



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΑΧΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
ΡΑΧΗ ΚΟΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Φαρμακογενετική ανάλυση του γονιδίου *IL17A* σε ασθενείς με ψωρίαση

Pharmacogenetic study of the *IL17A* gene in psoriatic patients

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Λιαδάκη Καλλιόπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, πολυπαραγοντική νόσος, η οποία φέρει αυτοάνοσα χαρακτηριστικά, επηρεάζει το δέρμα και προσβάλλει περίπου 2-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Αν και η αιτιολογία της παραμένει άγνωστη, γενετικοί, επιγενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην ανάπτυξή της. Μελέτες των ψωριασικών αλλοιώσεων έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ψωρίαση παρουσιάζουν διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση των κερατινοκυττάρων και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων της επιδερμίδας. Οι ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση συχνά απαιτούν θεραπεία με συστημικές ή βιολογικές μεθόδους, ωστόσο παρατηρείται σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ τόσο της κλινικής απόκρισης, όσο και της τοξικότητας αυτών των παραγόντων στους ασθενείς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η φαρμακογενετική μελέτη του γονιδίου *IL17A* σε ασθενείς που έχουν ακολουθήσει θεραπεία με τον βιολογικό παράγοντα secukinumab (cosentyx), ο οποίος προσδένεται ειδικά στην κυτταροκίνη IL17A εμποδίζοντας την πρόσδεσή της στον υποδοχέα της. Συγκεκριμένα γίνεται έλεγχος της συσχέτισης των πολυμορφισμών rs72916862 και rs17881982, με την κλινική απόκριση στην θεραπεία των ασθενών με ψωρίαση. Η ανακάλυψη μοριακών δεικτών, οι οποίοι θα έχουν την δυνατότητα να προβλέπουν την ανταπόκριση των ασθενών στην θεραπεία, είναι ένα χρήσιμο εργαλείο, το οποίο θα συμβάλει στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης θεραπείας.

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση (n=21) από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπεία με το φάρμακο cosentyx. Αφού είχε ήδη γίνει η λήψη του αίματος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA. Κατόπιν, η έρευνα εστίασε στο γονίδιο *IL17A*, τμήμα του οποίου ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), ώστε να γονοτυπηθούν οι πολυμορφισμοί rs17881982 και rs72916862, ύστερα από αλληλούχηση των προϊόντων PCR και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Λέξεις κλειδιά: Ψωρίαση, Φαρμακογενετική, IL17A, Πολυμορφισμοί, cosentyx, δείκτης, απόκριση

Abstract

Psoriasis is a chronic, multifactorial skin disease with an autoimmune contribution, that affects approximately 2-3% of the population worldwide. Although its etiology remains unknown, genetic, epigenetic, and environmental factors play a role in its development. Studies of psoriatic lesions have indicated that patients with psoriasis demonstrate imbalance of their immune system, that leads to keratinocytes' activation and possible increased mitotic activity in epidermis. Patients with moderate-to-severe psoriasis frequently require treatment with systemic or biologic therapies. Although these therapies are very efficient, variability is observed in both clinical responsiveness and toxicity among the patients.

The purpose of this study is to test the association between the *IL17A* rs72916862 and rs17881982 polymorphisms and the clinical response of patients with psoriasis to treatment with secukinumab (cosentyx). This drug selectively binds to the IL17A cytokine and inhibits its interaction with the IL-17 receptor. The discovery of molecular markers for treatment response would be a useful tool in the development of personalized medicine.

This study involved 21 patients with psoriasis, that had been treated with cosentyx in the General University Hospital of Larissa. Part of the *IL17A* gene, containing rs72916862 and rs17881982 polymorphisms was amplified with PCR and genotyping was performed through sequencing.

Key words: Psoriasis, Pharmacogenetic, IL17A, Polymorphisms, marker, response

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract.....	5
Εισαγωγή.....	10
1. Ψωρίαση	10
1.1 Αιτιολογία της νόσου	11
1.1.1 Γενετική της ψωρίασης	12
1.1.2 Παθογένεση και μηχανισμός της Ψωρίασης	14
1.2 <i>Επιπτώσεις της νόσου</i>	17
1.3 <i>Αξιολόγηση σοβαρότητας της νόσου</i>	17
2 Θεραπευτική αντιμετώπιση της ψωρίασης	18
2.1 Συμβατική, συστημική θεραπεία μέτριας- σοβαρής ψωρίασης	18
2.1.1 Μεθοτρεξάτη.....	18
2.1.2 Κυκλοσπορίνη:.....	19
2.1.3 Ακιτρετίνη:.....	19
2.2 Βιολογική θεραπεία μέτριας- σοβαρής ψωρίασης	19
2.2.1 Φάρμακα αναστολείς TNF.....	20
2.2.2 <i>Ustekinumab</i>	21
2.2.3 <i>Apremilast</i>	22
2.2.4 <i>Secukinumab</i>	23
3. Φαρμακογενετική	24
3.1 Φαρμακογενετική των συμβατικών, συστημικών φαρμάκων.....	25
3.2 Φαρμακογενετική των βιολογικών φαρμάκων	26
3.2.2 Φαρμακογενετική και <i>Ustekinumab</i>	27
3.3 Φαρμακογενετική και <i>Secukinumab</i>	27
Σκοπός	28
Υλικά και Μέθοδοι	29
1. Ασθενείς	29
2. Απομόνωση DNA από ολικό περιφερικό αίμα	29
2.1 Απομόνωση DNA από αίμα με πρωτεΐνωση και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες.....	29
2.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	29
2.1.2 Υλικά.....	30

2.1.3	<i>Πειραματική διαδικασία</i>	30
2.2	Απομόνωση με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.....	31
2.2.1	Αρχή της μεθόδου.....	31
2.1.2	<i>Πειραματική διαδικασία</i>	31
3.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
3.1	Αρχή της μεθόδου.....	31
3.2	Υλικά	32
3.3	<i>Πειραματική Διαδικασία</i>	32
A)	<i>Παρασκευή Πηκτώματος</i>	32
B)	<i>Ηλεκτροφόρηση DNA στο πήκτωμα αγαρόζης</i>	32
4.	Σχεδιασμός εκκινητών	33
4.1	Αρχή της μεθόδου.....	33
4.2	Διαδικασία σχεδιασμού	34
5.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	35
5.1	Αρχή της μεθόδου:.....	35
5.2	Υλικά	36
5.3	Πειραματική διαδικασία	36
6.	Καθαρισμός προϊόντος PCR	38
6.1	Αρχή της μεθόδου:.....	38
7.	Αλληλούχηση (Sequencing) προϊόντων PCR.....	38
	Αποτελέσματα-Συζήτηση	39
1.	Απομόνωση DNA από αίμα με πρωτεϊνάση και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες	39
2.	Απομόνωση DNA από αίμα με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων	39
3.	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου IL17A με PCR	40
4.	Καθαρισμός προϊόντων PCR	40
5.	Αλληλούχηση προϊόντων PCR	41
	Συμπεράσματα	43
	Βιβλιογραφία	44

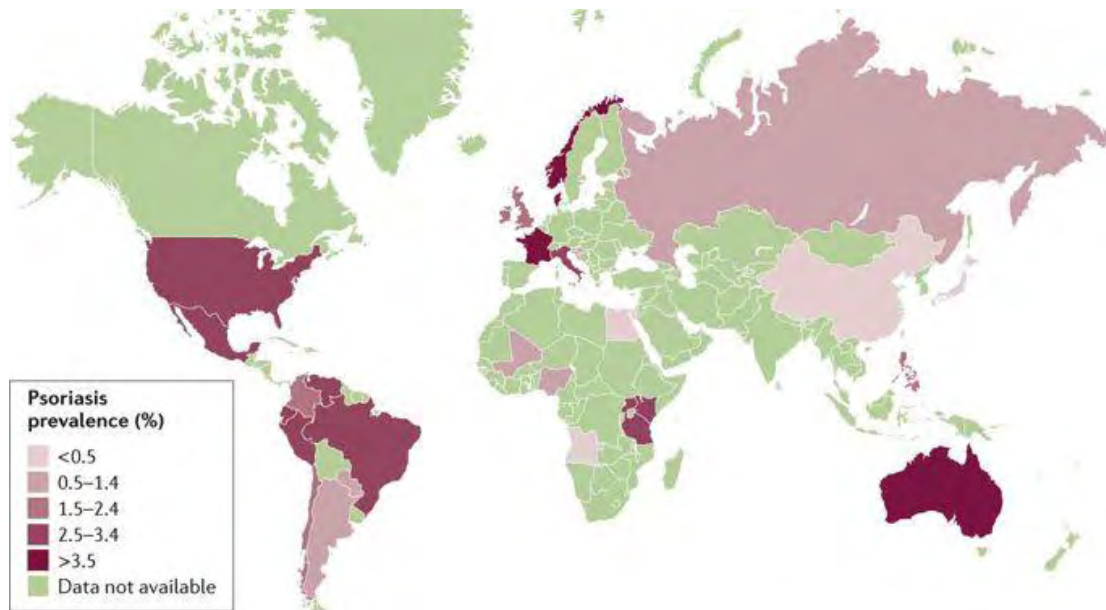
Εικόνα 1: Παγκόσμια κατανομή της ψωρίασης.	11
Εικόνα 2: Χάρτης του MHC. Διακρίνεται η περιοχή, όπου εντοπίζεται ο γενετικός τόπος <i>PSORS1</i> ,.....	13
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του Μηχανισμού ανάπτυξης της Ψωρίασης.	16
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αναστολέων TNF.	21
Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης του φαρμάκου Ustekinumab.	22
Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης του φαρμάκου Apremilast.	23
Εικόνα 7: Τα πέντε σύμπλοκα υποδοχέα ιντερλευκίνης-17 (IL-17R).	24
Εικόνα 8: Το γονίδιο της <i>IL17A</i> (.....)	33
Εικόνα 9: Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου της <i>IL17A</i>	35
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της <i>PCR</i>	36
Εικόνα 11: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γονιδιωματικού DNA, που απομονώθηκε με την μέθοδο πρωτεΐνωσης και εκχύλισης σε οργανικούς διαλύτες.	39
Εικόνα 12: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA, που απομονώθηκε με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.	39
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% τμήματος του γονιδίου <i>IL-17A</i> που ενισχύθηκε με <i>PCR</i>	40
Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου <i>IL-17A</i> με <i>PCR</i> μετά από τον καθαρισμό τους.	40
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου <i>IL-17A</i> που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs17881982, Δεν υπάρχει η έλλειψη A/A.	41
Εικόνα 16: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου <i>IL-17A</i> που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs17881982, Ταυτοποιείται η έλλειψη A/A.	41
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου <i>IL-17A</i> που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs72916862. Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.	42
Εικόνα 18: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου <i>IL-17A</i> που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs72916862. Ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C.	42
Εικόνα 19: Τιμές R^2 μεταξύ των πολυμορφισμών rs72916862 και rs17881982.	43

Πίνακας 1: Συνοπτικός κατάλογος των γενετικών τόπων και συσχετίσεων, οι οποίοι έχουν καταγραφεί στην ψωρίαση.	14
Πίνακας 2: Ενδεικτικές μελέτες πολυμορφισμών που συσχετίζονται με την απόκριση σε θεραπείες με φάρμακα αντι- TNF σε ασθενείς με ψωρίαση.	26
Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η θερμοκρασία τήξεως τους (Tm).	34
Πίνακας 4: Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε μια τυπική PCR	37
Πίνακας 5: Συνθήκες προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή.	37

Εισαγωγή

1. Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μία χρόνια αυτοάνοση ασθένεια με στοιχεία δερματοπάθειας, η οποία χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις και επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού παγκοσμίως (*Boehncke et al., 2015*) (*Εικόνα 1*). Ενώ μπορεί να ξεκινήσει σε οποιαδήποτε ηλικία, έχει παρατηρηθεί ότι στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς που εμφανίζουν ψωρίαση παρουσιάζουν τα συμπτώματα της νόσου είτε μεταξύ των ηλικιών 20 έως 30 ετών είτε μεταξύ των ηλικιών 50 έως 60 ετών. Η νόσος επηρεάζει εξίσου τους άνδρες και τις γυναίκες και είναι πιο συχνή σε μη ισπανόφωνους λευκούς (*Armstrong et al., 2017*). Τα άτομα με ψωρίαση, κατά την εμφάνιση των ψωριασικών αλλοιώσεων παρουσιάζουν διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση των κερατινοκυττάρων με ενδεχόμενο υπερπολλαπλασιασμό της επιδερμίδας. Με άλλα λόγια, προκαλείται όταν τα κύτταρα του δέρματος πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα κάτω από την επιδερμίδα και ύστερα εναποτίθενται στην επιφάνειά της πριν ωριμάσουν. Στην τυπική μορφή της η νόσος έχει σαν αποτέλεσμα επιδερμίδες με παχύ, κόκκινο (φλεγμονώδες) δέρμα που καλύπτεται με ασημο- λευκές φολίδες οι οποίες αναφέρονται ως πλάκες. Οι πλάκες εμφανίζονται πιο συχνά στους αγκώνες, στα γόνατα, στα άλλα μέρη των ποδιών, στο τριχωτό της κεφαλής, στο κάτω μέρος της πλάτης, στο πρόσωπο, στις παλάμες και στα πέλματα των ποδιών. Ανάλογα με τον τύπο των αλλοιώσεων που προκαλούνται στο δέρμα η νόσος μπορεί να διακριθεί σε διάφορες κλινικές μορφές, όπως η σταγονοειδής ψωρίαση, η φλυκταινώδης ψωρίαση, η καμπική ή ανάστροφη ψωρίαση, η ψωρίαση του τριχωτού της κεφαλής και η ψωριασική αρθρίτιδα, οι οποίες και αποτελούν περίπου το 10% των περιπτώσεων, ενώ η πιο συχνή κλινική μορφή είναι η ψωρίαση κατά πλάκας που αποτελεί το 80% των περιπτώσεων. (*Schleicher et al., 2016*).



Nature Reviews | Disease Primers

Εικόνα 1: Παγκόσμια κατανομή της ψωρίασης. Συστημική ανασκόπηση διεθνών πληθυσμιακών μελετών έχει δείξει ότι η συχνότητα της ψωρίασης σε ενήλικες κυμαίνεται μεταξύ 2,7% στις Η.Π.Α και 8,5% στην Νορβηγία. Τα χαμηλότερα ποσοστά της νόσου παρατηρήθηκαν στους Λατινοαμερικάνους Ινδιάνους, στους γηγενείς Αμερικάνους, καθώς επίσης και σε πληθυσμούς της Αφρικής και της Ασίας, ενώ τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στην Ευρώπη. Ωστόσο στην Ασία η διακύμανση της ασθένειας κυμαίνεται μεταξύ χαμηλών ποσοστών όπως στο Χονγκ Κονγκ (0,3%) και υψηλότερων όπως στις Φιλιππίνες (2,4%). (Grebetal., 2016)

1.1 Αιτιολογία της νόσου

Η ψωρίαση θεωρείται ευρέως ως μια πολυπαραγοντική διαταραχή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ κληρονομικών αλληλόμορφων ευαισθησίας και περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου. Παρόλο που η ακριβής αιτία της ψωρίασης είναι ακόμη άγνωστη, γενετικοί (Prieto-Pe´rez et al., 2015), επιγενετικοί (Zhou et al., 2016) και περιβαλλοντικοί παράγοντες (Chandra et al., 2015), διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στην ανάπτυξή της.

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι τραυματισμοί και η χρήση φαρμάκων μπορούν να προκαλέσουν την επιδείνωση των ψωριασικών αλλοιώσεων ή ακόμα και να επάγουν την εκδήλωση της νόσου (Hani et al, 2013). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και το στρες αποτελούν παράγοντες που αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης της ψωρίασης (Higgins 2000).

