



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή εργασία

**«Φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου της ιντερλευκίνης
17 σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό»**

**"Pharmacogenetic study of the interleukin 17 gene in
patients with psoriasis in the Greek population"**



Φιλιππούλου Χρύσα

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Καλλιόπη Λιαδάκη

ΛΑΡΙΣΑ , 2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, ΤΒΒ, Π.Θ.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες,	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
Ψωρίαση.....	8
1.1.1. Επιδημιολογία της ψωρίασης.....	8
1.1.2. Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία— Κλινικά χαρακτηριστικά ψωρίασης	8
1.1.3. Αίτια εκδήλωσης	9
1.1.3.α Κληρονομικότητα.....	9
1.1.3.β. Εκλυτικοί παράγοντες.....	10
1.1.4. Ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης.....	11
1.1.5. Διάγνωση και αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου.....	12
1.1.6. Τρόποι αντιμετώπισης και θεραπεία	13
1.1.6.α. Τοπική θεραπεία.....	14
1.1.6.β. Φωτοθεραπεία	14
1.1.6.γ. Συστηματική θεραπεία.....	14
1.2.1. Μεθοτρεξάτη.....	15
1.2.2 Ρετινοειδή.....	15
1.2.3 Κυκλοσπορίνη.....	16
1.3 Βιολογικοί παράγοντες – μονοκλωνικά αντισώματα.....	17
1.3.1 TNF και αναστολείς του TNF.....	17
1.3.2 Απρεμιλάστη	18
1.3.3 Αντισώματα έναντι της ιντερλευκίνης 17.....	18
1.3.4. Σεκουκινουμάμπη.....	19
1.4. Φαρμακογενετική.....	20
1.4.1 Εξατομικευμένη θεραπεία	21
1.4.2. Στόχοι φαρμακογενετικής σε ασθενείς με ψωρίαση.....	22
1.4.3. Φαρμακογενετικές μελέτες στη συστηματική θεραπεία.....	22
ΣΚΟΠΟΣ	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	26
2.1.1. Δείγματα ασθενών	26

2.1.2 Χημικά.....	26
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ανθρώπινο αίμα	26
2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)	28
2.3.2.α Αρχή της μεθόδου-Στάδια της PCR	28
2.3.2.β. Πειραματική διαδικασία.....	29
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
2.3.3.α Αρχή της μεθόδου.....	31
2.3.3.β.Αντιδραστήρια	32
2.3.3.γ. Πειραματική διαδικασία.....	32
2.3.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	34
2.3.5. Αλληλούχιση των προϊόντων PCR.....	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	35
3.1. Ενίσχυση της υπό μελέτης περιοχής του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17A με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	35
3.2. Αλληλούχιση δειγμάτων και ανίχνευση πολυμορφισμών	36
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψη της, καθώς και για την εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου. Η βοήθεια και η καθοδήγησή της για την επίλυση διάφορων θεμάτων ήταν πολύτιμη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την κυρία Σαραφίδου Θεολογία, Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και τον κύριο Μαμούρη Ζήση, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος, θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, βοηθώντας με τον τρόπο τους να ολοκληρώσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους μου μέχρι τώρα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια αυτοάνοση δερματοπάθεια που επηρεάζει το δέρμα και τις αρθρώσεις και προσβάλλει το 1-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Χαρακτηρίζεται από κόκκινες, λεπιδώδεις κηλίδες που ονομάζονται ψωριασικές πλάκες. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπισή της νόσου ποικίλλουν και επιλέγονται ανάλογα με τη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Διακρίνονται στην τοπική θεραπεία, τη φωτοθεραπεία και τη συστηματική θεραπεία καθώς και τη πιο σύγχρονη προσέγγιση των βιολογικών παραγόντων. Ωστόσο, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν ετερογένεια στην απόκριση στη θεραπεία, η οποία να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Η σεκουκινουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που χορηγείται για την αντιμετώπιση της ψωρίασης. Συνδέοντας ειδικά με την IL-17A, εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της, αναστέλλοντας έτσι τη δράση της στα κερατινοκύτταρα οδηγώντας κατά συνέπεια στην μείωση των συμπτωμάτων της νόσου. Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν φαρμακογενετικές μελέτες που αφορούν στην απόκριση ασθενών με ψωρίαση στην σεκουκινουμάμπη. Στο πλαίσιο μιας ευρύτερης φαρμακογενετικής μελέτης για την απόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί Rs4711998, Rs8193036, Rs3819024 και Rs2275913 του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17A. Συγκεκριμένα, στόχος της εργασίας αυτής ήταν να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής της ιντερλευκίνης 17A. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με ψωρίαση και η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα των ασθενών, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και την αλληλούχιση των προϊόντων. Η γονοτύπηση οδήγησε στην ταυτοποίηση τόσο ομόζυγων, όσο και ετερόζυγων ατόμων για τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς. Η παρούσα εργασία θα πρέπει να εφαρμοστεί μελλοντικά σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ώστε να αποτελέσει την πρώτη φαρμακογενετική μελέτη για την απόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic autoimmune, skin disorder that affects the skin and joints and affects 1-3% of the world's population. It is characterized by red, scaled patches called psoriatic plaques. The treatment approaches vary and are selected depending on the severity of the patient's clinical picture. They are distinguished in the local treatment, phototherapy and systemic therapy as well as the most modern approach of the biological factors. However, it has been demonstrated that patients exhibit various responses to different drugs, which can be attributed to differences in their genetic background. Secukinumab is a monoclonal antibody that is administered as a treatment for psoriasis. It binds specifically to IL-17A and prevents its interaction with its receptor, thus inhibiting its action on keratinocytes and thereby reducing the disease symptoms. Until now, there are not any pharmacogenetic studies referring the response of patients with psoriasis to secukinumab treatment. In the context of a large pharmacogenetic study regarding the response of patients with psoriasis to secukinumab treatment, in the present study we decided to study the following SNPs of the IL-17A gene: Rs4711998, Rs8193036, Rs3819024 and Rs2275913. Specifically, the aim of the present study was to design primers and optimize the conditions for the amplification of the specific region of IL-17A which includes the selected SNPs. We used 10 patients, which have been diagnosed with psoriasis and the genotyping was performed from DNA isolated from peripheral blood, using polymerase chain reaction and direct sequencing. We identified patients, which were homozygous for both alleles as well as heterozygous. In the future the present study needs to be applied to a larger number of patients, in order to be the first pharmacogenetic study on the response of psoriasis patients to secukinumab therapy.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια, αυτοάνοσης αιτιολογίας που προκαλείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Προσβάλλει κυρίως το δέρμα αλλά και τις αρθρώσεις, χαρακτηρίζεται από ερυθρηματώδεις κηλίδες, βλατίδες και πλάκες, οι οποίες καλύπτονται από αργυρόχροα λέπια. Η κλασική εντόπιση των βλαβών είναι στους αγκώνες και στα γόνατα. Έχει χαρακτηριστεί ως πολυπαραγοντικό νόσημα καθώς η εκδήλωσή του οφείλεται τόσο στο γενετικό υπόβαθρο όσο και στο περιβάλλον του ασθενούς (Camisa, 2004) .

1.1.1. Επιδημιολογία της ψωρίασης

Η ψωρίαση δεν είναι μεταδοτικό νόσημα, δηλαδή δεν μεταδίδεται μετά από την επαφή με το δέρμα ή τα ρούχα του πάσχοντος, ούτε είναι αποτέλεσμα κακής προσωπικής υγιεινής. Η ψωρίαση, όπως πολλές παθήσεις όχι μόνο του δέρματος αλλά και άλλων οργάνων, είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού γενετικής προδιάθεσης και διαταραχής της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Προσβάλλει το 1-3% του παγκόσμιου πληθυσμού, τόσο γυναίκες όσο και άντρες, και παρότι δεν είναι μια θανάσιμη ασθένεια, φέρει σοβαρό ψυχολογικό αντίκτυπο στους ασθενείς αλλά και στην καθημερινότητά τους. Στην Ελλάδα οι πάσχοντες/ουσες φθάνουν στις 200.000. (Kouris, Christodoulou, & et al, 2015)

1.1.2. Ταξινόμηση με βάση την μορφολογία— Κλινικά χαρακτηριστικά ψωρίασης

Υπάρχουν έξι, κυρίως, διαφορετικές μορφές της ψωρίασης:

1. Η «κοινή» ψωρίαση, ή ψωρίαση κατά πλάκας,
2. Η σταγονοειδής ψωρίαση,
3. Η ανάστροφη ψωρίαση,
4. Η φλυκταινώδης ψωρίαση,
5. Η ερυθροδερμική ψωρίαση,
6. Η ψωριασική αρθρίτιδα (αρθροπαθητική ψωρίαση)

Η συχνότερη μορφή της ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας. Περίπου το 80% των ασθενών πάσχει από αυτήν, η οποία χαρακτηρίζεται από σαφώς περιγεγραμμένες ερυθρές πλάκες που καλύπτονται από αργυρόχροα λέπια (Εικόνα 1). Η ψωρίαση κατά πλάκας ενδέχεται να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος, ωστόσο τα γόνατα, οι αγκώνες, το τριχωτό της κεφαλής και ο κορμός αποτελούν εκλεκτικές εντοπίσεις της μορφής αυτής. Η σταγονοειδής ψωρίαση είναι η δεύτερη συχνότερη μορφή, υπολογιζόμενη στο 18% των περιπτώσεων της νόσου. Προσβάλλει, συχνότερα, παιδιά και νέους ενήλικες και χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες μικρές, ερυθρές, μεμονωμένες σταγονοειδείς πλάκες στο δέρμα. Η ανάστροφη ψωρίαση εμφανίζεται

κυρίως στις μηρογεννητικές πτυχές και στις μασχालιαίες κοιλότητες, ενώ η φλυκταινώδης και η ερυθροδερμική ψωρίαση μπορεί να προσβάλουν εκτεταμένες περιοχές του δέρματος και να συνοδεύονται από γενικά συμπτώματα, όπως υψηλό πυρετό. Λιγότερο συχνά η ψωρίαση προσβάλλει τους όνυχες και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας και των γεννητικών οργάνων. Η ψωριασική αρθρίτιδα αποτελεί μια ξεχωριστή μορφή ψωρίασης, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη κλινικών εκδηλώσεων αρθρίτιδας και προσβάλλει περίπου 1/1000 ανθρώπους του γενικού πληθυσμού. Η έναρξη, πολύ συχνά, παρουσιάζεται μεταξύ των ηλικιών 20 και 50 ετών, με μέση ηλικία έναρξης τα 38 έτη. Το 10-30% των ασθενών με ψωρίαση, ανεξάρτητα από το μέγεθος της προσβεβλημένης επιφάνειας, αναπτύσσουν ψωριασική αρθρίτιδα σε διάστημα 1-10 ετών μετά την εμφάνιση της δερματικής βλάβης. (Camisa, 2004).



Εικόνα 1: Ασθενείς με ψωρίαση

1.1.3. Αίτια εκδήλωσης

Η ακριβής αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα αλλά έχει συσχετισθεί με την κληρονομικότητα και άλλους εκλυτικούς παράγοντες.

1.1.3.α Κληρονομικότητα

Ως πολυπαραγοντικό νόσημα πιστεύεται ότι κληρονομείται μια προδιάθεση για την εμφάνιση της ψωρίασης. Το 1/3 των ασθενών με ψωρίαση έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό, με ένα ή περισσότερα μέλη της οικογένειας τους να πάσχουν από κάποια μορφή της νόσου. Δηλαδή, η ψωρίαση δεν είναι κληρονομική με την έννοια της άμεσης μετάδοσης από τους γονείς στα παιδιά, αλλά με την έννοια της αυξημένης πιθανότητας να εκδηλωθεί στα παιδιά, όταν πάσχουν οι γονείς. Έτσι, η πιθανότητα να εμφανιστεί ψωρίαση στο πρώτο παιδί από ένα γονέα που πάσχει από ψωρίαση ανέρχεται στο 10%

(συγκριτικά με το 1-3%) του γενικού πληθυσμού, ενώ εάν και οι δύο γονείς πάσχουν η πιθανότητα αυτή φθάνει περίπου στο 30% (Generali & et al, 2017). Σε άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι στα παιδιά που προέρχονται από διαφορετικά ωάρια, το ποσοστό εμφάνισης της ψωρίασης φθάνει το 22%, ενώ στα δίδυμα που προέρχονται από το ίδιο ωάριο, το ποσοστό αγγίζει το 72%. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στα δίδυμα που προέρχονται από το ίδιο ωάριο, η νόσος έχει την τάση να εμφανίζεται ίδια ως προς την έναρξη, τη σοβαρότητα και την πορεία (Mahil, Capon, & Barker, 2015).

