

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ

ΣΟΦΙΑ ΑΛΕΞΟΥΔΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

**ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΩΝ
ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF
PHOSPHODIESTERASES IN AUTOIMMUNE DISEASES**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την κα. Θεολογία Σαραφίδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω τον τρόπο με τον οποίο εργάζονται στο εργαστήριο, να αναπτύξω την ικανότητα της συνεργασίας και να αντιμετωπίσω όποιες δυσκολίες μπορούν να προκύψουν σε αυτά τα πλαίσια αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη την περίοδο της συνεργασίας μας, ήταν κίνητρο για τη συνεχή προσπάθεια βελτίωσής μου. Δίπλα της ανέπτυξα σωστή επιστημονική σκέψη και η μεθοδικότητα και η εργατικότητα της αποτέλεσαν παράδειγμα για εμένα. Ευχαριστώ πολύ επίσης τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Γιακουνή Αντώνιο, Επίκουρο καθηγητή Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής για τη συμμετοχή τους στην τριμελή μου συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Αγγελική-Βικτωρία Ρουσσάκη-Σούλτσε Καθηγήτρια Δερματολογίας και Ζαφειρίου Ευτέρπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Δερματολογίας για τη παροχή των δειγμάτων των ασθενών. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον υποψήφιο Διδάκτορα Πλαγερά Δημήτρη και τον Διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθεια τους σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για το όμορφο κλίμα και την καλή μας συνεργασία.

Τέλος, το ευχαριστώ δεν θα είναι ποτέ αρκετό για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου την αδερφή μου και τους παππούδες μου, την οικογένειά μου, για την αγάπη τους και την εμπιστοσύνη τους.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΨΩΡΙΑΣΗ, ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΠΛΥΘΗΣΜΟ..	8
1.2 ΤΥΠΟΙ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	9
1.3 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	9
1.4 ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	10
1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΨΩΡΙΑΣΗ.....	12
1.6 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΨΩΡΙΑΣΗ.....	17
1.7 Η ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ 4 (PDE4) ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	25
1.8 ΑΠΡΕΜΙΛΑΣΤΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ.....	28
1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	30
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	30
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΑΙΜΑ.....	30
2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	32
2.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DNA.....	34
2.5 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs) ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>PDE4B</i>	35
2.6 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ (SNPs) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PDE4B</i>	36
2.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs4384209 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PDE4B</i>	36
2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.....	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA.....	38
3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs) ΑΠΟ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>PDE4B</i>	39
3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ rs4384209.....	41
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ rs4384209.....	42
3.5 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
----------------------	----

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης παγκοσμίως.....	9
Εικόνα 2. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	10
Εικόνα 3. Οργάνωση των δομών των μικρών και μεγάλων ισομορφών PDE4.....	27
Εικόνα 4. Τρόπος δράσης της απρεμιλάστης.....	29
Εικόνα 5. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γονιδιωματικού DNA.....	39
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου <i>PDE4B</i> και των ομάδων (blocks) που προέκυψαν με βάση την ανισορροπία σύνδεσης στους Ιταλούς (Toskani=TSI).....	40
Εικόνα 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης Gradient PCR.....	42
Εικόνα 8. Σύνολο προϊόντων PCR.....	42
Εικόνα 9. Αποτελέσματα αλληλούχησης- ανάλυση με Chromas.....	43

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Γονίδια και SNPs εντός και πλησίον αυτών, που εντοπίστηκαν σε μελέτες GWAS.....	14
Πίνακας 2. Το σύνολο των θεραπειών που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ψωρίασης (National Psoriasis Foundation).....	17
Πίνακας 3. Συστατικά PCR.....	37
Πίνακας 4. Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή.....	38
Πίνακας 5. Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με απρεμιλάστη.....	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία 10 χρόνια γίνονται άλματα στον τομέα ανάπτυξης φαρμάκων των αυτοάνοσων νοσημάτων και παράλληλα αναπτύσσεται και ο κλάδος της φαρμακογενετικής. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι φαρμακευτικές θεραπείες της ψωρίασης, μιας πολυπαραγοντικής, αυτοάνοσης, ανοσοδιαμεσολαβούμενης διαταραχής. Από το 2014 για τη θεραπεία της ψωρίασης χρησιμοποιείται και η απρεμιλάστη, ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4). Η PDE4 υδρολύει cAMP, με αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως TNF, IFN- γ , IL-12/23p40, IL-23p19, IL-17A και IL-22, που προάγουν τη φλεγμονή. Η απρεμιλάστη με το να καταστέλλει την PDE4, αυξάνει τα επίπεδα cAMP με αποτέλεσμα τη μείωση προφλεγμονωδών μεσολαβητών και την αύξηση αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η IL-6 και η IL-10. Στο πλαίσιο ελέγχου συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου *PDE4* και της απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με απρεμιλάστη, πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του SNP rs4384209 (G/A) στο γονίδιο *PDE4B* σε δείγμα 37 ασθενών που λάμβαναν το συγκεκριμένο φάρμακο για τουλάχιστον 3 μήνες και για τους οποίους υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την απόκρισή τους στη θεραπεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου (0,24) είναι σε συμφωνία με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (0,20). Σχετικά με τις γονοτυπικές συχνότητες, ταυτοποιήθηκαν 14 ετερόζυγοι ασθενείς (G/A), 21 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G) και 2 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (A/A). Η αξιολόγηση της συσχέτισης θα πραγματοποιηθεί όταν συγκεντρωθούν τουλάχιστον εκατό δείγματα ασθενών ώστε η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση να είναι αξιόπιστη.

Λέξεις- κλειδιά: φαρμακογενετική, ψωρίαση, γονίδιο *PDE4B*, απρεμιλάστη, πολυμορφισμός

ABSTRACT

Over the past 10 years, significant progress has been done in the field of drug development of autoimmune diseases as well as in the area of pharmacogenetics, including the treatment for psoriasis, a multifactorial, autoimmune disorder. Since 2014, apremilast, a selective phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, is used for the treatment of psoriasis. PDE4 hydrolyzes cAMP, resulting in the production of proinflammatory mediators such as TNF, IFN- γ , IL-12 / 23p40, IL-23p19, IL-17A and IL-22, that promote inflammation. Apremilast, through PDE4 suppression, increases cAMP levels resulting in decreased proinflammatory mediators and increased anti-inflammatory mediators such as IL-6 and IL-10. In order to test for association between *PDE4* polymorphisms and patient response to apremilast, genotyping of rs4384209 (G/A) located on the *PDE4B* gene was performed. The sample included 37 patients treated with apremilast for at least 3 months. Treatment response has been also assessed for those patients. The results showed that the minor allele frequency (0.24) is in agreement with the frequency for Europeans (0.20). In addition,

14 patients were heterozygous (G/A), 21 homozygous (G/G) for the common allele, and 2 homozygous (A/A) for the rare allele. For statistical power, the association analysis will be performed when at least one hundred patient samples will be collected.

Key- words: pharmacogenetics, psoriasis, *PDE4B* gene, apremilast, polymorphism

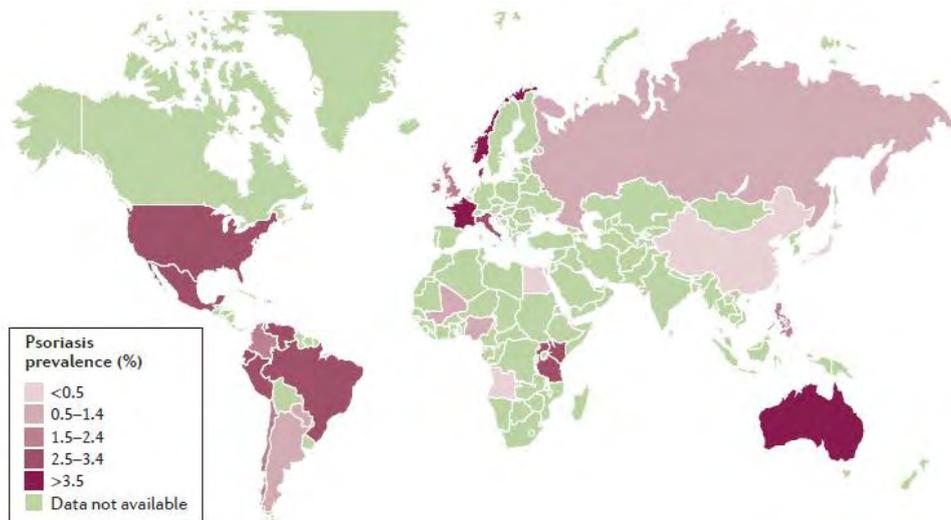
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΩΡΙΑΣΗ, ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΠΛΥΘΗΣΜΟ

Η ψωρίαση είναι μια συχνή ανοσοδιαμεσολαβούμενη δερματολογική διαταραχή που επηρεάζει κυρίως το δέρμα και τις αρθρώσεις και έχει πολυπαράγοντική βάση, δηλαδή εξαρτάται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lebwohl, 2003). Το ποσοστό της ψωρίασης βρέθηκε σημαντικά αυξημένο ($P < 0,05$) στους συγγενείς των ασθενών και το ποσοστό αυτό ήταν πολύ υψηλότερο μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων (65-72%) σε σχέση με τα διζυγωτικά δίδυμα (15-30%), γεγονός που υποδηλώνει ότι η γενετική παίζει ρόλο στην εκδήλωση της ψωρίασης (Gervin *et al*, 2012), (Lonnberg *et al*, 2013), (Pedersen *et al*, 2008).

Το Εθνικό Ίδρυμα Ψωρίασης (National Psoriasis Foundation) έχει ορίσει ως ήπια ψωριασική δερματική νόσο αυτήν που καλύπτει επιφάνεια σώματος (Body Surface Area, BSA) λιγότερο του 3%, μέτρια αυτήν που επηρεάζει το 3-10% και σοβαρή αυτήν που επηρεάζει περισσότερο από το 10% του σώματος. Πρόσθετες ταξινομήσεις ανάλογα με τη σοβαρότητα της ψωρίασης περιλαμβάνουν τον δείκτη έκτασης και σοβαρότητας της ψωρίασης (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) και τη γενική αξιολόγηση του ιατρού (Physician's Global Assessment, PGA) (Langley & Ellis, 2004).

Στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, το ποσοστό της ψωρίασης είναι περίπου 2% (Christophers, 2001) και αυξάνεται κατά προσέγγιση γραμμικά με την ηλικία, από 0,12% σε ηλικία 1 έτους έως 1,2% σε ηλικία 18 ετών (Augustin *et al*, 2010). Η ψωρίαση επηρεάζει περισσότερους από 125 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, με τις γυναίκες και τους άνδρες να επηρεάζονται εξίσου. Επιπλέον, παρουσιάζει διαφορετικά ποσοστά εμφάνισης μεταξύ διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων, για παράδειγμα η συχνότητα στα παιδιά κυμαίνεται από 0% στην Ταϊβάν έως 2,1% στην Ιταλία (Parisi *et al*, 2013), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1**.



Εικόνα 1. Συχνότητα εμφάνισης της ψωρίασης παγκοσμίως (Greb *et al*, 2016).

1.2 ΤΥΠΟΙ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η ψωρίαση μπορεί να εκδηλωθεί με διάφορους φαινοτύπους, βάσει των οποίων διακρίνεται στους εξής έξι τύπους (National Psoriasis Foundation):

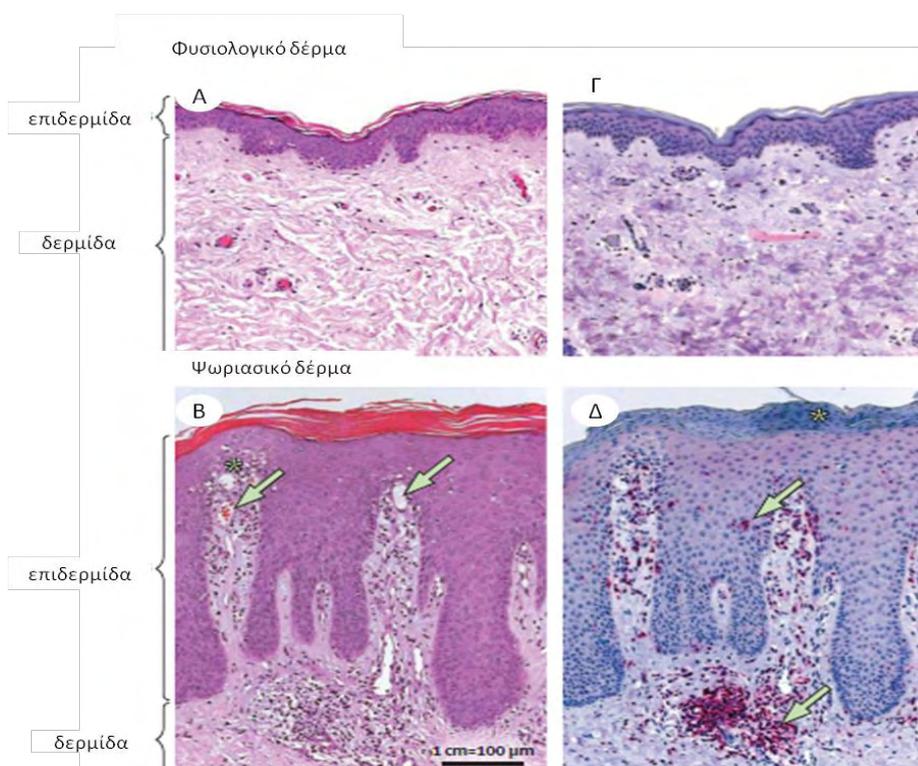
1. Η «κοινή» ψωρίαση ή ψωρίαση κατά πλάκας (αναφερόμενη και ως psoriasis vulgaris)
2. Η σταγονοειδής ψωρίαση (γλουτατική ψωρίαση)
3. Η ανάστροφη ψωρίαση
4. Η φλυκταινώδης ψωρίαση [συμπεριλαμβανομένης της παλαμοπελματιαίας φλυκταινώδους ψωρίασης, της ακροδερματίτιδας του Hallopeau και της γενικευμένης φλυκταινώδους ψωρίασης (von Zumbusch)]
5. Η ερυθροδερμική ψωρίαση
6. Η ψωριασική αρθρίτιδα

Ένας ή και περισσότεροι φαινότυποι ενδέχεται να εμφανιστούν στο ίδιο άτομο, ενώ ο πιο κοινός τύπος ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας (Gudjonsson & Elder, 2012) που αποτελεί το 90% των περιπτώσεων. Οι βλάβες που προκαλεί είναι μονομορφικές, ερυθρηματώδεις πλάκες, οι οποίες μπορεί να είναι λίγες, να εκτείνονται σε μεγαλύτερη επιφάνεια ή να παρουσιάζουν ερυθροδερμία (National Psoriasis Foundation).

1.3 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η ψωρίαση παρουσιάζει χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σχεδόν σε κάθε τύπο κυτάρου του δέρματος (**Εικόνα 2**). Σε αντίθεση με το κανονικό δέρμα (**Εικόνα 2A, B**), το ψωριασικό χαρακτηρίζεται από επιδερμική ακάνθωση και υπερκεράτωση (λόγω της ταχείας ωρίμανσης των κερατινοκυττάρων) καθώς και

παρακεράτωση (διατήρηση των πυρήνων των κερατινοκυττάρων στην κεράτινη στιβάδα), (αστερίσκος, **Εικόνα 2Δ**). Αυτό το φαινόμενο οδηγεί στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών αργυρόχρωμων λεπιών που βρίσκονται στις πλάκες της ψωρίασης. Ακόμη, στην επιδερμίδα σημειώνεται έντονη πάχυνση και επιμήκυνση των ραβδώσεων Rete που είναι επιδερμικές πυκνώσεις, οι οποίες εκτείνονται κάθετα στο θηλώδες χόριο. Επιπλέον, παρατηρείται επιμήκυνση και διαστολή των αιμοφόρων ελικοειδών αγγείων του θηλώδους χορίου, (βέλη **Εικόνα 2B**) που οδηγεί σε εμφάνιση ερυθρότητας στο δέρμα και σε αυξημένη περιαγγειακή φλεγμονώδη διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως Τ-λεμφοκυττάρων μεταξύ της δερμίδας και της επιδερμίδας (**Εικόνα 2B,Δ**). Επιπρόσθετα, παρατηρείται διήθηση αυξημένου αριθμού μακροφάγων, ιστιοκυττάρων, ουδετερόφιλων και κοκκιοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται μέσα στην επιδερμίδα (αστερίσκος στην **Εικόνα 2B**) σχηματίζοντας μικρά σπογγοειδή φλυκταινίδια (φλυκταινίδια του Koçoj) καθώς και μικρά αποστήματα στην κεράτινη στιβάδα, γνωστά ως μικροαποστήματα Munro (Boehncke & Schön, 2015).



Εικόνα 2. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης (Boehncke & Schön, 2015).

1.4 ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Στην εκδήλωση της ψωρίασης τα κύτταρα που έχουν κεντρικό ρόλο είναι τα κερατινοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα Τ-κύτταρα ενώ οι διαταραχές που συμβάλλουν στην εκδήλωση της ασθένειας αφορούν κυρίως την αντιγονοπαρουσίαση, την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of

activated B cells) και τη διαφοροποίηση του πληθυσμού των βοηθητικών T-κυττάρων (Th). Ειδικότερα συμβάλλει η διαφοροποίηση των Th17, τα οποία είναι η πρωταρχική πηγή της ιντερλευκίνης-17 (IL-17), που με τη σειρά της προάγει την ανοσοαπόκριση του ξενιστή και τη διήθηση των ανοσοκυττάρων (Greb *et al*, 2016). Εξωτερικές προσβολές, όπως κάποιο τραύμα, μία λοίμωξη ή ορισμένα φάρμακα, μπορούν να ενεργοποιήσουν την ψωρίαση.

Κατά τη φάση έναρξης της νόσου, απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο το αντιμικροβιακό πεπτίδιο (AMP) LL37 από τα κερατινοκύτταρα. Σύμπλοκα LL37 με DNA που βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο έπειτα από κυτταρικό θάνατο, δεσμεύονται με τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) των δενδριτικών κυττάρων ενεργοποιώντας τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs) και τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs). Η ενεργοποίηση των pDCs έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιντερφερονών (IFN) τύπου I, των IFN α και IFN β , που δρουν επίσης και στα mDCs. Τα ενεργοποιημένα μόνιμα (όχι μεταναστευτικά) mDCs παράγουν τις κύριες κυτοκίνες ενεργοποίησης της ψωρίασης, τις ιντερλευκίνες (IL) 12 και 23. Επιπλέον, πιστεύεται ότι το LL37 αναγνωρίζεται από τα T-κύτταρα του κυκλοφορικού συστήματος των ασθενών, ως αυτοαντιγόνο (Lande *et al*, 2014). Τα ειδικά για το LL37 T-κύτταρα παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-17.