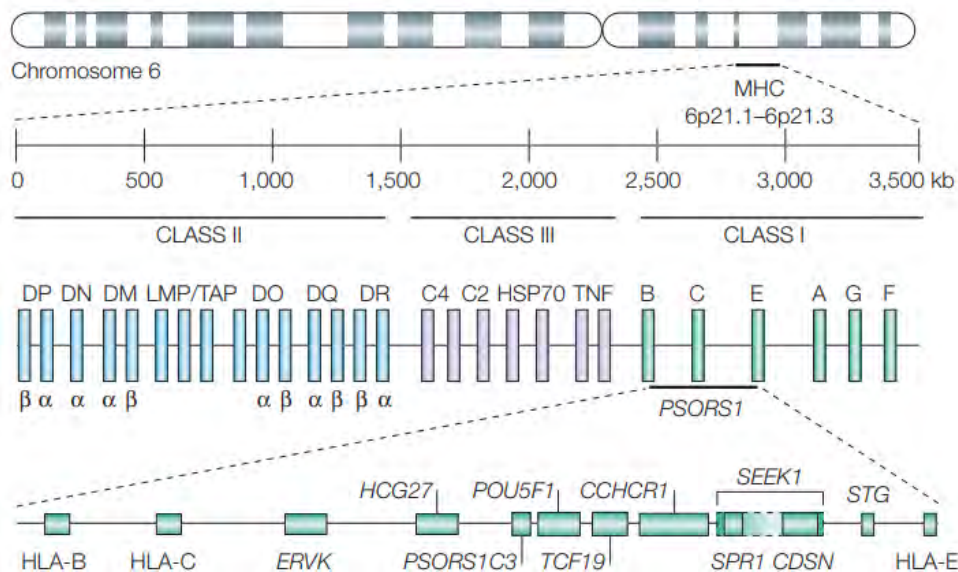
Ο ρόλος της γενετικής στην παθογένεια της νόσου είναι αρκετά καλά τεκμηριωμένος βάσει μελετών σε οικογένειες και δίδυμα (Tang H, et al., 2013). Γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου έχουν διερευνηθεί σε ευρεία κλίμακα με μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος, GWAS (Genome Wide Association Studies), οι οποίες περιλαμβάνουν σάρωση για την εύρεση δεικτών σε ολόκληρο το γονιδίωμα, καθώς και σε ειδικές μελέτες υποψήφιων,

υπεύθυνων γονιδίων. Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* (Gudjonsson et al., 2006) και πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια όπως αυτά των ιντερλευκινών (IL) -12, -17 και -23 και αυτά του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF)-α ταυτοποιήθηκαν ως παράγοντες κινδύνου για την πρόκληση ψωρίασης. (Lee et al., 2013- Prieto-Pérez et al., 2013). Επίσης, μελέτες GWAS έχουν αποδείξει ότι η ύπαρξη διαφόρων SNPs που προδιαθέτουν την εμφάνιση της νόσου ποικίλει ανάμεσα στις διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες (Yin et al., 2015).

1.1.1 Γενετική της ψωρίασης

Πληθυσμιακές μελέτες, έχουν δείξει ότι η πιθανότητα εμφάνισης ψωρίασης είναι αυξημένη μεταξύ συγγενών πρώτου και δεύτερου βαθμού σε σχέση με την εμφάνιση της στο γενικό πληθυσμό. Επίσης μελέτες διδύμων αποκάλυψαν πως η συμπτωματοκτικότητα της νόσου είναι υψηλότερη στα μονοζυγωτικά έναντι των διζυγωτικών διδύμων (Tang et al., 2013).

Το ανοσοποιητικό σύστημα κατέχει ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη και πρόοδο της ψωρίασης. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων επάγει μια ανοσολογική απόκριση που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεϊνών όπως οι TNFα, IL1β, IL12 και IL23. Η ψωρίαση έχει συσχετιστεί με γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση όπως αυτά που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες TNFα, IL12B και IL23R, αλλά και με γονίδια που δεν εμπλέκονται σε ανοσοποιητικές οδούς, όπως αυτά των πρώιμων, διαφοροποιημένων δεικτών κερατινοποίησης (IVL- involucrin) καθώς και των μικρών, πλούσιων σε προλίνη πρωτεϊνών (SPRR- small proline-rich protein). Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην άτυπη επιδερμική, κυτταρική οργάνωση και διαφοροποίηση και έχει βρεθεί πως υπερεκφράζονται στην ψωρίαση (Prieto-Pérez et al., 2013- Iizuka et al., 2004). Μεταξύ των γενετικών τόπων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο, αυτός που έχει ταυτοποιηθεί επανειλημμένα και μελετηθεί διεξοδικά σε σαρώσεις ολόκληρου του γονιδιώματος, είναι ο γενετικός τόπος στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC- Major Histocompatibility complex) του χρωμοσώματος 6p21, γνωστός και ως *PSORS1* (psoriasis susceptibility locus 1). Κάποια από τα γονίδια που υπάρχουν σε αυτήν την περιοχή είναι αυτά του γενετικού τόπου *HLA-C*, της κορνεοδεσμοσίνη (Corneodesmosin, CDSN) και το *CCHCR* (Εικόνα 2). Η ύπαρξη αλληλόμορφων συσχέτισης μεταξύ της ψωρίασης και του MHC μελετάται εδώ και περισσότερα από 30 χρόνια (Russell et al., 1972). Η ισχυρή συσχέτιση του αλληλόμορφου *HLA-Cw6*, που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη MHC τάξης I και βρίσκεται στον γενετικό τόπο *PSORS1*, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στον φινλανδικό πληθυσμό (Tiilikainen et al., 1980). Μια μελέτη του 2006 στην οποία συγκρίθηκαν απλότυποι κινδύνου σε μη συγγενή άτομα καθώς και σε οικογένειες με πρώιμη έναρξη ψωρίασης αποκάλυψε ότι το *HLA-Cw6* ενδέχεται να είναι το “αλληλόμορφο κινδύνου” για την ψωρίαση σε αυτόν τον γενετικό τόπο (Nair et al., 2006).



Εικόνα 2: Χάρτης του MHC. Διακρίνεται η περιοχή, όπου εντοπίζεται ο γενετικός τόπος *PSORS1*, καθώς επίσης και κάποια από τα γονίδια που βρίσκονται μέσα στον *PSORS1* (Bowcock et al., 2005).

Μελέτες των αναδιατάξεων του υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων, TCR (T cell Receptor) έχουν τεκμηριώσει την ύπαρξη επεκτάσεων ολιγοκλωνικών Τ κυττάρων σε ψωριασικές αλλοιώσεις (Lin WJ, et al., 2001). Αυτοί οι ολιγοκλωνικοί πολλαπλασιασμοί περιλαμβάνουν Τ κύτταρα που εκφράζουν CD8 και CD4 (Chang et al., 1994). Το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* φαίνεται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, αφού γονίδια *HLA-C* είναι υπεύθυνα για την παρουσίαση πεπτιδικών αντιγόνων σε CD8+ Τ-κύτταρα, τα οποία αποτελούν τουλάχιστον το 80% των κυττάρων σε αλλοιωμένη ψωριασική επιδερμίδα (Gudjonsson JE et al., 2004). Τα γονίδια *HLA-C* ρυθμίζουν επίσης την ενεργότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (Natural Killer-NK), μέσω αλληλεπίδρασης με τους φονικούς, όμοιους με ανοσοσφαιρίνη, υποδοχείς (KIR- Killer Immunoglobulin-like Receptors). Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *KIR* έχουν επίσης συσχετιστεί με την ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα (Parham P, et al., 2005). Ο γενετικός τόπος *PSORS1* αντιπροσωπεύει περίπου το 35- 50% της κληρονομικότητας της ψωρίασης. Ωστόσο, έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι γενετικοί τόποι υπεύθυνοι για την εμφάνιση της νόσου, είτε μέσω μελετών σε οικογένειες (family based association studies), είτε μέσω μελετών GWAS σε διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίνακας 1) .

Πίνακας 1: Συνοπτικός κατάλογος των γενετικών τόπων και συσχετίσεων, οι οποίοι έχουν καταγραφεί στην ψωρίαση (Chandra et al., 2015).

Γενετικοί τόποι	Υποψήφια γονίδια	Πολυμορφισμοί	Πληθυσμοί
6p21.33 (PSORS1)	HLA-Bw7, DR4, DR7, HLA-A1, HLA-B13, B17, B27, B39, B57, HLA-Cw6, Cw7, PSORS1C3, CCHCR1, CDSN, POU5F1, CDKAL1, IRF4	rs1265181, rs720465, rs130065, rs3130455, rs3130457, rs1265159, rs10484554, rs10484554-rs130065, rs6908425	Indian, Pakistani, French, Chinese Han, Canadian, American, Finnish, Japanese, Italian, British, Swedish, German, Jewish, Spanish, Northern European, Taiwanese, Brazilian
17q25.3 (PSORS2)	NAT9, SLC9A3R1, RAPTOR, CMRF35A1, CMRF35A2-6, CMRF35H, CARD14, STAT3	rs734232, rs11652075, rs2019154	Swedish, Asian, Hispanic, African-American, Chinese, European and Taiwanese families
4q (PSORS3)	IL2, IL21	rs2282276	North-East England, Irish, Swedish, Northern European, Italian, Korean
1q21 (PSORS4)	LOR, S100A8, S100A9, PGLYRP3, PGLYRP4, LCE3A, LCE3B/3C deletion, LCE3D, LCE3E, IVL, FLG	rs4112788, rs4112788, rs4085613, rs4845454, rs1886734, rs512208	Italian families, Singaporean Chinese, European Chinese (in Taiwan), Chinese Han, Spanish, Dutch, Italian, American
3q21 (PSORS5)	CSTA, SLC12A8	rs9813946, rs9831295, rs1554241, rs651630	Swedish families, German, French
19p13 (PSORS6)	Jun-B, ILF3, BSG	rs8259	German, South Chinese, European
1p (PSORS7)	EPS15, IL23R, PTPN22, RUNX3, TNFRSF9	rs11209026, rs1217414, rs7536201	European, North American, British, Tunisian
16q (PSORS8)	NOD2, CARD15, CYLD	rs2076752, rs2066844, rs12925755	American, German, Italian, French, northern European
4q31-34 (PSORS9)	IL15	rs10519613, rs2322301, etc	Chinese Han, Caucasian
5q31.1-q33.1 (PSORS11)	IL12B, IL13, TNIP1	rs3213094, rs20541, rs1024995	North American, Japanese, Chinese Han
20q13 (PSORS12)	RNF114, SPATA2, ZNF313	rs2235617, rs495337	British (Replicated in German population)
6q21 (PSORS13)	TRAF3IP2, TAGAP	rs240993, rs33980500	German, European
3p24	IL17RD	rs1249564	Tunisian
11q24.3	ETS1, ZC3H12C	rs3802826, rs4561177	European
16p13.13	SOCS1	rs367569	European
9q33-34	KLF4	rs10979182	Chinese Han, European
2p22.3	IL1RN	rs315934	Chinese Han, European

1.1.2 Παθογένεση και μηχανισμός της Ψωρίασης

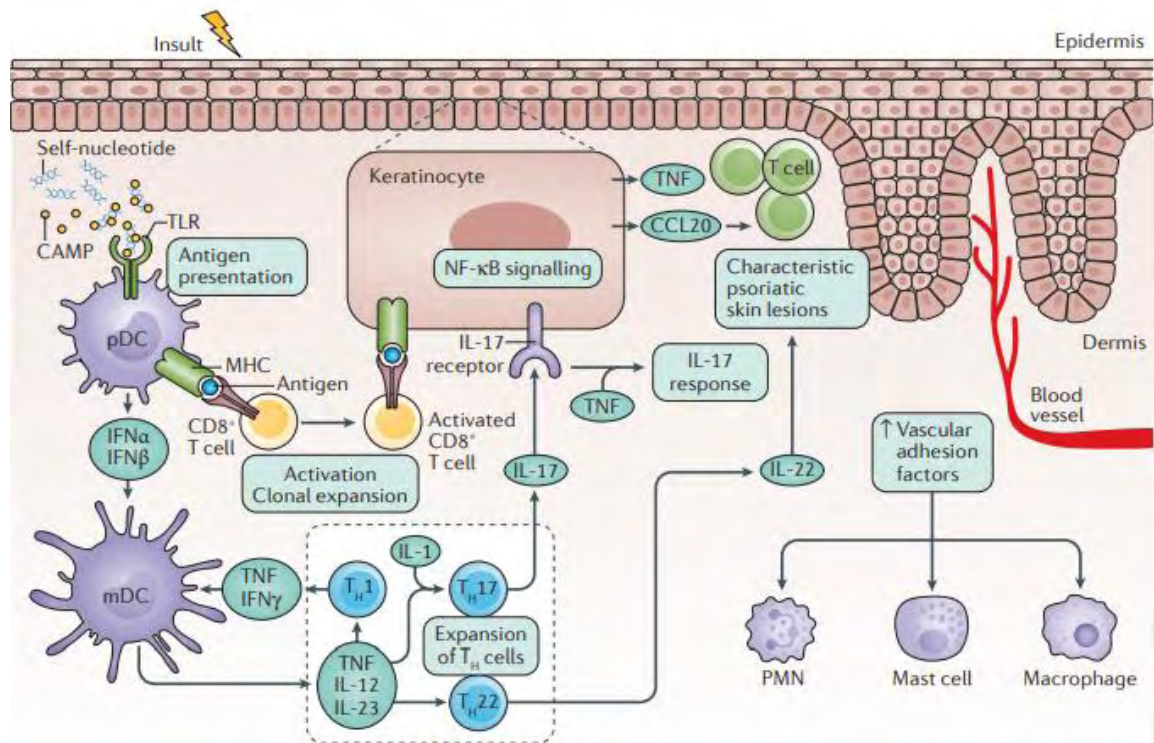
Σήμερα πιστεύεται πως τόσο η έμφυτη, όσο και η προσαρμοστική ανοσία παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης. Οι διάφοροι τύποι κυττάρων που παρατηρούνται σε ψωριασικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν κερατινοκύτταρα (KC- keratinocytes), δένδριτικά κύτταρα (DC- dendritic cells), μονοκύτταρα, μακροφάγα καθώς και T, B λεμφοκύτταρα. Η συμμετοχή των T-κυττάρων στην ψωρίαση έχει υποστηριχθεί από πολλές μελέτες. Στις ψωριασικές αλλοιώσεις παρατηρούνται διαφορετικά υποσύνολα T-κυττάρων,

συμπεριλαμβανομένων των Τ βοηθητικών 1 (Th1) κυττάρων, των κυτταροτοξικών (Tc) και των Th17 κυττάρων. Ρόλο κλειδί στην έμφυτη ανοσοαπόκριση που εμπλέκεται στην παθογένεση της ψωρίασης κατέχουν επίσης κύτταρα όπως τα μακροφάγα, τα KCs, τα DCs, τα μαστοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) και τα Τ φυσικά φονικά κύτταρα (NKT). Διάφορες κυτταροκίνες όπως IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-23, IL-6, IL-8 και TNF- α , παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου στρατολογώντας τα προφλεγμονώδη κύτταρα σε αλλοιώσεις ψωρίασης (Bowcock et al., 2005).

