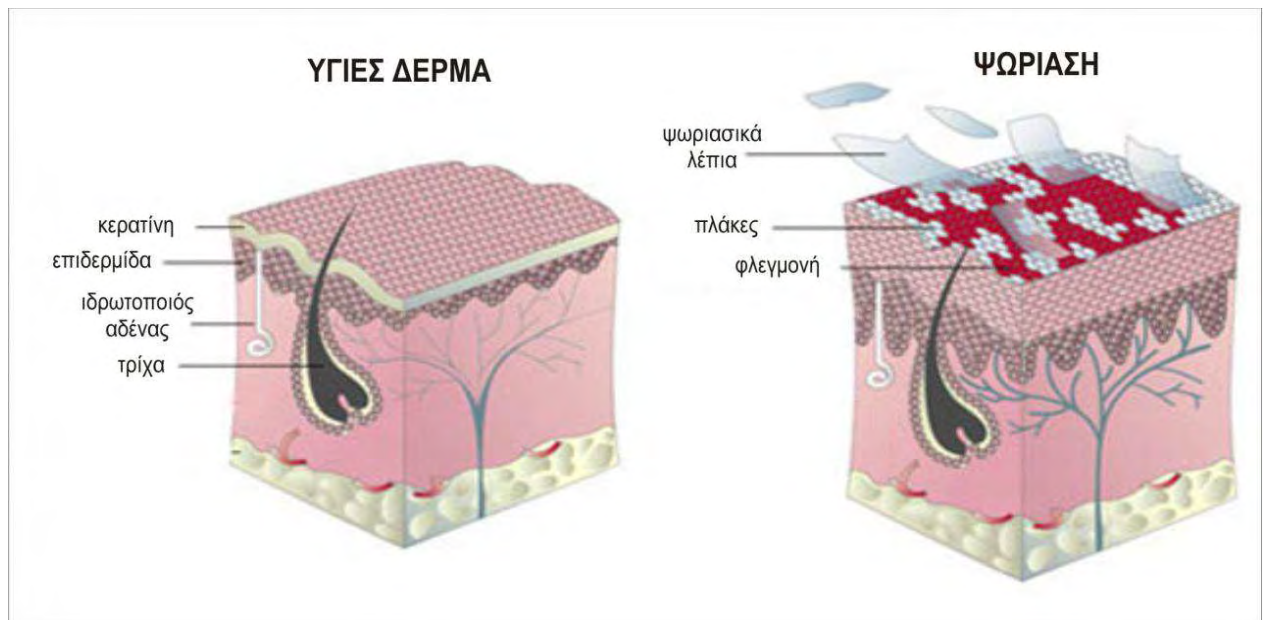




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Θέμα:

**Ανάλυση συσχέτισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *HIF-1α*
με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό**



Καμπούρη Σταυρούλα

Λάρισα 2014

**Ανάλυση συσχέτισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *HIF-1α*
με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό**

**Association analysis of mutations in the *HIF-1α* gene
with psoriasis in the Greek population**

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αγγελική Ρουσσάκη-Σούλτσε, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σαραφίδου Θεολογία, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για το χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Βασιλόπουλο για τη συνεχή βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ζήση Μαμούρη, για τη συνεργασία του καθώς και την κ. Ρουσσάκη Αγγελική, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή και την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Σαρρή για την πολύτιμη βοήθεια της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την υπομονή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Summary	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Ψωρίαση.....	7
1.1.1 Επιδημιολογία της νόσου.....	7
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης	8
1.1.3 Ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία	8
1.1.4 Ταξινόμηση με βάση την εντόπιση στο σώμα.....	12
1.1.5 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης.....	12
1.1.6 Ιστολογικά χαρακτηριστικά.....	13
1.1.7 Παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση.....	15
1.2 Παθοφυσιολογία της ψωρίασης	20
1.2.1 Αγγειογένεση	20
1.2.2 Ο παράγοντας VEGF.....	21
1.2.3 Ο παράγοντας HIF-1.....	22
1.2.4 Δομή της πρωτεΐνης HIF-1	24
1.2.5 Έκφραση του <i>HIF-1α</i> σε ασθενείς με ψωρίαση και μη προσβεβλημένα άτομα.....	24
1.3 Πολυμορφισμοί του <i>HIF-1α</i>	25
1.4 Σκοπός	26
2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος	27
2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	29
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
2.4 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)	32
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	33
2.6 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)	35
3. Αποτελέσματα	36
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	36
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών	36
3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>HIF-1α</i> με PCR	37
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP	37
3.5 Στατιστική ανάλυση	41
4. Συζήτηση	42
Βιβλιογραφία	44

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Είναι μια ασθένεια που επηρεάζει το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα. Διαφοροποιείται ανάλογα με τη μορφολογία και τα σημεία εμφάνισής της. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση είναι γενετικοί, ανοσολογικοί και περιβαλλοντικοί. Η αγγειογένεση εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου και επάγεται κυρίως από τον παράγοντα HIF-1α ο οποίος κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας. Παλαιότερες και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει υπέρ-έκφραση του *HIF-1α* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ψωριασικούς ασθενείς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η διερεύνηση της συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου *HIF-1α* με την εμφάνιση της ψωρίασης στον ελληνικό πληθυσμό. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκαν 120 ασθενείς με ψωρίαση και 66 μη προσβεβλημένα άτομα ως προς τον πολυμορφισμό P582S (rs11549465) του γονιδίου *HIF-1α*. Η γονοτυπική ανάλυση των ατόμων πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό τους αίμα με την μέθοδο PCR-RFLP. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού C1772T του γονιδίου *HIF-1α* με την εμφάνιση της ψωρίασης.

Summary

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, characterized by excessive growth and aberrant differentiation of keratinocytes. It affects 1-3 % of the population, and it causes significant morbidity. Psoriasis is classified in different types based on the location and appearance of the lesions. Psoriasis is influenced by genetic, immunological and environmental factors. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of the disease and recently, the delineation of molecular mechanisms of angiogenesis has revealed a critical role for HIF-1. Previous studies have proved an over expression of HIF-1 α at the mRNA and protein level in patients with psoriasis.

The purpose of the current thesis is to test the association of common polymorphisms of the *HIF-1 α* gene, with psoriasis in the Greek population. In this study 120 patients with psoriasis and 66 healthy volunteers have been genotyped for the polymorphism P582S (rs11549465) of the *HIF-1 α* gene. The genotyping analysis has been performed through the PCR-RFLP method. Analysis of results showed no statistically significant association for this polymorphism.

1.Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια αυτοάνοση ασθένεια του δέρματος που προκαλείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική ανάπτυξη και παρεκκλίνουσα διαφοροποίηση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων (κύτταρα τα οποία σχηματίζουν την κεράτινη στιβάδα που προστατεύει το δέρμα), αγγειογένεση στο χόριο και φλεγμονή τόσο στο χόριο όσο και στην επιδερμίδα. Η διέγερση των κερατινοκυττάρων οφείλεται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα Τ-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, αρκετές κυτταροκίνες και ορισμένες χημειοκίνες εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου (Lowes et al. 2007).

1.1.1 Επιδημιολογία της νόσου

Η ψωρίαση προσβάλλει περίπου το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά η συχνότητα εμφάνισής της ποικίλλει σημαντικά. Στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ η αντίστοιχη συχνότητα στο γενικό πληθυσμό υπολογίζεται σε περίπου 2%. Ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης είναι χαμηλή σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες όπως είναι οι Ιάπωνες, ενώ πολύ σπάνια εμφανίζεται στους αυτόχθονες Αυστραλούς και στους Ινδιάνους της Ν. Αμερικής. Η ψωρίαση μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Από διάφορες μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η μέση ηλικία έναρξης και εμφάνισης της νόσου είναι μεταξύ 15 και 20 ετών, ενώ μια δεύτερη κορύφωση συμβαίνει στα 55-60 χρόνια, προσβάλλοντας και τα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα (Nickoloff and Nestle, 2004, Bhalerao and Bowcock, 1998, Ferrandiz et al. 2002).

Βάσει της κλινικής εμφάνισης της ψωρίασης και της ηλικία έναρξης, η ψωρίαση διακρίνεται σε δυο τύπους, τον I και τον II. Ο τύπος I, που είναι ο συχνότερος (αντιστοιχεί σε περισσότερο από το 75% των περιπτώσεων), εμφανίζεται σε εφήβους και ενήλικες 16-22 ετών, ενώ ο τύπος II, εμφανίζεται σε άτομα 57-60 ετών. Μια πρόωρη έναρξη (πριν την ηλικία των 15 ετών) σχετίζεται με πιο βαριά μορφή της νόσου όσον αφορά το ποσοστό της επιφάνειας του σώματος που προσβάλλεται και την απόκριση στη θεραπεία (Melski and Stern, 1981). Επιπλέον, υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA-Cw6 σε ασθενείς με πρόωμη έναρξη, σε σύγκριση με μια μεταγενέστερη έναρξη της ψωρίασης (Marcus et al. 1993, Farber and Nall, 1992).

1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια φλεγμονώδης δερματοπάθεια με μεταβλητή μορφολογία, κατανομή, σοβαρότητα και αιτία. Εκδηλώνεται τυπικά με την εμφάνιση ερυθρηματολεπιδωδών βλατίδων, δηλαδή φλεγμονωδών βλαβών διαμέτρου μικρότερης των 5 mm, οι οποίες αυξάνονται προοδευτικά σε μέγεθος και συρρέουν σε πλάκες διαφόρου σχήματος και μεγέθους. Οι ψωριασικές πλάκες διαφέρουν σαφώς από το υγιές δέρμα, καλύπτονται από παχιά και ξηρά λέπια και μερικές φορές περιβάλλονται από λευκωπό δακτύλιο, γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff. Η ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε περιοχή του δέρματος και το ποσοστό επιφάνειας του σώματος που προσβάλλεται να διαφέρει κάθε φορά (Griffiths et al. 2007).

1.1.3 Ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία

Υπάρχουν διάφορες μορφές ψωρίασης και συνήθως διακρίνονται βάσει της περιοχής εμφάνισής τους στο σώμα και της μορφολογίας των βλαβών. Η παρουσία και η κατανομή των ψωριασικών πλακών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό: κάποια άτομα εμφανίζουν μόνο μια ψωριασική πλάκα σε συγκεκριμένο σημείο του σώματός τους, ενώ άλλα υποφέρουν από ψωρίαση σε ολόκληρο το σώμα.

- Ψωρίαση κατά πλάκας ή κοινή

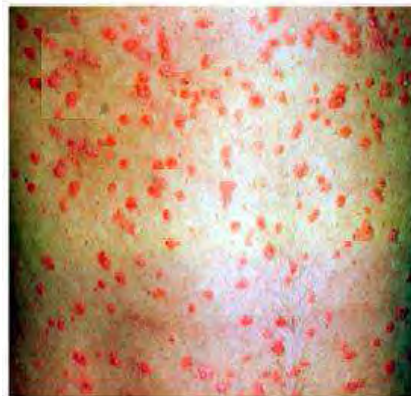
Αυτή η μορφή της ψωρίασης αποτελεί τη συνηθέστερη (80%) στην οποία οι ασθενείς συνήθως έχουν έντονα οριοθετημένες, στρογγυλές πλάκες. Οι βλάβες αρχικά ξεκινούν ως ερυθρηματώδεις πλάκες με διάμετρο 1-10 cm. Το δαχτυλίδι του Woronoff μπορεί να παρατηρηθεί στο δέρμα που περιβάλλει μια ψωριασική πλάκα. Οι πλάκες χαρακτηρίζονται από αργυρό-λευκό χρώμα, ενώ ποικίλουν σε πάχος. Το ποσοστό των πλακών ποικίλλει μεταξύ των ασθενών, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών περιοχών του σώματος του ασθενή. Η ψωρίαση κατά πλάκας ενδέχεται να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος, ωστόσο τα γόνατα, οι αγκώνες (Εικόνα 1), το τριχωτό της κεφαλής και ο κορμός, αποτελούν εκλεκτικές εντοπίσεις της μορφής αυτής (Griffiths et al. 2007).



Εικόνα 1. Ψωρίαση κατά πλάκας ή κοινή (Roberson & Bowcock, 2010).

- Σταγονοειδής ψωρίαση

Αυτή η μορφή, που είναι η δεύτερη συχνότερη, αντιστοιχεί στο 18% των περιπτώσεων της νόσου. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ερυθματολεπιδωδών βλατίδων διαμέτρου 2-10 χιλιοστών, οι οποίες καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του σώματος (Εικόνα 2). Πιο συχνά, προσβάλλεται ο κορμός και σπανιότερα οι παλάμες και τα πέλματα. Προσβάλλει κυρίως παιδιά και άτομα νεαρής ηλικίας. Συνήθως, η σταγονοειδής ψωρίαση εμφανίζεται μετά από μια οξεία αιμολυτική στρεπτοκοκκική λοίμωξη τύπου Β του φάρυγγα ή των αμυγδαλών (Baker et al. 1991).



Εικόνα 2. Σταγονοειδής ψωρίαση (Roberson & Bowcock, 2010).

