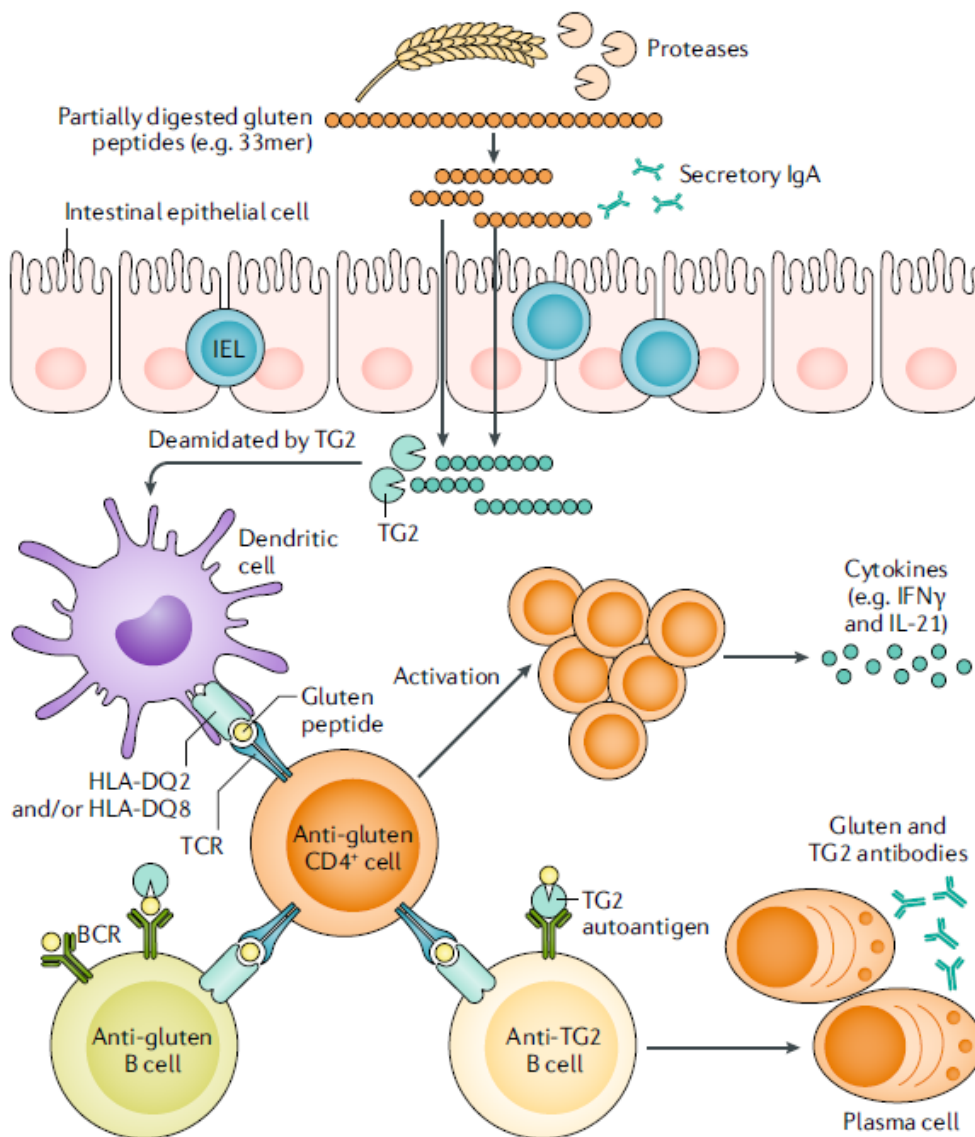
Επιπρόσθετα, παράγοντες που επηρεάζουν το γαστρεντερικό περιβάλλον κατά την πρώιμη παιδική ηλικία φαίνεται να ενέχουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου (Green et al., 2015). Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι ο θηλασμός. Βάσει μελετών, έχει φανεί πως βρέφη που θήλασαν, ενέχουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης και φαίνεται πως εάν εμφανίσουν τη νόσο, αυτό γίνεται αργότερα κατά τη διάρκεια της ζωής τους και με πιο ήπια συμπτώματα (Auricchio et al., 1983; D'Amico et al., 2005). Συνδυαστικά με το θηλασμό, καίριας σημασίας είναι το χρονικό διάστημα πρώτης επαφής του βρέφους με τη γλουτένη, καθώς το ποσό της γλουτένης, που καταναλώνεται κατά τη διάρκεια του απογαλακτισμού, φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση της κοιλιοκάκης. Διαφορές στην ποσότητα κατανάλωσης γλουτένης συσχετίζονται με μεταβολές στον επιπολασμό της νόσου. Ενδεικτικά, στη Σουηδία στα μέσα της δεκαετίας του 1980, παρατηρήθηκε αύξηση του επιπολασμού της νόσου κατά τέσσερις φορές σε παιδιά κάτω των δύο ετών, ύστερα από διπλασιασμό της κατανάλωσης σιτηρών, σίκαλης και κριθαριού. Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε από μελέτες. Συγκεκριμένα, βρέφη που κατανάλωσαν χαμηλά ποσά γλουτένης, όταν θήλαζαν, είχαν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης στη βρεφική ηλικία, με τον κίνδυνο αυτό να παραμένει χαμηλός και κατά την παιδική ηλικία (Ivarsson et al., 2002; Newton and Singer, 2012).

Επιπλέον, οι λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος φαίνεται να συμμετέχουν στην εμφάνιση της νόσου, χωρίς, όμως, να είναι γνωστός ο εν λόγω παθοβιολογικός μηχανισμός. Παιδιά που εμφάνιζαν τρεις ή περισσότερες λοιμώξεις πριν την ηλικία των έξι μηνών είχαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης πριν τα 2 έτη. Συγκεκριμένα, συχνές λοιμώξεις από ροταϊό σε άτομα με γενετική προδιάθεση αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της κοιλιοκάκης (Newton and Singer, 2012). Στους ενήλικες, έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση της κοιλιοκάκης σε ασθενείς, που λαμβάνουν θεραπεία με IFN-α έναντι της ηπατίτιδας Β (Meresse et al., 2012).

1.2.5. Ανοσολογική αντίδραση έναντι της γλουτένης

Η κοιλιοκάκη πυροδοτείται διατροφικά από την κατανάλωση γλουτένης σε άτομα με γενετική προδιάθεση. Μετά την κατανάλωση γλουτένης, οι πρωτεΐνες της πέπτονται, μερικώς, από γαστρικά και παγκρεατικά ένζυμα, αλλά και ένζυμα της ψηκτροειδούς παρυφής στο λεπτό έντερο. Τα προϊόντα της πέψης διαπερνούν τον επιθηλιακό φραγμό του γαστρεντερικού βλεννογόνου και εισέρχονται στο χόριο του βλεννογόνου, ενεργοποιώντας μηχανισμούς φυσικής και επίκτητης ανοσίας, οδηγώντας σε περαιτέρω φλεγμονή (Σχήμα 1.8 και Σχήμα 1.9).

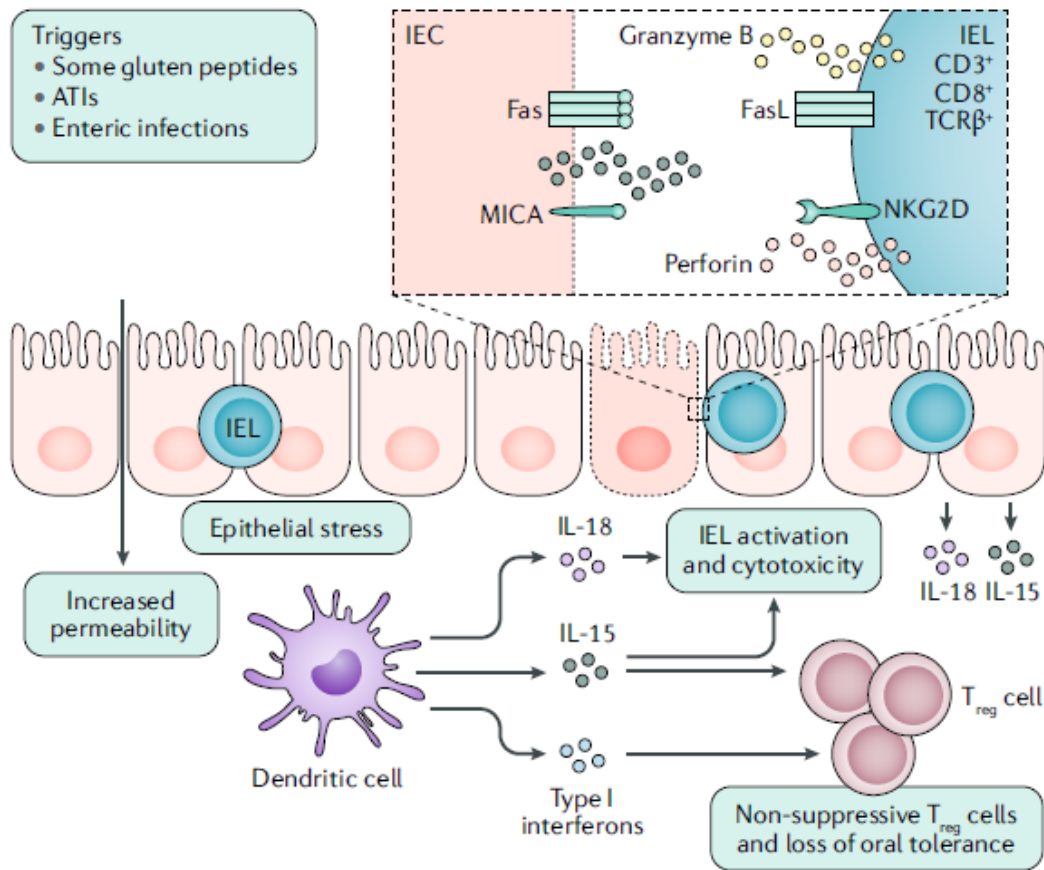
Τα θραύσματα της γλουτένης πυροδοτούν την έκκριση της ζονουλίνης από τα εντεροκύτταρα, μια πρωτεΐνη που χαλαρώνει τους στενοσυνδέσμους μεταξύ των εντεροκυττάρων. Έτσι, καθίσταται δυνατή η εισαγωγή των πεπτιδίων γλιαδίνης και γλουτενίνης στο χόριο του βλεννογόνου. Η ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας γίνεται με την απελευθέρωση της ιστικής τρανσγλουταμινάσης τύπου 2, tTG2, η οποία επιλεκτικά απαμινώνει τα πεπτίδια γλιαδίνης, που φέρουν το αμινοξύ γλουταμίνη σε συγκεκριμένες θέσεις. Τα κατάλοιπα γλουταμίνης αντικαθίστανται από γλουταμικό οξύ, αυξάνοντας τη συγγένειά τους με τα μόρια HLA-DQ2 και HLA-DQ8 στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πεπτίδια γλιαδίνης, που προσδένονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, να αναγνωρίζονται από τα CD4+ T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα μέσω των υποδοχέων των T-κυττάρων (T-cell receptors, TCRs). Κατόπιν ενεργοποίησής τους, τα T-βοηθητικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως η IFN- γ και η IL-21, δημιουργώντας ένα φλεγμονώδες περιβάλλον ως αποτέλεσμα της ιστικής καταστροφής (Leffler et al., 2015; Leonard et al., 2017; Lindfors et al., 2019). Μετά την ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων, ενεργοποιούνται B-λεμφοκύτταρα έναντι της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης τύπου 2, με αποτέλεσμα τη διαφοροποίησή τους προς πλασματοκύτταρα και την παραγωγή αντισωμάτων έναντι των απαμινωμένων πεπτιδίων της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης.



Σχήμα 1.8. Ανοσολογική αντίδραση έναντι γλουτένης (Lindfors et al., 2019).

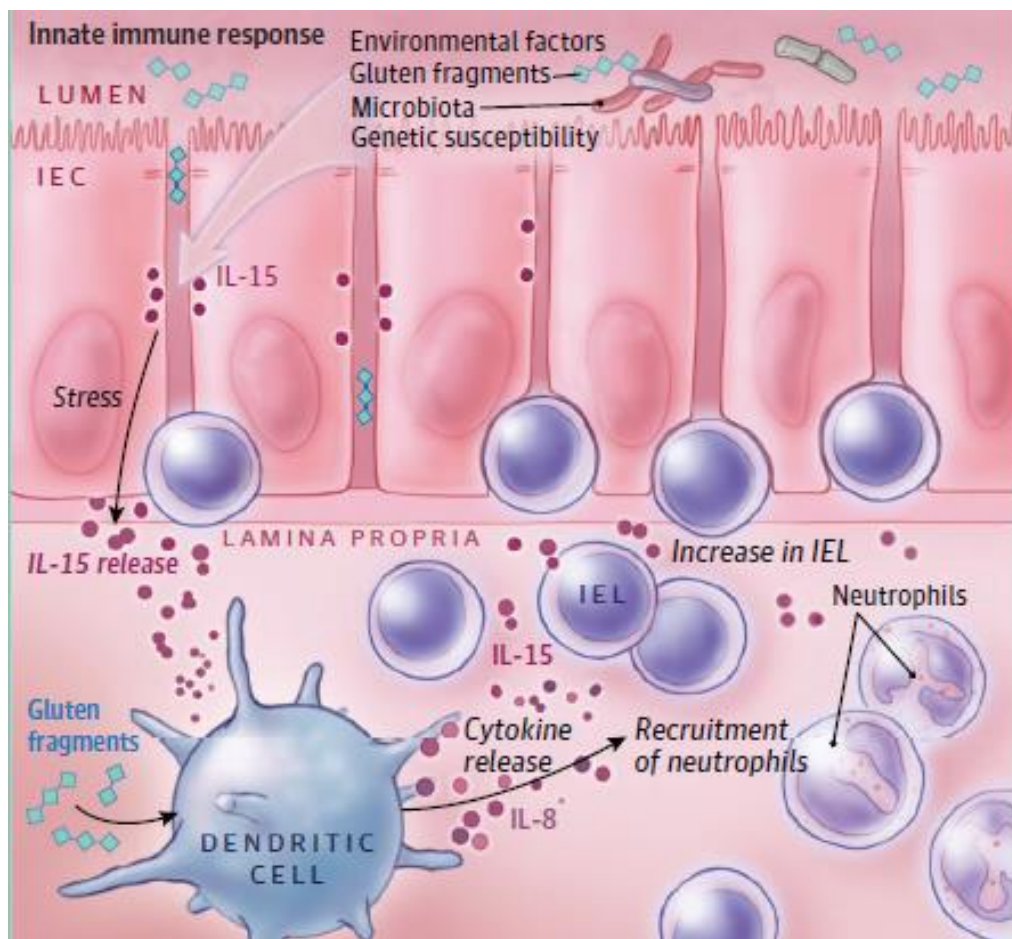
Επιπλέον, από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου ή/και από τα δενδριτικά κύτταρα εκκρίνονται κυτταροκίνες, όπως η IL-15 (ιντερλευκίνη 15), η IL-18 (ιντερλευκίνη 18) και οι τύπου I ιντερφερόνες. Η IL-15 είναι καίριας σημασίας, καθώς καταστέλλει τη δράση των T_{regs} με αποτέλεσμα την απώλεια της ανοχής και ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και προωθεί τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (Intraepithelial Lymphocytes, IELs) προς καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων. Τα IELs στην κοιλιοκάκη εμφανίζουν κυτταροτοξικά χαρακτηριστικά, προωθώντας την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων

μέσω διαφόρων μηχανισμών. Ενδεικτικά, τα IELs φέρουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα NKG2D, η έκφραση του οποίου αυξάνεται ως απάντηση στην IL-15. Ο προσδέτης του υποδοχέα (Quinn et al., 2015) βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα και ύστερα από αλληλεπίδραση MICA και NKG2D, προωθείται ο θάνατος των επιθηλιακών κυττάρων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ατροφία των κρυπτών (Lindfors et al., 2019).



Σχήμα 1.9. Μηχανισμός φυσικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι γλουτένης (Lindfors et al., 2019).

Στο μηχανισμό της φυσικής ανοσολογικής αντίδρασης συμμετέχουν κυτταροκίνες, όπως η IL-15 και η IFN- α , οι οποίες προωθούν τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων και των IELs προς συγκεκριμένη κατεύθυνση. Όπως φαίνεται και παρακάτω (Σχήμα 1.10), μετά την είσοδο των πεπτιδίων γλιαδίνης στο χόριο του βλεννογόνου, στρατολογούνται ουδετερόφιλα, κατόπιν παραγωγής IL-8, τα οποία οδηγούν σε περαιτέρω φλεγμονή (Leonard et al., 2017).



Σχήμα 1.10. Στρατολόγηση ουδετερόφιλων ως μέρος του μηχανισμού φυσικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι γλουτένης (Leonard et al., 2017).

1.2.6. Διάγνωση της νόσου

Η διάγνωση της κοιλιοκάκης βασίζεται, τόσο σε ορολογικές δοκιμασίες, όσο και σε ιστολογικές (βιοψίες), αλλά και σε γονοτύπηση των *HLA-DQ* γονιδίων. Η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας και Διατροφής (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, ESPGHAN) έχει θέσει βασικές κατευθυντήριες οδηγίες για τους παιδιατρικούς ασθενείς, τις οποίες ακολουθούν οι ιατροί για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης. Βάσει των οδηγιών αυτών, θα πρέπει να εξετάζονται παιδιά και έφηβοι με συμπτώματα, όπως η χρόνια διάρροια, η απώλεια βάρους, η μειωμένη ανάπτυξη, η ναυτία, το χρόνια κοιλιακό άλγος, κ.ά., αλλά και ασυμπτωματικά παιδιά και

έφηβοι, με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, λόγω διαβήτη τύπου I, σύνδρομο Down και άλλων αυτοάνοσων ασθενειών (π.χ. επιλεκτική ανεπάρκεια ανοσοσφαιρινών A, IgA), αλλά και λόγω πρώτου βαθμού συγγένειας με ασθενείς που πάσχουν από κοιλιοκάκη (Husby et al., 2012). Αντίστοιχα, θα πρέπει να εξετάζονται και ενήλικες που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Για τον ορολογικό έλεγχο απαιτείται οι ασθενείς να καταναλώνουν γλουτένη για ορισμένες ημέρες ή εβδομάδες πριν τη διενέργεια των εξετάσεων, καθώς τα αντισώματα στον ορό του αίματος έχουν χρόνο ημιζωής 30 έως 60 ημέρες. Όλες οι διαγνωστικές εξετάσεις έχουν αρνητική προγνωστική αξία σχεδόν 100%, γεγονός που σημαίνει ότι τιμές εντός του εύρους των φυσιολογικών τιμών αποκλείουν την ενεργή κοιλιοκάκη (Schuppan and Zimmer, 2013).

Συγκεκριμένα, μετρούνται τα αντισώματα IgA έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (anti-tTG). Η διαγνωστική αυτή εξέταση έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και είναι η πρώτη που διενεργείται στη διερεύνηση παρουσίας της κοιλιοκάκης. Η ανίχνευση αντισωμάτων IgA έναντι του ενδομυΐου (EMA) εμφανίζει 98% ειδικότητα και 83% θετική προγνωστική αξία για την ενεργή κοιλιοκάκη. Η εξέταση αυτή έχει χαρακτηριστεί ως ο χρυσός κανόνας (gold standard) για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στην κοιλιοκάκη, ωστόσο τα αποτελέσματά της είναι υποκειμενικά, καθώς βασίζεται σε έμμεσο ανοσοφθορισμό και είναι επίπονη και ακριβή δοκιμασία. Αντίθετα, η ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι της tTG2 γίνεται μέσω ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Επιπλέον, προσδιορίζονται αντισώματα έναντι των απαμινωμένων πεπτιδίων της γλιαδίνης (deamidated gliadin peptide antibodies, DGPA), τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στον παιδιατρικό πληθυσμό και ειδικά, σε βρέφη κάτω των 18 μηνών. Σε ασθενείς με επιλεκτική ανεπάρκεια αντισωμάτων IgA, μετρούνται τα επίπεδα των αντισωμάτων IgG έναντι της tTG ή του απαμινωμένου πεπτιδίου της γλιαδίνης. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως περίπου το 10% των ασθενών με κοιλιοκάκη δεν εμφανίζουν θετικές ορολογικές δοκιμασίες, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η ταυτοποίησή τους με τις προαναφερθείσες εξετάσεις. Σε αυτή την περίπτωση, η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση βλαβών στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου (Green et al., 2015; Leonard et al., 2017; Lindfors et al., 2019; Schuppan and Zimmer, 2013). Σήμερα, χρησιμοποιούνται ορισμένοι επιπρόσθετοι εργαστηριακοί έλεγχοι (*point-of-care tests*, POCT) για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του απαμινωμένου πεπτιδίου της γλιαδίνης και της tTG2, οι οποίοι παρέχουν γρήγορα και άμεσα αποτελέσματα, αλλά η χρήση

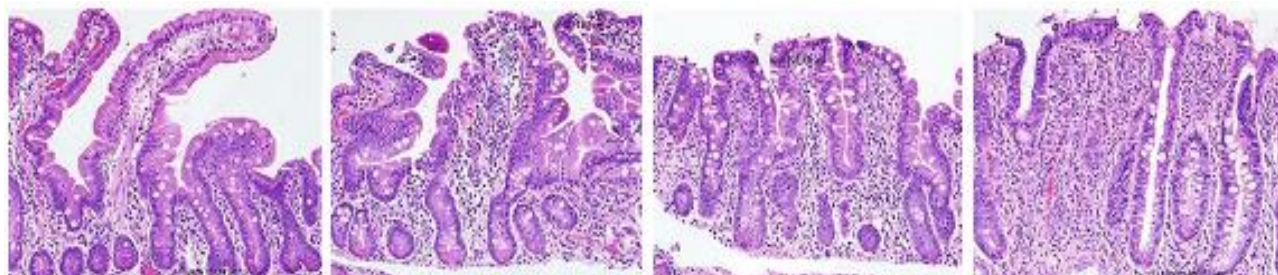
τους ακόμα παραμένει περιορισμένη, αφού και μετά την εφαρμογή τους πρέπει να γίνουν βιοψίες, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η διάγνωση της κοιλιοκάκης. Οι εν λόγω έλεγχοι, σε κάθε περίπτωση, δεν παρέχουν ποσοτικά αποτελέσματα κι έτσι, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπό τις κατευθυντήριες οδηγίες της ESPGHAN για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης στον παιδιατρικό πληθυσμό, απουσία βιοψίας (Prashant Singh et al., 2019). Συνεπώς, απαιτούνται επιπλέον μελέτες, προκειμένου να ενταχθούν στην καθιερωμένη κλινική πρακτική (Lindfors et al., 2019).

Η γονοτύπηση για την ύπαρξη ή όχι των *HLA-DQ2* και *HLA-DQ8* είναι πολύ χρήσιμη για τον αποκλεισμό της κοιλιοκάκης, καθώς έχει αρνητική προγνωστική αξία σχεδόν 100%. Σύμφωνα με την ESPGHAN και τις αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες του 2012, η γονοτύπηση πρέπει να γίνεται σε παιδιά και εφήβους, με αβέβαιη διάγνωση κοιλιοκάκης ή με παθήσεις σχετιζόμενες με την κοιλιοκάκη. Αυτοί μπορεί να είναι ασθενείς με αρνητικές ορολογικές εξετάσεις και ήπια διήθηση στα δείγματα των βιοψιών. Η γονοτύπηση μπορεί να ενισχύσει τη διάγνωση σε παιδιά με έντονη υποψία κοιλιοκάκης, με θετικές ορολογικές εξετάσεις, που δε θα υποβληθούν σε λήψη δειγμάτων για βιοψία (Husby et al., 2012; Lebwohl et al., 2018).

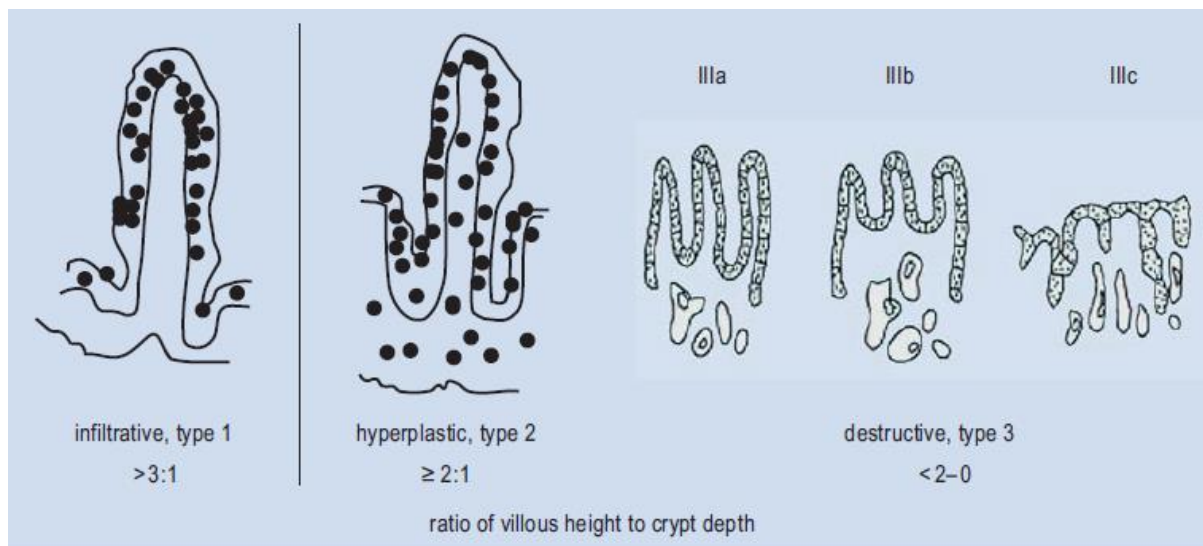
Σημαντικό ρόλο στη διάγνωση της κοιλιοκάκης ενέχει η λήψη βιοψιών από το λεπτό έντερο των ασθενών. Όσον αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, βάσει των οδηγιών της ESPGHAN, ακολουθείται στρατηγική αποφυγής βιοψίας, διότι πολλές φορές η γαστροσκόπηση που είναι απαραίτητη για τη λήψη των βιοψιών απαιτεί γενική αναισθησία. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, παιδιά με συμπτώματα κοιλιοκάκης, τίτλο anti-tTG2 10 φορές υψηλότερο του φυσιολογικού, παρουσία αντισωμάτων έναντι του ενδομυΐου στο αίμα και παρουσία των *HLA-DQ2* ή *HLA-DQ8*, δεν απαιτείται να υποβληθούν σε λήψη δειγμάτων για βιοψία, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της κοιλιοκάκης. Σε ενήλικες, ωστόσο, αυτή η στρατηγική φαίνεται να μην είναι η κατάλληλη, καθώς απαιτείται η λήψη δειγμάτων για βιοψία, προκειμένου να γίνει η διάγνωση, σε συνδυασμό με θετικές ορολογικές εξετάσεις (Lebwohl et al., 2018; Jonas F. Ludvigsson et al., 2014).

Οι ασθενείς, που πρόκειται να υποβληθούν σε λήψη βιοψιών, πρέπει να καταναλώνουν γλουτένη για τουλάχιστον δύο έως οχτώ εβδομάδες, πριν την εξέταση και πρέπει να λαμβάνονται τέσσερα έως έξι δείγματα, προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής λήψη

δειγμάτων της ανομοιογενούς εξέλιξης της νόσου. Χαρακτηριστικές ενδείξεις της νόσου αποτελούν η ατροφία των λαχνών του λεπτού εντέρου, η διήθηση των ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων και η υπερπλασία των κρυπτών (Went et al., 2019). Στο Σχήμα 1.11 φαίνεται χαρακτηριστικά η αλλοίωση της αρχιτεκτονικής του βλεννογόνου. Από αριστερά προς τα δεξιά στο Σχήμα 1.11, στο πρώτο πλαίσιο απεικονίζεται ο φυσιολογικός βλεννογόνος, στο δεύτερο πλαίσιο παρατηρείται η φλεγμονή του βλεννογόνου με υπερπλασία των κρυπτών και στο τρίτο και τέταρτο πλαίσιο της εικόνας φαίνεται η πρόοδος της νόσου με ατροφία των λαχνών και υπερπλασία των κρυπτών (Lindfors et al., 2019). Η αξιολόγηση του επιθηλίου πραγματοποιείται, σύμφωνα με την κατάταξη του Marsh, σε κλίμακα 0-4, με το «0» να αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό επιθήλιο και το «4» το υποπλαστικό (Σχήμα 1.12) (Marsh, 1992). Συνήθως, λαμβάνονται από το δωδεκαδάκτυλο, τουλάχιστον, τέσσερις βιοψίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις συμπτωματικών ασθενών με κοιλιοκάκη παρατηρείται αλλοίωση της κλίμακας Marsh 3, με επιμέρους στάδια Marsh 3 a-c προς πλήρη απώλεια των λαχνών. Επιπλέον, εάν παρατηρείται υπερπλασία των κρυπτών με τουλάχιστον 25 IELs/ 100 εντεροκύτταρα, θετικές ορολογικές εξετάσεις, και απουσία ατροφίας των λαχνών, τότε γίνεται λόγος για την αλλοίωση Marsh 2 (Schuppan and Zimmer, 2013).



Σχήμα 1.11. Αλλοίωση της αρχιτεκτονικής του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου (Lindfors et al., 2019).

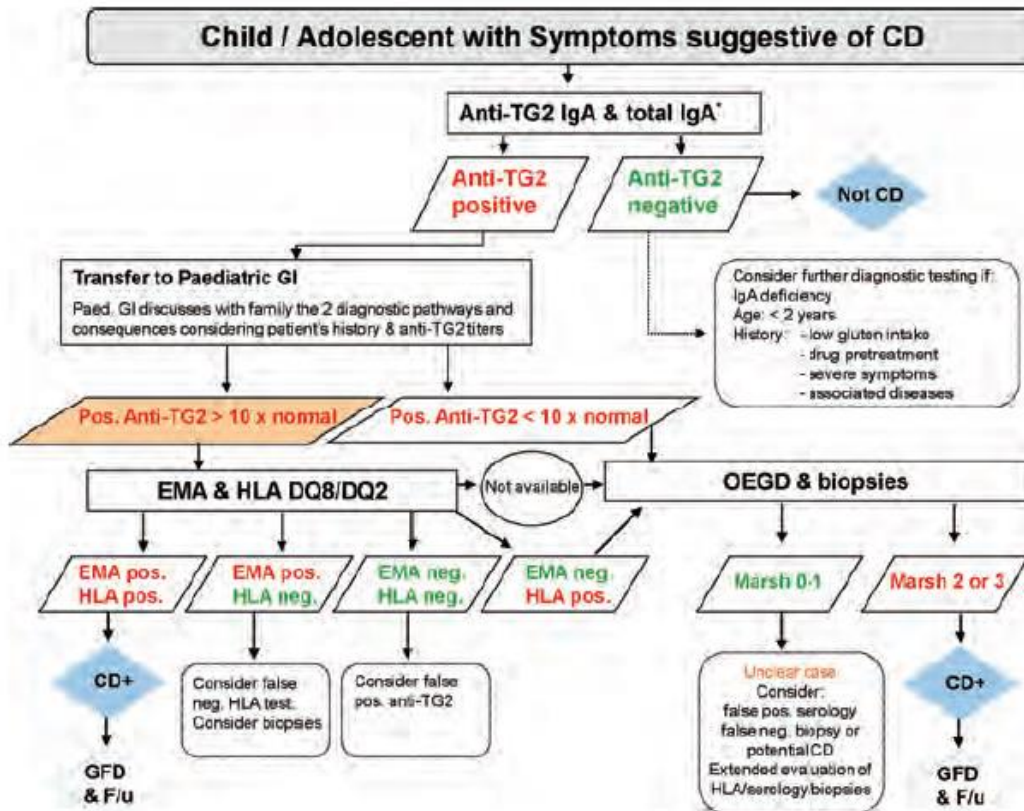


Σχήμα 1.12. Κατάταξη Marsh-Oberhuber των αλλοιώσεων του βλεννογόνου στην κοιλιοκάκη (Schuppan and Zimmer, 2013).

Ο αλγόριθμος, που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης σε παιδιά και εφήβους με υποψία της νόσου, βάσει των κριτηρίων της ESPGHAN φαίνεται στο Σχήμα 1.13 (Husby et al., 2012).

Επισημαίνεται πως η διάγνωση της νόσου στον παιδιατρικό πληθυσμό παραμένει δύσκολη, με το 90% των παιδιών να μη διαγιγνώσκονται ορθά, με αποτέλεσμα να ενέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών και ασθενειών, που σχετίζονται με την κοιλιοκάκη στη μη διαγνωσμένη μορφή της (Ravikumara et al., 2007).

