



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

# **Φαρμακογενετική της απρεμιλάστης σε ασθενείς με ψωρίαση**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ**

**Λούμα Βαρβάρα – Ρηγίνα**

**Ακαδημαϊκό έτος: 2019-2020**

# **“Φαρμακογενετική της απρεμιλάστης σε ασθενείς με ψωρίαση”**

## **“Pharmacogenetics of apremilast in patients with psoriasis”**

---

### **Τριμελής Επιτροπή**

#### **Σαραφίδου Θεολογία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών  
του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

#### **Μαμούρης Ζήσης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας  
- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Μούτου Αικατερίνη**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος  
Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους, των οποίων η συνεισφορά και η υποστήριξη ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Έτσι, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους αυτούς που συνεισφέραν με το δικό τους τρόπο στην προσπάθειά μου.

Πρωτίστως, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Σαραφίδου Θεολογία, την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, για την ευκαιρία που μου προσέφερε να «έχω» την πρώτη επαφή με το χώρο της επιστήμης και να φέρω εις πέρας το δικό μου πείραμα, με τις δικές μου προσωπικές επιτυχίες και αποτυχίες. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, όπως και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου μετέδωσε, το ενδιαφέρον της, τις συμβουλές της, τη συνεχή ενθάρρυνσή της, αλλά και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για να με καθοδηγήσει σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη την περίοδο της συνεργασίας μας, ήταν κίνητρο για τη συνεχή προσπάθεια βελτίωσής μου. Επιπλέον, με βοήθησε στο να αναπτύξω σωστή επιστημονική σκέψη και η μεθοδικότητα και η εργατικότητα της αποτέλεσαν παράδειγμα για εμένα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μούτου Αικατερίνη και τον κ. Μαμούρη Ζήση για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, μέσα από την καρδιά μου θέλω να δώσω και στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γαλοπούλου Λήδα – Μελίνα για την υπομονή, την πολύτιμη βοήθεια, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την εκπαίδευσή μου στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Είναι ένας πολύ ξεχωριστός άνθρωπος που είχα την τύχη να δουλέψω μαζί του και να συνεργαστώ στο ίδιο project. Την ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή της, την εξαιρετική παρέα της και για την άψογη συνεργασία και επικοινωνία που υπήρξε μεταξύ μας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την άμεση βοήθεια τους σε κάθε ερώτημα και δυσκολία που μου παρουσιαζόταν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου γιατί χωρίς την δική τους στήριξη, την ενθάρρυνσή τους, και την παρουσία τους σε κάθε δύσκολη στιγμή μου δεν θα είχα φτάσει μέχρι εδώ. Τους ευχαριστώ για τον αγώνα και την προσπάθειά τους να μη μου λείψει τίποτα όλα αυτά τα χρόνια. Στους γονείς μου οφείλω πολλά και τα λόγια για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου δεν αρκούν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική, φλεγμονώδης, δερματική νόσος, που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα, με αυτοάνοσα παθογόνα χαρακτηριστικά. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει οριστική θεραπεία για την ψωρίαση και οι διαθέσιμες θεραπείες συμβάλλουν μόνο στον περιορισμό των δερματικών αλλοιώσεων. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης νέων φαρμάκων όπως είναι οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους που στοχεύουν βασικά μόρια τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η απρεμιλάστη που είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης-4 (Phosphodiesterase-4, (PDE4)). Η απρεμιλάστη, αναστέλλοντας τη δράση της PDE4, αυξάνει τα επίπεδα του cAMP με αποτέλεσμα τη μείωση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών και την αύξηση των αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως της ιντερλευκίνης 10 (IL-10). Λόγω της μεταβλητότητας που παρατηρείται ως προς την αποτελεσματικότητα των γνωστών μέχρι τώρα θεραπειών μεταξύ των ασθενών καθίσταται αναγκαία η εφαρμογή στοχευμένης φαρμακογενετικής ανάλυσης.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού rs172043 (G/A) του γονιδίου PDE4C και της απόκρισης των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με απρεμιλάστη. Στα πλαίσια αυτής της έρευνας πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση αυτού του πολυμορφισμού σε δείγμα 36 ασθενών που λάμβαναν το συγκεκριμένο φάρμακο. Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (High Resolution Melting analysis). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζει τα δείγματα DNA σύμφωνα με τη συμπεριφορά μετουσίωσης τους και ανιχνεύει μικρές διαφορές στις αλληλουχίες DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου είναι 0,291 και βρίσκεται σε συμφωνία με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (0,343). Σχετικά με τις γονοτυπικές συχνότητες, ταυτοποιήθηκαν 17 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G), 2 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (A/A) και 12 ετερόζυγοι ασθενείς (G/A). Στους τελευταίους εντάχθηκαν μετά από σημαντική συσχέτιση ακόμη 5 ασθενείς, αλλά το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί. Η αξιολόγηση της συσχέτισης του υπό μελέτη πολυμορφισμού με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με απρεμιλάστη θα πραγματοποιηθεί όταν συγκεντρωθούν τουλάχιστον εκατό δείγματα ασθενών ώστε η αντίστοιχη στατιστική ανάλυση να είναι αξιόπιστη.

## ABSTRACT

Psoriasis is a multifactorial, inflammatory skin disease caused by the immune system, with autoimmune pathogenic characteristics. To this date, there is no definitive cure for psoriasis, and available treatments solely contribute to the restriction of skin lesions. Over the last years, there have been efforts to develop new drugs such as the small molecule inhibitors, which target basic molecules involved in cell signalling. Belonging to this category, Apremilast is a selective inhibitor of Phosphodiesterase-4 (PDE4). By inhibiting the action of PDE4, Apremilast increases cAMP levels resulting in the decrease of pre-inflammatory mediators and the increase of anti-inflammatory mediators, such as interleukin 10 (IL-10). Due to the variability observed among patients regarding the effectiveness of known treatments, it becomes necessary to apply targeted pharmacogenetic analysis.

This study aims to analyse the association between the polymorphism rs172043 (G/A) of the PDE4C gene and the response of psoriatic patients to the treatment with Apremilast. In the course of this study, genotyping of this polymorphism was conducted on a sample of 36 patients who were taking this drug. To define the genotype, was used the High Resolution Melting analysis. This method classifies DNA samples according to their denaturation behaviour and it detects small differences in DNA sequences. Results demonstrated that the minor allele frequency is 0.291 and it is consistent with its frequency in Europeans (0.343). Concerning the genotypic frequencies, 17 patients were identified as homozygous for the common allele (G/G), 2 patients were homozygous for the rare allele (A/A) and 12 were identified as heterozygous (G/A). The latter were joined by another 5 patients after a significant association, but this result must be confirmed. The correlation of the polymorphism under investigation with the effectiveness of treatment with Apremilast will be evaluated when a minimum of 100 patient samples have been collected, so that the relevant statistical analysis is reliable.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Ψωρίαση .....	7
1.1.1 Τύποι της ψωρίασης.....	7
1.1.2 Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	8
1.1.3 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης .....	8
1.1.4 Παράγοντες που σχετίζονται με τη ψωρίαση .....	9
1.1.4.1 Γενετικοί παράγοντες .....	9
1.1.4.1.1 Η περιοχή με την μεγαλύτερη συνεισφορά στην κληρονομησιμότητα της ψωρίασης .....	10
1.1.4.1.2 Ελλιπής κληρονομησιμότητα .....	18
1.1.5 Ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης.....	18
1.2 Θεραπεία της ψωρίασης.....	20
1.2.1 Συμβατικές θεραπείες.....	20
1.2.2 Χρήση βιολογικών παραγόντων για τη θεραπεία της ψωρίασης.....	21
1.2.3 Αναστολείς μικρού μοριακού βάρους, μια άλλη συστημική θεραπευτική στρατηγική .....	22
1.3 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση.....	22
1.3.1 Φαρμακογενετική των συμβατικών συστημικών φαρμάκων .....	22
1.3.2 Φαρμακογενετική των βιολογικών παραγόντων .....	24
1.4 Η φωσφοδιεστεράση-4 (Phosphodiesterase-4, PDE4), ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για τη ψωρίαση.....	27
1.4.1 Οι αναστολείς της PDE4 .....	29
1.5 Η χρήση της απρεμιλάστης ως θεραπευτική στρατηγική για τη ψωρίαση .....	30
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	34
3.1 Δείγματα μελέτης .....	34
3.2 Στοιχεία του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (single-nucleotide polymorphism - SNP) rs172043 του γονιδίου <i>PDE4C</i> .....	34
3.3 Απομόνωση DNA.....	35
3.4 Ποσοτικοποίηση του DNA φασματοφωτομετρικά.....	36
3.5 Ποσοτικοποίηση του DNA με φασματοφθορισμομετρία .....	37
3.6 Ποιοτικός έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .	39
3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	40
3.8 Η αλληλουχία του ζεύγους εκκινητών για τον πολυμορφισμό rs172043 .	42
3.9 Βελτιστοποίηση της PCR .....	43

3.10 Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism – SSCP) .....	44
3.11 Ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας.....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	52
4.1 Απομόνωση του DNA.....	52
4.2 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον πολυμορφισμό rs172043 του <i>PDE4C</i> .....	54
4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολυμορφισμό rs172043..	56
4.4 Τα πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 στην ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) .....	56
4.5 Οι εκκινητές του πολυμορφισμού rs172043 σε μία ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου – HRM .....	58
4.6 Ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (HRM analysis)	60
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης, δερματική νόσος, που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα, με αυτοάνοσα παθογόνα χαρακτηριστικά, που επηρεάζει το 2 έως 3% του πληθυσμού παγκοσμίως (Grän, F., et al., 2020). Ωστόσο, ο επιπολασμός της ψωρίασης ποικίλλει ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία (Parisi, R., et al., 2013, Michalek, I. M., et al., 2017), υποδηλώνοντας ότι η εθνικότητα, το γενετικό υπόβαθρο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση της νόσου (Kamiya, K., et al., 2019). Όσον αφορά την ηλικία έναρξης είναι μεταξύ 15 και 30 ετών, που τότε η ασθένεια ονομάζεται ψωρίαση τύπου I και πρόκειται για την πρώιμη μορφή έναρξης και μεταξύ 50 και 60 ετών, που τότε η ψωρίαση είναι τύπου II (Mahil, S. K., et al., 2015). Ακόμα, η ψωρίαση είναι μια ασθένεια εξίσου διαδεδομένη και στα δύο φύλα, αν και τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης έχουν δείξει ότι κατά μέσο όρο οι άνδρες έχουν πιο σοβαρές μορφές της νόσου από ότι οι γυναίκες (Hägg, D., et al., 2013).