Κατά τη διάρκεια της κύριας φάσης της ψωρίασης, ώριμα δερματικά δενδριτικά κύτταρα και φλεγμονώδη μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα οδηγούν στην προσαρμοστική και φλεγμονώδη απόκριση (Nestle *et al*, 1994). Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν IL-23 και IL-12, που ενεργοποιούν τα Th17, Th1 και Th22 κύτταρα. Η ενεργοποίηση αυτού του υποσυνόλου των T-κυττάρων οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή κυτοκινών όπως, οι IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 και IL-36, οι οποίες διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα. Η IL-21 υπερεκφράζεται στις αλλοιώσεις του ψωριασικού δέρματος και προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Caruso *et al*, 2009). Η έκφραση της IL-22 ρυθμίζεται από τον υποδοχέα αρυλυδρογονανθράκων (AhR) που δρα ως παράγοντας μεταγραφής σε Th17 κύτταρα, γδ T-κύτταρα και έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα τύπου 3 (Type 3 innate lymphoid cells, ILC3) (Rutz *et al*, 2014). Η IL-26 των Th17 κυττάρων υπερεκφράζεται επίσης σε ψωριασικές βλάβες (Wilson *et al*, 2007). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η IL-26 σχηματίζει σύμπλοκα με εξωκυτταρικό DNA που απελευθερώνεται κατά το θάνατο βακτηρίων και από κύτταρα ξενιστές. Τα σύμπλοκα αυτά, προάγουν την επαγόμενη από τον TLR9 ενεργοποίηση των pDCs και την παραγωγή IFN τύπου I (Meller *et al*, 2015). Τα κερατινοκύτταρα μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF α) και την IFN γ των οδών των Th1 κυττάρων και ως αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού τους παράγουν κυτοκίνες (IL-1, IL-6 και TNF α), χημειοκίνες και AMPs, προκαλώντας περαιτέρω δερματική φλεγμονή.

Οι IFNs, IL-12, IL-22 και IL-23 ενεργοποιούν την κινάση Janus (JAK) και τους παράγοντες STAT, που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ρυθμίζουν τη μεταγραφή προφλεγμονωδών γονιδίων. Ο TNF α δρα μέσω του μονοπατιού NF- κ B και οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρική

διαφοροποίηση και απόπτωση. Η ενδοκυτταρική κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ρυθμίζει την απόκριση των T-λεμφοκυττάρων, μειώνοντας την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF α , IFN γ , IL-2, IL-12 και IL-23 αυξάνοντας την αντιφλεγμονώδη IL-10.

1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΨΩΡΙΑΣΗ

Οι μελέτες γενετικής σύνδεσης, ήταν οι πρώτες που εφαρμόστηκαν για τη συλλογή πληροφοριών που αφορούν την γενετική βάση της ψωρίασης. Με τέτοιες μελέτες προσδιορίστηκαν 10 γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ψωρίαση, οι: PSORS1 (6p21.33), PSORS2 (17q25), PSORS3 (4q), PSORS4 (1q21), PSORS5 (3q21), PSORS6 (19p13), PSORS7 (1p), PSORS8 (16q), PSORS9 (4q31-q34) και PSORS10 (18p11.23). Καλά χαρακτηρισμένες είναι 4 από αυτές τις περιοχές (Oka *et al*, 2012). Από αυτές τις περιοχές μόνο η PSORS1 επιβεβαιώθηκε σε όλες τις μελέτες. Τα ασθενέστερα σήματα σύνδεσης τα έδωσαν οι γενετικοί τόποι PSORS2 και PSORS4, οι οποίοι όμως βρέθηκαν σε παραπάνω από μία μελέτες, ενώ οι υπόλοιπες χρωμοσωματικές περιοχές δεν μπόρεσαν να επανεπιβεβαιωθούν σε ανεξάρτητες μελέτες (The International Psoriasis Genetics Consortium, 2003), (Caron, 2017).

Στην περιοχή PSORS1 στη χρωμοσωματική περιοχή 6p21 εντοπίζεται το κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC). Μετά την επιβεβαίωση της σύνδεσης σε αυτή την περιοχή, προσδιορίστηκε η ελάχιστη κρίσιμη περιοχή μεγέθους 150kb που κάλυπτε την περιοχή MHC τάξης I και περιλάμβανε εννέα γονίδια (Nair *et al*, 2006). Από αυτά, τρία (*HLA-C*, *CCHCR1* και *CDSN*) είναι πολύ πολυμορφικά και περιλαμβάνουν παραλλαγές στην κωδική περιοχή που συσχετίστηκαν σημαντικά με την ψωρίαση (Caron *et al*, 2002). Το *HLA-C* κωδικοποιεί έναν υποδοχέα MHC τάξης I που συμμετέχει σε ανοσοαποκρίσεις μέσω της παρουσίασης αντιγόνων σε CD8+ T λεμφοκύτταρα. Δεδομένου του ρόλου του *HLA-C* στην παρουσίαση αντιγόνου, ελέγχθηκε αν το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης για ένα ή περισσότερα αυτοαντιγόνα που εντοπίζονται σε ασθενείς με ψωρίαση. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι το *HLA-Cw6* μπορεί να παρουσιάσει ένα συγκεκριμένο αυτοαντιγόνο των μελανοκυττάρων (ADAMTS-5) σε CD8+ T κύτταρα. Μελέτες δομικής βιολογίας έχουν επίσης δείξει ότι το *HLA-Cw6* έχει υψηλή συγγένεια για το LL37, ένα μόριο που αποτελεί αυτοαντιγόνο των T-κυττάρων στην ψωρίαση (Arakawa *et al*, 2015), (Mabuchi & Hirayama, 2016). Το *CCHCR1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 782 αμινοξέων που εκφράζεται διαφορετικά σε αλλοιωμένο ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα, παίζει επίσης ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού καθώς και στο μεταβολισμό του mRNA (Tervaniemi *et al*, 2018). Το *CDSN* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη των κερατινοκυττάρων που εμπλέκεται στην απολέπιση του δέρματος, μια διαδικασία που είναι γνωστό ότι μεταβάλλεται στην ψωρίαση (Jonca *et al*, 2011).

Στην περιοχή PSORS2 εφαρμόζοντας αλληλούχηση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), σε ασθενείς βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CARD14* (το σύμπλοκο πρωτεΐνης *CARD14* και NF-κB ρυθμίζει τη δραστηριότητα πολλαπλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που ελέγχουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις του σώματος και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις). Οι μεταλλάξεις του *CARD14* που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι τώρα είναι αλληλόμορφα κέρδους-λειτουργίας, οι οποίες προκαλούν ιδιοστατική ενεργοποίηση του NF-κB, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών (Jordan *et al*, 2012). Η περιοχή PSORS4 περιλαμβάνει το Epidermal Differentiation Cluster (EDC), ένα εξελικτικά συντηρημένο χρωμοσωματικό τμήμα, που φέρει περισσότερα από 60 γονίδια που εμπλέκονται στην τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Oh & de Guzman Strong, 2017). Μελέτες έχουν δείξει ότι το έλλειμμα δύο γονιδίων του EDC, των *LCE3B* και *LCE3C* τα οποία κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στα τελικά στάδια κερατινοποίησης συνδέονται έντονα με την εκδήλωση της ψωρίασης (Riveira-Munoz *et al*, 2011). Στο χρωμόσωμα 3 η περιοχή PSORS5 (3q21), σε μια ανάλυση σύνδεσης σε σουηδικές οικογένειες παρουσιάζεται ως τόπος ευαισθησίας στην ψωρίαση. Επακόλουθη χαρτογράφηση από την ίδια ομάδα, κυρίως με τη χρήση δεικτών SNP, περιόρισε την κρίσιμη περιοχή σε 250 kb και πρότεινε το *SLC12A8* (που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταφοράς κατιόντων χλωρίου) ως υποψήφιο γονίδιο για την εκδήλωση της ψωρίασης. (Oka *et al*, 2012).

Πιο πρόσφατα άρχισαν να εφαρμόζονται μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS). Η πρώτη GWAS για την ψωρίαση πραγματοποιήθηκε το 2007, και είχε ως στόχο τη γονοτύπηση 25.125 SNP σε 466 δείγματα ασθενών και 500 δείγματα ελέγχου (Cargill *et al*, 2007). Κατά τα επόμενα έτη πραγματοποιήθηκαν αρκετές επιπλέον μελέτες, ενώ πρόσφατα πραγματοποιήθηκε μία GWAS με 19.000 ασθενείς και 280.000 άτομα ελέγχου κατά την οποία γονοτυπήθηκαν 9 εκατομμύρια SNPs (Tsoi *et al*, 2017).

Κάποιες από τις περιοχές που βρέθηκαν να συσχετίζονται με την ψωρίαση σε μελέτες γενετικής σύνδεσης, περιέχουν SNPs που ταυτοποιήθηκαν και με τις μελέτες GWAS, όπως οι γενετικοί τόποι PSORS1 και PSORS4 (Oka *et al*, 2012). Το σύνολο των SNPs που έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με την ψωρίαση παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Γονίδια και SNPs εντός και πλησίον αυτών, που εντοπίστηκαν σε μελέτες GWAS (Di Meglio <i>et al</i> , 2014)				
Τύπος κυττάρου που συμμετέχει στην εκδήλωση της ψωρίασης	Γονίδιο/α	Πρωτεϊνική λειτουργία-Μονοπάτι	SNP	Pubmed ID
Ειδικά δερματικά	<i>LCE3B/3C/3D</i>	Δομική πρωτεΐνη κερατινοκυττάρων- Συγκρότηση δερματικού φραγμού	rs4112788, rs4085613	19169253, 20953188
	<i>KLF4</i>	Μεταγραφικός παράγοντας- Συγκρότηση δερματικού φραγμού, σηματοδότηση IL-17	rs10979182	23143594
	<i>ETS1</i>	Μεταγραφικός παράγοντας- Άγνωστο	rs3802826	23143594
Κύτταρα που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία	<i>IL-28RA</i>	Υπομονάδα του υποδοχέα της IL-29- σηματοδότηση IFN	rs4649203	20953190
	<i>IFIH1</i>	Αντιικός υποδοχέας-σηματοδότηση IFN	rs17716942	20953190
	<i>RNF114</i>	Λιγάση ουβικιτίνης E3-σηματοδότηση IFN	rs495337	18364390, 19169254, 20953190, 20953189
	<i>ELMO1</i>	Πρωτεΐνη κυτταρικής κινητικότητας συμμετέχει στην διαμεσολαβούμενη από τον υποδοχέα τύπου Toll IFN σηματοδότηση	rs2700987	23143594
	<i>DDX58</i>	Αντιικός υποδοχέας-σηματοδότηση IFN	rs11795343	23143594
	<i>NOS2</i>	Επαγωγέας της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου-Φλεγμονή	rs4795067	20953189
	<i>REL</i>	Υπομονάδα του NF-κB-σηματοδότηση NF-κB	rs702873	20953190
	<i>TNIP1, TNFAIP3</i>	Αναστολέας της επαγόμενης από τον TNF ενεργοποίησης του NF-κB- σηματοδότηση NF-κB	rs17728338, rs610604	19169254, 20953190, 20953187
	<i>NFKBIA</i>	Αναστολέας της ενεργοποίησης του NF-κB-σηματοδότηση NF-κB	rs12586317, rs8016947, rs2145623	20953190, 20953189
	<i>FBXL19</i>	Αναστολέας της ενεργοποίησης του NF-κB -σηματοδότηση NF-κB	rs10782001, rs12924903	20953189
	<i>CARD14</i>	Ενεργοποιητής του NF-κB μονοπατιού-NF-κB σηματοδότηση	rs11652075	23143594
	<i>CARM1</i>	Μεταγραφικός συνενεργοποιητής του NF-κB- σηματοδότηση NF-κB	rs892085	23143594
	<i>UBE2L3</i>	Ένζυμο που συμβάλλει στη σύζευξη της ουβικιτίνης-σηματοδότηση NF-κB	rs4821124	22482804, 23143594

Κύτταρα που παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας	<i>TRAF3IP2</i>	Μόριο προσαρμογέας που μεσολαβεί στην επαγόμενη από IL-17 ενεργοποίηση του NF-κB- μονοπάτι άξονα IL-23/IL-17 και σηματοδότηση NF-κB	rs13210247, rs33980500, rs240993, rs458017	20953188, 20953190
	<i>IL-12B</i>	Κοινή υπομονάδα των IL12/IL-23- συμμετοχή στο μονοπάτι του άξονα IL-23/IL-17	rs3212227, rs3213094, rs7709212, rs12188300, rs2546890, rs953861, rs2082412	17236132, 18364390, 19169254, 20953188, 23143594
	<i>IL-23A</i>	Μοναδική υπομονάδα της IL-23- μονοπάτι άξονα IL-23/IL-17	rs2066808	19169254, 20953190
	<i>TYK2</i>	Κινάση τυροσίνης που σχετίζεται με τους υποδοχείς κυτοκινών- σηματοδότηση IFN άξονας IL-23 / IL-17	rs12720356, rs280519	20953190
	<i>HLA-C</i>	Αντιγόνο MHC I-Αντιγονο-παρουσίαση	rs3134792, rs12191877, rs10484554, rs4406273, rs12111032, rs2243868, rs3906272	18364390, 19169254, 10.1038/ng.310, 20953188, 20953190, 23143594
	<i>ERAP1</i>	Ένζυμο επεξεργαστής των προσδετών των MHC I - Αντιγονο-παρουσίαση	rs27524, rs151823	20953190, 20953187
Κύτταρα που συμμετέχουν στην προσαρμοστική ανοσία	<i>IL-23R</i>	Μοναδική υπομονάδα του συμπλέγματος του υποδοχέα της IL-23- μονοπάτι άξονα IL-23/IL-17	rs11209026, rs1004819, rs2201841, rs1884444, rs7530511, rs9988642	20953190, 20953188, 17236132, 18364390, 19169254, 23143594
	<i>STAT3</i>	Μεταγραφικός παράγοντας άξονα IL-23/IL-17	rs963986	23143594
	<i>IRF4</i>	Μεταγραφικός παράγοντας-σηματοδότηση IL-17	rs9504361	23143594
	<i>RUNX3</i>	Μεταγραφικός παράγοντας-συνεργάζεται με το μεταγραφικό παράγοντα T-bet στο μονοπάτι διαφοροποίησης T-κυττάρων	rs7536201	23143594
	<i>IL-4/IL-13</i>	Κυτοκίνες IL-4 και IL-13-σηματοδότηση IL-4/IL-13	rs20541	19169254
	<i>TNFRSF9</i>	Μόριο προσαρμογέας- Διαφοροποίηση T-κυττάρων	rs11121129	22482804, 23143594
	<i>TAGAP</i>	RhoGTPάση- Ενεργοποίηση T-κυττάρων	rs2451258	23143594
	<i>ZMIZ1</i>	Πρωτεϊνικός αναστολέας των ενεργοποιημένων πρωτεϊνών STAT (PIAS)- Σηματοδότηση TGF-b	rs1250546	22482804, 23143594
	<i>SOCS1</i>	Καταστολέας της σηματοδότησης από κυτοκίνη- σηματοδότηση IFN II	rs367569	23143594

Άλλος	<i>PRDX5</i>	Αντιοξειδωτικό ένζυμο-Ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγή σηματοδότηση	rs694739, rs645078	22482804, 23143594
	<i>B3GNT2</i>	Ένζυμο-Μεταβολισμός υδατανθράκων	rs10865331	23143594
	<i>MBD2</i>	Μεταγραφικός καταστολέας-Άγνωστο	rs545979	23143594
	<i>ZC3H12C</i>	Πρωτεΐνη με δακτύλιο ψευδαργύρου και ενεργότητα RNάσης-Άγνωστο	rs4561177	23143594
Νέοι γενετικοί τόποι (Tsoi <i>et al</i>, 2017)				
Κοντινά γονίδια	SNP	Κοντινά γονίδια	SNP	
<i>FUBP1</i>	rs34517439	<i>BRAP, MAPKAPK5</i>	rs11065979	
<i>FASLG</i>	rs12118303	<i>IL31</i>	rs11059675	
<i>IKBKE</i>	rs41298997	<i>UBAC2, RN7SKP9</i>	rs9513593	
<i>ZNF365</i>	rs2944542	<i>RP11-61O1.1</i>	rs142903734	
<i>PTEN, KLLN, SNORD74</i>	rs76959677	<i>KLF13</i>	rs28624578	
<i>CHUK</i>	rs61871342	<i>TRIM47, TRIM65</i>	rs55823223	
<i>CFL1, FIBP, FOSL1</i>	rs118086960	<i>PTPN2</i>	rs559406	
<i>KLRK1, KLRC4</i>	rs11053802	<i>FUT2</i>	rs492602	

Ακόμη, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες δεν μεταβάλλουν την αλληλουχία του DNA αλλά μπορούν να μεταβιβάσουν στους απογόνους, μπορεί να είναι υπεύθυνες για την ασθένεια. Μελέτες έδειξαν ότι το ποσοστό μεθυλίωσης του DNA σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) ασθενών είναι αυξημένο, με συνέπεια την αύξηση ή την μείωση της έκφρασης διάφορων ρυθμιστικών παραγόντων. (Zhang *et al*, 2013, Yan *et al*, 2015).

Εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, είναι ευρέως αποδεκτό ότι και το περιβάλλον έχει τη δική του συμβολή στην εκδήλωση των συμπτωμάτων της ψωρίασης. Κάποιοι από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της ψωρίασης είναι τα φάρμακα, το κάπνισμα, η διατροφή-παχυσαρκία, το αλκοόλ, οι λοιμώξεις και το άγχος (Zeng *et al*, 2017). Ένα παράδειγμα γενετικής και περιβαλλοντικής συνέργειας είναι η συνδυαστική επίδραση του αλληλομόρφου HLA-Cw6 και του καπνίσματος. Ο κίνδυνος για εκδήλωση της ψωρίασης είναι 11 φορές μικρότερος για μη καπνιστές που δεν έχουν το HLA-Cw6 σε σύγκριση με τους καπνιστές που φέρουν το HLA-Cw6 στους Κινέζους (Jin *et al*, 2009).

1.6 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΨΩΡΙΑΣΗ

Μέχρι και σήμερα, τα συστημικά φάρμακα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ως πρώτη γραμμή θεραπείας για τους ασθενείς με μέτρια και σοβαρή ψωρίαση οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στις τοπικές θεραπείες και στη φωτοθεραπεία. Τα συστημικά φάρμακα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις μη βιολογικές θεραπείες (χορηγούνται συνήθως ως ταμπλέτες ή κάψουλες) και τους βιολογικούς παράγοντες (συνήθως χορηγούνται ενέσιμα). Τρεις μη βιολογικοί παράγοντες αποτελούν την πρώτη γραμμή θεραπείας της ψωρίασης, η μεθοτρεξάτη (ανταγωνιστής φολικού οξέος), η κυκλοσπορίνη Α (καταστολέας Τ-λεμφοκυττάρων) και η ακιτρετίνη (ρετινοειδής), (Prieto-Pérez *et al*, 2013). Αν και αυτές οι θεραπείες είναι πολύ αποτελεσματικές, περίπου το 30-50% των ασθενών έχουν ανεπαρκή απόκριση. Πλέον, υπάρχουν πολυάριθμοι βιολογικοί παράγοντες που έχουν εγκριθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης. Τέτοιοι είναι οι αναστολείς του TNFα (etanercept, adalimumab, infliximab), οι αναστολείς των IL-12/23 (ustekinumab), οι αναστολείς της IL-17 (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) και οι αναστολείς της IL-23 (tildrakizumab, guselkumab), όπως παρουσιάζονται και στον **Πίνακα 2**. Ωστόσο, τα ποσοστά απόκρισης στις συστημικές θεραπείες για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κυμαίνεται από 35 έως 80%, γεγονός που χρήζει άμεση την ανάγκη εντοπισμού βιοδεικτών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην πρόβλεψη των θεραπειών και στην εξατομικευμένη φροντίδα των ασθενών. Αυτοί οι στόχοι αποτελούν και το αντικείμενο της φαρμακογενετικής (Ovejero-Benito *et al*, 2018).