Όσον αφορά τον μηχανισμό ανάπτυξης της ψωρίασης (Εικόνα 3) εξωτερικοί παράγοντες, όπως τραύμα, λοίμωξη ή φάρμακα, αλλά και γενετικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση αυτό-νουκλεοτιδίων. Τα αυτο-νουκλεοτιδία μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με αντιμικροβιακά πεπτίδια (antimicrobial peptides -AMP) τα οποία απελευθερώνονται από κερατινοκύτταρα για την προστασία του οργανισμού από παθογόνα, σε περίπτωση επιθηλιακής βλάβης. Συγκεκριμένα, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια κατελικιδίνης (cathelicidin antimicrobial peptide-CAMP) απελευθερώνονται από τα κερατινοκύτταρα και μπορούν να δεσμεύονται σε υποδοχείς αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα 7 τύπου Toll (TLR7) και του TLR9 στην επιφάνεια πλασμοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων (pDCs). Αυτή η δέσμευση ενεργοποιεί την παρουσίαση αντιγόνου από τα pDCs, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση και την κλωνική επέκταση των αντιγονο-ειδικών CD8+ Τ-κυττάρων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβεί στο δέρμα (ενεργοποίηση Τ-λεμφοκυττάρων μνήμης) και στους τοπικούς λεμφαδένες (ενεργοποίηση αθώνων Τ-λεμφοκυττάρων). Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται τα CD8+ Τ- κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν στην επιδερμίδα, όπου συνδέονται σε υποδοχείς του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (ή ίσως κάποιες φορές των μελανοκυττάρων) και προκαλούν την τοπική απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων, όπως κυτταροκινών, χημειοκινών και μεσολαβητών του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίοι αυξάνουν την τοπική φλεγμονή και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Τα pDCs απελευθερώνουν επίσης τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές ιντερφερόνη- α (IFN α) και IFN β , οι οποίοι διεγείρουν μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs) ώστε να εκκρίνουν πρόσθετους προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως τις IL-12, IL-23 και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Αυτοί οι ενδιάμεσοι μεσολαβητές της έμφυτης ανοσίας διεγείρουν τους πληθυσμούς των Τ- κυττάρων, οι οποίοι κατέχουν ρόλο κλειδί στην φλεγμονή, όπως τα κύτταρα TH1, TH17 και TH22, τα οποία απελευθερώνουν επιπλέον κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Τα κύτταρα TH17 ενεργοποιούνται από την IL-23, η οποία ενισχύεται από την IL-1, για να παράγουν IL-17, η οποία δρα στα κερατινοκύτταρα (τα οποία εκφράζουν τον υποδοχέα της IL-17). Τα κερατινοκύτταρα διεγείρονται στη συνέχεια και παράγουν TNF και τον συνδέτη χημειοκίνης 20 (CCL20, ένα χημειοτακτικό παράγοντα για Τ κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα, DCs208). Σε συνδυασμό με τον TNF και/ή άλλες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η IL-17 διεγείρει επίσης την παραγωγή αμυντικών πρωτεϊνών και χημειοκινών, γεγονός που προάγει

την άμυνα του ξενιστή και οδηγεί στην πρόσληψη επιπλέον φλεγμονωδών κυττάρων στη βλάβη. Η IL-22, η οποία παράγεται από τα TH22 κύτταρα, συμβάλλει στον χαρακτηριστικό ψωριασικό ιστολογικό φαινότυπο, συμπεριλαμβανομένης της επιδερμικής υπερπλασίας, της ακάνθωσης και της παρακεράτωσης (ατελής κερατινοποίηση). Μόρια κλειδιά στο μηχανισμό της ψωρίασης αποτελούν επίσης μεταγραφικοί παράγοντες όπως το κυκλικό AMP (cAMP), η κινάση Janus (JAK), η οικογένεια μεταλλακτών σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (signal transducer and activator of transcription -STAT) και ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF-κB). Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών αυτών παραγόντων οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή μεσολαβητών, όπως οι TNF και IL-17 (Creb et al., 2016).

Η έκφραση υποδοχέων αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor-VEGFR) σε ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί τον αγγειακό πολλαπλασιασμό και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο ώστε να στρατολογηθούν επιπλέον φλεγμονώδη κύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα κτλ) στο δέρμα. Ως αποτέλεσμα, αυτοί οι αγγειογενετικοί παράγοντες οδηγούν στο χαρακτηριστικό στρεβλωτικό (στρίψιμο) των δερματικών αγγείων στην θηλώδη υποστοιβάδα του αλλοιωμένου ψωριασικού δέρματος, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη του σημείου Auspitz (στικτές αιμορραγικές βλάβες που προκαλούνται ύστερα από την αφαίρεση των λεπιών). Στη συνέχεια καθιερώνεται μια συμπτωματική, χρόνια φάση της ψωριασικής φλεγμονής, η οποία τυπικά συνεχίζεται μέχρι την εφαρμογή κάποιας θεραπευτικής παρέμβασης που στοχεύει βασικούς παθολογικούς ρυθμιστές (για παράδειγμα τον TNF ή την IL-17), οπότε και διαταράσσεται ο κύκλος της ασθένειας (Creb et al., 2016).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του Μηχανισμού ανάπτυξης της Ψωρίασης. (Creb et al., 2016)

1.2 Επιπτώσεις της νόσου

Η συγκεκριμένη ασθένεια παρουσιάζει χρόνια, φλεγμονώδη στοιχεία και εμφανίζει χαρακτηριστικά αυτοάνοσης νόσου (Eberle et al., 2016). Εκτός από την επίδραση της στο δέρμα όπου δημιουργεί ερυθρηματώδεις πλάκες με στέρεα προσκολλημένα αργυρόχρωα λέπια κυρίως σε αγκώνες, γόνατα, κνήμες, στην οσφυϊκή χώρα και στο τριχωτό της κεφαλής (Lowes et al., 2014), η ψωρίαση μπορεί να εμφανίσει ένα ευρύ φάσμα επιπτώσεων στον οργανισμό, όπως ψωριασική αρθρίτιδα, διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεγμονώδη νόσος του εντέρου καθώς επίσης και ψυχοκοινωνικές επιδράσεις, οι οποίες μεταξύ άλλων επηρεάζουν τον τρόπο, τη ποιότητα καθώς και τη διάρκεια ζωής του ασθενούς. Έχει παρατηρηθεί ότι τα άτομα με σοβαρή ψωρίαση αρκετές φορές εμφανίζουν έντονη δυσφορία σε διάφορες δραστηριότητες της καθημερινότητας, είτε αυτό έχει να κάνει με σωματική ανικανότητα του ατόμου, είτε ακόμη και με ψυχολογική αστάθεια λόγω εξωτερικής εμφάνισης (Dauden et al., 2012).

1.3 Αξιολόγηση σοβαρότητας της νόσου

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται συνήθως για να εκτιμήσουν την βαρύτητα της νόσου από ήπια έως μέτρια-σοβαρή μορφή, καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι οι δείκτες BSA (**B**ody **S**urface **A**ffected) και PASI (**P**soriasis **A**rea and **S**everity **I**ndex). Ο δείκτης BSA είναι ο αριθμητικός μέσος όρος της προσβεβλημένης επιφάνειας του δέρματος λαμβάνοντας υπόψη την υπόθεση ότι η κεφαλή αντιπροσωπεύει το 10% του συνολικού δέρματος, τα άνω άκρα το 20%, ο κορμός το 30% και τα κάτω άκρα το 40%. Ο δείκτης PASI εκτός από την έκταση αξιολογεί και το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών στις παραπάνω περιοχές (Henseler et al., 2008). Τιμές PASI και BSA μεγαλύτερες του 10 υποδεικνύουν ότι ο ασθενής πάσχει από μετρία-σοβαρή μορφή ψωρίασης. Με αυτούς τους δείκτες εκτιμάται και η ανταπόκριση στις θεραπείες, καθώς το απόλυτο PASI ή το ποσοστό βελτίωσης PASI σε σχέση με την αρχική τιμή [π.χ. μείωση κατά 75% (PASI 75)] χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χορηγούμενων φαρμάκων (Mrowietz et al., 2011).

2 Θεραπευτική αντιμετώπιση της ψωρίασης

Η θεραπεία της ψωρίασης αφορά κατά κύριο λόγο την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στο επίπεδο της επιδερμίδας. Η τοπική θεραπεία θεωρείται η ασφαλέστερη επιλογή και χρησιμοποιείται ευρέως για ήπια ψωρίαση ακολουθούμενη από συστηματικές θεραπείες και φωτοθεραπείες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μέτρια - σοβαρή ψωρίαση. Σε αυτά έρχεται να προστεθεί η καινοτόμα σύνθεση βιολογικών φαρμάκων, που αποτελεί έναν ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα θεραπείας και παρέχει πιο αποτελεσματικές επιλογές. Συνήθως συνίσταται συνδυασμός των υπάρχοντων θεραπευτικών μεθόδων ώστε να βελτιωθεί σύντομα η κατάσταση της νόσου χωρίς περαιτέρω παρενέργειες. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας συνηγορούνται εκτός από την σοβαρότητα της νόσου και άλλοι παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, κάποια άλλη συνυπάρχουσα νόσος, τυχόν εγκυμοσύνη και η λήψη άλλων φαρμάκων (Raut et al., 2013).

2.1 Συμβατική, συστηματική θεραπεία μέτριας-σοβαρής ψωρίασης

Τα συστηματικά φάρμακα είναι η πρώτη θεραπευτική προσέγγιση για ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση που δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με τοπικές θεραπείες ή φωτοθεραπεία. Τρεις συμβατικές, συστηματικές θεραπείες υπάρχουν για την αγωγή κατά της ψωρίασης. Αυτές είναι η μεθοτρεξάτη (ανταγωνιστής του φολικού οξέος), η κυκλοσπορίνη Α (καταστολέας Τ λεμφοκυττάρων) και η ακιτρετίνη (ρετινοειδές) (Prieto-Perez et al., 2013).

2.1.1 Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη θεραπεία σοβαρής ψωρίασης από την δεκαετία του 1960. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την θεραπεία της ερυθροδερμικής ψωρίασης, της φλυκταινώδης ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας, είτε ως βραχυπρόθεσμη επιλογή για τον έλεγχο ασθενών σε ασταθή κατάσταση, είτε ως μακροπρόθεσμη θεραπεία συντήρησης. Η μεθοτρεξάτη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των Τ και Β κυττάρων και καταστέλλει την έκκριση κυτταροκινών όπως οι IL-1, IFN-α και TNF-α. Αποτρέπει επίσης την επιδερμική κυτταρική διαίρεση στην ψωρίαση, εμποδίζοντας ανταγωνιστικά τη δράση του ενζύμου διυδροφυλική αναγωγή, με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Σε σύγκριση με άλλες θεραπείες είναι αρκετά φθηνή, αλλά ενδέχεται να οδηγήσει σε αναιμία και ηπατοτοξικότητα (Roeningk et al., 1998).

2.1.2 Κυκλοσπορίνη:

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα κυκλικό εντεκαπεπτίδιο, το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *Tolypocladium inflatum* και δρα προκαλώντας ανοσοκαταστολή με αναστολή της πρώτης φάσης ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων. Το φάρμακο αυτό δεσμεύεται σε μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη των Τ-κυττάρων, που ονομάζεται κυκλοφιλίνη και σχηματίζει ένα σύμπλοκο το οποίο στη συνέχεια δεσμεύεται και αναστέλλει το ένζυμο καλσινευρίνη, μια ασβεστιοεξαρτώμενη σερίνη-θρεονίνη φωσφατάση, η οποία ενεργοποιεί τα Τ-λεμφοκύτταρα. Η αναστολή της καλσινευρίνης έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή μεταγωγής σήματος στο μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT, που τελικά έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών, όπως η IL-2 και η ιντερφερόνη-γ. Ωστόσο η χρήση της κυκλοσπορίνης κατά της ψωρίασης, ενδέχεται να οδηγήσει σε παρενέργειες που περιλαμβάνουν τη νεφροτοξικότητα και την υπέρταση (Georgouras et al., 1997).

2.1.3 Ακιτρετίνη:

Η ακιτρετίνη είναι ένα ρετινοειδές, το οποίο ενδείκνυται για τη θεραπεία σοβαρής ψωρίασης σε ενήλικες. Πρόκειται για έναν προσδέτη πυρηνικού υποδοχέα, ο οποίος συνδέεται στον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptors -RAR) και στον ρετινοϊκό υποδοχέα Χ (retinoid X receptors -RXR) και μειώνει τον αριθμό των CD25+ Τ-κυττάρων, αναστέλλοντας ταυτόχρονα τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, και αυξάνοντας τον ρυθμό διαφοροποίησής τους. Η ακιτρετίνη επιλέγεται συχνά είτε ως μονοθεραπεία ενάντια στην ψωρίαση, είτε σε συνδυασμό με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως η φωτοθεραπεία και οι βιολογικοί παράγοντες. Στις παρενέργειες που έχουν συσχετιστεί με την χρήση ακιτρετίνης ως θεραπεία κατά της ψωρίασης, περιλαμβάνονται η αλωπεκία και η υπερτριγλυκεριδαιμία (Mendonça et al., 2003).

2.2 Βιολογική θεραπεία μέτριας- σοβαρής ψωρίασης

Η κατανόηση της ανοσοπαθογένειας της ψωρίασης, έχει οδηγήσει στην εμφάνιση νέων θεραπειών, που στοχεύουν σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε μόρια που επάγουν και διατηρούν τις κλινικές μεταβολές, που παρατηρούνται στις ψωριασικές πλάκες. Οι βιολογικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις σοβαρής ψωρίασης και ψωριασικής αρθρίτιδας και δρουν είτε στοχεύοντας σε Τ-κύτταρα, είτε μπλοκάροντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Sullivan et al., 2009).

Τα βιολογικά φάρμακα περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα παραγόντων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης όπως φάρμακα αντι-TNF, το ustekinumab και μονοκλωνικά αντισώματα, που στοχεύουν κυτταροκίνες όπως η IL-17. Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι η διατήρηση μιας αποδεκτής απόκρισης με χρήση φωτοθεραπείας ή παραδοσιακής συστημικής θεραπείας συχνά απαιτεί τη χρήση

δόσεων που σχετίζονται με τοξικότητα. Αντίθετα, οι βιολογικοί παράγοντες παρουσιάζουν ικανοποιητικό προφίλ αποφυγής κινδύνου και αποτελεσματικότητας, καθώς είναι ειδικά σχεδιασμένα για να αναστέλλουν τα μόρια στόχους που εμπλέκονται στην παθογένεια της ψωρίασης (Dogra et al., 2006).

2.2.1 Φάρμακα αναστολείς TNF

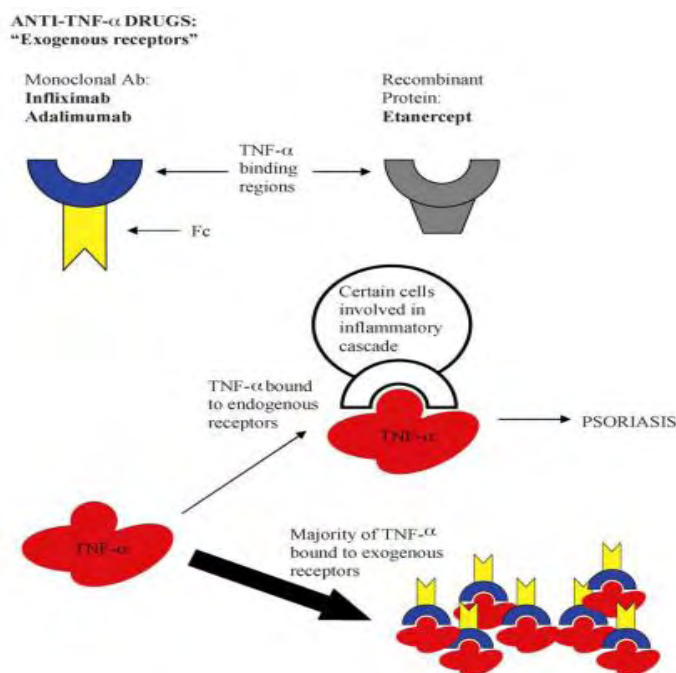
Ο TNF-α είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που βρίσκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις στις αρθρώσεις και στο δέρμα και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση φλεγμονής στην ψωρίαση. Τα δερματικά κύτταρα και τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα εκκρίνουν τον TNF-α, ο οποίος δεσμεύεται με τους υποδοχείς στόχους που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε κύτταρο του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων και κερατινοκυττάρων, όπου παίζει ενεργό ρόλο στην πρόσληψη, μετανάστευση και ενεργοποίησή τους. Τα λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται από αυτόν εκκρίνουν περισσότερες κυτταροκίνες, με αποτέλεσμα περισσότερα κύτταρα να στρατολογούνται και να δημιουργείται ένας φλεγμονώδης καταρράκτης. Οι βιολογικοί παράγοντες που εμποδίζουν την δραστηριότητα του TNF είναι τα αντι-TNF φάρμακα, τα οποία περιλαμβάνουν τα etanercept, infliximab και adalimumab. Οι παράγοντες αυτοί λειτουργούν ως εξωγενείς υποδοχείς οι οποίοι ανταγωνίζονται τους αντίστοιχους ενδογενείς υποδοχείς, δεσμεύοντας με υψηλότερη συγγένεια τον TNF-α και εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τα κερατινοκύτταρα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αναστέλλοντας κατ' επέκταση την φλεγμονή που συχνά παρατηρείται στην ψωρίαση (Εικόνα 4) (Koo et al., 2005).