- Φλυκταινώδης ψωρίαση

Η συγκεκριμένη μορφή ψωρίασης πλήττει ποσοστό μικρότερο από το 10% των ασθενών. Μπορεί να εμφανιστεί ως επιπλοκή της ψωρίασης κατά πλάκας, ως αποτέλεσμα της λήψης συγκεκριμένων φαρμάκων ή ως αποτέλεσμα της απότομης διακοπής τους. Οι βλάβες χαρακτηρίζονται από συνάθροιση πολυμορφοπύρηνων στην επιδερμίδα και το σχηματισμό φλυκταινών. Οι φλύκταινες περιέχουν άσηπτο

πυώδες υγρό, το οποίο με την πάροδο του χρόνου (7-10 ημέρες) αποξηραίνεται, δημιουργώντας μία κιτρινωπή ή καφετί βλατίδα. Οι παλάμες των χεριών, τα πέλματα των ποδιών (Εικόνα 3), τα δάκτυλα και τα νύχια, είναι τα σημεία που προσβάλλονται περισσότερο (Langley et al. 2005).



Εικόνα 3. Φλυκταινώδης ψωρίαση (Griffiths et al. 2007).

- Ερυθροδερμική ψωρίαση

Η ερυθροδερμική ψωρίαση χαρακτηρίζεται κλινικά από την εμφάνιση πολλαπλών ερυθματολεπιδωδών, ελάχιστα διηθημένων πλακών, οι οποίες καλύπτουν όλα τα σημεία του σώματος. Το εξάνθημα εμφανίζει ένα βαθύ ερυθρό χρώμα, με ποικίλου βαθμού απολέπιση (Εικόνα 4). Η μορφή αυτή συνήθως οφείλεται σε επιδείνωση των υπολοίπων μορφών, οι οποίες μεταπίπτουν σε αυτή την μορφή μετά από μη αποτελεσματική τοπική θεραπευτική αγωγή, έντονη και παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή ή υπεριώδη ακτινοβολία ή επίδραση άλλων παραγόντων (Green et al. 1996).



Εικόνα 4. Ερυθροδερμική ψωρίαση (Green et al. 1996).

- Ανάστροφη ψωρίαση

Οι όροι ανάστροφη ψωρίαση, καμπτική ψωρίαση και ψωρίαση των μεγάλων πτυχών χρησιμοποιούνται εναλλακτικά για τις εξάρσεις της ασθένειας στις καμπτικές επιφάνειες και τις πτυχές του δέρματος (π.χ. μασχαλιαία περιοχή, βουβωνική χώρα, περιοχή κάτω από τους μαστούς, περιοχή των γεννητικών οργάνων και γλουτιαία περιοχή). Η συνεχής τριβή μεταξύ των πτυχών του δέρματος προκαλεί επίμονες βλάβες έντονου ερυθρού χρώματος (Εικόνα 5). Οι βλάβες αυτές μπορεί να προκαλούν κνησμό και πόνο και να είναι λεπιδώδεις ή όχι. Τα χαρακτηριστικά λέπια της ψωρίασης μπορεί να απουσιάζουν στην περίπτωση της ψωρίασης των πτυχών, λόγω της φυσικής υγρασίας του σώματος (Gelfand et al. 2007).



Εικόνα 5. Ανάστροφη ψωρίαση (Roberson & Bowcock, 2010).

- Ψωριασική αρθρίτιδα

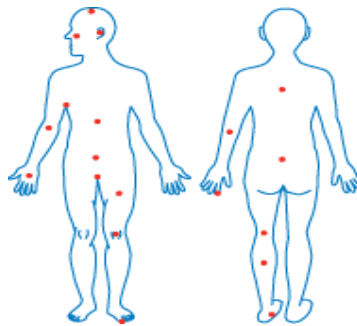
Πρόκειται για μια μορφή φλεγμονώδους, χρόνιας αρθρίτιδας κατά την οποία χορηγείται διαφορετική θεραπεία από τη θεραπεία για τις δερματικές βλάβες. Η πορεία της ασθένειας δεν μπορεί να προβλεφθεί. Η προσβολή των οστών και των αρθρώσεων παρατηρείται σε ποσοστό 7%-10% των ψωριασικών ασθενών και εμφανίζεται 6-10 χρόνια μετά τις πρώτες δερματικές αλλοιώσεις (ποσοστό 75%), ή ταυτόχρονα με αυτές (ποσοστό 15%). Προσβάλλει κυρίως τους γοφούς, τους ώμους, τα άκρα των χεριών και των ποδιών και ορισμένες φορές και τη σπονδυλική στήλη (Εικόνα 6). Τυπικά κλινικά ευρήματα της νόσου είναι: οίδημα, ερύθημα, άλγος και περιορισμός της κινητικότητας των αρθρώσεων (Langley et al. 2005).



Εικόνα 6. Ψωριασική αρθρίτιδα (Langley et al. 2005).

1.1.4 Ταξινόμηση με βάση την εντόπιση στο σώμα

Η ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του δέρματος και διαφέρει ανάλογα με την περιοχή όπου εμφανίζεται, ενώ, ανάλογα με την περιοχή, μπορεί να μην παρουσιάζονται ακριβώς τα ίδια συμπτώματα και να μην ισχύουν οι ίδιες θεραπείες (Εικόνα 7). Περίπου το 1/4 των ατόμων που υποφέρουν από ψωρίαση παρουσιάζουν βλάβες στα χέρια και στα πόδια. Η ψωρίαση του τριχωτού της κεφαλής είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μορφές ψωρίασης. Ακόμη μπορεί να εκδηλωθεί και στους αγκώνες, στα γόνατα, στο πρόσωπο, στους βλεννογόνους, στα νύχια και στη μέση.



Εικόνα 7. Εμφάνιση της ψωρίασης στις διάφορες περιοχές του σώματος (<http://www.psorinfo.gr>).

1.1.5 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης

Δεν υπάρχει καμία ριζική θεραπεία για την ψωρίαση. Υπάρχουν, όμως αποτελεσματικές θεραπείες που στοχεύουν στο να εξαφανίσουν ή να περιορίσουν τις βλάβες. Επιλέγονται ανάλογα με την εντόπιση, βαρύτητα, διάρκεια της νόσου, τις προηγούμενες θεραπείες και την ηλικία του ασθενούς. Η θεραπεία της ψωρίασης μπορεί να είναι αποκλειστικά τοπική, συστηματική ή συνδυασμός τοπικής

και συστημικής. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί και φωτοθεραπεία (Mrowlerz et al. 2011). Μια από τις σημαντικότερες θεραπείες αποτελεί η συστημική φαρμακευτική αγωγή. Οι περισσότεροι άνθρωποι που την χρησιμοποιούν έχουν μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση και/ή ψωριασική αρθρίτιδα. Ένα από τα σημαντικότερα φάρμακα που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της ψωρίασης είναι η κυκλοσπορίνη. Είναι ένα μη κυτταροτοξικό και μη μυελοτοξικό φάρμακο, το οποίο σε αντίθεση με άλλα, επιφέρει λιγότερες παρενέργειες στους ασθενείς. Η κυκλοσπορίνη, είναι ένας αναστολέας της ενεργοποίησης των T-κυττάρων και της προ-φλεγμονώδους έκφρασης των κυτταροκινών και καταστέλλει τη μετανάστευση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (EC). Η μεθοτρεξάτη, ένα ακόμη σημαντικό συστημικό φάρμακο για την ψωρίαση, επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων Th2 και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων EC καθώς και την αγγειογένεση. Το φουμαρικό οξύ, επίσης, που έχει εγκριθεί στη Γερμανία για τη θεραπεία της ψωρίασης, έχει αποδειχθεί σε αρκετές κλινικές μελέτες ότι αναστέλλει την επαγωγή της κυτταροκίνης IL-4 και των κυττάρων Th2. Οι συστημικές θεραπείες που έχουν καθοριστεί σήμερα, δεν έχουν αποκλειστικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης της ψωρίασης, αλλά αναστέλλουν άμεσα και σημαντικούς μεσολαβητές της αγγειογένεσης (Yeo et al. 2004, Heidenreich et al. 2009).

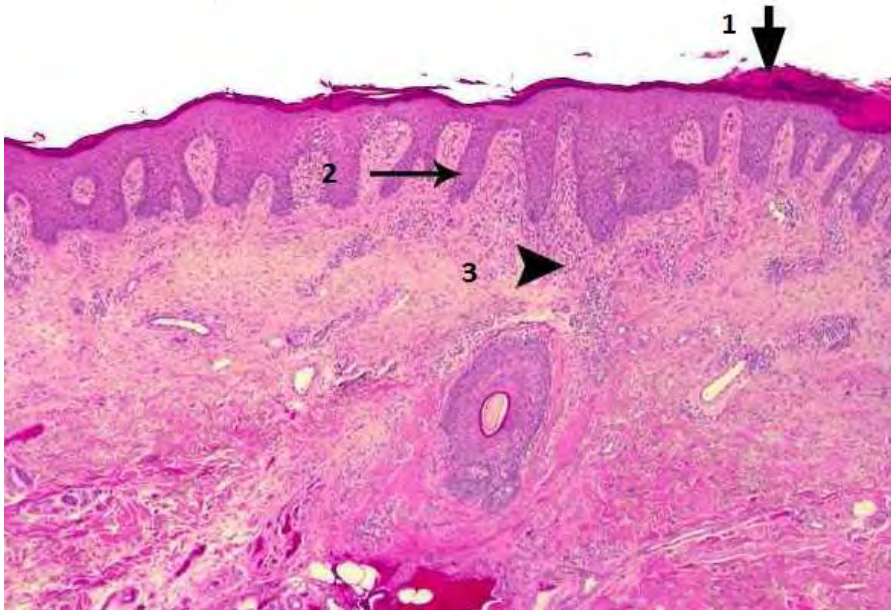
Η φωτοθεραπεία με UVB εφαρμόζεται στη θεραπεία της ψωρίασης, είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμένη αγωγή. Η μέθοδος της φωτοθεραπείας περιλαμβάνει την εκπομπή UVB (φάσμα 290-320 nm) σε ελεγχόμενες δόσεις με τη χρήση ειδικών λυχνιών. Ωστόσο, η φωτοθεραπεία δεν χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία της ψωρίασης, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με ψωρίαση που υποβλήθηκαν σε αυτό το είδος θεραπείας ανέπτυξαν καρκίνο και μελανώματα. Ο μηχανισμός δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας κατά της ψωρίασης, οφείλεται ίσως στο ότι η παροδική ελάττωση της σύνθεσης του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών που προκαλεί η UVB οδηγεί σε ομαλοποίηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κερατινοκυττάρων (Piskin et al. 2003).

1.1.6 Ιστολογικά χαρακτηριστικά

Η ιστολογική εικόνα μιας τυπικής ψωριασικής δερματικής βλάβης χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο. Η ιστοπαθολογική εικόνα της ψωρίασης ποικίλλει αναλόγως της μορφής, της ηλικίας και του εντοπισμού της εξεταζόμενης βλάβης.

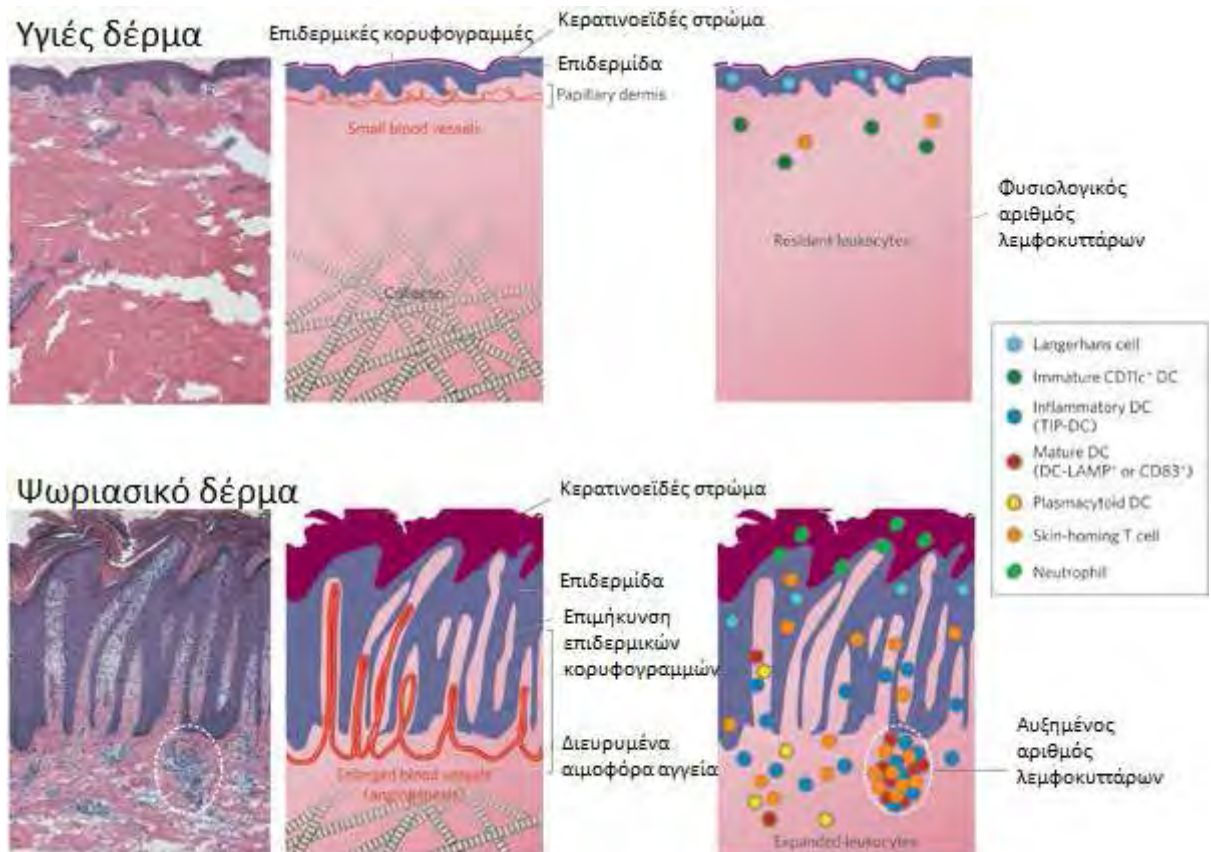
Αρχικά έχουμε την εμφάνιση ερυθριματωδών πλακών με προσκολλημένα αργυρόχρωα λέπια, τα οποία εμφανίζονται λόγω της υπερπλασίας της επιδερμίδας από την ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και τη διατήρηση των πυρήνων στην

κεράτινη στοιβάδα (παρακεράτωση), (βέλος 2 στην Εικόνα 8). Ως αποτέλεσμα η επιδερμίδα εμφανίζει πάχυνση (ακάνθωση) και επιμήκυνση των κορυφογραμμών των δερματικών πτυχώσεων (βέλος 1 στην Εικόνα 8). Τέλος στο χόριο παρατηρούνται διευρυμένα και ελικοειδή τριχοειδή σε συνδυασμό με διάχυτη και περιαγγειακή φλεγμονώδη διήθηση που περιλαμβάνει κυρίως Τ λεμφοκύτταρα (βέλος 3 στην Εικόνα 8), (Nestle et al. 2009).