Η ψωρίαση, συνήθως, επηρεάζει το δέρμα, αλλά μπορεί επίσης να επηρεάσει τις αρθρώσεις και έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες (Rendon, A., et al., 2019). Συγκεκριμένα μπορεί να εμφανιστεί με ένα ευρύ φάσμα συννοσηρότητας όπως ψωριασική αρθρίτιδα, καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (νόσος Crohn), μεταβολικό σύνδρομο κ.λπ. (Grän, F., et al., 2020). Η φλεγμονή που παρουσιάζεται δεν περιορίζεται μόνο στο δέρμα αλλά έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει και διαφορετικά συστήματα οργάνων. Έτσι, εικάζεται ότι η ψωρίαση είναι μια συστημική οντότητα και όχι αποκλειστικά δερματολογική ασθένεια (Rendon, A., et al., 2019). Επιπροσθέτως, η ψωρίαση έχει σημαντικά αρνητικό αντίκτυπο στην ψυχολογία του ασθενούς λόγω των συμπτωμάτων με αποτέλεσμα την μεγάλη επιβάρυνση της ποιότητας ζωής του (Quality Of Life, QOL) (Pincelli, C., et al., 2018).

Παρόλο που η παθογένεση της ψωρίασης είναι πολύπλοκη και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ασαφής, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι διάφοροι παράγοντες όπως το περιβάλλον, το ανοσοποιητικό σύστημα, οι γενετικοί και οι επιγενετικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην παθογένεση της νόσου (Alexander, H., et al., 2017). Συνεπώς, πρόκειται για μια πολυπαραγοντική ασθένεια η ψωρίαση.

### 1.1.1 Τύποι της ψωρίασης

Η ψωρίαση μπορεί να παρουσιάζεται με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις και η κλινική διάγνωσή της ορίζεται από μορφολογικά ευρήματα. Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες που ανάλογα με τον τύπο αυτών των βλαβών διακρίνονται οι διάφοροι κλινικοί φαινότυποι της ψωρίασης (Deng, Y., et al., 2016).

Μέχρι στιγμής είναι γνωστές οι εξής μορφές (Rajguru, J. P., et al., 2020):

1. Η «κοινή» ψωρίαση ή ψωρίαση κατά πλάκας
2. Η σταγονοειδής ψωρίαση
3. Η ανάστροφη ψωρίαση
4. Η φλυκταινώδης ψωρίαση
5. Η ερυθροδερμική ψωρίαση
6. Η ψωριασική ονυχία



Επιπλέον, ένα ποσοστό των ασθενών με ψωρίαση αναπτύσσει, επίσης, και ψωριασική αρθρίτιδα (Schafer, P., 2012).

Ο συνηθέστερος κλινικός φαινότυπος της ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας που αντιπροσωπεύει το 85-90% όλων των ψωριασικών ασθενών (Deng, Y., et al., 2016). Ο συγκεκριμένος τύπος χαρακτηρίζεται από καλά οριοθετημένες ερυθρηματώδεις πλάκες με αργυρόχρωα λέπια προσκολλημένα επάνω τους. Οι πιο συχνά προσβεβλημένες περιοχές περιλαμβάνουν τους αγκώνες, τα γόνατα, το τριχωτό της κεφαλής και την οσφυϊκή περιοχή, αν και μπορεί να είναι και πιο εκτεταμένη.

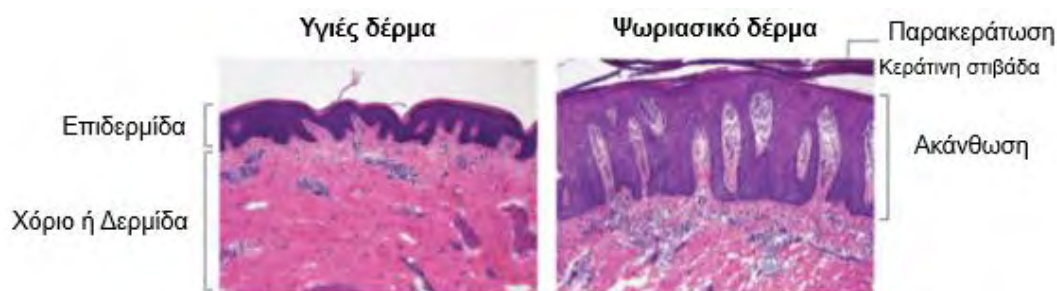
Τέλος, μεταξύ των ασθενών μπορεί να υπάρχουν πολλές διαφορές όσον αφορά την έναρξη της νόσου, την θέση της δερματικής βλάβης, τους παράγοντες ενεργοποίησης και τις υπάρχουσες συννοσηρότητες (Van de Kerkhof, P. C. M., 2008, García-Pérez, M. E., et al., 2012).

### 1.1.2 Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση χαρακτηρίζεται από τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό και την παρεκκλίνουσα διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων που σχετίζονται με τη διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων κυρίως Τ-λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και ουδετερόφιλων (Talaee, R., et al., 2017).

Τα κλασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης απεικονίζονται στην **Εικόνα 1** και είναι τα εξής:

Η επιδερμίδα εμφανίζει έντονη πάχυνση (ακάνθωση) με επιμήκεις επιδερμικές ραβδώσεις προς το χόριο, καθώς τα κερατινοκύτταρα κινούνται μέσω της επιδερμίδας για 4-5 ημέρες, μια δεκαπλάσια επιτάχυνση σε σχέση με το υγιές δέρμα. Καθώς δεν μπορεί να συμβεί η κανονική διαδικασία διαφοροποίησης, υπάρχει απώλεια της φυσιολογικής κοκκώδους στιβάδας, πυκνό στρώμα κερατοειδούς (υπερκεράτωση) και διατήρηση πυρήνων στα ανώτερα στρώματα και στην κεράτινη στιβάδα (παρακεράτωση). Επιπλέον, ουδετερόφιλα συγκεντρώνονται στην επιδερμίδα και στο στρώμα κερατοειδούς (φλύκταινα του Koçoj και μικροαποστήματα Munro). Ακόμα, το χόριο διεισδύεται από άφθονα μονοπύρρηνα κύτταρα, κυρίως μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα και Τ κύτταρα. Τέλος, το ερύθημα των αλλοιώσεων της ψωρίασης οφείλεται σε μεγαλύτερο αριθμό διασταλμένων δερματικών αιμοφόρων αγγείων (Lowe, M. A., et al., 2014).



**Εικόνα 1: Απεικόνιση των κύριων ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών της ψωρίασης** (προσαρμογή από Lowe, M. A., et al., 2014).

### 1.1.3 Αξιολόγηση της βαρύτητας της ψωρίασης

Οι δείκτες που συχνότερα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την απόκριση στη θεραπεία είναι το BSA (Body Surface Area), δηλαδή η

επιφάνεια του σώματος που επηρεάζεται, και το PASI (Psoriasis Area and Severity Index), δηλαδή ο δείκτης έκτασης και βαρύτητας της ψωρίασης.

Η έκταση της ψωρίασης που καλύπτει το σώμα μπορεί να μετρηθεί κατά προσέγγιση ως ποσοστό της περιοχής του σώματος, χρησιμοποιώντας την παλάμη για να αντιπροσωπεύει το 1% του σώματος (Lowe, M. A., et al., 2014). Ανάλογα την επιφάνεια του σώματος του ασθενή που επηρεάζεται (BSA), η ψωρίαση μπορεί να διακριθεί σε ήπια, μέτρια (επηρεάζεται το 3-10% της επιφάνειας του σώματος) και σοβαρή (επηρεάζεται περισσότερο από το 10% της επιφάνειας του σώματος) (Schafer, P., 2012).

Όσον αφορά το PASI είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη βαθμολογία, η οποία βασίζεται κυρίως σε κλινικές παραμέτρους για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της νόσου (Chularojanamontri, L., et al., 2019). Ειδικότερα, το PASI εκτιμά την σοβαρότητα της νόσου αξιολογώντας την έκταση, το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση των ψωριασικών βλαβών με την τιμή 72 να είναι η μέγιστη. Τέλος, αυτός ο δείκτης είναι χρήσιμος για την αξιολόγηση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου με τις περισσότερες κλινικές μελέτες να θεωρούν ότι απαιτείται βελτίωση κατά 75% από την αρχική τιμή για να θεωρηθεί επιτυχής η θεραπεία (αναφέρεται ως PASI75), αν και ένα PASI50 μπορεί επίσης να είναι πολύ σημαντικό για έναν μεμονωμένο ασθενή (Lowe, M. A., et al., 2014).

#### **1.1.4 Παράγοντες που σχετίζονται με τη ψωρίαση**

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν σημειωθεί αρκετές πρόοδοι στην κατανόηση της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας της ψωριασικής νόσου. Θεωρείται ότι προκύπτει από την αλληλεπίδραση πολλών τύπων γενετικού κινδύνου και της έκθεσης σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Pollock, R. A., et al., 2017). Στους τελευταίους συγκαταλέγονται οι λοιμώξεις, η χρήση φαρμάκων, το σωματικό τραύμα, το άγχος και ο τρόπος ζωής του ασθενούς (κάπνισμα και αλκοόλ) (Di Meglio, P., et al., 2014).