Etanercept (Enbrel®): Πρόκειται για μια χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από την εξωκυττάρια θέση σύνδεσης για τον υποδοχέα TNF-α και την περιοχή του σταθερού τμήματος Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG1. Δημιουργείται έτσι ένας εξωγενής υποδοχέας, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τον TNF-α από ότι ο ενδογενής υποδοχέας του. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση των ποσοτήτων ενεργού TNF και η αναστολή των γεγονότων που οδηγούν σε ψωριασική φλεγμονή (Gottlieb et al., 2003).

Infliximab (Remicade®): Πρόκειται για ένα χιμαιρικό, μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αποτελείται από μεταβλητές περιοχές ποντικού και ανήκει στην τάξη IgG1. Ρόλος του είναι να δεσμεύεται ειδικά με τον TNF-α αναστέλλοντας την παραγωγή προφλεγμονών κυτταροκινών και εξουδετερώνοντας έτσι τη δράση του (Gottlieb et al., 2003).

Adalimumab (Humira®): Πρόκειται για ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1, το οποίο δεσμεύεται με πολύ μεγάλο βαθμό συγγένειας με τον TNF-α, αναστέλλοντας έτσι την πρόσδεσή του στους κυτταρικούς του υποδοχείς, p55 και p75 (Weinblatt et al., 2003).

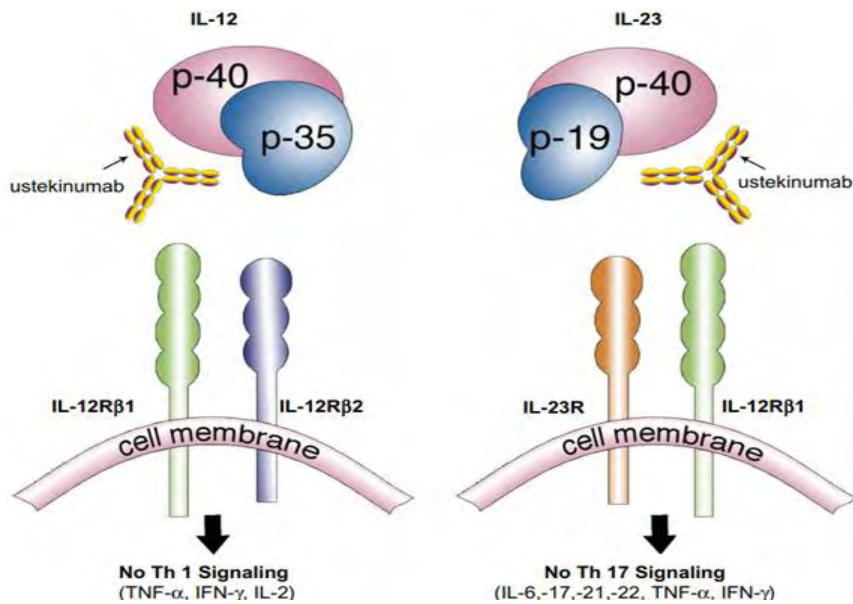
Οι βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν τον -TNF και οι οποίοι έχουν εγκριθεί για ψωρίαση έχουν αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικοί έναντι της νόσου. Οι θεραπείες αυτές, ωστόσο, είναι ιδιαίτερα δαπανηρές και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως αυξημένες πιθανότητες λοίμωξης και λεμφώματος (Bahner et al., 2009).



Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αναστολέων TNF. Τα φάρμακα αυτά λειτουργούν ως εξωγενείς υποδοχείς για τον TNF-α, δεσμεύοντας τον και εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσδεσή του στους ενδογενείς υποδοχείς των κυττάρων, τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία ανάπτυξης φλεγμονής (Kooetal., 2005).

2.2.2 Ustekinumab

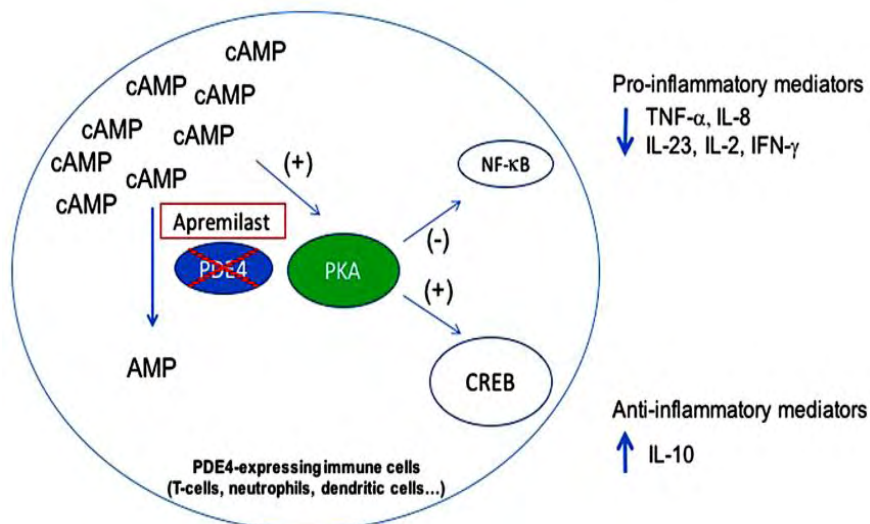
Το ustekinumab (Stelara®) είναι ένα ανθρώπινο IgG1 μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται με την υπομονάδα p40, η οποία είναι παρόμοια στις IL-12 και IL-23. Αυτό το βιολογικό φάρμακο σχεδιάστηκε για να αναστέλλει μέσω σύνδεσής του στις IL-12 και IL-23 την διαφοροποίηση αθών T-λεμφοκυττάρων σε Th1 και Th17, καταστέλλοντας κατ' επέκταση αυτές τις κυτταρικές σειρές και την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών, οι οποίες συμμετέχουν στον μηχανισμό παθοφυσιολογίας της ψωρίασης (Εικόνα 5). Σε γενικές γραμμές, το ustekinumab είναι καλά ανεκτό από τον οργανισμό και ασφαλές (Zweegers et al., 2017).



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης του φαρμάκου Ustekinumab. Το φάρμακο αυτό δρα αφού προσδεθεί σε κυτταροκίνες, όπως οι IL-12 και IL-23 (Lebwohl et al., 2010) .

2.2.3 Apremilast

Η φωσφοδιεστεράση (PDE) 4 εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης με την διάσπαση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), ενός βασικού δεύτερου αγγελιοφόρου. Στις ψωριασικές πλάκες, παρατηρείται εκλεκτική έκφραση της PDE4 σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους και την υπερέκφραση των γονιδίων τους. Η φωσφοδιεστεράση 4 εκφράζεται επίσης σε δομικούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα κερατινοκύτταρα, το αγγειακό ενδοθήλιο και ο αρθρικός υμένας. Το φάρμακο apremilast (Otezla®) είναι ένας αναστολέας της PDE4, μικρού μοριακού βάρους, που λαμβάνεται δια στόματος. Δρα δεσμεύοντας τη PDE4 και αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του cAMP, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική αύξηση των επιπέδων του σε όλα τα κύτταρα που εκφράζουν την PDE4. Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με την σειρά της φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη CREB (cAMP response element-binding protein), η οποία σχετίζεται με την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους IL-10. Παράλληλα η PKA αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (NF-κΒ), ο οποίος σχετίζεται με την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών παραγόντων TNF-α, IL-23, IL-8, IL-2, IFN-γ (Schafer et al., 2014) (Εικόνα 6).

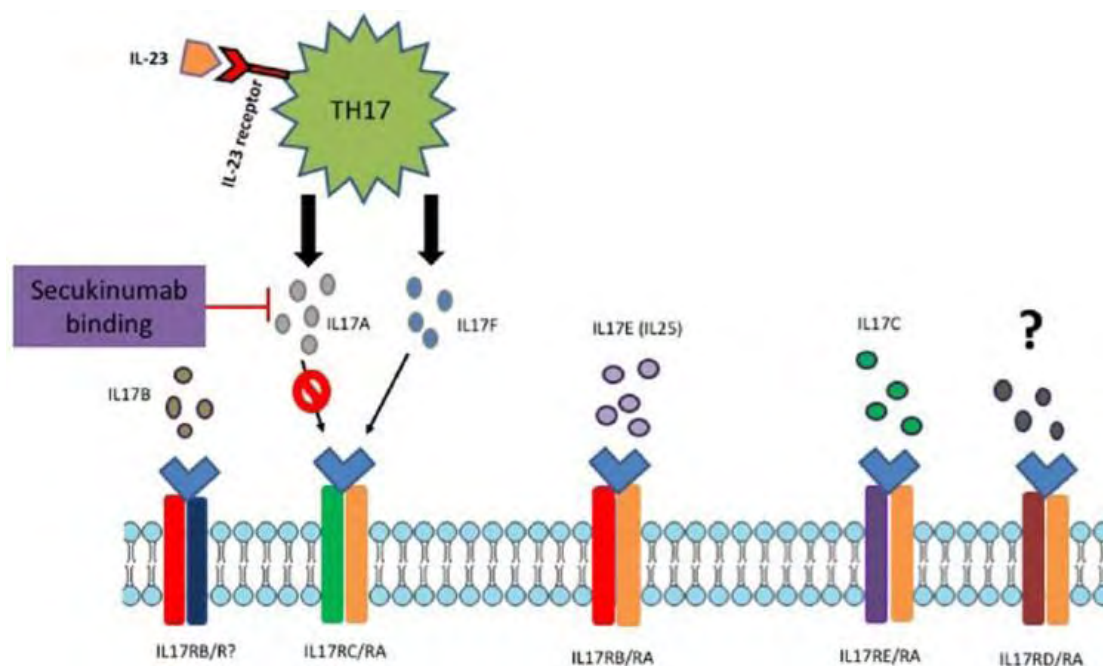


Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης του φαρμάκου Apremilast. Το φάρμακο αυτό δρα δεσμεύοντας τη PDE4 και αναστέλλοντας την αποικοδόμηση του cAMP (Torres et al., 2018)

2.2.4 Secukinumab

Το Secukinumab (Cosentyx®, Novartis International AG, Βασιλεία, Ελβετία) είναι ένα αντίσωμα ανασυνδυασμένης ανθρώπινης μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης G1 (IgG1) που επιλεκτικά στοχεύει στην IL-17A και αποκλείει την αλληλεπίδραση αυτής με τον υποδοχέα της (Εικόνα 7). Η παρεμπόδιση της δράσης αυτής της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης, αναστέλλει τις βασικές οδούς της νόσου της ψωρίασης ενώ προάγει την ομαλοποίηση της ανοσολογικής λειτουργίας και της ιστολογίας του δέρματος. Στις θεραπευτικές δόσεις που χρησιμοποιούνται στην ψωρίαση το secukinumab εξουδετερώνει πλήρως την IL-17A, χωρίς να εξουδετερώνει την IL-17F, ή να επηρεάζει άμεσα άλλες Th17 λειτουργίες ή την οδό των Th1 κυττάρων. Αυτή η εξειδίκευση στόχου προσφέρει τη δυνατότητα για λιγότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες θεραπείες σήμερα (Frieder et al., 2018).

Το Secukinumab έχει συσχετιστεί με ταχύ ρυθμό κλινικής απόκρισης, αποδίδοντας τιμές PASI 50/75 σε χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων από την αρχή της θεραπείας. Οι τιμές αυτές διατηρούνται ή βελτιώνονται καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας έως την εβδομάδα 52 (Langley et al., 2014). Επιπλέον, μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών οι οποίοι ακολουθούν θεραπεία με secukinumab επιτυγχάνει υψηλότερες κλινικές αποκρίσεις PASI 90 και 100 σε σύγκριση με ασθενείς στους οποίους χορηγούνται άλλοι βιολογικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα το ustekinumab. Συγκεκριμένα μελέτη των Blauvelt et al, έδειξε ότι το ποσοστό των ασθενών (n=676) που έλαβαν Secukinumab και παρουσίασαν την εβδομάδα 52 κλινική απόκριση PASI 90 ήταν 76%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των ασθενών που έλαβε ustekinumab ήταν 61% (Blauvelt et al., 2017).



Εικόνα 7: Τα πέντε σύμπλοκα υποδοχέα ιντερλευκίνης-17 (IL-17R) και οι αντίστοιχοι προσδέτες τους. Η οικογένεια κυτταροκινών IL-17 αποτελείται από έξι μέλη (IL-17A έως IL-17F), με την IL-17A να είναι η πρωτεύουσα τελεστική κυτταροκίνη της Th17 κυτταρικής γραμμής. Οι IL-17 ασκούν τις βιολογικές λειτουργίες τους μέσω δέσμευσης στον αντίστοιχο διαμεμβρανικό υποδοχέα IL-17 (IL-17R), ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από πέντε διαφορετικές υπομονάδες (IL-17RA-IL-17RE). Η IL-17B δεσμεύεται στο σύμπλοκο υποδοχέα που αποτελείται από την υπομονάδα IL-17RB και μια άγνωστη υπομονάδα. Οι IL-17A και IL-17F παράγονται από κύτταρα TH17 και καθώς παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους συνδέονται στο ίδιο σύμπλοκο υποδοχέα, που αποτελείται από της υπομονάδες IL-17RA και IL-17RC. Η IL-17E (IL-25) δεσμεύεται στο σύμπλοκο του υποδοχέα IL-17RB και IL-17RA, ενώ η IL-17C δεσμεύεται στο σύμπλοκο υποδοχέα IL-17RE και IL-17RA. Ο συνδέτης για το σύμπλοκο του υποδοχέα IL-17RD και IL-17RA είναι επί του παρόντος άγνωστος. Το secukinumab δρά αναστέλλοντας την IL-17A και εμποδίζοντας την δέσμευσή της στον υποδοχέα (Frieder et al., 2018).

3. Φαρμακογενετική

Φαρμακογενετική είναι η επιστήμη, η οποία επικεντρώνεται στην ανάλυση και τον συσχετισμό μεταξύ των αποκρίσεων των ασθενών σε συγκεκριμένα φάρμακα και των παραλλαγών που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα γονίδια. Οι κύριοι πολυμορφισμοί που μελετώνται είναι αυτοί του μονού νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNPs) που σχετίζονται είτε με την φαρμακοκινητική είτε με την φαρμακοδυναμική συγκεκριμένων φαρμάκων (Valdes R et al., 2016). Η φαρμακοκινητική μελετά τις επιδράσεις του οργανισμού στο φάρμακο και κυρίως επικεντρώνεται στην φυσιολογική διαδικασία μεταβολισμού των φαρμάκων που οδηγεί στην απέκκρισή τους, ή στην περίπτωση των προφαρμάκων στη δημιουργία ενεργών μεταβολιτών (Daly AK et al., 2003). Η φαρμακοδυναμική επικεντρώνεται στην ανάλυση των διαδικασιών που προκαλούνται στον οργανισμό ύστερα από την χορήγηση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου. Στο πλαίσιο των πολυμορφισμών που αφορούν στη φαρμακοδυναμική αναζητούνται SNPs τα οποία εντοπίζονται σε γονίδια

που κωδικοποιούν φαρμακευτικούς στόχους (*Roden DM et al., 2011*). Ένας άλλος πολυμορφισμός που χρησιμοποιείται επίσης ευρέως, είναι αυτός των πολυμορφισμών αριθμού αντιγράφων (Copy number variations- CNVs), στον οποίο η αύξηση ή η μείωση του αριθμού των αντιγράφων συγκεκριμένων γονιδίων, ή περιοχών γονιδίων, μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση ή μείωση της αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου (*Agundez et al., 2012*).