Εικόνα 8. Ιστοπαθολογική εικόνα ψωρίασης. Φαίνονται η ακάνθωση (βέλος 1), η παρακεράτωση (βέλος 2) και τα διευρημένα τριχοειδή και η φλεγμονώδης διήθηση (βέλος 3), (<http://www.pathpedia.com>).

Οι διαφορές ανάμεσα στο δέρμα ατόμων με ψωρίαση και υγιών ατόμων είναι εμφανείς (Εικόνα 9). Οι κυριότερες είναι η πάχυνση της επιδερμίδας, η επιμήκυνση των επιδερμικών κορυφογραμμών και η αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 9. Διαφορές ανάμεσα σε υγιές και ψωριασικό δέρμα. Φαίνεται η πάχυνση της επιδερμίδας στο ψωριασικό δέρμα και η επιμήκυνση των επιδερμικών κορυφογραμμών. Ακόμη σε σχέση με το υγιές δέρμα, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και διευρυμένα αιμοφόρα αγγεία (Lowe et al. 2007).

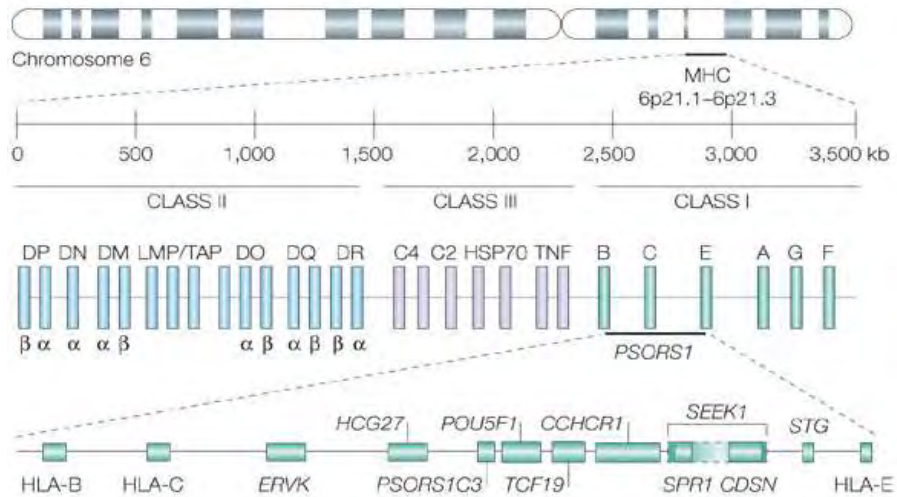
1.1.7 Παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς, ανοσολογικούς, περιβαλλοντικούς και ψυχολογικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί διαταράσσουν τη λειτουργία των κυττάρων του δέρματος και κυρίως των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών.

- Γενετικοί παράγοντες

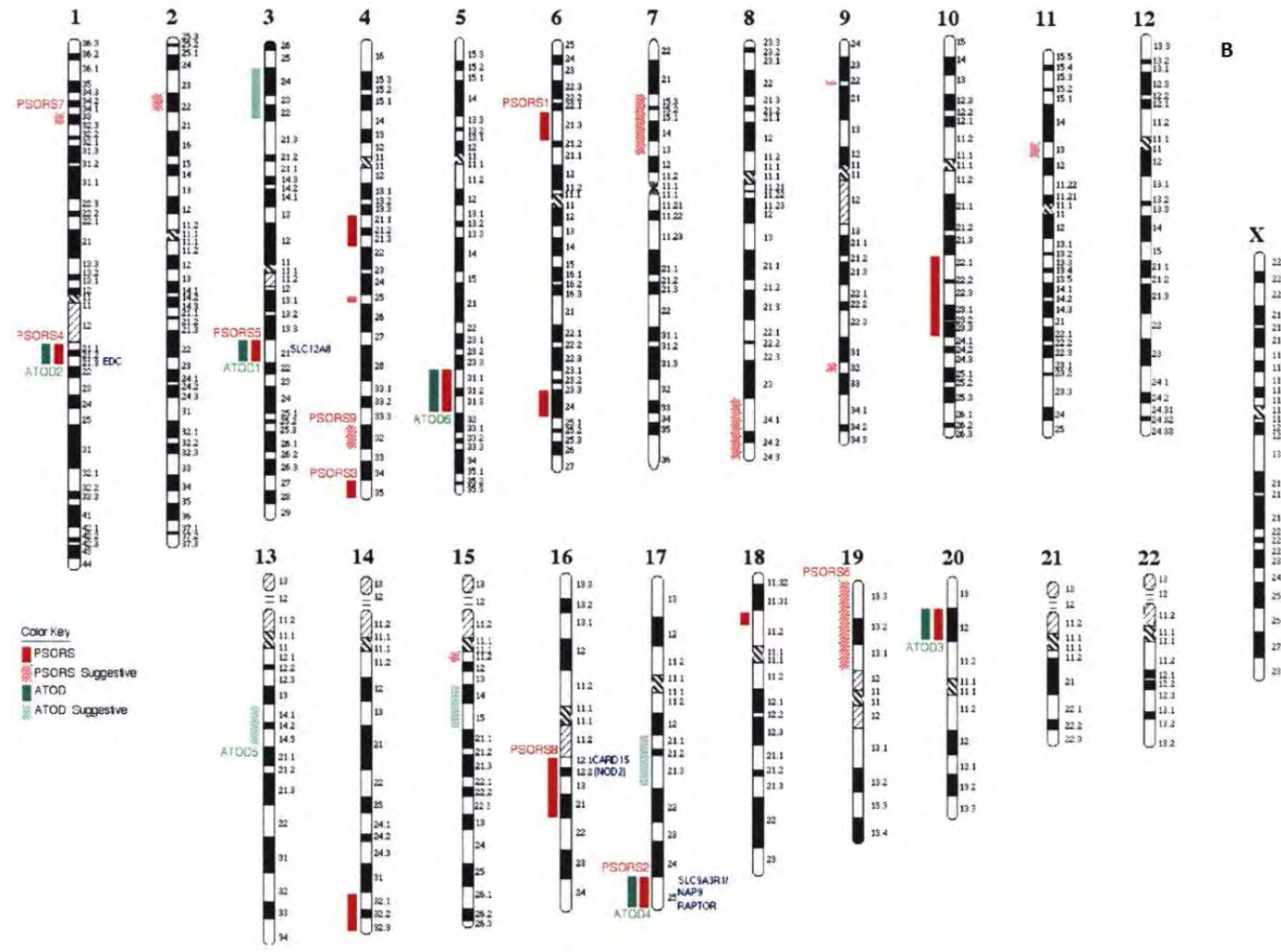
Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, υπάρχει μια πληθώρα στοιχείων που υποδηλώνουν την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης για την εμφάνιση της νόσου. Από αρκετές μελέτες προκύπτει ότι στο 30 με 50% των περιπτώσεων ψωρίασης υπάρχει οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας. Σε μονοζυγωτικούς διδύμους η συμπτωματικότητα είναι 70%, ενώ στους διζυγωτικούς διδύμους το αντίστοιχο

ποσοστό είναι 5-23%, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο (Melski et al. 1981). Έρευνες σε οικογένειες ατόμων με ψωρίαση έχουν δείξει ότι υπάρχουν αρκετές χρωμοσωμικές περιοχές που σχετίζονται με την ασθένεια. Οι έρευνες αυτές οδήγησαν στην ταυτοποίηση περισσότερων από 30 διαφορετικών γενετικών τόπων. Ο γενετικός τόπος *PSORS1* που βρίσκεται στην χρωμοσωματική περιοχή 6p21.3, και εδράζεται στην περιοχή του MHC (Major Histocompatibility Complex), θεωρείται ο σημαντικότερος και οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται στην ταυτοποίηση του γονιδίου (ή των γονιδίων) που σχετίζονται με την ψωρίαση στην περιοχή αυτή (Εικόνα 10). Το MHC είναι ένα μεγάλο σύμπλεγμα γονιδίων, τα οποία διακρίνονται βάσει των διαφορών στη δομή και στη λειτουργία τους, σε τρεις τάξεις (I, II και III). Δύο από αυτές τις τάξεις, η τάξη I και η τάξη II, αντιστοιχούν στα γονίδια των λευκοκυτταρικών αντιγόνων του ανθρώπου (HLA). Συγκεκριμένα αλληλόμορφα του HLA έχουν δείξει ισχυρή συσχέτιση με ορισμένα νοσήματα. Από μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ψωρίασης και του αλληλομόρφου HLA-Cw6. Το HLA-Cw6 έχει συσχετιστεί με την πρώιμη έναρξη της χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας και με τη σταγονοειδή ψωρίαση. Αυτή η παραλλαγή έχει προσδιοριστεί ως η κύρια υπεύθυνη για την ψωρίαση στο γενετικό τόπο *PSORS1*. Ένα άλλο γονίδιο που συσχετίζεται με την ψωρίαση σε αυτήν την περιοχή του MHC είναι, το γονίδιο *CCHCR1* το οποίο κωδικοποιεί την Coiled-Coil α -Helical Rod Protein 1 (Rajan et al, 2000). Η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα, και ίσως είναι ένας ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Επιπλέον με την ψωρίαση έχει συσχετιστεί και το γονίδιο *CDSN*, το οποίο κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη (CDSN). Η CDSN είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία υπερεκφράζεται στην ψωριασική επιδερμίδα και φαίνεται πως συμμετέχει στην κυτταρική προσκόλληση των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα. Ο γενετικός τόπος *PSORS1* είναι υπεύθυνος για το 35-50% της γενετικής βάσης της εκδήλωσης της ψωρίασης, αλλά δεν εξηγεί το σύνολο της γενετικής προδιάθεσης (Rajan et al. 2000).



Εικόνα 10. Η θέση του γενετικού τόπου *PSORS1* στην περιοχή MHC και τα γονίδια που συσχετίζονται με την ψωρίαση (Bowcock & Krueger, 2005).

Εκτός από τον *PSORS1* υπάρχουν και άλλοι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση, σε μελέτες διαφόρων πληθυσμιακών ομάδων, όπως ο *PSORS2*, στην χρωμοσωματική περιοχή 17q25, όπου εντοπίζονται τα γονίδια *SLC9A3R1* και *NAT9*, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στους μηχανισμούς εκδήλωσης της ψωριασικής προδιάθεσης. Ακόμη ο *PSORS3* στην χρωμοσωματική περιοχή 4q35, ο *PSORS4* στην 1q, ο *PSORS5* στην 3q και ο *PSORS7* στην 1p. Αρκετοί από τους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την ψωρίαση συμπίπτουν με περιοχές του γονιδιώματος που έχουν συσχετιστεί με άλλες ασθένειες, όπως ο γενετικός τόπος στην χρωμοσωματική περιοχή 16q που χαρτογραφείται κοντά στον γενετικό τόπο που σχετίζεται με τη νόσο Crohn. Αρκετά άτομα που έπασχαν μάλιστα από τη νόσο Crohn είχαν εμφανίσει ψωρίαση σε μεγάλο ποσοστό. Ακόμη οι γενετικοί τόποι στις χρωμοσωματικές περιοχές 1q, 3q, 5q, 17q και 20q συμπίπτουν με περιοχές του γονιδιώματος που έχουν σχετιστεί με την ατοπική δερματίτιδα (Εικόνα 11), ενισχύοντας έτσι την υπόθεση αλληλοεπικάλυψης τόπων για διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες (Bhalerao & Bowcock 1998, Rajan et al. 2000).