Στη αλληλεπίδραση των γονιδίων και του περιβάλλοντος, υπάρχει ένα ακόμα επίπεδο βιολογικών πληροφοριών που ονομάζεται επιγενετική (Pollock, R. A., et al., 2017). Πρόσφατες μελέτες έχουν υπογραμμίσει τη σημασία της επιγενετικής απορρύθμισης στην παθογένεση διαφόρων νόσων, συμπεριλαμβανομένων και των αυτοάνοσων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Glant, T. T., et al., 2014). Επιπλέον, υπάρχει μια αυξανόμενη αναγνώριση της σημασίας της επιγενετικής στη διαφοροποίηση και στη λειτουργία των ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται σε αυτοφλεγμονώδεις διαταραχές (Cuddapah, S., et al., 2010). Αυτά καθιστούν την επιγενετική σημαντικό ενδιαφέροντος για την ψωριασική νόσο (Pedersen, O. B., et al., 2008). Συγκεκριμένα υπάρχουν μελέτες που έχουν εντοπίσει ότι επιγενετικοί παράγοντες όπως η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών κ.τ.λ. εμπλέκονται στην εμφάνιση της ψωρίασης (Deng, Y., et al., 2016).

Στην παθογένεση της ψωρίασης ένας άλλος κρίσιμος παράγοντας είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των επιδερμικών κερατινοκυττάρων και των ανοσοκυττάρων, που προκαλούνται από συγκεκριμένες κυτταροκίνες σε άτομα με γενετική προδιάθεση (Bernard, F.-X., et al., 2012).

##### **1.1.4.1 Γενετικοί παράγοντες**

Η γενετική βάση της ψωρίασης έχει μελετηθεί μέσω πληθυσμιακών και οικογενειακών μελετών, μελετών διδύμων, μελετών γενεαλογίας και από μελέτες συσχέτισης σε

ολόκληρο το γονιδίωμα (Genome-Wide Association Studies, GWAS) (Deng, Y., et al., 2016). Από τις μελέτες έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης ψωρίασης σε συγγενείς πρώτου και δευτέρου βαθμού των ασθενών με ψωρίαση σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, ενώ τα μονοζυγωτικά δίδυμα έχουν διπλάσιο ή τριπλάσιο κίνδυνο σε σύγκριση με τα διζυγωτικά δίδυμα (Farber, E. M., et al., 1974). Γενικά, η ψωρίαση εμφανίζει σχετικά υψηλή κληρονομησιμότητα με αυτή να εκτιμάται σε 60 έως 90%, από τα υψηλότερα ποσοστά για πολυπαραγοντικές ασθένειες (Elder, J. T., et al., 1994).

Οι περιοχές των χρωμοσωμάτων στις οποίες χαρτογραφούνται τα γονίδια που συσχετίζονται με την ψωρίαση αναφέρονται ως θέσεις ευαισθησίας στην ψωρίαση (Psoriasis Susceptibility, PSORS). Κυρίως μέσω ανάλυσης γενετικής σύνδεσης σε οικογένειες που έχουν ψωρίαση έχουν ταυτοποιηθεί 12 τέτοιες θέσεις PSORS (Lowes, M. A., et al., 2014), με την θέση PSORS1 να προσδίδει τον μεγαλύτερο κίνδυνο ευαισθησίας για ψωρίαση (Mahil, S. K., et al., 2015). Το γονίδιο ή τα γονίδια για τις περισσότερες θέσεις PSORS που είναι υπεύθυνα για ευαισθησία δεν είναι γνωστά (Harden, J. L., et al., 2015).

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, η κατανόηση της παθογένεσης της ψωρίασης έχει εμπλουτιστεί με μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS), μέσω των οποίων έχουν αποκαλυφθεί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) σε μεγάλες ομάδες προσβεβλημένων ατόμων με τους αντίστοιχους μάρτυρες και έχει εξεταστεί κατά πόσο η συσχέτιση αυτών των SNPs με τη ψωρίαση είναι στατιστικά σημαντική (Harden, J. L., et al., 2015). Οι γενετικές παραλλαγές που έχουν βρεθεί να συσχετίζονται και οι οποίες βρίσκονται σε κωδικές περιοχές εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων και των ανοσολογικών λειτουργιών όπως η παρουσίαση αντιγόνου, η φλεγμονή και η βιολογία των κερατινοκυττάρων (Liang, Y., et al., 2017). Από τις μελέτες GWAS έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 60 SNPs (Ellinghaus, E., et al., 2010, Nair, R. P., et al., 2009, Tang, H., et al., 2014, Tsoi, L. C., et al., 2012). Αρκετά από τα αντίστοιχα υποψήφια γονίδια μπορούν να ομαδοποιηθούν σε γονίδια λειτουργίας φραγμού του δέρματος και σε γονίδια που εμπλέκονται σε ανοσοαποκρίσεις. Τα τελευταία μπορούν να σχετίζονται είτε με την έμφυτη ανοσία που περιλαμβάνει κυρίως γονίδια στη σηματοδότηση του πυρηνικού παράγοντα-κάππα Β (Nuclear Factor kappa-B, NF-κB) και της ιντερφερόνης (IFN) είτε στην προσαρμοστική που περιλαμβάνει CD8 Τ-λεμφοκύτταρα (αφορά την παρουσίαση αντιγόνων) και Th17 (Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα) κυτταρικές αποκρίσεις (αφορά τον άξονα IL-23/Th17) (O’Rielly, D. D., et al., 2015).

Ακόμα, είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένα γονίδια από τα παραπάνω μονοπάτια συσχετίζονται και με άλλες αυτοάνοσες ασθένειες όπως η νόσος του Crohn (CD), η κοιλιοκάκη και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (Tsoi, L. C., et al., 2012), επιβεβαιώνοντας έτσι την παρουσία κοινής γενετικής βάσης μεταξύ των φλεγμονωδών ασθενειών που προκαλούνται από το ανοσοποιητικό.

#### **1.1.4.1.1 Η περιοχή με την μεγαλύτερη συνεισφορά στην κληρονομησιμότητα της ψωρίασης**

Το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε ότι συσχετίζεται σημαντικά με την ευαισθησία στην ψωρίαση ήταν το HLA-C, και ειδικότερα το αλληλόμορφο HLA-Cw6, το οποίο χαρτογραφείται στον τόπο ευαισθησίας στην ψωρίαση 1 (PSORS1) στη χρωμοσωμική θέση 6p21.3 (Bowcock, A. M., 2005, Elder, J. T., 2006). Μέσω αλληλούχησης και ανάλυσης απλότυπου (Nair, R. P., et al., 2006), μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το

γονιδίωμα (GWASs) (Nair, R. P., et al., 2009, Strange, A., et al., 2010, Tsoi, L. C., et al., 2012) και ανάλυσης SNP έχει σταθερά αποδειχθεί ότι το HLA-C είναι το πιο πιθανό υπεύθυνο γονίδιο στη θέση PSORS1 (Di Meglio, P., et al., 2014). Η περιοχή αυτή, επίσης, έχει το μεγαλύτερο αντίκτυπο στην κληρονομησιμότητα της ψωρίασης (Lowes, M. A., et al., 2014), καθώς το HLA-Cw6 έχει αποδειχθεί ότι το φέρουν περίπου 4-16% των υγιών μαρτύρων (Gourraud, P.-A., et al., 2014) και περίπου 20% έως και πάνω από το 50% των περιπτώσεων ψωρίασης, ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται (Harden, J. L., et al., 2015).

Το HLA-C κωδικοποιεί ένα μόριο του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecule) που εκφράζεται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και προκαλεί την ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων (μέσω της παρουσίασης αντιγόνου) (Caron, F., et al., 2002, Nair, R. P., et al., 2006, Mahil, S. K., et al., 2015). Σε συμφωνία, τα SNPs που είναι σε ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (LD) με το αλληλόμορφο HLA-Cw6 αποδίδουν το ισχυρότερο σήμα συσχέτισης σε όλες τις GWAS (Mahil, S. K., et al., 2015).

Το σύνολο των γονιδίων που έχουν αναφερθεί ότι συσχετίζονται με τη ψωρίαση καθώς και τα SNPs που έχουν εντοπισθεί μέσω μελετών GWAS και τα οποία βρίσκονται εντός ή κοντά στα αναφερόμενα γονίδια συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**. Τα SNPs που παρουσιάζονται δεν είναι απαραίτητα τα υπεύθυνα, αλλά μπορεί κάποιο άλλο SNP από το block τους να είναι το αιτιώδες.