Στόχος της φαρμακογενετικής αποτελεί η εξατομικευμένη θεραπεία, μέσω της ανακάλυψης και μελέτης βιοδεικτών του γονιδιώματος, οι οποίοι θα καθιστούν δυνατή την πρόβλεψη της απόκρισης του ασθενούς σε μια φαρμακευτική αγωγή με βάση το γενετικό του προφίλ. Με τον τρόπο αυτό, η θεραπεία θα είναι προσαρμοσμένη στα γενετικά χαρακτηριστικά του ασθενούς, καθιστώντας την έτσι αποτελεσματικότερη και αποφεύγοντας την ύπαρξη παρενεργειών. Επιπλέον, με την εξατομικευμένη θεραπεία, το κόστος της φαρμακευτικής αγωγής θα μειωθεί αισθητά στον εκάστοτε ασθενή, καθώς ο ιατρός θα είναι σε θέση να συνταγογραφεί περισσότερο στοχευμένα και αποτελεσματικά φάρμακα, αποφεύγοντας την άσκοπη χορήγηση φαρμάκων, στα οποία λόγω γενετικού προφίλ ο ασθενής δεν θα αποκρίνεται. Τέλος με τη βοήθεια της φαρμακογενετικής δίνεται η ευκαιρία στις φαρμακευτικές εταιρείες να βελτιστοποιήσουν τα φάρμακά τους, κάνοντάς τα αποτελεσματικότερα και να αναπτύξουν νέα τα οποία θα είναι ειδικά για συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων.

3.1 Φαρμακογενετική των συμβατικών, συστημικών φαρμάκων

Αρκετές φαρμακογενετικές μελέτες έχουν αναζητήσει SNPs, τα οποία θα μπορούν να προβλέψουν την θεραπευτική απόκριση στη μεθοτρεξάτη (*Sutherland et al., 2016*). Ενδεικτικά, η παρουσία των SNPs rs35592, rs2238476, rs28364006 στο γονίδιο μεταφοράς *ABCC1* (ATP-binding cassette, subfamily C, member 1) και των SNPs rs17731538, rs13120400 στο γονίδιο *ABCG2* (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2), έχει συσχετιστεί με αποτελεσματική απόκριση ασθενών με ψωρίαση στην μεθοτρεξάτη (n=374) (*Warren et al., 2008*).

Η απορρόφηση της κυκλοσπορίνης A, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως στο έντερο, είναι συχνά χαμηλή και σε μεγάλο βαθμό μεταβλητή μεταξύ των ασθενών. Η μεταβλητότητα αυτή μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από την έκφραση και τη λειτουργία των μεταβολιζομένων ισοενζύμων του CYP3A (*CYP3A4* και *CYP3A5*) και της μεταφορικής P-γλυκοπρωτεΐνης (*ABCB1*). Σε μια μελέτη 84 ασθενών με ψωρίαση που παρακολουθήθηκαν για μια περίοδο 3 μηνών θεραπείας με κυκλοσπορίνη A, ο γονότυπος 3435T στον πολυμορφισμό rs1045642 του *ABCB1* εμφανίστηκε πιο συχνά σε μη ανταποκρινόμενους ασθενείς από ό, τι στους ανταποκρινόμενους (*Vasilopoulos et al., 2014*).

Όσον αφορά την ακιτρετίνη, οι παραλλαγές στον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) έχουν διερευνηθεί σε σχέση με την ευαισθησία στη νόσο. Στις μελέτες αυτές βρέθηκε πως η παραλλαγή rs833061 στον *VEGF* φαίνεται να παίζει ρόλο στην πρόβλεψη απόκρισης στην ακιτρετίνη, καθώς παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα του γονοτύπου TT στον πολυμορφισμό rs833061 σε ασθενείς με ψωρίαση που δεν ανταποκρίθηκαν στην ακιτρετίνη, σε σύγκριση με εκείνους που έδειξαν απόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του rs2010963 του *VEGF* και της απόκρισης σε ακιτρετίνη (n=327) (Young et al., 2004).

3.2 Φαρμακογενετική των βιολογικών φαρμάκων

3.2.1 Φαρμακογενετική και φάρμακα αναστολείς τουTNF:

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες φαρμακογενετικές μελέτες για τον εντοπισμό πολυμορφισμών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της θετικής απόκρισης ασθενών σε φάρμακα αντι-TNF (Πίνακας 2). Ενδεικτικά κάποιες από τις μελέτες αυτές έχουν καταλήξει στα εξής συμπεράσματα: Οι πολυμορφισμοί rs9304742 στο γονίδιο *ZNF816A* και rs96844 στο γονίδιο *MAP3K1* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της απόκρισης σε φάρμακα αντι-TNF ύστερα από θεραπεία 3 μηνών. Επίσης, οι πολυμορφισμοί rs13437088 στο *HLA-B*, rs2431697 στο *PTTG1* και rs928655 στο *GBP6* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί προγνωστικοί δείκτες της απόκρισης στο φάρμακο etanercept (Ovejero-Benito et al., 2017).

Πίνακας 2: Ενδεικτικές μελέτες πολυμορφισμών που συσχετίζονται με την απόκριση σε θεραπείες με φάρμακα αντι-TNF σε ασθενείς με ψωρίαση. (Ovejero-Benito et al., 2017)

Γονίδιο	SNP	Αλληλόμορφο ή γονότυπος απόκρισης	Συχνότητα για το σπάνιο αλληλόμορφο (MAF)	Αριθμός ασθενών	Φάρμακο	Διάρκεια θεραπείας (μήνες)	Τιμή απόκρισης	Αναφορές
<i>ZNF816A</i>	rs9304742	CC	C: 0.43	144, 68	AntiTNF/ETN	3, 6, and 12/6	PASI75	Prieto-Perez et al.2016. OvejeroBenito et al.2017
<i>CDKAL1</i>	rs6908425	CC	T: 0.22	144	AntiTNF	6	PASI75	Prieto-Perez et al.2016
<i>MAP3K1</i>	rs96844	TT	A: 0.45	144, 78	AntiTNF/ETN	3 and 6/6	PASI75	Prieto-Perez et al.2016 Ovejero Benito et al.2017
<i>IL17A</i>	rs4819554	AA	G: 0.23	205	AntiTNF	3	PASI75	Batalla et al.2016
<i>HLA-B/MICA</i>	rs13437088	CC	T: 0.34	78	ETN	3	PASI75	Ovejero-Benito et al.2017
<i>PTTG1</i>	rs2431697	TT	C: 0.38	68	ETN	6	PASI75	Ovejero-Benito et al.2017
<i>GBP6</i>	rs928655	GG	G: 0.45	68	ETN	6	PASI75	Ovejero-Benito et al.2017

3.2.2 Φαρμακογενετική και Ustekinumab

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει τον θετικό ρόλο του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* ως βιοδείκτη απόκρισης στο ustekinumab. Η παρουσία του *HLA-Cw6* συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στο ustekinumab σε μια ομάδα 51 Ιταλών ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Talamonti et al., 2013). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε δύο μεγαλύτερες ομάδες 255 (Talamonti et al., 2017) και 134 καυκάσιων ασθενών (Talamonti et al., 2016). Οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν μακροχρόνια και ταχύτερη ανταπόκριση (Talamonti et al., 2016) από ό,τι οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί για το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* (Talamonti et al., 2013). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε ασθενείς με ψωρίαση από την Κίνα (n = 66) (Chiu et al., 2012) και την Βόρεια Αμερική (n = 601) (Li K, et al., 2016). Επιπλέον, σε μελέτη 64 ασθενών δείχθηκε ότι σε θετικούς για το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* ασθενείς που δεν έχουν τον γονότυπο AA για τον πολυμορφισμό rs3212227 στο γονίδιο *IL12B*, αλλά φέρουν τον γονότυπο GG για τον πολυμορφισμό rs6887695 στο ίδιο γονίδιο, αυξάνονταν σημαντικά η πιθανότητα επιτυχίας της θεραπείας (Galluzzo et al., 2015). Συνοπτικά, το *HLA-Cw6* είναι ένας υποσχόμενος βιοδείκτης της απόκρισης στο ustekinumab, αν και πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών.

3.3 Φαρμακογενετική και Secukinumab

Δεδομένου ότι τα νέα βιολογικά φάρμακα, όπως το secukinumab και το apremilast, έχουν εγκριθεί πρόσφατα για χρήση στην ψωρίαση, δεν υπάρχουν για αυτά διαθέσιμες φαρμακογενετικές έρευνες. Η μοναδική φαρμακογενετική μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί προς το παρόν για την συσχέτιση του γενετικού προφίλ ασθενών με ψωρίαση και της απόκρισής τους στο φάρμακο secukinumab είναι αυτή των Costanzo et al (n=434), στην οποία διαπιστώθηκε πως το φάρμακο επιδείκνυε εξαιρετική αποτελεσματικότητα ανεξάρτητα από την ύπαρξη του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* στους ασθενείς, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ασθενών στην θεραπεία με secukinumab και της παρουσίας του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* στο γονιδίωμα τους (Costanzo et al, 2018).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της συσχέτισης των πολυμορφισμών rs72916862 και rs17881982, που εδράζονται στο γονίδιο *IL17A*, με την απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με secukinumab (cosentyx). Η φαρμακογενετική μελέτη αυτών των πολυμορφισμών αποτελεί ένα πρωτοπόρο βήμα και στοχεύει να ανοίξει το δρόμο για νέες αντίστοιχες μελέτες, οι οποίες θα αποσκοπούν στην ανάδειξη ενός προγνωστικού δείκτη απόκρισης, που θα οδηγήσει σε εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα για τον κάθε ασθενή, ανάλογα με τον γονότυπό του.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Ασθενείς

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού περιφερικού αίματος από ασθενείς με ψωρίαση που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο cosentyx. Συνολικά μελετήθηκαν 21 δείγματα, τα οποία προήλθαν από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

2. Απομόνωση DNA από ολικό περιφερικό αίμα

Μετά την αιμοληψία το αίμα των ασθενών τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάρια που περιείχαν EDTA (ώστε να αποφευχθεί η πήξη του) και φυλάχθηκε στους -20°C μέχρι την χρήση του. Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικές μεθόδους: με επώαση με πρωτεϊνάση και ακόλουθη εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο ή με την χρήση kit της εταιρείας Macherey Nagel.

2.1 Απομόνωση DNA από αίμα με πρωτεϊνάση και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA γίνεται από τους πυρήνες των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, αφού πρώτα έχει πραγματοποιηθεί λύση των κυτταροπλασματικών και των πυρηνικών μεμβρανών τους με διάλυμα λύσης, το οποίο δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή των μεμβρανών. Το DNA που απελευθερώνεται στο διάλυμα επωάζεται στη συνέχεια με διάλυμα πρωτεϊνάσης K, προκειμένου να αποικοδομηθούν οι πρωτεΐνες (π.χ ιστόνες) που είναι συνδεδεμένες με αυτό και να αδρανοποιηθούν τυχόν νουκλεάσες που απειλούν να το καταστρέψουν κατά τη διάρκεια της απομόνωσης. Στη συνέχεια τα υπολείμματα των κυττάρων, όπως οι διάφορες πρωτεΐνες και τα θραύσματα των μεμβρανών, απομακρύνονται με την βοήθεια οργανικών διαλυτών, όπως το χλωροφόρμιο και η φαινόλη. Η φαινόλη παίζει ρόλο στον διαχωρισμό των φάσεων και την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων ενώ το χλωροφόρμιο συμμετέχει αφενός στην απομάκρυνση της φαινόλης, η οποία σε αντίθετη περίπτωση αν παραμείνει αποτελεί δυνητικό ανασταλτικό παράγοντα στην περαιτέρω χρήση του γονιδιωματικού DNA, και αφετέρου στην εκχύλιση των λιπιδίων. Στη συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, με τη χρήση καθαρής αιθανόλης 100%. Αν το DNA στο στάδιο πριν την κατακρήμνιση δεν είναι αρκετά ορατό προστίθεται και άλας μαζί με αιθανόλη 70% για καλύτερη απόδοση. Το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή με

επαναδιάλυσή του σε διπλά απιονισμένο νερό. Τέλος, γίνεται έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητάς του σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%.

2.1.2 Υλικά

- **Διάλυμα 20X SSC (3M NaCl, 0,3M Sodium citrate, pH 7.0)**- Στη διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1X.
- **Διάλυμα λύσης TNES (Tris, NaCl, EDTA, SDS):** 10 mM Tris pH 7.5, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.6 % SDS
- **Πρωτεΐνάση K (10mg/ml)**
- **Χλωροφόρμιο**
- **Φαινόλη**
- **Αιθανόλη: 100% v/v και 70% v/v**
- **Διάλυμα Οξικού Νάτριου 3 M (CH₃COONa) pH 5.2:** παρασκευάζεται με προσθήκη 40,8 gr οξικού νατρίου σε 100 ml διπλά απιονισμένο νερό. Στη διαδικασία απομόνωσης χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0,2 M.

2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά μεταφέρθηκαν 400-500 μl αίματος σε σωληνάρια erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml και φυγοκεντρήθηκαν σε 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (RT, 19°C- 25°C) για 2 min. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου ακολούθησε προσθήκη 900 μl διαλύματος 1X SSC, ανάδευση των δειγμάτων και σύντομη φυγοκέντρησή τους. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου ακολούθησε προσθήκη διαλύματος 1X SSC και το ανωτέρω βήμα επαναλήφθηκε μια επιπλέον φορά. Ύστερα από την αφαίρεση του υπερκειμένου ακολούθησε προσθήκη 400 μl διαλύματος TNES, προσθήκη 4 μl πρωτεΐνάσης K και καλή ανάδευση των δειγμάτων. Τα δείγματα επώαστηκαν στην συνέχεια στους 55° C, ολονύκτια. Στην συνέχεια, ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος, προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα φαινόλης και χλωροφόρμιου με αναλογία 1:1 (π.χ. Για 400 μl δείγματος προστίθενται 200 μl φαινόλης και 200 μl χλωροφόρμιου) και τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 rpm για 10 min στους 24°C. Μετά την φυγοκέντρωση παρατηρήθηκαν 3 στοιβάδες, από τις οποίες αφαιρέθηκε με προσοχή η πάνω εξ αυτών (χωρίς να διαταραχθεί η μεσοστοιβάδα) και μεταφέρθηκε σε νέα erpendorf tubes. Στην συνέχεια, ανάλογα με την ποσότητα του δείγματος προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα χλωροφόρμιου με αναλογία 1:1, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και πάλι στις 10.000 rpm για 10 min σε RT. Μετά την φυγοκέντρωση παρατηρήθηκαν δύο στοιβάδες, από τις οποίες αφαιρέθηκε η πάνω και μεταφέρθηκε σε νέα erpendorf tubes. Ακολούθησε προσθήκη αιθανόλης 100% v/v σε ποσότητα 2,5 φορές του όγκου του κάθε δείγματος και προσθήκη CH₃COONa σε ποσότητα 10% του όγκου του κάθε δείγματος. Έπειτα τα δείγματα αναδεύθηκαν καλά και μεταφέρθηκαν στους - 80°C (ή - 20°C) για 30 min. Μετά το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, ακολούθησε αφαίρεση και απόρριψη του υπερκειμένου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 300 μl αιθανόλης 70% v/v, τα δείγματα αναδεύθηκαν καλά και φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για

20min. Ακολούθησε αφαίρεση και απόρριψη του υπερκειμένου και μεταφορά των δειγμάτων σε κλίβανο, ρυθμισμένο στους 55°C, προκειμένου να στεγνώσει η αιθανόλη. Τέλος ακολούθησε προσθήκη 50 μl dH₂O και ολονύκτια επώαση στους 4°C. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση τους.