Η γενετική σύνδεση είναι η τάση που έχουν συγκεκριμένες θέσεις στα χρωμοσώματα ή συγκεκριμένα αλληλόμορφα γονίδια να κληρονομούνται μαζί. Οι γενετικές θέσεις που βρίσκονται κοντά ή μια στην άλλη στο ίδιο χρωμόσωμα έχουν την τάση να μην διαχωρίζονται κατά την μείωση και είναι γενετικά συνδεδεμένες. Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης (linkage studies) μπορούν να προσδιορίσουν τις περιοχές του γονιδιώματος που προσδίδουν ευαισθησία στην εκδήλωση συγκεκριμένων ασθενειών (Dawn Tear & Barrett, 2005). Μελέτες γενετικής σύνδεσης για την ψωρίαση οδήγησαν στην ταυτοποίηση τουλάχιστον εννέα χρωμοσωμικών τμημάτων (γενετικών τόπων) που συνδέονται με την ψωρίαση (Psoriasis Susceptibility 1-9, PSORS1-9) (Tang & et al, 2013). Η *PSORS1*, μία περιοχή 220 kb του χρωμόσωματος 6p21.3 αποδείχθηκε ότι προσδίδει τον μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης ψωρίασης. Η περιοχή *PSORS1* περιέχει τα υποψήφια γονίδια *human leukocyte antigen C (HLA-C)*, *coiled-coil-a-helical rod protein (CCHCR1)*, και *corneodesmosin (CDSN)*. Το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* σχετίζεται με την ψωρίαση σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να είναι το κύριο υπεύθυνο αλληλόμορφο στο *PSORS1* που προσδίδει την ευαισθησία στην ψωρίαση (Nair & et al, 2006). Το *HLA-C* κωδικοποιεί ένα μόριο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I που εκφράζεται σε αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των CD81 T-κυττάρων, υπογραμμίζοντας έτσι τη σημασία της ανοσολογικής απορρύθμισης στην παθογένεση της ψωρίασης. Επίσης, έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί που επηρεάζουν την έκφραση του *HLA-Cw6* που πιθανώς σχετίζονται με την εκδήλωση της ψωρίασης. (Mahil, Capon, & Barker, 2015)

1.1.3.β. Εκλυτικοί παράγοντες

Οι διάφοροι παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την «πυροδότηση» της εκδήλωσης της νόσου είναι οι ακόλουθοι:

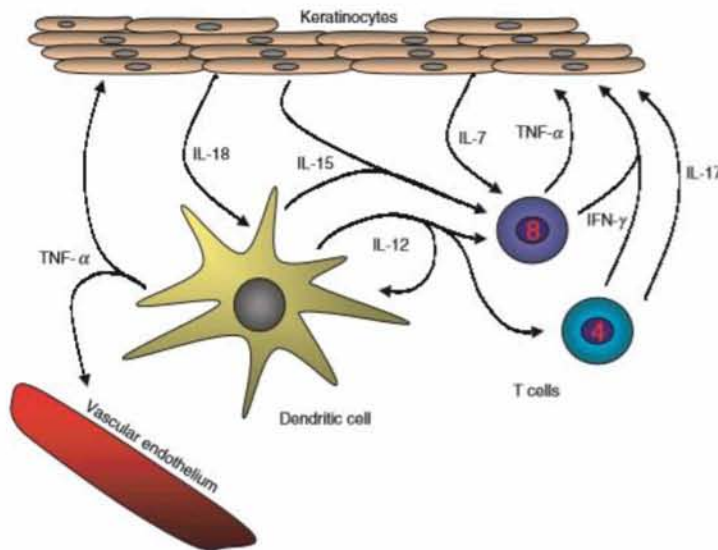
1. Λοιμώξεις: Ο ρόλος των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων (αμυγδαλίτιδες) εμπλέκεται σε ορισμένες παιδικές μορφές της νόσου (σταγονοειδής μορφή).
2. Τραυματισμοί: Τραύματα κάθε είδους (φυσικά, χημικά) μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση ψωριασικών πλακών.
3. Ενδοκρινικοί παράγοντες: Διαταραχές στη λειτουργία της υπόφυσης, του θύμου, του θυρεοειδούς ή των επινεφριδίων, καθώς και η υπογλυκαιμία μερικές φορές επιταχύνουν την εμφάνιση βλαβών της νόσου.

4. Υπεριώδης ηλιακή ακτινοβολία: Συνήθως το ηλιακό φως δρα ευεργετικά στην ψωρίαση, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις που μπορεί να αποτελέσει εκλυτικό παράγοντα για την εμφάνιση της νόσου.
5. Ψυχογενείς παράγοντες: Οι νευροψυχικές διαταραχές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου καθώς μπορεί να εμφανισθεί ή να επιδεινωθεί μετά από ένα έντονο ψυχικό τραύμα.
6. Χορήγηση ορισμένων φαρμάκων όπως αντικαταθλιπτικά και β-αναστολείς (Chandran & Raychaudhuri, 2010).

1.1.4. Ανοσοπαθγένεια της ψωρίασης

Το δέρμα αποτελείται από 3 στοιβάδες: την εξωτερική στοιβάδα ή επιδερμίδα, την ενδιάμεση στοιβάδα ή χόριο, και την εσωτερική στοιβάδα ή υποδερμίδα. Η επιδερμίδα, με τη σειρά της, αποτελείται από 4 στοιβάδες: τη βασική, την ακανθωτή, την κοκκώδη και την κεράτινη στοιβάδα. Η επιδερμίδα ανανεώνεται συνεχώς ανά 45 περίπου ημέρες, δηλαδή ένα κύτταρο της βασικής στοιβάδας μεταμορφώνεται και φθάνει τελικά στην κεράτινη στοιβάδα, απ' όπου αποβάλλεται στο περιβάλλον εντός του χρονικού αυτού διαστήματος. Στην ψωρίαση ο χρόνος ζωής του κυττάρου της επιδερμίδας μειώνεται δραματικά και φθάνει τις 4 ημέρες, δηλαδή τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται με πολύ εντονότερο από τον φυσιολογικό ρυθμό (Camisa, 2004). Η δεύτερη κύρια στιβάδα του δέρματος, το χόριο, βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα. Είναι πολύ παχύτερη από την επιδερμίδα και αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Διαιρείται σε δύο υποστιβάδες, τη θηλώδη, η οποία περιέχει το αγγειακό δίκτυο και τη δικτυωτή, στην οποία βρίσκονται τριχοφυείς αδένες, θύλακες των τριχών και εκκριτικοί αδένες. Είναι το σημείο όπου εντοπίζεται μεγάλος αριθμός μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων (DCs) και T λεμφοκυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα λειτουργούν ως αντιγόνο-παρουσιαστικά και ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους εξέρχονται των αγγείων και προκαλούν διαταραχές λειτουργίας στα κύτταρα της επιδερμίδας και πιο συγκεκριμένα την υπέρμετρη αύξηση των κερατινοκυττάρων. Προκειμένου τα T λεμφοκύτταρα να ασκήσουν αυτές τις επιδράσεις στα κύτταρα της επιδερμίδας ενεργοποιούνται από τα κύτταρα του Langerhans, τα οποία βρίσκονται στην επιδερμίδα και διεγείρονται με τη σειρά τους από άγνωστα αντιγόνα, μηχανικούς ερεθισμούς, εκκριτικές ουσίες των νευρικών απολήξεων στο δέρμα και άλλους παράγοντες. Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα ασκούν τις δράσεις τους απελευθερώνοντας ορισμένες ουσίες (Εικόνα 2), όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF α), η ιντερφερόνη γ (IFN- γ) και διάφορες ιντερλευκίνες. Οι κυτοκίνες IL-12, IFN- γ και TNF α κυριαρχούν στις ψωριασικές αλλοιώσεις. Η IFN- γ παράγεται από τα CD4+ και τα CD8+-T κύτταρα και παίζει κεντρικό ρόλο στην ψωρίαση (Ghoreschi & et al, 2007). Τα DCs και τα κερατινοκύτταρα μπορούν επίσης να παράγουν μεγάλες ποσότητες άλλων κυτοκινών και χημειοκινών. Έτσι, οι IFN- γ και TNF α μπορούν να επάγουν τα κερατινοκύτταρα ώστε να παράγουν IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, TNF α και ένα πλήθος άλλων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Η IL-18 δρα επί των DCs σε

συνεργασία με την IL-12, η οποία επίσης παράγεται από τα DCs, αυξάνοντας έτσι σημαντικά την παραγωγή IFN- γ . Η IL-17, η οποία παράγεται από ενεργοποιημένα CD4+T κύτταρα συνεργάζεται με την IFN- γ για να ενισχύσει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών από τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των IL-6 και IL-8, αυξάνοντας έτσι την εισροή T κυττάρων στο δέρμα (Elder & et al, 2010). Με αυτό τον τρόπο το δίκτυο κυτοκινών στην ψωρίαση μπορεί να γίνει μια αυτοδύναμη διαδικασία. Οι αυτοκρινείς TNF α , IL-20, IFN- γ και άλλες κυτοκίνες προκαλούν τον υπερ-πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και η IFN- γ και IL-15 αυξάνουν την αποπτωτική αντίσταση των κερατινοκυττάρων. Οι χημειοκίνες, που παράγονται από τα κερατινοκύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα και η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και άλλων κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που δημιουργούνται κατά την ψωρίαση, μπορεί να εξηγήσει τα περισσότερα από τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, την αυξημένη αγγειογένεση και τη φλεγμονή (Gudjonsson & al, 2004).



Εικόνα 2: Το δίκτυο κυτοκινών που εμπλέκονται στην ψωρίαση.

1.1.5. Διάγνωση και αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου

Η διάγνωση γίνεται κατά την κλινική εξέταση του δέρματος που έχει προσβληθεί από τη νόσο, καθώς οι ψωριασικές βλάβες είναι χαρακτηριστικές ως προς τη μορφολογία και την εντόπισή τους. Αν όμως η νόσος εξελίσσεται, ή μεταβάλλεται σε μία άλλη μορφή, ή συνοδεύεται με άλλες καταστάσεις, απαιτείται ιστολογική εξέταση του προσβεβλημένου δέρματος (βιοψία). Στην ψωριασική αρθρίτιδα είναι πολύ χρήσιμες και οι ακτινογραφικές απεικονίσεις. Για την αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου υπάρχουν τρία σημαντικά εργαλεία: το ερωτηματολόγιο Dermatology Life Quality Index (DLQI), ο δείκτης PASI (Psoriasis Area and Severity Index) και η αξιολόγηση PGA (Physician Global Assessment). Μία ευρεία συνολική εκτίμηση της νόσου και η επίδρασή της στην

ποιότητα ζωής των ασθενών χρησιμοποιούνται για να εκτιμηθεί η σοβαρότητα της ασθένειας των ασθενών και η ανταπόκρισή τους στη θεραπεία. Το DLQI είναι ένα απλό επικυρωμένο ερωτηματολόγιο το οποίο χρησιμοποιείται σε περισσότερες από 40 διαφορετικές παθήσεις του δέρματος. Αποτελείται από 10 ερωτήσεις που αφορούν την αντίληψη των ασθενών σχετικά με τον αντίκτυπο των δερματικών παθήσεων σε διάφορες πτυχές της ποιότητας ζωής τους την τελευταία εβδομάδα. Τα αντικείμενα του DLQI περιλαμβάνουν πτυχές όπως συμπτώματα και συναισθήματα, καθημερινές δραστηριότητες, αναψυχή, εργασία ή σχολείο, προσωπικές σχέσεις και παρενέργειες της θεραπείας. Το DLQI μπορεί να χρησιμοποιηθεί από κλινικούς ιατρούς προκειμένου να βοηθήσει στην σωστή κλινική διαβούλευση, αξιολόγηση και κλινική διαδικασία λήψης αποφάσεων (Basra & et al, 2008). Τα βασικά χαρακτηριστικά των αλλοιώσεων της ψωρίασης - κοκκινίλα, πάχος και φουσκάλες - παρέχουν ένα μέσο αξιολόγησης της σοβαρότητας της νόσου. Το πρότυπο μέσο για την εκτίμηση της σοβαρότητας της ψωρίασης είναι ο δείκτης PASI. Ο PASI είναι ένα μέτρο της μέσης ερυθρότητας, του πάχους και της όψης των βλαβών (καθένα βαθμολογείται σε κλίμακα 0-4). Ένα άλλο βασικό μέτρο που χρησιμοποιείται στις κλινικές δοκιμές της ψωρίασης είναι η γενική αξιολόγηση PGA. Υπάρχουν δύο κύριες μορφές: η στατική μορφή, η οποία μετρά την εντύπωση του γιατρού για τη νόσο σε ένα μόνο εντοπισμένο σημείο και η δυναμική μορφή στην οποία ο γιατρός εκτιμά την συνολική βελτίωση του ασθενούς σε σχέση με την αρχική εικόνα. Ο δείκτης PASI είναι το πρότυπο για την αξιολόγηση της σοβαρής ψωρίασης αλλά και η PGA χρησιμοποιείται ευρέως. Για τους ασθενείς με σοβαρή ψωρίαση, οι κλινικοί ιατροί συνήθως θεωρούν ότι τουλάχιστον 75% βελτίωση της νόσου είναι μια κλινικά σημαντική βελτίωση ενδεικτική της επιτυχίας της θεραπείας. Αυτό μεταφράζεται σε βελτίωση κατά 75% στην βαθμολογία PASI. Ωστόσο, είναι σαφές ότι ασθενείς με πολύ χαμηλότερες βελτιώσεις στην βαθμολογία PASI μπορούν επίσης να έχουν κλινικά σημαντική βελτίωση της νόσου (Feldman & Krueger, 2005).