Πίνακας 2. Το σύνολο των θεραπειών που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ψωρίασης (National Psoriasis Foundation)			
Τοπικές θεραπείες	Ήπια ψωρίαση		
	Μη συνταγογραφούμενες τοπικές θεραπείες: σαλικυλικό οξύ, πίσσα, ενυδατικές ουσίες, διαλύματα μπάνιου, απολεπιστικές ουσίες, αντικνησμώνδες ουσίες		
	Μη στεροειδείς συνταγογραφούμενες τοπικές θεραπείες: καλσιποτριόλη, καλσιποτριόλη μονοϋδρική - διπροπιονική βηταμεθαζόνη, ταζαροτένη, καλσιτριόλη, ανθραλίνη		
	Στεροειδείς συνταγογραφούμενες τοπικές θεραπείες: προέρχονται από τις φυσικές κορτικοστεροειδείς ορμόνες που παράγονται από τα επινεφρίδια - είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη θεραπεία για την ψωρίαση		
Φωτοθεραπεία	Υπεριώδης ακτινοβολία Β (UVB) UVB φωτοθεραπεία, ηλιακή ακτινοβολία (UVB, UVA), Psoralen + UVA (PUVA), θεραπείες laser		
	Μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση		
		Τρόπος δράσης	Χρονολογία έγκρισης ως θεραπεία για την ψωρίαση

Συστημικές θεραπείες	Μεθοτρεξάτη	Ανταγωνιστής φολικού οξέος που δεσμεύεται και αναστέλλει τη ρεδοκτάση του διυδροφυλλικού οξέος που εμπλέκεται στην ταχεία ανάπτυξη των δερματικών κυττάρων με αποτέλεσμα να επιβραδύνει τον ρυθμό ανάπτυξης τους	1970 για τη βαριά μορφή ψωρίασης
	Soriatane (ακιτρετίνη)	Ρετινοειδές, συνθετική μορφή βιταμίνης Α. Τα ρετινοειδή ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ταχύτητα με την οποία τα κύτταρα του δέρματος αναπτύσσονται και πεθαίνουν	1980 για τη βαριά μορφή ψωρίασης
	Neoral (κυκλοσπορίνη)	Καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα και τη δραστηριότητα ορισμένων κυττάρων του, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των δερματικών κυττάρων	1997 για τη βαριά μορφή ψωρίασης
	Otezla (απρεμιλάστη)	Ειδικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4) η οποία ελέγχει σημαντικά την εξέλιξη της φλεγμονής εντός των κυττάρων	2014 για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση
Βιολογικοί παράγοντες	Αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α)	Cimzia (κερτολιζο υμάμπη πεγόλη)	2018 για την μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση
		Enbrel (ετανερσέ πτη)	2004 για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση και 2016 για τη θεραπεία παιδιών 4 ετών και άνω με ψωρίαση
		Humira (αδαλιμου μάμπη)	Στοχεύει την κυτοκίνη TNF-α 2008 για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση
		Remicade (ινφλιξιμά μπη)	2006 για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση

Βιολογικοί παράγοντες	Αναστολείς ιντερλευκίνης 12 και 23 (IL-12/23)	Stelara (ουστεκιν ουμάμπη)	Στόχευση των κυτταροκινών IL-12 και IL-23, που σχετίζονται με την ψωριασική φλεγμονή	2009 για τη μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση και 2017 για εφήβους ηλικίας 12 ετών και άνω με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση
	Αναστολείς ιντερλευκίνης 17 (IL-17)	Cosentyx (σεκουκιν ουμάμπη) Taltz (ιξεκιζουμ άμπη) Siliq (βροδαλο υμάμπη)	Προσκολλάται στην κυτοκίνη IL-17, η οποία εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις Δεσμεύεται στον υποδοχέα της IL-17 (IL-17 RA) μέσω του οποίου η IL-17 προκαλεί φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις	2015 για ψωρίαση 2016 για μέτρια-σοβαρή ψωρίαση 2017 για ψωρίαση
	Αναστολείς ιντερλευκίνης 23 (IL-23)	Tremfya (γκουσελκ ουμάμπη) Ilumya (τιλδρακιζ ουμάμπη-asmn)	Αναστέλλει την IL-23	2017 έγκριση για τη θεραπεία της ψωρίασης 2018 έγκριση για μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση

Οι πρώτες φαρμακογενετικές μελέτες στην ψωρίαση αφορούσαν τις συστημικές θεραπείες (μεθοτρεξάτη, ακιτρετίνη, κυκλοσπορίνη). Αρκετές φαρμακογενετικές μελέτες έχουν αναζητήσει SNPs που μπορούν να προβλέψουν την απόκριση της θεραπείας στη μεθοτρεξάτη (Sutherland *et al*, 2016). Η πρώτη μελέτη διερεύνησε αν τα SNPs σε διαμεμβρανικούς μεταφορείς μεθοτρεξάτης και σε υποδοχείς αδενοσίνης, σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα ή/και με την τοξικότητα του φαρμάκου. Το δείγμα περιελάμβανε 374 ασθενείς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας, που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με μεθοτρεξάτη για τουλάχιστον 3 μήνες. Τρία SNPs του μεταφορέα εκροής *ABCC1* τα rs35592 (p-value= 0,008), rs2238476 (p-value= 0,02), rs28364006 (p-value=0,02) φάνηκαν να σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, ενώ έξι SNPs του ίδιου γονιδίου, τα rs11075291 (p-value=0,008), rs1967120 (p-value=0,01), rs3784862 (p-value=0,002),

rs246240 (p-value=0,0006), rs3784864 (p-value=0,03), rs2238476 (p-value=0,01) συσχετίστηκαν με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών/τοξικότητας. Επίσης, δύο SNPs του μεταφορέα εκροής *ABCG2*, τα rs13120400 (p-value=0,03) και rs17731538 (p-value=0,007) φάνηκαν να συσχετίζονται με την αποτελεσματικότητα στη μεθοτρεξάτη. Τέλος, βρέθηκαν άλλα δύο SNPs, ένα στο γονίδιο του μεταφορέα μεθοτρεξάτης *SLC19A1* (rs1051266, p-value=0,03) και ένα στο γονίδιο του υποδοχέα αδενοσίνης *ADORA2a* (rs5760410, p-value=0,03) τα οποία συσχετίστηκαν με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών/τοξικότητας (Warren *et al*, 2008).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, αναλύθηκαν φαρμακογενετικοί δείκτες απόκρισης στη μεθοτρεξάτη σε 189 ασθενείς με βαριά μορφή ψωρίασης του νοτίου Ινδικού Ταμίλ. Στο τέλος των 16 εβδομάδων, υπήρχαν 132 ασθενείς με PASI>75 οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν αποκρινόμενοι και 57 ασθενείς με PASI<50 οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως μη αποκρινόμενοι. Μελετήθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια που συσχετίζονται με την παθογένεση της ψωρίασης, δηλαδή τα *HLA-A2*, *HLA-B17*, *HLA-Cw6*, τα ελλείμματα των *LCE3B/3C*, *IL-12B*, *IL-23R*, *IFN-γ*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-10*, *TNFAIP3*, *TNIP1* και *FOXP3*. Ένα πολύ σημαντικό εύρημα ήταν η σημαντική διαφορά στις συχνότητες των γονότυπων των *HLA-Cw6* και *FOXP3* (rs3761548) που παρατηρήθηκε μεταξύ των αποκρινόμενων και μη στη μεθοτρεξάτη (p<0.005). Έτσι, το *HLA-Cw6* δρα ως δείκτης απόκρισης στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη, ενώ το *FOXP3* (rs3761548) προβλέπει την κλινική απόκριση στη μεθοτρεξάτη αλλά όχι τον κίνδυνο εκδήλωσης της ψωρίασης (Indhumathi *et al*, 2017).

Τέλος, μια ακόμη μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση εξέτασε εάν συχνοί πολυμορφισμοί σε μεταβολικά ένζυμα φολικού οξέος, πυριμιδίνης και πουρίνης συσχετίζονται με την αποτελεσματικότητα και/ή την τοξικότητα της μεθοτρεξάτης. Συνολικά, από τους 193 ασθενείς που ολοκλήρωσαν την θεραπευτική αγωγή με μεθοτρεξάτη για 3 μήνες, οι 114 προσδιορίστηκαν ως αποκρινόμενοι στη μεθοτρεξάτη, 44 ως μη ανταποκρινόμενοι και 35 ως απροσδιόριστοι καθώς οι κλινικές πληροφορίες δεν ήταν διαθέσιμες, ήταν ελλιπείς ή δεν πληρούσαν τα κριτήρια για τον ορισμό της απόκρισης ή μη. Από τη γονοτύπηση προέκυψε ότι το αλληλόμορφο 3R που βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) του γονιδίου της θυμιδυλικής συνθετάσης *TS* (αλληλόμορφο *TS* 5'-UTR 3R) συσχετίζεται με κακή θεραπευτική απόκριση στη μεθοτρεξάτη. Όταν αναλύθηκαν όλοι οι ασθενείς, οι ασθενείς με το σπάνιο αλληλόμορφο είχαν σχεδόν τρεις φορές μικρότερη πιθανότητα να ανταποκριθούν στη θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν το συχνό αλληλόμορφο. Ωστόσο, η συσχέτιση χάθηκε όταν οι ασθενείς με παλαμοπελματιαία φλυκταινώδη ψωρίαση δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Επίσης, σημαντική συσχέτιση υπήρξε μεταξύ του αλληλόμορφου *TS* 5'-UTR 3R και της αυξημένης τοξικότητας της μεθοτρεξάτης σε ασθενείς που δεν έλαβαν φολικό οξύ. Οι ομόζυγοι για το *TS* 5'-UTR 3R/3R ήταν 13 φορές πιο πιθανό να παρουσιάσουν οποιαδήποτε παρενέργεια, 15 φορές πιο πιθανό να αναπτύξουν ηπατοτοξικότητα και σχεδόν 12 φορές πιο πιθανό να εμφανίσουν κάποια παρενέργεια σε σχέση με άλλους γονοτύπους (P = 0,029). Όταν εφαρμόστηκε ένα μοντέλο που συνδυάζει ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες για το αλληλόμορφο 3R, ο συνολικός κίνδυνος εμφάνισης

τοξικότητας μειώθηκε σε 3 φορές και δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση με ηπατοτοξικότητα. Ακόμη, το αλληλόμορφο του φορέα φολικού οξέος, *RFC 80A* που παρουσιάζει έλλειμα και η απαλοιφή 6 bp της 3'-UTR του γονιδίου της θυμιδυλικής συνθετάσης *TS* συσχετίστηκαν με τοξικότητα στη μεθοτρεξάτη ($P=0,025$ και $P=0,025$ αντίστοιχα). Τέλος, τα αλληλόμορφα *RFC 80A* και *ATIC* (5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμιδικής ριβονουκλεοτιδικής μετασχηματάσης) 347G συσχετίστηκαν με διακοπή της μεθοτρεξάτης ($P=0,048$ και $P=0,038$) (Campalani *et al*, 2007).

Εκτός από τη μεθοτρεξάτη, υπάρχει μια φαρμακογενετική μελέτη σε 84 ασθενείς με ψωρίαση που αφορά την απόκριση στην κυκλοσπορίνη A. Από αυτούς, το 62% ορίστηκαν ως αποκρινόμενοι και το 38% ως μη αποκρινόμενοι. Η γονοτύπηση των SNPs T-129C, G1199A, C1236T, G2677T και C3435T του *ABCB1* έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του SNP 3435T με αρνητική απόκριση ($P=0,0075$) στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη A (Vasilopoulos *et al*, 2014).

Δύο ακόμη φαρμακογενετικές μελέτες αφορούν την απόκριση στην ακιτρετίνη. Στην πρώτη μελέτη συμπεριελήφθησαν 124 ασθενείς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με ακιτρετίνη για τουλάχιστον 3 μήνες. Από την ανάλυση συσχέτισης φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός -460 του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα *VEGF*, έχει ρόλο στην πρόβλεψη απόκρισης ή μη στην ακιτρετίνη ($P=0,01$). Ειδικότερα, ο γονότυπος -460TT (rs833061) συσχετίστηκε με μη απόκριση ενώ ο -460TC με σημαντική απόκριση στη θεραπεία (Young *et al*, 2006). Στη δεύτερη μελέτη, με στόχο το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E, στην οποία πήραν μέρος 106 ασθενείς αποκρινόμενοι στη θεραπεία με ακιτρετίνη και 84 ασθενείς μη αποκρινόμενοι, δεν βρέθηκε κανένα SNP του γονιδίου να σχετίζεται με την απόκριση στη θεραπεία (Campalani *et al*, 2006).

Φαρμακογενετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί επίσης και σε βιολογικές θεραπείες. Λίγες μελέτες έχουν αναλύσει τη σχέση μεταξύ του αλληλομόρφου HLA-C:06:02 και την απόκριση σε θεραπείες με αντι-TNF. Μια τέτοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 138 Βρετανούς και Ιρλανδούς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας, δεν μπόρεσε να προβλέψει συσχέτιση του αλληλομόρφου HLA-C:06:02 με απόκριση στη θεραπεία με ετανερσέπτη και αδαλιμουμάμπη (Ryan *et al*, 2014). Σε συμφωνία με το παραπάνω, μια μελέτη σε 109 Ισπανούς ασθενείς διαπίστωσε ότι το αλληλόμορφο HLA-C:06:02 δεν συσχετίζεται με απόκριση σε θεραπεία με αδαλιμουμάμπη, ετανερσέπτη ή ινφλιξιμάμπη (Gallo *et al*, 2013). Παρομοίως, σε μελέτη σε ευρωπαϊκό πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μετά από τριετή θεραπεία με αδαλιμουμάμπη μεταξύ 46 ασθενών με το αλληλόμορφο HLA-C:06:02 και 76 ασθενών που δεν είχαν αυτό το αλληλόμορφο (Talamonti *et al*, 2017).

Αντίθετα αποτελέσματα φαίνεται να προκύπτουν από άλλες μελέτες. Μία μελέτη σε ισπανικό πληθυσμό, με 116 άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο HLA-C:06:02 και το LCE-I (ID/II) του γονιδίου του επιδερμικού φραγμού *LCE* (late-cornified envelope) έδειξε ότι ήταν πιο πιθανό να ανταποκρίνονται σε φάρμακα αντι-TNF (Batalla *et al*, 2015). Μια ακόμη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό με 250

ασθενείς διαπίστωσε ότι ο πολυμορφισμός rs1048554, που βρίσκεται κοντά στον γενετικό τόπο HLA-C, συσχετίστηκε με καλύτερη απόκριση των ασθενών στα φάρμακα αντι-TNF. Επιπλέον, οι ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο A (rs610604) του HLA-C, είχαν καλύτερη απόκριση στην αδαλιμουμάμπη (Masouri *et al*, 2016).

Θετική απόκριση στις αντι- TNF θεραπείες προκύπτει από τη μελέτη και άλλων γενετικών τόπων. Μια φαρμακογενετική μελέτη που αφορά τον υποδοχέα ανοσοσφαιρίνης (FCGR), στην οποία συμμετείχαν 35 ασθενείς, έδειξε ότι οι ομόζυγοι ασθενείς για τον υποδοχέα υψηλότερης συγγένειας (FF) στο γονίδιο FCGR3A (rs396991) ήταν πιθανότερο να ανταποκρίνονται στη θεραπεία με φάρμακα αντι-TNF (Tutuncu *et al*, 2005). Όσον αφορά την πρωτεΐνη FCGR2A, η ιστιδίνη (H) που βρίσκεται στη θέση 131 σχετίζεται με υψηλή συγγένεια για ανοσοσφαιρίνη-γ (IgG), ενώ η παρουσία ασπαραγίνης (R) σχετίζεται με χαμηλή συγγένεια. Τα SNPs FCGR2A-H131R και FCGR3A-V158F συσχετίστηκαν με καλύτερη απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF σε μελέτη 70 ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Julia *et al*, 2013). Επίσης για το γονίδιο της IL-17, το rs763780 (IL-17F) συσχετίστηκε με απόκριση στην ινφλιξιμάμπη σε 37 ασθενείς στους 3 και 6 μήνες θεραπείας. Επίσης βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του rs763780 και απόκρισης στην αδαλιμουμάμπη σε θεραπεία 6 μηνών σε 67 ασθενείς. Αναλύθηκαν επίσης οι rs763780 (IL-17F), rs2275913 και rs10484879 (IL-17A) όσον αφορά την απόκριση σε αδαλιμουμάμπη και ινφλιξιμάμπη σε 194 ασθενείς, αλλά μόνο το rs763780 (IL-17F) ήταν σε θέση να προβλέψει απόκριση (Prieto-Pérez *et al*, 2015).

Λαμβάνοντας υπόψη την αυτοάνοση και φλεγμονώδη συνιστώσα της ψωρίασης, μια μελέτη μεταξύ των SNPs rs361525, rs1800629, rs1799724, rs1799964 (TNF), rs6887695, rs3212227 και rs7530511 (IL-12B) και rs11209026 (IL-23R) σε 109 ασθενείς έδειξε ότι οι 33 ασθενείς που φέρουν το γονότυπο GG για το rs1120902 (IL-23R) είχαν καλύτερη απόκριση στην ινφλιξιμάμπη (Gallo *et al*, 2013). Μια ακόμη μελέτη στον ισπανικό πληθυσμό σε 130 ασθενείς έδειξε ότι ο rs3794271 (SLCO1C1), ο οποίος βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον rs11045392 (PDE3A), έχει συσχετιστεί με απόκριση σε θεραπείες με αντι-TNF (Julia *et al*, 2015). Όσον αφορά τον παράγοντα TNFα, δύο μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό με 80 ασθενείς και στον ιταλικό πληθυσμό με 57 ασθενείς δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ των rs1800629 ή rs361525 και απόκρισης σε φάρμακα αντι-TNF, (Vasilopoulos *et al*, 2012),(Murdaca *et al*, 2014).

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση όμως, 15 μελετών που διερευνούν διαφορετικά SNPs του TNFα σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs1800629, rs361525 και rs1799724 και των θεραπειών με αντι-TNF αλλά μόνο στους Καυκάσιους. Αν και οι συσχετίσεις αυτές δεν επικυρώθηκαν στην ψωρίαση για τους rs1800629 και rs361525 παραμόνο σε άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, επιβεβαιώθηκε μια συσχέτιση με τον rs1799724 στην μετα-ανάλυση. Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι μόνο δύο από

τις 15 μελέτες που αναλύθηκαν συμπεριλάμβαναν ασθενείς με ψωρίαση (Murdaca *et al*, 2014).