2.2 Απομόνωση με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Το πρωτόκολλο NucleoSpin® για αίμα της εταιρίας Macherey Nagel αποτελεί μία αυτοματοποιημένη μέθοδο απομόνωσης και έκλουσης DNA υψηλής καθαρότητας από δείγματα αίματος. Αρχικά επιτυγχάνεται λύση των κυττάρων με επώαση του ολικού αίματος σε ένα διάλυμα που περιέχει χαστροπικά ιόντα παρουσία πρωτεΐνάσης K σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ακολουθεί προετοιμασία του δείγματος για πρόσδεση του DNA σε ειδικά διαμορφωμένες κλώνες με μεμβράνη από ίνες πυριτίου με την προσθήκη αιθανόλης. Ύστερα από φυγοκέντρωση του δείγματος, το γονιδιωματικό DNA βρίσκεται προσδεμένο στην ειδικά διαμορφωμένη μεμβράνη. Οι ανεπιθύμητες ουσίες και μόρια που έχουν προσδεθεί στην μεμβράνη απομακρύνονται σε τρία στάδια έκπλυσης με αιθανολικά ρυθμιστικά διαλύματα. Τέλος, το καθαρό γονιδιωματικό DNA εκλύεται υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος σε ένα ελαφρώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης.

2.1.2 Πειραματική διαδικασία

Η απομόνωση του DNA, πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εμπορικού kit NucleoSpin® Tissue/ Genome DNA from Tissue της εταιρίας Macherey Nagel, Germany σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

3.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA και των προϊόντων της PCR. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA θα μετακινηθούν προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα δίκλινα μόρια DNA που κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης διανύουν απόσταση, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Σημαντικός παράγοντας στην μετακίνηση των μορίων DNA είναι επίσης η συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατός ο διαχωρισμός μορίων DNA που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών. Όσο

μεγαλύτερη η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο ιδανικότερο είναι το πήκτωμα για τον διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα πήκτωμα στο οποίο τα τμήματα DNA διαχωρίζονται σε ζώνες ανάλογα με το μέγεθος και την στερεοδιαμόρφωσή τους. Οι ζώνες αυτές εντοπίζονται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ένωσης που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA ή με την χρήση χρωστικής Sybr Green, η οποία φθορίζει μόνο όταν ενσωματώνεται στην μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας, το βρωμιούχο αιθίδιο και Sybr Green έχουν την ικανότητα να φθορίζουν και έτσι καθίσταται δυνατή η παρατήρηση της ακριβούς θέσης του DNA μέσα στο πήκτωμα.

3.2 Υλικά

- **Διάλυμα 1xTAE** (40mM Tris, 20mM acetic acid και 1mM EDTA)
- **Αγαρόζη**
- **Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)** ή χρωστική **Sybr Green**
- **Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer, 6X)**: περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης (25mg), 30% w/v γλυκερόλη (3 ml) σε ddH₂O (7ml).
- **Ladder 1 kb Plus**

3.3 Πειραματική Διαδικασία

A) Παρασκευή Πηκτώματος

Για την παρασκευή του πηκτώματος ακολουθείται η εξής διαδικασία: Για πήκτωμα με περιεκτικότητα αγαρόζης 1% ζυγίζονται 0,6 g αγαρόζης και διαλύονται σε 60 ml διαλύματος TAE (1X). Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό βρύσης. Μετά προστίθενται 2,16 μl από διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (συγκέντρωσης 10 mg/ml) ή 4 μl χρωστικής Sybr Green. Μετά από ήπια ανάμιξη το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλο εκμαγείο-καλούπι, στο οποίο έχουν τοποθετηθεί προηγουμένως ειδικά χτενάκια ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια του πηκτώματος. Όταν κρυώσει η αγαρόζη το πήκτωμα είναι έτοιμο για χρήση.

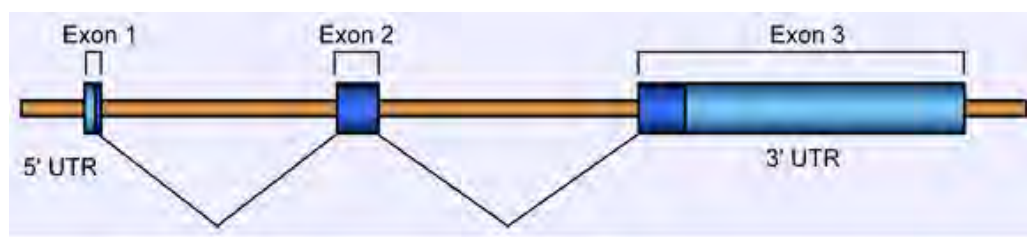
B) Ηλεκτροφόρηση DNA στο πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης ακολουθείται η εξής διαδικασία: Το καλούπι με το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία είχε προηγουμένως γεμίσει με ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και σε κάθε πηγαδάκι φορτώθηκαν 5 μl DNA και 2 μl Loading Buffer και 5 μl H₂O ή 10μl DNA και 2 μl Loading Buffer. Σε ένα από τα πηγαδάκια, προστέθηκαν επίσης 2 μl μάρτυρα Ladder (500 mg/μl) και 10μl H₂O. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, υπό σταθερή ένταση ρεύματος, σε τάση 100-150 V για περίπου 20 λεπτά. Τέλος το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή UV προκειμένου να παρατηρηθούν οι ζώνες του DNA και να φωτογραφηθεί το πήκτωμα.

4. Σχεδιασμός εκκινητών

4.1 Αρχή της μεθόδου

Ένα υποψήφιο γονίδιο το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βιοδεικτών, οι οποίοι θα προβλέπουν την απόκριση ασθενών με ψωρίαση στο φάρμακο secukinumab, είναι αυτό που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη-στόχο του, την IL17A. Το γονίδιο *IL17A*, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 (6p12.2), αποτελείται από περίπου 4.260 ζεύγη βάσεων και διαθέτει τρία εξώνια (*Εικόνα 8*). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του, το οποίο το καθιστά επίσης κατάλληλο προς διερεύνηση είναι το γεγονός ότι δεν περιέχει ομόλογα ψευδογονίδια σε άλλα σημεία του γονιδιώματος.



Εικόνα 8: Το γονίδιο της *IL17A* (http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IL17A.html)

Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αποτελεί ένα αρκετά σημαντικό και κρίσιμο βήμα για την επιτυχία της διαδικασίας, καθώς χωρίς τους κατάλληλους εκκινητές δεν θα παραχθεί προϊόν PCR. Τα κύρια χαρακτηριστικά που οφείλουν να έχουν οι εκκινητές είναι:

- **Μοναδικότητα:** Για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει μόνο ένα στόχος στο DNA που ενισχύεται με την PCR.
- **Θερμοκρασία Τήξης (T_m):** Είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA σχηματίζει δίκλινα μόρια. Επηρεάζεται κυρίως από την σύσταση της αλληλουχίας του DNA, καθώς υψηλότερη περιεκτικότητα σε G+C, οδηγεί σε σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου, άρα και μεγαλύτερο T_m . Εμπειρική μέθοδος για τον υπολογισμό T_m :
$$T_m = (A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C$$
- **Θερμοκρασία Υβριδοποίησης (T_a):** Η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στην μήτρα του DNA. Επιλέγεται συνήθως να είναι $\sim 5^\circ C$ μικρότερη από την T_m των εκκινητών.
- **Μήκος:** Το μήκος των εκκινητών επηρεάζει τόσο την μοναδικότητα τους, όσο και την θερμοκρασία τήξης και υβριδοποίησής τους. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος ενός εκκινητή τόσο αυξάνεται η εξειδίκευσή του και η πιθανότητα να υβριδοποιηθεί στο DNA-στόχο, ενώ αυξάνονται επίσης οι θερμοκρασίες T_m και T_a . Συνήθως το μήκος των εκκινητών κυμαίνεται από 17 έως 30 bp.

- **Σύσταση βάσεων:**Επηρεάζει την υβριδοποίηση και τις T_m , T_a . Προτιμώνται αλληλουχίες τυχαίας σύστασης, ενώ αποφεύγονται περιοχές πλούσιες είτε σε A+T, είτε σε G+C (μέση περιεκτικότητα σε G+C \approx 50-60%) .
- **Σταθερότητα:**Εξαρτάται από την αναλογία G/C στα άκρα των εκκινητών. Η επιμήκυνση από την Taq πολυμεράση ξεκινάει όταν ο εκκινητής προσδεθεί με το 3' άκρο του στην μήτρα DNA. Για την αποφυγή υβριδοποίησης του εκκινητή σε πολλαπλά ή λανθασμένα σημεία προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δύο βάσεις G/C και 3' άκρα με μία ή καμία βάση G/C.
- **Εσωτερικές δομές:**Στην περίπτωση που οι εκκινητές υβριδιστούν μεταξύ τους και δημιουργήσουν δομές φουρκέτες ή ομοδιμεριστούν, η απόδοση της PCR θα μειωθεί δραματικά.

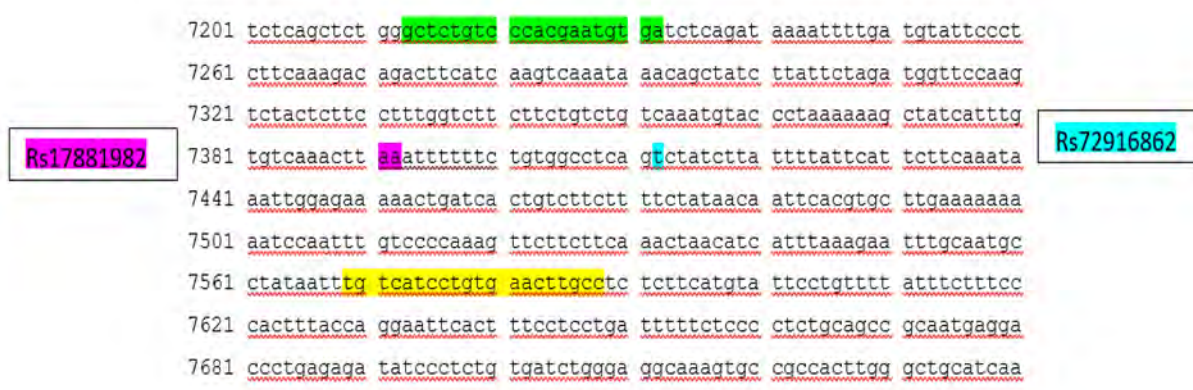
4.2 Διαδικασία σχεδιασμού

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε η ιστοσελίδα του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Αρχικά πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στην ιστοσελίδα για το γονίδιο *IL17A*, προκειμένου να βρούμε πληροφορίες για την θέση του, την ακριβή του αλληλουχία και σχετική βιβλιογραφία που το αφορά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στη βάση δεδομένων dbSNP όλων των πολυμορφισμών του γονιδίου *IL17A*, προκειμένου να γίνει επιλογή εκείνων των SNPs που εντοπίζονται πιο συχνά στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό και έχουν συχνότητα MAF (Minor Allele Frequency, σπανιότερο αλληλόμορφο στον πληθυσμό) μεγαλύτερη του 15%. Αφού συγκεντρώθηκαν όλοι οι πολυμορφισμοί με τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν, επιλέχθηκαν οι: rs17881982 (MAF: delAA \approx 21%) και rs72916862 (MAF: C \approx 22%) οι οποίοι βρίσκονται σε ιντρόνιο μεταξύ του δεύτερου και τρίτου εξωνίου του γονιδίου *IL17A*. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το primer designing tool του NCBI, το οποίο βρίσκει εκκινητές ειδικούς για συγκεκριμένο τμήμα DNA, το οποίο ορίζεται εξαρχής χρησιμοποιώντας λογισμικά όπως το Primer 3 και το BLAST, για την εύρεση των κατάλληλων εκκινητών που θα ενισχύσουν τμήμα του γονιδίου *IL17A*, το οποίο περιέχει τους rs17881982 και rs72916862. Τελικά με την βοήθεια του primer designing tool εντοπίστηκαν και επιλέχθηκαν οι εκκινητές του **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3:Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και η θερμοκρασία τήξεως τους (T_m).

Εκκινητές	Αλληλουχία	T_m
Forward (F6)	5'- GAGACAGGGTGCTTACACT - 3'	58°C
Reverse (R7)	5'- GGCAAGTTCACAGGATGACA-3'	60°C

Αναμένεται ότι η ενίσχυση με PCR της περιοχής του γονιδίου της *IL17A* μεταξύ των εκκινητών F6 και R7 θα δώσει ένα τμήμα DNA μεγέθους 376bp (**Εικόνα 9**).



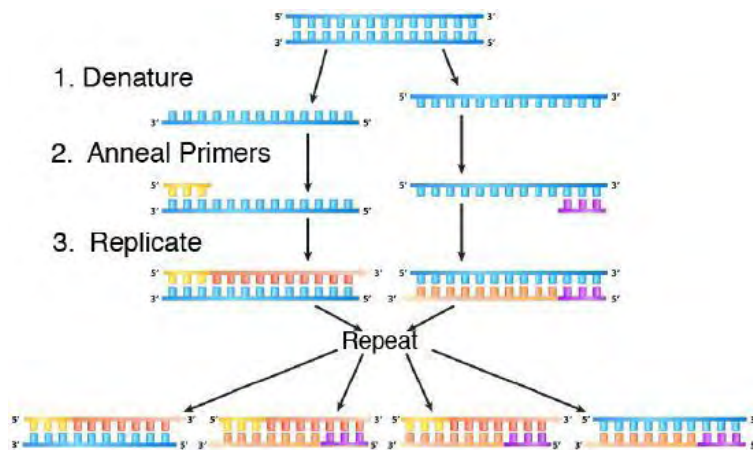
Εικόνα 9: Τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου της IL17A. Φαίνονται σημειωμένα με **Πράσινο:** Το τμήμα όπου θα υβριδοποιηθεί ο F6 εκκινητής, **Κίτρινο:** Το τμήμα όπου θα υβριδοποιηθεί ο R7 εκκινητής, **Μοβ:** Ο πολυμορφισμός rs17881982, **Μπλέ:** Ο πολυμορφισμός rs72916862

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

5.1 Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kary Mullis (Mullis, et al., 1986). Βασίζεται κατά κύριο λόγο στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών του DNA, με την βοήθεια μιας θερμοσταθερής πολυμεράσης, όπως αυτής του *Thermus aquaticus* (Taq). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού κλώνου με κατεύθυνση 5'-3'. Ως μήτρα για την αντιγραφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας από τους δύο κλώνους της διπλής έλικας του DNA, η οποία προηγουμένως έχει αποδιαταχθεί σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Ειδικοί και συμπληρωματικοί για μια περιοχή σε μία από τις δύο αλυσίδες του DNA, ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές εισάγονται σε ζεύγη έτσι ώστε να ξεκινήσει η σύνθεση του DNA -στόχου. Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι υβριδοποιημένοι εκκινητές λειτουργούν ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση κι έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, μέσω της διαδοχικής προσθήκης ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων. Ακολουθούν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης και αντιγραφής του DNA, έτσι ώστε ύστερα από η κύκλους να προκύπτουν 2ⁿ μόρια DNA. Η όλη διαδικασία μπορεί να αυτοματοποιηθεί με τη χρήση του θερμικού κυκλοποιητή, ο οποίος ρυθμίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ένας κύκλος PCR αποτελείται από τρία διακριτά στάδια:

- 1) **Στάδιο αποδιάταξης DNA (denaturation):** Προκειμένου να αποδιαταχθούν οι δύο κλώνοι του DNA η θερμοκρασία ανέρχεται στους 92-96° C για περίπου 40sec. Οι κλώνοι διαχωρίζονται σε μονόκλωνες αλυσίδες καθώς διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου .
- 2) **Στάδιο υβριδισμού (annealing):** Προκειμένου να επιτραπεί η υβριδοποίηση των εκκινητών με το μονόκλωνο DNA, η θερμοκρασία μειώνεται συνήθως μεταξύ των 50-65° C για περίπου 45 sec. Παράμετροι όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζονται οι εκκινητές ώστε να υβριδοποιηθούν, εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης ρυθμίζεται ώστε να είναι περίπου 3-5° C χαμηλότερη από το σημείο τήξης (T_m).
- 3) **Στάδιο επιμήκυνσης (extension):** Στο στάδιο αυτό η θερμοκρασία ανεβαίνει και πάλι στους 72° C περίπου ώστε η DNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων κλώνων. Ο χρόνος του σταδίου αυτού εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος της PCR.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της PCR. (<https://bio.libretexts.org>)

5.2 Υλικά

- Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
- DNA πολυμεράση της εταιρείας KapaTaq
- Διάλυμα αντίδρασης της KapaTaq (10x, που περιέχει 15 mM MgCl₂)
- Γονιδιωματικό DNA
- Εκκινητές
- H₂O

5.3 Πειραματική διαδικασία

Οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl, 25 μl και 50 μl. Στον **Πίνακα 4** παρατίθενται τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε μια ενδεικτική αντίδραση τελικού όγκου 50 μl.