Επιπλέον, δύσκολη καθίσταται και η διαφοροδιάγνωση της κοιλιοκάκης. Στην κοιλιοκάκη, η διαδικασία αυτή είναι περίπλοκη, αφού πολλές φορές ασθενείς με κοιλιοκάκη φέρουν αρνητικά αποτελέσματα στις ορολογικές δοκιμασίες, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η διάγνωση από τον κλινικό ιατρό (Pallav et al., 2012). Επιπρόσθετα, τα συμπτώματα της κοιλιοκάκης και τα ιστολογικά ευρήματα αυτής είναι παρόμοια με άλλες ασθένειες, όπως είναι η νόσος του Crohn και το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου, προσθέτοντας, έτσι, άλλο ένα εμπόδιο στη διαφορική διάγνωση της κοιλιοκάκης (Lundin and Sollid, 2014; Pallav et al., 2012).



Σχήμα 1.13. Αναπαράσταση του αλγόριθμου διάγνωσης της κοιλιοκάκης βάσει των κριτηρίων της ESPGHAN (Husby et al., 2012).

1.2.7. Διαχείριση της νόσου

Η μόνη γνωστή θεραπεία για την κοιλιοκάκη είναι η υιοθέτηση αυστηρής διαίτας χωρίς γλουτένη. Η διαίτα ελεύθερη γλουτένης (Gluten Free Diet, GFD) αποκλείει από τη διατροφή του ασθενούς τρόφιμα που περιέχουν γλουτένη, όπως το σιτάρι, η σίκαλη, το κριθάρι και κατ' επέκταση το ψωμί, τα ζυμαρικά, τα δημητριακά, τις ζύμες, αλλά και τροφές (π.χ. σάλτσες) που περιέχουν γλουτένη ως μέσο σταθεροποίησης και ενίσχυσης της γεύσης. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), τρόφιμα ελεύθερα γλουτένης θεωρούνται αυτά που περιέχουν <20ppm (parts per million) γλουτένη (Lindfors et al., 2019). Εάν τηρηθεί η διαίτα, τα συμπτώματα βελτιώνονται, σταματά η διάρροια και το κοιλιακό άλγος, κανονικοποιούνται οι

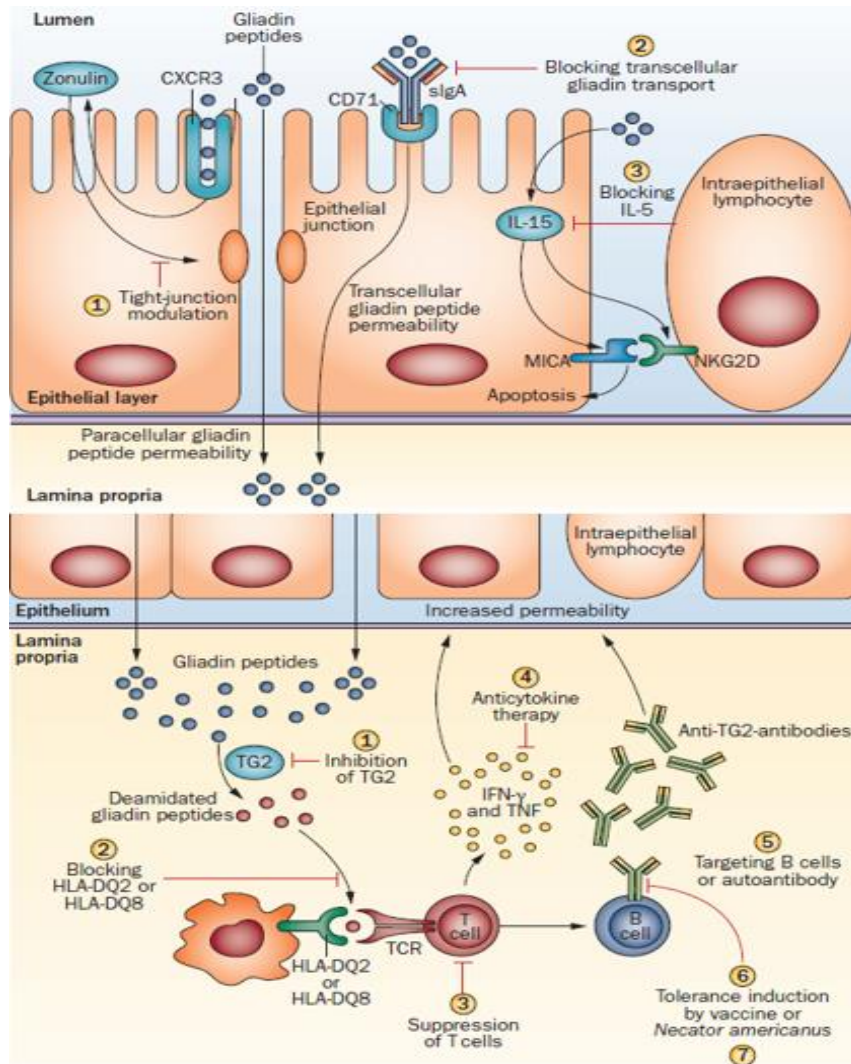
τιμές των αντισωμάτων έναντι της tTG2 στον ορό και τέλος, βελτιώνονται και κανονικοποιούνται τα ιστολογικά ευρήματα (Lebwohl et al., 2015). Συγκεκριμένα, στα παιδιά, τα συμπτώματα βελτιώνονται, συχνά, εντός δύο έως τεσσάρων εβδομάδων, ενώ πλήρης επούλωση του βλεννογόνου παρατηρείται μετά από δύο έτη συμμόρφωσης, με δίαιτα ελεύθερη γλουτένης (Newton and Singer, 2012).

Η συμμόρφωση, ωστόσο, με μια δίαιτα ελεύθερη γλουτένης δια βίου είναι δύσκολη και απαιτητική. Τα τρόφιμα χωρίς γλουτένη είναι πολύ πιο ακριβά από τα αντίστοιχα που περιέχουν γλουτένη. Επιπλέον, είναι πιθανό να δυσχεραίνεται η κοινωνική ζωή του ασθενούς, καθώς σε εκδηλώσεις, όπως διάφοροι εορτασμοί, αλλά και γεύματα σε εστιατόρια, οι επιλογές είναι περιορισμένες (Lebwohl et al., 2015). Συγκεκριμένα, στον παιδιατρικό πληθυσμό έχει φανεί πως η υιοθέτηση δίαιτας χωρίς γλουτένη, καθίσταται ευκολότερη, εάν υπάρχει συχνή παρακολούθηση των παιδιών από τον παιδίατρο, σε σχέση με τα παιδιά που παρακολουθούνται ετησίως ή καθόλου. Είναι σημαντικό οι ασθενείς κατά τον επανέλεγχό τους να εξετάζονται για τα επίπεδα σιδήρου, ασβεστίου, φολικού οξέος, βιταμινών B6 και B12, καθώς έχει βρεθεί ότι η δίαιτα χωρίς γλουτένη είναι ανεπαρκής σε φυτικές ίνες, ασβέστιο και σίδηρο και πλούσια σε πρωτεΐνες και λιπίδια (Valitutti et al., 2017).

Λόγω των δυσκολιών που ενέχει η εφ' όρου ζωής δίαιτα ελεύθερη γλουτένης (Σχήμα 1.14), έχει προταθεί η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων σιτηρών, που θα περιέχουν γλουτένη, χωρίς, όμως, τις ανοσογονικές πρωτεΐνες. Βέβαια, μια τέτοια προσέγγιση θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους της ήδη ακριβής δίαιτας χωρίς γλουτένη. Επιπλέον, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί θεραπεία με πρωτεάσες, βασιζόμενη στην πέψη των πεπτιδίων της γλουτένης σε μικρότερα μη τοξικά πεπτίδια, προτού αυτά φτάσουν στο εντερικό επιθήλιο. Επιπρόσθετα, γίνεται λόγος και για ενζυμική θεραπεία. Τα σιτηρά περιέχουν ένα σύνολο ενδογενών πρωτεασών, που πέπτουν τη γλουτένη κατά τη βλάστηση, προκειμένου να εξασφαλίσουν θρεπτικά συστατικά για το αναπτυσσόμενο φυτό. Έχει δημιουργηθεί ένα ενζυμικό προϊόν, το ALV003 (Alvine Pharmaceuticals, San Carlos, CA, USA), που περιέχει σε αναλογία 1:1 το ένζυμο EP-B2 (πρωτεάση στο κριθάρι) και την ενδοπεπτιδάση PEP του *Sphingomonas capsulate*. Το φάρμακο αυτό βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές στη Φάση II, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Kaukinen et al., 2014).

Μια διαφορετική στρατηγική περιλαμβάνει τη χρήση οξικής λαραζοτιδής (larazotide acetate), η οποία είναι ένα οκταπεπτίδιο προερχόμενο από μια εντεροτοξίνη του *Vibrio cholerae*, που περιέχει ένα κοινό μοτίβο με τη ζονουλίνη. Δρα ανταγωνιστικά με τη ζονουλίνη και εμποδίζει τη διαπερατότητα λόγω γλιαδίνης, ισχυροποιώντας, έτσι, τους στενοσυνδέσμους. Με τη χρήση λαραζοτιδής, οι ασθενείς θα μπορούν να καταναλώσουν μικρά ποσά γλουτένης για μικρό χρονικό διάστημα (Caio et al., 2019; Kaukinen et al., 2014). Επιπρόσθετα, διερευνάται η χρήση αναστολέων, ώστε να αποφευχθεί η είσοδος των πεπτιδίων γλιαδίνης από το εντερικό επιθήλιο, μέσω μηχανισμού, που περιλαμβάνει σύμπλοκα πεπτιδίων γλιαδίνης με εκκριτική ανοσοσφαιρίνη Α (secretory IgA, sIgA), τα οποία προσδέονται στον υποδοχέα της τρανσφερίνης CD71. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της IL-15, φαίνεται μία υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική στην κοιλιοκάκη. Εφόσον τα πεπτίδια γλιαδίνης διαπεράσουν τον επιθηλιακό φραγμό και εισέλθουν στο χόριο του βλεννογόνου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναστολείς της ιστικής τρανσγλουταμινάσης τύπου II, αλλά και πεπτιδικά ανάλογα που θα δρουν ανταγωνιστικά με τα HLA-DQ2 και HLA-DQ8 μόρια, προκειμένου να αποφευχθεί η αντιγονοπαρουσίαση και κατ' επέκταση, η περαιτέρω ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Εν συνεχεία, η καταστολή των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του TNF και της IFN-γ (Kaukinen et al., 2014).

Στον παιδιατρικό πληθυσμό η διαίτα ελεύθερη γλουτένης θα πρέπει να καθορίζεται από ειδικό διατροφολόγο, που να ασχολείται με την παιδική διατροφή, άμεσα μετά τη διάγνωση της κοιλιοκάκης. Συνίσταται ο επανέλεγχος των παιδιών κάθε τρεις έως έξι μήνες για το πρώτο έτος μετά τη διάγνωση και μετέπειτα, ετησίως. Κατά τον επανέλεγχο θα πρέπει ο κλινικός ιατρός να εξετάζει τη συμμόρφωση ή μη του παιδιού με τη διαίτα ελεύθερη γλουτένης, τόσο με συστημικά συμπτώματα, όπως αυξημένη δίψα και κούραση, απώλεια βάρους ή έντονη αύξηση βάρους, όσο και με ορολογικές εξετάσεις. Ο ορολογικός επανέλεγχος πραγματοποιείται έξι μήνες μετά την υιοθέτηση διαίτας χωρίς γλουτένη, προκειμένου να εξεταστεί, εάν τα επίπεδα των anti-tTG2 είναι εντός φυσιολογικών ορίων (Paul et al., 2015; Valitutti et al., 2017).



Σχήμα 1.14. Σχηματική αναπαράσταση προτεινόμενων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία της κοιλιοκάκης (Kaukinen et al., 2014).

1.2.8. Κοιλιοκάκη και Th1 ανοσία

Είναι γνωστό πως κατά την ανοσολογική αντίδραση έναντι της γλουτένης, δημιουργείται ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, με τα CD4⁺ T κύτταρα να διαφοροποιούνται προς το μονοπάτι της Th1 κυτταρικής ανοσίας, με ταυτόχρονη έκκριση κυτταροκινών της Th1 ανοσίας (π.χ. IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-21) (Mazzarella, 2015). Αυτή η έκκριση κυτταροκινών, οδηγεί σε κλωνική επέκταση των ενεργοποιημένων T-κυττάρων,

ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων, τραυματίζοντας, έτσι, το εντερικό επιθήλιο, αλλά και στρατολόγηση των B-κυττάρων και παραγωγή αντισωμάτων έναντι της γλιαδίνης και της tTG2. Η ανάπτυξη αποκρίσεων έναντι του εαυτού πυροδοτείται μέσω του φαινομένου της μοριακής μίμησης και της διάχυσης αντιγόνων (Newton and Singer, 2012). Αναζητώντας τη σχέση κοιλιοκάκης και αιματολογικών κακοηθειών, βάσει βιβλιογραφίας, έχει βρεθεί πως στο φλεγμονώδες περιβάλλον της κοιλιοκάκης, εντοπίζεται μια υποομάδα CD103+ ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων (Went et al., 2019), τα οποία μπορούν να επεκταθούν κλωνικά, δίνοντας CD103+ λεμφώματα και να αυξήσουν επιλεκτικά την απόκρισή τους στην IL-15, αναπτύσσοντας κυτταροτοξικότητα έναντι των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Ettersperger et al., 2016). Η IL-15, κυτταροκίνη της Th1 ανοσίας, ενεργοποιεί τα IELs, συνεργατικά με την IL-21 και ενισχύει την επιβίωσή τους, ενεργοποιώντας αντι-αποπτωτικά μονοπάτια (Malamut et al., 2010; Meresse et al., 2012). Τα μη φυσιολογικά IELs, σταδιακά, αντικαθιστούν ή/και εξαλείφουν τους φυσιολογικούς υποτύπους των CD8+CD3+TCRαβ+ και CD8+/-CD3+TCRγδ+ κυττάρων και έχουν την ικανότητα να διασπείρονται στο χόριο του βλεννογόνου, στο αίμα και εξωεντερικά, υποδεικνύοντας, έτσι, τον κακοήθη χαρακτήρα τους (Malamut et al., 2010). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εξηγήσει τη συννοσηρότητα της κοιλιοκάκης με το T-λέμφωμα εντεροπαθούς εκδήλωσης, συχνή επιπλοκή της κοιλιοκάκης, χωρίς, όμως, να είναι κατανοητός ο μοριακός μηχανισμός συννοσηρότητας με το γενικότερο πλαίσιο των αιματολογικών κακοηθειών.

1.3. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ

Λόγω της παθοφυσιολογίας της κοιλιοκάκης και του γεγονότος ότι αποτελεί μια χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη διαταραχή, δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την εκδήλωση σοβαρών επιπλοκών, αυτοάνοσων ασθενειών, αλλά και αιματολογικών κακοηθειών. Συγκεκριμένα, η διάγνωση της κοιλιοκάκης μετά την ηλικία των 50 χρόνων ή/και η μη συμμόρφωση με δίαιτα ελεύθερη γλουτένης, δυσχεραίνουν την πρόγνωση, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Caio et al., 2019).

Σε πολλές περιπτώσεις ασθενών με κοιλιοκάκη, καταγράφεται η εκδήλωση άλλων ασθενειών, είτε λόγω κοινών γενετικών παραγόντων και μηχανισμών παθογένεσης, είτε

λόγων άλλων απροσδιόριστων παραγόντων (Leonard et al., 2017). Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με κοιλιοκάκη έχουν περιγραφεί πληθώρα ηπατοχολικών διαταραχών, όπως η πρωτοπαθής χολική χολαγγειίτιδα (primary biliary cirrhosis, PBC), η αυτοάνοση ηπατίτιδα (autoimmune hepatitis, AIH) και η πρωτογενής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (primary sclerosing cholangitis, PSC)(Lauret and Rodrigo, 2013). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως ασθενείς με κοιλιοκάκη ενέχουν αυξημένο κίνδυνο (κατά 4 φορές) για την εμφάνιση πρωτογενούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας (Ludvigsson et al., 2007). Η συσχέτιση της πρωτοπαθούς χολικής χολαγγειίτιδας με την κοιλιοκάκη φαίνεται να έγκειται στην επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος στο χολικό επιθήλιο και το επιθήλιο του λεπτού εντέρου (Sorensen et al., 1999). Η αυξημένη εντερική διαπερατότητα, σε συνδυασμό με τη συστηματική κυκλοφορία των αντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης, προτείνεται ως πιθανή αιτία ανάπτυξης αυτοάνοσης ηπατίτιδας σε ασθενείς με κοιλιοκάκη. Τα αντισώματα αυτά πιθανά τροποποιούν αντιγόνα του εαυτού ή μη εαυτού, δημιουργώντας νέα αντιγόνα, υπεύθυνα για τον τραυματισμό του ήπατος (Panetta et al., 2012).

Επιπλέον, έχουν καταγραφεί και διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος, όπως ο διαβήτης τύπου I (Type 1 Diabetes, T1D). Πιο συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της κοιλιοκάκης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου I υπολογίζεται στο 4%, με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης να είναι υψηλότερος στο διαβήτη της παιδικής ηλικίας (Pham-Short et al., 2012). Έχει βρεθεί πως η εμφάνιση διαβήτη τύπου I, μετά την εμφάνιση κοιλιοκάκης, είναι υψηλότερη σε ασθενείς κάτω των 20 ετών, παρουσιάζοντας σχετικό κίνδυνο (hazard ratio) 2,4 (95% CI, 1,9-3,0). Ως προς τη γενετική βάση συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με το διαβήτη τύπου I, είναι γνωστό πως ασθενείς με T1D φέρουν τα HLA-DQ2 ή DQ8 μόρια κινδύνου σε ποσοστό 90%, ενώ ο γενικός πληθυσμός σε ποσοστό 40%. Επίσης, η ομοζυγωτία για τα μόρια DR3-DQ2 σε ασθενείς με T1D ενέχει κίνδυνο 33% για την παρουσία αντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης, ενώ λιγότερο από το 2% των ασθενών με T1D, που δε φέρουν τα μόρια HLA-DQ2 ή DQ8, φέρουν αυτοαντισώματα, σχετιζόμενα με την κοιλιοκάκη (Lauret and Rodrigo, 2013).

Όσον αφορά τις παθήσεις του θυρεοειδούς, έχει βρεθεί πως ο επιπολασμός της κοιλιοκάκης σε ασθενείς με νόσο του Graves (Graves' disease) ή θυρεοειδίτιδα Hashimoto (Hashimoto's thyroiditis) κυμαίνεται μεταξύ 2% και 7%. Αντίστοιχα, ο κίνδυνος εμφάνισης παθήσεων του θυρεοειδούς είναι αυξημένος κατά τρεις φορές σε ασθενείς με κοιλιοκάκη, σε

σχέση με το γενικό πληθυσμό (Lauret and Rodrigo, 2013). Η συννοσηρότητα της κοιλιόκακης και αυτοάνοσων παθήσεων του θυρεοειδούς εξηγείται βάσει κοινής γενετικής προδιάθεσης, όπως η συσχέτιση του γονιδίου *CTLA4* με την κοιλιόκακη, αλλά και την εμφάνιση αυτοανοσίας του θυρεοειδούς. Επιπλέον, τα αντισώματα έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης φαίνεται να αντιδρούν με τον ιστό του θυρεοειδούς, με την πρόσδεση αυτή να συνεισφέρει στην ανάπτυξη παθήσεων του θυρεοειδούς (Ch'ng et al., 2007; Naiyer et al., 2008).

1.3.1. Κοιλιόκακη και αιματολογικές κακοήθειες

Η κοιλιόκακη φαίνεται να έχει σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικών κακοηθειών, νεοπλασμάτων και λεμφωμάτων. Η πρώτη καταγραφή αυτής της σχέσης πραγματοποιήθηκε το 1937 από τους Fairly και Mackie, οι οποίοι παρατήρησαν πως ασθενείς με λέμφωμα εμφάνιζαν και συμπτώματα κοιλιόκακης (Fairley and Mackie, 1937). Το 1962 ο Gough και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την εμφάνιση κακοήθους λεμφώματος του λεπτού εντέρου σε ασθενείς που έπασχαν από κοιλιόκακη (Gough et al., 1962). Έκτοτε, έχει περιγραφεί μια σειρά λεμφωμάτων σχετιζόμενα με την κοιλιόκακη, με την πιο συχνή κακοήθεια σχετιζόμενη με την κοιλιόκακη να είναι το T-λέμφωμα εντεροπαθούς εκδήλωσης (Enteropathy Associated T cell Lymphoma, EATL). Πρόκειται για μια μορφή T-λεμφώματος non-Hodgkin, που αναπτύσσεται στο λεπτό έντερο (Catassi et al., 2002; Green et al., 2003). Άλλοι τύποι λεμφωμάτων, που έχουν καταγραφεί σε ασθενείς με κοιλιόκακη, περιλαμβάνουν τα λεμφώματα B-κυττάρων (διάχυτο από μεγάλα B-κύτταρα λέμφωμα) και τα T-λεμφώματα, που δεν είναι εντεροπαθούς εκδήλωσης (περιφερικό λέμφωμα T-κυττάρων). Η πρόγνωση των ασθενών με B- και T-λεμφώματα non-Hodgkin διαφέρει, με τους ασθενείς με λέμφωμα T-κυττάρων να έχουν χειρότερη πρόγνωση, σε σχέση με τους ασθενείς με λέμφωμα B-κυττάρων (Halfdanarson et al., 2010). Εκτός αυτών, έχει βρεθεί αυξημένη συχνότητα εμφάνισης λεμφώματος του μανδύα (Mantle Cell Lymphoma) και λεμφώματος οριακής ζώνης (Marginal Zone Lymphoma) σε ασθενείς με κοιλιόκακη (Leslie et al., 2012). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί ελάχιστες περιπτώσεις συννοσηρότητας της κοιλιόκακης με την οξεία μυελοειδή λευχαιμία, τόσο σε παιδιά, όσο και σε ενήλικες (Aggarwal, 2013).

Ο μηχανισμός συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με τις αιματολογικές κακοήθειες παραμένει άγνωστος, αλλά πιθανά οφείλεται σε μια πληθώρα παραγόντων. Η αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου, λόγω της έκκρισης ζονουλίνης από τα εντεροκύτταρα και της καταστροφής του από τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα, σε συνδυασμό με τη χρόνια διέγερση από αντιγόνα (γλουτένη), την έκκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, λόγω της δίαιτας ελεύθερης γλουτένης, μπορούν να συνδράμουν στην ανάπτυξη κακοηθειών (Green et al., 2003). Προτείνεται πως τα λεμφώματα T-κυττάρων προκύπτουν από δραστικά T-κύτταρα, καθότι σε ασθενείς με T-λέμφωμα εντεροπαθούς εκδήλωσης εντοπίστηκαν πανομοιότυποι μονοκλωνικοί πληθυσμοί T-κυττάρων (Green and Jabri, 2002). Η αυξημένη έκκριση IL-15 στο φλεγμονώδες περιβάλλον της κοιλιοκάκης μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη λεμφωμάτων, αφού προωθεί την ανάπτυξη των B- και NK- κυττάρων, αλλά και τον πολλαπλασιασμό κακοηθών B-κυττάρων (Fehniger and Caligiuri, 2001). Έχει βρεθεί μια υποομάδα CD103+ IELs στο έντερο, τα οποία ταυτοποιούνται λόγω της ύπαρξης της πρωτεΐνης iCD3 (Intracellular CD3 protein). Στην κοιλιοκάκη εντοπίζονται CD103+ λεμφώματα, λόγω κλωνικής επέκτασης των CD103-iCD3+ IELs, που απαντούν επιλεκτικά στην IL-15 και αναπτύσσουν κυτταροτοξικότητα όμοια των NK κυττάρων έναντι των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Ettersperger et al., 2016). Συνεπώς, φαίνεται πως η αυξημένη εντερική διαπερατότητα, το φλεγμονώδες περιβάλλον και η επακόλουθη διαταραχή της ομοιοστάσης δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την εκδήλωση αιματολογικών κακοηθειών. Επιπλέον, λόγω του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης κακοήθειας μετά την ηλικία των 50 ετών, υποδηλώνεται πως μια παρατεταμένη περίοδος κατανάλωσης γλουτένης μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών (Leslie et al., 2012).

Συνδέοντας τις αιματολογικές κακοήθειες με την Th1 ανοσία, σύμφωνα με μελέτες, έχει βρεθεί πως ο ρόλος της Th1 κυτταρικής ανοσίας μπορεί να είναι διττός, με τη φλεγμονή επαγόμενη από την Th1 ανοσία να προωθεί ή να καταστέλλει την επέκταση των νεοπλασιών. Η επαγόμενη από την Th1 επέκταση των νεοπλασιών έχει φανεί, τόσο στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin, όσο και στο πολλαπλό μυέλωμα και το θυλακιώδες λέμφωμα (Bachireddy et al., 2015). Η Th1 κυτταρική ανοσία, λόγω της έκκρισης κυτταροκινών, όπως η IFN- γ και η IL-2, που προάγουν τη διαφοροποίηση των CD8+ κυττάρων προς T-κυτταροτοξικά κύτταρα,

μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη για την απόκριση έναντι παθογόνων και ιών. Με τη συμμετοχή των ιικών βιομορίων-ερεθισμάτων στην παθογένεση της κοιλιοκάκης να παραμένει ένα σκοτεινό πεδίο, ερευνητές βρήκαν πως οι ιοί μπορούν να διαταράξουν την εντερική ομοιόσταση και να επάγουν απώλεια ανοχής, αλλά και Th1 κυτταρική ανοσία έναντι διαιτητικών αντιγόνων (γλουτένη). Προτείνεται πως ιοί που επάγουν προ φλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι διαιτητικών αντιγόνων, τροποποιούν την ομοιόσταση και οδηγούν σε δενδριτικά κύτταρα με προφλεγμονώδεις ιδιότητες (Bouziat and Hinterleitner, 2017).

1.4. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ ΚΑΙ ΠΚΑ ΕΡΕΘΙΣΜΑΤΑ-ΒΙΟΜΟΡΙΑ

Στην κοιλιοκάκη, θεωρείται πως ιοί και βιομόρια αυτών (ιικά ερεθίσματα) συμμετέχουν στην εκδήλωση της νόσου, μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η μοριακή μίμηση (molecular mimicry), τροποποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Plot and Amital, 2009). Οι ιικές λοιμώξεις οδηγούν στην έκφραση των τύπου I ιντερφερονών, οι οποίες πυροδοτούν την απώλεια ανοχής στη γλουτένη, συμμετέχοντας στην ανάπτυξη της κοιλιοκάκης, όπως έχει φανεί σε μοντέλα ποντικών. Στον άνθρωπο έχει φανεί πως η θεραπεία με ιντερφερόνη-α, που ανήκει στην ομάδα των ιντερφερονών τύπου I, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση κοιλιοκάκης (Cammara et al., 2000; Devendra and Eisenbarth, 2004; Takayama et al., 1999).

Μελέτες έχουν συνδέσει τον ανθρώπινο αδενοϊό τύπου 12 (Adenovirus 12, Ad12) με την κοιλιοκάκη. Έχει περιγραφεί μια ομόλογη αμινοξική αλληλουχία μεταξύ της Eb1 πρωτεΐνης του ιού και της α-γλιαδίνης. Ασθενείς με κοιλιοκάκη βρέθηκε να έχουν προηγούμενες μολύνσεις από Ad12 σε μεγαλύτερο ποσοστό, σε σχέση με τους υγιείς. Θεωρείται πως πραγματοποιείται μια διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των επιτόπων στις ιικές πρωτεΐνες και την α-γλιαδίνη (Kagnoff et al., 1984; Kagnoff et al., 1987). Μια μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς με κοιλιοκάκη, ενίσχυσε τη θετική συσχέτιση του Ad12 με την κοιλιοκάκη, αφού βρέθηκε πως οι ασθενείς είχαν υψηλότερο τίτλο IgG αντισωμάτων έναντι του Eb1 πεπτιδίου, σε σχέση με τους υγιείς, με τα αντισώματα έναντι της α-γλιαδίνης, αλλά και του Eb1 να αυξάνουν συνεργατικά τον κίνδυνο εμφάνισης της κοιλιοκάκης (Lähdeaho et

al., 1993). Επιπλέον, μελέτες συσχετίζουν τον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis Virus C, HCV) και B (Hepatitis Virus B, HBV), εντεροϊούς, τον ιό Epstein-Barr (Epstein Barr Virus, EBV), τον κυτταρομεγαλοϊό (Cytomegalovirus, CMV) και ροταϊούς με την ανάπτυξη της κοιλιοκάκης. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αντισώματα έναντι του ενδομυϊού, της γλιαδίνης και της ιστικής τρανσγλουταμινάσης σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα C. Η ηπατίτιδα C και η κοιλιοκάκη προτείνεται πως έχουν και γενετική σύνδεση, αφού στην ίδια μελέτη βρέθηκε το μόριο HLA-DQ2 στο 52% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (Fine et al., 2001; Plot and Amital, 2009) (Lerner et al., 2017). Επιπλέον, σε ασθενείς με κοιλιοκάκη έχει βρεθεί ενεργή λοίμωξη από EBV, κατόπιν ανίχνευσης πρωτεϊνών του λυτικού κύκλου του ιού (Perfetti et al., 2016).

Οι ροταϊοί αποτελούν την πιο κοινή αιτία γαστρεντερικών λοιμώξεων κατά την πρώιμη παιδική ηλικία, με μελέτες να υποδηλώνουν πως συχνές λοιμώξεις, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης (Stene et al., 2006). Όσον αφορά τους εντεροϊούς, βρέθηκε πως παιδιά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης βάσει του γενετικού τους υποβάθρου, είχαν αυξημένη συχνότητα λοίμωξης από εντεροϊούς πριν την εμφάνιση της νόσου (Kahrs et al., 2019). Τέλος, ο Bouziat και οι συνεργάτες του, έδειξαν σχέση των ρεοϊών με την ανάπτυξη κοιλιοκάκης (Bouziat and Hinterleitner, 2017). Χρησιμοποίησαν δύο διαφορετικά στελέχη των ιών *Reoviridae* και απέδειξαν πως οι ρεοϊοί έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν την εντερική ομοιόσταση και να πυροδοτούν την Th1 κυτταρική ανοσία, καθώς και την απώλεια ανοχής στη γλουτένη (Bouziat and Hinterleitner, 2017).

Στον παιδιατρικό πληθυσμό έχει φανεί πως γαστρεντερικές λοιμώξεις αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, σε παιδιά με γενετική προδιάθεση. Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί πως σημαντικό ρόλο φαίνεται να ενέχει η χρονική στιγμή στην οποία πραγματοποιείται η λοίμωξη, αφού παιδιά που γεννήθηκαν το καλοκαίρι φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, καθώς καταναλώνουν γλουτένη για πρώτη φορά το χειμώνα, όταν οι ιικές λοιμώξεις είναι περισσότερες (Capriati et al., 2015; Ivarsson et al., 2003). Το μυστήριο του ρόλου των ιών στις χρόνιες νόσους, ξεκινά δειλά δειλά να διαλευκαίνεται, με το ρόλο των ιών στην παθογένεση της κοιλιοκάκης να παραμένει άγνωστος (Lerner et al., 2019).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κοιλιοκάκη και η συννοσηρότητά της με τις αιματολογικές κακοήθειες, σε σχέση με τις ιικές λοιμώξεις. Έχοντας την ικανότητα να διαταράσσουν την εντερική ομοιόσταση και να πυροδοτούν την Th1 ανοσία, οι ιοί επάγουν προφλεγμονώδεις ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι διαιτητικών αντιγόνων, τροποποιούν την ομοιόσταση και οδηγούν σε δενδριτικά κύτταρα με προφλεγμονώδεις ιδιότητες (Bouziat and Hinterleitner, 2017). Η φλεγμονή, επαγόμενη από την Th1 ανοσία, έχει συσχετιστεί με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το κλασικό λέμφωμα Hodgkin, το πολλαπλό μυέλωμα και το θυλακιάδες λέμφωμα (Bachireddy et al., 2015). Συνεπώς, είναι πιθανό μέσω της συμμετοχής των ιών στην παθογένεση της κοιλιοκάκης, αλλά και των αιματολογικών κακοηθειών και της ανοσολογικής απόκρισης που επάγουν, να δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για τη συννοσηρότητα κοιλιοκάκης και αιματολογικών κακοηθειών.

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η κοιλιοκάκη, αποτελώντας μια χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη διαταραχή του λεπτού εντέρου, ειδικά όταν παραμένει αδιάγνωστη ή στη μακροχρόνια μη θεραπευθείσα μορφή της, δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την παράλληλη εκδήλωση αυτοάνοσων παθήσεων και αιματολογικών κακοηθειών.