Πίνακας 1: Μονονουκλεοτιδικό Πολυμορφισμό (SNPs) και τα εντός ή πλησίον γονίδια, που συσχετίζονται με την ψωρίαση .					
SNP	Εντός γονιδίου <sup>[*]</sup>	Κοντινό γονίδιο (~...) <sup>[*]</sup>	Βιολογικό μονοπάτι <sup>[6]</sup>	Πληθυσμιακή ομάδα	PubMed ID <sup>[15]</sup>
rs12118303	---	<b>FASLG</b> (~39kb)	Σηματοδότηση NF-kB	Ευρωπαίοι	28537254
rs41298997	<b>IKBKE</b>	---	Σηματοδότηση NF-kB	Ευρωπαίοι	28537254
rs61871342	<b>BLOC1S2<sup>[1]</sup></b>	<b>CHUK</b> (~49kb)	Σηματοδότηση NF-kB	Ευρωπαίοι	28537254
rs11053802	<b>KLRC1</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία	Ευρωπαίοι	28537254
rs27524	<b>ERAP1, CAST<sup>[1]</sup></b>	---	Παρουσίαση αντιγόνου <sup>[7]</sup>	Ευρωπαίοι	20953190
rs27432	<b>ERAP1, LOC102724748<sup>[1]</sup></b>	---	Παρουσίαση αντιγόνου <sup>[7]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs39841	<b>ERAP1, LOC102724748<sup>[1]</sup></b>	---	Παρουσίαση αντιγόνου <sup>[7]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs469758	<b>ERAP1, LOC102724748<sup>[1]</sup></b>	---	Παρουσίαση αντιγόνου <sup>[7]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs2910686	<b>ERAP2, ERAP1<sup>[1]</sup></b>	---	Παρουσίαση αντιγόνου <sup>[7]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs2233278	<b>TNIP1</b>	---	Σηματοδότηση NF-kB <sup>[8]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs17728338	---	<b>TNIP1</b> (~11kb)	Σηματοδότηση NF-kB <sup>[8]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs10036748	<b>TNIP1</b>	---	Σηματοδότηση NF-kB <sup>[8]</sup>	Κινέζοι	25854761
rs74817271	---	<b>TNIP1</b> (~2,7kb)	Σηματοδότηση NF-kB <sup>[8]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs4112788 <sup>[2]</sup>	---	<b>LCE3D</b> (581bp)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Ευρωπαίοι	20953190
rs4085613 <sup>[2]</sup>	---	<b>LCE3D</b> (~1,8kb), <b>LCE3E</b> (~10,7kb)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Κινέζοι	19169255
rs6677595	---	<b>LCE3B</b> (~3,6kb), <b>LCE3A</b> (~5kb), <b>LCE3D</b> (~37kb)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Ευρωπαίοι	23143594
rs1581803	---	<b>LCE3B</b> (~5,7kb), <b>LCE3A</b> (~3,2kb)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Ευρωπαίοι	25574825
rs6693105	---	<b>LCE3B</b> (~4kb), <b>LCE3A</b> (~4,9kb)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Ευρωπαίοι	26974007
rs4845459	---	<b>LCE3A</b> (~8,2kb)	Λειτουργία φραγμού δέρματος	Ευρωπαίοι Κινέζοι	25903422
rs2276405	<b>AIM2</b>	---	Δεν υπάρχει συγκεκριμένο <sup>[9]</sup>	Κινέζοι	25854761
rs11209026	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs9988642	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs12564022	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι Κινέζοι	25903422
rs2295359	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι Κινέζοι	25903422

rs80174646	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs7517847	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs10889676	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs183686347	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs2201841	<b>IL23R</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	19169254
rs20541	<b>IL-13</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Σηματοδότηση Th2 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	19169254
rs1295685	<b>IL-13</b>	<b>IL-4</b> (~13kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Σηματοδότηση Th2 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs3213094	<b>IL-12B</b> , LOC107986469 <sup>[1]</sup>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17	Κινέζοι	19169255
				Ευρωπαίοι	20953190
rs2546890	LOC285626 <sup>[1]</sup>	<b>IL-12B</b> (~2,4kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17	Ευρωπαίοι	25574825
rs12188300	---	<b>IL-12B</b> (~72kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17	Ευρωπαίοι	23143594
rs2082412	---	<b>IL-12B</b> (~24kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17	Ευρωπαίοι	19169254
rs2853694	<b>IL-12B</b> , LOC107986469 <sup>[1]</sup>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs10484554	LOC112267902 <sup>[1]</sup>	<b>HLA-C</b> (~34kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Ευρωπαίοι	20953190
rs1265181	---	<b>HLA-C</b> <sup>[3]</sup> (~80kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Κινέζοι	19169255
rs12191877	---	<b>HLA-C</b> (~13kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Ευρωπαίοι	20953188
				Ευρωπαίοι	19169254
rs2395029	HCP5 <sup>[1]</sup>	<b>HLA-C</b> <sup>[4]</sup> (~192kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Ευρωπαίοι	18369459
rs3134792	---	<b>HLA-C</b> <sup>[5]</sup> (~72kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Ευρωπαίοι	18369459
rs4406273	LINC02571 <sup>[1]</sup> , LOC112267902 <sup>[1]</sup>	<b>HLA-B</b> (~50kb), <b>HLA-C</b> (~26kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Ευρωπαίοι	23143594
rs12199223	---	<b>HLA-B</b> (~79kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Παρουσίαση αντιγόνου	Αιγύπτιοι	30921485
rs610604	<b>TNFAIP3</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κΒ <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	20953190
				Ευρωπαίοι	19169254

rs582757	<b>TNFAIP3</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
				Ευρωπαίοι	25574825
rs643177	<b>TNFAIP3</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs2066808	STAT2	<b>IL-23A</b> (~3,7kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	19169254
				Ευρωπαίοι	20953190
rs2066819	STAT2	<b>IL-23A</b> (~16kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Άξονας IL-23 / Th17 <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs2235617	ZNF313 (γνωστό και ως <b>RNF114</b> )	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	20953190
rs495337	SPATA2	<b>RNF114</b> (~30kb)	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	20953189
rs73129298	<b>RNF114</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs1056198	<b>RNF114</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs4649203	---	<b>IFNLR1</b> ( <b>IL28RA</b> ) (~6kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	20953190
rs7552167	---	<b>IFNLR1</b> ( <b>IL28RA</b> ) (~4,8kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs10794648	---	<b>IFNLR1</b> ( <b>IL28RA</b> ) (~4,4kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs702873	LINC01185 <sup>[11]</sup>	<b>REL</b> (~27kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB	Ευρωπαίοι	20953190
rs67766926	---	<b>REL</b> (~4,8kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB	Ευρωπαίοι	25574825
rs62149416	FLJ16341(LINC01185)	<b>REL</b> (~25kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB	Ευρωπαίοι	23143594
rs17716942	KCNH7	<b>IFIH1</b> (~85kb)	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs3747517	<b>IFIH1</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs1990760	<b>IFIH1</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs240993	REV3L	<b>TRAF3IP2</b> (~130kb)	Σηματοδότηση IL-17/23 & NF-κB	Ευρωπαίοι	20953190
rs458017	REV3L	<b>TRAF3IP2</b> (~108kb)	Σηματοδότηση IL-17/23 & NF-κB	Ευρωπαίοι	20953190
rs33980500	<b>TRAF3IP2,</b> TRAF3IP2-AS1 <sup>[11]</sup>	---	Σηματοδότηση IL-17/23 & NF-κB	Ευρωπαίοι	23143594

rs9481169	---	<b>TRAF3IP2</b> (~2,4kb)	Σηματοδότηση IL-17/23 & NF-kB	Ευρωπαίοι	25574825
rs7769061	<b>TRAF3IP2</b>	---	Σηματοδότηση IL-17/23 & NF-kB	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs8016947	---	<b>NFKBIA</b> (~38kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB	Ευρωπαίοι	20953190
				Ευρωπαίοι	23143594
rs12586317	PRORP <sup>[1]</sup>	<b>NFKBIA</b> (~188kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB	Ευρωπαίοι	25574825
				Ευρωπαίοι	20953190
rs12720356	<b>TYK2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN	Ευρωπαίοι	20953190
rs280519	<b>TYK2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN	Ευρωπαίοι	20953190
rs34536443	<b>TYK2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN	Ευρωπαίοι	23143594
rs35018800	<b>TYK2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN	Ευρωπαίοι	26974007
rs7993214	<b>COG6</b>	---	Δεν είναι γνωστό	Ευρωπαίοι	18369459
rs34394770	<b>COG6</b>	---	Δεν είναι γνωστό	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs10782001	<b>FBXL19</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB	Δεν είναι γνωστή	20953189
				Ευρωπαίοι	25574825
rs12445568	STX1B <sup>[1]</sup>	<b>FBXL19</b> (~70kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs4795067	<b>NOS2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[11]</sup>	Δεν είναι γνωστή	20953189
				Ευρωπαίοι	25574825
				Ευρωπαίοι	25903422
Κινέζοι					
rs28998802	<b>NOS2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs9797244	<b>NOS2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs28512356	<b>TP63</b>	---	Δεν είναι γνωστό	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs8128234	---	<b>RUNX1</b> (~49kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[13]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs4821124	---	<b>UBE2L3</b> (~900bp)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594



rs2266961	<b>UBE2L3</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs11121129	---	<b>TNFRSF9</b> (~266kb)	Προσαρμοστική ανοσία <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs7536201	<b>RUNX3</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων	Ευρωπαίοι	23143594
rs10865331	---	<b>B3GNT2</b> (~99kb)	Προσαρμοστική ανοσία <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs9504361	<b>EXOC2</b>		Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση	Ευρωπαίοι	23143594
		<b>IRF4</b> (~166kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>		
rs2476847	<b>EXOC2</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση	Ευρωπαίοι	25574825
rs2451258	LOC112267968 <sup>[1]</sup>	<b>TAGAP</b> (~40kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs2700987	<b>ELMO1</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs2724013	<b>ELMO1</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση IFN <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs11795343	<b>DDX58</b>	---	Έμφυτη ανοσία: Έμφυτη αντιική σηματοδότηση	Ευρωπαίοι	23143594
rs4561177	---	<b>ZC3H12C</b> (~719bp)	Σηματοδότησης Th-1 κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs3802826	<b>ETS1</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs6590334	<b>ETS1</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs7933433	---	<b>ETS1</b> (~134kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
				Ευρωπαίοι	
rs55974252	---	<b>ETS1</b> (~181kb)	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	25903422
				Κινέζοι	
rs11221332	<b>ETS1</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία: Ενεργοποίηση T κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs367569	LOC105371082 <sup>[1]</sup>	<b>SOCS1</b> (~15kb)	Έμφυτη ανοσία	Ευρωπαίοι	23143594
rs963986	PTRF(CAVIN1)	<b>STAT3</b> (~21kb), <b>STAT5A</b> (~97kb), <b>STAT5B</b> (~121kb)	Προσαρμοστική ανοσία <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs12942547	<b>STAT3</b>	---	Προσαρμοστική ανοσία <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs11652075	<b>CARD14, SSGSH<sup>[1]</sup></b>	---	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-κB <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs545979	POLI	<b>MBD2</b> (~68,7kb)	Προσαρμοστική ανοσία <sup>[10]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594
rs892085	QTRT1 <sup>[1]</sup>	<b>ILF3</b> (~15kb)	Σηματοδότησης Th-1 κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	23143594