Πίνακας 4: Ποσότητες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε μια τυπική PCR

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Ποσότητες	Τελική Συγκέντρωση
πολυμεράση Kapa Taq DNA	5 Units/μl	0,2 μl	1 Units/μl
Διάλυμα Kapa Taq (+ 15 mM MgCl ₂)	10x	5 μl	1X (+1,5 mM MgCl ₂)
Δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs	10 mM	2 μl	0,4 mM
Πρόσθιος εκκινητής	20 pmol/ μl	2,5 μl	20 pmol/αντίδραση
Ανάστροφος εκκινητής	20 pmol/ μl	2,5 μl	20 pmol/αντίδραση
DNA μήτρα	εξαρτάται	εξαρτάται	εξαρτάται
H ₂ O	εξαρτάται	εξαρτάται	εξαρτάται
		Σύνολο = 50 μl	

Για κάθε PCR προετοιμάζεται ένα μείγμα (mastermix), το οποίο περιέχει τα αντιδραστήρια στις ποσότητες του πίνακα 4. Όπως φαίνεται στον πίνακα σε κάθε αντίδραση η ποσότητα του DNA που προστίθεται κυμαίνεται στα 1-10 μl ανάλογα με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος. Ενδεικτικά χρησιμοποιούνται 100-300 ng γονιδιωματικού DNA. Σε κάθε PCR πραγματοποιείται και μια αντίδραση αρνητικού ελέγχου (negative control) που περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια στις ίδιες ποσότητες εκτός από το DNA, το οποίο αντικαθίσταται με ίσο όγκο νερού. Το δείγμα του αρνητικού ελέγχου είναι απαραίτητο ώστε να γίνεται έλεγχος για πιθανές επιμολύνσεις των αντιδραστηρίων.

Σημαντικό βήμα είναι η προσθήκη της Taq πολυμεράσης κατευθείαν από τους -20° C, ώστε να αποφευχθεί ο μη ειδική σύνδεση, που θα έχει ως συνέπεια την παρουσία παραπροϊόντων.

Ύστερα από σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων και διαφορετικών θερμοκρασιών επιλέχθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες, στις οποίες η περιοχή -στόχος ενισχύονταν κατά το βέλτιστο βαθμό και ακολουθήθηκε το ανάλογο πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συνθήκες προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Προ- αποδιάταξη	95° C	5 min
Αποδιάταξη DNA	95° C	30 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	54° ή 55° C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών	72° C	30 sec
Τελική επέκταση	72° C	10 min

X40
Κύκλοι

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτοφόρηση σε 2% w/v πήκτωμα αγαρόζης.

6. Καθαρισμός προϊόντος PCR

6.1 Αρχή της μεθόδου:

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR προτού σταλούν για αλληλούχηση έγινε με το kit PureLink PCR Purification της εταιρείας Invitrogen (MAN00004375) σύμφωνα με τις οδηγίες που περιέχονται στο ειδικό εγχειρίδιο του παρασκευαστή. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται διάφορα συστατικά, τα οποία ενδεχομένως έχουν παραμείνει στο διάλυμα με τα προϊόντα της PCR, όπως εκκινητές, νουκλεοτίδια, η Taq πολυμεράση, άλατα και τα οποία ίσως προκαλέσουν προβλήματα στη διαδικασία της αλληλούχησης.

Για την ποσοτικοποίηση του δείγματος μετά το πέρας του καθαρισμού ακολουθεί ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας (ενδεικτικά 1-3 μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η ένταση του ειδικού σήματος του κάθε δείγματος συγκρίνεται με την ένταση στις ζώνες του μάρτυρα και έτσι γίνεται η εκτίμηση της συγκέντρωσής του.

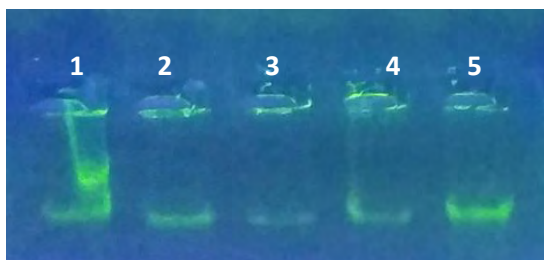
7. Αλληλούχηση (Sequencing) προϊόντων PCR

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρία CeMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) στην Λάρισα. Για την αλληλούχηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής F6. Η αλληλούχηση γίνεται αόριστος με την μέθοδο Sanger και τα αποτελέσματα αποστέλλονται ηλεκτρονικά υπό την μορφή χρωματογραφημάτων. Για την μελέτη και επεξεργασία των δεδομένων αυτών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BioEdit version 7.2.6 (3/31/2017) (Hall, T.A. 1999).

Αποτελέσματα-Συζήτηση

1. Απομόνωση DNA από αίμα με πρωτεϊνάση και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

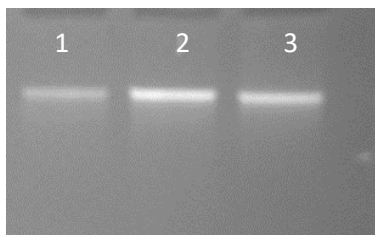
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών. Ο έλεγχος της ποιότητας του DNA στα δείγματα έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v. Στην **Εικόνα 11** φαίνονται τα ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης 5 από το σύνολο των 21 δειγμάτων. Σύμφωνα με την εικόνα που προκύπτει ύστερα από έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV κρίνεται η ποιότητα της απομόνωσης, που στην προκειμένη περίπτωση είναι καλή και στην συνέχεια εκτιμάται η συγκέντρωση του γονιδιωματικού DNA. Η ποσότητα που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητας της απομόνωσης, είναι 2 μl από συνολικό όγκο δείγματος 50 μl



Εικόνα 11: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γονιδιωματικού DNA, που απομονώθηκε με την μέθοδο πρωτεϊνάσης και εκχύλισης σε οργανικούς διαλύτες, σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. **Διαδρομές 1-5: #1 13COS, #2 14COS, #3 15COS, #4 16COS, #5 19COS**

2. Απομόνωση DNA από αίμα με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων

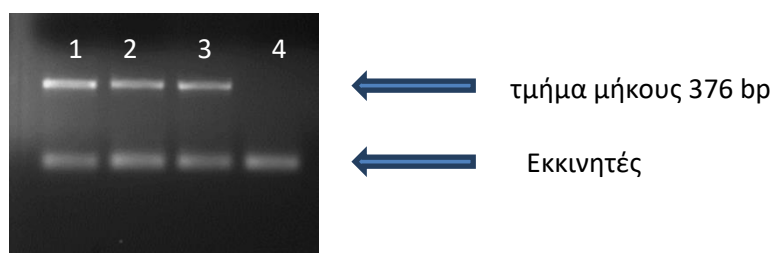
Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα ασθενών με ψωρίαση, με την χρήση αντιδραστηρίων kit. Τα αποτελέσματα της απομόνωσης ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v και παρατήρηση σε UV ακτινοβολία (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA, που απομονώθηκε με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v. **Διαδρομές 1-3: #1 26COS, #2 29COS, #3 30COS**

3. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου IL17A με PCR

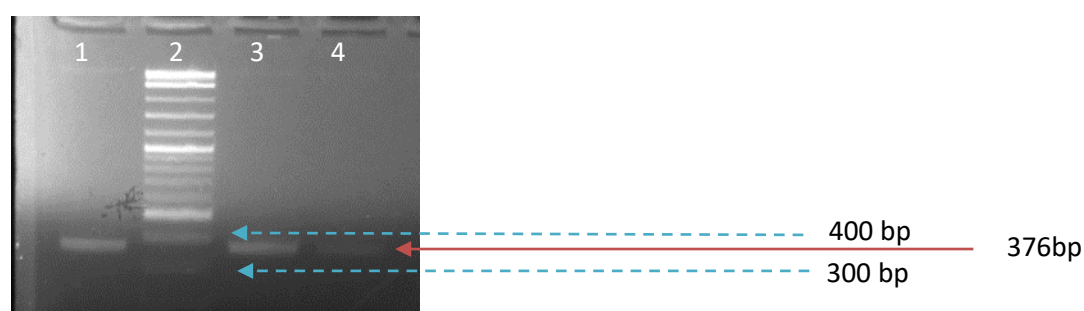
Το τμήμα του γονιδίου της IL17A το οποίο περιέχει τους πολυμορφισμούς rs17881982 και rs72916862 ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR. Στην συνέχεια, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% w/v, για να πιστοποιηθεί η παρουσία του προϊόντος του επιθυμητού μεγέθους. Στην (Εικόνα 13), απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR, μεγέθους 376 bp πριν το καθαρισμό τους.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% τμήματος του γονιδίου *IL-17A* που ενισχύθηκε με PCR. **Διαδρομές 1-3:** Αποτέλεσμα της ενίσχυσης του γενωμικού DNA των δειγμάτων #1 12COS, #2 14COS και #3 16COS. **Διαδρομή 4:** Αρνητικός μάρτυρας της PCR.

4. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR από διάφορα παραπροϊόντα, πραγματοποιήθηκε με το kit PureLink PCR Purification της εταιρείας Invitrogen (Thermo Fisher). Η επιτυχία του καθαρισμού καθώς και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων, ελέγχθηκε με την βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Εικόνα 14) και την χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder- 1kb Plus).

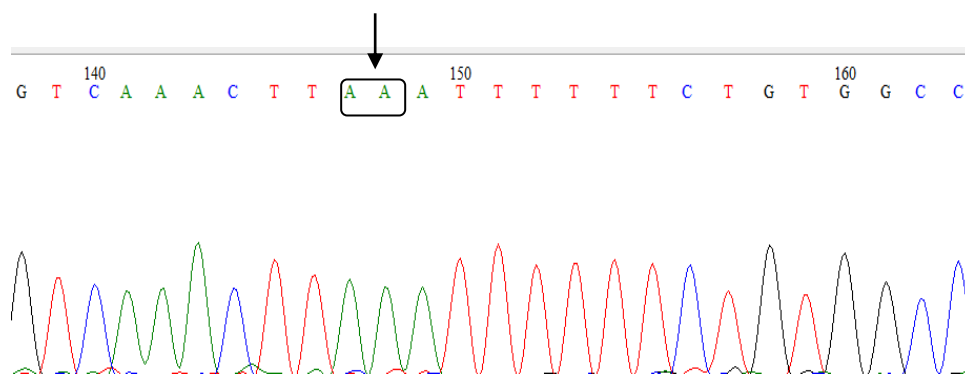


Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *IL-17A* με PCR μετά από τον καθαρισμό τους. **Διαδρομές 1, 3, 4:** Καθαρισμένα προϊόντα PCR των δειγμάτων #1 5COS, #3 18COS, #4 25COS, **Διαδρομή 2:** δείκτης μοριακών βαρών, 1 Kb plus DNA Ladder (N3200 NE BIOLABS).

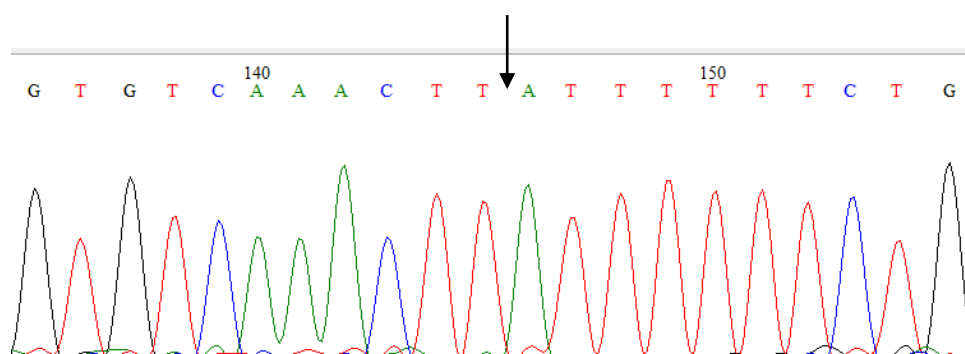
5. Αλληλούχηση προϊόντων PCR

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR έδωσε 100% ομολογία με τις υπό μελέτη περιοχές του γονιδίου *IL-17A*, μετά από ευθυγράμμιση με το πρόγραμμα BLAST του NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στις Εικόνες 15 έως 18 δίνονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Οι εικόνες εστιάζονται στην περιοχή που απαντώνται οι πολυμορφισμοί rs17881982 (MAF: delAA \approx 21%), και rs72916862 (MAF: C \approx 22%)

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs17881982 (delAA), βρέθηκαν άτομα τα οποία δεν φέρουν την έλλειψη A/A (Εικόνα 15) και άτομα που φέρουν την έλλειψη A/A (Εικόνα16).

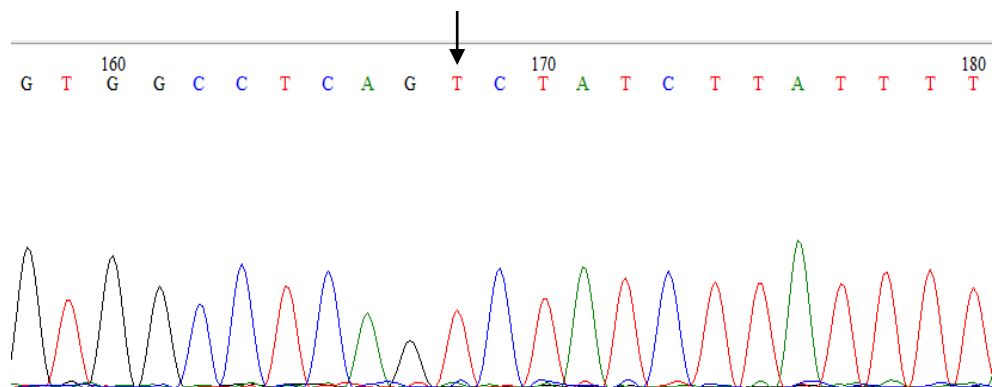


Εικόνα 15:Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs17881982, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα (6COS) δεν υπάρχει η έλλειψη A/A.

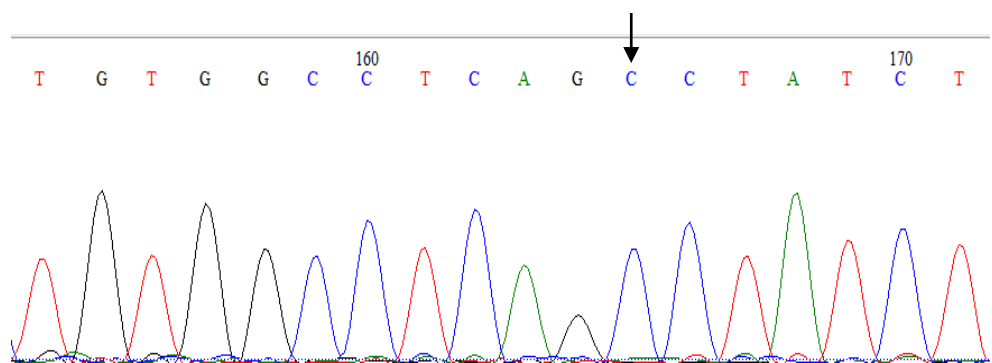


Εικόνα 16:Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs17881982, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα (5COS) ταυτοποιείται η έλλειψη A/A.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs72916862 βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο T (Εικόνα 17), και άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο C (Εικόνα 18).