1.1.6. Τρόποι αντιμετώπισης και θεραπεία

Δεν υπάρχει ακόμα η θεραπεία για την πλήρη ίαση της ψωρίασης, αλλά έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεραπείες για την αντιμετώπισή της. Οι θεραπείες εξαρτώνται από τη σοβαρότητα της νόσου. Οι κλινικοί γιατροί αρχίζουν συνήθως με ήπια θεραπεία, όπως τοπικές κρέμες που περιέχουν κορτιζόνη ή χρησιμοποιούν φωτοθεραπεία, εκθέτοντας το δέρμα σε ορισμένους τύπους υπεριώδους (UV) φωτός. Αυτές οι θεραπείες μπορούν να συνδυαστούν για να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, ορισμένοι ασθενείς απαιτούν πιο δραστικές παρεμβάσεις, συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων που χορηγούνται είτε από του στόματος είτε ενέσιμα. Τα μη βιολογικά φάρμακα περιλαμβάνουν τη μεθοτρεξάτη, την κυκλοσπορίνη και την ακιτρετίνη. Τα βιολογικά φάρμακα αναπτύχθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία και εγκρίθηκαν για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, όπως η νόσος του Crohn, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα και η ψωρίαση (Weller & Hunter, 2009).

Το ιδανικό θεραπευτικό σχήμα εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, την ταχεία έναρξη δράσης, την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διάρκεια ύφεσης της νόσου που επιτυγχάνεται με τη χορήγηση της αγωγής, καθώς και την ασφάλεια και

ανεκτικότητα της θεραπείας. Η θεραπεία της ψωρίασης είναι εξατομικευμένη, αφού ο κάθε ασθενής διαφέρει στον τύπο, στη σοβαρότητα και στην απόκριση στη θεραπεία. Αυτό οφείλεται στη φύση της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από μια απρόβλεπτη πορεία και αντιμετωπίζεται μόνον εφόσον χορηγηθεί κάποιο φάρμακο σε συγκεκριμένη δόση ή εφαρμόζεται κάποια άλλη θεραπευτική μέθοδος, όπως η φωτοχημειοθεραπεία. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη θεραπευτική επιλογή είναι ο τύπος της ψωρίασης, η σοβαρότητα της νόσου, η εντόπιση του ψωριασικού εξανθήματος, η ηλικία και το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς, η συναισθηματική κατάσταση του σε σχέση με το νόσημα και η επίδραση στην ποιότητα ζωής του (Weller & Hunter, 2009).

1.1.6.α. Τοπική θεραπεία

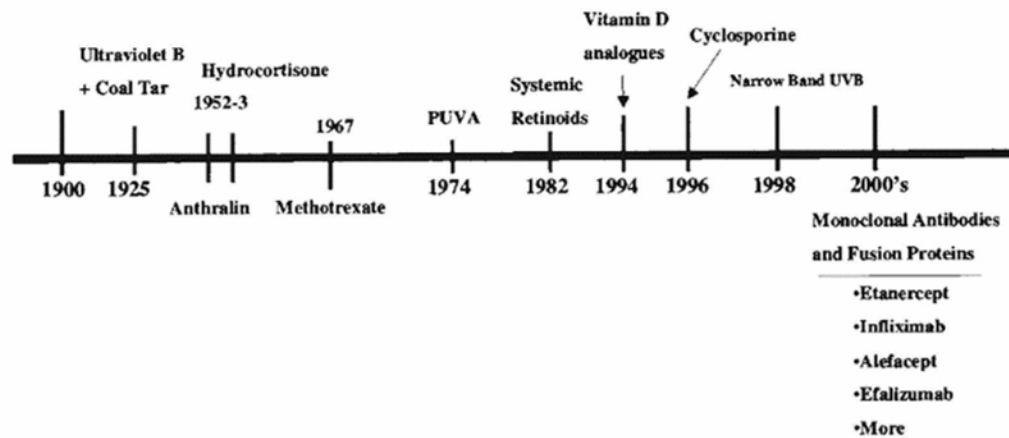
Η τοπική θεραπεία περιλαμβάνει κερατολυτικές και ενυδατικές ουσίες, κορτικοστεροειδή ποικίλης ισχύος, την καλσιποτριόλη, την καλσιποτριόλη σε συνδυασμό με βηταμεθαζόνη, την καλσιτριόλη, την ταζαροτένη και αναστολείς της καλσινευρίνης (π.χ. pimecrolimus και tacrolimus).

1.1.6.β. Φωτοθεραπεία

Η φωτοθεραπεία περιλαμβάνει τις μεθόδους των Goeckerman και Ingram, τη φωτοχημειοθεραπεία με PUVA, ή UVB στενής ή ευρείας δέσμης και τη θεραπεία με ακτίνες Laser.

1.1.6.γ. Συστηματική θεραπεία

Όσον αφορά τη συστηματική θεραπεία, τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται κυρίως ξεκίνησαν με τη χορήγηση της μεθοτρεξάτης το 1967, τη φωτοχημειοθεραπεία το 1974, τα ρετινοειδή 1982, την κυκλοσπορίνη το 1996 και τα φάρμακα νέας γενιάς το 2000 (Εικόνα 3) (Camisa, 2004).



Εικόνα 3: Χρονοδιάγραμμα θεραπευτικής αντιμετώπισης της ψωρίασης

Η συστηματική αγωγή επιλέγεται όταν η απόκριση της νόσου στην τοπική θεραπεία ή φωτοθεραπεία δεν είναι ικανοποιητική, όταν έχει συμπληρωθεί η επιτρεπόμενη δόση υπεριώδους ακτινοβολίας, όταν η νόσος καταλαμβάνει ποσοστό μεγαλύτερο του 15% της επιφάνειας του σώματος, όταν η μορφή της ψωρίασης είναι σοβαρή (φλυκταινώδης, ερυθροδερμική) και, τέλος, όταν η επίδραση της πάθησης στην ποιότητα ζωής είναι σημαντική. Η συστηματική αγωγή έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε θεραπείες μικρής διάρκειας. Σε θεραπείες μεγάλης διάρκειας οι ανεπιθύμητες ενέργειες οδηγούν σε διακοπτόμενη χορήγηση του φαρμάκου, εναλλασσόμενη χορήγηση φαρμάκων ή σε συνδυασμό διαφόρων φαρμάκων. Έχουν εφαρμοστεί διάφοροι συνδυασμοί, όπως κυκλοσπορίνη με μεθοτρεξάτη, ρετινοειδή ή φωτοθεραπεία, ρετινοειδή με φωτοθεραπεία.

1.2.1. Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη (Εικόνα 4) έχει χρησιμοποιηθεί στη δερματολογία για περισσότερο από 50 χρόνια, χωρίς να είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της. Είναι γνωστό ότι η μεθοτρεξάτη μεταφέρεται διαμεμβρανικά εντός του κυττάρου όπου ενεργοποιείται σε μια πολυγλουταμική μορφή και αναστέλλει ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση πουρίνης, πυριμιδίνης και φολικού οξέος και επιπλέον επιδρά στα επίπεδα αδενosίνης. Η μεθοτρεξάτη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κακοηθών κυττάρων με αναστολή της *de novo* σύνθεσης των πουρινών και των πυριμιδινών. Υπάρχουν διάφοροι προτεινόμενοι μηχανισμοί που εξηγούν την αντιφλεγμονώδη δράση της μεθοτρεξάτης, οι περισσότεροι από τους οποίους περιλαμβάνουν την ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων της αδενosίνης, η οποία μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή των λευκοτριενίων και των T κυττάρων (Warren & Griffiths, 2008).

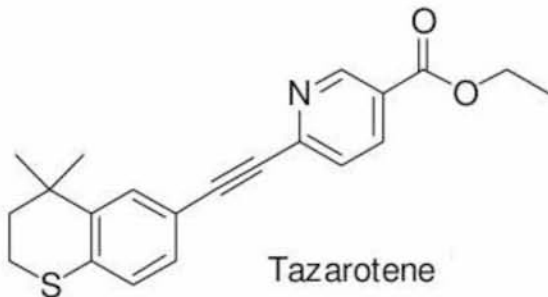


Εικόνα 4: Ο χημικός τύπος της μεθοτρεξάτης

1.2.2 Ρετινοειδή

Ο όρος «ρετινοειδή» χρησιμοποιείται για μια ομάδα ουσιών που αφορούν μόρια που απαντώνται στη φύση και συνθετικά παράγωγα τους που σχετίζονται στενά με τη βιταμίνη Α. Τα συστηματικά ρετινοειδή χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ορισμένων δερματολογικών παθήσεων. Η κυρίαρχη χρήση τους είναι για την θεραπεία της ψωρίασης. Επί του παρόντος, η ακιτρετίνη είναι η κύρια συστηματική θεραπεία ρετινοειδών για την θεραπεία σοβαρής ψωρίασης. Το ταζαροτένιο (Εικόνα 5), ένας

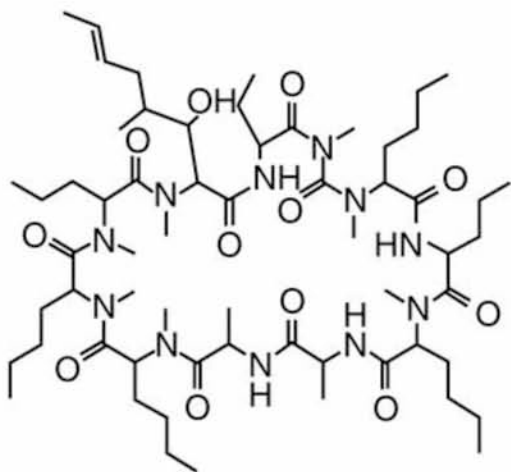
συνθετικός αναστολέας του εκλεκτικού υποδοχέα ρετινόλης, χρησιμοποιείται τοπικά. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των ρετινοειδών στην ψωρίαση παραμένει ασαφής. Είναι πιθανό ότι οι βιολογικές επιδράσεις των ρετινοειδών σε μεγάλο βαθμό, διαδίδονται μέσω πρωτεϊνών δέσμευσης κυτταροπλασματικών ρετινοειδών και πυρηνικών υποδοχέων ρετινοειδών ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα ρετινοειδή μπορούν να διαμορφώνουν τις αποκρίσεις των Τ-κυττάρων, να αναστείλλουν τις χημειοτακτικές αποκρίσεις και την ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, ενεργώντας έτσι με έναν αντιφλεγμονώδη τρόπο. Η εκφυλιστική ερυθροδερμική ψωρίαση και η φλυκταινώδης ψωρίαση ανταποκρίνονται περισσότερο στην απλή θεραπεία με ακιτρετίνη από ότι η ψωρίαση κατά πλάκας (Warren & Griffiths, 2008).



Εικόνα 5: Χημικός τύπος του ταζαροτενίου.

1.2.3 Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη (Εικόνα 5) είναι ένα ενδεκαπεπτίδιο που προέρχεται από το μύκητα του εδάφους *Tolyocladium inflatum* Gams και ανήκει στην οικογένεια των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων γνωστών ως αναστολείς της καλσινευρίνης. Η κυκλοσπορίνη δρα ως «προφάρμακο», καθώς παραμένει ανενεργή μέχρις ότου συνδεθεί με έναν κυτταροπλασματικό υποδοχέα γνωστό ως κυκλοφιλίνη. Εντός των Τ-κυττάρων, το σύμπλοκο κυκλοσπορίνης-κυκλοφιλίνης αναστέλλει τη δραστηριότητα ενός κυτταροπλασματικού ενζύμου- της φωσφατάσης της καλσινευρίνης-υπεύθυνου για την αποφωσφορυλίωση του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων. Η αποφωσφορυλίωση επιτρέπει τη μετατόπιση του πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, προκαλώντας την ενεργοποίηση του Τ-κυττάρου και την παραγωγή κυτοκινών όπως IL-2 και IFN- γ . Φαίνεται ότι τα Τ-κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις ανασταλτικές επιδράσεις της κυκλοσπορίνης. Γενικά, η κυκλοσπορίνη είναι μια πολύ αποτελεσματική θεραπεία για την ψωρίαση. Επί του παρόντος, η κυκλοσπορίνη χρησιμοποιείται κυρίως ως βραχυπρόθεσμη διακοπτόμενη θεραπεία, περιορίζοντας έτσι τη συσσώρευση τοξικότητας η οποία σχετίζεται με τη δόση της (Warren & Griffiths, 2008).