Στην παθοφυσιολογία της κοιλιοκάκης συμμετέχουν γενετικοί, ανοσολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Κατά την ανοσολογική αντίδραση έναντι της γλουτένης, παρατηρείται απελευθέρωση των κυτταροκινών της Th1 ανοσίας, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην εκδήλωση της νόσου. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως οι ιοί και βιομόρια αυτών συμμετέχουν στην παθογένεση της κοιλιοκάκης, χωρίς να είναι γνωστοί οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασής τους, διαταράσσοντας την εντερική ομοιόσταση και επάγοντας, όχι μόνο την απώλεια ανοχής στη γλουτένη, αλλά και την Th1 ανοσία (Bouziat and Hinterleitner, 2017). Η Th1 ανοσία, επιπρόσθετα, προάγει τη διαφοροποίηση των CD8+ T κυττάρων προς T κυτταροτοξικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να θεωρείται απαραίτητη για την απόκριση έναντι των ιών. Η φλεγμονή, επαγόμενη από την Th1 ανοσία, ευνοεί την εκδήλωση αιματολογικών κακοηθειών, όπως έχει φανεί στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το κλασικό λέμφωμα Hodgkin, το πολλαπλό μυέλωμα και το θυλακιώδες λέμφωμα (Bachireddy et al., 2015).

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με τις αιματολογικές κακοήθειες, εστιάζοντας στον ελληνικό παιδιατρικό πληθυσμό. Εφαρμόζοντας υπολογιστικές και εργαστηριακές προσεγγίσεις, το ενδιαφέρον μας εστιάζει στο ρόλο της Th1 κυτταρικής ανοσίας και ειδικότερα, των ιικών λοιμώξεων.

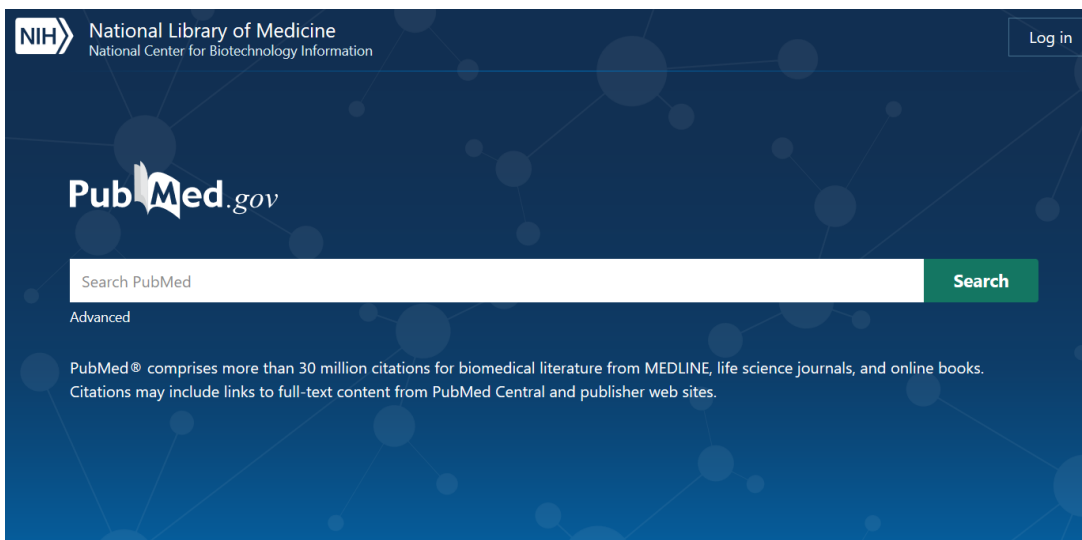
ΚΕΦ. 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΕΞΟΡΥΞΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΚΕΙΜΕΝΟΥ

Η εξόρυξη δεδομένων και κειμένου αποτελεί μια ιδιαίτερη χρήσιμη μεθοδολογία για την ανάκτηση της επιθυμητής πληροφορίας σε δεδομένα μεγάλου όγκου και διαθέσιμης βιβλιογραφίας, δίχως σφάλματα σύγχυσης (Przybyła et al., 2016; Rodriguez-Esteban and Bundschuh, 2016). Ως στόχος της εξόρυξης είναι η απόκτηση νέας γνώσης από ευρείες βάσεις δεδομένων, με σκοπό τη λήψη αποφάσεων και τη δημιουργία ή/και απάντηση ερευνητικών υποθέσεων. Επιπλέον, η εξόρυξη δεδομένων και κειμένου μπορεί να γεφυρώσει το κενό μεταξύ της συνεχούς αύξησης της επιστημονικής βιβλιογραφίας και της γνώσης που απορρέει μέσω αυτών (Yoo et al., 2012).

2.1.1. Αναζήτηση δημοσιεύσεων στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed

Ξεκινώντας την εξόρυξη δεδομένων και κειμένου, χρησιμοποιήθηκε η βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed. Πρόκειται για μία βάση δεδομένων ενεργή από το 1996, που έχει αναπτυχθεί από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας των ΗΠΑ (National Institutes of Health, NIH) και περιέχει περισσότερες από τριάντα εκατομμύρια αναφορές και περιλήψεις βιολογικών και ιατρικών επιστημονικών δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Σχήμα 2.1. Περιβάλλον αναζήτησης βιβλιογραφίας στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed.

Η εύρεση πληροφοριών στη βάση δεδομένων PubMed πραγματοποιήθηκε μέσω δύο αναζητήσεων, χρησιμοποιώντας τους παρακάτω όρους:

1. pediatric OR paediatric AND celiac OR coeliac AND comorbidities
2. pediatric OR paediatric AND celiac OR coeliac AND malignancies.

Σε κάθε αναζήτηση χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα κριτήρια ένταξης. Πιο συγκεκριμένα, οι δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά έπρεπε να είναι γραμμένες στην Αγγλική γλώσσα (Language, English), δημοσιευμένες εντός της τελευταίας δεκαετίας (Publication dates, 10 years), να αφορούν το ανθρώπινο είδος (Species, Humans), αλλά και να είναι διαθέσιμο το πλήρες κείμενο της δημοσίευσης (Text availability, Full text). Επιπλέον η εμφάνιση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει σχετικότητας, δηλαδή βάσει βέλτιστης αντιστοίχισης (Best Match), όπου οι πιο σχετικές με την αναζήτηση δημοσιεύσεις παρουσιάζονται στην κορυφή των αποτελεσμάτων.

Από την 1^η αναζήτηση (pediatric OR paediatric AND celiac OR coeliac AND comorbidities) προέκυψαν n=297 αποτελέσματα, εκ των οποίων επιλέχθηκαν n=146 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά βάσει τίτλου. Χρησιμοποιήθηκε, στη

συνέχεια, ο συντελεστής απήχησης (Impact factor) του επιστημονικού περιοδικού στο οποίο είχαν δημοσιευτεί. Πρόκειται για έναν συντελεστή αξιολόγησης του περιοδικού, βάσει του αριθμού των αναφορών όλων των δημοσιεύσεων του περιοδικού τα τελευταία δύο έτη (<https://www.ekt.gr/el/library/impact-factor>). Θέτοντας ως κριτήριο επιλογής έναν συντελεστή απήχησης $IF > 6.0$, επιλέχθηκαν 25 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.

Από την 2^η αναζήτηση (pediatric OR paediatric AND celiac OR coeliac AND malignancies) προέκυψαν $n=1312$ αποτελέσματα, εκ των οποίων επιλέχθηκαν 200 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά βάσει τίτλου. Ομοίως, στην 2^η αναζήτηση χρησιμοποιώντας τον ίδιο συντελεστή απήχησης, επιλέχθηκαν $n=51$ δημοσιεύσεις. Συνεπώς, συνολικά από τις δύο αναζητήσεις μελετήθηκαν περαιτέρω $n=76$ δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (Πίνακας 3.1).

2.1.2. Χρήση εργαλείου ταξινόμησης BioReader

Το πρόγραμμα BioReader (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BioReader/>) αποτελεί ένα εργαλείο ταξινόμησης των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, βάσει σχετικότητας. Το εργαλείο αυτό ανακτά τις περιλήψεις των δημοσιεύσεων, που θέτει ο χρήστης (PMIDs), μέσω της βάσης βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed. Στη συνέχεια, μέσω εξόρυξης κειμένου από τις περιλήψεις, δημιουργεί μια βάση με όρους-κλειδιά. Χρησιμοποιώντας έως και δέκα διαφορετικούς αλγορίθμους, ταξινομεί βάσει περιεχομένου τις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που πρόκειται να μελετηθούν (Simon et al., 2019). Παρατηρώντας το περιβάλλον του προγράμματος (Σχήμα 2.2), υπάρχουν τρεις διαφορετικές κατηγορίες, *Positive Category*, *Negative Category* και *Documents to classify*, όπου μπορούν να ενταχθούν PMIDs δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed.

BioReader

- *Biomedical Research Article Distiller*

Do you have a large number of research articles to go through, but do not know where to start? BioReader can help you distill your reading list by ranking articles by relevance. Simply collect the PubMed IDs of a number of articles you found relevant and a similar number of articles not relevant to you (we recommend at least 20 in each category - see [Tips and tricks](#) for successful classification). These two sets of PubMed IDs represent your positive and negative text mining training corpora to be pasted below. Then, either paste the PubMed IDs of up to 1000 articles that you would like to have ranked according to your content of interest, or enter a PubMed search term, and BioReader will provide you with a ranked reading list to limit the time wasted on reading irrelevant literature. Click [here](#), for examples of application

The screenshot shows the BioReader web interface. At the top, there are three navigation tabs: 'Home' (highlighted in blue), 'Instructions', and 'Citation'. Below the tabs, there are three main input areas:

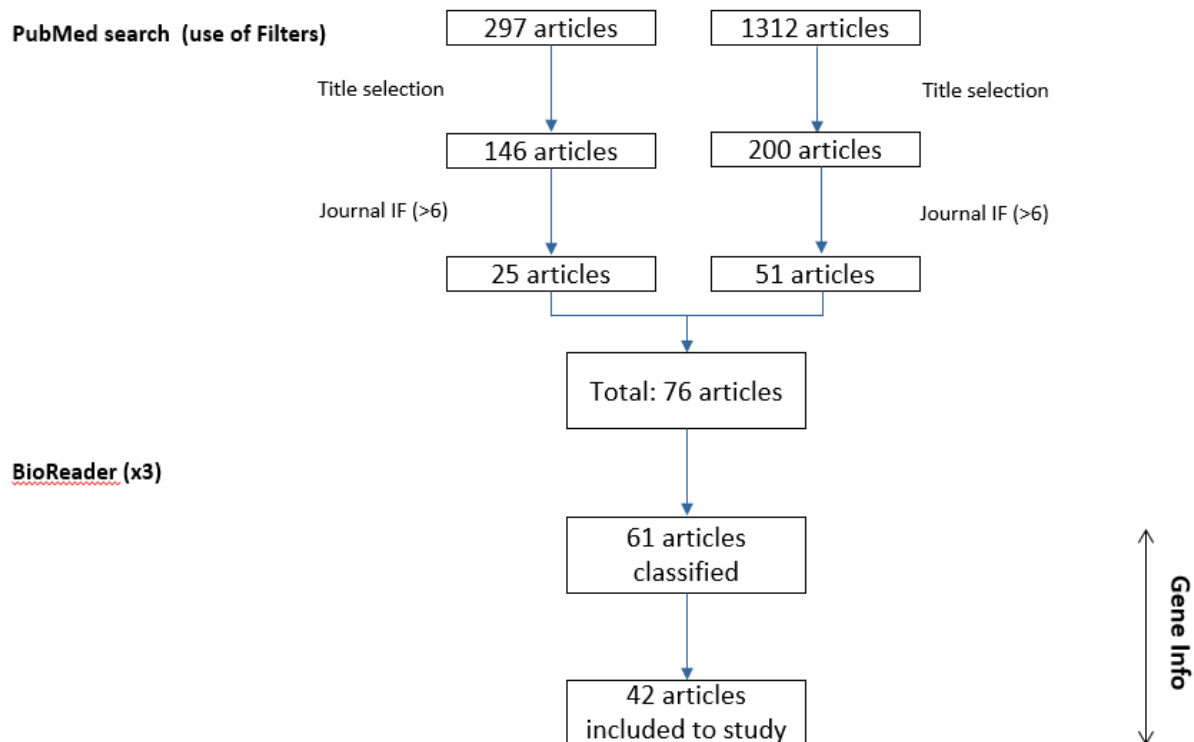
- Positive category:** A text box with the instruction 'Paste PubMed IDs for papers containing information relevant to you'.
- Negative category:** A text box with the instruction 'Paste PubMed IDs for papers similar to the positive category, but not containing information relevant to you'.
- Documents to classify:** A text box with the instruction 'Paste PubMed IDs (max: 1000) for articles that you would like to have classified as either relevant or irrelevant'.

Σχήμα 2.2. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου ταξινόμησης BioReader.

Οι $n=76$ δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που επιλέχθηκαν από τη βάση δεδομένων PubMed, τοποθετήθηκαν προς ταξινόμηση στην κατηγορία *Documents to classify*. Στη στήλη *Positive category* τοποθετήθηκαν τα PMIDs δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που έχουν προκύψει από την αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed, χρησιμοποιώντας τους όρους *pediatric AND celiac OR coeliac*. Αυτές οι δημοσιεύσεις θεωρούνται εύστοχες και σχετικές με το θέμα της εργασίας. Στη στήλη *Negative category* τοποθετούνται τα PMIDs δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά μετά από αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed με τους όρους *adult AND autoimmunity AND cancer*. Στην κατηγορία αυτή τοποθετούνται δημοσιεύσεις, οι οποίες σχετίζονται με το ευρύτερο αντικείμενο της εργασίας, αλλά διαφέρουν ως προς συγκεκριμένους όρους (ενδεικτικά, χρησιμοποιείται ο όρος *αυτοανοσία* αντί του όρου *κοιλιοκάκη*). Στόχος είναι η τελική ταξινόμηση των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά βάσει σχετικότητας με το θέμα της εργασίας. Το πρόγραμμα BioReader χρησιμοποιήθηκε με τα ίδια δεδομένα εις τριπλούν για λόγους στατιστικής σημαντικότητας και αποφυγή σφαλμάτων σύγχυσης.

Η τελική κατάταξη των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά προς ανάγνωση, του προγράμματος BioReader, περιλάμβανε $n=61$ δημοσιεύσεις από τις

αναζητήσεις στη βάση δεδομένων PubMed (υποενότητα 2.1.1). Οι εναπομείνουσες n=15 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που δεν είχαν συμπεριληφθεί στην αρχική κατάταξη του προγράμματος, χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου στα *Documents to Classify*, συμπεριλαμβάνοντας, επιπλέον, στην ίδια κατηγορία πέντε τυχαίες δημοσιεύσεις, που είχαν χρησιμοποιηθεί, προηγουμένως, στην *Positive Category*. Επισημαίνεται πως απαιτούνται τουλάχιστον 20 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά σε κάθε κατηγορία, προκειμένου να εμφανιστεί η τελική κατάταξη. Τα PMIDs στην κατηγορία *Positive Category* ήταν τα ίδια με αυτά της προηγούμενης χρήσης του BioReader, έχοντας αφαιρεθεί πέντε τυχαίες δημοσιεύσεις, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ενώ τα PMIDs της κατηγορίας *Negative Category* παρέμειναν ίδια. Οι n=6 δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά που προέκυψαν στην τελική κατάταξη επαναλαμβάνονταν ήδη στην αρχική, ενώ αποκλείστηκαν από τη μελέτη οι δημοσιεύσεις, που δεν συμπεριλήφθηκαν και αυτή τη φορά στην κατάταξη του BioReader. Από τις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που είχαν συμπεριληφθεί στην κατάταξη του εργαλείου BioReader (n=61), ορισμένες απορρίφθηκαν βάσει τίτλου και περίληψης, καθώς δεν σχετίζονταν με το θέμα της αναζήτησης, με αποτέλεσμα ο τελικός αριθμός δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά προς μελέτη να ορίζεται στις n=42. Στο Σχήμα 2.3 παρατίθεται η διαγραμματική παρουσίαση των βημάτων που ακολουθήθηκαν για την επιλογή των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42) της μελέτης.



Σχήμα 2.3. Διαγραμματική παρουσίαση μεθοδολογίας επιλογής των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά της μελέτης.

Σε ένα αρχείο του προγράμματος Microsoft Excel καταγράφηκαν ως μια λίστα τα γονίδια που αναφέρονταν στις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42), που επεβίωσαν των κριτηρίων μας. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και η επέκταση Gene Info του προγράμματος περιήγησης στο διαδίκτυο, Google Chrome, όπου επιλέγοντας ένα γονίδιο εμφανίζονται όλες οι ονομασίες του, καθώς και η λειτουργία του. Το εργαλείο αυτό λειτούργησε ως οδηγός, προκειμένου να μην καταγράφονται τα ίδια γονίδια πολλαπλές φορές με διαφορετική ονομασία. Επιπλέον, κατά την ανάγνωση των τελικών δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42), το Gene Info ήταν χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της λειτουργίας του κάθε γονιδίου. Έτσι, συνδυάζοντας την πληροφορία από το Gene Info, αλλά και από τις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42), στόχος ήταν η διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων στη συννοσηρότητα κοιλιοκάκης και αιματολογικών κακοηθειών.

Αφού ολοκληρώθηκε η χρήση του εργαλείου BioReader, χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός δείκτης Cohen kappa για την αξιολόγηση της επιλογής των τελικών δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42). Πρόκειται για έναν δείκτη αξιοπιστίας μεταξύ δύο βαθμολογητών (Interrater reliability), που παρουσιάζει την ορθότητα της συλλογής των δεδομένων, βάσει του θέματος της εργασίας, ώστε να αποφευχθούν μεροληπτικές αποφάσεις κατά τη διαδικασία αυτή (McHugh, 2012). Για τον υπολογισμό του στατιστικού δείκτη Cohen kappa, οι δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία εξόρυξης δεδομένων και κειμένου και η πληροφορία που συλλέχθηκε, δόθηκαν προς αξιολόγηση σε τέσσερις ανεξάρτητους αναλυτές.

2.1.3. Συλλογή πληροφορίας μέσω του εργαλείου εύρεσης κειμένου

PolySearch2

Το PolySearch2 (<http://polysearch.ca/>) είναι ένα εργαλείο εύρεσης κειμένου, με σκοπό την εύρεση πληροφορίας βάσει σχετικότητας, το οποίο αναγνωρίζει συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων βιοϊατρικών όρων. Ενδεικτικά, μπορεί να τεθεί ως όρος από το χρήστη το γονίδιο *BCL2* και να ζητηθεί από το εργαλείο η εμφάνιση όλων των ασθενειών με το οποίο αυτό συσχετίζεται. Το PolySearch2 για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων, αναζητεί συσχετίσεις μεταξύ εμπειριστατωμένων συλλογών δωρεάν δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, σε βάσεις όπως η MEDLINE και η PubMed Central. Επιπλέον, πραγματοποιεί αναζητήσεις σε μια πληθώρα βάσεων δεδομένων, όπως είναι η DrugBank, η UniProt, η Human Metabolome Database, με σκοπό τη βελτίωση της ακρίβειας και της κάλυψης. Επιπλέον, κατατάσσει τα αποτελέσματα βάσει σχετικότητας, παρουσιάζοντάς τα, αξιοποιώντας στατιστική επεξεργασία της σχετικότητας. (Liu et al., 2015).

Στη συγκεκριμένη εργασία, το εργαλείο εύρεσης κειμένου PolySearch2 χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εμπλουτιστεί η ήδη υπάρχουσα πληροφορία, που είχε προκύψει από την αναζήτηση στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed, μετά την κατάταξη αυτής μέσω του εργαλείου BioReader. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που αναφέρονται στις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n= 42) αναζητήθηκαν και με το PolySearch2.

Quick Start

To use this server:

1. Decide which type of search you wish to do (e.g. "Given Toxin Find associated Diseases")
2. Select search restraints from the pull-down menus (Given X, Find Y)
(e.g., select "Toxin" from the Given menu and "Disease" from the Find menu.)
3. Enter Query Keyword (e.g. "Bisphenol A")
4. Press "Quick Search" to start a search using default settings, OR
5. Press "Advanced Search" and follow the instructions on the advanced search page to fine tune your search
6. If you need more help or detailed explanations of the methods or databases, see the help section.

Choose your search type and enter query keyword

Given	<input type="text"/>	Find ALL associated	<input type="text"/>
Query Keyword	<input type="text" value="Enter query keyword"/>	<input type="button" value="Quick Search"/>	<input type="button" value="Advanced Search"/>

Σχήμα 2.4. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου εύρεσης κειμένου PolySearch2.

Στην επιλογή *Given* επιλέχθηκε ο όρος *Gene/ Protein* και κάθε γονίδιο εισήχθη σαν όρος κλειδί *Query Keyword*, ενώ αναζητήθηκαν όλες οι διαθέσιμες συσχετίσεις με αυτό, *Find ALL associated-ALL* (Σχήμα 2.4). Επιπλέον, εάν στα αποτελέσματα συσχέτισης με κάποιο γονίδιο υπήρχαν άλλα γονίδια που δεν αναφέρονται στις δημοσιεύσεις που αναφέρονται πιο πάνω, τότε αναζητήθηκαν και αυτά με το PolySearch2. Τα αποτελέσματα αυτών των αναζητήσεων καταγράφηκαν σε ένα φύλλο Microsoft Excel. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια και οι γενετικές παραλλαγές καταγράφηκαν σε ξεχωριστές στήλες και επιπλέον ορίστηκαν ως ξεχωριστές στήλες οι αιματολογικές κακοήθειες, η κοιλιοκάκη, οι ιοί και η Th1 κυτταρική ανοσία. Στο αρχείο αυτό είναι εμφανής η ποιοτική συσχέτιση, θετική ή αρνητική, των γονιδίων, αλλά και των γενετικών παραλλαγών (μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών) με κάθε μία από τις διαφορετικές στήλες.

2.1.4. Αναζήτηση γονιδίων χρησιμοποιώντας το εργαλείο εξόρυξης κειμένου

EVEX

Το εργαλείο EVEX (<http://www.evexdb.org/>) αποτελεί μια πηγή εξόρυξης κειμένου, που εμφανίζει τόσο άμεσες, όσο και έμμεσες σχέσεις μεταξύ γονιδίων και πρωτεϊνών.

Προκειμένου να εμφανίσει τα αποτελέσματα της αναζήτησης, πραγματοποιεί εξόρυξη κειμένου στις περιλήψεις δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed και στις πλήρεις δημοσιεύσεις της βάσης βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed Central. Ο χρήστης εισάγει στο κατάλληλο πεδίο το όνομα του γονιδίου ή της πρωτεΐνης, που τον ενδιαφέρει και το EVEX θα εμφανίσει αλληλεπιδράσεις ,που συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο ή την πρωτεΐνη, που εισήχθη στο πεδίο αναζήτησης. Η βάση δεδομένων του EVEX περιέχει δεδομένα για μια πληθώρα αλληλεπιδράσεων, όπως έκφραση και μεταγραφή γονιδίων, μεθυλίωση του DNA, πρόσδεση και ουβικιτινίωση πρωτεϊνών. Περισσότερα από εβδομήντα έξι εκατομμύρια ονόματα γονιδίων και πρωτεϊνών και πάνω από σαράντα εκατομμύρια μοριακά γεγονότα εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων του εργαλείου (Van Landeghem et al., 2013).

Στο EVEX αναζητήθηκαν τα γονίδια που ήταν πιο κοινά μεταξύ των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά της κατάταξης του εργαλείου BioReader. Αυτό αποσκοπούσε στην εύρεση περαιτέρω πληροφορίας για το κάθε γονίδιο, προκειμένου να διερευνηθεί, εάν συσχετίζονται βάσει του EVEX με τις αιματολογικές κακοήθειες, με την κοιλιοκάκη και τους ιούς. Στο Σχήμα 2.5 φαίνεται ένα παράδειγμα αναζήτησης γονιδίου στο EVEX και το περιβάλλον εργασίας του εργαλείου στο οποίο εμφανίζονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε ένα φύλλο εργασίας του προγράμματος Microsoft Excel. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που αναζητήθηκαν στο EVEX καταγράφηκαν σε μία στήλη και σε ξεχωριστή στήλη, καταγράφηκε για το κάθε γονίδιο, η πληροφορία που ήταν σχετική με την κοιλιοκάκη, τις αιματολογικές κακοήθειες και τους ιούς. Πιο αναλυτικά, για τα γονίδια που αναζητήθηκαν, καταγράφηκαν οι αλληλεπιδράσεις με άλλα γονίδια και πρωτεΐνες, υπό το πρίσμα της κοιλιοκάκης, των αιματολογικών κακοηθειών και των ιών.

IL-15 Search [Add taxonomy filters](#)

Show gene profile for [IL-15](#)

IL-15 regulates 185 genes or proteins

IL-6 [Show gene profile](#)

Confidence: Very high

Taken together, these findings suggest that an **IL-15**-dependent pro-inflammatory feedback loop may be created in the inflamed synovium, in which **IL-15** stimulates the production of TNF, IFN-gamma and IL-17, which in turn stimulate the further production of **IL-15**, **IL-8** and **IL-6** in fibroblast-like synoviocytes [7,8].

[Show more](#) [Search all for IL-6 and IL-15](#) [Search all for IL-6](#)

SAP [Show gene profile](#)

Confidence: Very high

To examine whether IL-2 and **IL-15** can upregulate **SAP** and **CD244** expression in CD8+ T cells, purified CD8+ T cells from ND PBMCs (n = 2) were cultured with recombinant human IL-2 (rhIL-2) or rhIL-15 for 7 days, and expression of **SAP** and **CD244** in these cells were analyzed.

[Show more](#) [Search all for SAP and IL-15](#) [Search all for SAP](#)

2B4 [Show gene profile](#)

Confidence: Very high

To examine whether IL-2 and **IL-15** can upregulate **SAP** and **CD244** expression in CD8+ T cells, purified CD8+ T cells from ND PBMCs (n = 2) were cultured with recombinant human IL-2 (rhIL-2) or rhIL-15 for 7 days, and expression of **SAP** and **CD244** in these cells were analyzed.

[Show more](#) [Search all for 2B4 and IL-15](#) [Search all for 2B4](#)

PLS [Show gene profile](#)

Confidence: Very high

Furthermore, expression of the perforin gene (PRF1) and **CTSC** (encoding the granzyme activating enzyme cathepsin C) were induced by **IL-15** and antagonized by TGF-beta (Figure 3B).

[Show more](#) [Search all for PLS and IL-15](#) [Search all for PLS](#)

IL-12Rbeta1 [Show gene profile](#)

Confidence: Very high

Among 16 cytokines tested, IL-2, IL-7 and **IL-15** markedly induced **IL-12Rbeta1** expression and IL-12 binding on resting PBMC, whereas IL-1alpha and tumor necrosis factor-alpha had a minimal enhancing effect.

[Show more](#) [Search all for IL-12Rbeta1 and IL-15](#) [Search all for IL-12Rbeta1](#)

Showing 1 to 5 of 185 entries

[First](#) [Previous](#) [1](#) [2](#) [3](#) [4](#) [5](#) [Next](#) [Last](#)

Σχήμα 2.5. Περιβάλλον εργασίας του εργαλείου εξόρυξης κειμένου EVEX, μετά την αναζήτηση του γονιδίου IL-15.

2.1.5. Αναζήτηση γονιδίων και γενετικών παραλλαγών χρησιμοποιώντας τον περιηγητή Ensembl

Η πλατφόρμα Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (European Molecular Biology Laboratory, EMBL) αποτελεί έναν περιηγητή γονιδιωμάτων, λειτουργώντας ως μια βάση για την προσπέλαση δεδομένων σε περισσότερες βάσεις δεδομένων. Συγκεντρώνει πληροφορίες για γονίδια, μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, τη γονιδιακή ρύθμιση, αλλά και τη σύγκριση γονιδιωμάτων μεταξύ οργανισμών των Σπονδυλωτών και οργανισμών-μοντέλων, που χρησιμοποιούνται στη Γενετική (Σχήμα 2.6) (Yates et al., 2020).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the rs699 SNP. The top navigation bar includes 'Ensembl', 'BLAST/BLAT', 'VEP', 'Tools', 'BioMart', 'Downloads', 'Help & Docs', and 'Blog'. The species is set to 'Human (GRCh38.p13)'. The variant is located at '1:230,709,548-230,710,548'. The variant is identified as 'rs699 SNP' and is a 'missense variant'. The alleles are 'A/G', with 'A' being the ancestral allele. The MAF is 0.29 for 'A' and 0.50 for 'G'. The CADD score is 1.939 and the GERP score is -4.82. The variant is located on 'Chromosome 1:230710048 (forward strand)'. It is associated with 'HGMD-PUBLIC CM920010' and 'dbSNP rs1553314015 (A-)'. The page lists 6 HGVS names and 10 synonyms. It also lists 11 genotyping chips used for this variant, including HumanOmniExpress, Illumina_1M-duo, Illumina_ImmunoChip, Illumina_HumanOmni2.5, Illumina_HumanHap550, HumanCoreExome-12, Illumina_HumanOmni1-Quad, and Illumina_HumanHap650Y.

Σχήμα 2.6. Περιβάλλον εργασίας του περιηγητή Ensembl μετά την αναζήτηση της γενετικής παραλλαγής rs699.

Τα γονίδια, που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαλείο εύρεσης κειμένου PolySearch2, αναζητήθηκαν εκ νέου στον περιηγητή Ensembl για τον άνθρωπο. Από τη λίστα αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το επιθυμητό γονίδιο και στη συνέχεια, η καρτέλα που προβάλλει τους φαινοτύπους, που συσχετίζονται με το συγκεκριμένο γονίδιο. Στην καρτέλα αυτή ο χρήστης μπορεί, μεταξύ άλλων, να βρει πληροφορία για τους φαινοτύπους, που σχετίζονται με το συγκεκριμένο γονίδιο στον πίνακα *Phenotypes, diseases and traits associated with this gene*, αλλά και για τους φαινοτύπους, που συσχετίζονται με γενετικές παραλλαγές αυτού του γονιδίου στον πίνακα *Phenotype, disease and trait annotations associated with variants in this gene*. Το περιεχόμενο των πινάκων καταγράφηκε σε ένα φύλλο Excel. Επιπλέον αναζητήθηκαν και οι γενετικές παραλλαγές, που αναφέρονταν στις δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed ή στις δημοσιεύσεις από την αναζήτηση του εργαλείου εύρεσης κειμένου PolySearch2 ή/ και από την αναζήτηση των γονιδίων στο Ensembl. Από τον πίνακα *Phenotype, disease and trait annotations associated with variants in this gene* αναζητήθηκαν γενετικές παραλλαγές, που

βρέθηκαν ότι σχετίζονται με την κοιλιοκάκη ή/και με τις αιματολογικές κακοήθειες ή/και με τα ικκά ερεθίσματα-βιομόρια.

Συγκεκριμένα, σε ένα αρχείο Excel για κάθε γενετική παραλλαγή σε ξεχωριστές στήλες καταγράφηκαν:

- η πιο σοβαρή συνέπεια (Most severe consequence)
- οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων για τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς CEU (Utah residents with Northern and Western European ancestry) βάσει του 1000 Genomes Project Phase 3 και NFE (non-Finnish European) βάσει του gnomAD exomes και gnomAD genomes
- η πληροφορία από το Variant Effect Predictor (VEP), προκειμένου να βρεθούν οι επιπτώσεις των παραλλαγών. Παρέχονται πληροφορίες για τη θέση της παραλλαγής σε επίπεδο μεταγράφου, κωδικής αλληλουχίας και σε επίπεδο πρωτεΐνης, για τον τύπο της παραλλαγής και την επίπτωση που έχει στην πρωτεΐνη (π.χ. ανεκτή ή δηλητηριώδης).
- οι παθήσεις και η κλινική σημασία, που σχετίζονται με κάθε γενετική παραλλαγή στην καρτέλα Phenotype Data. Για κάθε φαινότυπο-ασθένεια, μεταξύ άλλων, φαίνεται και ποιο είναι το αιτιοκρατικό αλληλόμορφο
- η αλλαγή στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης, μέσω του τρισδιάστατου πρωτεϊνικού μοντέλου (3D Protein Model).