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs72916862, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα (6COS) έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs72916862, που σημειώνεται με το βέλος. Στο συγκεκριμένο δείγμα (5COS) έχουμε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C.

Συνολικά αναφορικά με τον πολυμορφισμό rs72916862 ταυτοποιήθηκαν 19 δείγματα ασθενών ομόζυγα για το αλληλόμορφο T και 2 δείγματα ασθενών ομόζυγα για το αλληλόμορφο C.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs17881982 ταυτοποιήθηκαν συνολικά 19 δείγματα ασθενών χωρίς την έλλειψη A/A και 2 δείγματα ασθενών που φέρουν την έλλειψη A/A.

Συμπεράσματα

Εξαιτίας του μικρού αριθμού των δειγμάτων, τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παραπάνω μελέτη, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για στατιστική ανάλυση από την οποία θα προκύψει ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την συσχέτιση των μελετηθέντων πολυμορφισμών και της απόκρισης στο φάρμακο cosentyx.

Στην παραπάνω έρευνα ωστόσο, βελτιστοποιήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες PCR (εκκινητές, θερμοκρασίες, πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή κ.τ.λ.) για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου *IL17A*, μήκους 376 bp, το οποίο περιέχει τους πολυμορφισμούς rs72916862 και rs17881982. Παρατηρήθηκε επιπλέον πως όσοι από τους ασθενείς έφεραν τον ένα πολυμορφισμό, έφεραν και τον άλλο υποδηλώνοντας πως οι rs72916862 και rs17881982 βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης, γεγονός που είναι απόλυτα αναμενόμενο, καθώς μια αναζήτηση στην ιστοσελίδα NIH (National Institutes of Health), χρησιμοποιώντας το LDlink tool, το οποίο συλλέγει δεδομένα από το πρόγραμμα 1000Genome, θα δώσει τα αποτελέσματα της **εικόνας 19**. Συγκεκριμένα οι τιμές R^2 κυμαίνονται από 0.9779 έως 1 στους πληθυσμούς της Ευρώπης (n=503), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι πολυμορφισμοί rs72916862 και rs17881982 κληρονομούνται μαζί .

Population	N	rs72916862 Allele Freq	rs17881982 Allele Freq	R^2
EUR	503	T: 74.95%, C: 25.05%	TAA: 74.85%, T: 25.15%	0.9947
CEU	99	T: 73.74%, C: 26.26%	TAA: 73.74%, T: 26.26%	1
TSI	107	T: 71.96%, C: 28.04%	TAA: 71.96%, T: 28.04%	1
FIN	99	T: 80.3%, C: 19.7%	TAA: 80.3%, T: 19.7%	1
GBR	91	T: 79.12%, C: 20.88%	TAA: 79.12%, T: 20.88%	1
IBS	107	T: 70.56%, C: 29.44%	TAA: 70.09%, T: 29.91%	0.9779

Εικόνα 19: Τιμές R^2 μεταξύ των πολυμορφισμών rs72916862 και rs17881982 σε πληθυσμούς της Ευρώπης. Όπως φαίνεται στην εικόνα οι πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη θέτει τις βάσεις για την μελλοντική ανάδειξη των πολυμορφισμών rs72916862 και rs17881982, ως προγνωστικοί δείκτες για την απόκριση σε φάρμακο cosentyx, καθιστώντας ωστόσο αναγκαία τη συνέχιση και επέκταση της μελέτης σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με ψωρίαση. Ακολουθώντας την ίδια λογική θα μπορούσαν επίσης να εξεταστούν και άλλοι πολυμορφισμοί με MAF μεγαλύτερη του 15% στο γονίδιο *IL17A*, όπως για παράδειγμα οι rs1974226, rs2275913, rs3819024, rs4711998, rs774747909. Τέλος, η φαρμακογενετική μελέτη για την εύρεση προγνωστικών δεικτών, οι οποίοι θα προβλέπουν την απόκριση του ασθενούς στο cosentyx, μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα γονίδια που σχετίζονται με το γονίδιο *IL17A*, όπως για παράδειγμα αυτό που κωδικοποιεί για την κυτταροκίνη IL17F, η οποία έχει αρκετά μεγάλο ποσοστό ομολογίας με την κυτταροκίνη IL17A και συνδέεται στον ίδιο υποδοχέα με αυτή.

Βιβλιογραφία

1. Boehncke W-H, Schon MP. Psoriasis. *The Lancet*. 2015;386:983–94.
2. April W. Armstrong. Psoriasis. *JAMA Dermatol*. 2017;153(9):956.
3. Schleicher SM. Psoriasis: pathogenesis, assessment, and therapeutic update. *Clin Podiatr Med Surg*. 2016;33:355–66.
4. Jacqueline E. Greb, Ari M. Goldminz, James T. Elder, Mark G. Lebwohl, Dafna D. Gladman, Jashin J. Wu, Nehal N. Mehta, Andrew Y. Finlay and Alice B. Gottlieb. Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:Article number: 16082.
5. Prieto-Perez R, Solano-Lopez G, Cabaleiro T, Roman M, Ochoa D, Talegon M, et al. New immune system genetic Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Psoriasis polymorphisms associated with moderate-to-severe plaque psoriasis: a case-control study. *Br J Dermatol*. 2015;172:1432–5.
6. Zhou F, Wang W, Shen C, Li H, Zuo X, Zheng X, et al. Epigenome-wide association analysis identified nine skin DNA methylation loci for psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2016;136:779–87.
7. Chandra A, Ray A, Senapati S, Chatterjee R. Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Mol Immunol*. 2015;64:313–23.
8. Hani A. and Qureshi M.G. Pathophysiology of Psoriasis: Current Concepts. Hermenio Lima, ISBN. 2013;978-953-51-1065-1
9. Higgins E. Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25(2):107-10
10. Tang H, Jin X, Li Y, Jiang H, Tang X, Yang X, et al. A largescale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nat Genet*. 2013;46:45–50.
11. Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jo ´nsson HH, et al. Distinct clinical differences between HLA-Cw* 0602 positive and negative psoriasis patients—an analysis of 1019 HLA-C-and HLA-B-typed patients. *J Invest Dermatol*. 2006;126:740–5.
12. Lee YH, Song GG. Associations between interleukin-23R and interleukin-12B polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Immunol Invest*. 2013;42:726–36.
13. Prieto-Pe ´rez R, Cabaleiro T, Dauden E, Ochoa D, Roman M, Abad-Santos F. Genetics of psoriasis and pharmacogenetics of biological drugs. *Autoimmune Dis*. 2013;2013:1–13.
14. Yin X, Low HQ, Wang L, Li Y, Ellinghaus E, Han J, et al. Genome-wide meta-analysis identifies multiple novel associations and ethnic heterogeneity of psoriasis susceptibility. *Nat Commun*. 2015;6:6916.
15. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A J. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *Dermatol*. 2004 Apr; 31(4):271-6.
16. Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ N. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *Engl J Med*. 1972 Oct 12; 287(15):738-40.
17. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol*. 1980 Feb;102(2):179-84.
18. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*. 2006;78:827–51.

19. Bowcock, A. M., & Krueger, J. G. Erratum: Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews Immunology*. 2005. 5(9), 699–711.
20. Lin WJ, Norris DA, Achziger M, Kotzin BL, Tomkinson B J. Oligoclonal expansion of intraepidermal T cells in psoriasis skin lesions. *Invest Dermatol*. 2001 Dec; 117(6):1546-53.
21. Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, Kurland HH, Karasek MA, Wilkinson DI, Carlo DJ, Brostoff SW. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T cell receptor Vb3 and/or Vb13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:9282–9286
22. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:1–8
23. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:201–214
24. Eberle FC, Brück J, Holstein J, Hirahara K, Ghoreschi K. Recent advances in understanding psoriasis. *F1000Res*. 2016 Apr 28;5.
25. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:227-55.
26. Daudén E, Castañeda S, Suárez C, García-Campayo J, et al. Integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis. Working Group on Psoriasis-associated Comorbidities. *Actas Dermosifiliogr*. 2012 Jan;103 Suppl 1:1-64.
27. Henseler T, Schmitt-Rau K. A comparison between BSA, PASI, PLASI and SAPASI as measures of disease severity and improvement by therapy in patients with psoriasis. *Int J Dermatol*. 2008 Oct;47(10):1019-23.
28. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P. et al. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res*. 2011 Jan;303(1):1-10.
29. Raut, A. S., Prabhu, R. H., & Patravale, V. B. Psoriasis Clinical Implications and Treatment: A Review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2013;30(3), 183–216.
30. Roenigk HH Jr, Auerbach R, Maibach H, Weinstein G, Lebwohl M. Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol*. 1998;38(3):478–85.
31. Georgouras KE, Zagarella SS, Cains GD, Brown PJ. Systemic treatment of severe psoriasis. *Australia's J Dermatol*. 1997;38(4):171–82
32. Mendonça CO, Burden AD. Current concepts in psoriasis and its treatment. *Pharmacol Ther*. 2003;99(2):133–47.
33. Sullivan J. and Preda V. Treatments for severe psoriasis. *Aust Prescr*. 2009;32:14–18
34. Dogra A, Sachdeva S. Biologic therapy in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2006;72(4):256–64.
35. Koo J., Khera, P. Update on the mechanisms and efficacy of biological therapies for psoriasis. *Journal of Dermatological Science*. 2005;38(2), 75–87.
36. Gottlieb AB. Etanercept for treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. In: Weinstein G, Gottlieb A, editors. *Therapy of moderate to severe psoriasis*. Marcel Dekker Inc.; 2003
37. Gottlieb AB. Infliximab in the treatment of psoriasis. In: Weinstein G, Gottlieb A, editors. *Therapy of moderate to severe psoriasis*. Marcel Dekker Inc.; 2003
38. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human antitumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:35—45.
39. Jennifer D Bahner, Lauren Y Cao, Neil J Korman. Biologics in the management of psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2009; 2: 111–128.

40. Zweegers J, Groenewoud JMM, van den Reek JMPA, Otero ME, van de Kerkhof PCM, Driessen RJB, et al. Comparison of the 1-and 5-year effectiveness of adalimumab, etanercept and ustekinumab in patients with psoriasis in daily clinical practice: results from the prospective BioCAPTURE registry. *Br J Dermatol*. 2017;176:1001–9.
41. Lebwohl M., Emer J., & Koutruba N. Review of ustekinumab, an interleukin-12 and interleukin-23 inhibitor used for the treatment of plaque psoriasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2010;6 123–141
42. Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal*. 2014;26:2016–29.
43. Torres T, Puig L. Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Feb;19(1):23-32.
44. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med*. 2014 Jul 24;371(4):326-38.
45. Blauvelt A, Reich K, Tsai TF, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate-to-severe plaque psoriasis up to 1 year: Results from the CLEAR study. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76(1):60–69.
46. Jillian Frieder, Dario Kivelevitch, Alan Menter. Secukinumab: a review of the anti-IL-17A biologic for the treatment of psoriasis. *Ther Adv Chronic Dis*. 2018 Jan; 9(1): 5–21.
47. Valdes R, Yin (Tyler) D. Fundamentals of pharmacogenetics in personalized, precision medicine. *Clin Lab Med*. 2016;36:447–59.
48. Daly AK. Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics*. 2003;4:127–39.
49. Roden DM, Wilke RA, Kroemer HK, Stein CM. Pharmacogenomics: the genetics of variable drug responses. *Circulation*. 2011;123(15): 1661–1670.
50. Agundez JAG, Abad-Santos F, Aldea A, Alonso-Navarro H, Bernal ML, Borobia AM, et al. Toward a clinical practice guide in pharmacogenomics testing for functional polymorphisms of drug-metabolizing enzymes. Gene/drug pairs and barriers perceived in Spain. *Front Genet* 2012;3:273.
51. Sutherland A, Power RJ, Rahman P, O’Rielly DD. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in psoriasis treatment: current challenges and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12:923–35.
52. Warren RB, Smith RL, Campalani E, Eyre S, Smith CH, Barker JNWN, et al. Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1925–9.
53. Vasilopoulos Y, Sarri C, Zafiriou E, Patsatsi A, Stamatias C, Ntoumou E, et al. A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics J*. 2014;14:523–5. 38.
54. Young HS, Summers AM, Read IR, Fairhurst DA, Plant DJ, Campalani E, et al. Interaction between genetic control of vascular endothelial growth factor production and retinoid responsiveness in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:453–9.
55. Ovejero-Benito MC, Prieto-Perez R, Llamas-Velasco M, Belmonte C, Cabaleiro T, Roman M, et al. Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics*. 2017;18:631–8.
56. van den Reek JMPA, Coenen MJH, van de L’Isle Arias M, Zweegers J, Rodijk-Olthuis D, Schalkwijk J, et al. Polymorphisms in CD84, IL12B and TNFAIP3 are associated with response to biologics in patients with psoriasis. *Br. J. Dermatol*. [Internet]. 2016.

57. Talamonti M, Galluzzo M, van den Reek JM, de Jong EM, Lambert JLW, Malagoli P, et al. Role of the HLA-C*06 allele in clinical response to ustekinumab: evidence from real life in a large cohort of European patients. *Br. J. Dermatol.* [Internet]. 2017.
58. Talamonti M, Botti E, Galluzzo M, Teoli M, Spallone G, Bavetta M, et al. Pharmacogenetics of psoriasis: HLA-Cw6 but not LCE3B/3C deletion nor TNFAIP3 polymorphism predisposes to clinical response to interleukin 12/23 blocker ustekinumab. *Br J Dermatol.* 2013;169:458–63.
59. Talamonti M, Galluzzo M, Chimenti S, Costanzo A. HLA-C*06 and response to ustekinumab in Caucasian patients with psoriasis: Outcome and long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74:374–5.
60. Chiu HY, Huang P-Y, Jee S-H, Hu C-Y, Chou C-T, Chang Y-T, et al. HLA polymorphism among Chinese patients with chronic plaque psoriasis: subgroup analysis: HLA polymorphism among Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166:288–97. 98.
61. Li K, Huang CC, Randazzo B, Li S, Szapary P, Curran M, et al. HLA-C*06:02 allele and response to IL-12/23 Inhibition: results from the ustekinumab phase 3 psoriasis program. *J Invest Dermatol.* 2016;136:2364–71. 99.
62. Galluzzo M, Boca AN, Botti E, Potenza C, Malara G, Malagoli P, et al. IL12B (p40) gene polymorphisms contribute to ustekinumab response prediction in psoriasis. *Dermatology.* 2015;232:230–6.
63. A. Costanzo, L. Bianchi, M.L. Flori, G. Malara, L. Stingeni, M. Bartzaghi, L. Carraro, G. Castellino. Secukinumab shows high efficacy irrespective of HLA-Cw6 status in patients with moderate-to-severe plaque-type psoriasis: SUPREME study. *Br J Dermatol.* 2018. Nov;179(5):1072-1080.
64. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999;41: 95-98.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το πειραματικό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, κυρίας Λιαδάκης Καλλιόπης.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Λιαδάκη Καλλιόπη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο, να διδαχθώ μέσα σε αυτό, να πάρω πρωτοβουλίες και να εξελιχθώ ως επιστήμονας. Με τη δική της καθοδήγηση και τις πάντα καίριες τοποθετήσεις, βοήθησε ώστε να περατωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία και να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σαραφίδου Θεολογία, για τη πολύτιμη βοήθειά που μου πρόσφερε, καθώς και τον κ. Μαμούρη Ζήση, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα στα εργαστήρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας, με τα οποία μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ κατά τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Τέλος για την τεράστια υπομονή και συμπαράστασή τους, ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου Στέφανο Παχή και Ασπασία Μπούρχα και την αδελφή μου Στεργιάννα Παχή. Χωρίς τη δική τους οικονομική, ηθική και συναισθηματική στήριξη δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση των σπουδών μου.