Εικόνα 11. Γενετικοί τόποι ψωρίασης (PSORS), (με κόκκινο και ροζ χρώμα) και ατοπικής δερματίτιδας (ATOD), (με πράσινο και γκρι χρώμα), (Bhalerao & Bowcock, 1998).

- Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους ασθενείς με γενετική προδιάθεση στην ψωρίαση, η ασθένεια μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδογενείς και εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στους εξωγενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η αλλαγή εποχής και η τριβή που προκαλούν τα ρούχα στο δέρμα. Στους ενδογενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η συναισθηματική πίεση, ορισμένα φάρμακα και οι μολυσματικές ασθένειες. Ορισμένες συνήθειες στον τρόπο ζωής αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης της ψωρίασης. Αυτό σχετίζεται κυρίως με το κάπνισμα. Η κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία μπορούν επίσης να θεωρηθούν παράγοντες επιδείνωσης (Higgins 2000).

- Ανοσολογικοί παράγοντες

Οι ανοσολογικοί παράγοντες προκαλούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις στην επιδερμίδα. Η επιδερμίδα αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα, από μελανοκύτταρα (κύτταρα τα οποία παράγουν τις χρωστικές που ευθύνονται για την αλλαγή του χρώματος στο δέρμα), καθώς και από κύτταρα Langerhans (τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του ανοσοποιητικού συστήματος και ελέγχουν την πλειοψηφία των λειτουργιών του δέρματος). Είναι γνωστό ότι στην περίπτωση της ψωρίασης η επιδερμίδα ανανεώνεται υπερβολικά γρήγορα (τέσσερις με έξι φορές πιο γρήγορα συγκριτικά με το υγιές δέρμα). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, τα οποία δεν παράγουν αρκετή ποσότητα κερατίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεπιών. Εκτός από τον ταχύ ρυθμό ανανέωσης των κερατινοκυττάρων, η ψωρίαση είναι και αποτέλεσμα φλεγμονωδών αντιδράσεων του δέρματος. Η φλεγμονώδης αντίδραση οφείλεται σε δυο τύπους κυττάρων: τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπάντηση.

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κατευθύνονται προς την εξωτερική κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας, αποκολλώνται από την επιφανειακή στιβάδα του δέρματος και προκαλούν συνεχή ερεθισμό. Έτσι, το δέρμα ξεκινά μία συνεχή διαδικασία επούλωσης. Με αυτόν τον τρόπο, τα συγκεκριμένα κύτταρα συμβάλλουν στη διατήρηση της φλεγμονής στην επιδερμίδα. Τα T κύτταρα, (τα οποία ενεργοποιούνται από τα κύτταρα Langerhans), εμπλέκονται στην εκδήλωση και στη διατήρηση της φλεγμονής του δέρματος μέσω της απελευθέρωσης ορισμένων κυτταροκινών με προφλεγμονώδη δράση (Lowes et al. 2007, Gudjonsson et al. 2004).

1.2. Παθοφυσιολογία της ψωρίασης

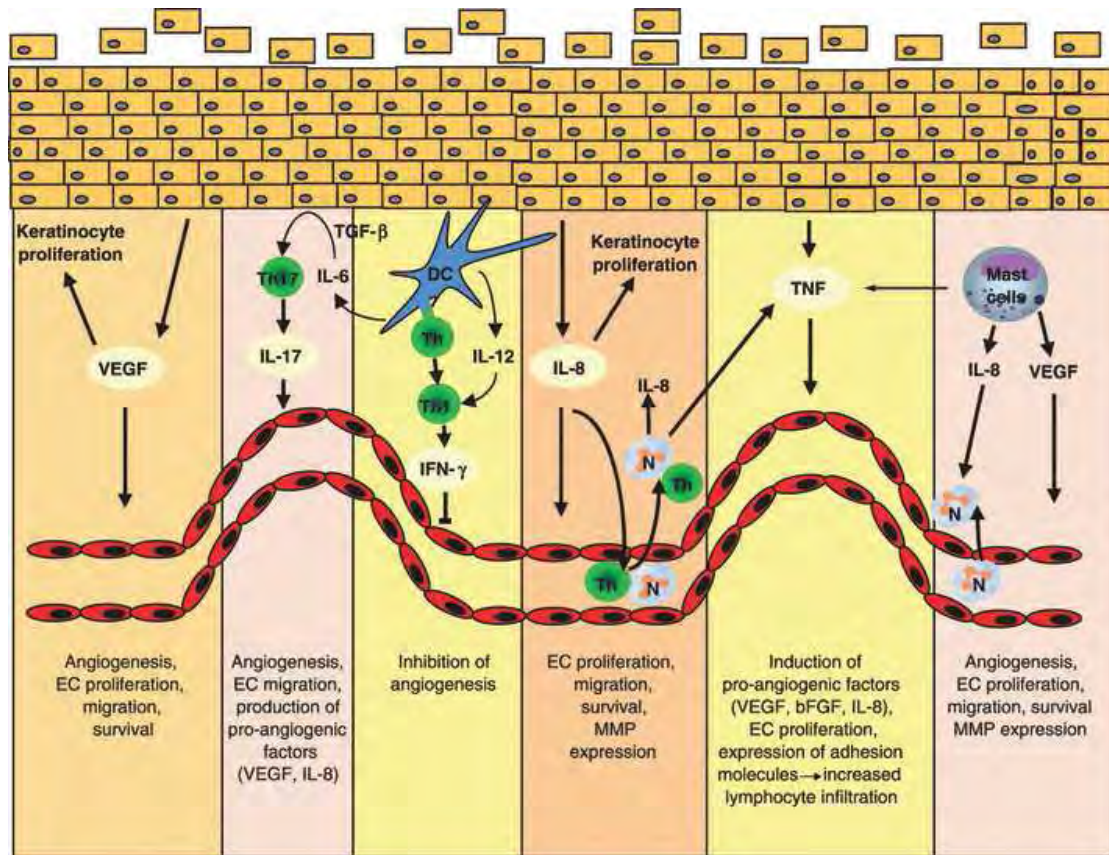
Η ψωρίαση χαρακτηρίζεται, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, από υπερπολλαπλασιασμό και ανώμαλη διαφοροποίηση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων, διήθηση των λεμφοκυττάρων (που αποτελούνται κυρίως από Τ λεμφοκύτταρα) και διάφορες ενδοθηλιακές αγγειακές μεταβολές στη δερματική στοιβάδα, όπως αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα κατά την έναρξη της νόσου, δενδριτικά κύτταρα (DCs) ενεργοποιούνται στην επιδερμίδα και στο χόριο, και παράγουν ιντερφερόνη-α (IFN-α) και ιντερλευκίνη-23 (IL-23), οι οποίες με τη σειρά τους, προωθούν την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένα των Τ βοηθητικών κυττάρων Th1 και Th17. Στην επιδερμίδα και στο χόριο των ψωριασικών αλλοιώσεων, αυτά τα Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν πληθώρα κυτταροκινών (κυρίως IFN-γ, IL-2 και TNF-α), οι οποίες είναι σε θέση να διεγείρουν τα γειτονικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα, κερατινοκύτταρα) και να εκκρίνουν και αυτά κυτταροκίνες. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας, η μειωμένη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών αγγειακών διαταραχών, με μία από τις σημαντικότερες, την αγγειογένεση (Lowe et al. 2007).

1.2.1 Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός δηλαδή νέων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία, εμπλέκεται στην παθογένεια διάφορων φλεγμονωδών αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η κολίτιδα. Η αγγειογένεση αρχίζει με την ενεργοποίηση των κυττάρων EC μέσω διαφόρων παραγόντων, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ή ο βασικός παράγοντας ανάπτυξης ινοβλαστών (bFGF), (Εικόνα 12). Τα ακόλουθα στάδια της αγγειογένεσης περιλαμβάνουν αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, αποσταθεροποίηση των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων, αποικοδόμηση της ECM (extracellular matrix), πολλαπλασιασμό των EC και μετανάστευση. Η αγγειογένεση ρυθμίζεται αυστηρά από μια ισορροπία μεταξύ των προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών μεσολαβητών. Φυσιολογική αγγειογένεση επάγεται μόνο παροδικά κατά τη διάρκεια διεργασιών, όπως η επούλωση τραύματος, ενώ παθολογική αγγειογένεση λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες χρόνιας φλεγμονής, όπως παρατηρείται στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή της ψωρίασης. Σε αυτές τις συνθήκες, η αγγειογένεση είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη της νόσου (Heidenreich et al. 2009).

Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ECs είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της αγγειογένεσης. Ωστόσο υπάρχουν και κάποιοι προ-αγγειογενετικοί μεσολαβητές οι

οποίοι είναι αυξημένοι στο ψωριασικό δέρμα, όπως οι TNF, VEGF, HIF, IL-8 (Heidenreich et al. 2009, Krueger et al. 2005, Mohammad et al. 2010).



Εικόνα 12. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην παθογένεια της ψωρίασης. Παρατηρείται η ενεργοποίηση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων, η αλληλεπίδραση μεταξύ τους και η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ECs (VEGF: αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου, IL: ιντερλευκίνη, IFN γ : ιντερφερόνη, TNF: παράγοντα νέκρωσης όγκου, TGF: παράγοντα ανάπτυξης όγκων, MMP: μήτρα μεταλλοπρωτεϊνών, bFGF: βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, ECs: ενδοθηλιακά κύτταρα, DC: δενδριτικά κύτταρα, Th: T-βοηθητικά κύτταρα, N: ουδετερόφιλα), (Heidenreich et al. 2009).

1.2.2 Ο παράγοντας VEGF

Ο VEGF και οι υψηλής συγγένειας υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2, που κυρίως εκφράζονται από αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλούν πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, επιβίωση των ECs και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα (κυρίως η ενεργοποίηση του VEGFR-2 έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αυξημένη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων, για το σχηματισμό νέων αγγείων), (Ferrara et al. 2003). Σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του VEGF σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα σε αντίθεση με άτομα που δεν εμφάνιζαν ψωρίαση, στα οποία εντοπίστηκε σχεδόν μηδενική έκφραση του VEGF. Ακόμη εντοπίστηκε

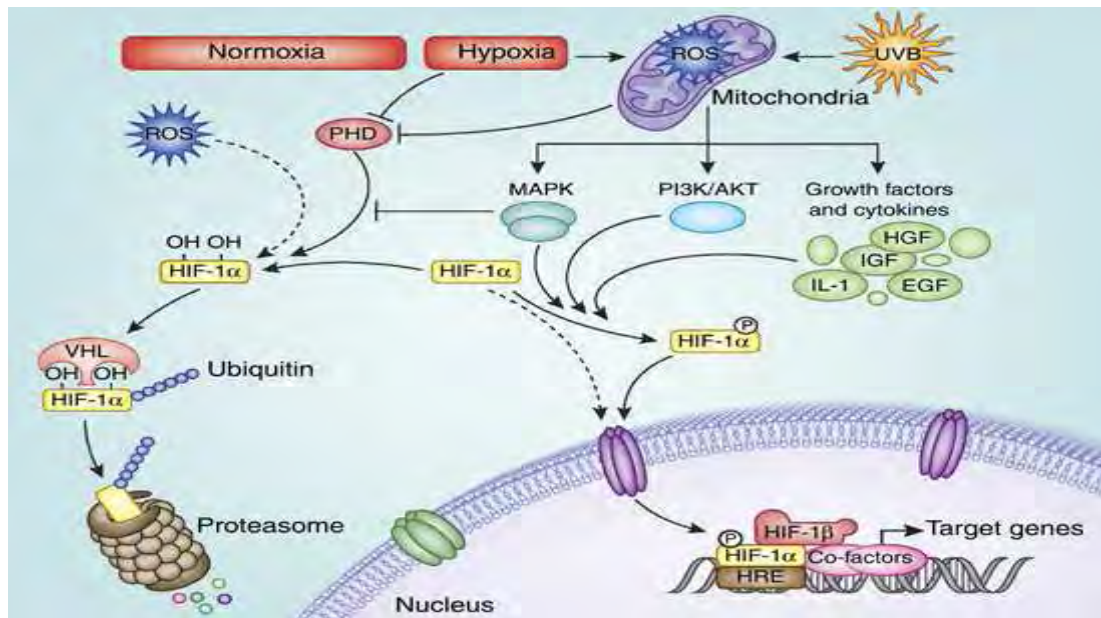
αυξημένη έκφραση του VEGFR-1 και VEGFR-2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα από δερματικές θηλές στους ασθενείς με ψωρίαση. Ο TGF- α (Transforming growth factor α) ο οποίος υπερεκφράζεται σε κύτταρα ψωριασικού δέρματος, ευθύνεται για την υπερέκφραση του VEGF στην ψωρίαση, καθώς επάγει την έκκριση και την έκφραση του VEGF στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα (Detmar et al. 1994). Ο ρόλος του VEGF στην εκδήλωση της ψωρίασης επιβεβαιώθηκε και από πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία υπερέκφραζαν τον VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρατήρησαν χρόνια φλεγμονή του δέρματος, αύξηση τριχοειδών αγγείων, υπερέκφραση των VEGFR-1 και -2, διήθηση των T λεμφοκυττάρων και αλλαγές στην επιφάνεια του δέρματος (Heidenreich et al. 2009, Simonetti et al. 2006).