Εικόνα 5: Χημικός τύπος της κυκλοσπορίνης

1.3 Βιολογικοί παράγοντες – μονοκλωνικά αντισώματα

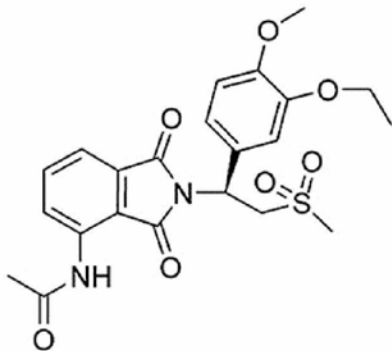
1.3.1 TNF και αναστολείς του TNF

Ο TNF είναι μια ομοτριμερής κυτοκίνη που παράγεται κυρίως από κύτταρα του ανοσοποιητικού και επιθηλιακά κύτταρα. Ο TNF μπορεί να συνδέεται στην μεμβράνη, αλλά μπορεί επίσης να διασπαστεί και να δράσει σε διαλυτή μορφή. Ο TNF ασκεί τις λειτουργίες του μέσω πρόσδεσης σε δύο διαφορετικούς υποδοχείς (TNFR1 και TNFR2). Ο TNF προκαλεί φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και ανοσοποιητικών κυττάρων, αλλά αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης του λεμφοειδούς ιστού ελέγχοντας την απόπτωση. Αυξημένα επίπεδα του TNF βρίσκονται στις θέσεις φλεγμονής σε αρκετές αυτοάνοσες ασθένειες και τα φλεγμονώδη συμπτώματα μειώνονται μετά την εξουδετέρωση του. Υψηλότερα επίπεδα TNF παρατηρούνται σε ασθενείς με ψωρίαση. Τα κερατινοκύτταρα ανταποκρίνονται στον TNF καθώς εκφράζουν τον υποδοχέα του TNFR1. Η διέγερση με τον TNF επάγει όχι μόνο ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις που ενορχηστρώνονται από κερατινοκύτταρα, αλλά και την αναδιαμόρφωση των ιστών, την κυτταρική κινητικότητα και την απόπτωση. Ο TNF παράγεται από μια ποικιλία κυττάρων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης, όπως τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα κύτταρα NKT, Th1, Th17 και Th22. Αυτό σημαίνει ότι ο TNF μπορεί να εμπλέκεται τόσο στην αρχική φάση όσο και στη χρόνια φάση της ψωρίασης. Επομένως, η εξουδετέρωση του TNF μπορεί να επηρεάσει διάφορα στάδια της ασθένειας παρεμβαίνοντας στην ενεργοποίηση διαφόρων κυτταρικών υποτύπων. Αν και οι αναστολείς του TNF συνταγογραφούνται εκτενώς σε ασθενείς, ο ακριβής ρόλος του TNF δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Η εικόνα της ασθένειας καθίσταται όλο και πιο πολύπλοκη, αλλά είναι σαφές ότι ο TNF εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες στην ψωρίαση (Grinde & et al, 2015). Οι πιο δημοφιλείς ανταγωνιστές του TNF είναι το etanercept, το infliximab και το adalimumab ενώ δύο νέα αντι-TNF φάρμακα αποτελούν το certolizumab και το golimumab. Η απόκριση στους ανταγωνιστές του TNF διαφέρει ανάμεσα σε ασθενείς και

σε διαφορετικές ασθένειες, και αυτό δημιουργεί πολυπλοκότητα στην επιλογή του σωστού ανταγωνιστή του TNF. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι επειδή ο TNF έχει επίσης ανοσορυθμιστικές λειτουργίες, η εκτεταμένη χρήση των ανταγωνιστών του TNF μπορεί να καταστεί επικίνδυνη. Οι ασθενείς μπορεί να γίνουν πιο ευαίσθητοι σε βακτηριακές και μυκητιακές λοιμώξεις ή σε κίνδυνο επανενεργοποίησης λανθάνουσας λοίμωξης από φυματίωση (Ovejero-Benito & et al, 2017).

1.3.2 Απρεμιλάστη

Η απρεμιλάστη (Otezla) (Εικόνα 6) είναι ένας αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης (PDE) 4, η οποία εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Το φάρμακο λαμβάνεται από το στόμα και είναι εγκεκριμένο για τη θεραπεία της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Η απρεμιλάστη μεταβάλλει την έκφραση μιας ποικιλίας διαμεσολαβητών ανοσολογικής απόκρισης. Για παράδειγμα, *in vitro*, το φάρμακο αναστέλλει την παραγωγή ορισμένων χημειοκινών (π.χ. CXCL9, CXCL10), ιντερλευκινών (π.χ. IL2, IL-5, IL-12A IL-13, IL-17, IL-23A) και άλλων κυτοκινών π.χ. IFN- α και IFN- γ , TNF- α , Τ-λεμφοκυττάρων, καθώς και την παραγωγή κερατινοκυττάρων μέσω του TNF- α (Deeks, 2015).



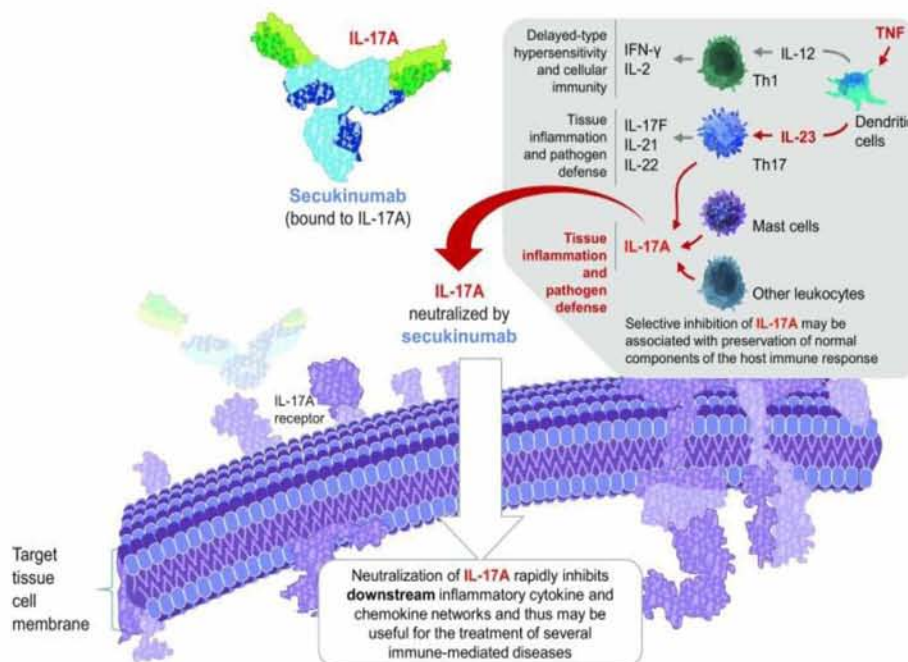
Εικόνα 6: Χημικός τύπος της απρεμιλάστης

1.3.3 Αντισώματα έναντι της ιντερλευκίνης 17

Η ιντερλευκίνη 17A (IL-17A) παίζει ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Αυξημένα επίπεδα κυττάρων που παράγουν IL-17A εντοπίζονται στην κυκλοφορία, στις αρθρώσεις και στις πλάκες του δέρματος ασθενών με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα και τα επίπεδα αυτά έχουν αποδειχθεί ότι συσχετίζονται με τα επίπεδα εκδήλωσης της νόσου και των δομικών βλαβών που αυτή προκαλεί (Grinde & et al, 2015). Ως αποτέλεσμα της επιτυχίας της βιολογικής θεραπείας με στόχο το μονοπάτι IL-23/Th17, οι ερευνητές εξακολουθούν να αναζητούν νέες θεραπευτικές επιλογές. Ένας πιθανός στόχος είναι η IL-17 και μέχρι στιγμής υπάρχουν τρεις βιολογικοί παράγοντες που την αναστέλλουν: το secukinumab, το brodalumab και το ixekizumab. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζουμε στην σεκουκινουμάμπη.

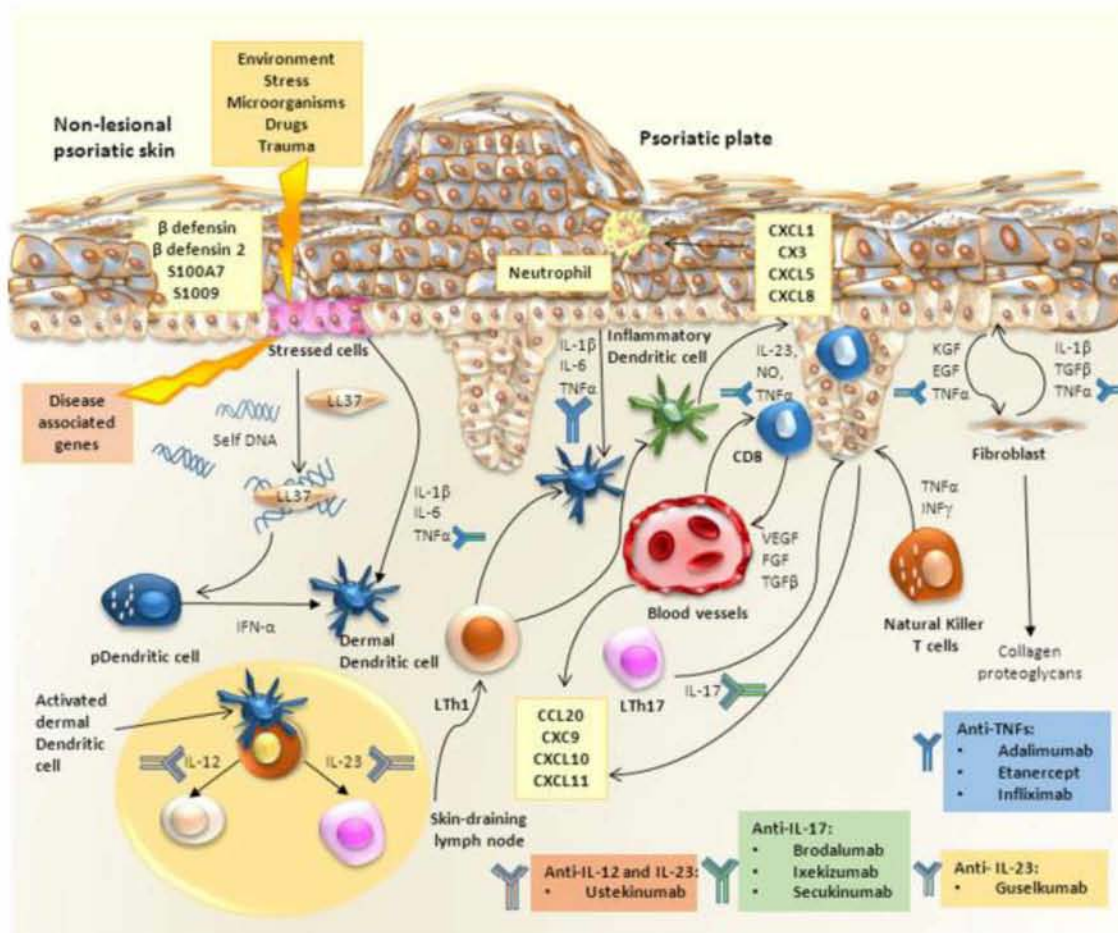
1.3.4. Σεκουκινουμάμπη

Η σεκουκινουμάμπη (cosentyx), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G1 υψηλής συγγένειας που δεσμεύεται επιλεκτικά και εξουδετερώνει την IL-17A, έχει βρεθεί αποτελεσματικό σε φλεγμονώδεις ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της ψωρίασης και της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας. Συνδέεται επιλεκτικά με την IL-17A, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της, αναστέλλοντας έτσι τη δράση της στα κερατινοκύτταρα (Εικόνα 7). Στη διάρκεια της θεραπείας, σημαντικά επίπεδα του φαρμάκου φθάνουν στο δέρμα, μειώνοντας τους τοπικούς φλεγμονώδεις παράγοντες και έτσι μειώνονται το ερύθημα, η σκληρότητα και η απολέπιση του δέρματος. Οι κλινικές βελτιώσεις ασθενών με ψωρίαση που έλαβαν το φάρμακο είναι παράλληλες με κυτταρικές, ιστολογικές και μοριακές μεταβολές στο ψωριασικό δέρμα [π.χ. μειωμένο πάχος επιθηλίου, μειωμένη παρακεράτωση, μειωμένο πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων, μειωμένα επίπεδα φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, μειωμένα επίπεδα T κυττάρων και μειώσεις σε άλλους εγγενείς πληθυσμούς ανοσοκυττάρων στο δέρμα, όπως τα θετικά με μυελοϋπεροξειδάση (δερματικά) ουδετερόφιλα]. Σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση η χορήγηση σεκουκινουμάμπης μειώνει τα επίπεδα της β-defensin 2 στον ορό και το αλλοιωμένο δέρμα και επίσης μειώνει τα υψηλά επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) στον ορό. Και τα δύο είναι δείκτες φλεγμονής και τα υψηλά επίπεδα hsCRP είναι ενδεικτικά αυξημένου κίνδυνου καρδιαγγειακής νόσου.



Εικόνα 7: Η σεκουκινουμάμπη αποτρέπει την πρόσδεση της IL-17A στον υποδοχέα της, αναστέλλοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών.

Στην εικόνα 8 συνοψίζονται τα φάρμακα που χορηγούνται για την αντιμετώπιση της ψωρίασης και οι στόχοι τους.