Τέλος, δημιουργήθηκε συγκεντρωτικός πίνακας στο πρόγραμμα Microsoft Excel, όπου καταγράφηκαν τα γονίδια σε μία στήλη, ενώ σαν ξεχωριστές στήλες ορίστηκαν οι αιματολογικές κακοήθειες, η κοιλιοκάκη και τα ικκά βιομόρια-ερεθίσματα. Για κάθε γονίδιο καταγράφηκαν, ποιοτικά, οι συσχετίσεις, θετικές ή αρνητικές, με κάθε μία από τις υπόλοιπες στήλες (Πίνακας 3.3). Επιπλέον, αντίστοιχος πίνακας δημιουργήθηκε και για τις γενετικές παραλλαγές (Πίνακας 3.4), όπου σε μια στήλη κατατάχθηκαν τα γονίδια, σε διπλανή στήλη οι γενετικές παραλλαγές για το κάθε γονίδιο, τα αλληλόμορφα της γενετικής παραλλαγής και η συχνότητα μειοψηφικού αλληλομόρφου (Minor Allele Frequency, MAF) και ως ξεχωριστές στήλες ορίστηκαν οι αιματολογικές κακοήθειες και η κοιλιοκάκη. Πιο συγκεκριμένα, στις στήλες αυτές καταγράφηκε το αλληλόμορφο, που συσχετίζεται με τις αιματολογικές

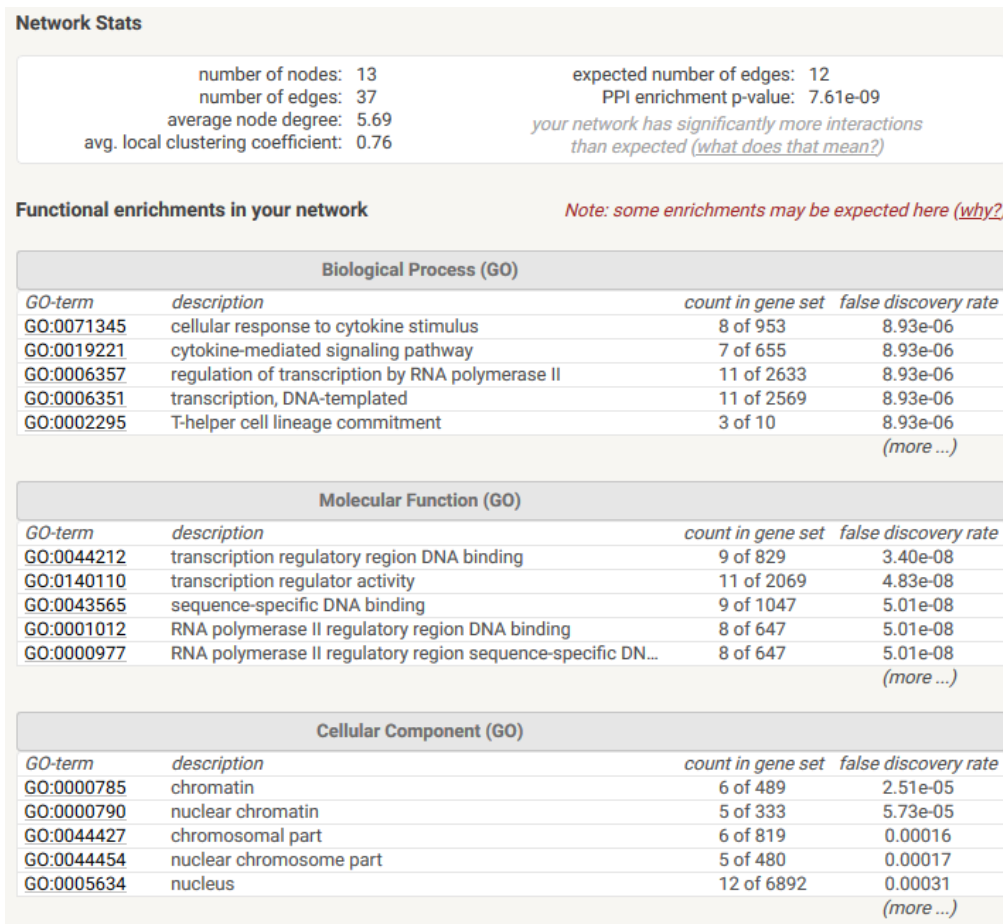
κακοήθειες και το αλληλόμορφο που συσχετίζεται με την κοιλιοκάκη. Τέλος, ως τελευταία στήλη ορίστηκε ο τύπος της γενετικής παραλλαγής.

2.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

2.2.1 Αναζήτηση πρωτεϊνικών δικτύων με το υπολογιστικό εργαλείο STRING

Το υπολογιστικό εργαλείο STRING (<https://string-db.org/>), αποτελεί μια βάση δεδομένων, όπου παρουσιάζονται γνωστές και προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, για πάνω από είκοσι τέσσερα εκατομμύρια πρωτεΐνες σε περισσότερους από πέντε χιλιάδες οργανισμούς. Δημιουργείται, έτσι, ένα δίκτυο, που συμπεριλαμβάνει άμεσες και έμμεσες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προέρχονται από γενωμικές προβλέψεις, πειράματα υψηλής απόδοσης (high-throughput), δεδομένα συνέκφρασης, εξόρυξη κειμένου, αλλά και από προηγούμενη γνώση, που εμπεριέχεται σε βάσεις δεδομένων.


Η κάθε αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σχολιάζεται με μια ή περισσότερες βαθμολογίες (scores), που είναι δείκτες εμπιστοσύνης. Όλες οι βαθμολογίες κυμαίνονται στο εύρος 0-1, με το «1» να είναι ο υψηλότερος δυνατός δείκτης εμπιστοσύνης. Στην καρτέλα ανάλυσης του κάθε πρωτεϊνικού δικτύου (Analysis) (Σχήμα 2.7), παρέχονται στατιστικά δεδομένα για το απορρέον δίκτυο. Μεταξύ άλλων, ο χρήστης μπορεί να βρει το συντελεστή ομαδοποίησης (clustering coefficient) του δικτύου, που υποδηλώνει κατά πόσο οι κόμβοι (πρωτεΐνες) στο δίκτυο τείνουν να ομαδοποιούνται μαζί. Συνεπώς, έντονα συνδεδεμένα δίκτυα φέρουν υψηλές τιμές αυτού του συντελεστή. Στην ίδια καρτέλα περιέχεται πληροφορία για το p-value της ανάλυσης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (PPI enrichment p-value). Χαμηλό p-value υποδηλώνει πως οι πρωτεΐνες του δικτύου φέρουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, από ό,τι θα αναμενόταν σε ένα τυχαίο σύνολο πρωτεϊνών, άρα οι πρωτεΐνες αυτές είναι βιολογικά συνδεδεμένες ως ομάδα (Szkarczyk et al., 2019).



Σχήμα 2.7. Παράδειγμα στατιστικής ανάλυσης πρωτεϊνικού δικτύου στο STRING μετά την εισαγωγή των πρωτεϊνών BACH2, IRF4, MYNN.

Συγκεκριμένα, ο χρήστης μπορεί να εισάγει το όνομα μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών για τις οποίες πρόκειται να προβλεφθούν λειτουργικές αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 2.8). Εναλλακτικά, μπορεί να εισάγει την αλληλουχία αυτών και να επιλέξει τον οργανισμό στον οποίο αναζητούνται οι αλληλεπιδράσεις. Στη συνέχεια, το εργαλείο αυτό θα εμφανίσει ένα πρωτεϊνικό δίκτυο, το οποίο ο χρήστης μπορεί να τροποποιήσει, ώστε να εμφανίζονται περισσότεροι ή λιγότεροι κόμβοι και να επιλέξει την εμφάνιση των αλληλεπιδράσεων, είτε βάσει δεδομένων, είτε βάσει εμπιστοσύνης, είτε βάσει μοριακής δράσης.

Version: 11.0 LOGIN | REGISTER

 Search Download Help My Data

- Protein by name >
- Protein by sequence >
- Multiple proteins >
- Multiple sequences >
- Proteins with Values/Ranks New >
- Organisms >
- Protein families ("COGs") >
- Examples >
- Random entry >

SEARCH

Single Protein by Name / Identifier

Protein Name: (examples: #1 #2 #3)

Organism:

auto-detect ▼

SEARCH

Σχήμα 2.8. Περιβάλλον αναζήτησης πρωτεϊνικών δικτύων με το υπολογιστικό εργαλείο *STRING* εισάγοντας το όνομα/αναγνωριστικό της επιθυμητής πρωτεΐνης (<https://string-db.org/>).

2.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ

2.3.1. Χρήση υπολογιστικού εργαλείου PROVEAN/SIFT

Το PROVEAN/SIFT (Protein Variation Effect Analyzer/ Sorting Tolerant From Intolerant) (<http://provean.jcvi.org>) αποτελεί ένα υπολογιστικό εργαλείο που προβλέπει, εάν μια οποιαδήποτε αλλαγή σε επίπεδο νουκλεοτιδικών βάσεων στο γονιδίωμα έχουν αντίκτυπο στη βιολογική δράση μιας πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους PROVEAN και SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant). Η χρησιμότητά του έγκειται στην ταυτοποίηση παραλλαγών, που προβλέπονται να ενέχουν λειτουργική σημασία. Στο εργαλείο αυτό ο χρήστης μπορεί να εισάγει μια πρωτεϊνική αλληλουχία (PROVEAN Protein), ένα σύνολο πρωτεϊνικών αλληλουχιών (PROVEAN Protein Batch) και γενετικές παραλλαγές (PROVEAN Genome Variants) (Σχήμα 2.9). Ο αλγόριθμος PROVEAN εισάγει βαθμολογία

ευθυγράμμισης *δέλτα* (delta alignment score), σύμφωνα με τις αναφορές και τις εκδοχές των παραλλαγών μιας πρωτεϊνικής αλληλουχίας αναζήτησης, σε σχέση με τις ομόλογες αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων NCBI NR μέσω του εργαλείου BLAST. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο PROVEAN, το προκαθορισμένο κατώφλι βαθμολογίας ορίζεται σε -2,5. Προβλέψεις με βαθμολογία <-2,5 ορίζονται ως επιβλαβείς (deleterious), ενώ προβλέψεις με βαθμολογία >-2,5 ορίζονται ως ουδέτερες (neutral) (Choi and Chan, 2015). Εκτός από τον αλγόριθμο PROVEAN, χρησιμοποιείται και ο αλγόριθμος SIFT για την πρόβλεψη της λειτουργικής σημασίας των παραλλαγών. Η βασική υπόθεση του αλγορίθμου SIFT βασίζεται στην εξελικτική παρατήρηση των αμινοξέων σε πρωτεϊνικές οικογένειες. Σημαντικές θέσεις, τόσο για τη λειτουργία, όσο και τη δομή της πρωτεΐνης, είναι υψηλά συντηρημένες, εξελικτικά και οι αντικαταστάσεις αμινοξέων στις θέσεις αυτές επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης, ενώ οι περισσότερες αντικαταστάσεις σε θέσεις με χαμηλότερο βαθμό συντήρησης και άρα, μικρότερης σημασίας, είναι ανεκτές. Όμοια με τον αλγόριθμο PROVEAN, μέσω του εργαλείου BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on), ο αλγόριθμος SIFT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μη συνώνυμες παραλλαγές. Η βαθμολογία του SIFT κυμαίνεται στο εύρος τιμών 0-1 και αφορά στη κλιμακωτή πιθανότητα μιας αμινοξικής αντικατάστασης να είναι ανεκτή. Πιο συγκεκριμένα, βαθμολογίες SIFT ≤ 0.05 αντιστοιχούν σε επιβλαβείς προβλέψεις (deleterious), ενώ βαθμολογίες >0.05 αντιστοιχούν σε ανεκτές (tolerated) παραλλαγές.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο PROVEAN/SIFT, προκειμένου να διερευνηθεί εάν οι γενετικές παραλλαγές ενδιαφέροντος που προέκυψαν από την εξόρυξη δεδομένων και κειμένου, έχουν αντίκτυπο στη βιολογική δράση της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, στο εργαλείο αυτό τέθηκε η γενετική παραλλαγή rs10936599 του γονιδίου *MYNN*, καθώς και με το PROVEAN/SIFT μπορεί να προβλεφθεί η λειτουργική σημασία παραλλαγών, που βρίσκονται στην κωδική περιοχή του γονιδίου. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.10, εισήχθη η εν λόγω γενετική παραλλαγή υπό τη μορφή που ορίζει το PROVEAN/SIFT, ορίζοντας τις συντεταγμένες (χρωμόσωμα, θέση), το μείζον αλληλόμορφο και το πολυμορφικό αλληλόμορφο της παραλλαγής. Επιπλέον, επιλέχθηκαν οι επιλογές *Ensembl Gene ID* και *Associated Gene Name*, το αναγνωριστικό του γονιδίου στον περιηγητή Ensembl και το όνομα του γονιδίου, σχετιζόμενο με την πρωτεΐνη.

- PROVEAN Tools
 - PROVEAN Protein
 - PROVEAN Protein Batch
 - Human
 - Mouse
 - PROVEAN Genome Variants
 - Human
 - Mouse
- About
- FAQ
- News
- Download
- Help
- Contact Us
- Related Links

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) is a software tool which predicts whether an amino acid substitution or indel has an impact on the biological function of a protein.

PROVEAN is useful for filtering sequence variants to identify nonsynonymous or indel variants that are predicted to be functionally important.

The performance of PROVEAN is comparable to popular tools such as SIFT or PolyPhen-2 [1]. [Read more.](#)

A fast computation approach to obtain pairwise sequence alignment scores enabled the generation of precomputed PROVEAN predictions for 20 single AA substitutions and a single AA deletion at every amino acid position of all protein sequences in human and mouse [2].

This work is funded by the National Institutes of Health [grant number 5R01HG004701-04].

References:

1. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688.
2. Choi Y (2012) A Fast Computation of Pairwise Sequence Alignment Scores Between a Protein and a Set of Single-Locus Variants of Another Protein. In *Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine (BCB '12)*, ACM, New York, NY, USA, 414-417.
 (* This is the author's version of the work. It is posted here by permission of ACM for your personal use. Not for redistribution. The definitive version was published in ACM BCB '12. <http://doi.acm.org/10.1145/2382936.2382989>)
3. Choi Y, Chan AP (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31(16): 2745-2747.

PROVEAN web server functions are currently using **PROVEAN v1.1.3**.

PROVEAN Tool	Species	Description
PROVEAN Protein	Any species	This tool provides PROVEAN prediction for a protein sequence from any organisms. [details] <ul style="list-style-type: none"> • Input: A protein sequence from any organism and amino acid variants of interest. See example. • Output: PROVEAN scores and predictions. See example.
PROVEAN Protein Batch	- Human - Mouse	This tool provides PROVEAN and SIFT predictions for a list of protein variants. [details] <ul style="list-style-type: none"> • Input: A list of protein variants. See example. • Output: Scores and predictions from PROVEAN and SIFT. See example.
PROVEAN Genome Variants	- Human - Mouse	This tool provides PROVEAN and SIFT predictions for a list of genome variants. It is based on the assembly of the species and the Ensembl genome annotation. [details] <ul style="list-style-type: none"> • Input: A list of genomic variants. See example. • Output: Changes at protein level, their scores and predictions from PROVEAN and SIFT, and accessory information (dbSNP rs IDs, gene description, PFAM domain, GO terms, etc.). See example.

Σχήμα 2.9. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου PROVEAN/SIFT (<http://provean.jcvi.org>)

Step 1. Enter a list of genomic coordinates and variants

Paste in your coordinates and variants: [format] [Example \(upload example\)](#)

```
3,169492101,C,T
```

```
1,100382265,C,G,user comment 1
1,100380997,A,G,user comment 2
22,30163533,A,C
X,12905093,A,T
2,230633386,G,C
1,100382265,C,A
7,117199641,ATCA,.
7,117199647,TTT,.
10,50184923,TGG,.
12,121438957,ACC,.
1,43217995,G,GCCA
10,102762472,G,GGCG
9,117856130,T,G
9,117856135,C,G
```

Or upload a file containing variants (5MB limit):

Δεν επιλέχθηκε αρχείο.

Step 2. Select gene annotation (optional)

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Ensembl Gene ID | <input type="checkbox"/> UniProt/SwissProt ID |
| <input checked="" type="checkbox"/> Associated Gene Name | <input type="checkbox"/> RefSeq Protein ID |
| <input type="checkbox"/> Ensembl Transcript ID | <input type="checkbox"/> MIM Disease Accession |
| <input type="checkbox"/> Transcript Status | <input type="checkbox"/> PFAM ID |
| <input type="checkbox"/> Gene Description | <input type="checkbox"/> TIGRFam ID |
| <input type="checkbox"/> % GC Content | <input type="checkbox"/> Interpro ID |
| <input type="checkbox"/> Chromosome band | <input type="checkbox"/> GO Term Accession |
| <input type="checkbox"/> Ensembl Protein Family ID | <input type="checkbox"/> GO Slim GOA Accession |
| <input type="checkbox"/> Ensembl Family Description | |

Parameters

Assembly/Annotation:

Email (optional)

If provided, results will be sent via email.

Σχήμα 2.10. Περιβάλλον εργασίας εργαλείου PROVEAN/SIFT (PROVEAN Genome Variants), έχοντας εισάγει τη γενετική παραλλαγή rs10936599 (<http://provean.jcvi.org>)

2.4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

2.4.1 Πληθυσμιακό δείγμα

Τα αποτελέσματα της μελέτης εξόρυξης δεδομένων και κειμένου επικυρώθηκαν σε γενετικό υλικό από σαράντα παιδιά με κοιλιοκάκη δριμείας κλινικής εικόνας, σύμφωνα με την ηλικία έναρξης και διάγνωσης της ασθένειας, τη τυπική μορφή της ασθένειας και την ιστοπαθολογική ταξινόμηση κατά Marsh. Ειδικότερα, η επιλογή των σαράντα παιδιών με κοιλιοκάκη έγινε με τα εξής κριτήρια: ιστολογική εικόνα λεπτού εντέρου με υπερπλασία κρυπτών και ολική ατροφία λαχνών (Marsh 3c), μικρή ηλικία έναρξης συμπτωμάτων και διάγνωσης της νόσου, δίχως κληρονομικό ιστορικό, ισόρροπη συμμετοχή των δύο φύλων, καθώς και ισόρροπη συμμετοχή μεταξύ κλασικής και άτυπης κλινικής μορφής της κοιλιοκάκης.

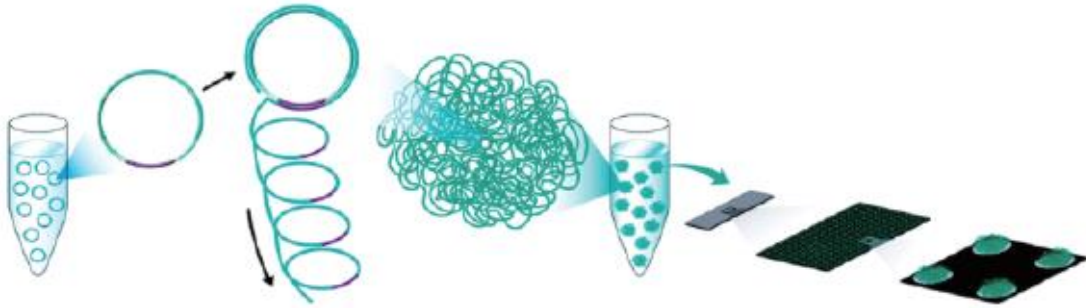
Το γενετικό υλικό των παιδιών με κοιλιοκάκη δριμείας κλινικής εικόνας συλλέχθηκε και απομονώθηκε από ολικό περιφερικό αίμα στο 1ο Τμήμα Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, ύστερα από έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Παιδιατρικού Νοσοκομείου *Αγία Σοφία* Αθηνών (Krini et al., 2012). Η διάγνωση της κοιλιοκάκης σε αυτούς τους ασθενείς βασίστηκε στα ESPGHAN κριτήρια (Walker-Smith, 1990). Για τους ασθενείς των οποίων η διάγνωση πραγματοποιήθηκε πριν το 1990, βασίστηκε στα κριτήρια ‘Interlaken’ (McNeish, 1989).

2.4.2 Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος-Whole Genome Sequencing (WGS)

Μετά την ολοκλήρωση του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project), με το οποίο δημιουργήθηκαν οι αλληλουχίες αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος, έγινε διαθέσιμη και η χρήση της αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) (Morgensztern et al., 2018). Πρόκειται για μια εργαστηριακή προσέγγιση, όπου καθορίζεται ολόκληρη η αλληλουχία του DNA ενός

οργανισμού μονομιάς. Με τη μέθοδο αυτή ανακαλύπτεται η σειρά των βάσεων στο πλήρες γονιδίωμα ενός οργανισμού, η οποία υποστηρίζεται από αυτόματες μεθόδους αλληλούχησης του DNA και από υπολογιστικές μεθόδους, που συγκεντρώνουν τους μεγάλους όγκους βιολογικών δεδομένων. Πριν τη χρήση τεχνικών αλληλούχησης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), οι τεχνικές αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος ήταν αργές, επίπονες και ακριβές, ενώ μετά την ευρεία χρήση των τεχνικών NGS, δόθηκε η δυνατότητα πραγματοποίησης αποτελεσματικών και πιο φθηνών αναλύσεων ολόκληρου του γονιδιώματος (Yin et al., 2019). Μέσω της αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, μπορεί κανείς να βρει πληροφορία σχετιζόμενη με γενετικές παραλλαγές, οι οποίες μπορεί να είναι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), ενθέσεις ή απαλοιφές, δομικές παραλλαγές και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variations, CNVs). Μια τυπική μεθοδολογία αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος αποτελείται από την προετοιμασία των δεδομένων, τη στοίχιση και συγκέντρωση, την κλήση των παραλλαγών, την επεξήγηση και την ανάλυση των δεδομένων (Yin et al., 2019).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος σε σαράντα παιδιά-ασθενείς με κοιλιοκάκη δριμείας κλινικής εικόνας με την πλατφόρμα BGISEQ-500 της εταιρείας BGI Genomics. Η BGISEQ-500 αποτελεί μια πλατφόρμα αλληλούχησης υψηλής απόδοσης, που βασίζεται στη χρήση της τεχνολογίας combinatorial Probe-Anchor Synthesis (cPAS), γραμμικής ισοθερμικής αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου (Linear isothermal Rolling-Circle Replication) και στην τεχνολογία νανοσφαιρών DNA (DNA Nanoballs, DNB™), ακολουθούμενη από ψηφιακή απεικόνιση υψηλής ανάλυσης (Drmanac et al., 2010). Ο συνδυασμός της γραμμικής ενίσχυσης και της τεχνολογίας DNB μειώνει το ποσοστό σφάλματος, ενισχύοντας παράλληλα το σήμα (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11. Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας της πλατφόρμας BGISEQ-500 της εταιρείας BGI Genomics (<https://www.bgi.com>).

Η μεθοδολογία μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερα βασικά στάδια:

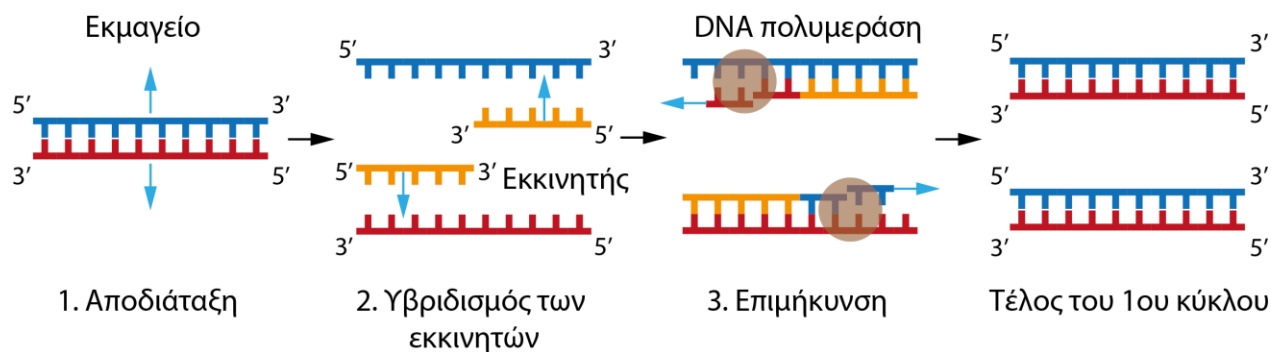
1. Το σχηματισμό της βιβλιοθήκης: Γενομικό DNA κόβεται σε τμήματα 500bp και τέσσερις τεχνητές αλληλουχίες προσαρμογών προστίθενται στα τμήματα με τη βοήθεια ενδονουκλεασών. Τα τροποποιημένα τμήματα ενισχύονται μέσω ενίσχυσης κυλιόμενου κύκλου μέχρι το σχηματισμό νανοσφαιρών DNA (DNB™).
2. Αυτο-συναρμολογούμενες νανοδιατάξεις DNA (Self-Assembling DNA Nanoarrays): Τα DNBs διατάσσονται σε υπόστρωμα που φέρει μέχρι 2,85 δις θέσεις και κάθε θέση μπορεί να φέρει ένα μόνο DNB.
3. Αλληλούχηση cPAS: Για την ανάγνωση 10 βάσεων δίπλα από τις θέσεις εισαγωγής των προσαρμογών (62-70 βάσεις ανά DNB).
4. Συγκέντρωση και ανάλυση των αποτελεσμάτων (Drmanac, 2010)).

Ύστερα από την αλληλούχηση, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των δεδομένων σε αρχεία BAM, XLS και png. Μετέπειτα, εφαρμόστηκαν υπολογιστικές προσεγγίσεις και εργαλεία ανάλυσης, αλλά και βιοπληροφορική ανάλυση μοριακών μονοπατιών για περαιτέρω ανάλυση των γενετικών παραλλαγών.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis το 1983 και πρόκειται για μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού *in vitro*. Κατά τη διάρκεια μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς (π.χ. ηλεκτροφόρηση, πέψη με ένζυμα περιορισμού, αλληλούχηση κ.ά.). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, η Taq πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η πολυμεράση αυτή έχει την ικανότητα να είναι δραστική ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστη αυτή των 72°C. Η πολυμεράση μπορεί να συνθέσει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η νέα αλυσίδα συντίθεται με κατεύθυνση 5'→3'. Εκτός από την DNA πολυμεράση, βασικά συστατικά μιας αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελούν και οι εκκινητές, που οριοθετούν την αλληλουχία που ενισχύεται, αλλά και τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotides, dNTPs). Τα ιόντα Mg²⁺, είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες της DNA πολυμεράσης, σχηματίζοντας διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, την αλυσίδα μήτρα και τους εκκινητές. Το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες για τη διεξαγωγή της αντίδρασης και φυσικά, το γενετικό υλικό περιέχει την αλληλουχία-στόχο.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ξεκινά με την αποδιάταξη του DNA, που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία-στόχο, όπου οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται, λόγω θέρμανσης σε θερμοκρασία 94-95°C για 30" έως 1'. Έπειτα, η θερμοκρασία μειώνεται στους 55-65°C για 30" έως 1', όπου οι εκκινητές προσδένονται στην αλληλουχία-στόχο. Ακολουθεί το στάδιο της επιμήκυνσης, όπου η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και που η Taq πολυμεράση εισάγει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά προς τον κλώνο-στόχο με κατεύθυνση από 5'→3' (Σχήμα 2.12.). Τα τρία αυτά διαδοχικά στάδια επαναλαμβάνονται για *n* κύκλους (όπου *n*, ο αριθμός των κύκλων). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εκτελείται στο θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα, που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.



Σχήμα 2.12. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Παπανικολάου *et al.*, 2015).

Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και εφαρμόστηκε μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την κάθε υποψήφια γενετική παραλλαγή, που προέκυψε από την εξόρυξη δεδομένων και κειμένου στα σαράντα παιδιά με κοιλιοκάκη δριμείας κλινικής εικόνας (βλέπε ενότητα 2.4.1). Παρακάτω, σημειώνεται η στοιχειομετρία της αντίδρασης (Πίνακας 2.1) και το πρωτόκολλο στο θερμικό κυκλοποιητή (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.1. Τα αντιδραστήρια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητες
ddH ₂ O			17.3 μ L
Εμπρόσθιος εκκινητής*	10 mM	0.5 μ M	1.25 μ L
Ανάστροφος εκκινητής*	10 mM	0.5 μ M	1.25 μ L
dNTPs	10mM	0.2 μ M	0.5 μ L
Buffer	10x	1x	2.5 μ L
Taq polymerase	5 u/ μ L		0.2 μ L
DNA	50 ng/ μ L		2 μ L

*εκκινητής ειδικός για την εκάστοτε αλληλουχία- στόχο

Πίνακας 2.2. Το πρωτόκολλο στο θερμικό κυκλοποιητή για την ενίσχυση του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την εκάστοτε παραλλαγή.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
95°C	2'	40
95°C	15"	
Tm*	15"	
72°C	1"	
72°C	30"	
4°C	forever	

*Η θερμοκρασίας υβριδοποίησης (Tm) καθορίστηκε για την εκάστοτε παραλλαγή

2.4.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη και αποτελεσματική μέθοδο διαχωρισμού νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) και πρωτεϊνών. Βασίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Κατά τον πολυμερισμό της, η αγαρόζη σχηματίζει ένα πορώδες πήκτωμα. Οι πόροι αυτοί επιτρέπουν τη μετακίνηση των μορίων διαμέσου του πηκτώματος, με αποτέλεσμα τα μικρότερα μόρια να κινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με αυτά που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Το DNA, λόγω των φωσφορικών ομάδων είναι αρνητικά φορτισμένο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο εντός ηλεκτρικού πεδίου. Επιπλέον, η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων εντός του πηκτώματος αγαρόζης καθορίζεται και από τη διαμόρφωση του DNA (γραμμικό, κυκλικό), από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, που εφαρμόζεται και το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Κατά το διαχωρισμό τους, τα τμήματα DNA σχηματίζουν ζώνες στο πήκτωμα, με την απόστασή τους από το σημείο φόρτωσης των δειγμάτων να είναι ενδεικτική του μεγέθους τους. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) λόγω φθορίζουσών ουσιών, που προστίθενται κατά τη διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης. Οι χρωστικές αυτές προσδένονται στις μεγάλες αύλακες του DNA και φθορίζουν, ύστερα από διέγερση με υπεριώδη ακτινοβολία. Μεταξύ των χρωστικών που χρησιμοποιούνται, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), κάποιες

θεωρούνται έντονα μεταλλαξιγόνες (Lee et al., 2012; Παπανικολάου et al., 2015). Λιγότερο μεταλλαξιγόνος χρωστική και με υψηλή ευαισθησία είναι η Midori Green (NIPPON Genetics), η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ήταν:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (TAE Buffer, Tris-Acetate-EDTA), τελικής συγκέντρωσης 1x, το οποίο προκύπτει από αρραίωση από TAE 50x (Για το TAE 50x: 242g Tris base, 57.1mL Glacial Acetic Acid, 100mL EDTA 0.5M, pH 8.0 και υπερκάρθαρο H₂O μέχρι τελικό όγκο 1000mL)
- Αγαρόζη
- Χρωστική Midori Green Advance (NIPPON Genetics)

Για την ηλεκτροφόρηση, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x
- Διάλυμα φόρτωσης Orange G 6x
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp DNA Ladder (NIPPON Genetics)

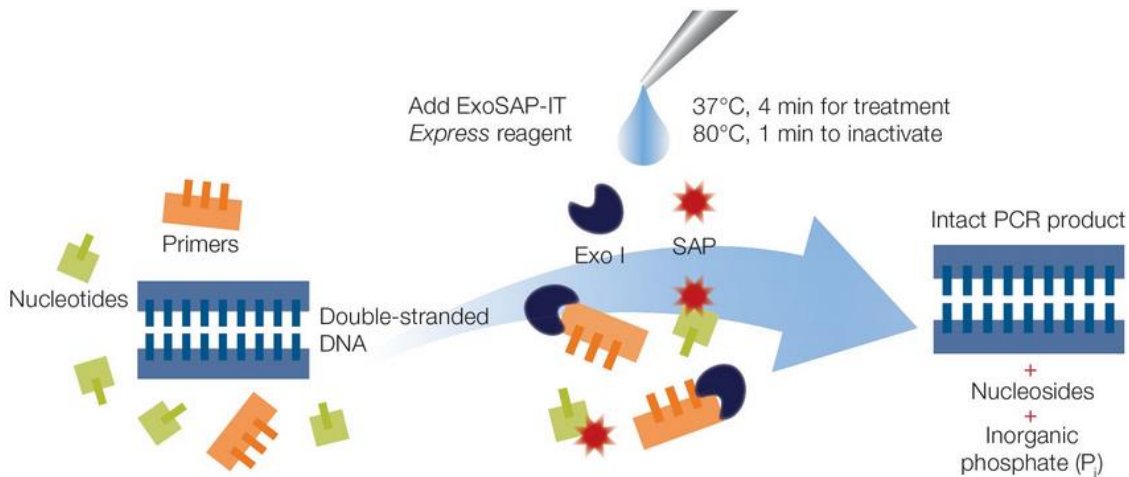
Το μήκος των τμημάτων DNA, που πρόκειται να διαχωριστούν, καθορίζουν την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη και τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Πηκτώματα αγαρόζης 1,5% (w/v) έχουν διακριτική ικανότητα 200bp έως 3kb, ενώ πηκτώματα 2% (w/v) 50bp έως 2kb. Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η επιτυχία κάθε αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του κάθε προϊόντος της αντίδρασης αυτής σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, σε τάση ηλεκτρικού ρεύματος 90V για 40'.

2.4.5 Καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης καθαρίστηκε για να ακολουθηθεί η αλληλούχηση κατά Sanger. Έτσι, απομακρύνθηκαν τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, οι εκκινητές που δεν ενσωματώθηκαν, τα ιόντα Mg²⁺, η Taq πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε

να απομείνει καθαρό προϊόν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τα συστατικά αυτά απομακρύνονται, προκειμένου να μην παρέμβουν στη διαδικασία της αλληλούχησης.