Πληροφορίες υπάρχουν όμως και για άλλους πολυμορφισμούς του *TNFA*. Ο πολυμορφισμός rs1799964 (*TNFA*) βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου *TNF* και αντιστοιχεί σε μετάβαση T>C στη νουκλεοτιδική θέση -1031. Οι ασθενείς που μεταφέρουν το γονότυπο TT του rs1799964 (*TNFA*) ήταν πιθανότερο να ανταποκρίνονται σε αντι-TNF φάρμακα στους 3 και 6 μήνες θεραπείας. Επιπλέον, οι φορείς του γονότυπου TT έδειξαν καλύτερη απόκριση στην ινφλιξιμάμπη στους 3 και 6 μήνες θεραπείας. Ο πολυμορφισμός rs361525 (*TNFA*) που αναφέρθηκε και παραπάνω, βρίσκεται στη θέση -238, και περιλαμβάνει μια μετάβαση G>A, ο γονότυπος GG του rs361525 (*TNFA*) συσχετίστηκε με καλύτερη απόκριση σε αντι-TNF φάρμακα σε 109 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία για 6 μήνες. Φορείς του γονότυπου GG στο rs361525 (*TNFA*) ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στην ετανερσέπτη και την ινφλιξιμάμπη (Gallo *et al*, 2013). Αντίθετα, μία ανεξάρτητη μελέτη 97 ασθενών έδειξε ότι οι φορείς του γονότυπου GA του rs361525 (*TNFA*) δεν αποκρίθηκαν πλήρως στην ετανερσέπτη (De Simone *et al*, 2015). Στην ίδια επίσης μελέτη των Gallo *et al*, βρέθηκε ότι οι ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο T του rs1799724 (*TNFA*) ανταποκρίθηκαν καλύτερα στα φάρμακα αντι-TNF. Αυτή η συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης σε ένα υποσύνολο ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ινφλιξιμάμπη για 6 μήνες. Στην ίδια επίσης μελέτη, τα SNPs rs13190932 (*TRAF3IP2*) και rs9260313 (*HLA-A*) έδειξαν επίσης μια τάση προς καλύτερη απόκριση σε ετανερσέπτη, όχι όμως στατιστικά σημαντική. Τέλος, ο γονότυπος GG του rs13190932 (*TRAF3IP2*) και ο γονότυπος TT του rs9260313 (*HLA-A*) συσχετίστηκαν επίσης με θετική απόκριση στην αδαλιμουμάμπη και την ινφλιξιμάμπη αντίστοιχα (Gallo *et al*, 2013)

Άλλα γονίδια που αλληλεπιδρούν με τον *TNFA* έχουν μελετηθεί επίσης. Φορείς του γονότυπου TT του rs1061622 (*TNFRSF1B*) ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στα φάρμακα αντι-TNF, ιδιαίτερα στην ετανερσέπτη μετά από θεραπεία 6 μηνών (Vasilopoulos *et al*, 2012). Ωστόσο, μια μελέτη σε 90 Ισπανούς ασθενείς έδειξε ότι φορείς του αλληλόμορφου G για τον rs1061622 (*TNFRSF1B*) δεν παρουσίασαν απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF (González-Lara *et al*, 2015). Ενώ σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση που περιλάμβανε ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες (ρευματοειδής αρθρίτιδα, ψωριασική αρθρίτιδα και ασθένεια του Crohn) συσχετίστηκε το αλληλόμορφο T του rs1061622 (*TNFRSF1B*) (με φορείς, 929 ασθενείς) με καλύτερη απόκριση στα φάρμακα αντι-TNF, αν και μόνο δύο από τις επτά μελέτες συμπεριλάμβαναν ασθενείς με ψωρίαση (Chen *et al*, 2015).

Μια μελέτη σε 144 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση σε 173 SNP που συσχετίζονται με την ψωρίαση εξέτασε την απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF. Οι πολυμορφισμοί rs2916205 (*PGLYR4*), rs9304742 (*ZNF816A*), rs11126740 (*CTNNA2*), rs2546890 (*IL12B*), rs96844 (*MAP3K1*) και rs12191877 (*HLA-C*) συσχετίστηκαν με απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF ύστερα από θεραπεία για 3 μήνες. Επιπλέον οι πολυμορφισμοί rs1801274 (*FCGR2*), rs6311 (*HTR2A*), και rs6908425

(*CDKAL1*) συσχετίστηκαν με απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF ύστερα από θεραπεία για 6 μήνες (Prieto-Pérez *et al*, 2018). Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε πληθυσμό της Δανίας και περιλάμβανε 478 ασθενείς με ψωρίαση βρήκε συσχέτιση απόκρισης σε φάρμακα αντι-TNF και έξι SNPs: rs1143623 και rs1143627 (*IL1B*), rs11465996 (*LY96*), rs11938228 και rs4696480 (*TLR2*) και rs352139 (*TLR9*) (Loft *et al*, 2018). Τέλος, μια μελέτη συσχέτισης της απόκρισης 81 ασθενών σε θεραπεία με ετανερσέπτη στην οποία ελέγχθηκαν 124 SNP έδειξε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs13437088 (*HLA-B/MICA*), rs96844 (*MAP3K1*), rs2431697 (*PTTG1*), και rs9304742 (*ZNF816A*) μετά από θεραπεία για 3 μήνες. Βρέθηκε επίσης, συσχέτιση μεταξύ του rs928655 (*GBP6*) και του rs2546890 (*IL-12B*) και της απόκρισης στην ετανερσέπτη μετά από θεραπεία για 6 μήνες. (Ovejero-Benito *et al*, 2017) και μια ακόμη μελέτη σε 161 ασθενείς, έδειξε ότι αυτοί που φέρουν τον γονότυπο GA για το rs6427528 (*CD84*) είχαν καλύτερη απόκριση στην ετανερσέπτη από ό,τι η ομάδα ασθενών με ομόζυγο γονότυπο GG (van den Reek *et al*, 2017).

Φαρμακογενετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί επίσης και για την οστεκινουμάμπη, έναν αναστολέα της IL-12/23. Μια φαρμακογενετική μελέτη απέτυχε να δείξει κάποια συσχέτιση μεταξύ του rs763780 (*IL-17F*) και της απόκρισης στην οστεκινουμάμπη σε 70 ασθενείς ύστερα από θεραπεία για 3 και 6 μήνες. Αναλύθηκε επίσης η επίδραση των rs763780 (*IL-17F*), rs2275913, και rs10484879 (*IL-17A*) στην ανταπόκριση στην οστεκινουμάμπη αλλά μόνο το rs763780 (*IL-17F*) συσχετίστηκε με απόκριση σε 194 ασθενείς (Prieto-Pérez *et al*, 2015). Μια ακόμη μελέτη στον ελληνικό πληθυσμό σε 250 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με οστεκινουμάμπη δεν έδειξε κάποια συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs610604 (*TNFAIP3*) και rs10484554 (*HLA-C*). Αντίθετα, συσχετίστηκαν οι πολυμορφισμοί rs151823 και rs26653 (*ERAP1*) με καλή απόκριση στη θεραπεία με αυτό το φάρμακο (Masouri *et al*, 2016). Επιπλέον, τα ελλείμματα στο γονίδιο *LCE3B/3C* δεν συσχετίστηκαν με απόκριση στην οστεκινουμάμπη σε ασθενείς με ψωρίαση (Talamonti *et al*, 2013). Μια πρόσφατη μελέτη σε 69 ασθενείς βρήκε συσχέτιση μεταξύ SNPs στα γονίδια *CHUK*, *C17orf51*, *ZNF816A*, *STAT4*, *SLC22A4* και *Corf72* και σε καλή απόκριση σε θεραπεία με οστεκινουμάμπη, ενώ SNPs στα γονίδια *TNFRSF1A*, *HTR2A*, *NFKBIA*, *ADAM33* και *IL13* συσχετίστηκαν με κακή απόκριση σε αυτήν τη θεραπεία (Prieto-Pérez *et al*, 2017). Μια άλλη μελέτη που αναφέρθηκε ήδη και διεξήχθη σε πληθυσμό της Δανίας βρήκε συσχέτιση μεταξύ απόκρισης σε οστεκινουμάμπη και σε 4 SNP, τα rs1143623, rs1143627 (*IL1B*), rs8177374 (*TIPAP*) και rs5744174 (*TLR5*) (Loft *et al*, 2018). Ενώ όσο αφορά το γονίδιο *HLA-C*, η παρουσία του *HLA-C:06:02* συσχετίστηκε με καλύτερη απόκριση στην οστεκινουμάμπη σε μελέτη 51 Ιταλών ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Talamonti *et al*, 2013). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε δύο μεγαλύτερες μελέτες με 255 (Talamonti *et al*, 2017) και 134 (Talamonti *et al*, 2016) σε Καυκάσιους ασθενείς. Επαναλήφθηκαν επίσης, σε μελέτη 66 Κινέζων ασθενών (Chiu *et al*, 2012) και σε μελέτη 601 Βόρειων Αμερικάνων (Li *et al*, 2016). Μια μελέτη σε 64 ασθενείς μερικοί από τους οποίους δεν φέρουν τον γονότυπο AA για το

rs3212227 (*IL12B*) αλλά φέρουν τον γονότυπο GG για το rs6887695 (*IL12B*) και το HLA-C:06:02 ήταν πιο πιθανό να ανταποκριθούν στην ουστεκινουμάμπη (Galluzzo *et al*, 2016). Συμπερασματικά, το HLA-C:06:02 είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης της απόκρισης σε ουστεκινουμάμπη, παρόλο που πρέπει να επικυρωθεί στο μέλλον με μεγαλύτερες ομάδες ασθενών.

1.7 Η ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ 4 (PDE4) ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Οι αναστολείς των φωσφοδιεστερασών χαρακτηρίζονται ως πολλά υποσχόμενα φάρμακα για χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως η ψωρίαση. Οι αναστολείς αυτοί αυξάνουν τη συγκέντρωση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP), αναστέλλοντας την φωσφοδιεστεράση η οποία φυσιολογικά αποικοδομεί τη cAMP. Η τελευταία γενιά αναστολέων είναι οι επιλεκτικοί αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4 (Phosphodiesterase 4, PDE4), όπως η απρεμιλάστη που φαίνεται να έχει βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη, δηλαδή δυνατότητα χορήγησης μεγαλύτερων δόσεων του φαρμάκου χωρίς την ύπαρξη ανεπιθύμητων παρενεργειών (Wittmann & Helliwell, 2013).

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα ανταποκρίνονται σε ένα ευρύ φάσμα εξωκυτταρικών σημάτων, προκαλώντας τη δημιουργία ενδοκυττάρων δεύτερων αγγελιοφόρων. Αυτοί με τη σειρά τους ενεργοποιούν μια σειρά κυτταρικών αντιδράσεων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία γεγονότων σηματοδότησης. Η cAMP είναι ένας βασικός δεύτερος ενδοκυτταρικός αγγελιοφόρος και η σηματοδότηση ενεργοποιείται από μια ποικιλία υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G. Η δέσμευση ορισμένων μορίων, όπως οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες και οι νευροδιαβιβαστές, επάγει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με μια πρωτεΐνη G. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη υπομονάδα α της πρωτεΐνης G, αποσυνδέεται από τον υποδοχέα και διεγείρει την αδενυλική κυκλάση, η οποία καταλύει τη μετατροπή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP) σε cAMP. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα αποτελέσματα του cAMP διαμεσολαβούνται από δύο ενδοκυτταρικούς υποδοχείς cAMP που εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα, την πρωτεϊνική κινάση A (Protein kinase A, PKA) και την πρωτεΐνη ανταλλαγής που ενεργοποιείται απευθείας από cAMP, την EPAC (Exchange protein activated by cAMP) (Cheng *et al*, 2008). Η δράση της cAMP μπορεί επίσης να εκδηλωθεί και μέσω των ενεργοποιημένων από κυκλικά νουκλεοτιδια καναλιών ιόντων (Cyclic nucleotide activated ion channels, CNGC), καθώς και την οικογένεια πρωτεϊνών με δομές popeye (Popeye domain containing proteins, POPDC).

Η PKA καταλύει τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, ενώ η EPAC ενεργοποιεί την υπεροικογένεια των ενζύμων RAS (Fertig & Baillie, 2018). Η ρύθμιση της μεταγραφής από την PKA επιτυγχάνεται κυρίως με την άμεση φωσφορυλίωση παραγόντων μεταγραφής, όπως της πρωτεΐνης CREB

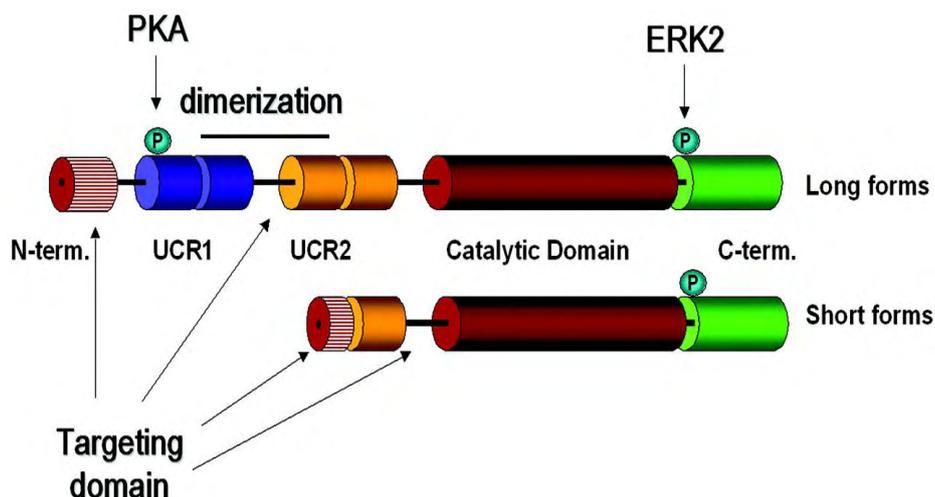
(cAMP response element binding protein), του CREM (cAMP-responsive modulator) και του μεταγραφικού παράγοντα ATF1 (Cyclic AMP-dependent transcription factor), ενώ αναστέλλει την λειτουργία άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως του NF-κB (nuclear factor kappa B) ο οποίος προάγει την μεταγραφή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η φωσφορυλίωση είναι ένα κρίσιμο γεγονός επειδή επιτρέπει σε αυτές τις πρωτεΐνες να αλληλεπιδράσουν με τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές όπως την πρωτεΐνη που συνδέεται με τον CREB (CREB-binding protein, CBP) και την p300 όταν συνδέονται με τα στοιχεία απόκρισης για cAMP (cAMP-response element CREs) στα γονίδια-στόχους. Η EPAC μπορεί να ενεργοποιήσει την υδρολάση Rap1, της οποίας μια κύρια λειτουργία είναι η αύξηση της προσκόλλησης των κυττάρων μέσω των υποδοχέων της ιντεγκρίνης (Sassone-Corsi, 2012).

Στα T-κύτταρα η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση cAMP καταστέλλει την παραγωγή διαφόρων προφλεγμονωδών μεσολαβητών, ενώ προάγει την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών. Με την ελάττωση μέσω υδρόλυσης του ενδοκυτταρικού cAMP, η PDE4 προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών και μειώνει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών. Αντιστρόφως, η αναστολή της PDE4 αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP το οποίο καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α, IFN-γ και IL-2 και αυξάνει αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η IL-10 (Schafer, 2012).

Οι PDE είναι μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων, τα οποία, στον άνθρωπο, είναι προϊόντα 11 διαφορετικών γονιδιακών οικογενειών, που ομαδοποιούνται σύμφωνα με τη δομή, τη λειτουργία και τη συγγενειά τους για cAMP και cGMP. Δομικά, όλες οι PDEs έχουν συντηρημένες καρβοξυτελικές καταλυτικές περιοχές ενώ τα αμινοτελικά άκρα διαφέρουν μεταξύ των οικογενειών, υποοικογενειών και συγκεκριμένων ισομορφών. Οι αμινοτελικές περιοχές παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της απόκρισης σε σήματα από ρυθμιστικά μόρια ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι PDEs είναι συντηρημένες πρωτεΐνες, κάποιες PDEs υδρολύουν cAMP (PDE4, PDE7 και PDE8), κάποιες υδρολύουν cGMP (PDE5, PDE6 και PDE9) και κάποιες υδρολύουν και cAMP και cGMP (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 και PDE11). Στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών η PDE3 και η PDE4 υδρολύουν κυρίως cAMP (Francis *et al*, 2011). Σε αντίθεση όμως με την PDE3, η PDE4 υδρολύει μόνο cAMP και είναι η κύρια ισομορφή σε φλεγμονώδη κύτταρα. Εκφράζεται επίσης σε δομικούς κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην ψωρίαση, όπως στα κερατινοκύτταρα, στο αγγειακό ενδοθήλιο και στο αρθρικό υαλώδες (Schafer, 2012).

Οι PDE4s (**Εικόνα 3**) που υδρολύουν μόνο cAMP, αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια με περισσότερες από 20 ισομορφές που κωδικοποιούνται από τέσσερα γονίδια (A, B, C και D). Κάθε ισόμορφη έχει μια μοναδική αμινοτελική περιοχή που περιέχει τις συντηρημένες περιοχές 1 και 2 (UCR1 και UCR2), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους και με την καταλυτική υπομονάδα (κόκκινο) μέσω της περιοχής σύνδεσης 1 και 2 (LR1 και LR2) αντίστοιχα. Με βάση την παρουσία και το μέγεθος των UCR1 και UCR2, οι PDE4s μπορούν να ταξινομηθούν σε μακριές (UCR1 &

UCR2), βραχείες (UCR2), εξαιρετικά βραχείες (UCR2 απουσία LR1) και μη λειτουργικές ισομορφές (απουσία UCR1, UCR2, LR1). Στην **Εικόνα 3**, σημειώνονται επίσης οι θέσεις φωσφορυλίωσης (συμβολίζονται με P). Η παρουσία ή απουσία του UCR1 συνεπάγεται κρίσιμες δομικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ των μακρών και βραχειών μορφών συμπεριλαμβανομένου του ολιγομερισμού, της ρύθμισης της δραστηριότητας του ενζύμου με τη σύνδεση των αλλοστερικών προσδετών, της μεταμεταφραστικής τροποποίησης καθώς και της ευαισθησίας του αναστολέα.



Εικόνα 3. Οργάνωση των δομών των μικρών και μεγάλων ισομορφών PDE4. Πάνω απεικονίζεται η δομή που έχουν οι μακριές ισομορφές και κάτω, η δομή με την οποία εμφανίζονται οι βραχείες ισομορφές. Στα αριστερά υπάρχει το αμινοτελικό άκρο και δεξιά το καρβοξυτελικό. Οι συντηρημένες περιοχές UCR1 και 2 εμφανίζονται μόνο στις μακριές ισομορφές. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι σε μπλε κύκλους (Conti *et al*, 2003).

Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό οι ισομορφές PDE4A, B και D (αλλά όχι η C) καθώς και οι PDE3 και 7 (Page & Spina, 2012). Η καταλυτική περιοχή της PDE4 έχει μελετηθεί εκτενώς και κρυσταλλικές δομές ακτίνων X έχουν προσδιορίσει την θέση για την υδρόλυση της cAMP (Burgin *et al*, 2010). Η καταλυτική περιοχή είναι η περιοχή πρόσδεσης και του αναστολέα της PDE4, της απρεμιλάστης (Schett *et al*, 2010).

Με το να επιτυγχάνουν την αύξηση των επιπέδων της cAMP, οι αναστολείς της PDE4 παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα σχεδόν σε όλα τα φλεγμονώδη κύτταρα. Πολυάριθμοι επιλεκτικοί αναστολείς της PDE4 έχουν κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας τις τελευταίες δύο δεκαετίες και ορισμένοι από αυτούς έχουν αξιολογηθεί σε κλινικές δοκιμές για το άσθμα, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), την ατοπική δερματίτιδα (ΑΔ) και τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ) (Wittmann & Helliwell, 2013). Ο πρώτος δραστικός αναστολέας της PDE4 που χορηγείται από το στόμα είναι το roflumilast. Εγκρίθηκε το 2010 από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων για τη σοβαρή ΧΑΠ που σχετίζεται με χρόνια βρογχίτιδα σε ενήλικες ασθενείς και τον Μάρτιο του 2011, από τον οργανισμό φαρμάκων και τροφίμων (FDA) για τη θεραπεία της ΧΑΠ και του άσθματος (Michalski *et al*, 2012). Η απρεμιλάστη (apremilast) είναι και αυτή ένας αναστολέας της PDE4, χορηγείται από το στόμα και χρησιμοποιείται από το 2014 για

τη θεραπεία της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας (Ghoreschi & Forchhammer, 2015).