1.2.3 Ο παράγοντας HIF-1

Στην ψωρίαση ο κυτταρικός υπερπολλαπλασιασμός και η πάχυνση της επιδερμίδας, έχουν ως αποτέλεσμα την παράλληλη αύξηση κατανάλωσης οξυγόνου και την ελλιπή παροχή του ιστού σε οξυγόνο. Μεταξύ άλλων, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου που παρατηρούνται αποτελούν κύριο επαγωγέα της αγγειογένεσης, μέσω μεταγραφικών παραγόντων που επάγονται από την υποξία (Hypoxia-Inducible transcription Factors, HIF), (Heidenreich et al. 2009). Ο παράγοντας HIF είναι ένα ετεροδιμερές μεταγραφικό σύμπλοκο που αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1 α και HIF-1 β . Σε φυσιολογικές τιμές οξυγόνου, οι υπομονάδες HIF- α συντίθενται συνεχώς και αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα. Ειδικά ένζυμα υδροξυλίωσης (prolyl hydroxylases) τα οποία είναι δραστικά μόνο υπό την παρουσία κανονικών συγκεντρώσεων οξυγόνου, προσθέτουν μια ομάδα υδροξυλίου (-OH) στα κατάλοιπα των υπομονάδων HIF- α ώστε να αποικοδομηθούν. Στη συνέχεια οι υδροξυλιωμένες μορφές αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη VHL (Von Hippel-Lindau) και κατευθύνονται στο πρωτεάσωμα. Κάτω όμως από συνθήκες υποξίας ή ακτινοβολίας UVB, οι υδροξυλάσες αυτές είναι ανενεργές και κατά συνέπεια, οι υπομονάδες HIF-1 α δεν αποικοδομούνται. Μετατοπίζονται έτσι στον πυρήνα, ετεροδιμερίζονται με την υπομονάδα HIF-1 β και αλληλεπιδρούν με παράγοντες HRES (hypoxia-responsive elements), προάγοντας έτσι την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (Εικόνα 13), (Hamid et al. 2011). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτταροκίνες και οι πρωτεϊνικές κινάσες AKT, μπορούν επίσης να επάγουν την σύνθεση της πρωτεΐνης HIF-1 α ή την στρατολόγησή της στον πυρήνα. Τα επίπεδα του HIF-1 α έτσι είναι αυξημένα. Μεταξύ των γονιδίων στόχων του HIF είναι κύριοι ρυθμιστές της αγγειογένεσης όπως οι VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, IL-8 (Rosenberger et al. 2007).

Ο HIF-1 α , φαίνεται να είναι ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης που επάγεται από την υποξία, η οποία με τη σειρά της, κατευθύνει τη μετανάστευση των ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων κοντά σε υποξικό περιβάλλον. Αυτό γίνεται μέσω του

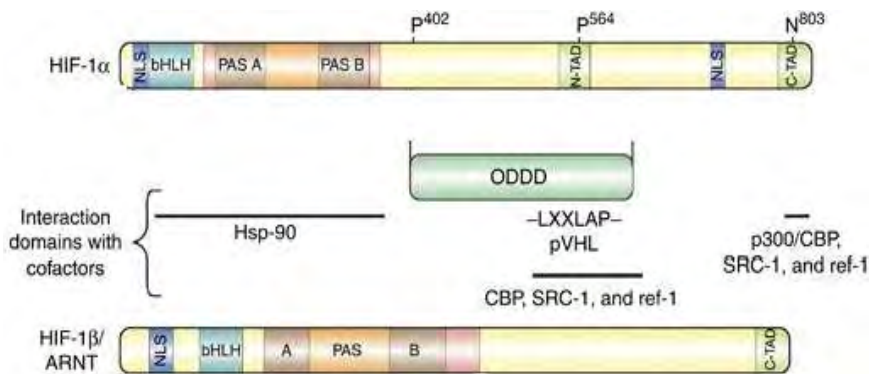
μεταγραφικού παράγοντα VEGF, ο οποίος αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της αγγειογένεσης. Αποτελεί επίσης, ένα βασικό παράγοντα στις ανοσολογικές απαντήσεις, σημαντικό ρυθμιστή στην ομοίωση και στον αναερόβιο μεταβολισμό. Ένας αριθμός διαμεσολαβητών της φλεγμονής μπορεί να ενεργοποιήσει τον παράγοντα αυτόν και έπειτα να διεγείρει την έκφραση αρκετών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες προάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Ο VEGF ενεργοποιεί κυρίως την κινάση Akt, η οποία ευθύνεται για την αύξηση της έκφρασης του HIF, ο οποίος ενεργοποιείται από την υποξία και ενεργοποιεί τον VEGF, σχηματίζοντας έτσι, έναν επαναλαμβανόμενο κύκλο. Οι περιοχές που εντοπίζεται ο HIF-1α, πολλές φορές συμπίπτουν με τις περιοχές έκφρασης του VEGF στο δέρμα (Heidenreich et al. 2009, Westra et al. 2010, Rosenberger et al. 2007).



Εικόνα 13. Ρύθμιση του HIF-1α από διαφορετικά ερεθίσματα. Φαίνεται η πορεία του HIF υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες υποξίας (AKT: πρωτεϊνική κινάση B, HGF: αυξητικός παράγοντας ηπατικών κυττάρων, Hsp-90: πρωτεΐνες θερμικού σοκ-90, LXXLAP: το μοτίβο που απαιτείται για την αλληλεπίδραση με τις υδροξυλάσες (PhD), MAPK: ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση, NLS: πυρηνικό σήμα εντοπισμού, N-TAD: N-τερματική δομή μετα-ενεργοποίησης, PI3K: φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-κινάση, pVHL: πρωτεΐνη VHL ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου (Hamid et al. 2011).

1.2.4 Δομή της πρωτεΐνης HIF-1

Η πρωτεΐνη HIF-1 αποτελείται από τις υπομονάδες α και β . Τόσο η α όσο και η β υπομονάδα έχουν ένα βασικό μοτίβο helix-loop-helix και μια περιοχή PAS (Per-Arnt-Sim), η οποία απαιτείται για το διμερισμό της υπομονάδας HIF-1 α με την HIF-1 β , καθώς και για την πρόσδεση στο DNA. Στην υπομονάδα α υπάρχει μια περιοχή ODDD (oxygen-dependent degradation), που μεσολαβεί στην σταθερότητα του HIF και η οποία είναι υδροξυλιωμένη από την PHD-2 (proline-hydroxylase-2), καθιστώντας έτσι την υπομονάδα α ευάλωτη σε αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου (Jennifer et al. 2007). Η υπομονάδα HIF-1 α περιέχει επίσης δυο περιοχές TAD (transactivation domains), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχου της πρωτεΐνης HIF-1. Με τις περιοχές TAD αλληλεπιδρούν οι ακετυλοτρανσφεράσες CBP, p300 και SRC-1. Αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων-στόχων (Εικόνα 14), (Hamid et al. 2011, Maxwell, 2005).



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση του HIF-1 α και HIF-1 β . Αναφέρονται και οι περιοχές αλληλεπίδρασης με διάφορους παράγοντες (Hamid et al. 2011).

1.2.5 Έκφραση του γονιδίου HIF-1 α σε ασθενείς με ψωρίαση και σε μη προσβεβλημένα άτομα

Όπως προαναφέρθηκε, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της ψωρίασης είναι ο ταχύς υπερπολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων, κατά τον οποίο σταματάει η απόπτωση και ξεκινά η αγγειογένεση. Ο HIF-1 α , ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης που επάγεται από την υποξία, υπερεκφράζεται στις συνθήκες αυτές. Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και πρωτεΐνης. Με πειράματα που έγιναν σε δείγματα ασθενών και μη προσβεβλημένων ατόμων,

διαπιστώθηκε στους πρώτους υπερέκφραση του *HIF-1α* σε επίπεδο mRNA και μειωμένα επίπεδα του παράγοντα VHL, ο οποίος είναι αυξημένος σε μη-υποξικές συνθήκες (Tovar-Castillo et al. 2007). Παρατηρήθηκαν ακόμη αυξημένα επίπεδα mRNA του παράγοντα PR39 (porcine peptide cathelicidin) ο οποίος έχει αγγειογενετικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες και εμποδίζει την δράση των πρωτεασωμάτων και κατ' επέκταση την αποικοδόμηση του HIF-1α. Ο PR39 επίσης επάγει την έκφραση του VEGF και του IAP-2 (inhibitor of apoptosis protein-2), οι οποίοι βρέθηκαν και αυτοί να υπερεκφράζονται στους ασθενείς. Αντιθέτως στα δείγματα των μη προσβεβλημένων ατόμων παρατηρήθηκε υπερέκφραση του VHL τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης (Tovar-Castillo et al. 2007, Reynoso-Roldán et al. 2012).

Η υπερέκφραση του HIF-1α επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης, με πειράματα που έγιναν σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση και μη προσβεβλημένων ατόμων. Η υπερέκφραση που παρατηρήθηκε συσχετίστηκε και με την υπερέκφραση της κυτταροκίνης IL-6. Η IL-6 συμμετέχει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αιμοποίηση και στη φλεγμονή και είναι ένας ισχυρός προ-αγγειογενετικός παράγοντας. Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το περιβάλλον, η IL-6 ελέγχει την αγγειογένεση και την έκφραση του παράγοντα VEGF. Εκτός από την IL-6 και άλλες κυτταροκίνες που εμπλέκονται είτε στην προώθηση (IL-2, IL-12), είτε στην διατήρηση (TNF-α, IFN-γ) της φλεγμονής, ήταν αυξημένες στους ασθενείς, γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα μη προσβεβλημένα άτομα (Tovar-Castillo et al. 2007, Vasilopoulos et al. 2013, Fee et al. 2000).

1.3. Πολυμορφισμοί του *HIF-1α*

Συνολικά 35 πολυμορφισμοί (SNPs), έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *HIF-1α*, τρεις από τους οποίους βρίσκονται σε κωδικές περιοχές, ενώ οι υπόλοιποι εντοπίζονται σε μη κωδικές περιοχές, όπως ιντρόνια και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (Yamada, et al. 2005). Οι πολυμορφισμοί που βρίσκονται στις κωδικές περιοχές είναι, ο S28Y στο εξώνιο 2, και οι P582S, A588T στο εξώνιο 12. Όσον αφορά τα SNPs του εξωνίου 12, στο πρώτο γίνεται μια αλλαγή της βάσης C→T, στο νουκλεοτίδιο 1772 (C1772T) και ως αποτέλεσμα η προλίνη στο κωδικόνιο 582 αντικαθίσταται από τη σερίνη (P582S). Στο άλλο SNP γίνεται μια αλλαγή G →A στο νουκλεοτίδιο 1790 (G1790A) και το αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση της αλανίνης στο κωδικόνιο 588 από τη θρεονίνη (A588T). Και οι δύο αυτές αντικαταστάσεις (P582S, A588T) εντοπίζονται στην περιοχή ODDD του HIF-1α, με συνέπεια να τροποποιείται η σταθερότητα και η ικανότητα ενεργοποίησης του HIF-1α (Tanimoto et al. 2003). Αρκετοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *HIF-1α* έχουν δείξει γενετική συσχέτιση με διάφορα νοσήματα. Οι πολυμορφισμοί P582S και A588T έχουν μελετηθεί αρκετά

και έχουν συσχετιστεί με διάφορα είδη καρκίνου (Wang X. et al. 2011). Σε ανάλυση συσχέτισης διαπιστώθηκε, ότι η συχνότητα των πολυμορφισμών P582S και A588T ήταν αυξημένη σε ασθενείς με παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα σε σχέση με μη προσβεβλημένα άτομα. Επίσης στους ασθενείς με παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα παρατηρήθηκε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α. Και οι δύο αντικαταστάσεις αμινοξέων βρέθηκε να αυξάνουν την σταθερότητα και τα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α (Wang X. et al. 2011). Επιπλέον και τα δυο SNPs βρέθηκε να σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος. Η συσχέτιση των παραλλαγών A588T και P582S με την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *HIF-1α*, επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε δείγματα ασθενών με καρκίνο στο κεφάλι και στον τράχηλο και υγιών ατόμων, όπου παρατηρήθηκε αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του HIF-1α στους ασθενείς με καρκίνο υπό συνθήκες υποξίας και μη. Μια σημαντική παρατήρηση ήταν ακόμη, ότι οι ασθενείς οι οποίοι είχαν το σπάνιο αλληλόμορφο T και A, των C1772T και G1790A αντίστοιχα, εμφάνιζαν αυξημένο αριθμό μικροαγγείων σε σχέση με τους ασθενείς με γονότυπους CC και GG (Tanimoto et al. 2003). Επιπλέον οι πολυμορφισμοί αυτοί βρέθηκαν να σχετίζονται και με την εμφάνιση άλλων ειδών καρκίνου, καθώς και με το διαβήτη τύπου 2 (Norihiko et al. 2005, Chau et al. 2005). Μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί γενετική συσχέτιση του *HIF-1α* με την ψωρίαση.