		<b>CARM1</b> (~164kb)	Έμφυτη ανοσία: Σηματοδότηση NF-kB <sup>[11]</sup>		
rs4685408	<b>PLCL2</b>	---	Δεν είναι γνωστό	Ευρωπαίοι	25939698
rs7637230	LINC02085 <sup>[1]</sup>	<b>NFKBIZ</b> (~83,6kb)	Σηματοδότηση NF-kB <sup>[12]</sup>	Ευρωπαίοι	25939698
rs2675662	<b>CAMK2G</b>	---	Δεν είναι γνωστό	Ευρωπαίοι	25939698
rs1051738	<b>PDE4A</b>	---	Κυτταρική σηματοδότηση <sup>[14]</sup>	Ευρωπαίοι	25574825
rs59867199	---	<b>IL2</b> (~74kb), <b>IL21</b> (~79kb)	Σηματοδότησης Th-17 κυττάρων <sup>[11]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007
rs10758669	---	<b>JAK2</b> (~3,4kb)	Άξονας IL-12 / IL-23 <sup>[13]</sup>	Ευρωπαίοι	26974007

<sup>[1]</sup> Η κατάταξη των γονιδίων σε κοντινά και εντός έγινε μετά από επεξεργασία στη SNP Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Για τα κοντινά γονίδια αναφέρεται στο περίπου πόσο απέχουν από το SNP (η απόσταση βρέθηκε μετά από επεξεργασία στη SNP Database και έχει εύρος από ~500bp έως ~200kb). <sup>[1]</sup> Μετά από επεξεργασία στη SNP Database. <sup>[2]</sup> Για το SNP rs4112788 κοντινά είναι επίσης τα γονίδια LCE3B (~35kb) και LCE3C (~22kb) (De Cid, R., et al., 2009). Για το SNP rs4085613 κοντινά είναι επίσης τα γονίδια LCE3D (~1,8kb) και LCE3A (~45,5kb) (Zhang, X.-J., et al., 2009). <sup>[3]</sup> Το PubMed ID αναφέρεται στο SNP, ενώ ότι κοντά σε αυτό το SNP είναι το γονίδιο HLA-C έχει αναφερθεί από τους (Zhang, X.-J., et al., 2009). <sup>[4]</sup> Το PubMed ID αναφέρεται στο SNP, ενώ ότι κοντά σε αυτό το SNP είναι το γονίδιο HLA-C έχει αναφερθεί από τους (Liu, Y., et al., 2008). <sup>[5]</sup> Το PubMed ID αναφέρεται στο SNP, ενώ ότι κοντά σε αυτό το SNP είναι το γονίδιο HLA-C έχει αναφερθεί από τους (OKA, A., et al., 2012). <sup>[6]</sup> Αναφέρεται στο/α γονίδιο/α (εντός ή κοντά) που είναι με έντονα γράμματα. <sup>[7]</sup> (Strange, A., et al., 2010), (Tsoi, L. C., et al., 2012). <sup>[8]</sup> (Nair, R., et al., 2009). <sup>[9]</sup> (Dombrowski, et al., 2011), (Zuo, et al., 2015). <sup>[10]</sup> (Mahil, S. K., et al., 2015). <sup>[11]</sup> (Sun, L.-D., et al., 2010), (Hüffmeier, U., et al., 2010), (Tsoi, L. C., et al., 2012), (Ellinghaus, D., et al., 2012), (Liu, Y., et al., 2008), (Stuart, P. E., et al., 2010), (Nair, R. P., et al., 2009), (Ellinghaus, E., et al., 2010), (Strange, A., et al., 2010), (Zhang, X.-J., et al., 2009). <sup>[12]</sup> (Tsoi, et al., 2015). <sup>[13]</sup> (Harden, J. L., et al., 2015). <sup>[14]</sup> (Lin, C.-H., et al., 2016). <sup>[15]</sup> Στον Πίνακα 2 για κάθε PubMed ID αναγράφεται η πληθυσμιακή ομάδα, ο αριθμός δειγμάτων περιπτώσεις/μάρτυρες στην μελέτη και ο αριθμός δειγμάτων περιπτώσεις/μάρτυρες στην μελέτη επανάληψης.

Πίνακας 2: Πληθυσμιακή ομάδα και αριθμός δειγμάτων για κάθε μελέτη			
PubMed ID	Πληθυσμιακή ομάδα	Αριθμός δειγμάτων περιπτώσεις/μάρτυρες	Αριθμός δειγμάτων περιπτώσεις/μάρτυρες (μελέτη επανάληψης)
28537254	Ευρωπαίοι	11.988/275.335	7.044/11.434
20953190	Ευρωπαίοι	2.178/5.175	3.174/5.464
23143594	Ευρωπαίοι	10.588/22.806	---
25574825	Ευρωπαίοι	4.212/8.032	---
26974007	Ευρωπαίοι	52.262 (από τις οποίες 6.530 ψωρίαση) /34.213	---
25854761	Κινέζοι	11.245/11.177	6.369/13.969
19169255	Κινέζοι	1.139/1.132	5.721/7.340
25903422	Ευρωπαίοι	3.496/5.186	5.134/5.633
	Κινέζοι	1.588/3.546	5.151/5.152
19169254	Ευρωπαίοι	~ 1.400/ ~ 1.400	5.048/5.041
20953188	Ευρωπαίοι	472/1.146	6.015/6891 <sup>[*]</sup>
18369459	Ευρωπαίοι	218/519	1.153/1.217
30921485	Αιγύπτιοι	215/416	321/253
20953189	Ευρωπαίοι	2.178/5.175	3.174/5.464
25939698	Ευρωπαίοι	3.994/7.699	11.301/19.879 <sup>[**]</sup>

<sup>[\*]</sup> Από τους 6.015 οι 2.585 είναι άγνωστης πληθυσμιακής ομάδας / από τους 6.891 οι 2.412 άγνωστης πληθυσμιακής ομάδας. <sup>[\*\*]</sup> Από τους 11.301 οι 5.033 είναι άγνωστης πληθυσμιακής ομάδας/ από τους 19.879 οι 5.707 είναι άγνωστης πληθυσμιακής ομάδας.

#### 1.1.4.1.2 Ελλιπής κληρονομησιμότητα

Αν και έχουν αναγνωρισθεί πολλά γονίδια προδιάθεσης για ψωρίαση, μεμονωμένα αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό επίδρασης. Ενώ η κληρονομησιμότητα της ψωρίασης έχει εκτιμηθεί ότι φτάνει το 60-90%, ο γενετικός κίνδυνος όλων των παραλλαγών, που έχουν εντοπισθεί μέσω μελετών GWAs, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μόνο το ένα τέταρτο της ευαισθησίας λόγω γενετικής. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ελλιπής κληρονομησιμότητα (Golan, D., et al., 2014). Έχουν προταθεί αρκετοί λόγοι για την φαινομενικά ελλιπή κληρονομησιμότητα σε πολυπαραγοντικές ασθένειες, όπως αλληλεπιδράσεις γονιδίου-γονιδίου και γονιδίου-περιβάλλοντος και η ύπαρξη εξαιρετικά επιβλαβών σπάνιων παραλλαγών (Hunt, K. A., et al., 2013, Tang, H., et al., 2014). Από τα παραπάνω συνεπάγεται, λοιπόν, ότι η αιτία πολλών πολυπαραγοντικών ασθενειών μπορεί να εξηγηθεί καλύτερα μέσω ορισμένων συνδυασμών SNPs (δηλαδή αλληλεπιδράσεων SNP-SNP) και όχι μόνο μέσω ενός αριθμού ανεξάρτητων SNPs (Gerke, J., et al., 2009, Moore, J. H., et al., 2010). Παρόλο που έχουν βρεθεί πολλά SNPs να συσχετίζονται με την ψωρίαση, αρκετά από αυτά συνδέονται ασθενώς όταν αναλύονται ανεξάρτητα. Μερικά από τα τελευταία εμφανίζουν ισχυρότερη συσχέτιση μόνο όταν αναλύονται σε συνδυασμό με ένα άλλο SNP. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του φαινομένου που έχει αποδείξει ότι η αλληλεπίδραση SNP-SNP παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της ψωρίασης αφορά SNPs που βρίσκονται κυρίως στην εκτεταμένη περιοχή του HLA στο χρωμόσωμα 6 (Lee, K.-Y., et al., 2018).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι γενετικές παραλλαγές εντός του γονιδίου της ενδοπλασματικής αμινοπεπτιδάσης 1 (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1, ERAP1), όπως το rs27524, μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία στην ψωρίαση μόνο σε άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο HLA-Cw6 (Strange, A., et al., 2010, Lysell, J., et al., 2013, Kenna, T. J., et al., 2015, Popa, O. M., et al., 2016). Αυτό αποτελεί ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλληλομόρφων του *ERAP1* και του HLA-Cw6 (γενετική επίσταση) (Strange, A., et al., 2010). Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το ρόλο της ERAP1 στην επεξεργασία πεπτιδίων για την αποτελεσματική σύνδεσή τους σε μόρια MHC τάξης I, ενισχύοντας, έτσι, την παρουσίαση αντιγόνου και την επακόλουθη μη φυσιολογική ενεργοποίηση T κυττάρων (Mahil, S. K., et al., 2015). Ένα άλλο παράδειγμα γενετικής αλληλεπίδρασης είναι μεταξύ των γονιδίων της οικογένειας όψιμου κερατοειδούς φακέλου (Late Cornified Envelope, *LCE*) και του *HLA-C* (Tsoi, L. C., et al., 2012). Η επιστατική αυτή επίδραση αναφέρθηκε μόνο στους πληθυσμούς των Ολλανδών και των ΗΠΑ στο Μίτσιγκαν (de Cid, R., et al., 2009, Riveira-Munoz, E., et al., 2011) και δεν σημειώθηκε σε άλλους μελετημένους πληθυσμούς (de Cid, R., et al., 2009, Hüffmeier, U., et al., 2010, Riveira-Munoz, E., et al., 2011, Xu, L., et al., 2011). Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο, καθώς και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Xu, L., et al., 2011).