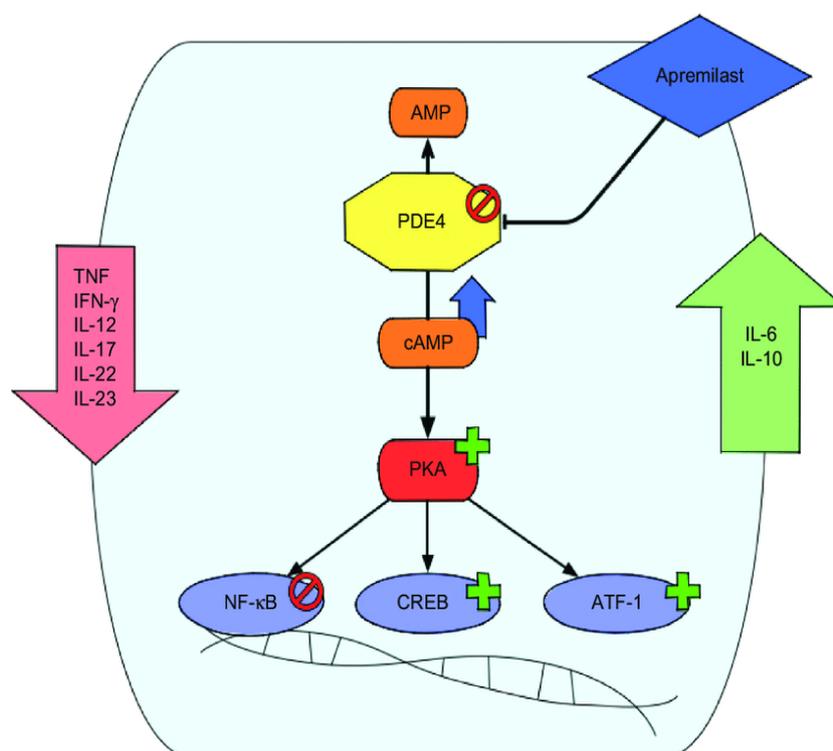
1.8 ΑΠΡΕΜΙΛΑΣΤΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η απρεμιλάστη είναι ένας αναστολέας της PDE4 που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως TNF, IFN- γ , IL-12/23p40, IL-23p19, IL-17A και IL-22. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι η απρεμιλάστη αυξάνει την παραγωγή των IL-6 και IL-10 (Schafer *et al*, 2010) και είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της PDE4, καθώς αναστέλλει μόνο τα ισόένζυμα της PDE4 (PDE4A, PDE4B, PDE4C και PDE4D) και όχι άλλες PDE. Σε μια πρόσφατη μελέτη *in vitro*, η απρεμιλάστη έδειξε να προκαλεί περίπου 95% αναστολή των ενζύμων PDE4 ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή σε άλλα μέλη της οικογένειας PDE (Schafer *et al*, 2014).

Η θεραπεία με απρεμιλάστη αυξάνει τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής cAMP στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs). Η *in vitro* χορήγηση απρεμιλάστης σε PBMCs αναστέλλει την παραγωγή του TNF και μειώνει την παραγωγή της IFN- α . Επιπλέον, αναστέλλει και την παραγωγή κυτταροκινών όπως των IL-2, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, TNF, του παράγοντα GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) και της IFN- γ από αντι-CD3 T-κύτταρα (Schafer *et al*, 2014). Στην **Εικόνα 4** φαίνεται το προτεινόμενο μονοπάτι δράσης της απρεμιλάστης. Η απρεμιλάστη αναστέλλει την PDE4, με αποτέλεσμα αυτή να μην μπορεί να υδρολύσει την cAMP και έτσι να αυξάνονται τα επίπεδα της cAMP στο εσωτερικό των PBMCs. Η ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων της cAMP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την CREB και τον ATF-1, ενώ καταστέλλει τη δράση του NF- κ B και κατά συνέπεια αυξάνει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών παραγόντων ενώ μειώνεται η παραγωγή των προφλεγμονωδών, βελτιώνοντας έτσι τη φλεγμονή.

Η απρεμιλάστη μελετήθηκε για την εξειδίκευσή της έναντι επιπρόσθετων ανασυνδυασμένων ανθρώπινων PDE όπως οι 1A, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A1A, 4B1, 4B2, 4C1, 4D2, 5A1, 7A, 7B, 8A1, 9A2, 10A1 και 11A4. Τα αποτελέσματα έδειξαν αναστολή με μέσο όρο \approx 95% (εύρος: 91% έως 99%) των ενζύμων PDE4 (A1A, B1, B2, C1 και D2) χωρίς να φαίνεται κάποια ιδιαίτερη προτίμηση σε κάποια από αυτά και χωρίς σημαντική αναστολή των άλλων δοκιμαζόμενων PDEs. Σε δοκιμασίες αναστολής δοσολογικής απόκρισης (0.001 μ M - 10 μ M απρεμιλάστη) σε ανασυνδυασμένες ανθρώπινες PDE4s A1A, B1, B2, C1, D2, D3 και D7, οι τιμές IC50 ήταν 14, 43, 27, 118, 33, 28 και 30 nM, αντίστοιχα. Αυτό το πρότυπο αναστολής συμφωνεί με το προφίλ ενός γενικού αναστολέα της PDE4, καθώς η ποσότητα απρεμιλάστης που απαιτείται για τη μείωση στο μισό της ενεργότητας των ενζύμων είναι πολύ μικρή (Schafer *et al*, 2014).

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της απρεμιλάστης αξιολογήθηκαν σε δύο πολυκεντρικές (διεξάγονται με βάση το ίδιο πρωτόκολλο σε περισσότερα από ένα κέντρα), τυχαίοποιημένες (η κατανομή των ασθενών στις συγκρινόμενες ομάδες είναι τυχαία), διπλές-τυφλές (η κατανομή της θεραπευτικής παρέμβασης είναι άγνωστη τόσο στους ασθενείς όσο και στους ερευνητές), ελεγχόμενες δοκιμές φάσης 3 (αποτελούν το τελευταίο βήμα για την αξιολόγηση του νέου φαρμακευτικού προϊόντος, στις οποίες συμμετέχουν 300 έως αρκετές χιλιάδες πάσχοντες) με συγκρίσιμο σχεδιασμό. Αυτές ήταν οι ESTEEM 1 (N = 844) και ESTEEM 2 (N = 413), στις οποίες οι ασθενείς, με τυχαία κατανομή 2: 1, έλαβαν είτε απρεμιλάστη 30 mg δύο φορές την ημέρα ή εικονικό φάρμακο για 16 εβδομάδες.



Εικόνα 4. Τρόπος δράσης της απρεμιλάστης (Ghoreschi & Forchhammer, 2015). Η απρεμιλάστη αναστέλλει τη δράση της PDE4, με αποτέλεσμα να μην υδρολύεται το cAMP και έτσι να ενεργοποιεί την PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει και αυξάνει την έκφραση δύο μεταγραφικών παραγόντων (CREB, ATF-1) οι οποίοι αυξάνουν την μεταγραφή των IL-6/-10 που αποτελούν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Αντίθετα, η PKA αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή προφλεγμονωδών παραγόντων. Έτσι, συνολικά επέρχεται αποκατάσταση της φλεγμονής.

Την 16^η εβδομάδα, οι ασθενείς που λάμβαναν απρεμιλάστη επιτυγχάνουν PASI-75. Το PASI είναι ένα μέτρο της σοβαρότητας της ψωριασικής νόσου που αντιπροσωπεύει τα χαρακτηριστικά της βλάβης και παίρνει τιμές από 0-72, με τις μεγαλύτερες τιμές να δείχνουν μεγαλύτερη σοβαρότητα της νόσου. Το PASI-75 σημαίνει 75% βελτίωση, που είναι σημαντικά μεγαλύτερη (P <0,0001) στην ομάδα που λάμβανε απρεμιλάστη σε σχέση με εκείνη που λάμβανε το εικονικό φάρμακο. Αυτό το αποτέλεσμα φάνηκε και στις δύο μελέτες, με το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν PASI-75 να είναι μεγαλύτερο στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν απρεμιλάστη. (ESTEEM 1: 33% (ασθενείς που έλαβαν απρεμιλάστη) έναντι 5%

(ασθενείς που έλαβαν το εικονικό φάρμακο), αντίστοιχα και η ESTEEM 2: 29% έναντι 6%) (Zerilli & Ocheretyaner, 2015).

Τον Μάρτιο του 2014, ο FDA ενέκρινε την απρεμιλάστη (Otezla, Celgene Corporation), ως τον πρώτο εκλεκτικό αναστολέα της PDE4 σε ενήλικες με ενεργή ψωριασική αρθρίτιδα (Fala, 2015). Στη συνέχεια, τον Σεπτέμβριο του 2014, η εταιρεία Celgene έλαβε έγκριση από τον FDA για την περαιτέρω διάθεση του φαρμάκου στην αγορά και για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας σε ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν, ή έχουν κάποια αντένδειξη, ή εμφάνισαν μη ανοχή σε άλλη συστηματική θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της κυκλοσπορίνης, της μεθοτρεξάτης, του ψωραλενίου και της υπεριώδους ακτινοβολίας A (PUVA) (Celgene Corporation, 2014).

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι ο έλεγχος πολυμορφισμών (SNPs) σε σχέση με την απόκριση ψωριασικών ασθενών στην θεραπεία με απρεμιλάστη. Ειδικότερα, ως πρώτη προσπάθεια επιλέχθηκε ο έλεγχος του πολυμορφισμού rs4384209 του γονιδίου *PDE4B*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 37 δείγματα αίματος, εμπλουτισμένο σε ερυθρά αιμοσφαίρια, ασθενών με ψωρίαση που λαμβάνουν αγωγή με απρεμιλάστη. Τα δείγματα προήλθαν από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (συνεργασία με Καθ. Α. Ρουσσάκη και Επικ. Καθηγήτρια Ε. Ζαφειρίου)

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΑΙΜΑ

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα, η τεχνική της επώασης με πρωτεΐνάση και εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και το kit της invitrogen (PureLink® Genomic DNA Mini Kit K1820-02).

Για την απομόνωση DNA από δείγματα αίματος με τη χρήση φαινόλης/χλωροφόρμιου ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Σε ποσότητα αίματος περίπου 400μl σε σωληνάρια 1,5ml προστίθενται 900μl SSC(1x) (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0).

2. Γίνεται ανάδευση με vortex στη μέγιστη ταχύτητα.
3. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 30 sec.
4. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.
5. Πραγματοποιείται επαναδιάλυση με 900 μl SSC(1x).
6. Γίνεται ανάδευση με vortex στη μέγιστη ταχύτητα.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 30 sec.
8. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.
9. Προστίθενται στην πελέτα των κυττάρων 400μl διαλύματος λύσης TNES-urea (10 mM Tris-HCl pH = 7.5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% SDS) και 4μl πρωτεϊνάση K (1,5x).
10. Γίνεται ανάδευση με vortex στη μέγιστη ταχύτητα, μέχρι να διαχωριστούν τα κύτταρα μεταξύ τους.
11. Ολονύχτια επώαση στο υδατόλουτρο ή στο φούρνο (υπό ανάδευση) στους 55°C.
12. Τα δείγματα είναι περίπου 400 μl γι' αυτό προστίθενται 200μl φαινόλη και 200 μl χλωροφόρμιο (½ του όγκου του δείγματος φαινόλη και ½ του όγκου του δείγματος χλωροφόρμιο). Ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Σχηματίζονται τρεις στιβάδες. Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούρια σωληνάρια 1,5ml χωρίς να διαταραχθεί η μεσόφαση.
14. Αν ο όγκος που λήφθηκε στο προηγούμενο βήμα είναι πολύ μικρός (<400) τότε προστίθενται περίπου 100-150μl νερό (απιονισμένο και αποστειρωμένο) στα αρχικά σωληνάρια, αναδεύονται και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Σχηματίζονται τρεις στιβάδες. Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου διαλύματος στα σωληνάρια που περιέχουν το υπερκείμενο διάλυμα του βήματος 13 και τα παλιά σωληνάρια απορρίπτονται. Τα δείγματα είναι περίπου 400μl.
16. Προστίθεται χλωροφόρμιο σε όγκο 1/1 με αυτόν του δείγματος, δηλαδή 400μl. Ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
17. Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούρια σωληνάρια 1,5ml. Το διάλυμα είναι τώρα περίπου 350μl.
18. Προστίθεται αιθανόλη 100% σε ποσότητα 2,5 φορές τον όγκο του δείγματος (περίπου 875μl) και οξικό νάτριο (3M, pH=5,2) σε ποσότητα 1/10 του όγκου του δείγματος (περίπου 35μl), πραγματοποιείται ανάδευση.
19. Τα σωληνάρια 1,5ml τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C (ή στους -80°C) για 30 min.
20. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 20 min στους 4°C.
21. Φαίνεται η πελέτα του DNA. Απορρίπτεται όσο περισσότερη ποσότητα διαλύματος γίνεται έως ότου μείνει μόνο η πελέτα.
22. Προστίθενται 300μl αιθανόλη 70% και πραγματοποιείται ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.

23. Απορρίπτεται όλο το διάλυμα και τα δείγματα αφήνονται στους 55°C μέχρι να στεγνώσουν.
24. Αφού στεγνώσουν το DNA διαλύεται σε 50μl νερό (απιονισμένο και αποστειρωμένο) και επωάζεται ολονύχτια στους 4°C για πλήρη επαναδιάλυση.

Για την απομόνωση DNA από αίμα ασθενών Εκτός από τη φαινόλη/χλωροφόρμιο χρησιμοποιήθηκε και το κιτ της Invitrogen, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης 1% και φωτομέτρησή τους. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων των προϊόντων της RCR.

Αρχή της μεθόδου

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, χημικά μόρια (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) κινούνται μέσα σε ένα πήκτωμα με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους (τα μόρια μικρότερου μήκους κινούνται ταχύτερα από τα μόρια μεγαλύτερου μήκους), του φορτίου τους και του σχήματός τους. Στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, τα γραμμικά μόρια DNA, τα οποία είναι φορτισμένα αρνητικά λόγω των φωσφορικών ομάδων, κινούνται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο της συσκευής με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους, τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται στο πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τη διαμόρφωση (κυκλικό-γραμμικό) και με βάση τη διαμόρφωσή τους, διαφορετικά κινούνται τα υπερελικωμένα και διαφορετικά τα μη υπερελικωμένα (για τα κυκλικά). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων διαφορετικού μήκους. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων που σχηματίζονται στο πήκτωμα, άρα και το μέγεθος των κομματιών DNA που μπορούν να διαχωριστούν.

Καθώς μετακινούνται, τα διαφορετικά μόρια DNA σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες στο πήκτωμα, ανάλογα με την κινητικότητα τους. Οι ζώνες δεν είναι ορατές κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, γίνονται όμως ορατές με προσθήκη στο πήκτωμα μιας χρωστικής που δεσμεύεται στο DNA (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η (Xpert Green) και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV, τα τμήματα DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Με τη βοήθεια ενός μάρτυρα (ladder) γνωστών μοριακών

μεγεθών, ο οποίος έχει προστεθεί σε ένα ή περισσότερα πηγαδάκια, γίνεται η εκτίμηση των μεγεθών των τμημάτων DNA του κάθε δείγματος.

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE Buffer 50x (200mM Tris, 200mM CH₃COOH, 1mM EDTA) σε συγκέντρωση 1x
- Αγαρόζη, Agarose NIPPON Genetics EUROPE GmbH, AG02
- 100bp DNA Ladder, Minotech, #412
- Xpert Green DNA Stain (20.000X) της grisp, GS01.0001
- Διάλυμα φόρτωσης, Loading buffer (για 10ml) Bromophenol blue 1% w/v 1ml TBE 20x 0,5ml Glycerol 5ml ddH₂O έως τα 10ml. Κατά τη φόρτωση των προϊόντων PCR, χρησιμοποιήθηκε το Loading buffer: Bromophenol Blue 0,25%, Xylene Cyanol 0,25%, Γλυκερόλη 30%, σε dH₂O.

Για τη διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης με περιεκτικότητα 1% (ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA) και 2% (ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR) w/v σε τελικό όγκο 50, 70 ή 150ml.

Διαδικασία παρασκευής πηκτώματος:

1. Για την παρασκευή πηκτώματος 1% πραγματοποιείται προσθήκη 0,3g αγαρόζης, σε 50ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x και στη συνέχεια θέρμανσή τους σε φούρνο μικροκυμάτων. Για την παρασκευή πηκτώματος 2% πραγματοποιείται προσθήκη 1,12g αγαρόζης σε 70ml TAE 1x. Οι ποσότητες αυτές δεν αντιστοιχούν ακριβώς σε 1% και 2%, αλλά αυτό συμβαίνει γιατί εξατμίζεται μια μικρή ποσότητα διαλύματος κατά τον βρασμό.
2. Προστίθενται 4μl Xpert Green για τελικό όγκο 50ml, πριν τον πολυμερισμό της αγαρόζης και το μείγμα μεταφέρεται σε κατάλληλο καλούπι για να στερεοποιηθεί.
3. Παράλληλα, πριν τη μεταφορά του διαλύματος της αγαρόζης στο εκμάγειο, τοποθετείται στην άκρη του καλουπιού μία πλαστική «χτένα», κάθετα στο υγρό, βυθισμένη σε αυτό, έτσι ώστε μετά τον πολυμερισμό, να δημιουργηθούν τα κατάλληλα «πηγαδάκια» στο πήκτωμα, στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα DNA. Μετά τη μεταφορά του διαλύματος της αγαρόζης στο εκμάγειο απομακρύνονται τυχόν φυσαλίδες από το πήκτωμα με τη βοήθεια κάποιου tip για πιπέτες.

4. Μετά τη σταθεροποίηση του, το διάλυμα της αγαρόζης παίρνει τη μορφή πηκτώματος. Απομακρύνονται προσεκτικά τα «χτενάκια» και το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1x, έτσι ώστε το πήκτωμα να βρίσκεται πλήρως βυθισμένο σε αυτό.
5. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 2μl από κάθε δείγμα DNA (από τα 50μl που υπήρχαν συνολικά) και 5μl loading buffer για ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA, και 6μl προϊόντος PCR με 4μl loading buffer με ξυλένιο. Σε κάποιο πηγαδάκι, προστίθεται και ο μάρτυρας (ladder) μοριακών μεγεθών. Το loading buffer περιέχει μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη) που βοηθά στην καλύτερη τοποθέτηση εντός των πηγαδιών και 1 ή 2 χρωστικές που μετακινούνται με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό του ξυλενίου). Στην περίπτωση των προϊόντων PCR χρησιμοποιούμε το loading buffer με το ξυλένιο γιατί τα προϊόντα μας μετακινούνται με την ίδια ταχύτητα με το μπλε της βρωμοφαινόλης με αποτέλεσμα να μην είναι ευδιάκριτα.
6. Έπειτα, η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συνδέεται με κατάλληλο τροφοδοτικό και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο 100-150 Volts.

Έπειτα από 15-20min, και παρατηρώντας την μετακίνηση της χρωστικής του loading buffer (πρέπει να φτάσει περίπου στη μέση του πηκτώματος) το πήκτωμα αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται επάνω σε μία τράπεζα με λάμπα UV (UV Transilluminator), όπου διακρίνονται τα μόρια-DNA ως φωτεινές ζώνες, λόγω πρόσδεσης της χρωστικής σε αυτό και γίνεται η εκτίμηση του μεγέθους τους, συγκρίνοντάς τα με τον μάρτυρα.