1.4 Σκοπός

Σε ασθενείς με ψωρίαση έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του γονιδίου *HIF-1α* σε επίπεδο mRNA και μειωμένα επίπεδα του παράγοντα VHL, ο οποίος είναι αυξημένος σε μη-υποξικές συνθήκες. Η υπερέκφραση του *HIF-1α* επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης και συσχετίστηκε μάλιστα με την υπερέκφραση της κυτταροκίνης IL-6, η οποία είναι ένας ισχυρός προ-αγγειογενετικός παράγοντας. Με βάση την συσχέτιση της έκφρασης του *HIF-1α* στη ψωρίαση, σκοπός της εργασίας είναι ο έλεγχος πιθανής γενετικής συσχέτισης του γονιδίου με την προδιάθεση εμφάνισης ψωρίασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με γονοτύπηση του πολυμορφισμού P582S, ο οποίος έχει συσχετιστεί με τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου, σε άτομα με ψωρίαση καθώς και σε μη προσβεβλημένα άτομα του ελληνικού πληθυσμού.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση του DNA έγινε από κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση και μη προσβεβλημένων ατόμων. Τα δείγματα προέρχονται από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (90 δείγματα ασθενών με ψωρίαση και 66 δείγματα μη προσβεβλημένων ατόμων) και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης (30 δείγματα ασθενών με ψωρίαση).

Στόχος είναι η απομόνωση του DNA, που βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου, μετά τον διαχωρισμό του από τα άλλα κυτταρικά συστατικά, πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και άλλες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε γενωμικό DNA, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο επώασης με πρωτεΐνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο με κατάλληλες τροποποιήσεις.

Διαλύματα:

- **20X SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0):**
- **3 M CH₃COONa**

40,81 gr οξικό νάτριο

σε 100 ml ddH₂O τελικό όγκο

Ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH₃COOH

- **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**

10 gr SDS

σε 100 ml ddH₂O

• **Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v):** 24 ml χλωροφόρμιο: 1 ml ισοαμυλική αλκοόλη

Διαδικασία:

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 0,5 ml δείγματος σε eppendorfs, όπου προστίθεται 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.

2. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml 1X SSC. Γίνεται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστίθεται 0,5ml οξικού νατρίου 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55°C για περίπου 1h υπό ανάδευση.
4. Προστίθεται 0,5 ml φαινόλης και 0,5 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα eppendorfs, προστίθεται 1 ml χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm στους 4°C.
6. Στην συνέχεια γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα eppendorfs, προστίθεται 1 ml ισοπροπανόλης και επώαση για τουλάχιστον 20 min στους -20°C. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm, στους 4°C για να γίνει κατακρήμνιση του DNA.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 75%. Στην συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm, στους 4°C.
8. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επώαση στους 55°C μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
9. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προστίθεται 100 μl ddH₂O στο DNA, και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Τα αντιδραστήρια που προστέθηκαν έχουν τους εξής ρόλους: το SSC είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την επαναιώρηση των ερυθροκυττάρων. Το CH₃COONa προκαλεί την καθίζηση των μεμβρανών και των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό, που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει την δομή των κυτταρικών μεμβρανών, συνεπώς γίνεται η λύση του κυττάρου. Η πρωτεΐνάση K είναι μια πρωτεάση σερίνης, η οποία μπορεί να πέψει πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες και να απελευθερώσει το DNA. Επίσης, η πρωτεΐνάση K προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από τις νουκλεάσες (ένζυμα που διασπούν νουκλεϊκά οξέα). Η φαινόλη/ χλωροφόρμιο χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από την λύση των κυττάρων. Η ισοπροπανόλη χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Τέλος η αιθανόλη 70% καταφέρνει να απομακρύνει τα προηγούμενα διαλύματα (όπως το SDS) που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, π.χ. την πέψη με ένζυμα περιορισμού.

2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Στη συγκεκριμένη εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA και για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA σε ζώνες ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (πχ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μίας ένωση που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA. Έτσι, φωτίζοντας το πήκτωμα με υπεριώδες φως, να μπορούμε να παρατηρήσουμε αν ήταν επιτυχής ή όχι η απομόνωση του DNA.

Διαλύματα:

- **TAE 50X**

Tris Base 2 M

Οξικό οξύ 7,7%

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,05 M

- **Loading buffer 6X**

Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v

TBE 1X (Tris Base 0,05 M, Βορικό οξύ 0,004 M, EDTA 0,002 M)

Γλυκερόλη 8,7%

Διαδικασία:

Παρασκευή πηκτώματος:

- Προετοιμασία της ειδικής πλάκας για την παρασκευή του πηκτώματος, τοποθετώντας τα χτενάκια
- Προσθήκη 40 ml TAE 1X και 0,6 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη
- Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει
- Προσθήκη 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου 1 mg / ml και καλή ανάδευση
- Στην συνέχεια το διάλυμα ρίχνεται στο ειδικό καλούπι με τα χτενάκια για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια του πηκτώματος
- Το διάλυμα της αγαρόζης αφήνεται μέχρι να πήξει για περίπου 30 λεπτά

- Τα χτενάκια αφαιρούνται

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης:

1. Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία έχει γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X
2. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται αναμεμιγμένα 3μl DNA (από τα 100 μl της απομόνωσης DNA) μαζί με 0,6μl loading buffer
3. Εφαρμόζεται τάση 150 V για περίπου 20 min, μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση στο πήκτωμα
4. Μεταφορά του πηκτώματος σε συσκευή UV
5. Παρατήρηση των ζωνών και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA
6. Φωτογράφιση του πηκτώματος

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* ενζυμικό πολλαπλασιασμό επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε τρία στάδια και έχει ως αποτέλεσμα τον εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- υβριδισμό των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου
- σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης

Στο πρώτο στάδιο γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA που έχει απομονωθεί, συνήθως μεταξύ 92-96⁰C, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Έπειτα είναι το δεύτερο στάδιο στο οποίο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65 ⁰C για περίπου 45 sec επιτρέποντας την υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία του υβριδισμού ρυθμίζεται περίπου 5⁰C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται κατά προσέγγιση εμπειρικά με την εξής σχέση: 2⁰C για κάθε A ή T και 4⁰C για κάθε G ή C [T_m= 2*(A+T) + 4 *(G+C)]. Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός) σε θερμοκρασία 72⁰C με μια θερμοσταθερή

DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase) και παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Κατά τον πολυμερισμό οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση του DNA γίνεται πάντοτε με κατεύθυνση 5'→3'. Για την πραγματοποίηση της PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις του MgCl₂ και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους σταδίου. Στην PCR ο κύκλος της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκε 35 φορές (Mullis et al, 1987).

Οι συνθήκες της PCR, καθώς και οι ποσότητες και συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση είναι οι εξής:

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/Χρόνος	Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
Αρχική αποδιάταξη	95°C/4min	DNA εκμαγείο	100-200 ng
Αποδιάταξη	95°C/40sec	Ρυθμιστικό διάλυμα(10X+ 1,5mM Mg1X)	5μl
Υβριδοποίηση εκκινητών	58°C/45sec	MgCl ₂ (100mM)	0,25μl
Επέκταση	72°C/45sec	dNTPs(10mM)	1μl
Τελική επέκταση	72°C/10min	Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	1μl
		Εκκινητής Reverse (20pmol/ml)	1μl
		Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,25μl
		ddH ₂ O	Έως τα 50μl

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου HIF-1α που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs11549465 (P582S) είναι οι εξής:

Πολυμορφισμός	Εκκινητές
rs11549465 (P582S)	5'-aggtgtggccattgtaaaaactc-3' (forward) 5'-ctgctctgtttggtgaggct -3' (reverse)

2.4 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

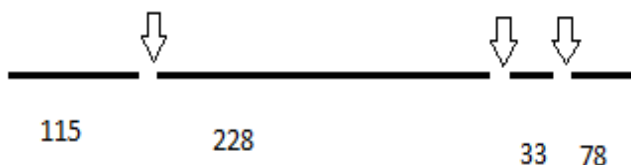
Η μέθοδος RFLP βασίζεται στη χρήση ειδικών ενζύμων, των ενδονουκλασών περιορισμού. Τα ένζυμα αυτά έχουν απομονωθεί από βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν και να κόβουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Επομένως κάθε ένζυμο περιορισμού εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης σε ένα τμήμα DNA. Μια μετάλλαξη σε μια θέση θα οδηγήσει μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ή σε δημιουργία μια νέας θέσης κοπής. Με την PCR, ενισχύονται επιλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και έτσι δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης RFLP στα ενισχυμένα τμήματα DNA. Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs11549465 (P582S) στο γονίδιο *HIF-1α*.

Το ένζυμο περιορισμού για την ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού βρέθηκε με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0. Το πρόγραμμα αυτό γνωρίζοντας την αλληλουχία που περιέχει το σημείο πολυμορφισμού επιλέγει το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που να έχει θέση αναγνώρισης το σημείο του πολυμορφισμού. Έτσι, επιλέχθηκε το ένζυμο *HphI* το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία:

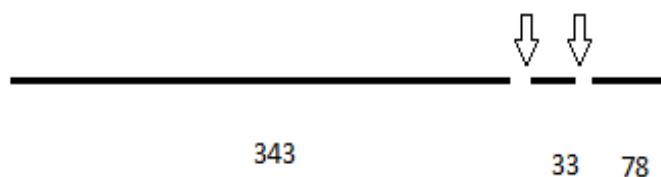


Όταν στην θέση του πολυμορφισμού επομένως υπάρχει C τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει στο C. Σε αυτήν την περίπτωση προκύπτουν τέσσερα τμήματα 115bp, 228bp, 33bp και 78bp. Αντιθέτως αν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει T τότε το ένζυμο δεν κόβει και δημιουργούνται τρία μόνο τμήματα με μήκος 343bp, 33b, 78b.

Αν το SNP είναι C:



Αν το SNP είναι T:



Διαδικασία RFLP :

1. Για την πέψη χρησιμοποιούνται 3μl από το προϊόν PCR
2. Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο *HphI* και μοιράζεται στα δείγματα DNA
3. Γίνεται ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C ολονύχτια

Αντιδραστήρια	Πέψη με <i>HphI</i>
προϊόν PCR	3μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X NEB4 (50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 1 mM Dithiothreitol)	1μl
Ένζυμο <i>HphI</i>	0,6μl
ddH ₂ O	6μl
Τελικός όγκος	10μl

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% είναι πιο αποτελεσματικό για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5 -500 bp), καθώς η αναλυτική ισχύς του είναι εξαιρετικά υψηλή. Η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 8-14% και εξαρτάται από το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο *HphI* όλων των προϊόντων PCR ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10% :

Διαλύματα:

- Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:

29 gr ακρυλαμίδης

1 gr δις ακρυλαμίδης (N,N-Methylene-bis-acrylamide)

Έως τα 100 ml ddH₂O

- 10x TBE (890mM Tris, 890mM βορικό οξύ, 20mM EDTA) :

121 gr Tris base

61,7 gr βορικό οξύ

80 ml EDTA 0,5 M

έως τα 2 lt ddH₂O

- APS 20% :

2 gr υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)

10 ml ddH₂O

Διαδικασία:

1. Σε ποτήρι ζέσεως των 100 ml προστίθεται: 8 gr ουρία, 21 ml μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30% και 6 ml 10x TBE
2. Γίνεται ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία
3. Το διάλυμα διηθείται, σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος ρυθμίζεται με ddH₂O μέχρι τα 65 ml
4. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 65 μl TEMED (tetramethylethylenediamine) και 400 μl APS 20%
5. Το διάλυμα περιχύνεται στην συσκευή, τοποθετείται το χτενάκι για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια και πολυμερίζεται για περίπου 45 λεπτά
6. Τέλος αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται προσεχτικά τα πηγαδάκια από τα υπολείμματα του πηκτώματος

Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης:

1. Τοποθετείται το πήκτωμα σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
2. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE στην συσκευή ηλεκτροφόρησης
3. Τοποθετούνται τα προϊόντα της πέψης (10 μl) μαζί με 5 μl loading buffer στα πηγαδάκια
4. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3h με τάση 250 Volts

2.6 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι τεχνική για την ανίχνευση των ζωνών DNA σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Η διακριτική ικανότητα είναι <1 ng DNA (Wolf et al, 2000).

Κατασκευάζονται τρία διαφορετικά διαλύματα:

- **Διάλυμα 1 (400ml)**

10 ml αιθανόλη 100%

0,5 ml οξικό οξύ 99%

έως τα 400 ml ddH₂O

- **Διάλυμα 2 (200ml)**

Διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 1gr/lit

- **Διάλυμα 3 (200ml)**

3 gr υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)

0,02 gr βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)

1 ml φορμαλδεΰδη έως τα 200 ml ddH₂O

Διαδικασία:

1. Τα πηκτώματα επώάζονται δύο φορές με το διάλυμα 1 για 3 min υπό ανάδευση. Στην συνέχεια γίνεται πλύση με απεσταγμένο νερό για 1 min.

2. Γίνεται επώαση με το διάλυμα 2 υπό ανάδευση για 15 min. Ακολουθούν δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό (κάθε πλύση έχει διάρκεια 1 min).