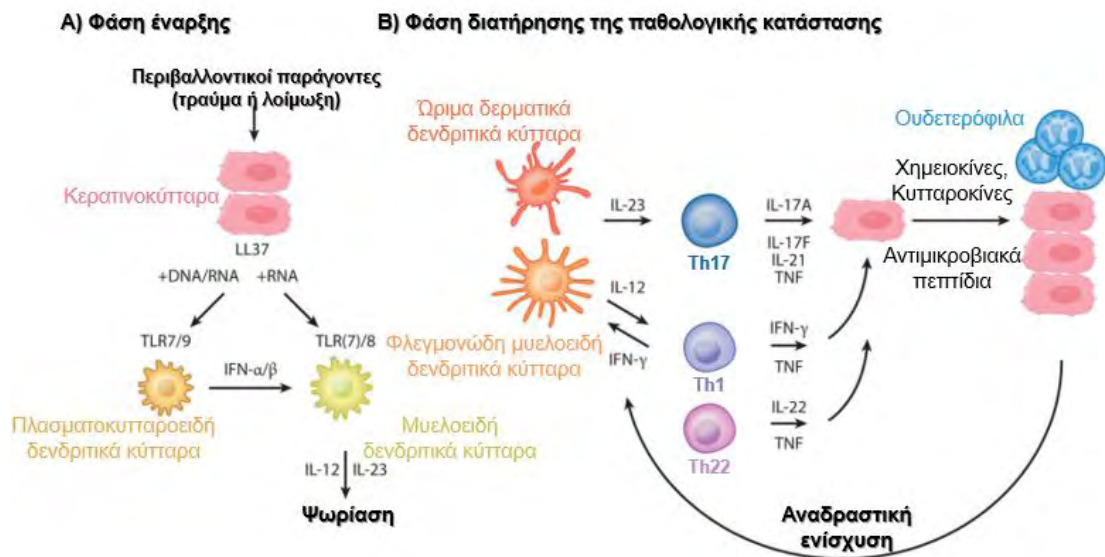
#### 1.1.5 Ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης

Η διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί βασική πτυχή της ψωρίασης και έχει αποδειχθεί ότι μια ποικιλία κυττάρων συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου, συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων (Dendritic Cells, DCs), των T κυττάρων, των ιστιοκυττάρων, των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων, των μακροφάγων ακόμη και των κερατινοκυττάρων (Chiricozzi, A., et al., 2018, Ayala-Fontanez, N., et al., 2016, Rendon, A., et al., 2019). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των διαφόρων κυτταρικών τύπων θεωρείται ότι δημιουργεί τη φλεγμονή

και τα προ-πολλαπλασιαστικά κυκλώματα που μεσολαβούνται από χημειοκίνες και κυτταροκίνες (Chiricozzi, A., et al., 2018) σε άτομα με γενετική προδιάθεση (Bernard, F.-X., et al., 2012). Ακόμη, αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να ενισχύουν και να διατηρούν μια χρόνια φλεγμονή (Grän, F., et al., 2020).

Η παθογένεση της ψωρίασης διακρίνεται συνήθως σε δύο φάσεις, τη φάση έναρξης (**Εικόνα 2A**) και τη φάση διατήρησης της παθολογικής κατάστασης (**Εικόνα 2B**). Τα DCs, ως “ επαγγελματικά ” κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα (Antigen Presenting Cells, APCs), είναι τα κύτταρα που παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της νόσου (**Εικόνα 2A**). Ωστόσο, η ενεργοποίησή τους στην ψωρίαση δεν είναι απολύτως σαφής. Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς περιλαμβάνει την αναγνώριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (Antimicrobial Peptides, AMPs), όπως LL37, πρωτεΐνες S100 και β-defensins, που εκκρίνονται από κερατινοκύτταρα ως απόκριση σε τραυματισμό (Grän, F., et al., 2020). Αυτά τα πεπτίδια (και ιδιαίτερα το LL37) μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με μόρια DNA ή RNA και, μέσω της σηματοδότησης υποδοχέων που μοιάζουν με Toll (Toll-Like Receptors, TLRs), να ενεργοποιήσουν πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid Dendritic Cells, pDCs), τα οποία παράγουν ιντερφερόνες τύπου I (IFN-α / β). Από τα σύμπλοκα LL37 / RNA καθώς και από IFN-α / β προσελκύονται και ενεργοποιούνται τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (myeloid Dendritic Cells, mDCs) τα οποία εκκρίνουν IL-12 και IL-23 (Frischknecht, L., et al., 2019).

Κατά τη διάρκεια της φάσης διατήρησης της παθολογικής κατάστασης (**Εικόνα 2B**), τα ώριμα δερματικά δενδριτικά κύτταρα και τα φλεγμονώδη μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα οδηγούν στην προσαρμοστική φλεγμονώδη απόκριση (Nestle, F. O., et al., 1994). Ειδικότερα, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα, παράγοντας τις κυτταροκίνες IL-23 και IL-12, πυροδοτούν την ενεργοποίηση των κυττάρων Th17, Th1 και Th22. Η ενεργοποίηση αυτών των υποομάδων T κυττάρων οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, INF-γ και TNF-α οι οποίες διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα (Alexander, H., et al., 2017). Για παράδειγμα, οι IL-17A και IL-17F ενεργοποιούν τα κερατινοκύτταρα για την παραγωγή χημειοκινών (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8/IL-8), που στρατολογούν ουδετερόφιλα ή άλλα ανοσοκύτταρα (CCL20), καθώς και για την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μελών της οικογένειας LL37 και S100 (S100A7/8/9/15) (Wilson, N. J., et al., 2007) που δρουν, επίσης, ως χημειοτακτικοί παράγοντες λευκοκυττάρων (Wolf, R., et al., 2010). Ένα άλλο παράδειγμα είναι η IL-22 που μεσολαβεί στην πλειονότητα της επιδερμικής υπερπλασίας, μειώνοντας τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Zheng, Y., et al., 2007, Ma, H.-L., et al., 2008). Τέλος, με παρόμοιο τρόπο, η ίδια IFN-γ ενισχύει τη σηματοδότηση της και προκαλεί την πρόσληψη κυττάρων που παράγουν IFN-γ, μέσω της παραγωγής των CXCL9, CXCL10 και CXCL11 από κερατινοκύτταρα (Mabuchi, T., et al., 2012). Συνεπώς, τα κερατινοκύτταρα παράγοντας αντιμικροβιακά πεπτίδια, και εκκρίνοντας κυτταροκίνες (π.χ IL-6, IL-1β και TNF-α) και χημειοκίνες (π.χ CCL20, CXCL9, CXCL10) διαιωνίζουν το φλεγμονώδες περιβάλλον (Rauschenberger, T., et al., 2019).



**Εικόνα 2: Η ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης** (προσαρμογή από Lowes, M. A., et al., 2014).

**A)** Φάση έναρξης: Η έναρξη της νόσου επιτελείται μέσω της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Το έναυσμα μπορεί να δώσει ένα τραύμα ή μια λοίμωξη με επακόλουθη την αναγνώριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, κυρίως LL37, που εκκρίνονται από κερατινοκύτταρα. Το LL37 μπορεί να συνδεθεί με νουκλεϊκά οξέα για να ενεργοποιήσει τα πλασματοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα, ώστε τα τελευταία να απελευθερώσουν IFN-α / β. Τα σύμπλοκα LL37 / RNA μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα για την παραγωγή βασικών ψωριασικών κυτταροκινών, IL-12 και IL-23. **B)** Φάση διατήρησης της παθολογικής κατάστασης: Ωριμα δερματικά δένδριτικά κύτταρα και φλεγμονώδη μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες όπως IL-23 και IL-12. Αυτές οι κυτταροκίνες ενεργοποιούν τα κύτταρα Th17, Th1 και Th22 με αποτέλεσμα να αρχίσουν να παράγουν και αυτά κυτταροκίνες (IL-17, IL-21, IL-22, INF-γ και TNF) και να δρουν περαιτέρω στα κερατινοκύτταρα. Τα τελευταία, καθώς διεγείρονται μπορούν να παράγουν χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αντιμικροβιακά πεπτιδία (Lowes, M. A., et al., 2014) που στρατολογούν ανοσοκύτταρα στο προσβεβλημένο δέρμα, δημιουργούν ένα βρόχο θετικής ανάδρασης και εμφανίζουν συνεργιστικά αποτελέσματα που ενισχύουν τη διαδικασία της φλεγμονώδους νόσου (Pincelli, C., et al., 2018).

## 1.2 Θεραπεία της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια υποτροπιάζουσα ασθένεια, η οποία συχνά απαιτεί μακροχρόνια θεραπεία (Rendon, A., et al., 2019). Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τη σοβαρότητα της νόσου, τη θέση της δερματικής βλάβης, τις σχετικές συννοσηρότητες και την προτίμηση του ασθενούς (Sutherland, A., et al., 2016). Ωστόσο, όπως συμβαίνει και με άλλες πολυπαραγοντικές ασθένειες που προκαλούνται από το ανοσοποιητικό, δεν υπάρχει οριστική θεραπεία για την ψωρίαση και η διαθέσιμη θεραπεία συμβάλει μόνο στην μείωση της δραστηριότητας της νόσου και στη βελτίωση των συμπτωμάτων. Όσον αφορά την αξιολόγηση της θεραπείας, αυτή γίνεται με βάση τη μεταβολή στον δείκτη PASI (Di Meglio, P., et al., 2014).