2.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ DNA

Η αρχή της μεθόδου της φωτομέτρησης στηρίζεται στο γεγονός ότι, το DNA, όπως και το RNA, εμφανίζει μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Επομένως, η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 260nm, προσδιορίζοντας την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.). Παράλληλα, γίνεται μέτρηση του ίδιου δείγματος στα 280nm και στα 230nm για τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA. Ο λόγος της $O.D._{260nm}/O.D._{280nm}$ που προκύπτει χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του DNA και του RNA. Μια τιμή κοντά στο 1,8 είναι γενικά αποδεκτή για να θεωρήσουμε το δείγμα ως "καθαρό" για το DNA, ενώ μια αναλογία περίπου κοντά στο 2.0 είναι γενικά αποδεκτή για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα ως "καθαρό" για το RNA. Εάν ο λόγος είναι αισθητά χαμηλότερος σε κάθε περίπτωση, μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, που απορροφούν περίπου στα 280 nm. Επίσης, ο λόγος της $O.D._{260nm}/O.D._{230nm}$ χρησιμοποιείται ως δευτερεύουσα μέτρηση της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Οι τιμές 260/230 για να χαρακτηριστεί ένα

δείγμα νουκλεϊκού οξέος "καθαρό" είναι συχνά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές 260/280. Οι αναμενόμενες τιμές 260/230 είναι συνήθως στην περιοχή 2.0-2.2. Εάν ο λόγος είναι αισθητά χαμηλότερος από τον αναμενόμενο, μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία προσμείξεων που απορροφούν στα 230 nm (π.χ. φαινόλες, οργανικοί διαλύτες από τη διαδικασία απομόνωσης των νουκλεϊκών οξέων).

2.5 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs) ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *PDE4B*

Για την εύρεση και την επιλογή των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) για την εύρεση των SNPs για το γονίδιο *PDE4B*. Η Ensembl είναι ένα πρόγραμμα περιήγησης γονιδιώματος, για γονιδιώματα σπονδυλωτών, που υποστηρίζει την έρευνα στη συγκριτική γονιδιωματική, την εξέλιξη και τις παραλλαγές στην ακολουθία του DNA. Η Ensembl περιέχει επίσης σχολιασμό γονιδίων, προβλέψεις για τις ρυθμιστικές λειτουργίες τους και δεδομένα για διάφορες ασθένειες. Για την εύρεση όλων των SNPs του γονιδίου επιλέχθηκε, (αριστερά στη σελίδα: Human) ή από το drop-down μενού στην κορυφή της σελίδας: All species to Human, (για το ανθρώπινο γονιδίωμα και πληκτρολογήθηκε το όνομα του γονιδίου PDE4B). Επιλέγεται το γονίδιο PDE4B (Human Gene) και στην συνέχεια η επιλογή genetic variation και συγκεκριμένα η variant table. Στον πίνακα που προκύπτει, που περιλαμβάνει όλους τους πολυμορφισμούς επιλέχθηκε Global MAF (minor allele frequency), συχνότητα για το σπάνιο αλληλόμορφο) 0,2-0,5%. Τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε αρχείο excel (επιλογή πάνω δεξιά του πίνακα). Εκεί πραγματοποιήθηκε η στοίχισή τους με βάση τη θέση τους στο γονίδιο, η οποία υπήρχε στο αρχείο της Ensembl.

Στη συνέχεια τα SNPs εξετάστηκαν για ανισοροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium, LD) μεταξύ τους χρησιμοποιώντας το υπολογιστικό εργαλείο της Ensembl, Linkage Disequilibrium Calculator (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/LD?db=core). Στο «Choose calculation» επιλέχθηκε το «LD for a given list of variants», στο «select one or more populations» επιλέγεται το 1000GENOMES:phase 3:TSI για Ιταλούς (TSI) επειδή αυτός ο πληθυσμός φαίνεται πως έχει παρόμοια γενετική δομή με τους Έλληνες και στο «either paste data» υπάρχει δυνατότητα γραφής μέχρι 20 πολυμορφισμών περίπου, από αυτούς που υπάρχουν στο αρχείο Excel. Το αποτέλεσμα ήταν ένας πίνακας με ζευγάρια των SNPs και τιμές για r^2 και D' . Έτσι δημιουργούνται ομάδες στο αρχείο Excel ανάλογα με την LD των SNPs. Ως όριο τέθηκε το $D' > 0,9$ και το $r^2 > 0,7$ για να ενταχθούν τα SNPs στην ίδια ομάδα. Από κάθε ομάδα που δημιουργήθηκε επιλέχθηκε ένα SNP για το οποίο υπάρχει πληροφορία για την MAF του στον ελληνικό πληθυσμό (διδακτορική διατριβή Δ. Πλαγερά, σε εξέλιξη, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π. Θεσσαλίας).

2.6 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ (SNPs) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PDE4B*

Αρχικά για την εύρεση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου έγινε αναζήτηση για το γονίδιο *PDE4B* στο Gene της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Στη συνέχεια επιλέχθηκε το NCBI Reference Sequences (RefSeq) σε format GenBank το οποίο έχει την αλληλουχία του γονιδίου αριθμημένη. Στην αλληλουχία εντοπίστηκαν τα υποψήφια SNPs, κάνοντας blast την αλληλουχία του SNP (που βρίσκεται στην Ensembl) και την αλληλουχία του *PDE4B*, χρησιμοποιώντας το εργαλείο της Ensembl, blastn.

Για τη διαδικασία σχεδιασμού των εκκινήτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) του NCBI. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε ένα μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου στο οποίο περιέχεται και ο υπό μελέτη πολυμορφισμός (περίπου 300 bp). Περαιτέρω επιλέγονται οι εξής παράμετροι: για το «Range» γράφεται το εύρος των νουκλεοτιδίων που πρέπει να προσδεθούν οι εκκινήτες, και εξαιρούνται 20-30 νουκλεοτίδια δεξιά και αριστερά των εκκινήτων (ανάλογα με τον προσανατολισμό τους). Οι εκκινήτες που θα επιλεγθούν θα πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 60 νουκλεοτίδια από το υπό μελέτη SNP, γιατί κατά την αλληλούχηση δεν διαβάζονται τα πρώτα νουκλεοτίδια και συνεπώς δεν υπάρχει πληροφορία Στο «PCR product size» σημειώνεται το επιθυμητό εύρος του μεγέθους του προϊόντος PCR. Το «Primer melting temperatures (T_m)» ορίστηκε από 55 έως 63 °C και το «Max T_m difference» μεταξύ των εκκινήτων στην τιμή 2. Στην επιλογή «Database» επιλέγεται το «Genomes for selected organisms» και εισήχθη το *Homo sapiens* και τέλος στην επιλογή «Primer specificity stringency» που αφορά την ειδικότητα του εκκινήτη, τέθηκε το «Primer must have at least 6 total mismatches to unintended targets, including at least 4 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer». Συνήθως, προκύπτουν πολλά ζεύγη εκκινήτων και επιλέγεται το καλύτερο, δηλαδή αυτό με την μεγαλύτερη ειδικότητα.

2.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs4384209 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PDE4B*

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) είναι επινόηση του Kary Mullis το 1980. Η σημαντικότητά της φαίνεται μέχρι και σήμερα, καθώς, χρησιμοποιείται ακόμη σε διάφορες παραλλαγές, και έτσι μπορούμε να καταλάβουμε την επανάσταση που έφερε στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Με τη μέθοδο της PCR είναι δυνατή η παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς να χρειαστεί η κλωνοποίηση. Στην PCR χρησιμοποιείται μία DNA πολυμεράση για τη σύνθεση των αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας που βρίσκεται μεταξύ των δύο εκκινήτων, οι

οποίοι είναι απαραίτητοι για την έναρξη της σύνθεσης. Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου μορίου DNA στους 94-95°C για να γίνει η αποκάλυψη των θέσεων πρόσδεσης των εκκινητών.
- Υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους θέσεις στο DNA-στόχο στους 50-65°C.
- Επιμήκυνση (elongation) των αντιγράφων-κλώνων από την DNA πολυμεράση με κατεύθυνση 5'→3' στους 72°C.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για n κύκλους, όπου το n είναι συνήθως 30-40 κύκλοι (στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι) με αποτέλεσμα στο τέλος το μείγμα της αντίδρασης να περιέχει θεωρητικά 2^n δίκλινα μόρια DNA, αν η αντίδραση άρχισε με 1 μόριο DNA.

Η μέθοδος της PCR βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση DNA πολυμερασών από θερμοφιλα βακτήρια (θερμοσταθερές πολυμεράσες). Η πολυμεράση Taq απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο ζει σε θερμοκρασία 75°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία λειτουργεί αυτή η πολυμεράση είναι οι 72°C, ενώ είναι αρκετά σταθερή και στους 95°C και γι αυτό δεν χρειάζεται να αναπληρώνεται σε κάθε κύκλο. Αυτή η τροποποίηση απλοποιεί τη διαδικασία, καθιστώντας την κατάλληλη για αυτοματοποίηση. Η διαδικασία της PCR αυτοματοποιήθηκε με τη χρήση, θερμοκυκλοποιητών, μηχανημάτων που εκτελούν τα βήματα της αντίδρασης σε επιθυμητούς χρόνους και θερμοκρασίες. Η προετοιμασία των συστατικών της αντίδρασης έγινε όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**, και το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή φαίνεται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 3. Συστατικά PCR	
Συστατικά	Τελικός όγκος 50μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο	5μl
dNTPs (10mM)	1μl
F1 εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
R1 ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
Kappa taq (5units/μl)	0.2μl
DNA	Διαφορετικός όγκος ανάλογα με το δείγμα (100-300ng)
ddH ₂ O	Μέχρι τα 50μl

Ανάλογα με το πόσες αντιδράσεις πρέπει να πραγματοποιηθούν κάθε φορά, πολλαπλασιάζονται οι ποσότητες των παραπάνω συστατικών για την παρασκευή ενός συνολικού μίγματος και ενός επιπλέον για τυχόν διαφοροποιήσεις στην ακρίβεια της πιπέτας. Επίσης χρησιμοποιείται και αντίδραση αρνητικού ελέγχου η οποία δεν περιέχει DNA ώστε να ελέγχεται η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης. Η αρχική PCR πραγματοποιήθηκε για να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες με τις οποίες στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR για όλα τα δείγματα. Αρχικά λοιπόν, έγινε μια Gradient

PCR, κατά την οποία στο στάδιο των 35 κύκλων (**Πίνακας 4**) δοκιμάστηκαν οι 58/60/62 °C για το ίδιο δείγμα, και επιλέχθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία με την οποία πραγματοποιήθηκε PCR και για τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας4. Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή		
Βήματα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min
35 κύκλοι	95°C 58/60/62 °C 72°C	40 sec 40 sec 40 sec
Τελική Επέκταση	72°C	10 min
Διατήρηση	4°C	

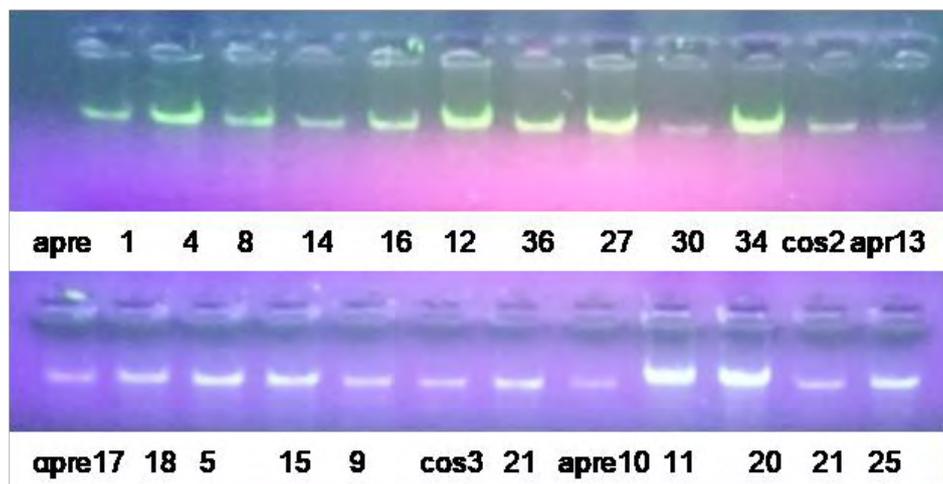
2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Ο καθαρισμός των δειγμάτων γίνεται με τη χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up με κωδικό 740609, με σκοπό την απομάκρυνση των εκκινητών, των συστατικών της αντίδρασης PCR καθώς και των παραπροϊόντων, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε μια εταιρεία η οποία θα πραγματοποιήσει την αλληλούχηση. Ως απάντηση, αποστέλλονται τα αποτελέσματα σε υπολογιστική μορφή, και στη συνέχεια διαβάζονται με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων όπως το Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) και το Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

Από τα 37 δείγματα των ασθενών με ψωρίαση που είχαν λάβει θεραπεία με απρεμιλάστη πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA είτε με την κλασική τεχνική με πρωτεϊνάση και εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο ή χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό kit, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Στην **Εικόνα 5** φαίνονται ενδεικτικά κάποιο από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης.

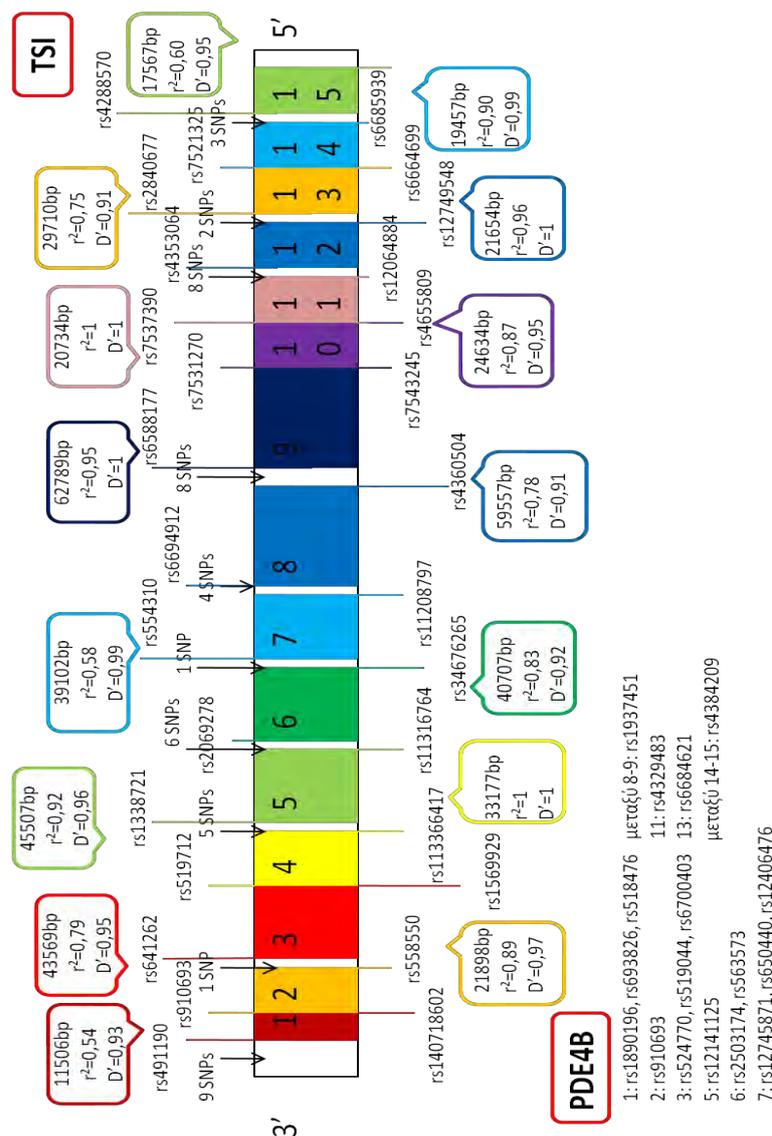


Εικόνα 5. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γονιδιωματικού DNA. Φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% 2-4 μl γονιδιωματικού DNA, με 5 μl loading buffer. Στην εικόνα φαίνεται επίσης ο τρόπος αρίθμησης των δειγμάτων.

3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs) ΑΠΟ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *PDE4B*

Όπως αναφέρθηκε, η απρεμιλάστη αναστέλλει την *PDE4*, η οποία κωδικοποιείται από τέσσερα γονίδια (A, B, C και D). Στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό οι ισομορφές *PDE4A*, B και D (αλλά όχι η C) και για αυτό στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η *PDE4B*. Για την επιλογή των SNPs προς γονοτύπηση, αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Ensembl για την εύρεση του συνολικού αριθμού των SNPs για το γονίδιο *PDE4B* ο οποίος είναι 126.520. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν τα SNPs με συχνότητα για το σπάνιο αλληλόμορφο (Minor Allele Frequency, MAF) 0,2-0,5% για να υπάρχουν πιθανότητες να βρίσκονται οι πολυμορφισμοί αυτοί στο υπό μελέτη δείγμα. Αυτές οι συχνότητες αφορούν το μέσο όρο από όλες τις πληθυσμιακές ομάδες με βάση δεδομένα από τη φάση 3 του προγράμματος 1000 Genomes (Global MAF). Η αναζήτηση οδήγησε σε 738 SNPs. Τα SNPs αυτά εξετάστηκαν για ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD) μεταξύ τους με το εργαλείο της Ensembl, Linkage Disequilibrium Calculator. Αυτό έγινε ώστε να μειωθεί ο αριθμός των υποψήφιων υπό μελέτη πολυμορφισμών, καθώς κάποιοι από αυτούς βρίσκονται σε συγκληρονομούμενες ομάδες (blocks) και επομένως αρκεί η γονοτύπηση ενός από αυτούς (tag SNP). Η ανισορροπία σύνδεσης ελέγχθηκε για έναν ευρωπαϊκό πληθυσμό, διαθέσιμο στην Ensembl, τους Ιταλούς (TOSKANI=TSI), και αυτό γιατί αυτός ο πληθυσμός φαίνεται πως έχει παρόμοια γενετική δομή με τους Έλληνες (Seldin *et al*, 2006). Για να ομαδοποιηθούν τα SNPs τέθηκε ως κριτήριο τα $r^2 > 0,5$ και $D' > 0,9$. Κάποια SNPs ωστόσο απέτυχαν να ενταχθούν σε κάποια από τις 15 ομάδες που δημιουργήθηκαν και έτσι έμειναν εκτός ομάδων. Δημιουργήθηκαν τελικά 15 ομάδες (blocks) όπως φαίνονται στην **Εικόνα 6**. Το μήκος (σε bp) κάθε ομάδας υπολογίστηκε από τη θέση των SNPs που βρίσκονται στα όρια κάθε ομάδας. Ως προτεινόμενα για μελέτη SNPs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ένα από κάθε ομάδα και τα SNPs που δεν εντάχθηκαν σε κάποια, δηλαδή συνολικά 62 SNPs.

Μπορούν να επιλεγούν αυτά που παρουσιάζονται αριθμημένα στην **Εικόνα 6** (ένα από κάθε ομάδα) με βάση πληροφορίες για τη συχνότητά τους (MAF) στον ελληνικό πληθυσμό η οποία ήταν αρκετά υψηλή από 0,2-0,52% στους ασθενείς και 0,2-0,5% στα δείγματα ελέγχου (διδακτορική διατριβή Δ. Πλαγερά, σε εξέλιξη, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π. Θεσσαλίας). Η μεταξύ τους ανισοροπία σύνδεσης κυμαινόταν στο δείγμα των Ιταλών (TSI) για το r^2 από 0,07-0,54 και για το D' από 0,32-0,99.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου *PDE4B* και των ομάδων (blocks) που προέκυψαν με βάση την ανισοροπία σύνδεσης στους Ιταλούς (Toskani=TSI). Φαίνονται έγχρωμες οι 15 ομάδες που έχουν δημιουργηθεί (κλίμακα 15,5/582065), για τις οποίες προσδιορίστηκε το μήκος τους (= bp) στο γονιδίωμα και τα r^2 και D' , που προκύπτουν από τα ακραία SNPs τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για να οριοθετήσουν την κάθε ομάδα. Στην εικόνα φαίνονται επίσης και τα SNPs για τα οποία υπάρχει πληροφορία συχνότητας στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και η ομάδα στην οποία ανήκουν.