Με την ενζυμική μέθοδο ExoSAP-IT είναι εφικτός ο αποτελεσματικός καθαρισμός του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πριν την αλληλούχηση του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα σύστημα δύο ενζύμων, της ανασυνδυασμένης αλκαλικής φωσφατάσης γαρίδας (Shrimp Alkaline Phosphatase, rSAP) και της εξωνουκλεάσης I (Exonuclease I, ExoI). Η εξωνουκλεάση I αποδιατάσσει μονόκλωνο DNA με κατεύθυνση 3'→5' και η αλκαλική φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει τα ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια.



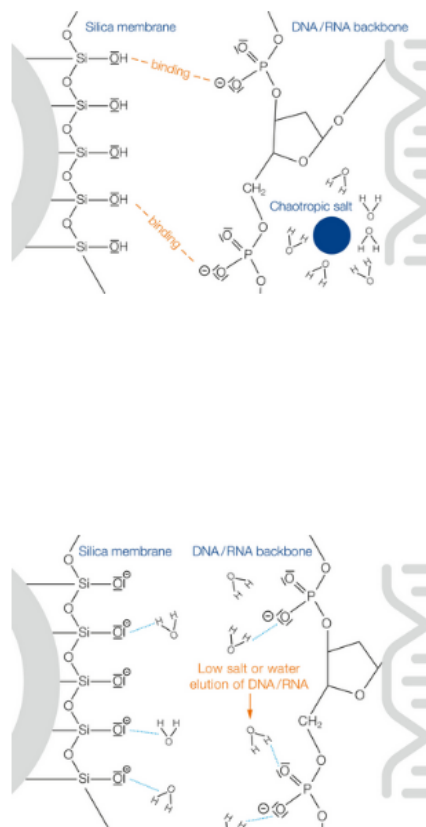
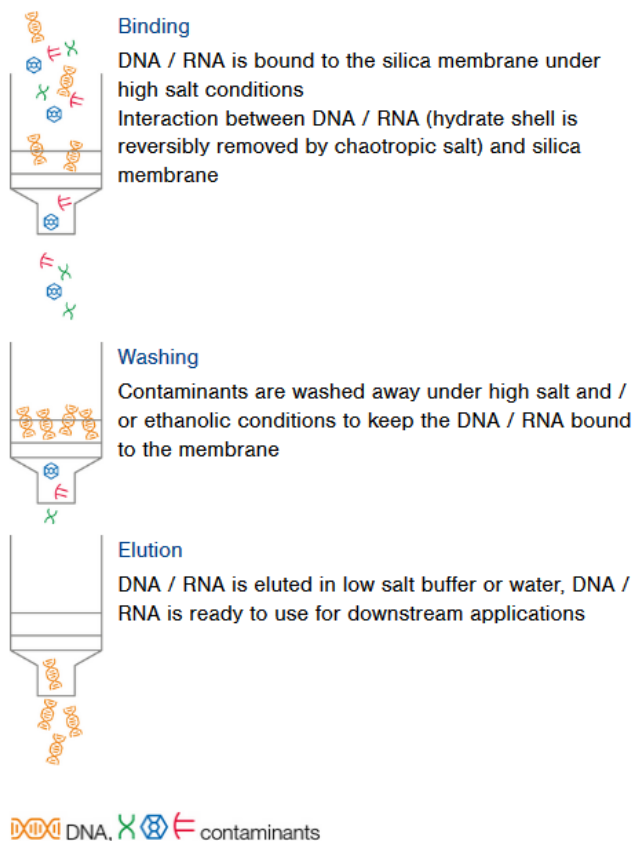
Σχήμα 2.13. Σχηματική αναπαράσταση της ενζυμικής μεθόδου καθαρισμού ExoSAP-IT (www.thermofisher.com).

Σε κάθε προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, σύμφωνα με τον κατασκευαστή, συνίσταται η προσθήκη 10Units ExoI και 1Unit rSAP. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15' και έπειτα, στους 80°C για 15' για πλήρη απενεργοποίηση των δύο ενζύμων (Σχήμα 2.13). Έπειτα, τα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αλληλούχηση.

Παράλληλα, έγινε χρήση προτυποποιημένων συστημάτων (kit). Το σύστημα αυτό βασίζεται στην απομάκρυνση των ρύπων με τη χρήση μεμβράνης διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) ή αλλιώς μεμβράνης silica. Υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας το DNA προσδένεται στη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυσης με τη χρήση αιθανόλης απομακρύνονται οι ρύποι, ενώ

το DNA παραμένει προσδεμένο στη μεμβράνη. Τέλος, υπό συνθήκες χαμηλής αλατότητας, γίνεται έκλουση της μεμβράνης από το καθαρό προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, το οποίο είναι έτοιμο προς περαιτέρω χρήση (Σχήμα 2.14).

NucleoSpin principle



Σχήμα 2.14. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής του προτυποποιημένου συστήματος *NucleoSpin PCR Clean-up* της εταιρείας *Macherey-Nagel* (<https://www.mn-net.com/bioanalysis/bio-brands/nucleospin-information/>).

Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα του προτυποποιημένου συστήματος *NucleoSpin PCR Clean-up* της εταιρείας *Macherey-Nagel* είναι τα εξής:

- i. Προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης (NTI Buffer) σε διπλάσια αναλογία από αυτή του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.
- ii. Τοποθέτηση του μείγματος σε στήλη *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column*, η οποία έπειτα τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής (Collection Tube).

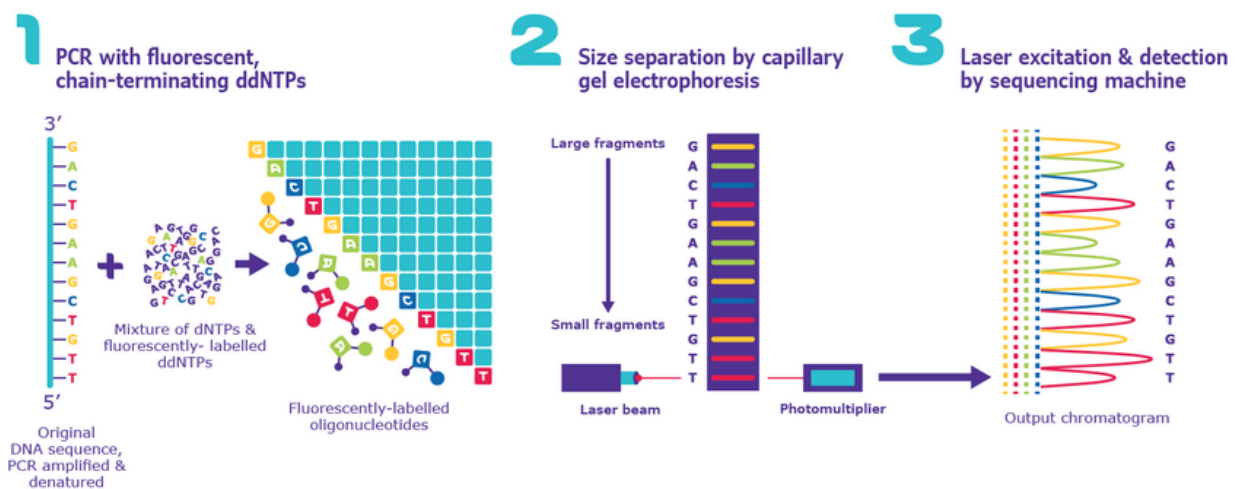
- Φυγοκέντρωση για 30" στα 11.000 x g ώστε να προσδεθεί το DNA στη μεμβράνη και απόρριψη του διηθήματος που βρίσκεται στο σωληνάριο συλλογής.
- iii. Προσθήκη 700μL διαλύματος πλύσης (Buffer NT3) στη στήλη και φυγοκέντρωση για 30" στα 11.000 x g και απόρριψη του διηθήματος που βρίσκεται στο σωληνάριο συλλογής. Επανάληψη αυτού του βήματος.
 - iv. Φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000 x g για την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος πλύσης NT3.
 - v. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάκι τύπου Eppendorf 1,5 mL και προσθήκη 30 mL διαλύματος έκλουσης (NE Buffer). Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και φυγοκέντρωση με ταχύτητα 11.000 x g για 1'.

2.4.6 Αλληλούχηση DNA κατά Sanger - DNA Sanger Sequencing

Η μέθοδος αλληλούχησης του DNA κατά Sanger αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger το 1975, αλλά εμπορευματοποιήθηκε το 1977 και ονομάζεται αλλιώς αλληλούχηση με διδεοξυνουκλεοτίδια (Dideoxynucleotides, ddNTPs) ή αλληλούχηση τερματισμού αλυσίδας (chain termination sequencing). Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση τροποποιημένων δεοξυνουκλεοτιδίων, των τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων, που φέρουν υδρογόνο, αντί για υδροξύλιο στην 3' θέση της δεόξυριβόζης. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια ενσωματώνονται, φυσιολογικά, κατά τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA μέσω των 5' τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά εμποδίζουν την ενσωμάτωση του επόμενου διδεοξυνουκλεοτιδίου, επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση απαιτείται μονόκλωνη DNA αλυσίδα ως εκμαγείο της αντίδρασης, ενός από τους εκκινητές, DNA πολυμεράσης για την ενίσχυση της αλυσίδας εκμαγείου, δεοξυριβονουκλεοτίδια, τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια. (Verma et al., 2017). Το κάθε διδεοξυνουκλεοτίδιο σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική ουσία.

Για την αλληλούχηση κατά Sanger (Σχήμα 2.14), το DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί αναμειγνύεται σε σωληνάριο με τον εκκινητή, τη DNA πολυμεράση, τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια και τα τέσσερα τριφωσφορικά 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδια.

Το μείγμα θερμαίνεται για την αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA ώστε να συνδεθεί ο εκκινητής στη μονόκλωνη αλυσίδα. Μετέπειτα η DNA πολυμεράση συνθέτει το νέο DNA έως ότου αντί για δεοξυριβονουκλεοτίδιο προστεθεί διδεοξυνουκλεοτίδιο. Στα νεοσυντιθέμενα τμήματα DNA είναι διακριτό το 2',3'-διδεοξυνουκλεοτίδιο στο τέρμα της σύνθεσης της αλυσίδας DNA. Τα σημασμένα προϊόντα της αλληλούχησης ηλεκτροφορούνται σε τριχοειδή σωληνάρια, παρέχοντας τη δυνατότητα διαχωρισμού τμημάτων διαφοράς μήκους, ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου. Στη συνέχεια, ύστερα από διέγερση των φθορίζουσών ουσιών με laser, εκπέμπεται χαρακτηριστικό σήμα, που συλλέγεται από ειδικούς ανιχνευτές. Τα δεδομένα, που συλλέγονται από τους ανιχνευτές, αποτελούνται από μια σειρά κορυφών, με αποτέλεσμα η αλληλουχία του DNA να αναπαρίσταται σε ένα χρωματογράφημα, όπου απεικονίζεται η ένταση καθενός από τα φθορίζοντα σήματα ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης. Κάθε βάση αναπαρίσταται ως μια καμπύλη διαφορετικού χρώματος (<https://www.khanacademy.org>).



Σχήμα 2.15. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου αλληλούχησης κατά Sanger (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html>).

ΚΕΦ. 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την εξόρυξη δεδομένων και κειμένου, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.1.1, οι δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά από τις δύο αναζητήσεις, που πραγματοποιήθηκαν στη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed (n=76) και παρέμειναν στη μελέτη, παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Επιλεγμένες δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=76) από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed.

PMIDs		
28810029	25047399	23922062
28298278	24161347	23458541
28546222	28188172	26347156
29131356	23083988	22922421
25157666	22239821	22964554
19508313	25623043	27405898
22549889	23845233	21248165
26032154	20179237	20851210
27295421	24792481	21401738
22526468	22288441	23922078
26681723	23281890	26342013
22749351	21289299	25081899
21392369	22404400	21330559
24565339	23463575	20440074
20685275	20937050	30593798
19494248	21953605	27612641
19785615	28363349	21245833
21880073	21605296	22825364
20461805	21982968	20173778
22825364	19996326	21762658
22517096	21723236	29915405
21571158	29054322	27033429
20675785	22704573	28664941
28664941	20805461	28333239
28333239	27499257	
27885681	26352082	

Στη συνέχεια, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.1.2, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο BioReader, με σκοπό την ταξινόμηση των δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά

(n=76) από τη βάση βιβλιογραφικών δεδομένων PubMed, βάσει σχετικότητας. Από την τελική κατάταξη του εργαλείου (n=61), ορισμένες απορρίφθηκαν, με αποτέλεσμα οι δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42), που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη προς εξαγωγή πληροφορίας και που ουσιαστικά αποτελούν το δειγματικό χώρο της εργασίας, να είναι αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

PMID	Τίτλος
19494248	Prevalence of celiac disease and gluten sensitivity in the United States clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness study population.
19996326	Continual monitoring of intraepithelial lymphocyte immunophenotype and clonality is more important than snapshot analysis in the surveillance of refractory coeliac disease.
20179237	High-resolution array comparative genomic hybridization in sporadic and celiac disease-related small bowel adenocarcinomas
20440074	IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis.
20685275	Morbidity and mortality among older individuals with undiagnosed celiac disease.
20851210	Patients with celiac disease and B-cell lymphoma have a better prognosis than those with T-cell lymphoma.
20937050	Risk of colorectal adenomas in patients with coeliac disease
21245833	Causes of death in people with celiac disease spanning the pre- and post-serology era: a population-based cohort study from Derby, UK.
21289299	Risk of lymphoproliferative malignancy in relation to small intestinal histopathology among patients with celiac disease.
21330559	MR enteroclysis in refractory celiac disease: proposal and validation of a severity scoring system.
21392369	Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity
21401738	Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases.
22239821	Meta-analysis: coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy.
22288441	The long-term risk of malignancy following a diagnosis of coeliac disease or dermatitis herpetiformis: a cohort study
22549889	Celiac disease in children and adolescents: special considerations.
22922421	Large granular lymphocytic leukemia: a treatable form of refractory celiac disease.
23083988	Mortality and malignancy in celiac disease.
23281890	Risk of thyroid cancer in a nationwide cohort of patients with biopsy-verified celiac disease.
23845233	Risk of colorectal neoplasia in patients with celiac disease: a multicenter study.

23922062	Mucosal healing and risk for lymphoproliferative malignancy in celiac disease: a population-based cohort study.
24161347	Risk of congenital malformations among offspring of mothers and fathers with celiac disease: a nationwide cohort study.
24565339	Autoantibodies against MHC class I polypeptide-related sequence A are associated with increased risk of concomitant autoimmune diseases in celiac patients.
25047399	Incidence of malignancies in diagnosed celiac patients: a population-based estimate.
25081899	Autoimmune diseases associated with non-Hodgkin lymphoma: a nationwide cohort study.
26032154	Predictors and Significance of Incomplete Mucosal Recovery in Celiac Disease After 1 Year on a Gluten-Free Diet.
26342013	Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease.
26347156	Mechanisms and management of refractory coeliac disease.
27033429	Detection of Active Epstein-Barr Virus Infection in Duodenal Mucosa of Patients With Refractory Celiac Disease.
27885681	Dynamics of occurrence of refractory coeliac disease and associated complications over 25 years.
28188172	T-cell repertoires in refractory coeliac disease
28298278	Pediatric Celiac Disease: Follow-Up in the Spotlight.
28333239	Small Bowel Carcinomas in Coeliac or Crohn's Disease: Clinico-pathological, Molecular, and Prognostic Features. A Study From the Small Bowel Cancer Italian Consortium.
28546222	Prevalence of Celiac Disease in 52,721 Youth With Type 1 Diabetes: International Comparison Across Three Continents.
28664941	Small bowel carcinomas in celiac or Crohn's disease: distinctive histophenotypic, molecular and histogenetic patterns.
28810029	Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity: A Review
29131356	Gluten sensitivities and the allergist: Threshing the grain from the husks.
29915405	Wheat Intolerance and Chronic Gastrointestinal Symptoms in an Australian Population-based Study: Association Between Wheat Sensitivity, Celiac Disease and Functional Gastrointestinal Disorders.
22704573	Small bowel endoscopy and coeliac disease.
22749351	Celiac disease: an immunological jigsaw.
25623043	Local communication among mucosal immune cells in patients with celiac disease.
30593798	Plasma Cells Are the Most Abundant Gluten Peptide MHC-expressing Cells in Inflamed Intestinal Tissues From Patients With Celiac Disease.
27612641	Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease.

Μετά από τη μελέτη των παραπάνω δημοσιεύσεων σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά (n=42) και τη χρήση των εργαλείων PolySearch2, EVEX καθώς και του περιηγητή Ensembl, δημιουργήθηκε συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 3.3), όπου παρουσιάζονται τα γονίδια, που

συσχετίζονται, θετικά ή αρνητικά, με την κοιλιοκάκη, ή/και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/και τους ιούς ή/και την Th1 κυτταρική ανοσία.

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικός πίνακας γονιδίων που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη ή/και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/και τους ιούς.

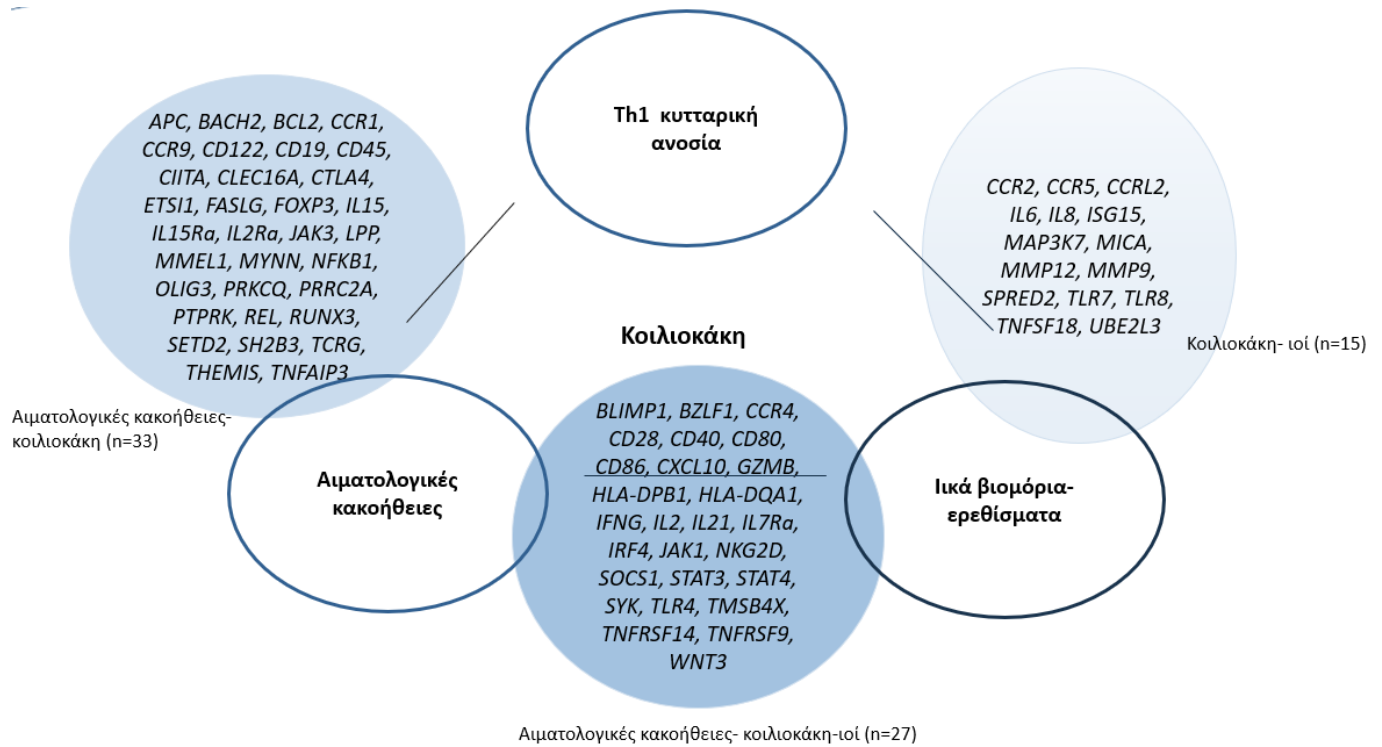
Γονίδια	Αιματολογικές κακοήθειες	Κοιλιοκάκη	Ιοί
<i>APC</i>	✓	✓	-
<i>BACH2</i>	✓	✓	-
<i>BCL2</i>	✓	✓	-
<i>BLIMP1</i>	✓	✓	✓
<i>BZLF1</i>	✓	✓	✓
<i>CCR1</i>	✓	✓	-
<i>CCR2</i>	-	✓	✓
<i>CCR4</i>	✓	✓	✓
<i>CCR5</i>	-	✓	✓
<i>CCR9</i>	✓	✓	-
<i>CCRL2</i>	-	✓	✓
<i>CD122</i>	✓	✓	-
<i>CD19</i>	✓	✓	-
<i>CD28</i>	✓	✓	✓
<i>CD40</i>	✓	✓	✓
<i>CD45</i>	✓	✓	-
<i>CD80</i>	✓	✓	✓
<i>CD86</i>	✓	✓	✓
<i>CIITA</i>	✓	✓	-
<i>CLEC16A</i>	✓	✓	-
<i>CTLA4</i>	✓	✓	-
<i>CXCL10</i>	✓	✓	✓
<i>ETS1</i>	✓	✓	-
<i>FASLG</i>	✓	✓	-
<i>FOXP3</i>	✓	✓	-
<i>GZMB</i>	✓	✓	✓
<i>HLA-DPB1</i>	✓	✓	✓
<i>HLA-DQA1</i>	✓	✓	✓
<i>IFNG</i>	✓	✓	✓
<i>IL15</i>	✓	✓	-
<i>IL15RA</i>	✓	✓	-
<i>IL-2</i>	✓	✓	✓
<i>IL-21</i>	✓	✓	✓
<i>IL2RA</i>	✓	✓	-
<i>IL-6</i>	-	✓	✓

<i>IL7Ra</i>	✓	✓	✓
<i>IL8</i>	-	✓	✓
<i>IRF4</i>	✓	✓	✓
<i>ISG15</i>	-	✓	✓
<i>JAK1</i>	✓	✓	✓
<i>JAK3</i>	✓	✓	-
<i>LPP</i>	✓	✓	-
<i>MAP3K7</i>	-	✓	✓
<i>MICA</i>	-	✓	✓
<i>MMEL1</i>	✓	✓	-
<i>MMP12</i>	-	✓	✓
<i>MMP9</i>	-	✓	✓
<i>MYNN</i>	✓	✓	-
<i>NFKB1</i>	✓	✓	-
<i>NKG2D</i>	✓	✓	✓
<i>OLIG3</i>	✓	✓	-
<i>PRKCQ</i>	✓	✓	-
<i>PRRC2A</i>	✓	✓	-
<i>PTPRK</i>	✓	✓	-
<i>REL</i>	✓	✓	-
<i>RUNX3</i>	✓	✓	-
<i>SETD2</i>	✓	✓	-
<i>SH2B3</i>	✓	✓	-
<i>SOCS1</i>	✓	✓	✓
<i>SPRED2</i>	-	✓	✓
<i>STAT3</i>	✓	✓	✓
<i>STAT4</i>	✓	✓	✓
<i>SYK</i>	✓	✓	✓
<i>TCRG</i>	✓	✓	-
<i>THEMIS</i>	✓	✓	-
<i>TLR4</i>	✓	✓	✓
<i>TLR7</i>	-	✓	✓
<i>TLR8</i>	-	✓	✓
<i>TMSB4X</i>	✓	✓	✓
<i>TNFAIP3</i>	✓	✓	-
<i>TNFRSF14</i>	✓	✓	✓
<i>TNFRSF9</i>	✓	✓	✓
<i>TNFSF18</i>	-	✓	✓
<i>UBE2L3</i>	-	✓	✓
<i>WNT3</i>	✓	✓	✓

✓ : Το γονίδιο συσχετίζεται θετικά με τη στήλη στην οποία βρίσκεται το σύμβολο.

- : Δεν έχει βρεθεί συσχέτιση του γονιδίου με τη στήλη στην οποία βρίσκεται το σύμβολο.

Όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 3.1, τα γονίδια του Πίνακα 3.3 (n=75) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες. Αυτά που συσχετίζονται θετικά, δηλαδή υπάρχει διαθέσιμη πληροφορία που να τα συνδέει με την κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες (n=33), αυτά που συσχετίζονται θετικά με την κοιλιοκάκη, τις αιματολογικές κακοήθειες, αλλά και τα ιικά βιομόρια-ερεθίσματα (n=27) και τέλος, αυτά που συσχετίζονται θετικά με την κοιλιοκάκη και τα ιικά βιομόρια-ερεθίσματα (n=15). Όλα τα γονίδια (n=75) συσχετίζονται θετικά και με την Th1 κυτταρική ανοσία. Στη πρώτη ομάδα γονιδίων, εντοπίζονται γονίδια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των T-κυττάρων στο θύμο αδένιο (*THEMIS*, *RUNX3*), στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων (*SH2B3*, *CTLA4*, *CITA*), στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B-κυττάρων (*BACH2*), αλλά και το γονίδιο *IL-15*, που αποτελεί κίριο ρυθμιστή στην παθογένεση της κοιλιοκάκης. Είναι εμφανές πως δυσλειτουργίες και διαταραχές στη ρύθμιση και λειτουργία των γονιδίων αυτών, μπορούν δυνητικά να πυροδοτήσουν την εμφάνιση κακοηθειών, τόσο B- όσο και T-κυττάρων, πόσο δε μάλλον σε ένα ήδη διαταραγμένο και φλεγμονώδες περιβάλλον σε ασθενείς με κοιλιοκάκη. Στην δεύτερη ομάδα, παρατηρούνται γονίδια, που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. *BLIMP1*, *STAT3*, *STAT4*), κινάσες (π.χ. *JAK1*, *SYK*), κυτταροκίνες (π.χ. *CXCL10*, *IFNG*, *IL-2*, *IL-21*) και πρωτεΐνες επιφανείας των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων (π.χ. *CD28*, *CD40*, *CD80*, *CD86*), καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για Αντιγόνα Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων, (π.χ. *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*). Στην τρίτη ομάδα βρέθηκαν γονίδια, όπως το *TLR7* και *TLR8*, που κωδικοποιούν για υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων, οι οποίοι ενεργοποιούνται από ssRNA ύστερα από ιική λοίμωξη (Bender et al., 2020), προωθώντας την Th1 ανοσία (Keshavarz-Fathi and Rezaei, 2019). Μεταξύ άλλων βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς χημειοκινών, τα *CCR2*, *CCR5* και *CCRL2*, με τις χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους να ενέχουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στο σημείο της φλεγμονής.



Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη και την Th1 κυτταρική ανοσία και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/ και τα ιικά βιομόρια-ερεθίσματα.

Επιπλέον, παρατίθεται ο συγκεντρωτικός πίνακας, που παρουσιάζει τις γενετικές παραλλαγές γονιδίων, που έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με τις αιματολογικές κακοήθειες και την κοιλιοκάκη. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε γενετική παραλλαγή, καταγράφεται το γονίδιο στο οποίο εντοπίζεται η παραλλαγή, τα αλληλόμορφα της γενετικής παραλλαγής και η συχνότητα μειοψηφικού αλληλομόρφου, όπως και το αλληλόμορφο, που συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικών κακοηθειών και κοιλιοκάκης, αλλά και ο τύπος της παραλλαγής (Πίνακας 3.4).

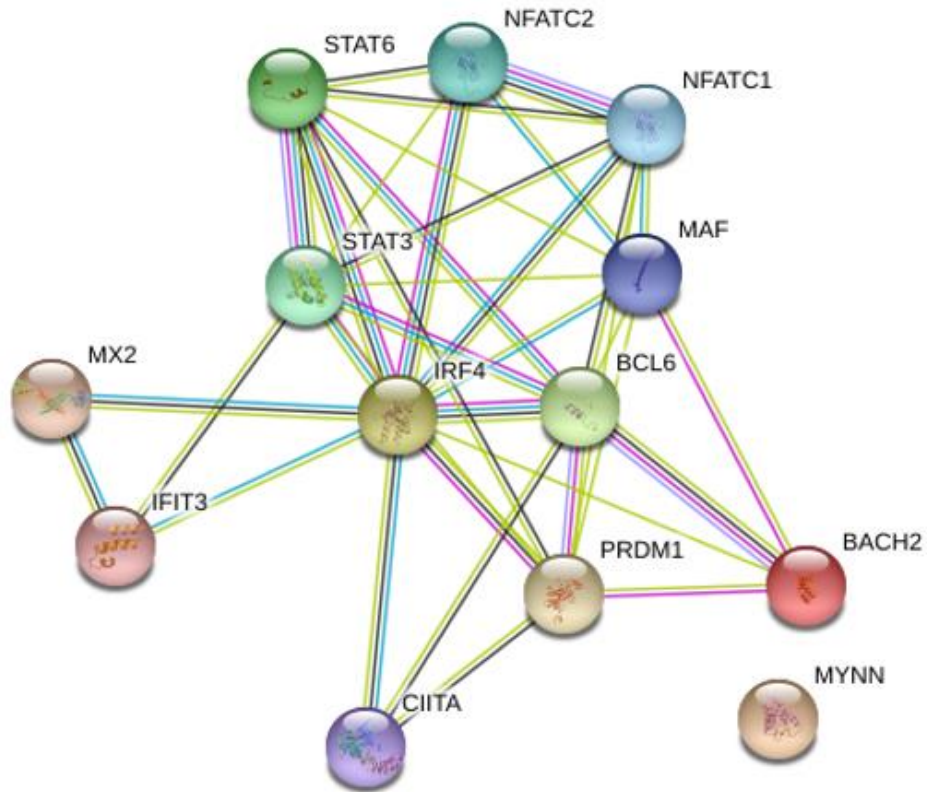
Πίνακας 3.4 Συγκεντρωτικός πίνακας γενετικών παραλλαγών που συσχετίζονται με την κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες.

Γονίδια	Γενετικές παραλλαγές Αλληλόμορφα MAF	Αιματολογικές κακοήθειες	Κοιλιοκάκη	Παραλλαγή
<i>BACH2</i>	rs10806425 C/A Ancestral: C MAF: 0.27 (A)	C	A	intron variant (παραλλαγή σε εσώνιο)
<i>IRF4</i>	rs1050976 C/T Ancestral: C MAF: 0.31 (T)	T	T	3 prime UTR variant (παραλλαγή στην 3' UTR)
<i>MYNN</i>	rs10936599 C/T Ancestral: C MAF: 0.27 (T)	C	T	synonymous variant (συνώνυμη παραλλαγή)

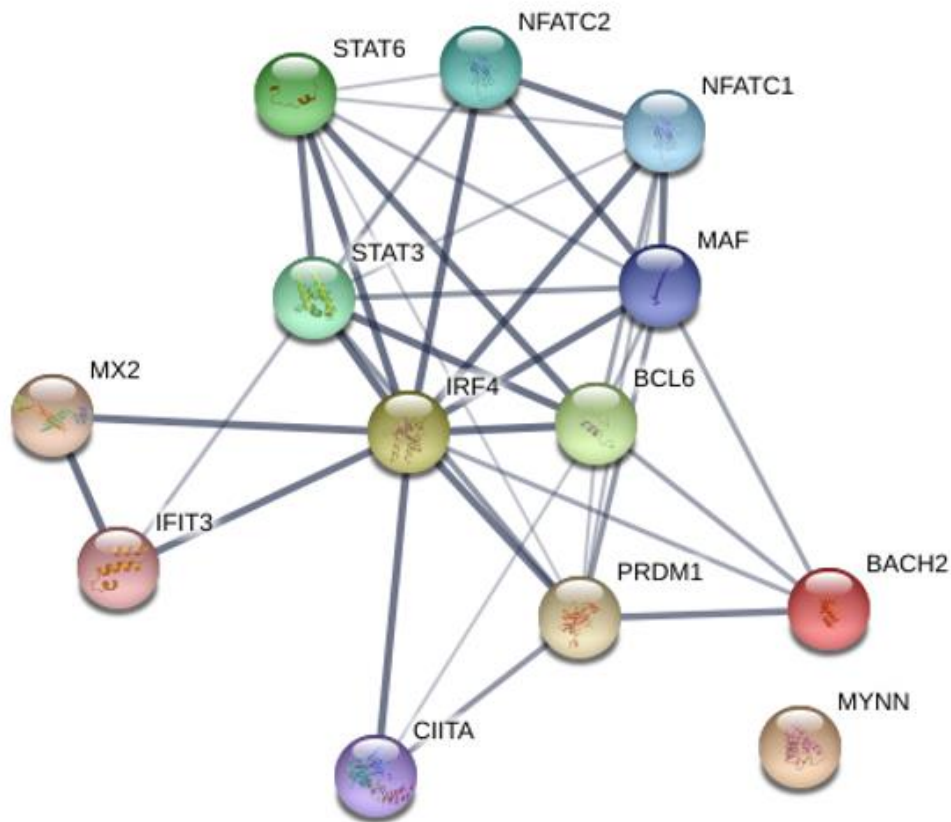
MAF: Minor Allele Frequency, Συχνότητα Μειοψηφικού αλληλομόρφου
Ancestral: Αρχέγονο αλληλόμορφο

Οι εν λόγω γενετικές παραλλαγές επιβεβαιώθηκαν και στην ομάδα των παιδιών με κοιλιοκάκη δριμείας νόσου για τα οποία έχουμε δεδομένα ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος και κατόπιν, εφαρμογής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και αλληλούχησης κατά Sanger.