3. Γίνεται επώαση με το διάλυμα 3 υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA (περίπου 20 min)

4. Τέλος γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος σε φως και καταγραφή των αποτελεσμάτων

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 120 ασθενείς με ψωρίαση και 66 μη προσβεβλημένα άτομα. Η διάγνωση της ψωρίασης στους ασθενείς και ο έλεγχος της εξέλιξης ή μη της νόσου βασίστηκε στον δείκτη PASI. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που πήραν μέρος στην μελέτη:

Πίνακας 3.1: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (*TA: Τυπική απόκλιση)

Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος \pm TA*	41.23 \pm 15.53
Φύλο Α/Θ	59/61
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος \pm TA*	7.3 \pm 2.8
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος \pm TA*	31.2 \pm 19.8
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	55/120 (46%)
Αρχικό PASI, μέσος \pm TA*	11.83 \pm 3.8

Από τον πίνακα 3.1 φαίνεται ότι από τους 120 ψωριασικούς ασθενείς, οι 59 είναι άντρες και οι 61 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 41 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 31 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 7 έτη. Στο 46% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση και με άλλες ασθένειες, δηλαδή εμφανίζεται συν-νοσηρότητα.

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

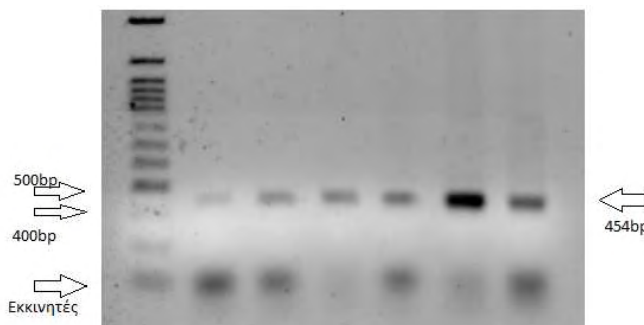
Από όλα τα άτομα απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας. Ενδεικτικά, (Εικόνα 15) φαίνονται τα αποτελέσματα DNA τεσσάρων ασθενών σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.



Εικόνα 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *HIF-1α* με PCR

Το τμήμα του γονιδίου *HIF-1α* το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό rs11549465 και έχει μέγεθος 454bp ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Εικόνα 16).

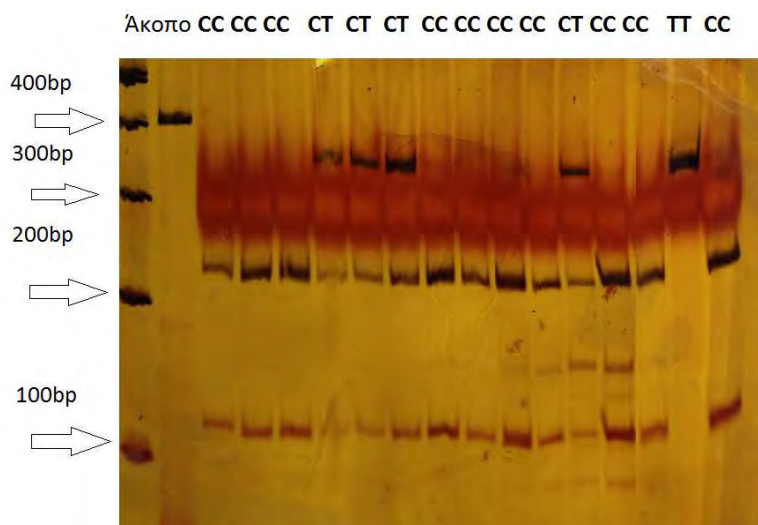


Εικόνα 16. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP

Ο προσδιορισμός των γονότυπων των ατόμων έγινε με την μέθοδο RFLP. Στα προϊόντα PCR έγινε πέψη με το ένζυμο *HphI*. Από αυτήν την πέψη, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτουν τμήματα των 115, 228, 33, και 78bp ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο T προκύπτουν τμήματα των 343, 33, και 78bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (CC), ατόμων ομόζυγων ως

προς την απουσία της θέσης περιορισμού (TT), και ετερόζυγων ατόμων (CT). Ενδεικτικά (Εικόνα 17) φαίνονται τα αποτελέσματα της RFLP.



Εικόνα 17. Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό P582S του HIF-1α.

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης των ασθενών για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Γονότυποι των ασθενών για τον πολυμορφισμό C1772T του γονιδίου HIF-1α

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1	C/C	31	C/C	64	C/C	103	C/C
2	C/C	33	C/C	69	C/C	104	C/T
3	C/T	35	C/C	72	C/C	105	C/C
4	C/C	35	C/C	73	C/C	106	C/C
5	C/C	36	C/T	74	C/T	107	C/T
6	C/C	37	C/C	75	C/C	108	C/C
7	C/C	38	C/C	76	C/C	110	C/T

8	C/C	39	C/C	77	C/C	111	C/C
9	C/C	40	C/C	79	C/C	112	C/C
10	C/C	41	C/C	80	C/C	113	C/C
11	C/C	42	C/C	81	C/C	114	C/C
12	C/C	43	C/C	82	C/C	115	C/C
13	C/C	44	C/C	83	C/C	116	C/C
14	C/C	45	C/C	84	C/C	117	C/C
15	C/C	46	C/C	85	C/C	118	C/C
16	C/C	47	C/C	86	T/T	119	C/C
17	C/C	48	C/T	91	C/C		
18	C/C	52	C/T	92	C/C		
19	C/C	53	CT	93	C/C		
20	C/C	55	C/C	94	C/T		
21	C/C	56	C/C	95	C/C		
22	C/T	57	C/T	96	C/C		
23	C/C	58	C/C	97	C/C		
24	C/T	59	C/C	98	C/T		
25	C/C	60	C/C	99	C/C		
26	C/C	61	C/C	100	C/T		
27	C/C	62	C/T	101	C/C		
28	C/T	63	C/C	102	C/T		

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης των μη προσβεβλημένων ατόμων για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Γονότυποι των μη προσβεβλημένων ατόμων για τον πολυμορφισμό C1772T του γονιδίου HIF-1α

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1	C/C	18	C/T	35	C/C	52	C/C
2	C/C	19	C/C	36	C/T	53	C/C
3	C/C	20	C/C	37	C/T	54	C/C
4	C/C	21	C/T	38	C/C	55	C/C
5	C/C	22	C/C	39	C/C	56	C/C
6	C/C	23	C/C	40	C/C	57	C/T
7	C/C	24	C/T	41	C/T	58	C/C
8	C/T	25	C/C	42	C/C	59	C/C
9	C/T	26	C/C	43	C/C	60	C/C
10	C/C	27	C/C	44	C/C	61	C/C
11	C/C	28	C/C	45	C/C	62	C/C
12	C/C	29	C/C	46	C/T	63	C/C
13	C/C	30	C/T	47	C/T	64	C/C
14	C/C	31	C/C	48	C/C	65	C/C
15	C/C	32	C/C	49	C/C	66	C/C
16	C/C	33	C/C	50	C/C		
17	C/C	34	C/C	51	C/C		

3.5 Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό P582S

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του γονοτύπου των ασθενών ή ενός συγκεκριμένου αλληλομόρφου με την εμφάνιση της ψωρίασης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον Πίνακα 3.4. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι αναλύσεις συσχέτισης βάσει των γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων των ασθενών και των μη προσβεβλημένων ατόμων. Ακόμη παρουσιάζεται ανάλυση συσχέτισης βάσει της υπόθεσης ότι το αλληλόμορφο C είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου T και βάσει της υπόθεσης ότι το αλληλόμορφο T είναι επικρατές έναντι του αλληλομόρφου C. Όπως παρατηρούμε οι τιμές P απέχουν από την τιμή ≤ 0.05 , που ορίστηκε ως το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Συνεπώς, από την στατιστική ανάλυση της παρούσας μελέτης, εξάγεται το συμπέρασμα πως δεν υπάρχει κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C1772T του γονιδίου *HIF-1α* την εμφάνιση της νόσου.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα αναλύσης συσχέτισης βάσει των γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων των ασθενών και των μη προσβεβλημένων ατόμων

Γονίδιο Πολυμορφισμός	Test	Μάρτυρες	Ασθενείς	P
HIF-1α P582S (rs11549465)	Genotypic [CC/CT/TT]	53/13/0	101/18/1	0.845
	Cochran- Armitage [C/T]	119/13 (0.91)	220/20 (0.92)	0.703
	Επικρατές [(CC+CT)/TT]	66/0	119/1	1.000
	Υπολειπόμενο [CC/(CT+TT)]	53/13	101/19	0.545

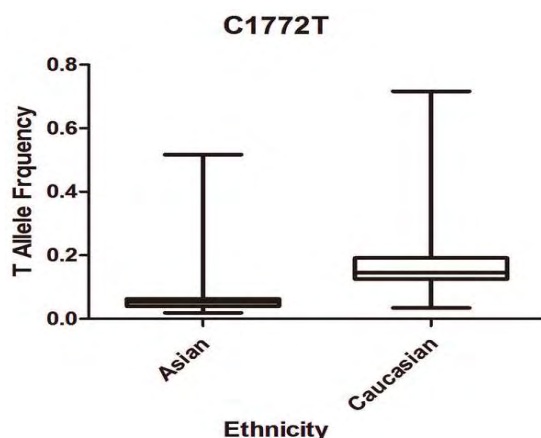
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανάλυση συσχέτισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *HIF-1α*, και συγκεκριμένα του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού P582S (C1772T) με την εμφάνιση της ψωρίασης σε άτομα του ελληνικού πληθυσμού. Ο παράγοντας HIF-1 αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β και είναι ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης που επάγεται από την υποξία (Hamid et al. 2011). Ο HIF-1 υπερεκφράζεται σε ψωριασικούς ασθενείς, όπως προκύπτει από προγενέστερες μελέτες, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης (Vasilopoulos et al. 2013, Ioannou et al. 2009). Αυξημένα ήταν επίσης και τα επίπεδα του παράγοντα PR39, ο οποίος έχει αγγειογενετικές και αντιαποπτωτικές ιδιότητες και εμποδίζει τη δράση του πρωτεοσώματος και κατ'επέκταση έτσι την αποικοδόμηση του *HIF-1α* (Tovar-Castillo et al., 2007). Στους ψωριασικούς ασθενείς παρατηρήθηκε επιπλέον και υπερέκφραση της IL-6 κυτταροκίνης, η οποία συμμετέχει στην αιμοποίηση και στη φλεγμονή και είναι ένας ισχυρός προ-αγγειογενετικός παράγοντας (Vasilopoulos et al. 2013). Στο πλαίσιο της ανάλυσης αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 120 ασθενών με ψωρίαση, και 66 μη προσβεβλημένων ατόμων. Στη συνέχεια ακολούθησε γονοτυπική ανάλυση με την μέθοδο PCR-RFLP. Από τα άτομα που συμμετείχαν στην συγκεκριμένη μελέτη οι 59 είναι άντρες και οι 61 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης για τον πολυμορφισμό rs11549465 (P582S) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση της ψωρίασης. Παρόλα αυτά ο αριθμός των ασθενών που συμπεριελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη είναι σχετικά μικρός για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη συσχέτισή του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Επιπλέον, οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται μόνο από δύο γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (89% των ασθενών προέρχεται από τη Λάρισα και 11% από τη Θεσσαλονίκη). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της γονοτύπησης δεν αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό στο σύνολό του και ίσως να διαφοροποιούνται σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Γι' αυτό το λόγο, είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός των ασθενών ώστε και να επιτευχθεί αύξηση του συνόλου των ασθενών αλλά και να συμπεριληφθούν ασθενείς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων που θα αφορούν πλέον τη συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού στον ελλαδικό χώρο.

Τα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες, υποδεικνύουν πως το αλληλόμορφο T του πολυμορφισμού (C1772T) έχει μικρή συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό (5%) σε σχέση με το αλληλόμορφο C (Wang et al. 2011). Το αλληλόμορφο T μάλιστα έχει βρεθεί σε μεγαλύτερη συχνότητα σε άτομα που έπασχαν από διάφορες νόσους από ότι σε υγιή άτομα. Ο πολυμορφισμός C1772T έχει συσχετιστεί κυρίως με διάφορα

είδη καρκίνου. Παραδείγματος χάριν, σε ασθενείς με παγκρεατικά αδενοκαρκινώματα το αλληλόμορφο T είχε συχνότητα 10%, ενώ η αντίστοιχη συχνότητα στα μη προσβεβλημένα άτομα ήταν 5% (Wang X. et al, 2011). Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, το αλληλόμορφο T είχε πολύ χαμηλή συχνότητα, τα περισσότερα άτομα μάλιστα ήταν ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο C (CC) και ελάχιστα άτομα ήταν ετερόζυγα (CT) (Putra et al, 2011).

Το αλληλόμορφο T και τα άτομα που είναι ομόζυγα σε αυτό, σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου (Wang et al. 2011). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα και σταθερότητα του HIF-1α που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση των ρυθμιζόμενων γονιδίων του, τα οποία προάγουν την αγγειογένεση. Ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου ατόμων με το αλληλόμορφο T, διαφοροποιείται ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα. Η συχνότητα μάλιστα του αλληλομόρφου T διαφέρει μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών (Εικόνα 18). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε νοσοκομείο της Κίνας παρατηρήθηκε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου σε Ασιατικούς πληθυσμούς και μειωμένη σε Καυκάσιους. Αυτό πιθανόν εξηγείται, εξαιτίας του γενετικού υπόβαθρου που ποικίλει στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, καθώς και του διαφορετικού τρόπου ζωής (Pengfei et al. 2013).