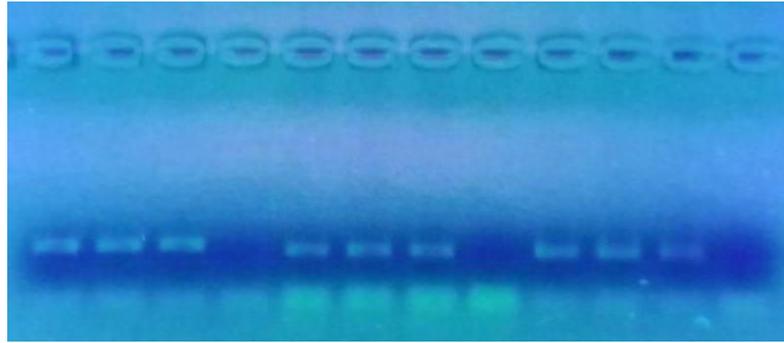
3.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ rs4384209

Η επιλογή του σωστού ζεύγους εκκινήτων είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για την σωστή έκβαση της μελέτης. Ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινήτων πρέπει να προσδένεται ειδικά στην αλληλουχία στόχο, έτσι ώστε να μην προκύπτουν παραπροϊόντα. Θα πρέπει επίσης να μην έχει θέσεις ενδο-συμπληρωματικότητας, ώστε να μην μπορούν να σχηματίζονται δευτεροταγείς δομές (δομές φουρκέτας), ή διμερή εκκινήτων τα οποία ίσως να επηρεάζουν την πρόσδεσή τους στην αλληλουχία στόχο. Όπως αναφέρεται και στην ενότητα Υλικά και μέθοδοι, για το σχεδιασμό των εκκινήτων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Primer designing tool με βάση την αλληλουχία του *PDE4B* στην περιοχή του rs4384209 που εντοπίζεται στο ιντρόνιο 1.

Από τη βάση δεδομένων NCBI η αλληλουχία στόχος που επιλέχθηκε και στην οποία φαίνεται με κόκκινο ο πολυμορφισμός, είναι η ακόλουθη:

```
tatttctaagacatggttgggagataactaaaactggaacgagattggggaacagggcagagaggt  
taggaggctaccgagggaggttcaggaatgaggtattgaggggttgggtttattagctgctc  
acctgtagaggagtgagtcacttattttaaattcatacagaaaaatatgtaagcatatatgg  
tgggttgggttgttaataactttgtcaaattgcatgccacttaactaatcgtgggaggtcact  
ataattaccatttagatgtgagaggtatacgaggaggagaaagaagtcaacagtaatatgc  
aagttactattttaattaattgggggaattgaattgccattcactaaagaaagactaaga  
aaaagatacagttttgctgggggaaatggcatggttgagttttgaacgtgcaagtttgaga  
tatttttgccatataaaataatacctatctgaaaagtatgttgggaaggtgggtctggaaactc  
tcaggaaaaagccagatcagagtaaacagatttttagaagtgaaacaatatagagatctata  
cattttcattgtgggcccctggaaatcatattcaaaatagtatgaaaaatggtgtgccagtg  
tagtttttctgaggaggggggtcctctatagtttcaaagaatcactgctacagatagatga  
gataggtaaattaagaccttaatggcaaatgggtagaaattatgatttttaaagtaaaag  
aggaaaaatgaatcaaggataacttcaggggtatttttttctttggcagcagtgcaagagta
```

Οι εκκινήτες (υπογραμμισμένοι) που προέκυψαν είναι ο εμπρόσθιος (forward) CGGAGGGAGAAAGAAGTCAA που αποτελείται από 20 νουκλεοτίδια, έχει θερμοκρασία τήξης 59,4°C και περιεκτικότητα σε GC είναι 50%, και ο ανάστροφος (reverse) TTCCAGGGCCCACAATGAAAA που αποτελείται από 21 νουκλεοτίδια, έχει θερμοκρασία τήξης 60,41°C και περιεκτικότητα σε GC 47,62%. Το αναμενόμενο προϊόν της PCR έχει μήκος 294 bp. Ένα ζεύγος εκκινήτων σε μία PCR δεν θα πρέπει να διαφέρει στη θερμοκρασία τήξης πάνω από 5 βαθμούς. Για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μια αρχική PCR κλίσης θερμοκρασίας (Gradient PCR), δηλαδή μια PCR με διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης των εκκινήτων. Στη συγκεκριμένη εργασία δοκιμάστηκαν οι θερμοκρασίες 58/60/62°C με το πρόγραμμα που περιγράφηκε στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην **Εικόνα 7**.

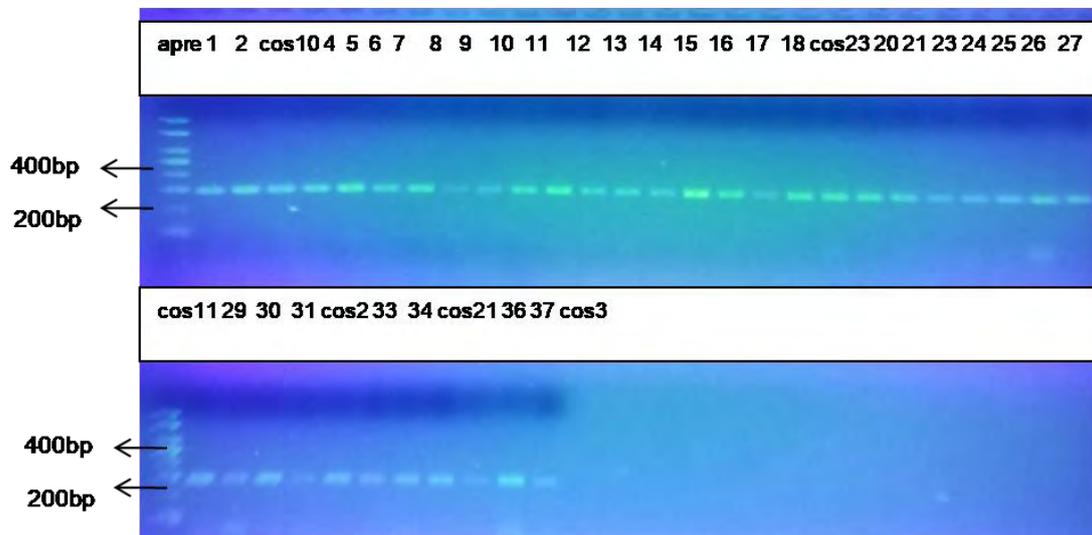


Εικόνα 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης Gradient PCR. Στα πρώτα τρία δείγματα από τα αριστερά της εικόνας η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι 58°C, στα επόμενα τρία 60°C και στα τελευταία τρία 62°C.

Επιλέχθηκαν οι 60°C γιατί είχαν λίγο μεγαλύτερη απόδοση, αν και εξίσου ικανοποιητικές ήταν και οι άλλες δύο θερμοκρασίες.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ rs4384209

Μετά τη βελτιστοποίηση της PCR, πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις σε όλα τα δείγματα ασθενών όπως περιγράφηκε στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων στον **Πίνακα 4**. Η επιβεβαίωση της επιτυχίας της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η PCR γινόταν συνήθως με 7 δείγματα και την παρουσία 1 αρνητικού ελέγχου, για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης. Στην **Εικόνα 8** φαίνεται το σύνολο των προϊόντων PCR. Η ποσότητα όλων των δειγμάτων είναι ικανοποιητική για να ακολουθήσει γονοτύπηση με αλληλούχηση.

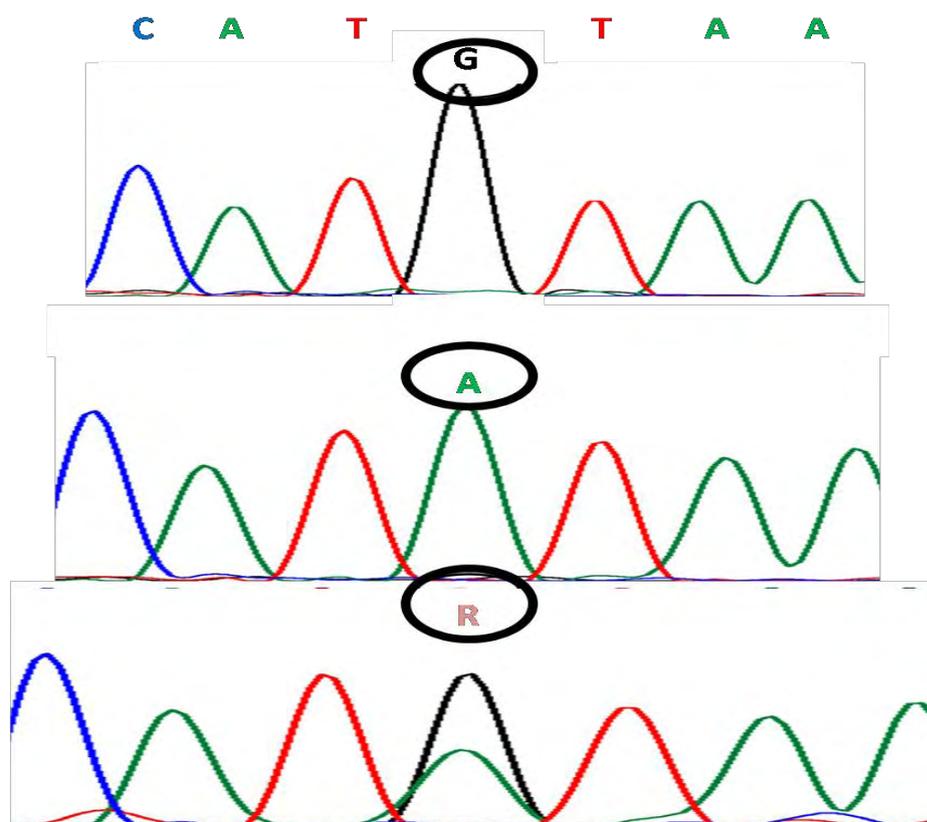


Εικόνα 8. Σύνολο προϊόντων PCR.

3.5 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα προϊόντα της PCR μετά την ηλεκτροφόρησή τους στάλθηκαν σε εταιρία ώστε να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη

βοήθεια δύο υπολογιστικών προγραμμάτων, του Chromas και του Bioedit. Το πρόγραμμα Bioedit μας βοηθά να εντοπίσουμε τους πολυμορφισμούς, καθώς στοιχίζει τις αλληλουχίες των δειγμάτων που αναλύθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς και έτσι μπορούμε να αξιολογήσουμε σε ποιες αλληλουχίες υπάρχει κάποια παραλλαγή του γονιδιώματος. Ο πολυμορφισμός φαίνεται ακόμη πιο αναλυτικά με το πρόγραμμα Chromas, στο οποίο αναπαρίστανται οι κορυφές (ένταση φθορισμού) του κάθε νουκλεοτιδίου, με τις διπλές κορυφές φαίνεται ο πολυμορφισμός σε ετεροζυγωτία, όπως διακρίνεται και στην **Εικόνα 9**. το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόρφο G (GG), το δεύτερο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (AA) και το τρίτο σε ετεροζυγωτία (GA).



Εικόνα 9. Αποτελέσματα αλληλούχησης- ανάλυση με Chromas. Απεικόνιση τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR με τη μορφή χρωματογραφήματος. Το βέλος προσδιορίζει τον πολυμορφισμό rs4384209. Το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόρφο G (GG), το δεύτερο σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (AA) και το τρίτο σε ετεροζυγωτία (GA).

Οι γονότυποι που προέκυψαν από την ανάγνωση των παραπάνω χρωματογραφημάτων οδήγησαν στη δημιουργία του **πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με απρεμιλάστη.					
Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος	Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος	Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος
apre1	G/G	apre13	G/A	apre26	G/A
apre2	G/G	apre14	G/G	apre27	G/G
cos10	A/A	apre15	G/G	cos11	G/A
apre4	G/G	apre16	G/A	apre29	G/G
apre5	G/G	apre17	G/G	apre30	G/A
apre6	G/G	apre18	G/G	apre31	G/A
apre7	G/G	cos23	G/A	cos2	G/G
apre8	G/A	apre20	G/G	apre33	G/G
apre9	A/A	apre21	G/A	apre34	G/A
apre10	G/G	apre23	G/A	cos21	G/A
apre11	G/G	apre24	G/A	apre36	G/A
apre12	G/G	apre25	G/G	apre37	G/G
				cos3	G/G

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην ανάπτυξη φαρμάκων για τους ασθενείς με ψωρίαση, όπως τα συστημικά φάρμακα και οι βιολογικοί παράγοντες. Παρόλο που υπάρχει συνεχής βελτίωση στον τομέα της ανάπτυξης φαρμάκων, πολλοί ασθενείς συνεχίζουν να μην αποκρίνονται στις θεραπείες, ή να παρουσιάζουν πολλές παρενέργειες. Για αυτό το λόγο, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες για τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα, κυρίως στο πεδίο της φαρμακογενετικής, έτσι ώστε να επιτευχθεί εξατομικευμένη θεραπεία, η οποία θα ανταποκρίνεται στις ανάγκες κάθε ασθενή με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες.

Η παρούσα φαρμακογενετική μελέτη, αφορά την απρεμιλάστη, μια φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιείται από το 2014 για τη θεραπεία ασθενών με ψωρίαση. Μέχρι τώρα δεν έχει δημοσιευτεί κάποια αντίστοιχη μελέτη οπότε δεν υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων μας, με αποτελέσματα άλλων ερευνών. Οι περισσότερες φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, αφορούν παλαιότερες συστημικές θεραπείες όπως η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη και η ακιτρετίνη, ενώ φαρμακογενετικές μελέτες έχουν διεξαχθεί επίσης και για βιολογικούς παράγοντες όπως τον αντι-TNF και τους αναστολείς των IL-12/23. Η ανάγκη όμως για τη συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει και από το γεγονός ότι δεν αποτελεί πρώτη γραμμή θεραπείας. Η απρεμιλάστη χορηγείται σε ασθενείς στους οποίους οι συστημικές θεραπείες έχουν αποτύχει, εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες, ή υπάρχει κάποια αντένδειξη για τη χορήγησή τους. Αυτό συμβαίνει γιατί η απρεμιλάστη αποτελεί μια θεραπεία με καλή ανταπόκριση και εμφανίζει ελάχιστες παρενέργειες.

Η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στην υπόθεση, πως πιθανόν κάποιοι πολυμορφισμοί στα γονίδια της φωσφοδιεστεράσης 4, μπορεί να επηρεάζουν τη δραστικότητα της απρεμιλάστης, που αποτελεί έναν εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου. Στην παρούσα προκαταρκτική μελέτη ελέγχθηκε ο πολυμορφισμός rs4384209 του γονιδίου *PDE4B* σε 37 ασθενείς με ψωρίαση που βρίσκονται σε αγωγή με απρεμιλάστη και για τους οποίους είναι γνωστή η απόκριση στη θεραπεία.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη γονοτύπηση, έδειξαν ότι η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου είναι 0,24 και βρίσκεται σε συμφωνία με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (0,20). Σχετικά με τις γονοτυπικές συχνότητες, ταυτοποιήθηκαν 14 ετερόζυγοι ασθενείς (G/A), 21 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G) και 2 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (A/A).

Στα αποτελέσματα δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης επειδή ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν επαρκεί έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστα συμπεράσματα, με στατιστική ισχύ. Αυτό θα γίνει σε επόμενο στάδιο της μελέτης όταν θα έχει συλλεχθεί ικανός αριθμός δειγμάτων. Μελλοντικός στόχος είναι επίσης, η μελέτη περισσότερων πολυμορφισμών τόσο αυτού όσο και των υπόλοιπων τριών γονιδίων της *PDE4* οι οποίοι θα βρίσκονται μεταξύ τους σε ανισορροπία σύνδεσης. Εναλλακτικά, και όταν ο αριθμός των δειγμάτων προσεγγίσει τα εκατό, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί κάποια προσέγγιση μεγάλης κλίμακας, όπως για παράδειγμα αλληλούχηση RNA ή εξονιώματος, ανάλυση μικροσυστοιχιών SNP ή γονοτύπηση πολλαπλών SNPs ταυτόχρονα.

Η αλληλούχηση RNA ή εξονιώματος που εστιάζει σε περιοχές με υψηλή βιολογική σημασία, είναι μια φθηνή και γρήγορη τεχνική σε σχέση με την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος. Επίσης δίνει τη δυνατότητα εύρεσης νέων πολυμορφισμών και γονιδίων, καθώς και την εκτίμηση όλων των μεταγράφων συμπεριλαμβανομένης της ποσοτικοποίησής τους και το εναλλακτικό μάτισμα. Δεν περιλαμβάνει όμως τα ιντρόνια καθώς και άλλες περιοχές που μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο και ίσως επηρεάζουν τα συμπτώματα της ασθένειας. Οι μικροσυστοιχίες SNP αντίθετα από την αλληλούχηση RNA δεν δίνουν πληροφορία για νέους πολυμορφισμούς και γονίδια, καθώς η πληροφορία που παρέχουν στηρίζεται σε ήδη υπάρχουσα γνώση. Ωστόσο, παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης συγκριτικής μελέτης και γονοτύπησης μεγάλου αριθμού δειγμάτων και πολλών SNPs.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexander, H., & Nestle, F. O. (2017). Pathogenesis and immunotherapy in cutaneous psoriasis: What can rheumatologists learn? *Current Opinion in Rheumatology*. 29(1), 71-78.
2. Ammar, M., Bouchlaka-Souissi, C., Helms, C. A., Zaraa, I., Jordan, C. T., Anbunathan, H., (...), Bowcock, A. M. (2013). Genome-wide linkage scan for psoriasis susceptibility loci in multiplex Tunisian families. *British Journal of Dermatology*. 168(3), 583–587.
3. Arakawa, A., Siewert, K., Stöhr, J., Besgen, P., Kim, S.-M., Rühl, G., (...), Prinz, J. C. (2015). Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *The Journal of Experimental Medicine*. 212(13), 2203–2212.
4. Augustin, M., Glaeske, G., Radtke, M. A., Christophers, E., Reich, K., Schäfer, I. (2010). Epidemiology and comorbidity of psoriasis in children. *British Journal of Dermatology*. 162(3), 633–636.
5. Batalla, A., Coto, E., González-Fernández, D., González-Lara, L., Gómez, J., Santos-Juanes, J., (...), Coto-Segura, P. (2015). The Cw6 and late-cornified envelope genotype plays a significant role in anti-tumor necrosis factor response among psoriatic patients. *Pharmacogenetics and Genomics*. 25(6), 313–316.
6. Boehncke, W.H., Schön, M.P. (2015). Psoriasis. *Lancet*. 386(9997), 983-994.
7. Burgin, A. B., Magnusson, O. T., Singh, J., Witte, P., Staker, B. L., Bjornsson, J. M., (...), Gurney, M. E. (2010). Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nature Biotechnology*, 28(1), 63–70.
8. Campalani, E., Allen, M. H., Fairhurst, D., Young, H. S., Mendonca, C. O., Burden, A. D., (...), Smith, C. H. (2006). Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *British Journal of Dermatology*, 154(2), 345–352.
9. Campalani, E., Arenas, M., Marinaki, A. M., Lewis, C. M., Barker, J. N. W. N., & Smith, C. H. (2007). Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 127(8), 1860–1867.
10. Capon, F. (2017). The Genetic Basis of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(12), 2526.
11. Capon, F., Munro, M., Barker, J., Trembath, R. (2002). Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *Journal of Investigative Dermatology*.
12. Cargill, M., Schrodi, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., (...), Begovich, A. B. (2007). A Large-Scale Genetic Association Study Confirms IL12B and Leads to the Identification of IL23R as Psoriasis-Risk Genes. *The American Journal of Human Genetics*. 80(2), 273–290.
13. Caruso, R., Botti, E., Sarra, M., Esposito, M., Stolfi, C., Diluvio, L., (...), Monteleone, G. (2009). Involvement of interleukin-21 in the epidermal hyperplasia of psoriasis. *Nature Medicine*. 15(9), 1013–1015.
14. Chen, W., Xu, H., Wang, X., Gu, J., Xiong, H., & Shi, Y. (2015). The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *International Immunopharmacology*. 28(1), 146–153.
15. Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., Mei, F. (2008). Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 40(7), 651-662.
16. Chiu, H. Y., Huang, P. Y., Jee, S. H., Hu, C. Y., Chou, C. T., Chang, Y. T., (...), Tsai, T. F. (2012). HLA polymorphism among Chinese patients with chronic plaque psoriasis: Subgroup analysis. *British Journal of Dermatology*. 166(2), 288–297.
17. Christophers, E. (2001). Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clinical and experimental dermatology*. 26(4), 314-320.
18. Conti, M., Richter, W., Mehats, C., Livera, G., Park, J. Y., Jin, C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 278(8), 5493-5496
19. De Simone, C., Farina, M., Maiorino, A., Fanali, C., Perino, F., Flamini, A., (...), Sgambato, A. (2015). TNF-alpha gene polymorphisms can help to predict response