### 1.2.1 Συμβατικές θεραπείες

Οι συμβατικές θεραπείες για τη ψωρίαση εκτείνονται από τοπικές θεραπείες (Di Meglio, P., et al., 2014) όπως γλυκοκορτικοστεροειδή, ανάλογα βιταμίνης D ή συνδυασμοί και των δύο (Boehncke, W.-H., et al., 2015), μαλακτικούς παράγοντες (Sutherland, A., et al., 2016), πίσσα και τοπικά ρετινοειδή (Menter, A., et al., 2011) που συνήθως θεωρούνται επαρκείς για τη διαχείριση της ήπιας μορφής της νόσου, έως φωτοθεραπεία που περιλαμβάνει την ευρέως χρησιμοποιούμενη στενή ζώνη UVB και

σε μικρότερο βαθμό τη φωτοχημειοθεραπεία, όπως το PUVA (psoralen plus UVA) (Boehncke, W.-H., et al., 2015) ή συστημικές θεραπείες που προορίζονται για μέτριες έως σοβαρές περιπτώσεις (Di Meglio, P., et al., 2014). Στις περιπτώσεις αυτές, συνήθως, η φωτοθεραπεία και οι συστημικοί παράγοντες λαμβάνονται σε συνδυασμό με τοπικές θεραπείες (Sutherland, A., et al., 2016) και ως θεραπευτική επιλογή πρώτης γραμμής θεωρούνται τα συστημικά φάρμακα (Ovejero-Benito, M. C., et al., 2017). Έχουν εγκριθεί τρία συμβατικά συστημικά φάρμακα για τη θεραπεία της ψωρίασης: μεθοτρεξάτη (ανταγωνιστής φολικού οξέος), κυκλοσπορίνη A (καταστολέας T λεμφοκυττάρων) και ακιτρετίνη (ένα ρετινοειδές) (Prieto-Pérez, R., et al., 2013). Από αυτά συχνά ως πρώτη γραμμή θεραπείας είναι η μεθοτρεξάτη που έχει ανοσοκατασταλτική, κυτταροστατική και αντιφλεγμονώδη δράση (Di Meglio, P., et al., 2014). Ωστόσο, η συμβατική θεραπεία δεν ικανοποίησε πλήρως τις ανάγκες των ασθενών (Di Meglio, P., et al., 2014) κυρίως λόγω της ανεπαρκούς αποτελεσματικότητας και των ανεπιθύμητων παρενεργειών (Kamata, M., et al., 2017), ειδικά στις πιο σοβαρές περιπτώσεις (Di Meglio, P., et al., 2014).

### 1.2.2 Χρήση βιολογικών παραγόντων για τη θεραπεία της ψωρίασης

Την τελευταία δεκαετία, μια καλύτερη κατανόηση της ανοσοπαθολογίας της νόσου έχει μεταφραστεί επιτυχώς σε νέα φάρμακα, γνωστά ως «βιολογικοί παράγοντες» (Di Meglio, P., et al., 2014). Πρόκειται για σύνθετα τροποποιημένα μόρια που περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα και πρωτεΐνες σύντηξης υποδοχέα (Rendon, A., et al., 2019). Οι βιολογικοί παράγοντες είναι γενικά καλά ανεκτοί και χρησιμοποιούνται συνήθως ως συστημική θεραπεία δεύτερης γραμμής (Alexander, H., et al., 2017), όταν οι παραδοσιακές θεραπείες έχουν αποτύχει, αντενδείκνυται ή οδηγούν σε σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες (Strohal, R., et al., 2013). Οι κυριότεροι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της ψωρίασης είναι (Kamata, M., et al., 2020):

- **Αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (Tumor Necrosis Factor-α - TNF-α):** Infliximab, Adalimumab, Certolizumab-pegol και Etanercept, ο μόνος βιολογικός παράγοντας που είναι πρωτεΐνη σύντηξης υποδοχέα (Rendon, A., et al., 2019)
- **Αναστολέας ιντερλευκίνης 12/ ιντερλευκίνης 23 (IL-12/IL-23):** Ustekinumab (στοχεύει την κοινή υπομονάδα p40 που έχουν η IL-12 και IL-23)
- **Αναστολείς ιντερλευκίνης 23 (IL-23) (πρόκειται για μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν ειδικά την υπομονάδα p19 της IL-23):** Guselkumab, Risankizumab, Tildrakizumab (δεν έχει εγκριθεί ακόμη) και Mirikizumab (δεν έχει εγκριθεί ακόμη)
- **Αναστολείς ιντερλευκίνης 17 (IL-17):** Secukinumab και Ixekizumab αντισώματα κατά της IL-17A, Brodalumab αντίσωμα κατά του υποδοχέα της IL-17A (IL-17RA) και Bimekizumab (δεν έχει εγκριθεί ακόμη) αντίσωμα κατά της IL-17A και IL-17F

Οι βιολογικοί παράγοντες είναι γενικά πολύ αποτελεσματικοί για την ψωρίαση. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών δεν αποκρίνεται ή χάνει την απόκριση με την πάροδο του χρόνου. Η παρουσία αντισωμάτων κατά των φαρμάκων (Anti - Drug Antibodies, ADA) έχει αναγνωρισθεί ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στην αποτυχία της θεραπείας και στον αυξημένο κίνδυνο ανεπιθύμητων παρενεργειών (Strand, V., et al., 2017, Van Schouwenburg, P. A., et al., 2013, Jullien, D., et al., 2015, Krieckaert, C., et al., 2012, Garces, S., et al., 2013).

### 1.2.3 Αναστολείς μικρού μοριακού βάρους, μια άλλη συστημική θεραπευτική στρατηγική

Επιπλέον, εκτός από τους βιολογικούς παράγοντες τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ακόμα μία θεραπευτική επιλογή για τη ψωρίαση (Claudia, C.-D., et al., 2020), που εντάσσεται και αυτή στις συστημικές θεραπείες (Rendon, A., et al., 2019). Πρόκειται για τους αναστολείς μικρού μοριακού βάρους που στοχεύουν βασικά μόρια τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση (Garcia-Perez et al., 2013) με στόχο την ελαχιστοποίηση της γενικής ανοσοκαταστολής (Di Meglio, P., et al., 2014). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η απρεμιλάστη (αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης-4 (Phosphodiesterase-4 (PDE4)) και το Tofacitinib [αναστολέας των κινασών Janus (Janus kinases - JAK) και ειδικότερα των JAK1 και JAK3] (Alexander, H., et al., 2017). Γενικά, οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ενδιάμεσες επιλογές μεταξύ των συμβατικών συστημικών θεραπειών και των βιολογικών θεραπειών ή ως εναλλακτικές επιλογές για τους ασθενείς που δεν αποκρίνονται στους βιολογικούς παράγοντες (Yiu, Z. Z. N., et al., 2016) λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων τους για τους ασθενείς (όπως χορήγηση από το στόμα ή τοπικά, χαμηλό κόστος και απουσία αντιδράσεων ανοσογονικότητας) (Claudia, C.-D., et al., 2020).

### 1.3 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση

Οι θεραπείες που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής για τη ψωρίαση περιορίζονται από τη διακύμανση της αποτελεσματικότητας μεταξύ ασθενών (Gunter, N. V., et al., 2019). Έτσι, φαίνεται να είναι απαραίτητος ο εντοπισμός γενετικών βιοδεικτών που θα λειτουργήσουν ως στόχοι για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ψωρίαση. Αυτό έχει προταθεί για την επίτευξη εξατομικευμένων αντι-ψωριασικών θεραπειών (Woolf, R. T., et al., 2010). Στην ουσία αυτός είναι ο στόχος της φαρμακογενετικής μελέτης.

Οι φαρμακογενετικές μελέτες, συνήθως, επικεντρώνονται στην ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ των αποκρίσεων των ασθενών σε ορισμένα φάρμακα και SNPs (Ovejero-Benito, M. C., et al., 2017) που υπάρχουν σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων, μεταφορείς φαρμάκων, υποδοχείς καθώς και στόχους φαρμάκων (Sutherland, A., et al., 2016, Roden, D. M., et al., 2011, Agúndez, J. A. G., et al., 2012).

Παρακάτω θα αναφερθούν οι φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την αναζήτηση γενετικών παραλλαγών που μπορούν να προβλέψουν την απόκριση σε συμβατικά συστημικά φάρμακα και σε βιολογικούς παράγοντες.