Εικόνα 8: Απεικόνιση των κύριων κυττάρων και των φλεγμονωδών κυτοκινών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ψωρίασης και στόχοι φαρμάκων

1.4. Φαρμακογενετική

Ο Vogel, από τη Χαϊδελβέργη, χρησιμοποίησε πρώτος τον όρο Φαρμακογενετική το 1959, πριν καν την ύπαρξη διαθέσιμων τεχνικών ικανών να αναλύσουν τις παραλλαγές στο DNA. Πιο πρόσφατα, η φαρμακογενετική έχει οριστεί από τον αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration) ως «τη μελέτη των παραλλαγών στην αλληλουχία του DNA που σχετίζονται με την απόκριση σε φάρμακα». Ο τομέας αυτός στοχεύει να συσχετίσει πώς ένας συγκεκριμένος γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να επηρεάσει τον μεταβολισμό του φαρμάκου και τη δράση του με σκοπό τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών αποκρίσεων του ασθενούς, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, ελαχιστοποιώντας τις δυσμενείς

επιπτώσεις και βελτιώνοντας τη συμμόρφωση του ασθενούς (Ovejero-Benito & et al, 2017).

Ο πιο συχνός τύπος πολυμορφισμού είναι ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Ωστόσο, υπάρχουν διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένων αλληλουχιών επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων (Copy Number Variant, CNV). Τα SNPs είναι παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου που εμφανίζονται τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού. Εντοπίζονται σε κωδικές και μη κωδικές περιοχές γονιδίων ή υποκινητών. Τα SNPs που εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές ταξινομούνται ως συνώνυμα όταν δεν επηρεάζουν το αμινοξύ που κωδικοποιείται ή ως μη συνώνυμα όταν το SNP τροποποιεί την αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης. Τα μη συνώνυμα SNPs μπορούν να χωριστούν σε παρανοηματικά εάν καταλήγουν σε διαφορετικό αμινοξύ και μη νοηματικά όταν δημιουργούν ένα κωδικόνιο τερματισμού. Τα SNPs που βρίσκονται έξω από τις κωδικές περιοχές μπορούν να μεταβάλλουν την πρόσδεση των παραγόντων μεταγραφής στο DNA, να προκαλέσουν αποικοδόμηση του mRNA ή να επηρεάσουν το μάτισμα (Ovejero-Benito & et al, 2017).

Οι φαρμακογενετικές μελέτες συνήθως επικεντρώνονται στην ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ των αποκρίσεων των ασθενών σε ορισμένα φάρμακα και των πολυμορφισμών στο DNA που εντοπίζονται σε γονίδια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των φαρμάκων. Οι κύριοι πολυμορφισμοί που μελετώνται ανήκουν σε δύο κατηγορίες: τα SNPs που σχετίζονται είτε με τη φαρμακοκινητική είτε με τη φαρμακοδυναμική ενός συγκεκριμένου φαρμάκου. Η φαρμακοκινητική μελετά τη φυσιολογική διαδικασία του μεταβολισμού ενός φαρμάκου που οδηγεί στην απέκκριση του ή στην περίπτωση των προφαρμάκων στη δημιουργία ενός ενεργού μεταβολίτη. Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι ισόένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 (CYP): *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP2C219*. Μεταφορείς φαρμάκων, όπως η γλυκοπρωτεΐνη P, διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση του φαρμάκου. Τα SNPs που βρίσκονται σε γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν το μεταβολισμό των φαρμάκων. Οι ασθενείς που διαθέτουν αυτούς τους πολυμορφισμούς μπορούν να ταξινομηθούν ως πολύ γρήγοροι, γρήγοροι, ενδιάμεσοι ή αργοί μεταβολιστές. Από την άλλη πλευρά, η φαρμακοδυναμική επικεντρώνεται στην ανάλυση των διαδικασιών που προκαλούνται από ένα συγκεκριμένο φάρμακο στο σώμα. Στο πλαίσιο αυτό αναζητώνται SNP που βρίσκονται στα γονίδια που κωδικοποιούν τους στόχους των φαρμάκων, καθώς και πιθανές αυξήσεις ή μειώσεις στον αριθμό των CNV που μπορεί να συσχετισθούν σε αύξηση ή μείωση της αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου.

1.4.1 Εξατομικευμένη θεραπεία

Όταν μια φαρμακογονιδιοματική έρευνα εντοπίζει έναν δείκτη ή δείκτες που προβλέπουν την απόκριση σε κάποια θεραπεία, υπάρχει η δυνατότητα λήψης κλινικών αποφάσεων με βάση τη φαρμακογονιδιοματική μελέτη, ρυθμίζοντας έτσι τη δοσολογία ή επιλέγοντας διαφορετικό φάρμακο ανάλογα με το γενετικό προφίλ του ασθενούς. Η

θεραπεία αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως στοχευμένη, καθώς για κάθε ασθενή επιλέγεται θεραπεία με βάση τα ειδικά του χαρακτηριστικά και όχι τα γενικά χαρακτηριστικά του συνολικού πληθυσμού. Τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής της φαρμακογενετικής και φαρμακογινιδιωματικής είναι σημαντικά, επιτρέποντας την ελαχιστοποίηση του κόστους θεραπείας και τη βελτίωση της ασφάλειας της θεραπείας μέσω της μείωσης των ανεπιθύμητων παρενεργειών. Προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι της εξατομικευμένης ιατρικής, οι κλινικές δοκιμές στον τομέα αυτό πρέπει να είναι ακριβείς στην πρόβλεψη της απόκρισης στα φάρμακα αλλά και να είναι οικονομικά προσιτές (Foulces & et al, 2015).

1.4.2. Στόχοι φαρμακογενετικής σε ασθενείς με ψωρίαση

Η διάθεση επαληθευμένων γενετικών δεικτών θα επέτρεπε την προσαρμογή της θεραπείας για κάθε ασθενή με ψωρίαση. Το κατάλληλο φάρμακο δεν θα επιλέγεται πλέον εμπειρικά, αλλά στηριζόμενο σε μοριακή βάση. Αυτό θα βελτιώσει την κλινική αποτελεσματικότητα και ασφάλεια, με σημαντική εξοικονόμηση του κόστους μακροπρόθεσμα. Διάφορες φαρμακογενετικές μελέτες για φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ψωρίασης έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς τόσο για τη συστηματική θεραπεία όσο και για νεότερους βιολογικούς παράγοντες.

1.4.3. Φαρμακογενετικές μελέτες στη συστηματική θεραπεία

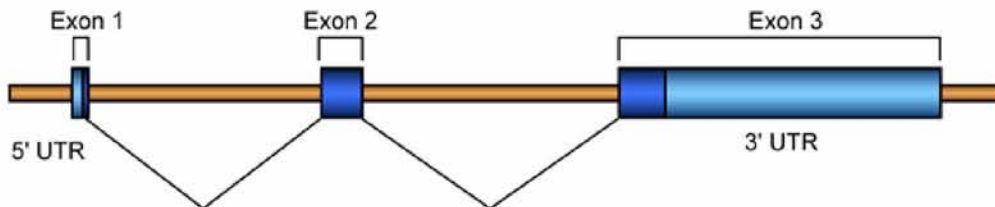
Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που συνδέονται με την απόκριση στη μεθοτρεξάτη περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες: εκείνους που επηρεάζουν τη μεταφορά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (*ABCC1*, *ABCG2* και *SLC19A1*) και εκείνες που επηρεάζουν τα ένζυμα στο μονοπάτι μεταβολισμού/σηματοδότησης της μεθοτρεξάτης (*MTHFR*, *DHFR*, *ATIC* και *ADORA2A*) (Ranganathan & McLeod, 2006). Τρεις παραλλαγές στο *ABCC1* (rs35592, rs2238476 και rs28364006) και δύο παραλλαγές στο *ABCG2* (rs13120400 και rs17731538) έχουν συσχετιστεί με αυξημένη απόκριση σε ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με μεθοτρεξάτη. Έξι παραλλαγές του *ABCC1* (rs2238476, rs3784864, rs246240, rs3784862, rs1967120 και rs11075291) έχουν συσχετισθεί με ανεπιθύμητες παρενέργειες (Warren, Smith, Campalani, & et al, 2008). Όσον αφορά την κυκλοσπορίνη, το *ABCB1* κωδικοποιεί μία Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, η οποία είναι σημαντική για την κατανομή του φαρμάκου είτε ανεξάρτητα είτε συνεργιστικά με το *CYP3A4*. Σε μία μελέτη με 84 ασθενείς με ψωρίαση που παρακολούθηθηκαν για μια περίοδο 3 μηνών θεραπείας με κυκλοσπορίνη, ο γονότυπος 3435T στο *ABCB1* (rs1045642) εμφανίστηκε πιο συχνά σε μη ανταποκρινόμενους ασθενείς από τους ανταποκρινόμενους (Vasilopoulos, Sarrì, Zafiriou, & et al, 2014). Τέλος, πολυμορφισμοί του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) που επηρεάζουν την παραγωγή του VEGF έχουν συσχετιστεί με την ευαισθησία στην ψωρίαση (Wang & et al, 2008). Το γονίδιο *VEGF* εκφράζεται στο χρωμόσωμα 6, κοντά στο *PSORS1* και ο πολυμορφισμός VEGF-460C>T έχει αποδειχθεί ότι παίζει ρόλο στην πρόβλεψη της απόκρισης ή μη απόκρισης της ασθενούς στην ακιτρετίνη (Young & et al, 2006) (Talamonti & et al, 2017).

1.4.4. Φαρμακογενετικές μελέτες για τους ανταγωνιστές του TNF

Διάφορες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να βρεθεί η πιθανή συσχέτιση των διαφόρων πολυμορφισμών γονιδίων που εμπλέκονται στην ψωρίαση ή γονιδίων που κωδικοποιούν στόχους φάρμακα με την απόκριση στους αναστολείς του TNF. Στο άρθρο των Ovejero-Benito & et al, 2017 συνοψίζονται διάφορες από αυτές, από τις οποίες διακρίνονται δύο έρευνες σε ελληνικό πληθυσμό. Οι Masourí & et al, 2016 έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός rs10484554 στο γονίδιο *HLA-C* συσχετίστηκε με την καλή απόκριση των ασθενών σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α (etanercept, adalimumab και infliximab) αλλά όχι στο ustekinumab, ενώ οι rs151823 και rs26653 στο γονίδιο *ERAPI* συσχετίστηκαν με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με αντισώματα για IL-12/23, ενώ οι Vasiloropoulos & et al, 2012 δείχνουν ότι η ύπαρξη των αλληλομόρφων *TNF-857C* ή *TNFRSF1B 676T* συσχετίζεται με θετική απόκριση των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με etanercept.

Η σεκουκινουμάμπη και η απρεμιλάστη είναι σχετικά καινούρια φάρμακα στην αγορά και δεν υπάρχει έως τώρα κάποια φαρμακογενετική μελέτη πάνω σε αυτά.

1.5. Γονίδιο της ιντερλευκίνης 17 A και SNPs Το γονίδιο της IL-17A βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6p12.2, συνολικά διαθέτει 3 εξόνια και το συνολικό του μήκος ανέρχεται στις 11252 bp. Το γονίδιο παρουσιάζεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Απεικόνιση του γονιδίου της IL-17A.

Η κυτοκίνη που προκύπτει από την έκφραση αυτού του γονιδίου αποτελείται από 155 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 17504 Da (Grinde & et al, 2015). Η IL-17A είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται από ενεργοποιημένα T κύτταρα. Η IL-17A ρυθμίζει τις δραστηριότητες του μεταγραφικού παράγοντα NF-κappaB και πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα. Επίσης, μπορεί να διεγείρει την έκφραση της IL6 και της κυκλοοξυγενάσης-2 (PTGS2/COX-2), καθώς και να ενισχύσει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Τα υψηλά επίπεδα της IL-17A συνδέονται με αρκετές χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η πολλαπλή σκλήρυνση.

Η ύπαρξη συγκεκριμένων SNP στην IL-17A, που αποτελεί το στόχο της σεκουκινουμάμπης, μπορεί να εξηγήσει τη διαφορετική απόκριση των ασθενών με

ψωρίαση στην θεραπεία με αυτό το αντίσωμα. Μέχρι τώρα παρόμοια φαρμακογενετική μελέτη δεν έχει πραγματοποιηθεί.

Παρακάτω συνοψίζονται τα τέσσερα SNPs του γονιδίου της IL-17A που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα εργασία. Για κάθε SNP αναγράφεται η συχνότητα εμφάνισής τους στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, η θέση τους πάνω στο γονίδιο, και η συχνότητα εμφάνισης του κάθε αλληλομόρφου σε συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων.

1. Rs4711998, θέση 4169, συχνότητες 25.8% A – 74.2% G σε 1000 δείγματα
2. Rs8193036, θέση 4309, συχνότητες 25.8% C – 74.2% T σε 1006 δείγματα
3. Rs3819024, θέση 4602, συχνότητες 61.8% A – 38.2% G σε 1006 δείγματα
4. Rs2275913, θέση 4849, συχνότητες 37.9% A – 62% G σε 1006 δείγματα

Τα παραπάνω SNP επιλέχθηκαν, τόσο με βάση τη συχνότητα εμφάνισής τους στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, όσο και γιατί έχουν προηγουμένως αναφερθεί διάφορες μελέτες, όπως αυτή των Shen & et al, 2015, που συσχετίζουν τρεις από τους παραπάνω πολυμορφισμούς με νόσους όπως την ρευματοειδή αρθρίτιδα.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση των κατάλληλων εκκινήτων και συνθηκών για την επιτυχή γονοτύπηση του τμήματος του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17Α που περιέχει τους πολυμορφισμούς rs4711998, rs8193036, rs3819024, rs2275913 ώστε μελλοντικά να εφαρμοστούν στο πλαίσιο μιας ευρύτερης φαρμακογενετικής μελέτης συσχέτισης της απόκρισης των ασθενών με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό στην θεραπεία με σεκουμινάμπη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Δείγματα ασθενών

Η μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17A στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε σε δείγματα αίματος ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με ψωρίαση και έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με το φάρμακο σεκουκινουμάμπη. Τα δείγματα αυτά προήλθαν από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά μελετήθηκαν 10 δείγματα από ασθενείς με ψωρίαση. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε ποσότητες των 0,5 ml και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20 °C έως ότου ξεκινήσει η επεξεργασία τους.