- to etanercept in psoriatic patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 29(9), 1786–1790.
20. Di Meglio, P., Villanova, F., Nestle, F. O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(8), a015354.
 21. Fala L. (2015). Otezla (Apremilast), an Oral PDE-4 Inhibitor, Receives FDA Approval for the Treatment of Patients with Active Psoriatic Arthritis and Plaque Psoriasis. *American health & drug benefits*, 8(Spec Feature), 105-10.
 22. Fertig, B. A., Baillie, G. S. (2018). PDE4-Mediated cAMP Signalling. *Journal of cardiovascular development and disease*. 5(1), 8.
 23. Francis, S. H., Blount, M. A., Corbin, J. D. (2011). Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Physiological Reviews*, 91(2), 651–690.
 24. Gallo, E., Cabaleiro, T., Román, M., Solano-López, G., Abad-Santos, F., García-Díez, A., & Daudén, E. (2013). The relationship between tumour necrosis factor (TNF)- α promoter and IL12B/IL-23R genes polymorphisms and the efficacy of anti-TNF- α therapy in psoriasis: A case-control study. *British Journal of Dermatology*. 169(4), 819–829.
 25. Galluzzo, M., Boca, A. N., Botti, E., Potenza, C., Malara, G., Malagoli, P., (...), Costanzo, A. (2016). IL12B (p40) Gene Polymorphisms Contribute to Ustekinumab Response Prediction in Psoriasis. *Dermatology*. 232(2), 230–236.
 26. Gandhi, G., Buttar, B. S., Albert, L., Hasan, Q., Aggarwal, R. K. (2011). Psoriasis-associated genetic polymorphism in North Indian population in the CCHCR1 gene and in a genomic segment flanking the HLA-C region. *Disease Markers*. 31(6), 361–370.
 27. Gervin, K., Vigeland, M. D., Mattingsdal, M., Hammerø, M., Nygård, H., Olsen, A. O., (...), Lyle, R. (2012). DNA methylation and gene expression changes in monozygotic twins discordant for psoriasis: Identification of epigenetically dysregulated genes. *PLoS Genetics*. 8(1), 8(1):e1002454.
 28. Ghoreschi, K., Forchhammer, S. (2015). Update on the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis - role of apremilast. *Psoriasis: Targets and Therapy*. 5, 117-124.
 29. González-Lara, L., Batalla, A., Coto, E., Gómez, J., Eiris, N., Santos-Juanes, J., (...), Coto-Segura, P. (2015). The TNFRSF1B rs1061622 polymorphism (p.M196R) is associated with biological drug outcome in Psoriasis patients. *Archives of Dermatological Research*. 307(5), 405–412.
 30. Greb, J.E., Goldminz, A.M., Elder, J.T., Lebwohl, M.G., Gladman, D.D., Wu, J.J., Mehta, N.N., Finlay, A.Y., Gottlieb, A.B. (2016). Psoriasis. *Nature reviews. Disease primers*. 2(16082)
 31. Indhumathi, S., Rajappa, M., Chandrashekar, L., Ananthanarayanan, P. H., Thappa, D. M., & Negi, V. S. (2017). Pharmacogenetic markers to predict the clinical response to methotrexate in south Indian Tamil patients with psoriasis. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 73(8), 965–971.
 32. Jin, Y., Yang, S., Zhang, F., Kong, Y., Xiao, F., Hou, Y., (...), Zhang, X. (2009). Combined effects of HLA-Cw6 and cigarette smoking in psoriasis vulgaris: A hospital-based case-control study in China. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 23(2), 132–137.
 33. Johann, E. G., James, T. E. (2012) in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 8th edn*, Vol. 1 (Eds: Lowell A. Goldsmith, Stephen I. Katz, Barbara A. Gilchrist, Amy S. Paller, David J. Leffell, Klaus Wolff), McGraw-Hill, United States of America
 34. Jonca, N., Leclerc, E. A., Caubet, C., Simon, M., Guerrin, M., & Serre, G. (2011). Corneodesmosomes and corneodesmosin: From the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *European Journal of Dermatology*.
 35. Jordan, C. T., Cao, L., Roberson, E. D. O., Pierson, K. C., Yang, C. F., Joyce, C. E., (...), Bowcock, A. M. (2012). PSORS2 is due to mutations in CARD14. *American Journal of Human Genetics*. 90(5), 784–795.
 36. Julià, A., Ferrandiz, C., Dauden, E., Fonseca, E., Fernandez-Lopez, E., Sanchez-Carazo, J. L., (...), Marsal, S. (2015). Association of the PDE3A-SLCO1C1 locus with the response to anti-TNF agents in psoriasis. *Pharmacogenomics Journal*. 15(4), 322–325.
 37. Julià, M., Guilabert, A., Lozano, F., Suarez-Casasús, B., Moreno, N., Carrascosa, J. M., (...), Mascaró, J. M. (2013). The role of Fc γ receptor polymorphisms in the

- response to anti-tumor necrosis factor therapy in psoriasis: A pharmacogenetic study. *JAMA Dermatology*. 149(9), 1033–1039.
38. Kim T.-G., Jee H., Fuentes-Duculan J., Wu W.H., Byamba D., Kim D.-S., Kim D.-Y., (...), Lee M.-G. (2014). Dermal clusters of mature dendritic cells and T cells are associated with the CCL20/CCR6 chemokine system in chronic psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 134(5), 1462-1465.
 39. Lande, R., Botti, E., Jandus, C., Dojcinovic, D., Fanelli, G., Conrad, C., (...), Frasca, L. (2014). The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature Communications*. 3(5), 5621.
 40. Langley, R. G., & Ellis, C. N. (2004). Evaluating psoriasis with psoriasis area and severity index, psoriasis global assessment, and lattice system physician's global assessment. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 51(4), 563–569.
 41. Lebwohl, M. (2003). Psoriasis. *Lancet*. 361(9364), 1197–1204.
 42. Li K., C.C., H., B., R., S., L., P., S., M., C., (...), Brodmerkel, C. (2016). HLA-C*06:02 Allele and Response to IL-12/23 Inhibition: Results from the Ustekinumab Phase 3 Psoriasis Program. *Journal of Investigative Dermatology*. 136(12), 2364–2371.
 43. Loft, N. D., Skov, L., Iversen, L., Gniadecki, R., Dam, T. N., Brandslund, I., (...), Andersen, V. (2018). Associations between functional polymorphisms and response to biological treatment in Danish patients with psoriasis. *Pharmacogenomics Journal*. 18(3), 494–500.
 44. Lønnberg, A. S., Skov, L., Skytthe, A., Kyvik, K. O., Pedersen, O. B., Thomsen, S. F. (2013). Heritability of psoriasis in a large twin sample. *British Journal of Dermatology*. 169(2), 412–416.
 45. Mabuchi, T., & Hirayama, N. (2016). Binding Affinity and Interaction of LL-37 with HLA-C*06:02 in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(9), 1901–1903.
 46. Masouri, S., Stefanaki, I., Ntritsos, G., Kypreou, K. P., Drakaki, E., Evangelou, E., (...), Antoniou, C. (2016). A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF- α and Anti-IL-12/23 Agents. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 20(3), 221–225.
 47. Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K. S., Friedrich, H. C., Chamilos, G., Ganguly, D., (...), Gilliet, M. (2015). TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nature Immunology*. 16(9), 970–979.
 48. Michalski, J. M., Golden, G., Ikari, J., Rennard, S. I. (2012). PDE4: A novel target in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 91(1), 134-142.
 49. Murdaca, G., Gulli, R., Spanò, F., Lantieri, F., Burlando, M., Parodi, A., (...), Puppo, F. (2014). TNF- α gene polymorphisms: Association with disease susceptibility and response to anti-TNF- α treatment in psoriatic arthritis. *Journal of Investigative Dermatology*. 134(10), 2503–2509.
 50. Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V. C., Jenisch, S., (...), Elder, J. T. (2006). Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis Susceptibility 1 Gene. *The American Journal of Human Genetics*. 78(5), 827–851.
 51. Nestle, F. O., Turka, L. A., Nickoloff, B. J. (1994). Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis: Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *Journal of Clinical Investigation*. 94(1), 202–209.
 52. Oh, I. Y., & de Guzman Strong, C. (2017). The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: EDC and Locus Control. *Journal of Investigative Dermatology*. 137(5), 101-104.
 53. Oka, A., Mabuchi, T., Ozawa, A., Inoko, H. (2012). Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *Journal of Dermatology*. 39(3), 231-241.
 54. Ovejero-Benito, M. C., Muñoz-Aceituno, E., Reolid, A., Saiz-Rodríguez, M., Abad-Santos, F., Daudén, E. (2018). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*. 19(2), 209-222.
 55. Ovejero-Benito, M. C., Prieto-Pérez, R., Llamas-Velasco, M., Belmonte, C., Cabaleiro, T., Román, M., (...), Abad-Santos, F. (2017). Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics*. 18(7), 631–638.

56. Page, C. P., Spina, D. (2012). Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(3), 275–286.
57. Parisi, R., Symmons, D. P. M., Griffiths, C. E. M., Ashcroft, D. M. (2013). Global epidemiology of psoriasis: A systematic review of incidence and prevalence. *Journal of Investigative Dermatology*. 133(2), 377–385.
58. Pedersen, O. B., Svendsen, A. J., Ejstrup, L., Skytthe, A., Junker, P. (2008). On the heritability of Psoriatic arthritis. Disease concordance among monozygotic and dizygotic twins. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 67(10), 1417–1421.
59. Prieto-Pérez, R., Cabaleiro, T., Daudén, E., Ochoa, D., Roman, M., Abad-Santos, F. (2013). Genetics of psoriasis and pharmacogenetics of biological drugs. *Autoimmune diseases*. 2013, 613086.
60. Prieto-Pérez, R., Llamas-Velasco, M., Cabaleiro, T., Solano-López, G., Márquez, B., Román, M., (...), Abad-Santos, F. (2017). Pharmacogenetics of ustekinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics*. 18(2), 157–164.
61. Prieto-Pérez, R., Solano-López, G., Cabaleiro, T., Román, M., Ochoa, D., Tategón, M., (...), Abad-Santos, F. (2015). The polymorphism rs763780 in the IL-17F gene is associated with response to biological drugs in patients with psoriasis. *Pharmacogenomics*. 16(15), 1723–1731.
62. Prieto-Pérez, R., Solano-López, G., Cabaleiro, T., Román, M., Ochoa, D., Tategón, M., (...), Abad-Santos, F. (2018). New polymorphisms associated with response to anti-TNF drugs in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics Journal*. 18(1), 70–75.
63. Riveira-Munoz, E., He, S. M., Escaramís, G., Stuart, P. E., Hüffmeier, U., Lee, C., (...), Estivill, X. (2011). Meta-analysis confirms the LCE3C-LCE3B deletion as a risk factor for psoriasis in several ethnic groups and finds interaction with HLA-Cw6. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(5), 1105–1109.
64. Rutz, S., Wang, X., & Ouyang, W. (2014). The IL-20 subfamily of cytokines-from host defence to tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 14(12), 783-95.
65. Ryan, C., Kelleher, J., Fagan, M. F., Rogers, S., Collins, P., Barker, J. N. W. N., (...), Kirby, B. (2014). Genetic markers of treatment response to tumour necrosis factor- α inhibitors in the treatment of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 39(4), 519–524.
66. Sassone-Corsi, P. (2012). The Cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12).
67. Schafer, P. (2012). Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochemical Pharmacology*. 83(12), 1583-1590.
68. Schafer, P. H., Parton, A., Capone, L., Cedzik, D., Brady, H., Evans, J. F., (...), Chopra, R. (2014). Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cellular Signalling*, 26(9), 2016–2029.
69. Schafer, P. H., Parton, A., Gandhi, A. K., Capone, L., Adams, M., Wu, L., (...), Stirling, D. I. (2010). Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *British Journal of Pharmacology*, 159(4), 842–855.
70. Schett, G., Sloan, V. S., Stevens, R. M., & Schafer, P. (2010). Apremilast: A novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2(5): 271–278.
71. Seldin, M. F., Shigeta, R., Villoslada, P., Selmi, C., Tuomilehto, J., Silva, G., (...), Gregersen, P. K. (2006). European population substructure: clustering of northern and southern populations. *PLoS Genetics*, 2(9), e143.
72. Shaiq, P. A., Stuart, P. E., Latif, A., Schmotzer, C., Kazmi, A. H., Khan, M. S., (...), Nair, R. P. (2013). Genetic associations of psoriasis in a Pakistani population. *British Journal of Dermatology*, 169(2), 406–411.
73. Sutherland, A., Power, R. J., Rahman, P., O’Rielly, D. D. (2016). Pharmacogenetics and pharmacogenomics in psoriasis treatment: current challenges and future prospects. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 12(8), 923-935.
74. Talamonti, M., Botti, E., Galluzzo, M., Teoli, M., Spallone, G., Bavetta, M., (...), Costanzo, A. (2013). Pharmacogenetics of psoriasis: HLA-Cw6 but not LCE3B/3C deletion nor TNFAIP3 polymorphism predisposes to clinical response to interleukin 12/23 blocker ustekinumab. *British Journal of Dermatology*. 169(2), 458–463.

75. Talamonti, M., Galluzzo, M., Chimenti, S., & Costanzo, A. (2016). HLA-C*06 and response to ustekinumab in Caucasian patients with psoriasis: Outcome and long-term follow-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 74(2), 374–375.
76. Talamonti, M., Galluzzo, M., van den Reek, J. M., de Jong, E. M., Lambert, J. L. W., Malagoli, P., (...), Costanzo, A. (2017). Role of the HLA-C*06 allele in clinical response to ustekinumab: evidence from real life in a large cohort of European patients. *British Journal of Dermatology*. 177(2), 489–496.
77. Talamonti, M., Galluzzo, M., Zangrilli, A., Papoutsaki, M., Egan, C. G., Bavetta, M.,(...), Bianchi, L. (2017). HLA-C*06:02 Does Not Predispose to Clinical Response Following Long-Term Adalimumab Treatment in Psoriatic Patients: A Retrospective Cohort Study. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21(3), 295–301.
78. Tervaniemi, M. H., Katayama, S., Skoog, T., Siitonen, H. A., Vuola, J., Nuutila, K., (...), Elomaa, O. (2018). Intracellular signalling pathways and cytoskeletal functions converge on the psoriasis candidate gene CCHCR1 expressed at P-bodies and centrosomes. *BMC Genomics*, 19(1).
79. The International Psoriasis Genetics Consortium. (2003). The International Psoriasis Genetics Study: Assessing Linkage to 14 Candidate Susceptibility Loci in a Cohort of 942 Affected Sib Pairs. *The American Journal of Human Genetics*. 73(2), 430–437.
80. Tsoi, L. C., Stuart, P. E., Tian, C., Gudjonsson, J. E., Das, S., Zawistowski, M., (...), Elder, J. T. (2017). Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nature Communications*, 8.
81. Tutuncu, Z., Kavanaugh, A., Zvaifler, N., Corr, M., Deutsch, R., & Boyle, D. (2005). Fcγ receptor type IIIA polymorphisms influence treatment outcomes in patients with inflammatory arthritis treated with tumor necrosis factor α-blocking agents. *Arthritis and Rheumatism*. 52(9), 2693–2696.
82. van den Reek, J. M. P. A., Coenen, M. J. H., van de L'Isle Arias, M., Zweegers, J., Rodijk-Olthuis, D., Schalkwijk, J., (...), de Jong, E. M. G. J. (2017). Polymorphisms in CD84, IL12B and TNFAIP3 are associated with response to biologics in patients with psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 176(5), 1288–1296.
83. Vasilopoulos, Y., Manolika, M., Zafiriou, E., Sarafidou, T., Bagiatis, V., Krüger-Krasagaki, S., (...), Roussaki-Schulze, A. (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. *Molecular Diagnosis and Therapy*. 16(1), 29–34.
84. Vasilopoulos, Y., Sarri, C., Zafiriou, E., Patsatsi, A., Stamatis, C., Ntoumou, E., (...), Sarafidou, T. (2014). A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics Journal*. 14(6), 523–525.
85. Warren, R. B., Smith, R. L., Campalani, E., Eyre, S., Smith, C. H., Barker, J. N. W. N., (...), Griffiths, C. E. M. (2008). Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 128(8). 1925–1929.
86. Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., (...), Malefyt, R. de W. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology*. 8(9), 950–957.
87. Wittmann, M., Helliwell, P. S. (2013). Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Dermatology and therapy*. 3(1), 1-15.
88. Yan, S., Xu, Z., Lou, F., Zhang, L., Ke, F., Bai, J., (...), Wang, H. (2015). NF-κB-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nature Communications*. 6, 7652.
89. Young, H. S., Summers, A. M., Read, I. R., Fairhurst, D. A., Plant, D. J., Campalani, E., (...), Griffiths, C. E. M. (2006). Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 126(2), 453–459.
90. Zeng, J., Luo, S., Huang, Y., Lu, Q. (2017). Critical role of environmental factors in the pathogenesis of psoriasis. *Journal of Dermatology*. 44(8), 863-872.

91. Zerilli, T., Ocheretyaner, E. (2015). Apremilast (Otezla): A New Oral Treatment for Adults With Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(8), 495-500.
92. Zhang, P., Zhao, M., Liang, G., Yin, G., Huang, D., Su, F., (...), Lu, Q. (2013). Whole-genome DNA methylation in skin lesions from patients with psoriasis vulgaris. *Journal of Autoimmunity*. 41, 17–24.

Links

1. Celgene Corporation. Oral Otezla (apremilast) approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of patients with moderate to severe plaque psoriasis. September 23, 2014. <https://ir.celgene.com/press-releases/press-release-details/2014/Oral-OTEZLA-apremilast-Approved-by-the-US-Food-and-Drug-Administration-for-the-Treatment-of-Patients-with-Moderate-to-Severe-Plaque-Psoriasis/default.aspx>
2. National Psoriasis Foundation. About psoriasis. *National Psoriasis Foundation*. <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis>

Για την περιγραφή των πειραματικών διαδικασιών στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι χρησιμοποιήθηκε υλικό από το βιβλίο:

James D. Watson, Jan A. Witkowski, Richard M. Myers, Amy A. Caudy (2010). Ανασυνδασμένο DNA. *Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε.*