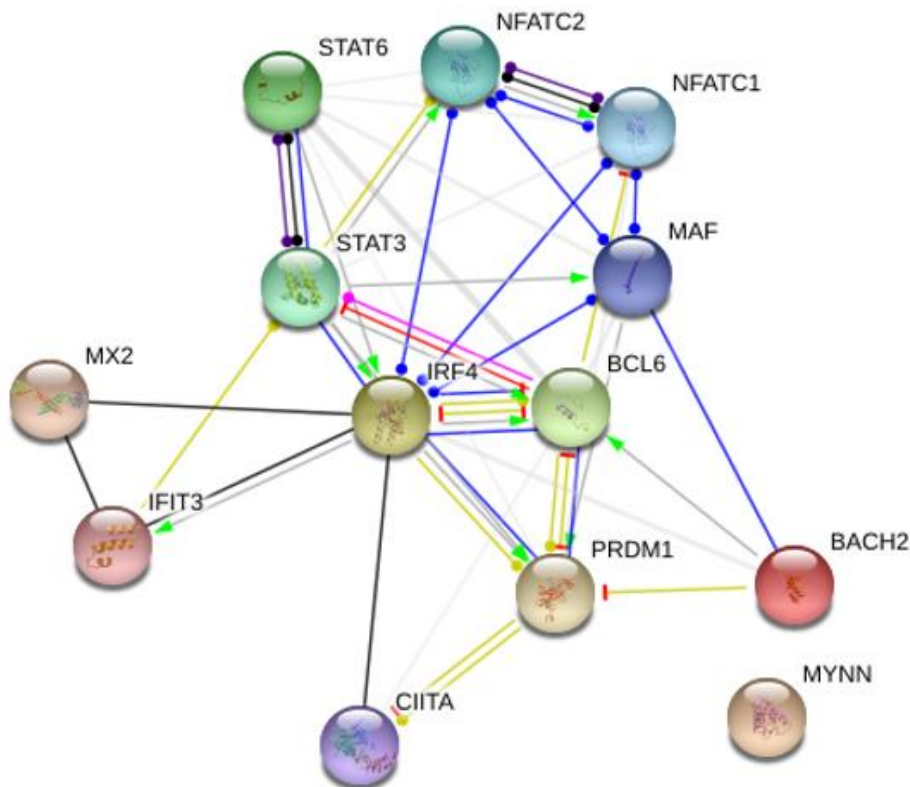
Προκειμένου να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί στη συννοσηρότητα της κοιλιοκάκης και των αιματολογικών κακοηθειών, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο STRING. Παρακάτω παρατίθενται τα σχήματα του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου από την αναζήτηση των πρωτεϊνών *BACH2*, *IRF4*, *MYNN* βάσει δεδομένων (Σχήμα 3.2), βάσει εμπιστοσύνης (Σχήμα 3.3) και βάσει μοριακής δράσης (Σχήμα 3.4). Επιπλέον, παρατίθενται οι πληροφορίες στατιστικής ανάλυσης του δικτύου αυτού (Πίνακας 3.5).



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες *BACH2*, *IRF4*, *MYNN* βάσει δεδομένων. Γαλάζιες γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις σύμφωνα με βάσεις δεδομένων, μωβ γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις από πειραματικά δεδομένα, μαύρες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει δεδομένων κοινής έκφρασης, κίτρινες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει εξόρυξης κειμένου, γκρι γραμμές: δεδομένα πρωτεϊνικής ομολογίας.



Σχήμα 3.3. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες *BACH2*, *IRF4*, *MYNN* βάσει εμπιστοσύνης. Το πάχος των γραμμών μεταξύ των κόμβων είναι ανάλογο της ισχύος των δεδομένων. (αχνό γκρι χρώμα: χαμηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.15, γκρι χρώμα: μέση τιμή εμπιστοσύνης-0.4, σκούρο γκρι χρώμα: υψηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.7, πολύ σκούρο γκρι χρώμα: ύψιστη τιμή εμπιστοσύνης-0.9)



Σχήμα 3.4. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN βάσει μοριακής δράσης. Οι γραμμές μεταξύ των κόμβων μπορεί να υποδηλώνουν θετική, αρνητική ή απροσδιόριστη δράση. Κίτρινη γραμμή: μεταγραφική ρύθμιση, μαύρη γραμμή: αντίδραση, μπλε γραμμή: πρόσδεση, γκρι γραμμή με πράσινο βέλος: ενεργοποίηση, μωβ γραμμή: κατάλυση, ροζ γραμμή: μετα-μεταφραστική τροποποίηση, κόκκινη γραμμή: καταστολή.

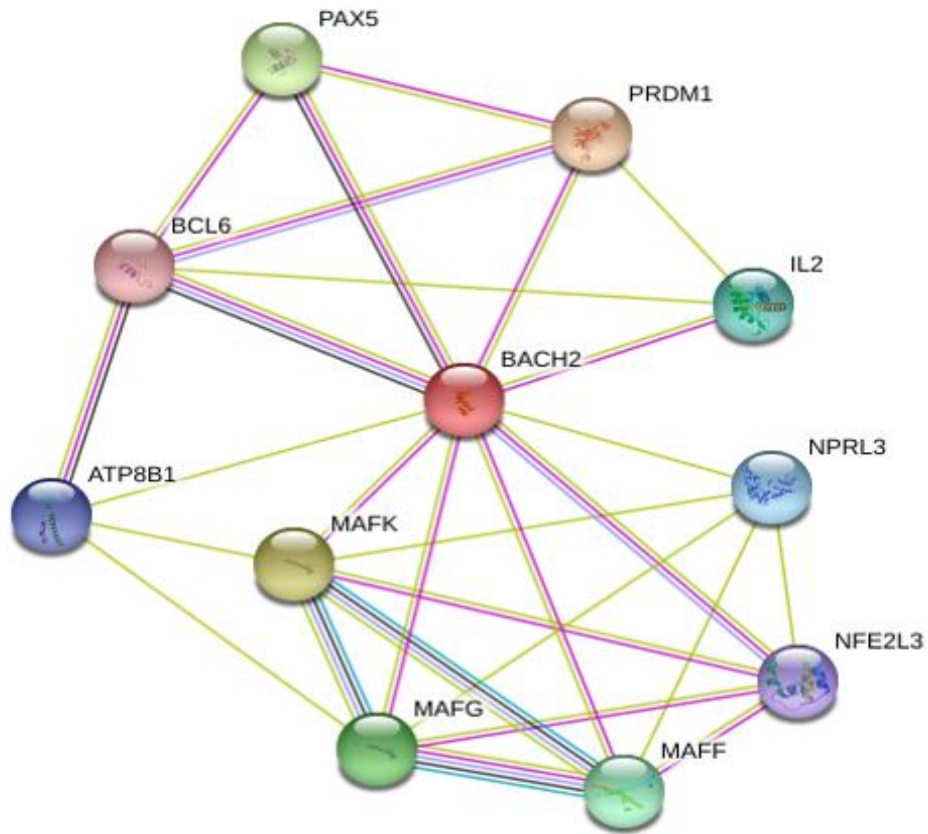
Πίνακας 3.5 Στατιστική ανάλυση πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες BACH2, IRF4, MYNN.

Στατιστική ανάλυση δικτύου	
number of nodes: 13	expected number of edges: 12
number of edges: 37	PPI enrichment p-value: 7.61e-09
average node degree: 5.69	
avg. local clustering coefficient: 0.76	

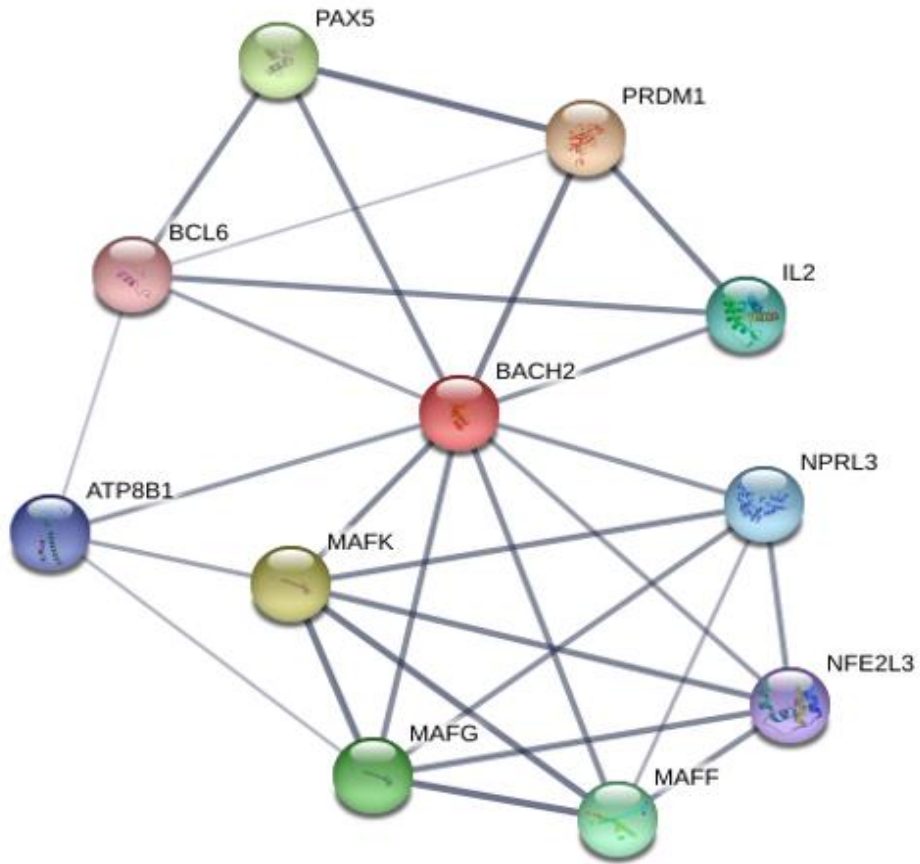
Προσαρμοσμένος πίνακας από την πηγή STRING version 11.0 (<https://string-db.org/>).
number of nodes: αριθμός κόμβων στο δίκτυο, *number of edges*: αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ κόμβων, *average node degree*: πόσες αλληλεπιδράσεις έχει κατά μέσο όρο μία πρωτεΐνη στο απορρέον δίκτυο, *clustering coefficient*: συντελεστής ομαδοποίησης δικτύου-υψηλές τιμές υποδηλώνουν υψηλή σύνδεση, *PPI enrichment p-value*: τιμή p-value της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Το παραπάνω πρωτεϊνικό δίκτυο αποτελείται από 13 κόμβους (πρωτεΐνες) και 37 αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ο συντελεστής ομαδοποίησης του δικτύου είναι 0.76, υποδηλώνοντας ένα έντονα συνδεδεμένο δίκτυο και η τιμή PPI enrichment p-value είναι $7.61e-09$ υποδηλώνοντας ότι στο συγκεκριμένο δίκτυο οι πρωτεΐνες είναι μερικώς, βιολογικά συνδεδεμένες ως ομάδα (Πίνακας 3.5). Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό δίκτυο υποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών BACH2 και IRF4, τόσο μεταξύ τους, όσο και με άλλες πρωτεΐνες, ενώ για την πρωτεΐνη MYNN δεν καταγράφονται αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις. Στα απορρέοντα STRING αποτελέσματα μας, μπορεί κάποιος να δει πως οι πρωτεΐνες BACH2 και IRF4 εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια διαμεσολαβούμενα από κυτταροκίνες, στη ρύθμιση της μεταγραφής, αλλά και στο μονοπάτι διαφοροποίησης των B- και T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, από το πρωτεϊνικό δίκτυο επισημαίνεται ότι η IRF4 προωθεί την έκφραση της PRDM1, ενώ η PRDM1 καταστέλλει την έκφραση της CIITA. Επιπλέον, όσον αφορά την αλληλεπίδραση IRF4 και BCL6, η IRF4 καταστέλλει την έκφραση της BCL6 και αντίστροφα. Ακόμα, η BCL6 καταστέλλει τη μεταγραφή της STAT3.

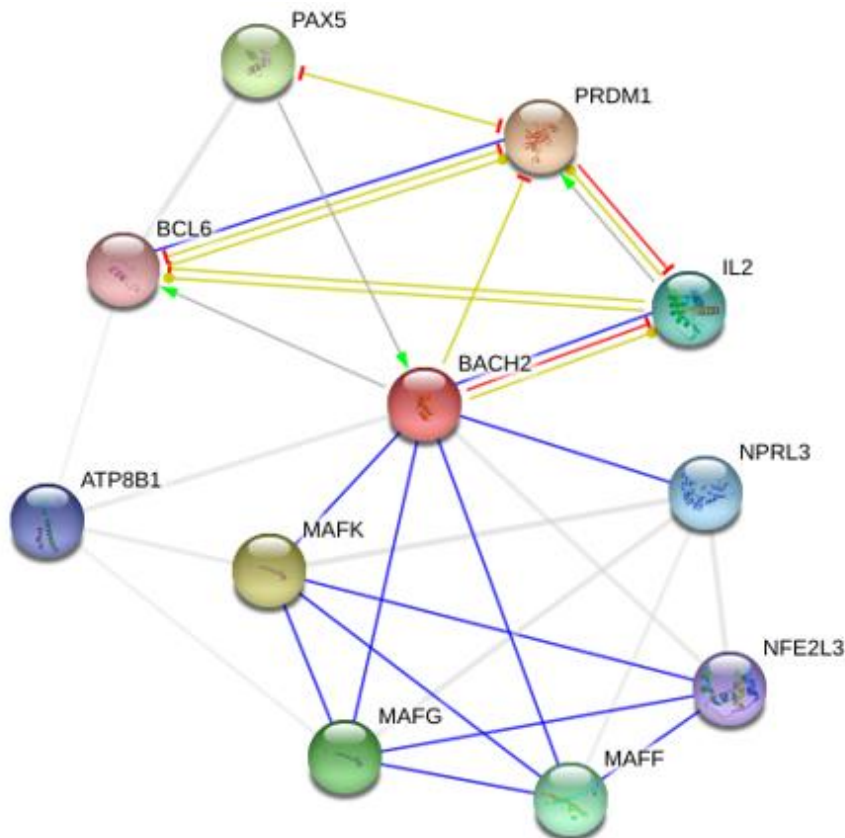
Στη συνέχεια, παρατίθενται τα σχήματα του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου από την αναζήτηση της πρωτεΐνης BACH2 βάσει δεδομένων (Σχήμα 3.5), βάσει εμπιστοσύνης (Σχήμα 3.6) και βάσει μοριακής δράσης (Σχήμα 3.7), αλλά και οι πληροφορίες στατιστικής ανάλυσης του δικτύου αυτού (Πίνακας 3.6).



Σχήμα 3.5. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη BACH2 βάσει δεδομένων. Γαλάζιες γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις σύμφωνα με βάσεις δεδομένων, μωβ γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις από πειραματικά δεδομένα, μαύρες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει δεδομένων κοινής έκφρασης, κίτρινες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει εξόρυξης κειμένου, γκρι γραμμές: δεδομένα πρωτεϊνικής ομολογίας.



Σχήμα 3.6. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη *BACH2* βάσει εμπιστοσύνης. Το πάχος των γραμμών μεταξύ των κόμβων είναι ανάλογο της ισχύος των δεδομένων. (αχνό γκρι χρώμα: χαμηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.15, γκρι χρώμα: μέση τιμή εμπιστοσύνης-0.4, σκούρο γκρι χρώμα: υψηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.7, πολύ σκούρο γκρι χρώμα: ύψιστη τιμή εμπιστοσύνης-0.9).



Σχήμα 3.7. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη BACH2 βάσει μοριακής δράσης. Οι γραμμές μεταξύ των κόμβων μπορεί να υποδηλώνουν θετική, αρνητική ή απροσδιόριστη δράση. Κίτρινη γραμμή: μεταγραφική ρύθμιση, μπλε γραμμή: πρόσδεση, γκρι γραμμή με πράσινο βέλος: ενεργοποίηση, κόκκινη γραμμή: καταστολή.

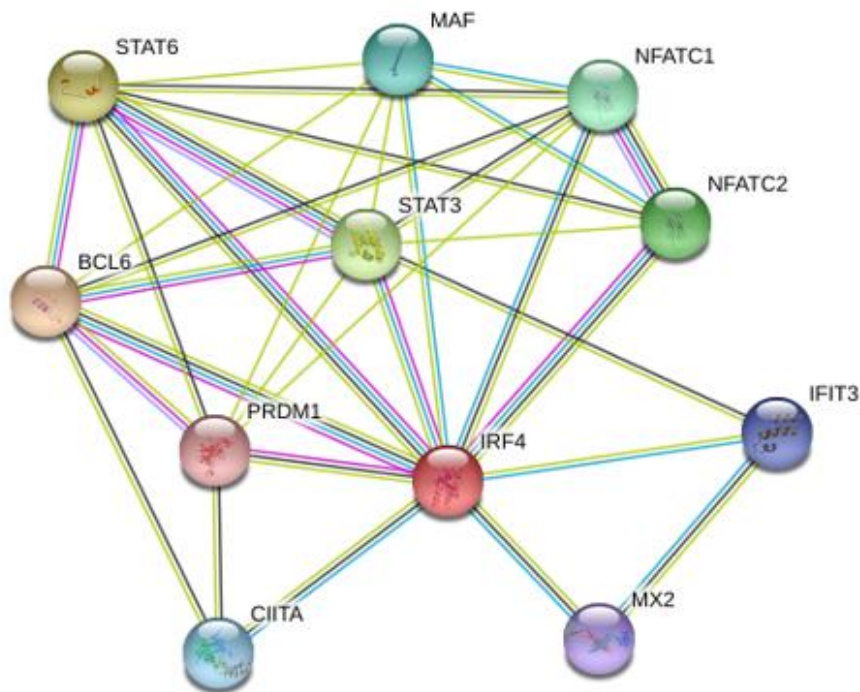
Πίνακας 3.6 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη BACH2 ως κεντρικό κόμβο.

Στατιστική ανάλυση δικτύου	
number of nodes: 11	expected number of edges: 11
number of edges: 28	PPI enrichment p-value: 7.09e-06
average node degree: 5.09	
avg. local clustering coefficient: 0.827	

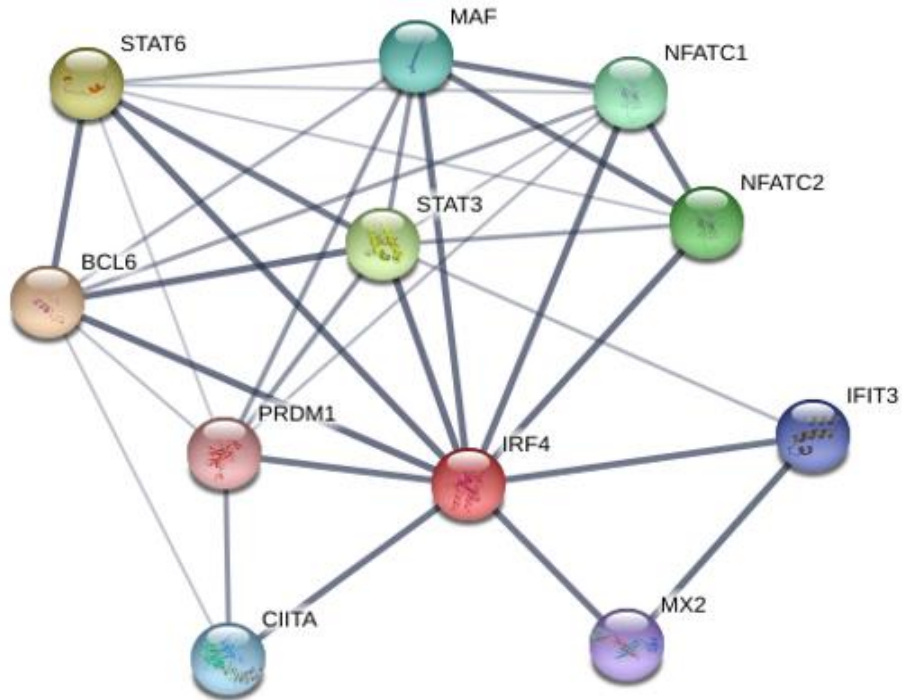
Προσαρμοσμένος πίνακας από την πηγή STRING version 11.0 (<https://string-db.org/>).
number of nodes: αριθμός κόμβων στο δίκτυο, *number of edges*: αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ κόμβων, *average node degree*: πόσες αλληλεπιδράσεις έχει κατά μέσο όρο μία πρωτεΐνη στο απορρέον δίκτυο, *clustering coefficient*: συντελεστής ομαδοποίησης δικτύου-υψηλές τιμές υποδηλώνουν υψηλή σύνδεση, *PPI enrichment p-value*: τιμή p-value της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Στο πρωτεϊνικό δίκτυο με κεντρικό κόμβο την πρωτεΐνη BACH2, η τιμή PPI enrichment p-value είναι $7.09e-06$, υποδηλώνοντας ότι στο συγκεκριμένο δίκτυο οι πρωτεΐνες είναι μερικώς, βιολογικά συνδεδεμένες ως ομάδα. Επιπλέον, παρουσιάζονται 11 κόμβοι (πρωτεΐνες) και 28 αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ο συντελεστής ομαδοποίησης του δικτύου είναι 0.827, υποδεικνύοντας ένα έντονα συνδεδεμένο δίκτυο (Πίνακας 3.6). Ειδικότερα, η BACH2 καταστέλλει την έκφραση της PRDM1(Blimp1) και της IL-2, ενώ ενεργοποιεί την έκφραση της BCL6. Η PRDM1 καταστέλλει την έκφραση της IL-2 και η IL-2 προωθεί την έκφραση της PRDM1. Η PAX5 προωθεί την έκφραση της BACH2, ενώ καταστέλλει την έκφραση της PRDM1 και η τελευταία καταστέλλει την έκφραση της PAX5.

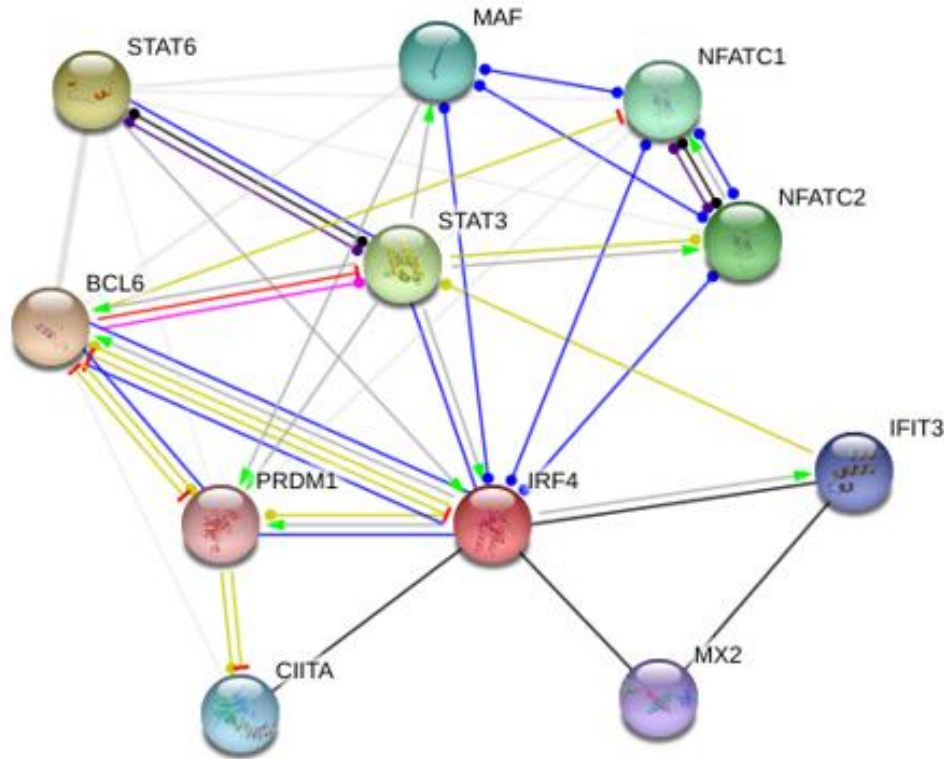
Ομοίως, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση για την πρωτεΐνη IRF4, με το απορρέον πρωτεϊνικό δίκτυο να παρατίθεται και πάλι βάσει δεδομένων (Σχήμα 3.8), βάσει εμπιστοσύνης (Σχήμα 3.9) και βάσει μοριακής δράσης (Σχήμα 3.10). Στον Πίνακα 3.7 παρατίθενται οι πληροφορίες στατιστικής ανάλυσης του δικτύου αυτού.



Σχήμα 3.8. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει δεδομένων. Γαλάζιες γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις σύμφωνα με βάσεις δεδομένων, μωβ γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις από πειραματικά δεδομένα, μαύρες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει δεδομένων κοινής έκφρασης, κίτρινες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει εξόρυξης κειμένου, γκρι γραμμές: δεδομένα πρωτεϊνικής ομολογίας.



Σχήμα 3.9. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει εμπιστοσύνης. Το πάχος των γραμμών μεταξύ των κόμβων είναι ανάλογο της ισχύος των δεδομένων. (αχνό γκρι χρώμα: χαμηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.15, γκρι χρώμα: μέση τιμή εμπιστοσύνης-0.4, σκούρο γκρι χρώμα: υψηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.7, πολύ σκούρο γκρι χρώμα: ύψιστη τιμή εμπιστοσύνης-0.9).



Σχήμα 3.10. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη IRF4 βάσει μοριακής δράσης. Οι γραμμές μεταξύ των κόμβων μπορεί να υποδηλώνουν θετική, αρνητική ή απροσδιόριστη δράση. Κίτρινη γραμμή: μεταγραφική ρύθμιση, μπλε γραμμή: πρόσδεση, γκρι γραμμή με πράσινο βέλος: ενεργοποίηση, κόκκινη γραμμή: καταστολή, μαύρη γραμμή: αντίδραση, ροζ γραμμή: μετα-μεταφραστική τροποποίηση.

Πίνακας 3.7 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη IRF4 ως κεντρικό κόμβο.

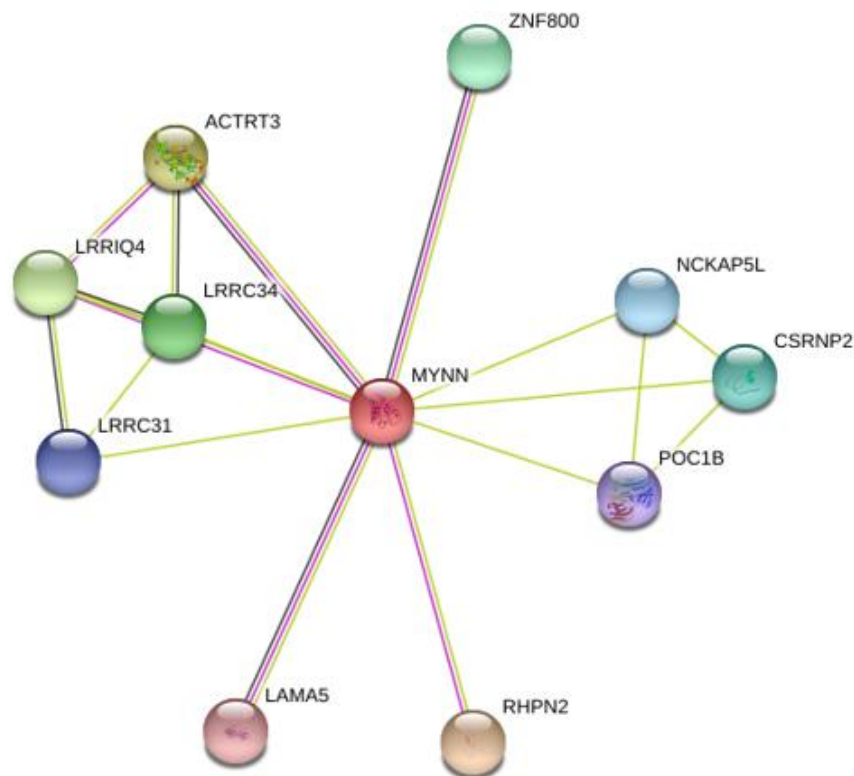
Στατιστική ανάλυση δικτύου	
number of nodes: 11	expected number of edges: 12
number of edges: 33	PPI enrichment p-value: 4.31e-07
average node degree: 6	
avg. local clustering coefficient: 0.839	

Προσαρμοσμένος πίνακας από την πηγή STRING version 11.0 (<https://string-db.org/>). *number of nodes*: αριθμός κόμβων στο δίκτυο, *number of edges*: αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ κόμβων, *average node degree*: πόσες αλληλεπιδράσεις έχει κατά μέσο όρο μία πρωτεΐνη στο απορρέον δίκτυο, *clustering coefficient*: συντελεστής ομαδοποίησης δικτύου-υψηλές τιμές υποδηλώνουν υψηλή σύνδεση, *PPI enrichment p-value*: τιμή p-value της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

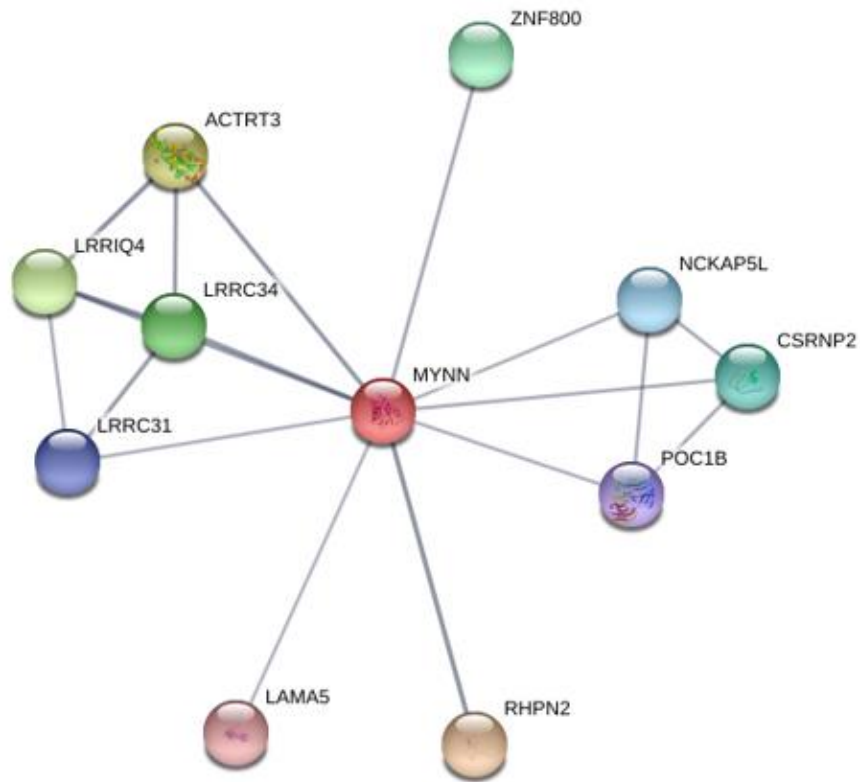
Στο πρωτεϊνικό δίκτυο με κεντρικό κόμβο την πρωτεΐνη IRF4, η τιμή PPI enrichment p-value είναι 4.31e-07, υποδηλώνοντας ότι στο συγκεκριμένο δίκτυο οι πρωτεΐνες είναι

μερικώς, βιολογικά συνδεδεμένες ως ομάδα. Επιπλέον, παρουσιάζονται 11 κόμβοι (πρωτεΐνες) και 33 αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ο συντελεστής ομαδοποίησης του δικτύου είναι 0.839, υποδεικνύοντας ένα έντονα συνδεδεμένο δίκτυο (Πίνακας 3.7). Η STAT3 φαίνεται να προωθεί την έκφραση της IRF4.