2.1.2 Χημικά

Τα χημικά αντιδραστήρια και τα kit που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και αγοράστηκαν από τις ακόλουθες εταιρίες: Sigma-Aldrich, AppliChem, Panreac, NEW ENGLAND Biolabs[®]inc, Kapa Biosystems, Macherey-Nagel.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ανθρώπινο αίμα

1.α. Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη
- ισοπροπανόλη
- NaCl 5 M
- πρωτεΐνάση K
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 (Phosphate Buffer Saline, PBS) (παρέχεται από την εταιρεία Invitrogen, με κωδικό 20012019)
- Διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O)
- Lysis buffer B3

1.β. Διαλύματα

Διάλυμα αιθανόλης 70%

Για τον καθαρισμό του DNA από υπολείμματα αλάτων χρησιμοποιείται διάλυμα παγωμένης 70% αιθανόλης, το οποίο προκύπτει με αραιώση 1,4 ml απόλυτης αιθανόλης (100%) σε 0,6 ml ddH₂O και διατηρείται σε - 20⁰ C.

Διάλυμα NaCl 5M

Για τελικό όγκο 100 ml, διαλύονται 29,22 g NaCl σε 100ml ddH₂O υπό συνεχή ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση του άλατος. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

1.γ. Διαδικασία απομόνωσης

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA γίνεται από λευκά αιμοσφαίρια τα οποία περιέχονται στα δείγματα αίματος των ασθενών. Το πρωτόκολλο απομόνωσης διαρκεί συνολικά 2 ημέρες και είναι το εξής: Τα δείγματα αίματος (0,5 ml) αποψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με προσθήκη 1 ml PBS, ανάδευση δια αναστροφής (vortex) και φυγοκέντρηση του δείγματος για 10 λεπτά στα 5.000 × g. Απομακρύνεται το υπερκείμενο με προσοχή και επαναλαμβάνεται άλλο ένα βήμα έκπλυσης με 1 ml PBS, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 5.000 × g. Αφαιρείται για άλλη μία φορά το υπερκείμενο με προσοχή και στο ίζημα προστίθενται 200 μl PBS και ακολουθεί ήπια ανάδευση μέχρι την διαλυτοποίησή του. Ακολούθως προστίθενται 200 μl lysis buffer B3, που είναι ένα λυτικό διάλυμα το οποίο περιέχει το απορρυπαντικό Sodium Dodecyl Sulphate (SDS). Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται η λύση των κυτταροπλασματικών και των πυρηνικών μεμβρανών των λευκοκυττάρων προκειμένου να απελευθερωθεί το γονιδιωματικό DNA στο διάλυμα. Το SDS είναι αμφιφατικό μόριο που αποτελείται από μια υδρόφοβη ουρά και μία υδρόφιλη κεφαλή και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας, διαταράσσοντας τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων. Ακολουθεί προσθήκη 15 μl πρωτεϊνάσης K (PrK) (σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml), η οποία είναι ένα ένζυμο με πρωτεολυτική δράση απενεργοποιώντας ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών εκ των οποίων και οι ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου που μπορούν να κατακερματίσουν το DNA κατά την διάρκεια της απομόνωσης. Τα δείγματα μετά την προσθήκη της πρωτεϊνάσης επωάζονται 24 ώρες στους 55 °C σε περιστρεφόμενο επωαστήριο. Μετά το πέρας του εικοσιτετραώρου στην περίπτωση που δεν έχει πραγματοποιηθεί η πλήρης λύση των κυττάρων προστίθενται επιπλέον 10 μl πρωτεϊνάσης K και πραγματοποιείται μία επιπλέον ώρα επώασης στον περιστρεφόμενο επωαστήρα των 55 °C. Για τον διαχωρισμό του DNA από τις πρωτεΐνες και την κατακρήμνιση του βασιζόμεστε στην προσθήκη διαλύματος χλωριούχου νατρίου και ισοπροπανόλης. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης η οποία παρουσία χλωριούχου νατρίου που έχει προστεθεί στην αρχή μειώνει τη διαλυτότητα του. Γίνεται μέτρηση λοιπόν του όγκου δείγματος, υπολογισμός της ποσότητας χλωριούχου νατρίου που πρέπει να προστεθεί ώστε η τελική συγκέντρωση του στο δείγμα να ανέρχεται στα 0,2 M και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Μετά από ήπια ανακίνηση του σωληναρίου παρατηρείται το DNA με μορφή σαν μία λευκή κλωστή. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -80 °C για 20 λεπτά ή εναλλακτικά στους -20 °C για 12 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 10 λεπτά στις 12.000 × g. Το DNA βρίσκεται σαν ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου και απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο. Για να καθαριστεί το DNA από υπολείμματα αλάτων ξεπλένεται με 70% παγωμένη αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12.000 × g και απομάκρυνση την αιθανόλης. Η πλήρης

απομάκρυνση της αιθανόλης είναι αναγκαία καθώς μπορεί να λειτουργήσει ως αναστολέας ενζυμικών αντιδράσεων. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα επωάζονται με ανοιχτό καπάκι στους 37 °C για διάστημα περίπου μίας ώρας. Τέλος, τα δείγματα επαναδιαλύονται σε ddH₂O, σε τελικό όγκο που καθορίζεται από την πυκνότητα του δείγματος. Ενδεικτικά προστίθενται 50-75 μl ddH₂O. Τα δείγματα μεταφέρονται στους 4 °C για 24 ώρες και στους 55 °C για 30 λεπτά προκειμένου να γίνει η πλήρης διαλυτοποίηση του DNA. Μετά την διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση του DNA μέσω φωτομέτρησης με βάση τον τύπο :

$$C \left(\frac{ng}{\mu l} \right) = A(260) \times \text{Συντελεστή Αραίωσης} \times 50$$

2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

2.3.2.α Αρχή της μεθόδου-Στάδια της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία *in vitro* μέθοδος η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis το 1980. Είναι μια καινοτόμα μέθοδος η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων του αρχικού γενετικού υλικού προκειμένου να είναι εφικτή η περαιτέρω μελέτη του. Κατά τη διάρκεια μίας αντίδρασης PCR μπορεί να γίνει ο πολλαπλασιασμός ενός επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές. Η ταχύτητα, η ειδικότητα, η μεγάλη ευαισθησία και το χαμηλό της κόστος την έχουν κάνει μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους σε ερευνητικό και διαγνωστικό επίπεδο.

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος και στηρίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί μονόκλωνα τμήματα DNA ως εκμαγεία για την σύνθεση νέων συμπληρωματικών κλώνων με κατεύθυνση 5'-3'. Η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει νουκλεοτίδια μόνο σε ελεύθερο 3'-OH άκρο. Για να γίνει η εκκίνηση της ενίσχυσης και να αρχίσει η δράση της πολυμεράσης χρειάζεται πρώτα να προσδεθεί το ζεύγος των εκκινητών σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας στα άκρα του τμήματος DNA-στόχου. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε 3 στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά και τα αντιδραστήρια τα οποία προστίθενται είναι το δείγμα DNA, τα τέσσερα νουκλεοτίδια (dNTPs), ένα ζεύγος εκκινητών (primers) και η DNA πολυμεράση. Τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. Αποδιάταξη: Το δίκλωνο DNA το οποίο φέρει την αλληλουχία στόχο θερμαίνεται στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθεί για 5 λεπτά.
2. Θέρμανση στους 95 °C για 1 λεπτό.
3. Υβριδισμός εκκινητών: Η θερμοκρασία μειώνεται στους 55-65 °C ανάλογα με την σχέση $T_m=2(A+T)+4(C+G)$ για 1 λεπτό. Κατά αυτό το στάδιο πραγματοποιείται ο υβριδισμός των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες στο τμήμα στόχο.

4. Επιμήκυνση: Ακολουθεί θέρμανση στους 72 °C για 1 λεπτό, η οποία αποτελεί τη βέλτιστη θερμοκρασία της δράσης της Taq πολυμεράσης. Σε αυτό το σημείο η πολυμεράση προσθέτει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) επιμηκώνοντας τους εκκινητές χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA.
5. Τα βήματα 2 έως 4 επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους συνολικά.
6. Θέρμανση στους 72 °C για 10 λεπτά
7. Παραμονή του δείγματος στους 4 °C για απεριόριστο χρόνο.

Η PCR πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα τα οποία έχουν την δυνατότητα γρήγορης εναλλαγής θερμοκρασιών, τους θερμοκυκλοποιητές (Thermo Cyclers).

2.3.2.β. Πειραματική διαδικασία

Ακολούθως συνοψίζονται τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR, η αλληλουχία του DNA-στόχου με τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς, οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή.

Γονίδιο - στόχος

Πίνακας 1: Η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17A η οποία ενισχύεται στην παρούσα εργασία. Έχει μήκος 993 νουκλεοτίδια. Με πράσινο χρώμα επισημαίνεται ο πρόσθιος εκκινητής (F4) με κόκκινο ο ανάστροφος (R2), και με μπλε χρώμα τα υπό μελέτη SNPs.

Αλληλουχία DNA		
F4	<p>tccacttccccacttttaactcatctgtcctccaattcccttttggctgagcctagctgaaaccagctgaca ggggagtttgagcaagcagcctccagggtcagccctctgagttacaggtagagcaggacagggaggaatgg atctcaggacaacaacaggttcaggatccggcaaaactaattttactccagccattgagttggaactactgg ccagcctcccccgagtttagcatgtagaatatgggataccagctgagtgctgagagttatcattcacctc agtgggggtagggcgagagaaggggtgacatatagccagccacatctatatccactggcccttccttgtcct agtcctctgtattcctgagaaggaactattctcaaggacctgagtcacaagttcatcttacttagagtacag agaaaagaaccgctaactccttctctctttcccccatcatgtctcctctcctttctagttctcatcactct ctactccccctgcccccttttctccatctccatcacctttgtccagtcctctatccccattttcaattcc ttcctcaaaaacaccaagttgcttggttagcatgcaggggttggaacatgcctttaacagaaaatctcgtgtct cttgaacctagttatttattccttgagcagagtagatattcaacaaaagaattggttaaattcaattaaata ggatatatcttattattaaatatttttttcattttttgtttacttatatgatgggaacttgagtagtttcc ggaattgtctccacaacacctggccaaggaatctgtgaggaaaagaagatcaaatggaanaatcaaggtac atgacaccagaagacctacatggttacttcaaactttttcttccctcatgaaccattaaaatagagcataact cttctggcagctgtacatatgttcataaatacatgatattgaccatagcatagcagctctgctcagcttc taacaagtaagaatgaaaagaggacatggtcttttaggaacatgaatttctgcccttcccattttccttcag aagagagagattcttctatgacctcattggggcggaatttttaaccaaaatggtgtcaccctgaaccac tgcgacacgccacgtaagtgaccacagaaggagaaaagccctataaaaagagagacgatagcgctacattt tgtccatctcatagcaggcacaactcatccatccccagttgattggaagaaacaacgatgactcctggga agacctcattgggtggtgagtcctgcactaacgtgcatgctc</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">Rs4711998</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">Rs8193036</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">Rs3819024</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Rs2275913</div>
R2		

Εκκινητές

Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών είναι ένα καίριο βήμα για την πραγματοποίηση μίας πετυχημένης PCR. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών λαμβάνονται υπόψιν οι συγκεκριμένες αρχές:

1. Οι αλληλουχίες τους δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους για την αποφυγή σχηματισμού διμερών.
2. Οι αλληλουχίες τους πρέπει να έχουν παρόμοια σύσταση σε G και C ώστε να έχουν παρόμοιο Tm.
3. Να μην περιέχουν περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

Πίνακας 2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η θερμοκρασία τήξεως (Tm).

Εκκινητές	Αλληλουχία	Tm
Forward (F4)	5'-GATACCAGCTGAGTGCCTG- 3'	58.8 °C
Reverse (R2)	5'-TGGATGAGTTTGTGCCTGCT-3'	57.3 °C

Οι εκκινητές παραλαμβάνονται σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Ανάλογα με την ποσότητά τους προσθέτουμε ddH₂O ώστε να επιτευχθεί διάλυμα συγκέντρωσης 100 pmol/μl. Για τις αντιδράσεις PCR το αρχικό διάλυμα αραιώνεται σε 10 pmol/μl σε ddH₂O. Τα διαλύματα διατηρούνται σε - 20 C.

Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Συνθήκες για την αντίδραση PCR

95°C , 5 λεπτά	
95°C , 1 λεπτό	} 40 κύκλοι
61°C , 1 λεπτό	
72°C , 1 λεπτό	
72°C , 10 λεπτό	
Παραμονή σε 4°C	

Αντιδραστήρια

Για κάθε αντίδραση PCR παρασκευάζεται ένα μείγμα (mastermix), το οποίο περιέχει τα αντιδραστήρια στις παρακάτω ποσότητες και τελικές αντιδράσεις του πίνακα 4. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μ l και η ποσότητα του DNA που προστίθεται κυμαίνεται στα 1-10 μ l ανάλογα το δείγμα. Σε κάθε αντίδραση PCR προστίθεται και ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control) ο οποίος περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια στις ίδιες ποσότητες εκτός από το DNA, το οποίο αντικαθίσταται με ίσο όγκο νερού. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι απαραίτητος σε κάθε αντίδραση ώστε να γίνεται έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις που μπορεί να έχουν συμβεί σε κάθε ένα από τα αντιδραστήρια.

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες τους σε μία τυπική αντίδραση συνολικού όγκου 50 μ l.

Αντιδραστήρια (αρχικές συγκεντρώσεις)	Ποσότητες (σε μ l)	Τελικές Συγκεντρώσεις
Buffer (10x + 1.5Mm MgCl ₂)	5	1x + 1.5 mM MgCl ₂
dNTPs (10 mM)	2	0.4 mM
MgCl ₂ (25 Mm)	1	0.5 mM
Forward primer (10 μ m/μl)	2.5	10 pmol/μl
Reverse primer (10 μ m/μl)	2.5	10 pmol/μl
Kapa Taq DNA polymerase (5 units/μl)	0.5	1 unit/μl
ddH ₂ O	26.5-35.5	
DNA καλούπι	1-10	100-200 ng/μl

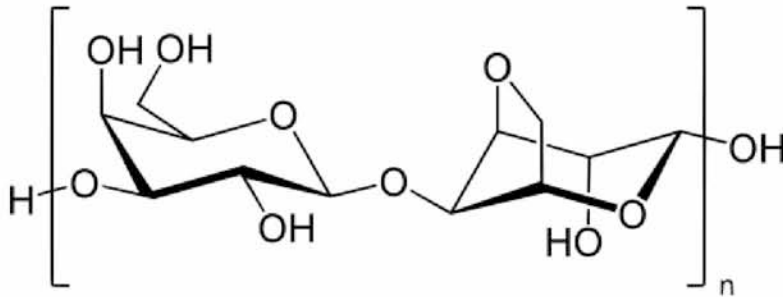
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.3.3.α Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και των πρωτεϊνών που βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης

χωρίζεται σε δύο στάδια, την παρασκευή του πηκτώματος της αγαρόζης και την τοποθέτηση των προς εξέταση δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του πολυσακχαρίτη της αγαρόζης.

2.3.3.β. Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, 6X) με σύσταση: 0.25% Μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromofenol blue) (25mg), 30% w/v Γλυκερόλη (3ml), ddH₂O (7ml). Συνολικός όγκος: 10ml
- Μάρτυρας Quick – Load 2-log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) 100μg/ml (αριθμός καταλόγου NO469S)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml.
- Διάλυμα TAE (Tris-Acetic acid-EDTA)

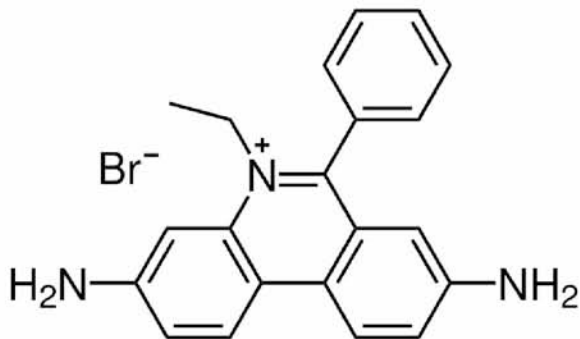
2.3.3.γ. Πειραματική διαδικασία

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE) 50x

Σε τελικό όγκο 1L, διαλύονται 242 g Tris-base και προστίθενται 57,1 ml υγρού οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M, pH = 8. Ακολουθεί προσθήκη ddH₂O μέχρι τον τελικό όγκο του 1 L. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ηλεκτροφόρηση το διάλυμα αυτό αραιώνεται σε 1X ως εξής: Σε τελικό όγκο 1L, προστίθενται 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE 50x σε 980m L ddH₂O.

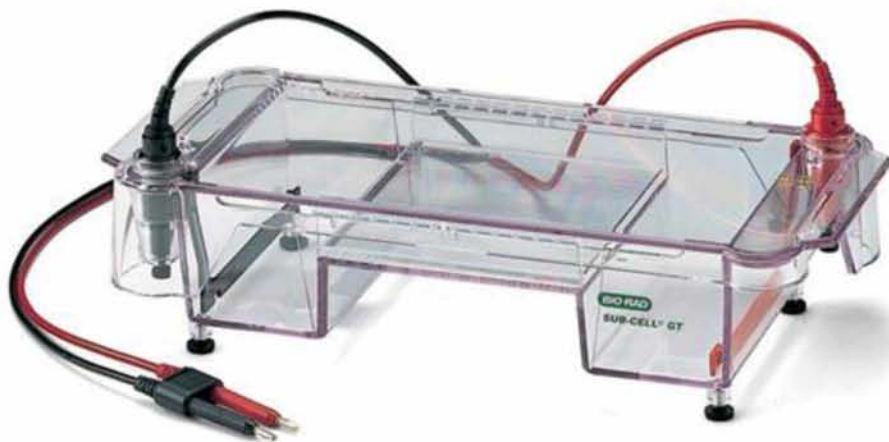
Για την παρασκευή πηκτώματος με περιεκτικότητα αγαρόζης 1,5% ζυγίζονται 0,9 g αγαρόζης και διαλύονται σε 60 ml διαλύματος TAE (1X). Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και να γίνει ένα διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια, το μίγμα αφήνεται να κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό και πραγματοποιείται η προσθήκη 2,16 μl του βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Για την

οπτικοποίηση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το EtBr παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση. Τα γάντια και τα πηκτώματα που περιέχουν βρωμιούχο αιθίδιο απορρίπτονται σε κάδους με σήμανση για τοξικά απόβλητα και υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία εξουδετέρωσης.



Εικόνα 11: Απεικόνιση του χημικού τύπου του βρωμιούχου αιθιδίου

Το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά «πηγαδάκια» υποδοχής του δείγματος. Όταν κρυσώσει η αγαρόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης. Έπειτα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει διάλυμα TAE (1X). Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής. Στα δείγματα έχει προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) σε τελική συγκέντρωση 1x. Ενδεικτικά, σε κάθε δείγμα ποσότητας 5 μl προστίθεται 1μl από το διάλυμα φόρτωσης). Τέλος, απαραίτητη είναι και η φόρτωση ενός δείκτη-μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών, για τον προσδιορισμό του μεγέθους του δείγματος που «τρέχει» στο πήκτωμα. Το επόμενο βήμα είναι η εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα 90 V. Το πήκτωμα αξίζει να τονισθεί ότι πρέπει να τοποθετηθεί με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Ειδικότερα, τα «πηγαδάκια» υποδοχής του δείγματος τοποθετούνται από την πλευρά του αρνητικού πόλου. Έτσι, το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την σωστή κατεύθυνση τον θετικό πόλο.



Εικόνα 12: Συσκευή ηλεκτροφόρησης BioRad Sub-Cell

Μόλις τερματιστεί η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το μηχάνημα λήψης ψηφιακών φωτογραφιών σε UV, όπου τα μόρια του DNA γίνονται ορατά μετά την έκθεσή τους σε UV. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας αναλύθηκαν στο πήκτωμα 5 ή 10 μl από την αντίδραση PCR.

2.3.4. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR σε αυτό το στάδιο καθαρίζονται με σκοπό να σταλούν για αλληλούχηση. Το kit το οποίο χρησιμοποιείται είναι το NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey Nagel και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες στο ειδικό εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Αρχικά, ο όγκος του κάθε δείγματος ρυθμίζεται με την προσθήκη νερού στον τελικό όγκο των 50 μl. Σε αυτό προστίθεται 100 μl από το διάλυμα NT1 και το δείγμα μεταφέρεται σε στήλες NucleoSpin Gel and PCR Clean up οι οποίες τοποθετούνται μέσα σε ειδικά σωληνάκια των 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα $11.000 \times g$, απόρριψη του διαλύματος που διαπέρασε την στήλη και επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι. Προστίθενται 700 μl του διαλύματος NT3, το οποίο περιέχει αιθανόλη, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα $11.000 \times g$ και απόρριψη του διαλύματος που διαπέρασε την στήλη. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται. Για να ξηρανθεί η στήλη και να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα της αιθανόλης ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $11.000 \times g$ για 1 λεπτό. Η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι erpendorf και προστίθενται 15 μl διαλύματος έκλυσης NE το οποίο έχει προθερμανθεί στους $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Για την βέλτιστη απόδοση, το δείγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα $11.000 \times g$. Ακολουθεί ένα δεύτερο βήμα έκλυσης στο οποίο ο όγκος του διαλύματος έκλυσης που προστίθεται σε κάθε δείγμα εξαρτάται από την ένταση του ειδικού σήματος στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και κυμαίνεται από 8-25 μl. Πραγματοποιείται ξανά επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα $11.000 \times g$. Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος μετά το πέρας του καθαρισμού ακολουθεί ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (ενδεικτικά 1- 3

μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% δίπλα σε συγκεκριμένη ποσότητα μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η ένταση του ειδικού σήματος του κάθε καθαρισμένου δείγματος συγκρίνεται με την ένταση στις ζώνες του μάρτυρα και έτσι γίνεται η εκτίμηση της συγκέντρωσής του.

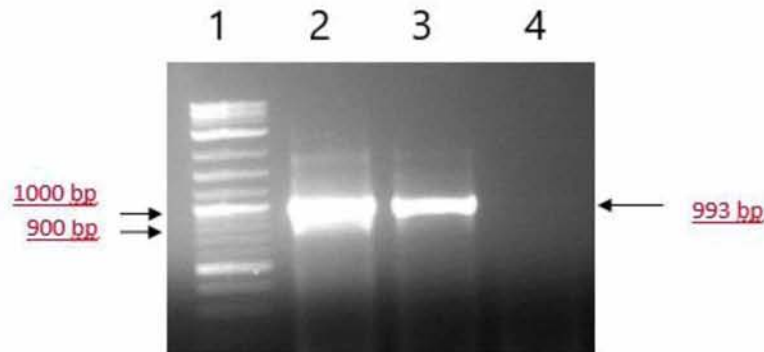
2.3.5. Αλληλούχιση των προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR λαμβάνει μέρος στο εργαστήριο της εταιρίας CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) στην Λάρισα. Για την αλληλούχιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τόσο ο πρόσθιος εκκινητής (F4) όσο και ο ανάστροφος εκκινητής (R2). Η αλληλούχιση των δειγμάτων γίνεται με την μέθοδο Sanger και τα αποτελέσματα αποστέλλονται ηλεκτρονικά υπό την μορφή χρωματογραφημάτων. Για την μελέτη και επεξεργασία των δεδομένων αυτών γίνεται χρήση του προγράμματος BioEdit version 7.2.6 (3/31/2017) (Hall, T.A. 1999).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

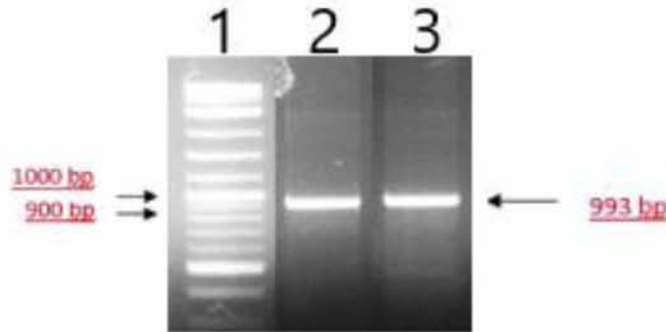
3.1. Ενίσχυση της υπό μελέτης περιοχής του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17A με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Μετά την απομόνωση του DNA από το αίμα των ασθενών πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου της ιντερλευκίνης 17 που περιέχει τους τέσσερις υπό μελέτη πολυμορφισμούς. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% για να διαπιστωθεί η παραγωγή του ειδικού προϊόντος μεγέθους 993 bp (Εικόνα13).



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% της περιοχής ενίσχυσης του γονιδίου της IL-17A με αντίδραση PCR. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών μεγεθών, **2-Log DNA Ladder** (100-1000 bp). **Διαδρομές 2 και 3:** Αποτέλεσμα της ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων #1 και #2. **Διαδρομή 4:** Αρνητικός μάρτυρας της PCR.

Στη συνέχεια Τα δείγματα με το σωστό προϊόν καθαρίστηκαν με τη χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey Nagel. Τα προϊόντα του καθαρισμού ηλεκτροφορήθηκαν εκ νέου σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 14).