Εικόνα 18: Η συχνότητα του αλληλομόρφου T του HIF-1α (C1772T) ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα (Pengfei et al. 2013).

Στο γονίδιο HIF-1α έχουν βρεθεί και μελετηθεί και άλλοι πολυμορφισμοί, σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές. Ο πολυμορφισμός A588T παραδείγματος χάριν στο εξόνιο 12, προκαλεί και αυτός μια αλλαγή στη σταθερότητα και στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Tanimoto et al. 2003). Σε μελέτες που έγιναν

βρέθηκε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, και μεγαλύτερη συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου A σε ψωριασικά άτομα σε σχέση με μη προσβεβλημένα άτομα (Wang X. et al, 2011). Και αυτός ο πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αρκετών παθήσεων, κυρίως διάφορων ειδών καρκίνου (Wang X. et al, 2011). Το γεγονός ότι ο πολυμορφισμός C1772T δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση της ψωρίασης, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο μιας πιθανής συσχέτισης ενός άλλου πολυμορφισμού του *HIF-1α* με την εμφάνιση της νόσου.

Στο ψωριασικό δέρμα εκτός από τον παράγοντα HIF-1α, είδαμε ότι και άλλοι προαγγειογενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον HIF-1α είναι αυξημένοι. Αρκετοί πολυμορφισμοί αυτών των παραγόντων έχουν συσχετιστεί με την ασθένεια της ψωρίασης. Με μελέτες σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση και μη προσβεβλημένων ατόμων, διαπιστώθηκε ότι οι πολυμορφισμοί στις κυτταροκίνες IL-6 και IL-10 στις θέσεις -174 και -1082 αντίστοιχα, καθώς και ο πολυμορφισμός στη θέση -308 του παράγοντα TNF-α, σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση εκδήλωσης της νόσου (Ahmad et al. 2011). Συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός του παράγοντα TNF-α έχει συσχετιστεί σημαντικά με την εξέλιξη της ψωριασικής αρθρίτιδας. Τα επίπεδα έκφρασης του TNF-α είναι αυξημένα στους ασθενείς με ψωρίαση και ήδη θεραπεία με ανταγωνιστές του παράγοντα TNF-α, έχει δείξει θετικά αποτελέσματα (Balding et al. 2003).

Οι πολυμορφισμοί του *HIF-1α* βρίσκονται υπό μελέτη, με σκοπό μια πιθανή συσχέτιση με την ασθένεια της ψωρίασης και την ανάδειξη έτσι ενός θεραπευτικού σχήματος, για κάθε ασθενή με ψωρίαση, μειώνοντας το κόστος της θεραπείας αλλά και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Η παρούσα μελέτη βάζει τις βάσεις για αυτόν τον σκοπό, καθιστώντας αναγκαία τη συνέχιση και την επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με ψωρίαση από όλες τις περιοχές της Ελλάδας.

Βιβλιογραφία

1. Ahmad A Settin, Hanaa A Hassan, and Tahia A Hassan. (2011). Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile delta of Egypt, *Indian J Dermatol.* 2011 May-Jun; 56(3): 272–277.
2. Angélica Reynoso-Roldán, Maria L. Roldán, Juan C. Cancino-Diaz, Sandra Rodríguez-Martínez, Mario E. Cancino-Diaz. (2012). Vascular endothelial growth factor production is induced by histone deacetylase 1 and suppressed

- by von Hippel-Lindau protein in HaCaT cells. *Clinical and Investigative Medicine* 32(6):982-6.
3. Balding Joanna, Kane David, Wendy Livingstone, Lesley Mynett-Johnson, Barry Bresnihan, Owen Smith, Oliver FitzGerald. (2003). Cytokine gene polymorphisms: Association with psoriatic arthritis susceptibility and severity.
 4. Barker JN, Jones ML, Swenson CL, Sarma V, Mitra RS, Ward PA, Johnson KJ, Fantone JC, Dixit VM, Nickoloff BJ. (1991). Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *Journal of Immunology* 15,146(4):1192-7.
 5. Bhalerao J. and Bowcock A., (1998), The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system, *Hum. Mol. Genet.* 7:1537–1545.
 6. Bowcock A. & Krueger J. (2005) Review. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Wien Klin Wochenschr* 114(12):433-437.
 7. Christian Wolf, Martin Burgener, Philipp Hübner, Jürg Lüthy. (2000). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species *Autoimmunity* 42(7):574–9.
 8. Chun-shui Yu. (2011). Study on HIF-1 α Gene Translation in Psoriatic Epidermis with the Topical Treatment of Capsaicin Ointment.
 9. Chau C., Matthew G. Permenter, Seth M. Steinberg³, Avi S. Retter, William L. Dahut, Douglas K. Price, William D. Figg. (2005). Polymorphism in the Hypoxia-Inducible Factor 1 α Gene May Confer Susceptibility to Androgen-Independent Prostate Cancer. *Eur J Radiol.* 27 (1):S18-24.
 10. Detmar M., Brown L.F., Claffey K.P. *et al.* (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.* 180, 1141–1146.
 11. Farber EM, Nall L. Genital psoriasis. (1992). Oral lesions in patients with psoriasis: a controlled study. *Cutis* 50(4):263-6.
 12. Fee D, Grzybicki D, Dobbs M, Ihyer S, Clotfelter J, Macvilay S, Hart MN, Sandor M, Fabry Z. (2000). Interleukin 6 promotes vasculogenesis of murine brain microvessel endothelial cells. *Cytokine* 12(6):655-65.
 13. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9(6):669-76.
 14. Ferrandiz C., Pujol RM., Garcia-Patos V., Bordas X., Smandia JA., (2002), Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain, *J. Am. Acad. Dermatol.* 46:867–73.
 15. Green MS, Prystowsky JH, Cohen SR, Cohen JI, Lebwohl MG. Infectious complications of erythrodermic psoriasis. (1996). *Journal of the American Academy of Dermatology* 34(5 Pt 2):911-4.

16. Gelfand JM., Troxel AB., Lewis JD., Kurd SK., Shin DB., Wang X., Margolis DJ., Strom BL. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Archives of Dermatological* 143(12):1493-9.
17. Griffiths C. E., Christophers E., Barker J. N., Chalmers R. J., Chimenti S., Krueger G. G., Leonardi C., Menter A., Ortonne J. P. and Fry L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology* 156, 258–262.
18. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. (2004). Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135(1):1-8.
19. Hamid R Rezvani, Nsrein Ali, Lars J Nissen, Ghida Harfouche, Hubert de Verneuil, Alain Taïeb and Frédéric Mazurier. (2011). HIF-1 α in Epidermis: Oxygen Sensing, Cutaneous Angiogenesis, Cancer, and Non-Cancer Disorders. *Eur J Radiol.* 27 (1):S18-24.
20. Heidenreich Regina, Martin Rocken and Kamran Ghoreschi. (2009). Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. Review article from *International Journal of Experimental Pathology* 90:232-248.
21. Higgins E. (2000). Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 25(2):107-10.
22. Ioannou M, Sourli F, Mylonis I, Barbanis S, Papamichali R, Kouvaras E, Zafiriou E, Siomou P, Klimi E, Simos G, Roussaki-Schulze AV, Koukoulis G. (2009). Increased HIF-1 alpha immunostaining in psoriasis compared to psoriasiform dermatitides. *J Cutan Pathol.* 36(12):1255-61
23. Jennifer E. Ziello, Ion S. Jovin, and Yan Huang (2007) Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J Biol Med.* Jun 2007; 80(2): 51–60.
24. John W Melski, Robert S Stern, (1981), The separation of Susceptibility to Psoriasis from Age to Onset, *Journal of Investigative Dermatology* 2(1):41-7.
25. Krueger J G, Bowcock A. (2005). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. Published by group.bmj.com
26. Langley RG., Krueger GG., Griffiths CE., (2005), Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life, *Ann. Rheum. Dis.* 64 Suppl. 2:ii18-23.
27. Lowes MA., Bowcock AM., Krueger JG. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-73.
28. Marcus Schmitt-Egenolf, Wolf-Henning Boehncke, Markward Ständer, Thomas H Eiermann and Wolfram Sterry.(1993).Oligonucleotide Typing Reveals Association of Type I Psoriasis with the HLA-DRB1*0701/2, -DQA*0201, -DQB1*0303 Extended Haplotype.
29. Martin Ollerenshaw, Toby Page, John Hammonds, Andrew Demaine. (2004). Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1 α gene (*HIF1A*) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *BMC Dermatol.* 5: 9.

30. Maxwell PH. (2005). Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol.* 90(6):791-7.
31. Melski JW., Stern RS., (1981). The separation of susceptibility to psoriasis from age of onset, *J. Invest. Dermatol.* 77:474.
32. Mohammad El-Darouti, M.D. and Rania Abdel Hay, M.D. (2010). Psoriasis: Highlights on Pathogenesis, Adjuvant Therapy and Treatment of Resistant and Problematic Cases (Part I). *International Journal of Dermatology* 44, 81–82
33. Mrowietz U., Kragballe K. Reich K., Spuls P., Griffiths C. E. M., Nast A., Franke J., Antoniou C., Arenberger P., Balieva F. (2011). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Archives of Dermatological Research* 303:1-10.
34. Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Volume 155, 1987, Pages 335–350.*
35. Nestle F., Kaplan D. and Barker J., (2009), Psoriasis, *Mechanisms of Disease, N. Engl. J. Med.* 361:496-509.
36. Nickoloff BJ, Nestle FO. (2004). Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 113(12):1664 -75.
37. Norihiro Yamada, Yukio Horikawa, Naohisa Oda, Katsumi Iizuka, Nobuyuki Shihara, Shoji Kishi, and Jun Takeda. (2005). Genetic Variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1, Gene Is Associated with Type 2 Diabetes in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(10):5841–5847
38. Pengfei He, Jiajia Liu, Dongjuan Liu, Xin Zhao, Ting Hu, Lu Jiang, Hongxia Dan, Xin Zeng, Jing Li mail, Jiayi Wang mail, Qianming Chen. (2013). The Association between Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene C1772T Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis of 37 Case-Control Studies. DOI: 10.1371/journal.pone.0083441.
39. Piskin G., Koomen CW., Picavet D., Bos JD., Teunissen MB. (2003). Ultraviolet-B irradiation decreases IFN-g and increases IL-4 expression in psoriatic, lesional skin in situ and in cultured dermal T cells derived from these and lesions. *Exp Dermatol* 2003; 12: 172–180.
40. Putra AC, Tanimoto K, Arifin M, Hiyama K. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.01972.x
41. Rajan P. Nair, Philip Stuart, Tilo Henseler, Stefan Jenisch, Nicholas V.C. Chia, Eckhard Westphal, Nicholas J. Schork, Jane Kim, Henry W. Lim, Enno Christophers, John J. Voorhees, James T. Elder, (2000), Localization of Psoriasis-Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric to HLA-C. *ScienceDirect. Journal of American Science* 66:374-380.

42. Rosenberger Christian, Caius Solovan, Alina D. Rosenberger, Li Jinping, Regina Treudler, Ulrich Frei, Kai-Uwe Eckardt and Lawrence F. Brown. (2007). Upregulation of Hypoxia-Inducible Factors in Normal and Psoriatic Skin. *J Autoimmun.* 28(2-3):122-8.
43. Simonetti O, Lucarini G, Goteri G, et al. (2006). VEGF is likely a key factor in the link between inflammation and angiogenesis in psoriasis: results of an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; 19(4): 751.
44. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M. (2003). Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Mol Cell Biol.* 23(19): 6739–6749.
45. Tovar-Castillo LE, Cancino-Díaz JC, García-Vázquez F, Cancino-Gómez FG, León-Dorantes G, Blancas-González F, Jiménez-Zamudio L, García-Latorre E, Cancino-Díaz ME. (2007). Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1alpha, LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *Int J Dermatol.* 46(3):239-46.
46. Vasilopoulos Yiannis, Sourli Fani, Zafiriou Efterpi, Klimi Eleni, Ioannou Maria, Mamuris Zissis, Simos George, Koukoulis Giorgos, Roussaki-Schulze Angeliki (2013). High serum levels of HIF-1a in psoriatic patients correlate with an over-expression of IL-6. *Cytokine* (in press).
47. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. (2004). New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1061.
48. Wang X, Liu Y, Ren H, Yuan Z, Li S, Sheng J, Zhao T, Chen Y, Liu F, Wang F, Huang H, Hao J. (2011). Polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1α gene confer susceptibility to pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 12(5):383-7
49. Westra Johanna , Brouwer Elisabeth , van Roosmalen Ingrid AM. , Doornbos-van der Meer Berber, van Leeuwen Miek A, Posthumus Marcel D., Kallenberg Cees GM. (2010). Expression and regulation of HIF-1alpha in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC Musculoskelet Disord.* 11: 61.
50. Fitzpatrick T. (2003). Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης. Κλινική Δερματολογία
51. Thompson & Thompson. R.L Nussbaum, R.R McInnes, H.F. Willard. Εκδόσεις Πασχαλίδης. Ιατρική Γενετική
52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
53. www.psoriasis.org/webcasts