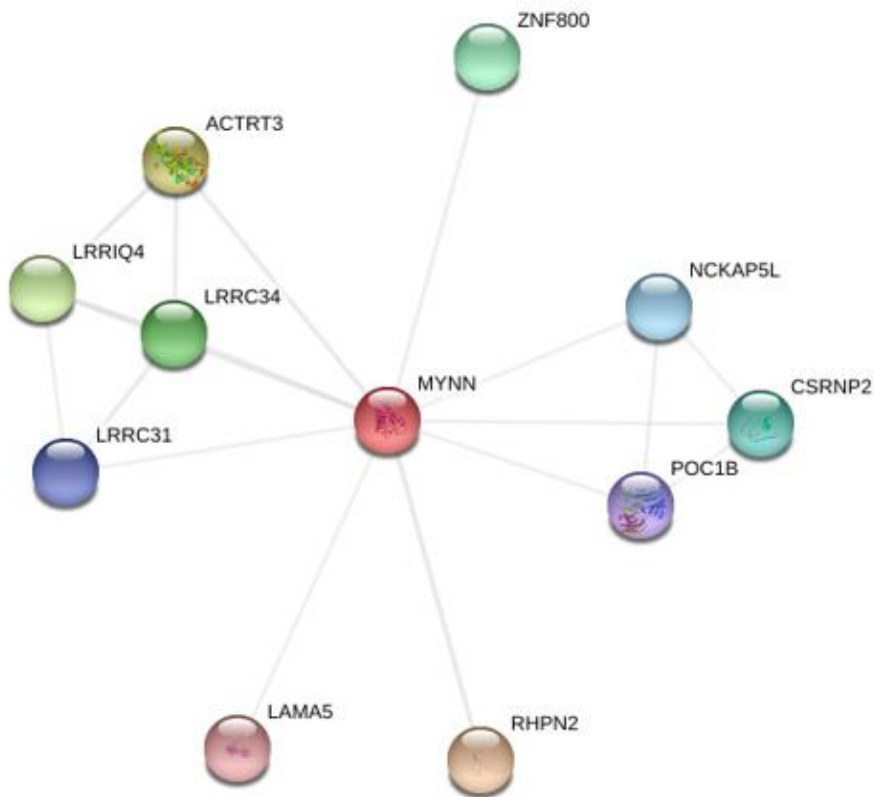
Τέλος, η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την πρωτεΐνη MYNN με το πρωτεϊνικό δίκτυο να παρατίθεται παρακάτω βάσει δεδομένων (Σχήμα 3.11), βάσει εμπιστοσύνης (Σχήμα 3.12) και βάσει μοριακής δράσης (Σχήμα 3.13). Στον Πίνακα 3.8 παρατίθενται οι πληροφορίες στατιστικής ανάλυσης του δικτύου αυτού.



Σχήμα 3.11. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει δεδομένων. Μωβ γραμμές: γνωστές αλληλεπιδράσεις από πειραματικά δεδομένα, μαύρες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει δεδομένων κοινής έκφρασης, κίτρινες γραμμές: αλληλεπιδράσεις βάσει εξόρυξης κειμένου.



Σχήμα 3.12. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει εμπιστοσύνης. Το πάχος των γραμμών μεταξύ των κόμβων είναι ανάλογο της ισχύος των δεδομένων. (αχνό γκρι χρώμα: χαμηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.15, γκρι χρώμα: μέση τιμή εμπιστοσύνης-0.4, σκούρο γκρι χρώμα: υψηλή τιμή εμπιστοσύνης-0.7, πολύ σκούρο γκρι χρώμα: ύψιστη τιμή εμπιστοσύνης-0.9).



Σχήμα 3.13. Απεικόνιση του απορρέοντος πρωτεϊνικού δικτύου για την πρωτεΐνη MYNN βάσει μοριακής δράσης. Οι γκρι γραμμές μεταξύ των κόμβων υποδηλώνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι απροσδιόριστες.

Πίνακας 3.8 Στατιστική ανάλυση του πρωτεϊνικού δικτύου που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη MYNN ως κεντρικό κόμβο.

Στατιστική ανάλυση δικτύου	
number of nodes: 11	expected number of edges: 10
number of edges: 18	PPI enrichment p-value: 0.0149
average node degree: 3.27	
avg. local clustering coefficient: 0.895	

Προσαρμοσμένος πίνακας από την πηγή STRING version 11.0 (<https://string-db.org/>). *number of nodes*: αριθμός κόμβων στο δίκτυο, *number of edges*: αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ κόμβων, *average node degree*: πόσες αλληλεπιδράσεις έχει κατά μέσο όρο μία πρωτεΐνη στο απορρέον δίκτυο, *clustering coefficient*: συντελεστής ομαδοποίησης δικτύου-υψηλές τιμές υποδηλώνουν υψηλή σύνδεση, *PPI enrichment p-value*: τιμή p-value της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Στο πρωτεϊνικό δίκτυο με κεντρικό κόμβο την πρωτεΐνη MYNN, η τιμή PPI enrichment p-value είναι 0.0149, υποδεικνύοντας ότι στο συγκεκριμένο δίκτυο οι πρωτεΐνες είναι

μερικώς, βιολογικά συνδεδεμένες ως ομάδα. Επιπλέον, παρουσιάζονται 11 κόμβοι (πρωτεΐνες) και 18 αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ο συντελεστής ομαδοποίησης του δικτύου είναι 0.895, υποδηλώνοντας ένα έντονα συνδεδεμένο δίκτυο (Πίνακας 3.8). Στην καρτέλα στατιστικής ανάλυσης των δικτύων αυτών, μπορεί κανείς να δει πως υπάρχουν δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, που συσχετίζουν την πρωτεΐνη MYNN και συγκεκριμένα, γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο MYNN με το μήκος των τελομερών και με την εμφάνιση πολλαπλού μυελώματος. Για το δίκτυο αυτό, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.13, δεν έχει αποσαφηνιστεί η μοριακή δράση των αλληλεπιδράσεων, εφόσον δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα στον άνθρωπο και η πληροφορία βασίζεται στην εξόρυξη κειμένου. Ενδεικτικά, πειραματικά δεδομένα στο σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* έχουν επισημάνει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης MYNN με την πρωτεΐνη RHPN2, ενώ πειραματικά δεδομένα στην *D. melanogaster* υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση MYNN και ZNF800.

Προκειμένου να προβλεφθεί ο αντίκτυπος της γενετικής παραλλαγής rs10936599 στη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης MYNN, χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο PROVEAN/SIFT με τα αποτελέσματα να παρατίθενται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9 Αποτελέσματα υπολογιστικής ανάλυσης του βιοπληροφορικού εργαλείου PROVEAN/SIFT για τη γενετική παραλλαγή rs10936599.

Variation	Protein Sequence Change						PROVEAN Prediction		SIFT Prediction		Annotation	
	Length	Codon Change	AA position	Reference Residue	Alternative Residue	Variation type	Score	Prediction	Score	Prediction	dbSNP ID	Gene Name
3,169492101, C,T	610	CAC CA[C/T] TGT	6	H	H	Synonymous	0.00	Neutral	1.00	Tolerated	rs10936599	MYNN

Προσαρμοσμένο από την πηγή PROVEAN v.1.1.3 (<http://provean.jcvi.org>). *INPUT*: καταχώρηση γενετικής παραλλαγής υπό τη μορφή χρωμόσωμα, θέση, μείζον αλληλόμορφο, πολυμορφικό αλληλόμορφο (Assembly: GRCh37), *Length*: μήκος πρωτεΐνης, *Codon Change*: αλλαγή κωδικονίου, *AA position*: θέση αμινοξέος, *Reference residue*: αμινοξικό κατάλοιπο αναφοράς, *Alternative residue*: Αμινοξικό κατάλοιπο παραλλαγής, *H*: αμινοξύ ιστιδίνη (Histidine), *Variation type*: τύπος παραλλαγής, *Synonymous*: συνώνυμη παραλλαγή. Για την πρόβλεψη του αλγορίθμου PROVEAN (PROVEAN Prediction) το κατώφλι βαθμολογίας ορίζεται στο -2,5. Βαθμολογίες <-2,5 αντιστοιχούν σε επιβλαβείς (deleterious) προβλέψεις και βαθμολογίες >-2,5 αντιστοιχούν σε ουδέτερες (neutral) προβλέψεις. Για την πρόβλεψη του

αλγόριθμου SIFT, το κατώφλι βαθμολογίας ορίζεται στο 0,5, με τη βαθμολογία να κυμαίνεται από 0 έως 1. Βαθμολογίες $SIFT \leq 0.05$ αντιστοιχούν σε επιβλαβείς (*deleterious*) προβλέψεις, ενώ βαθμολογίες $SIFT > 0,05$ αντιστοιχούν σε ανεκτές (*tolerated*) προβλέψεις. dbSNP ID: αναγνωριστικό γενετικής παραλλαγής στη βάση δεδομένων dbSNP.

Όπως συνοψίζεται στο Πίνακα 3.9 η γενετική παραλλαγή rs10936599 επιδρά στην πρωτεϊνική δομή. Ειδικότερα, ο αντίκτυπος της γενετικής παραλλαγής στη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης MYNN κρίνεται ως ουδέτερος (*neutral*) με βαθμολογία 0,00 βάσει του αλγόριθμου PROVEAN και ως ανεκτός (*tolerated*) με βαθμολογία 1,00 βάσει του αλγόριθμου SIFT.

ΚΕΦ. 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κοιλιοκάκη είναι μια πολυπαραγοντική και σύνθετη αυτοάνοση ασθένεια του λεπτού εντέρου, αποτελώντας την πιο κοινή εντεροπάθεια του Δυτικού κόσμου, με επιπολασμό 1% (Green et al., 2015). Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια, φαίνεται η εμφάνιση της νόσου να είναι πιο συχνή στον παιδιατρικό πληθυσμό, σε σχέση με τους ενήλικες (Ciccocioppo et al., 2015; Mariné et al., 2011; Poddar, 2013). Στον παιδιατρικό πληθυσμό, η κοιλιοκάκη εμφανίζει έντονη ετερογένεια ως προς τη συμπτωματολογία και την κλινική της εικόνα, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η επιτυχής διάγνωση της νόσου, με το 90% των παιδιών να μη διαγιγνώσκονται με τη νόσο (Ravikumara et al., 2007). Επιπλέον, η κοινή συμπτωματολογία της κοιλιοκάκης με άλλες παθήσεις, δυσχεραίνει τη διαφοροδιάγνωσή της, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σωστή διαχείριση της νόσου (Pallav et al., 2012).

Ακόμα και σήμερα η παθοφυσιολογία της νόσου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως με ένα σύνολο γενετικών, ανοσολογικών και περιβαλλοντικών να συμμετέχουν σε αυτή. Σε συνδυασμό με το γεγονός πως πολλές φορές παραμένει αδιάγνωστη και πως δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία, παρά μόνο διαχείριση των συμπτωμάτων με δίαιτα ελεύθερη γλουτένης, η νόσος αποτελεί πρόσφορο έδαφος για την εκδήλωση άλλων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών κακοηθειών (Leslie et al., 2012).

Οι μοριακοί μηχανισμοί της συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με τις αιματολογικές κακοήθειες παραμένουν άγνωστοι. Για τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συννοσηρότητας στην κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες, εστιάζοντας τον παιδιατρικό πληθυσμό, η παρούσα εργασία εστίασε στο ρόλο της Th1 κυτταρικής ανοσίας και των ικών βιομορίων-ερεθισμάτων, εφαρμόζοντας υπολογιστικές και εργαστηριακές προσεγγίσεις.

Η παρούσα μελέτη αναδεικνύει το γονίδιο *IRF4*, που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ιντερφερονών ως απάντηση στις ικές λοιμώξεις και στη ρύθμιση γονιδίων, που προάγονται από τις ιντερφερόνες. Η έκφρασή του πυροδοτείται μετά από την ενεργοποίηση του NF-κB σηματοδοτικού μονοπατιού, ενώ ενεργοποιείται και από το TLR7 και TLR9 σηματοδοτικό μονοπάτι κατά την απάντηση έναντι παθογόνων. Η συσχέτιση του γονιδίου *IRF4* με την κοιλιοκάκη είναι γνωστή μέσα από

GWAS και e-QTL μελέτες (Trynka et al., 2011; Trynka et al., 2010). Επιπλέον, το γονίδιο *IRF4* έχει βρεθεί πως εμπλέκεται στην παθογένεση των αιματολογικών κακοηθειών. Υπερεκφράζεται στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin, σε μορφές non-Hodgkin, όπως το διάχυτο από μεγάλα B-κύτταρα λέμφωμα (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), αλλά και στο πολλαπλό μυέλωμα. Επιπλέον, υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης IRF4 ανιχνεύονται σε κυτταρικές σειρές ύστερα από λοίμωξη από τον ιό HTLV1 (Human T-cell Leukemia Virus-1), που σχετίζεται με την T-κυτταρική λευχαιμία στους ενήλικες (Adult T-cell Leukemia, ATL) (Wang et al., 2014). Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL) σχετίζονται με τη δυσμενή πρόγνωση των πασχόντων (Adamaki et al., 2013). Έτερη ονομασία του γονιδίου *IRF4*, είναι το *MUM1* (Multiple Myeloma Oncogene 1), γεγονός που υποδηλώνει τη σημασία του στην παθογένεση του πολλαπλού μυελώματος, ενέχοντας κεντρικό ρόλο σε αυτή, ενεργοποιώντας γονίδια, όπως το ογκογονίδιο *MYC* (Agnarelli et al., 2018). Θεωρείται κύριος ρυθμιστής της ανώμαλης και κακοήθους έκφρασης γονιδίων, που σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου, καθώς επηρεάζει τον έλεγχο του μεταβολισμού, τη βιογένεση μεμβρανών, τον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό θάνατο, αλλά και τη διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων (Shaffer, 2008). Στον παιδιατρικό πληθυσμό, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *IRF4* ήταν τουλάχιστον διπλάσια σε παιδιά με λευχαιμία, σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, με τα επίπεδα του μεταγράφου του να είναι υψηλότερα σε λευχαιμίες σχετιζόμενες με τα T-κύτταρα, συγκριτικά με τις λευχαιμίες B-κυττάρων (Adamaki et al., 2013).

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας αποκαλύπτουν, επιπλέον, καίριο ρόλο για το γονίδιο *BACH2*. Το προϊόν έκφρασης του *BACH2* λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας, που ρυθμίζει την ισορροπία σε ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων καίριων για τη διαφοροποίηση και ωρίμανση των T- και B- κυττάρων. Στα B-κύτταρα, η *BACH2* ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ των Pax5 και Blimp1, καταστέλλοντας την πρωτεΐνη Blimp1, προκειμένου να επιβραδύνει τη διαφοροποίησή τους προς πλασματοκύτταρα. Στα T-κύτταρα ο καταστολέας *BACH2* ρυθμίζει ένα δίκτυο γονιδίων, περιορίζοντας τη διαφοροποίησή τους προς Th1 και Th2 και προωθώντας τη διαφοροποίησή τους προς T-ρυθμιστικά κύτταρα (Afzali et al., 2017; Roychoudhuri et al., 2013). Βάσει μελετών, η πρωτεΐνη *BACH2* εντοπίζεται σε χαμηλά επίπεδα σε ασθενείς με κοιλιοκάκη, με αποτέλεσμα τα γονίδια που καταστέλλει να είναι έντονα εκφρασμένα, οδηγώντας έτσι σε προ-φλεγμονώδεις αποκρίσεις

(Quinn et al., 2015). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της διαφοροποίησης των T-κυττάρων προς T-ρυθμιστικά κύτταρα, καταλήγοντας στην προώθηση της Th1 διαφοροποίησης, μιας και χαρακτηριστικές κυτταροκίνες της Th1 ανοσίας δεσπόζουν στο περιβάλλον της φλεγμονής. Επιπλέον μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή του BACH2 στην ανάπτυξη του πρωτογενούς λεμφώματος του νευρικού συστήματος (Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL), το οποίο αποτελεί μια επιθετική μορφή λεμφώματος non-Hodgkin (Löw et al., 2018), με τα επίπεδά του να είναι μειωμένα (Labreche et al., 2019). Συνεπώς, τόσο στην κοιλιοκάκη, όσο και στο πρωτογενές λέμφωμα του νευρικού συστήματος, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου είναι μειωμένα. Το BACH2 θεωρείται πως εμπλέκεται στην ανοσολογική απάντηση έναντι dsRNA ή dsDNA ιών, όπως είναι οι ερπητοϊοί, ρεοϊοί και αδενοϊοί (Hong et al., 2008).

Από τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συννοσηρότητας στην κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε πως υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών BACH2 και IRF4. Έμμεσα, η πρωτεΐνη BACH2 προωθεί την έκφραση της BCL6, η οποία με τη σειρά της καταστέλλει την IRF4. Επίσης, η πρωτεΐνη BACH2 καταστέλλει την έκφραση της PRDM1(Blimp1), η οποία όμως προωθείται από την IRF4. Βιβλιογραφικά, φαίνεται πως η IRF4 δρα συνεργατικά με το μεταγραφικό παράγοντα PRDM1(Blimp1), περιορίζοντας τη διαφοροποίηση των CD4+ T-κυττάρων προς τον υπότυπο των θυλακιωδών βοηθητικών T-κυττάρων (T_{FH}), προωθώντας παράλληλα τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων προς πλασματοκύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων (Jogdand et al., 2016). Η έκφραση των BCL6/BACH2/PAX5 διατηρεί το φαινότυπο των B-κυττάρων, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ η έκφραση των IRF4/PRDM1 προωθεί τη διαφοροποίησή τους προς πλασματοκύτταρα και B-κύτταρα μνήμης (Zhu et al., 2018).

Επιπρόσθετα, από τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών διαφάνηκε ότι η πρωτεΐνη BACH2 μπορεί να καταστείλει την έκφραση της ιντερλευκίνης 2 (IL-2), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Jang et al., όπου βρέθηκε πως η BACH2 καταστέλλει την έκφραση της IL-2 στα CD4+ T-λεμφοκύτταρα (Jang et al., 2017). Η IL-2 παράγεται από τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα και με αυτοκρινή δράση προωθεί τον πολλαπλασιασμό των CD4+ T-κυττάρων, αλλά και με παρακρινή δράση ενεργοποιεί τα NK κύτταρα, τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα και τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (van Bergen et al., 2015; Went et al.,

2019). Τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *BACH2* οδηγούν και σε χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *BCL6*, αφού η έκφρασή της προωθείται από την *BACH2* (Σχήμα 3.4). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της διαφοροποίησης των *CD4+* T-κυττάρων προς *T_{FH}* και *Tregs* και την ενίσχυση της διαφοροποίησης προς τον *Th1* υπότυπο. Λόγω των χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης *BACH2* στην κοιλιοκάκη, δεν καταστέλλεται η έκφραση της *IL-2*, ενισχύοντας έτσι, όχι μόνο το φαινόμενο της καταστροφής του επιθηλίου, αλλά και της συνεχούς ενεργοποίησης των T- και NK κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λεμφώματα T- και NK κυττάρων.

Τέλος, στην κοιλιοκάκη παρατηρείται επέκταση του πληθυσμού των πλασματοκυττάρων και τοπική έκκριση αντισωμάτων (Mesin et al., 2012). Το γεγονός αυτό συνάδει με το γεγονός ότι η *IRF4* προωθεί την έκφραση της *PRDM1*(*Blimp1*) (Σχήμα 3.10) και κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα και την παραγωγή αντισωμάτων. Τέλος, η έκφραση της πρωτεΐνης *IRF4* προωθείται από την *STAT3* (Σχήμα 3.10). Η πρωτεΐνη *STAT3* φυσιολογικά καταστέλλεται από την πρωτεΐνη *BCL6* (Σχήμα 3.4). Ωστόσο, λόγω των χαμηλών επιπέδων της *BACH2* και κατ' επέκταση της *BCL6*, η *STAT3* βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα, με το μονοπάτι της *STAT3* να είναι έντονα ενεργοποιημένο σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως η T-κυτταρική λευχαιμία ενηλίκων και το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα (Ding et al., 2008; Sawada et al., 2017). Συνεπώς, η μειωμένη έκφραση της *BACH2*, συνδυαστικά με τα υψηλά επίπεδα της *IRF4*, το ενεργοποιημένο μονοπάτι του *STAT3* και τη συνεχή ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από την *IL-2*, μπορεί να οδηγήσουν στην εκδήλωση αιματολογικών κακοηθειών σε ασθενείς που ήδη πάσχουν από κοιλιοκάκη.

Αξιοσημείωτα, η παρούσα ερευνητική εργασία κατέδειξε τρεις γενετικές παραλλαγές, *rs10806425* (*BACH2*), *rs1050976* (*IRF4*), *rs10936599* (*MYNN*) ως υποψήφιους βιοδείκτες συννοσηρότητας κοιλιοκάκης και αιματολογικών κακοηθειών. Οι γενετικές αυτές παραλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης αιματολογικών κακοηθειών σε παιδιατρικούς ασθενείς που ήδη πάσχουν από κοιλιοκάκη.

Η γενετική παραλλαγή *rs10806425* του γονιδίου *BACH2* συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, έχοντας ως αλληλόμορφο κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, το μειοψηφικό αλληλόμορφο A (Dubois et al., 2010) και με το πρωτογενές λέμφωμα του

κεντρικού νευρικού συστήματος (PCNSL) με αλληλόμορφο κινδύνου το αρχέγονο C (Labreche et al., 2019). Συνεπώς, ασθενείς με κοιλιοκάκη φέροντες το αλληλόμορφο C, ενέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πρωτογενούς λεμφώματος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ως εκ τούτου, το πολυμορφικό αλληλόμορφο A μπορεί να θεωρηθεί προστατευτικό ως προς την εμφάνιση του πρωτογενούς λεμφώματος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Το πρωτογενές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος εμφανίζεται, κυρίως, σε άτομα ηλικίας γύρω στα 60 έτη, αλλά έχουν περιγραφεί και σπάνιες περιπτώσεις σε παιδιά (<https://rarediseases.org/rare-diseases/primary-central-nervous-system-lymphoma/>). Παιδιατρικοί ασθενείς με κοιλιοκάκη ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου για πρωτογενές λέμφωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος, αφού το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι ήδη διαταραγμένο, με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου να είναι αυξημένος κατά την ενήλικη ζωή τους, χωρίς να αποκλείεται η εμφάνισή της και στην παιδική ή εφηβική ηλικία.

Η γενετική παραλλαγή rs1050976 του γονιδίου *IRF4* συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, φέροντας ως αλληλόμορφο κινδύνου το μειωρητικό T (Trynka et al., 2011). Το ίδιο αλληλόμορφο έχει βρεθεί πως είναι αλληλόμορφο κινδύνου, τόσο για την εμφάνιση πολλαπλού μυελώματος, όσο και τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL) (Went and Sud, 2018). Σύμφωνα με τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας των ΗΠΑ, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί έναν υπότυπο των non-Hodgkin's λεμφωμάτων (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chronic-lymphocytic-leukemia-small-lymphocytic-lymphoma>). Στον παιδιατρικό πληθυσμό η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία είναι πολύ σπάνια, με την αγγλική βιβλιογραφία να περιλαμβάνει μόνο 8 μελέτες περίπτωσης (Demir et al., 2014). Το πολλαπλό μυέλωμα, αποτελώντας τη δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια, μετά το λέμφωμα non-Hodgkin's, διαγιγνώσκεται, κυρίως, κατά την ενήλικη ζωή, με το 0,3% των περιπτώσεων να περιγράφεται πριν την ηλικία των 30 ετών. Στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί περίπου 30 περιπτώσεις ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα πριν την ηλικία των 18 ετών (Davidow and Walter, 2019). Ακόμη, ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο της νόσου έχουν καλύτερη επιβίωση από αυτούς που διαγιγνώσκονται σε μεταγενέστερο στάδιο (<https://www.cancer.net/cancer-types/multiple-myeloma/statistics>).

Τέλος, η γενετική παραλλαγή rs10936599 του γονιδίου *MYNN* βάσει μελετών GWAS, συσχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης κοιλιοκάκης, έχοντας ως αλληλόμορφο κινδύνου το μειωψηφικό T (Dubois et al., 2010). Σε μια διαφορετική μελέτη, η εν λόγω γενετική παραλλαγή μέσω του μειωψηφικού αλληλομόρφου T συσχετίζεται με τη συνεχή εμφάνιση αυτοαντισωμάτων έναντι της ιστικής τρανσγλουταμινάσης (Sharma et al., 2016). Συνδέοντας τη γενετική παραλλαγή με τις αιματολογικές κακοήθειες, το αρχέγονο αλληλόμορφο C έχει βρεθεί πως είναι αλληλόμορφο κινδύνου για την εμφάνιση πολλαπλού μυελώματος και χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Chubb et al., 2013; Speedy et al., 2014). Επομένως, παιδιατρικοί ασθενείς με κοιλιοκάκη που φέρουν το αλληλόμορφο C ενέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ή πολλαπλού μυελώματος, κυρίως κατά την ενήλικη ζωή, αφού σε αυτή την ηλικία εκδηλώνονται, πρωτίστως, αυτές οι ασθένειες, δίχως να αποκλείεται η εμφάνισή τους κατά την εφηβική ηλικία. Η γενετική παραλλαγή επιδρά στην πρωτεϊνική δομή με τον αντίκτυπο στη βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης να κρίνεται ως ουδέτερος (neutral) βάσει του αλγορίθμου PROVEAN και ως ανεκτός (tolerated) βάσει του αλγορίθμου SIFT.

Οι εν λόγω γενετικές παραλλαγές επιβεβαιώθηκαν και στην ομάδα των παιδιών με κοιλιοκάκη και δριμεία νόσο για τα οποία έχουμε δεδομένα ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος και κατόπιν, εφαρμογής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και αλληλούχησης κατά Sanger.

Από την παρούσα μελέτη γίνεται σαφές ότι αν και οι ιοί και τα βιομόρια αυτών (ικά ερεθίσματα) προκαλούν διαταραχή της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου-ξενιστή και ενεργοποιούν την Th1 κυτταρική ανοσία, ο ρόλος αυτός είναι ουσιαστικά ανεξερεύνητος και καλεί προς την αποσαφήνισή του. Ως μελλοντικός στόχος, τίθεται η διερεύνηση των υποψήφιων βιοδεικτών σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και σε επίπεδο τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών.

Κλείνοντας, ο τομέας της Κλινικής Βιοχημείας και της Μοριακής Διαγνωστικής, έχει πλέον καθιερωθεί ως βασικός πυλώνας της καθημερινής εργαστηριακής και κλινικής πράξης. Χρησιμοποιώντας σύγχρονες μοριακές τεχνικές προσφέρεται βοήθεια για την πρόληψη, διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία ασθενειών. Η παρούσα εργασία δύναται να συνεισφέρει στον τομέα αυτόν, χαρτογραφώντας ενδελεχώς τον κλινικό φαινότυπο της συννοσηρότητας.

ΚΕΦ. 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Adamaki, M., Lambrou, G. I., Athanasiadou, A., Tzanoudaki, M., Vlahopoulos, S. and Moschovi, M., 2013, Implication of IRF4 aberrant gene expression in the acute leukemias of childhood. *PLoS One*, **8**, e72326.
- Afzali, B., Grönholm, J., Vandrovцова, J., O'Brien, C., Sun, H. W., Vanderleyden, I., Davis, F. P., Khoder, A. and Zhang, Y., 2017, BACH2 immunodeficiency illustrates an association between super-enhancers and haploinsufficiency. *Nat Immunol*, **18**, 813-823.
- Aggarwal M, K. R., Aggarwal G. 2013, Celiac Disease with Acute Myeloid Leukemia: A Rare Association. *Pediatr Therapeut*, **3**, 163.
- Agnarelli, A., Chevassut, T. and Mancini, E. J., 2018, IRF4 in multiple myeloma-Biology, disease and therapeutic target. *Leuk Res*, **72**, 52-58.
- Auricchio, S., Follo, D., de Ritis, G., Giunta, A., Marzorati, D., Prampolini, L., Ansaldi, N., Levi, P., Dall'Olio, D., Bossi, A. and et al., 1983, Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **2**, 428-433.
- Azuma, M., 2019, Co-signal Molecules in T-Cell Activation : Historical Overview and Perspective. *Adv Exp Med Biol*, **1189**, 3-23.
- Bachireddy, P., Burkhardt, U. E., Rajasagi, M. and Wu, C. J., 2015, Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. *Nat Rev Cancer*, **15**, 201-215.
- Bardella, M. T., Fredella, C., Saladino, V., Trovato, C., Cesana, B. M., Quatrini, M. and Prampolini, L., 2005, Gluten intolerance: Gender- and age-related differences in symptoms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **40**, 15-19.
- Bender, A. T., Tzvetkov, E. and Pereira, A., 2020, TLR7 and TLR8 Differentially Activate the IRF and NF- κ B Pathways in Specific Cell Types to Promote Inflammation. **4**, 93-107.
- Bonilla, F. A. and Oettgen, H. C., 2010, Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*, **125**, S33-40.

- Bouziat, R. and Hinterleitner, R., 2017, Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, **356**, 44-50.
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C. and Fasano, A., 2019, Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*, **17**, 142.
- Cammarota, G., Cuoco, L., Cianci, R., Pandolfi, F. and Gasbarrini, G., 2000, Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet*, **356**, 1494-1495.
- Capriati, T., Francavilla, R., Castellaneta, S., Ferretti, F. and Diamanti, A., 2015, Impact of the birth's season on the development of celiac disease in Italy. *Eur J Pediatr*, **174**, 1657-1663.
- Catassi, C., Fabiani, E., Corrao, G., Barbato, M., De Renzo, A., Carella, A. M., Gabrielli, A., Leoni, P., Carroccio, A., Baldassarre, M., Bertolani, P., Caramaschi, P., Sozzi, M., Guariso, G., Volta, U. and Corazza, G. R., 2002, Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *Jama*, **287**, 1413-1419.
- Ch'ng, C. L., Jones, M. K. and Kingham, J. G., 2007, Celiac disease and autoimmune thyroid disease. *Clin Med Res*, **5**, 184-192.
- Choi, Y. and Chan, A. P., 2015, PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, **31**, 2745-2747.
- Chubb, D., Weinhold, N., Broderick, P., Chen, B., Johnson, D. C., Försti, A., Vijayakrishnan, J., Migliorini, G., Dobbins, S. E., Holroyd, A., Hose, D., Walker, B. A., Davies, F. E., Gregory, W. A., Jackson, G. H., Irving, J. A., Pratt, G., Fegan, C., Fenton, J. A., Neben, K., Hoffmann, P., Nöthen, M. M., Mühleisen, T. W., Eisele, L., Ross, F. M., Straka, C., Einsele, H., Langer, C., Dörner, E., Allan, J. M., Jauch, A., Morgan, G. J., Hemminki, K., Houlston, R. S. and Goldschmidt, H., 2013, Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*, **45**, 1221-1225.
- Ciccocioppo, R., Kruzliak, P., Cangemi, G. C., Pohanka, M., Betti, E., Lauret, E. and Rodrigo, L., 2015, The Spectrum of Differences between Childhood and Adulthood Celiac Disease. *Nutrients*, **7**, 8733-8751.
- Citterio, G., Reni, M., Gatta, G. and Ferreri, A. J. M., 2017, Primary central nervous system lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, **113**, 97-110.

- Crimeen-Irwin, B., Scalzo, K., Gloster, S., Mottram, P. L. and Plebanski, M., 2005, Failure of immune homeostasis -- the consequences of under and over reactivity. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **5**, 413-422.
- D'Amico, M. A., Holmes, J., Stavropoulos, S. N., Frederick, M., Levy, J., DeFelice, A. R., Kazlow, P. G. and Green, P. H., 2005, Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr (Phila)*, **44**, 249-258.
- Davidow, K. A. and Walter, A. W., 2019, Bone marrow transplant and pediatric multiple myeloma. *Pediatr Blood Cancer*, **66**, e27528.
- Demir, H. A., Bayhan, T., Üner, A., Kurtulan, O., Karakuş, E., Emir, S., Özyörük, D. and Ceylaner, S., 2014, Chronic lymphocytic leukemia in a child: a challenging diagnosis in pediatric oncology practice. *Pediatr Blood Cancer*, **61**, 933-935.
- Devendra, D. and Eisenbarth, G. S., 2004, Interferon alpha--a potential link in the pathogenesis of viral-induced type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Immunol*, **111**, 225-233.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O. and Schuppan, D., 1997, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, **3**, 797-801.
- Ding, B. B., Yu, J. J., Yu, R. Y., Mendez, L. M., Shaknovich, R., Zhang, Y., Cattoretti, G. and Ye, B. H., 2008, Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **111**, 1515-1523.
- Dixit, R., Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., Lewis, S. K., Rizkalla-Reilly, N. and Green, P. H. R., 2014, Celiac Disease Is Diagnosed Less Frequently in Young Adult Males. *Digestive Diseases and Sciences*, **59**, 1509-1512.
- Drmanac, R., Sparks, A. B., Callow, M. J., Halpern, A. L., Burns, N. L., Kermani, B. G., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, G. B., Yeung, G., Dahl, F., Fernandez, A., Staker, B., Pant, K. P., Baccash, J., Borcharding, A. P., Brownley, A., Cedeno, R., Chen, L., Chernikoff, D., Cheung, A., Chirita, R., Curson, B., Ebert, J. C., Hacker, C. R., Hartlage, R., Hauser, B., Huang, S., Jiang, Y., Karpinchyk, V., Koenig, M., Kong, C., Landers, T., Le, C., Liu, J., McBride, C. E., Morenzoni, M., Morey, R. E., Mutch, K., Perazich, H., Perry, K., Peters, B. A., Peterson, J., Pethiyagoda, C. L., Pothuraju, K., Richter, C., Rosenbaum, A. M., Roy, S., Shafto, J., Sharanhovich, U., Shannon, K. W., Sheppy, C. G., Sun, M., Thakuria, J. V., Tran, A., Vu, D., Zaranek, A. W., Wu, X.,

- Drmanac, S., Oliphant, A. R., Banyai, W. C., Martin, B., Ballinger, D. G., Church, G. M. and Reid, C. A., 2010, Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science*, **327**, 78-81.
- Dubois, P. C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G. A., Adány, R., Aromaa, A., Bardella, M. T., van den Berg, L. H., Bockett, N. A., de la Concha, E. G., Dema, B., Fehrmann, R. S., Fernández-Arquero, M., Fiatal, S., Grandone, E., Green, P. M., Groen, H. J., Gwilliam, R., Houwen, R. H., Hunt, S. E., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Mäki, M., Mazzilli, M. C., McCann, O. T., Mearin, M. L., Mein, C. A., Mirza, M. M., Mistry, V., Mora, B., Morley, K. I., Mulder, C. J., Murray, J. A., Núñez, C., Oosterom, E., Ophoff, R. A., Polanco, I., Peltonen, L., Platteel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, J. J., Sperandio, M. P., Tack, G. J., Turner, G., Veldink, J. H., Verbeek, W. H., Weersma, R. K., Wolters, V. M., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L., Neuhausen, S. L., McManus, R., Barisani, D., Deloukas, P., Barrett, J. C., Saavalainen, P., Wijmenga, C. and van Heel, D. A., 2010, Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*, **42**, 295-302.
- Elsurer, R., Tatar, G., Simsek, H., Balaban, Y. H., Aydinli, M. and Sokmensuer, C., 2005, Celiac Disease in the Turkish Population. *Digestive Diseases and Sciences*, **50**, 136-142.
- Ettersperger, J., Montcuquet, N., Malamut, G., Guegan, N., Lopez-Lastra, S., Gayraud, S., Reimann, C., Vidal, E., Cagnard, N., Villarese, P., Andre-Schmutz, I., Gomes Domingues, R., Godinho-Silva, C., Veiga-Fernandes, H., Lhermitte, L., Asnafi, V., Macintyre, E., Cellier, C., Beldjord, K., Di Santo, J. P., Cerf-Bensussan, N. and Meresse, B., 2016, Interleukin-15-Dependent T-Cell-like Innate Intraepithelial Lymphocytes Develop in the Intestine and Transform into Lymphomas in Celiac Disease. *Immunity*, **45**, 610-625.
- Fairley, N. H. and Mackie, F. P., 1937, The clinical and biochemical syndrome in lymphadenoma and allied diseases involving the mesenteric lymph glands. *BMJ*, **1**, 375-380.
- Fasano, A., 2005, Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*, **128**, S68-73.

- Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A., 2001, Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, **97**, 14-32.
- Fine, K. D., Ogunji, F., Saloum, Y., Beharry, S., Crippin, J. and Weinstein, J., 2001, Celiac sprue: another autoimmune syndrome associated with hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, **96**, 138-145.
- Gough, K. R., Read, A. E. and Naish, J. M., 1962, Intestinal reticulosis as a complication of idiopathic steatorrhea. *Gut*, **3**, 232-239.
- Green, P. H., Fleischauer, A. T., Bhagat, G., Goyal, R., Jabri, B. and Neugut, A. I., 2003, Risk of malignancy in patients with celiac disease. *Am J Med*, **115**, 191-195.
- Green, P. H. and Jabri, B., 2002, Celiac disease and other precursors to small-bowel malignancy. *Gastroenterol Clin North Am*, **31**, 625-639.
- Green, P. H., Lebwohl, B. and Greywoode, R., 2015, Celiac disease. *J Allergy Clin Immunol*, **135**, 1099-1106.
- Gutierrez-Achury, J., Coutinho de Almeida, R. and Wijmenga, C., 2011, Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. *J Intern Med*, **269**, 591-603.
- Halfdanarson, T. R., Rubio-Tapia, A., Ristow, K. M., Habermann, T. M., Murray, J. A. and Inwards, D. J., 2010, Patients with celiac disease and B-cell lymphoma have a better prognosis than those with T-cell lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **8**, 1042-1047.
- Hong, S. W., Kim, S. and Lee, D. K., 2008, The role of Bach2 in nucleic acid-triggered antiviral innate immune responses. *Biochem Biophys Res Commun*, **365**, 426-432.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Maki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A. and Zimmer, K. P., 2012, European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **54**, 136-160.
- Ivarsson, A., Hernell, O., Nyström, L. and Persson, L. A., 2003, Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *Journal of epidemiology and community health*, **57**, 36-39.
- Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H. and Persson, L. A., 2002, Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr*, **75**, 914-921.

- Jang, E., Lee, H. R., Lee, G. H., Oh, A. R., Cha, J. Y., Igarashi, K. and Youn, J., 2017, Bach2 represses the AP-1-driven induction of interleukin-2 gene transcription in CD4+ T cells. *BMB Rep*, **50**, 472-477.
- Jogdand, G. M., Mohanty, S. and Devadas, S., 2016, Regulators of Tfh Cell Differentiation. *Front Immunol*, **7**, 520-520.
- Kagnoff, M. F., Austin, R. K., Hubert, J. J., Bernardin, J. E. and Kasarda, D. D., 1984, Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med*, **160**, 1544-1557.
- Kagnoff, M. F., Paterson, Y. J., Kumar, P. J., Kasarda, D. D., Carbone, F. R., Unsworth, D. J. and Austin, R. K., 1987, Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. *Gut*, **28**, 995-1001.
- Kahrs, C. R., Chuda, K., Tapia, G., Stene, L. C., Mårild, K., Rasmussen, T., Rønningen, K. S., Lundin, K. E. A., Kramna, L., Cinek, O. and Størdal, K., 2019, Enterovirus as trigger of coeliac disease: nested case-control study within prospective birth cohort. *BMJ*, **364**, 1231-1231.
- Kapingidza, A. B., Kowal, K. and Chruszcz, M., 2020, Antigen-Antibody Complexes. *Subcell Biochem*, **94**, 465-497.
- Kaukinen, K., Lindfors, K. and Maki, M., 2014, Advances in the treatment of coeliac disease: an immunopathogenic perspective. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **11**, 36-44.
- Keshavarz-Fathi, M. and Rezaei, N., in *Vaccines for Cancer Immunotherapy*, eds Rezaei, N. and Keshavarz-Fathi, M., Academic Press 2019, 45-59.
- Kuby, J., Kindt, T. J., Goldsby, R. A. and Osborne, B. A., *ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ 2η ed.*, Broken Hill Publishers LTD Λευκωσία, Κύπρος, 2013
- Kumar, B. V., Connors, T. J. and Farber, D. L., 2018, Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, **48**, 202-213.
- Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P. C., 2009, Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, **4**, 1073-1081.
- Labreche, K., Daniau, M., Sud, A., Law, P. J., Royer-Perron, L., Holroyd, A., Broderick, P., Went, M., Benazra, M., Ahle, G., Soubeyran, P., Taillandier, L., Chinot, O. L., Casasnovas, O., Bay, J. O., Jardin, F., Oberic, L., Fabbro, M., Damaj, G., Brion, A., Mokhtari, K., Philippe, C., Sanson, M., Houillier, C., Soussain, C., Hoang-Xuan, K.,

- Houlston, R. S. and Alentorn, A., 2019, A genome-wide association study identifies susceptibility loci for primary central nervous system lymphoma at 6p25.3 and 3p22.1: a LOC network study. *Neuro Oncol*, **21**, 1039-1048.
- Lähdeaho, M. L., Parkkonen, P., Reunala, T., Mäki, M. and Lehtinen, M., 1993, Antibodies to E1b protein-derived peptides of enteric adenovirus type 40 are associated with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol Immunopathol*, **69**, 300-305.
- Lauret, E. and Rodrigo, L., 2013, Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Res Int*, **2013**, 127589.
- Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F. and Green, P. H., 2015, Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*, **351**, h4347.
- Lebwohl, B., Sanders, D. S. and Green, P. H. R., 2018, Coeliac disease. *Lancet*, **391**, 70-81.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. and Kim, Y. H., 2012, Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 3923.
- Leffler, D. A., Green, P. H. and Fasano, A., 2015, Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **12**, 561-571.
- Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C. and Fasano, A., 2017, Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity: A Review. *Jama*, **318**, 647-656.
- Lerner, A., Arleevskaya, M., Schmiedl, A. and Matthias, T., 2017, Microbes and Viruses Are Bugging the Gut in Celiac Disease. Are They Friends or Foes? *Frontiers in microbiology*, **8**, 1392-1392.
- Lerner, A., Ramesh, A. and Matthias, T., 2019, The Revival of the Battle between David and Goliath in the Enteric Viruses and Microbiota Struggle: Potential Implication for Celiac Disease. *Microorganisms*, **7**, 173.
- Leslie, L. A., Lebwohl, B., Neugut, A. I., Gregory Mears, J., Bhagat, G. and Green, P. H., 2012, Incidence of lymphoproliferative disorders in patients with celiac disease. *Am J Hematol*, **87**, 754-759.
- Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E. A., Makharia, G. K., Mearin, M. L., Murray, J. A., Verdu, E. F. and Kaukinen, K., 2019, Coeliac disease. *Nat Rev Dis Primers*, **5**, 3.
- Liu, Y., Liang, Y. and Wishart, D., 2015, PolySearch2: a significantly improved text-mining system for discovering associations between human diseases, genes, drugs, metabolites, toxins and more. *Nucleic Acids Res*, **43**, W535-542.

- Löw, S., Han, C. H. and Batchelor, T. T., 2018, Primary central nervous system lymphoma. *Therapeutic advances in neurological disorders*, **11**, 1756286418793562-1756286418793562.
- Ludvigsson, J. F., Bai, J. C., Biagi, F., Card, T. R., Ciacci, C., Ciclitira, P. J., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Holdoway, A., van Heel, D. A., Kaukinen, K., Leffler, D. A., Leonard, J. N., Lundin, K. E. A., McGough, N., Davidson, M., Murray, J. A., Swift, G. L., Walker, M. M., Zingone, F. and Sanders, D. S., 2014, Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*, **63**, 1210.
- Ludvigsson, J. F., Elfström, P., Broomé, U., Ekbom, A. and Montgomery, S. M., 2007, Celiac disease and risk of liver disease: a general population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **5**, 63-69.
- Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F. and Ciacci, C., 2013, The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, **62**, 43-52.
- Lundin, K. E. and Sollid, L. M., 2014, Advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol*, **30**, 154-162.
- Makharia, G. K., Mulder, C. J., Goh, K. L., Ahuja, V., Bai, J. C., Catassi, C., Green, P. H., Gupta, S. D., Lundin, K. E., Ramakrishna, B. S., Rawat, R., Sharma, H., Sood, A., Watanabe, C. and Gibson, P. R., 2014, Issues associated with the emergence of coeliac disease in the Asia-Pacific region: a working party report of the World Gastroenterology Organization and the Asian Pacific Association of Gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol*, **29**, 666-677.
- Malamut, G., El Machhour, R., Montcuquet, N., Martin-Lannerée, S., Dusanter-Fourt, I., Verkarre, V., Mention, J. J., Rahmi, G., Kiyono, H., Butz, E. A., Brousse, N., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N. and Meresse, B., 2010, IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*, **120**, 2131-2143.
- Mariné, M., Farre, C., Alsina, M., Vilar, P., Cortijo, M., Salas, A., Fernández-Bañares, F., Rosinach, M., Santaolalla, R., Loras, C., Marquès, T., Cusí, V., Hernández, M. I., Carrasco, A., Ribes, J., Viver, J. M. and Esteve, M., 2011, The prevalence of coeliac

- disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther*, **33**, 477-486.
- Marsh, M. N., 1992, Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, **102**, 330-354.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. and Kim, H. L., 2018, An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*, **14**, 49.
- Mazzarella, G., 2015, Effector and suppressor T cells in celiac disease. *World journal of gastroenterology*, **21**, 7349-7356.
- McHugh, M. L., 2012, Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*, **22**, 276-282.
- Meresse, B., Malamut, G. and Cerf-Bensussan, N., 2012, Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity*, **36**, 907-919.
- Mesin, L., Sollid, L. M. and Di Niro, R., 2012, The intestinal B-cell response in celiac disease. *Front Immunol*, **3**, 313.
- Morgensztern, D., Devarakonda, S., Mitsudomi, T., Maher, C. and Govindan, R., in *IASLC Thoracic Oncology*, eds Pass, H.I., Ball, D. and Scagliotti, G.V., 2nd ed., Philadelphia, 2018, 95-103.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M. H., Gasparin, M., Bravi, E. and Mäki, M., 2010, The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*, **42**, 587-595.
- Naiyer, A. J., Shah, J., Hernandez, L., Kim, S. Y., Ciaccio, E. J., Cheng, J., Manavalan, S., Bhagat, G. and Green, P. H., 2008, Tissue transglutaminase antibodies in individuals with celiac disease bind to thyroid follicles and extracellular matrix and may contribute to thyroid dysfunction. *Thyroid*, **18**, 1171-1178.
- Nam, S. and Lim, J. S., 2016, Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. **39**, 1548-1555.
- Newton, K. P. and Singer, S. A., 2012, Celiac disease in children and adolescents: special considerations. *Semin Immunopathol*, **34**, 479-496.
- Nurieva, R. I. and Chung, Y., 2010, Understanding the development and function of T follicular helper cells. *Cellular & Molecular Immunology*, **7**, 190-197.

- Pallav, K., Leffler, D. A., Tariq, S., Kabbani, T., Hansen, J., Peer, A., Bhansali, A., Najarian, R. and Kelly, C. P., 2012, Noncoeliac enteropathy: the differential diagnosis of villous atrophy in contemporary clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther*, **35**, 380-390.
- Panetta, F., Nobili, V., Sartorelli, M. R., Papa, R. E., Ferretti, F., Alterio, A. and Diamanti, A., 2012, Celiac disease in pediatric patients with autoimmune hepatitis: etiology, diagnosis, and management. *Paediatr Drugs*, **14**, 35-41.
- Paul, S. P., Kirkham, E. N., Pidgeon, S. and Sandmann, S., 2015, Coeliac disease in children. *Nurs Stand*, **29**, 36-41.
- Perfetti, V., Baldanti, F., Lenti, M. V., Vanoli, A., Biagi, F., Gatti, M., Riboni, R., Dallera, E., Paulli, M., Pedrazzoli, P. and Corazza, G. R., 2016, Detection of Active Epstein-Barr Virus Infection in Duodenal Mucosa of Patients With Refractory Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **14**, 1216-1220.
- Pham-Short, A., Donaghue, K. C., Ambler, G., Chan, A. K. and Craig, M. E., 2012, Coeliac disease in Type 1 diabetes from 1990 to 2009: higher incidence in young children after longer diabetes duration. *Diabet Med*, **29**, e286-289.
- Plaza-Izurieta, L., Fernandez-Jimenez, N., Irastorza, I., Jauregi-Miguel, A., Romero-Garmendia, I., Vitoria, J. C. and Bilbao, J. R., 2015, Expression analysis in intestinal mucosa reveals complex relations among genes under the association peaks in celiac disease. *European Journal of Human Genetics*, **23**, 1100-1105.
- Plot, L. and Amital, H., 2009, Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev*, **8**, 316-319.
- Poddar, U., 2013, Pediatric and adult celiac disease: similarities and differences. *Indian J Gastroenterol*, **32**, 283-288.
- Przybyła, P., Shardlow, M., Aubin, S., Bossy, R., Eckart de Castilho, R., Piperidis, S., McNaught, J. and Ananiadou, S., 2016, Text mining resources for the life sciences. *Database (Oxford)*, **2016**.
- Quinn, E. M., Coleman, C., Molloy, B., Dominguez Castro, P., Cormican, P., Trimble, V., Mahmud, N. and McManus, R., 2015, Transcriptome Analysis of CD4+ T Cells in Coeliac Disease Reveals Imprint of BACH2 and IFN γ Regulation. *PLoS One*, **10**, e0140049.
- Ravikumara, M., Nootigattu, V. K. T. and Sandhu, B. K., 2007, Ninety Percent of Celiac Disease Is Being Missed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **45**.

- Rodriguez-Esteban, R. and Bundschuh, M., 2016, Text mining patents for biomedical knowledge. *Drug Discov Today*, **21**, 997-1002.
- Romagnani, S., 2000, T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*, **85**, 9-18.
- Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciumè, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Puskosdy, G., Bedognetti, D., Wang, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marincola, F. M., Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno, Y., Gattinoni, L., Muto, A., Igarashi, K., O'Shea, J. J. and Restifo, N. P., 2013, BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature*, **498**, 506-510.
- Sadrzadeh, H., Abtahi, S. M. and Fathi, A. T., 2012, Infectious pathogens and hematologic malignancy. *Discov Med*, **14**, 421-433.
- Savvateeva, L. V., Erdes, S. I., Antishin, A. S. and Zamyatnin, A. A., Jr., 2017, Overview of Celiac Disease in Russia: Regional Data and Estimated Prevalence. *Journal of immunology research*, **2017**, 2314813-2314813.
- Sawada, L., Nagano, Y., Hasegawa, A., Kanai, H., Nogami, K. and Ito, S., 2017, IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways. **13**, e1006597.
- Scarfò, L., Ferreri, A. J. M. and Ghia, P., 2016, Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, **104**, 169-182.
- Schuppan, D. and Zimmer, K. P., 2013, The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int*, **110**, 835-846.
- Shaffer, A. L., 3rd, Young, R. M. and Staudt, L. M., 2012, Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*, **30**, 565-610.
- Shaffer, A. L., Emre, N. C. T., Lamy, L., Ngo, V. N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., Zeng, Y., Chen, B., Epstein, J. and Staudt, L. M., 2008, IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*, **454**, 226-231.
- Sharma, A., Liu, X., Hadley, D., Hagopian, W., Liu, E., Chen, W. M., Onengut-Gumuscu, S., Simell, V., Rewers, M., Ziegler, A. G., Lernmark, Å., Simell, O., Toppari, J., Krischer, J. P., Akolkar, B., Rich, S. S., Agardh, D. and She, J. X., 2016, Identification of Non-

- HLA Genes Associated with Celiac Disease and Country-Specific Differences in a Large, International Pediatric Cohort. *PLoS One*, **11**, e0152476.
- Simon, C., Davidsen, K., Hansen, C., Seymour, E., Barnkob, M. B. and Olsen, L. R., 2019, BioReader: a text mining tool for performing classification of biomedical literature. *BMC Bioinformatics*, **19**, 57.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V. and Makharia, G. K., 2018, Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **16**, 823-836.e822.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Mäki, M., Kelly, C. P., Ahuja, V. and Makharia, G. K., 2019, Diagnostic Accuracy of Point of Care Tests for Diagnosing Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **53**.
- Sorensen, H. T., Thulstrup, A. M., Blomqvist, P., Nørgaard, B., Fonager, K. and Ekbom, A., 1999, Risk of primary biliary liver cirrhosis in patients with coeliac disease: Danish and Swedish cohort data. *Gut*, **44**, 736-738.
- Speedy, H. E., Di Bernardo, M. C., Sava, G. P., Dyer, M. J., Holroyd, A., Wang, Y., Sunter, N. J., Mansouri, L., Juliusson, G., Smedby, K. E., Roos, G., Jayne, S., Majid, A., Dearden, C., Hall, A. G., Mainou-Fowler, T., Jackson, G. H., Summerfield, G., Harris, R. J., Pettitt, A. R., Allsup, D. J., Bailey, J. R., Pratt, G., Pepper, C., Fegan, C., Rosenquist, R., Catovsky, D., Allan, J. M. and Houlston, R. S., 2014, A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, **46**, 56-60.
- Stene, L. C., Honeyman, M. C., Hoffenberg, E. J., Haas, J. E., Sokol, R. J., Emery, L., Taki, I., Norris, J. M., Erlich, H. A., Eisenbarth, G. S. and Rewers, M., 2006, Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*, **101**, 2333-2340.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J. and Mering, C. V., 2019, STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, **47**, D607-d613.

- Tack, G. J., Verbeek, W. H., Schreurs, M. W. and Mulder, C. J., 2010, The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**, 204-213.
- Taguchi, T. and Mukai, K., 2019, Innate immunity signalling and membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, **59**, 1-7.
- Takayama, S., Iwaki, K., Nishida, Y., Tanaka, M., Fujii, M., Ohashi, K., Ikeda, M. and Kurimoto, M., 1999, Effects of oral administration of interferon-alpha on antibody production in mice with induced tolerance. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 895-900.
- Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S. F., Bardella, M. T., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., de la Concha, E. G., de Almeida, R. C., Dias, K. R., van Diemen, C. C., Dubois, P. C., Duerr, R. H., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., Gutierrez, J., Heap, G. A., Hrdlickova, B., Hunt, S., Plaza Izurieta, L., Izzo, V., Joosten, L. A., Langford, C., Mazzilli, M. C., Mein, C. A., Midah, V., Mitrovic, M., Mora, B., Morelli, M., Nutland, S., Núñez, C., Onengut-Gumuscu, S., Pearce, K., Platteel, M., Polanco, I., Potter, S., Ribes-Koninckx, C., Ricaño-Ponce, I., Rich, S. S., Rybak, A., Santiago, J. L., Senapati, S., Sood, A., Szajewska, H., Troncone, R., Varadé, J., Wallace, C., Wolters, V. M., Zhernakova, A., Thelma, B. K., Cukrowska, B., Urcelay, E., Bilbao, J. R., Mearin, M. L., Barisani, D., Barrett, J. C., Plagnol, V., Deloukas, P., Wijmenga, C. and van Heel, D. A., 2011, Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*, **43**, 1193-1201.
- Trynka, G., Wijmenga, C. and van Heel, D. A., 2010, A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in molecular medicine*, **16**, 537-550.
- Valitutti, F., Trovato, C. M., Montuori, M. and Cucchiara, S., 2017, Pediatric Celiac Disease: Follow-Up in the Spotlight. *Adv Nutr*, **8**, 356-361.
- van Berge-Henegouwen, G. P. and Mulder, C. J., 1993, Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*, **34**, 1473-1475.
- van Bergen, J., Mulder, C. J., Mearin, M. L. and Koning, F., 2015, Local communication among mucosal immune cells in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, **148**, 1187-1194.

- Van Landeghem, S., Björne, J., Wei, C. H., Hakala, K., Pyysalo, S., Ananiadou, S., Kao, H. Y., Lu, Z., Salakoski, T., Van de Peer, Y. and Ginter, F., 2013, Large-scale event extraction from literature with multi-level gene normalization. *PLoS One*, **8**, e55814.
- Verma, M., Kulshrestha, S. and Puri, A., 2017, Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*, **1525**, 3-33.
- Wang, L., Yao, Z. Q., Moorman, J. P., Xu, Y. and Ning, S., 2014, Gene Expression Profiling Identifies IRF4-Associated Molecular Signatures in Hematological Malignancies. *PLoS One*, **9**, e106788.
- Went, M., Kinnersley, B., Sud, A., Johnson, D. C., Weinhold, N., Försti, A., van Duin, M., Orlando, G., Mitchell, J. S., Kuiper, R., Walker, B. A., Gregory, W. M., Hoffmann, P., Jackson, G. H., Nöthen, M. M., da Silva Filho, M. I., Thomsen, H., Broyl, A., Davies, F. E., Thorsteinsdottir, U., Hansson, M., Kaiser, M., Sonneveld, P., Goldschmidt, H., Stefansson, K., Hemminki, K., Nilsson, B., Morgan, G. J. and Houlston, R. S., 2019, Transcriptome-wide association study of multiple myeloma identifies candidate susceptibility genes. *Human genomics*, **13**, 37-37.
- Went, M. and Sud, A., 2018, Genetic correlation between multiple myeloma and chronic lymphocytic leukaemia provides evidence for shared aetiology. **9**, 1.
- Went, M. and Sud, A., 2018, Identification of multiple risk loci and regulatory mechanisms influencing susceptibility to multiple myeloma. **9**, 3707.
- West, J., Logan, R. F. A., Hill, P. G., Lloyd, A., Lewis, S., Hubbard, R., Reader, R., Holmes, G. K. T. and Khaw, K. T., 2003, Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut*, **52**, 960-965.
- Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Marugán, J. C., Cummins, C., Davidson, C., Dodiya, K., Fatima, R., Gall, A., Giron, C. G., Gil, L., Grego, T., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O. G., Janacek, S. H., Juettemann, T., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Martinez, J. G., Maurel, T., McDowall, M., McMahon, A., Mohanan, S., Moore, B., Nuhn, M., Oheh, D. N., Parker, A., Parton, A., Patricio, M., Sakthivel, M. P., Abdul Salam, A. I., Schmitt, B. M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sycheva, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Vullo, A., Walts, B., Winterbottom, A., Zadissa, A., Chakiachvili, M., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S. E., G, I. I., Kostadima, M., Langridge, N.,

- Loveland, J. E., Martin, F. J., Morales, J., Mudge, J. M., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Trevanion, S. J., Cunningham, F., Howe, K. L., Zerbino, D. R. and Flicek, P., 2020, Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*, **48**, D682-d688.
- Yin, R., Kwoh, C. K. and Zheng, J., in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai and C. Schönbach eds., Academic Press Oxford, 2019, 176-183.
- Yoo, I., Alafaireet, P., Marinov, M., Pena-Hernandez, K., Gopidi, R., Chang, J. F. and Hua, L., 2012, Data mining in healthcare and biomedicine: a survey of the literature. *J Med Syst*, **36**, 2431-2448.
- Yuan, J., Zhou, C., Gao, J., Li, J., Yu, F., Lu, J., Li, X., Wang, X., Tong, P., Wu, Z., Yang, A., Yao, Y., Nadif, S., Shu, H., Jiang, X., Wu, Y., Gilissen, L. and Chen, H., 2017, Prevalence of Celiac Disease Autoimmunity Among Adolescents and Young Adults in China. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **15**, 1572-1579.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W. and Sun, B., 2014, TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol*, **841**, 15-44.
- Zhu, C., Chen, G., Zhao, Y., Gao, X.-M. and Wang, J., 2018, Regulation of the Development and Function of B Cells by ZBTB Transcription Factors. *Front Immunol*, **9**, 580-580.
- Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρούχα, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ. and Δούκισσας, Λ., *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου στον Υπολογιστή και στον Πάγκο Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα Πάτρα*, 2015.

Διαδικτυακοί Ιστότοποι

www.ekt.gr/el/library/impact-factor (τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2020)

www.cbs.dtu.dk/services/BioReader/ (τελευταία επίσκεψη Ιούνιος 2020)

www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.polysearch.ca/ (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

www.provean.jcvi.org (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.evexdb.org/ (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.genecards.org (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.ghr.nlm.nih.gov/gene/IRF4 (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

www.rarediseases.org/rare-diseases/primary-central-nervous-system-lymphoma/ (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/chronic-lymphocytic-leukemia-small-lymphocytic-lymphoma (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

www.cancer.net/cancer-types/multiple-myeloma/statistics (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2020)

www.string-db.org/ (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.coeliac.org.nz/children-with-coeliac/ (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&RUN_PSIBLAST=on (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.bgi.com (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0 (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-folding (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-melting (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.thermofisher.com (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.mn-net.com/bioanalysis/bio-brands/nucleospin-information/ (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.khanacademy.org (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

www.uniprot.org/uniprot/Q9NPC7 (τελευταία επίσκεψη Οκτώβριος 2020)

Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών
«Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική»

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Ε.Ι.Ε.

Τίτλος: Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συννοσηρότητας στην κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες.

Ειρήνη Μάνου, Βιολόγος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κοιλιοκάκη είναι μια χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη διαταραχή του λεπτού εντέρου, αποτελώντας την πιο κοινή εντεροπάθεια του Δυτικού κόσμου. Η παθογένεση της νόσου είναι πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή, με τα γονίδια *HLA-DQ2* ή/και *HLA-DQ8*, να αποτελούν αναγκαία, αλλά όχι ικανή συνθήκη για την ανάπτυξη της ασθένειας. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων και ιικά βιομόρια και ερεθίσματα αυτών, φαίνεται να έχουν ρόλο στην παθογένεση της νόσου, με το μηχανισμό αλληλεπίδρασής τους να είναι άγνωστος. Η αδιάγνωστη ή η χρόνια μη θεραπευθείσα μορφή της κοιλιοκάκης δημιουργεί πρόσφορο έδαφος συννοσηρότητας, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών κακοηθειών. Κατά την ανοσολογική αντίδραση έναντι της γλουτένης κυριαρχεί η Th1 κυτταρική απόκριση, ενώ ταυτόχρονα μελέτες υποδεικνύουν πως οι ιοί μπορούν να διαταράξουν την εντερική ομοιόσταση και να επάγουν απώλεια ανοχής και Th1 ανοσία έναντι της γλουτένης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με τις αιματολογικές κακοήθειες, εστιάζοντας στον ελληνικό παιδιατρικό πληθυσμό. Εφαρμόζοντας υπολογιστικές και εργαστηριακές προσεγγίσεις, το ενδιαφέρον μας εστιάζει στο ρόλο της Th1 κυτταρικής ανοσίας και ειδικότερα, των ικών λοιμώξεων. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε εκτενής ερευνητική μεθοδολογία συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και εξόρυξη δεδομένων και

κειμένου που υπέδειξε εκείνα τα γονίδια (n=75), που συσχετίζονται θετικά με την κοιλιοκάκη και την Th1 κυτταρική ανοσία ή/και τις αιματολογικές κακοήθειες ή/και τα ιικά ερεθίσματα-βιομόρια. Μεταξύ των γονιδίων που καταγράφηκαν, n=33 συσχετίζονταν με την κοιλιοκάκη και τις αιματολογικές κακοήθειες, n=27 με την κοιλιοκάκη, τις αιματολογικές κακοήθειες και τα ιικά ερεθίσματα-βιομόρια και n=15 με την κοιλιοκάκη και τα ιικά ερεθίσματα-βιομόρια. Η στρατηγική μας ανέδειξε, εν τέλει, τρεις γενετικές παραλλαγές ως υποψήφιους βιοδείκτες συννοσηρότητας της κοιλιοκάκης με τις αιματολογικές κακοήθειες προς εκτίμηση κινδύνου εμφάνισης αιματολογικών κακοηθειών σε παιδιατρικούς ασθενείς με κοιλιοκάκη. Πρόκειται για την rs10806425 του γονιδίου *BACH2*, την rs1050976 του γονιδίου *IRF4* και την rs10936599 του γονιδίου *MYNN*. Οι εν λόγω γενετικές παραλλαγές επιβεβαιώθηκαν και στην ομάδα των παιδιών με κοιλιοκάκη και δριμεία νόσο για τα οποία έχουμε δεδομένα ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος και κατόπιν, εφαρμογής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και αλληλούχησης κατά Sanger. Εμβαθύνοντας στους μοριακούς μηχανισμούς συννοσηρότητας, χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών *BACH2*, *IRF4*, *MYNN*, αλλά και τη διερεύνηση της επίδρασης των εν λόγω γενετικών παραλλαγών στη βιολογική δράση των πρωτεϊνών υπό μελέτη.

Από την παρούσα μελέτη γίνεται σαφές ότι οι ιοί και τα βιομόρια αυτών (ιικά ερεθίσματα) προκαλούν τη διαταραχή της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου-ξενιστή και ενεργοποιούν την Th1 κυτταρική ανοσία.

MSc Clinical Biochemistry - Molecular Diagnostics

Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens
Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation

Title: Dissecting the molecular mechanisms of comorbidity for celiac disease and hematological malignancies

Eirini Manou, BSc in Biology

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is considered to be a chronic autoimmune disease of the small intestine, whilst being the most common enteropathy of the Western World. The disease has a multifactorial etiology, with the presence of *HLA-DQ2* and/or *HLA-DQ8* being necessary but not efficient for disease development. GWAS and eQTL studies have identified many non-HLA genes involved in celiac disease pathogenesis. Amongst others, environmental factors such as viral infections seem to trigger celiac disease, but the underlying molecular mechanism is still unknown. Not being able to cure the disease but just ease the symptoms with gluten-free diets and considering the fact that celiac disease is under- or mis- diagnosed, give rise to comorbidities not only with other autoimmune disorders, but with hematological malignancies. CD is considered to be a Th1 mediated inflammatory disease, while studies revealed that viruses are able to promote Th1 immunity against dietary antigens, leading to gut permeability.

Utter purpose of this study is to explore the molecular mechanisms in celiac disease/ hematological malignancies comorbidity in the pediatric population of Greek origin. Applying a series of state-of-the-art computational and laboratory approaches, we explored the role of Th1 cellular immunity and viral infections. Our data and text mining methods revealed n=75 genes associated with CD, Th1 immunity and/or hematological malignancies and/or viral triggers/molecules; n=33 genes were associated with CD and hematological malignancies, n=27 genes correlated well with CD, hematological malignancies and viral triggers/molecules,

while n=15 genes were associated with CD and viral triggers/molecules. Our findings suggest three genomic variations as candidate comorbidity biomarkers toward risk assessment for developing hematological malignancies in pediatric patients already suffering from CD. Namely, rs10806425 *BACH2*, rs1050976 *IRF4* and rs10936599 *MYNN*. Data were confirmed further in the WGS data of pediatric celiac disease patients with severe clinical phenotype, PCR and Sanger sequencing. Focusing on the molecular mechanisms in question, we employed several computational tools to assess protein-protein interactions between *BACH2*, *IRF4*, *MYNN* and predict the effect of the aforementioned genomic variations on the protein function.

This study confirms further that viruses and viral triggers disrupt the homeostasis of the immune system and activate Th1-mediated immune responses.