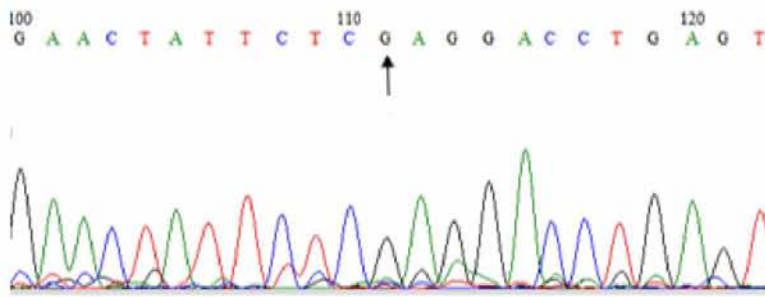
Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου IL-17 A με αντίδραση PCR μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομή 1:** δείκτης μοριακών βαρών, 2-Log DNA Ladder (100-1000 bp). **Διαδρομές 2-6:** Καθαρισμένα προϊόντα PCR των δειγμάτων #1 και #2.

3.2. Αλληλούχιση δειγμάτων και ανίχνευση πολυμορφισμών

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έδωσε 97-100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές του γονιδίου της IL-17A, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στις Εικόνες 15 έως 24 δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Οι εικόνες εστιάζονται στην περιοχή που απαντώνται οι πολυμορφισμοί Rs4711998, Rs8193036, Rs2275913 και Rs8193036.

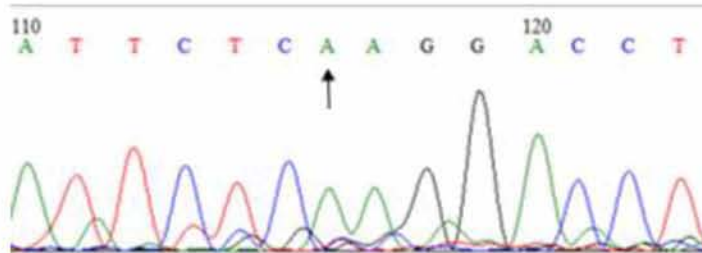
Αναφορικά με τον πολυμορφισμό Rs4711998 (ctattctcga), βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για κάθε αλληλόμορφο, είτε GG (Εικόνα 15), είτε AA (Εικόνα 16), αλλά δεν βρέθηκαν άτομα ετερόζυγα.

Rs4711998 (ctattctcga)



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs4711998, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G.

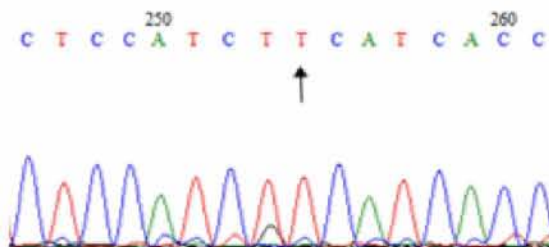
Rs4711998 (ctattctca)



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs4711998, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A.

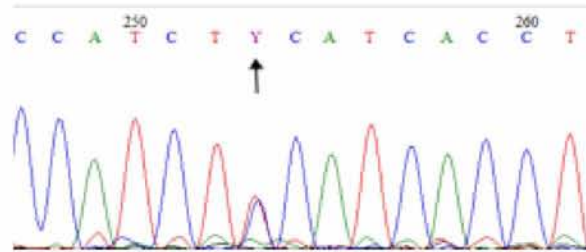
Αναφορικά με τον πολυμορφισμό Rs8193036 (ctccatctc), βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο T (Εικόνα 17), και άτομα ετερόζυγα για τα δύο αλληλόμορφα (C και T) (Εικόνα 18), αλλά δεν βρέθηκαν άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο C.

Rs8193036 (ctccatctc)



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs8193036, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

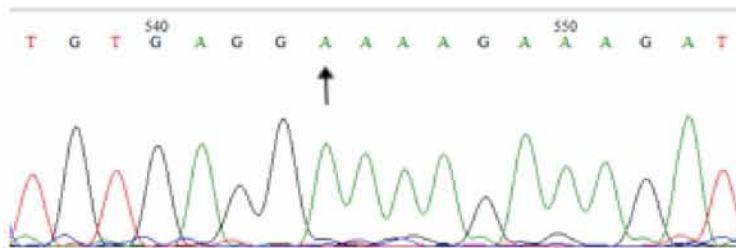
Rs8193036 (ctccatctt/cc)



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs8193036, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ετεροζυγωτία CT.

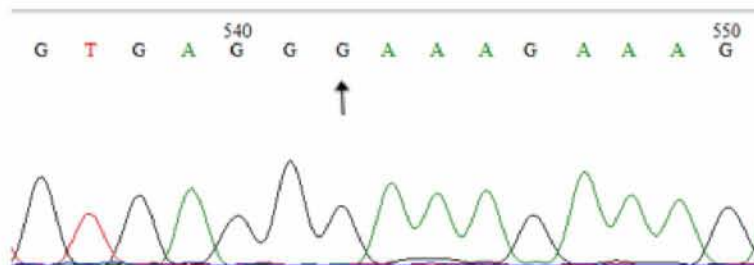
Αναφορικά με τον πολυμορφισμό Rs3819024 (gaaaagaaag), βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για κάθε αλληλόμορφο, είτε AA (Εικόνα 19), είτε GG (Εικόνα 20), καθώς και άτομα τα οποία είναι ετερόζυγα για τα δύο αλληλόμορφα AG (Εικόνα 21).

Rs3819024 (gaaaagaaag)



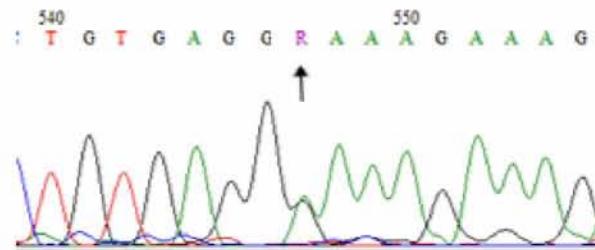
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs3819024, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A.

Rs3819024 (ggaaagaaag)



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs3819024, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G.

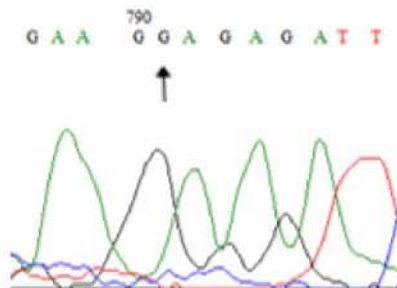
Rs3819024 (ga/gaaagaaag)



Εικόνα 21: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs3819024, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ετεροζυγωτία AG.

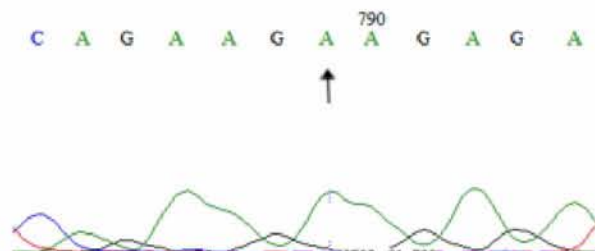
Αναφορικά με τον πολυμορφισμό Rs2275913 (ttcagaagga), βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για κάθε αλληλόμορφο, είτε GG (Εικόνα 22), είτε AA (Εικόνα 23), καθώς και άτομα τα οποία είναι ετερόζυγα AG (Εικόνα 24).

Rs2275913 (ttcagaagga)



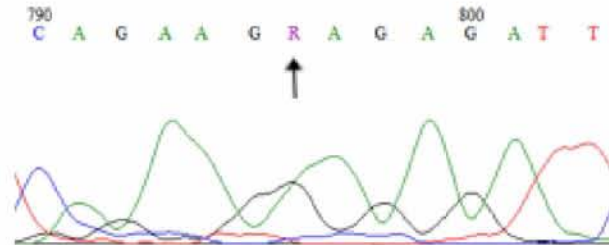
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs2275913, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ομόζυγωτία για το αλληλόμορφο G.

Rs2275913 (ttcagaagaa)



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs2275913, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A.

Rs2275913 (ttcagaagg/aa)



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό Rs2275913, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα έχουμε ετεροζυγωτία GA.

Συμπερασματικά, στην παρούσα πτυχιακή εργασία στόχος ήταν η εύρεση των κατάλληλων εκκινήτων και των βέλτιστων συνθηκών για την ενίσχυση του τμήματος αυτού του γονιδίου το οποίο περιέχει και τους τέσσερις υπό μελέτη πολυμορφισμούς. Η ενίσχυση αυτή ήταν επιτυχής και το προϊόν που προκύπτει περιέχει και τους τέσσερις πολυμορφισμούς ώστε να είναι δυνατή η αλληλούχιση τους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα χρωματογραφήματα της περιοχής του γονιδίου IL-17A που παρουσιάζονται παραπάνω μπορούμε να διακρίνουμε για τον κάθε πολυμορφισμό διαφορετικούς γονότυπους τόσο ομόζυγους για το αλληλόμορφο με την μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό, όσο ομόζυγους για το αλληλόμορφο με την μικρότερη συχνότητα αλλά και ετεροζυγώτες. Οι διαφορετικοί γονότυποι πιθανώς ευθύνονται για την διαφορετική απόκριση των ασθενών στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη. Σε αυτό το στάδιο η τελική συσχέτιση των πολυμορφισμών αυτών με την απόκριση στο φάρμακο δεν είναι δυνατή καθώς ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν είναι αρκετά μικρός ώστε να προκύψουν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα. Όμως είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μέχρι τώρα δεν υπάρχει φαρμακογενετική μελέτη η οποία να αφορά την σεκουκινουμάμπη σε ασθενείς με ψωρίαση. Αυτή η πτυχιακή εργασία αποτελεί το έναυσμα και το υπόβαθρο για την μελλοντική διεξαγωγή της πρώτης φαρμακογενετικής μελέτης σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ghoreschi K, Weigert C, Röcken M. 2007. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol.* 25(6): 574-580.
- Tang H & et al. 2013. A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nature Genetics.* 46(1): 45-50.
- Basra M & et al. 2008. The Dermatology Life Quality Index 1994–2007: a comprehensive review of validation data and clinical results. *Br J Dermatol.* 159(5): 1365-2133.
- Camisa C. 2004. Overview of Psoriasis. *Handbook of Psoriasis, Second edition* (p. 1-370). Florida: Blackwell Publishing.
- Chandran V & Raychaudhuri S. 2010. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun.* 34(3): 314-321.
- Dawn Tear M & Barrett J. 2005. Genetic linkage studies. *The Lancet.* 366(9490): 1036-1044.
- Deeks E. 2015. Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs.* 75(12): 459-472.
- Elder J. & et al. 2010. Molecular Dissection of Psoriasis: Integrating Genetics and. *J Invest Dermatol.* 130(5): 1213-1226.
- Feldman S. & Krueger G. 2005. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis.* 64(2): 65-68.
- Foulces A. & et al. 2015. Pharmacogenomics and the resulting impact on psoriasis therapies. *Dermatol Clin.* 31(1): 149-160.
- Generali E, Ceribelli A, Stazi MA, Selmi C. 2017. Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases. *J Autoimmun.* 83: 51-61.
- Grinde L. & et al. 2015. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 26(1): 25-33.
- GUDJONSSON J. & et al. 2004. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol.* 135(1): 1-8.
- Kim W & et al. 2017. Diagnosis and management of psoriasis. *Can Fam Physician.* 63(4): 278-285.
- Kouris A, Christodoulou C & et al. 2015. Quality of life and psychosocial aspects in Greek patients with psoriasis: a cross-sectional study. *An Bras Dermatol.* 90(6): 841-845.
- Levine D & Gottlieb A. 2009. Evaluation and Management of Psoriasis: An Internist's Guide. *Med Clin North Am.* 93(6): 1291-1303.
- Mahil S, Capon F & Barker J. 2015. Genetics of Psoriasis. *Dermatol Clin.* 33(1): 1-11.

- Masouri S. & et al. 2016. A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF-a and Anti-IL-12/23 Agents. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 20(3) 221-225.
- Nair R. & et al. 2006. Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis. *Am J Hum Genet*. 78(5): 827-851.
- Ovejero-Benito M. & et al. 2017. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *Am J Clin Dermatol*. 19(2): 209-222.
- Ranganathan P & McLeod H. 2006. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 54(5): 1366-1377.
- Shen L. & et al. 2015. Association between interleukin 17A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 566(1): 18-22.
- Talamonti M. & et al. 2017. The Role of Pharmacogenetics in Chronic Plaque Psoriasis: Update of the Literature. *Mol Diagn Ther*. 21(5): 467-480.
- Vasilopoulos Y. & et al. 2012. Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Mol Diagn Ther*. 16(1): 29-34.
- Vasilopoulos Y., Sarri C., Zafiriou E. & et al. 2014. A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics J*. 14(6): 523-525.
- Wang Z. & et al. 2008. Single nucleotide polymorphisms of VEGF gene and psoriasis risk. *J Dermatol Sci*. 49(3): 263-265.
- Warren R. & Griffiths C. 2008. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids and cyclosporine. *Clin Dermatol*. 26(5): 438-447.
- Warren R., Smith R., Campalani E. & et al. 2008. Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 128(8): 1925-1929.
- Weller R. & Hunter J. 2009. *Clinical Dermatology 4th Edition*. Blackwell Publishing .
- Young H. & et al. 2006. Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 126(2): 453-459.