#### 1.3.1 Φαρμακογενετική των συμβατικών συστημικών φαρμάκων

##### 1) Μεθοτρεξάτη

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την απόκριση στη μεθοτρεξάτη περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες - εκείνους που επηρεάζουν την μεταφορά διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (δηλ. ABCC1, ABCG2 και SLC19A1) και εκείνους που επηρεάζουν τα ένζυμα στην οδό μεταβολισμού / σηματοδότησης μεθοτρεξάτης (π.χ. MTHFR, DHFR, TYMS, ATIC και ADORA2A) (Ranganathan, P., et al., 2006). Από μία μελέτη που περιλάμβανε 374 ασθενείς με χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με μεθοτρεξάτη αποδείχθηκε ότι τρία SNPs στο γονίδιο του

μεταφορέα εκροής *ABCC1* (rs35592, rs2238476 και rs28364006) και δύο SNPs στο γονίδιο του μεταφορέα εκροής *ABCG2* (rs13120400 και rs17731538) συσχετίζονται με αυξημένη απόκριση στη μεθοτρεξάτη. Από την άλλη έξι SNPs στο *ABCC1* (rs2238476, rs3784864, rs246240, rs3784862, rs1967120 και rs11075291) αναφέρθηκαν ότι συσχετίζονται με ανεπιθύμητα συμβάντα. Ακόμα, τα SNPs που συσχετίστηκαν με αύξηση της πιθανότητας τοξικότητας ήταν το rs246240 και rs3784862 στο *ABCC1*, το rs5760410 στο *ADORA2A* και το rs1051266 στο *SLC19A1* (Warren, R. B., et al., 2008). Μια άλλη μελέτη με συνολικό αριθμό δείγματος 203 έδειξε ότι ένας πολυμορφισμός στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'-UTR) του γονιδίου της θυμιδυλικής συνθάσης (Thymidylate Synthase, TS ή TYMS), μιας διπλής ή τριπλής επανάληψης 28 bp (2R ή 3R), μπορεί να επηρεάσει τη θεραπευτική απόκριση στη μεθοτρεξάτη. Συγκεκριμένα, η παρουσία τουλάχιστον μιας τριπλής επανάληψης 28 bp (ετερόζυγο 3R / 2R αλληλόμορφο και ομόζυγο 3R / 3R αλληλόμορφο) στην 5'-UTR της θυμιδυλικής συνθάσης (TYMS) ήταν συχνότερη σε ασθενείς που δεν αποκρίθηκαν στη μεθοτρεξάτη. Επιπρόσθετα, το αλληλόμορφο 3R της 5'-UTR του *TYMS* συσχετίστηκε σημαντικά με ανεπιθύμητες παρενέργειες, ηπατοτοξικότητα ή συννοσηρότητες. Από την μελέτη αυτή αναφέρθηκε, επίσης, ότι η τοξικότητα είναι πιο συχνή στους φορείς του αλληλομόρφου 80A στο *SLC19A1* και του ελλείμματος 6 bp στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR) του *TYMS*. Τέλος, μια παραλλαγή στο γονίδιο *ATIC* (347G) συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο ανεπιθύμητων παρενεργειών και μια παραλλαγή στο γονίδιο *MTHFR* (1298C) αποδείχθηκε λιγότερο συχνή σε ασθενείς που εμφάνισαν ηπατοτοξικότητα (Campalani, E., et al., 2007). Τέλος, πρόσφατα αναλύθηκαν φαρμακογενετικοί δείκτες απόκρισης μεθοτρεξάτης σε ασθενείς με ψωρίαση της Νότιας Ινδίας Ταμίλ (n=189) και βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποκρινόμενων και των μη αποκρινόμενων στη μεθοτρεξάτη όσον αφορά τις γονοτυπικές συχνότητες της γενετικής παραλλαγής HLA-Cw6 και του rs3761548 στο *FOXP3* (Indhumathi, S., et al., 2017).

## 2) Κυκλοσπορίνη A

Η απορρόφηση της κυκλοσπορίνης A (CSA) είναι πολύ μεταβλητή μεταξύ των ασθενών. Αυτή η μεταβλητότητα μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την έκφραση και τη λειτουργία των ισοενζύμων του μεταβολισμού CYP3A στο ήπαρ (δηλ. CYP3A4 και CYP3A5) και του μεταφορέα πολλαπλών φαρμάκων, P - γλυκοπρωτεΐνη (*ABCB1*), (Naesens, M., et al., 2009) λόγω του ότι η απορρόφηση σχετίζεται με το μεταβολισμό. Παρόλο που το ένζυμο CYP3 μπορεί να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα και τη συστημική απέκκριση της CSA, καμία μελέτη για την ψωρίαση δεν έχει διερευνήσει επιτυχώς τον αντίκτυπο των παραλλαγών CYP3A (O'Rielly, D. D., et al., 2011). Από την άλλη, σε μια μελέτη με 84 ασθενείς με ψωρίαση που παρακολουθήθηκαν για περίοδο 3 μηνών κατά τη διάρκεια της θεραπείας με CSA, ο γονότυπος 3435T στο *ABCB1* (rs1045642) εμφανίστηκε συχνότερα στους μη αποκρινόμενους παρά στους αποκρινόμενους στην κυκλοσπορίνη A (Vasilopoulos, Y., et al., 2014). Δεδομένης της ανεπάρκειας των φαρμακογενετικών μελετών της CSA, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες (Sutherland, A., et al., 2016).

## 3) Ακιτρετίνη (ένα ρετινοειδές)

Ο μηχανισμός δράσης της ακιτρετίνης στην ψωρίαση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Παρόλα αυτά μέσω μια μελέτης σε 124 ασθενείς φαίνεται ότι η παραλλαγή rs833061 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) παίζει ρόλο στην πρόβλεψη της απόκρισης στην ακιτρετίνη σε ασθενείς με ψωρίαση. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συχνότητα του



γονότυπου TT στο rs833061 (*VEGF*) σε ασθενείς που δεν αποκρίθηκαν στην ακιτρετίνη σε σύγκριση με αυτούς που έδειξαν απόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ενός άλλου πολυμορφισμού, του rs2010963 του *VEGF*, που έχει συσχετιστεί με την ψωρίαση, με την απόκριση στην ακιτρετίνη (Young, H. S., et al., 2016). Τέλος, μια άλλη μελέτη, που περιλάμβανε 190 άτομα με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση δεν έδειξε συσχέτιση των SNPs που βρίσκονται στην απολιποπρωτεΐνη E με την απόκριση στην ακιτρετίνη (Campalani, E., et al., 2006).

### 1.3.2 Φαρμακογενετική των βιολογικών παραγόντων

#### 1) Φάρμακα κατά του παράγοντα νέκρωσης όγκου-α (TNF-α)

Οι φαρμακογενετικές μελέτες που αξιολόγησαν τη συσχέτιση μεταξύ του αλληλόμορφου HLA-Cw6 και της απόκρισης των ασθενών σε φάρμακα κατά του TNF-α ήταν οι εξής:

Μια μελέτη σε Βρετανούς και Ιρλανδούς με συνολικό αριθμό ασθενών 138 δεν βρήκε συσχέτιση μεταξύ του HLA-Cw6 και την απόκριση σε adalimumab ή etanercept (Ryan, C., et al., 2014). Αντίθετα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ισπανικό πληθυσμό (n=109) έδειξε ότι οι ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο HLA-Cw6 ήταν λιγότερο πιθανό να αποκριθούν σε adalimumab, etanercept ή infliximab (Gallo, E., et al., 2013). Η απουσία συσχέτισης μεταξύ του αλληλόμορφου HLA-Cw6 και της απόκρισης στο adalimumab αποδείχθηκε και από μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Ευρωπαίους με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση που έλαβαν adalimumab για 3 χρόνια (n=122) (Talamonti, M., et al., 2017). Από την άλλη πλευρά, σε ασθενείς από έναν ισπανικό πληθυσμό (n = 116) που έφεραν το αλληλόμορφο HLA-Cw6 και το γονίδιο του όψιμου κερατοειδούς φακέλου (*LCE*) διαπιστώθηκε ότι ήταν πιο πιθανό να αποκριθούν σε φάρμακα κατά του TNF-α (Batalla, A., et al., 2015). Ακόμα, ο πολυμορφισμός rs1048554, που βρίσκεται κοντά στο *HLA-C* φάνηκε να συσχετίζεται με καλύτερη απόκριση στα φάρμακα κατά του TNF-α μέσω μιας μελέτης σε ελληνικό πληθυσμό (n = 250) (Masouri, S., et al., 2016).

Επίσης, με την απόκριση στην θεραπεία κατά του TNF-α έχουν συσχετιστεί πολυμορφισμοί που εντοπίζονται σε γονίδια του υποδοχέα της ανοσοσφαιρίνης IgG (Fc Gamma Receptor, FCGR) και ειδικότερα στα γονίδια *Fc IIIa* (*FCGR3A*) και *Ila* (*FCGR2A*). Μέσω μιας μελέτης που διεξήχθη σε 70 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση που λάμβαναν θεραπεία με παράγοντες κατά του TNF-α (adalimumab, infliximab ή etanercept) βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί FCGR2A-H131R και FCGR3A-V158F συσχετίζονται με καλή απόκριση σε φάρμακα κατά του TNF-α. Επιπλέον, φάνηκε ότι τα παραπάνω αλληλόμορφα μπορεί να συμβάλλουν σε ταχύτερη απόκριση λόγω της αποτελεσματικότερης απομάκρυνσης των κυττάρων, που εκφράζουν TNF-α, από την περιοχή της φλεγμονής (Julia, M., et al., 2013).

Επιπρόσθετα, ως υποψήφιοι βιοδείκτες απόκρισης στη βιολογική θεραπεία έχουν προταθεί αρκετά SNPs που βρίσκονται στο *TNF-α* (rs1799724, rs1799964, rs1800629, rs361520) (Linares-Pineda, T. M., et al., 2016). Ωστόσο, από αυτά τα SNPs δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του rs1800629 ή του rs361525 και της απόκρισης σε φάρμακα κατά του TNF-α από δύο προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε 80 Έλληνες (Vasilopoulos, V., et al., 2012) και 57 Ιταλούς (Murdaca, G., et al., 2014). Όμως, μια άλλη μελέτη που περιλάμβανε συνολικά 109 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν φάρμακα κατά του TNF-α για 6 μήνες έδειξε ότι ο γονότυπος GG του rs361525 συσχετίζεται με καλή απόκριση στα φάρμακα κατά του TNF-α και ειδικότερα ήταν πιο πιθανό να αποκριθούν στο infliximab και στο etanercept

(Gallo, E., et al., 2013). Σε σχέση με την απόκριση στο etanercept υπάρχουν αμφιλεγόμενες απόψεις, καθώς μια άλλη ανεξάρτητη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με γονότυπο GA στο rs361525 αποκρίθηκαν ανεπαρκώς στο etanercept (n=97) (De Simone, C., et al., 2015). Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 15 μελετών στην οποία διερευνήθηκαν διαφορετικά SNPs στο *TNF-α* σε διαφορετικές αυτοάνοσες ασθένειες επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs1800629, rs361525 και rs1799724 του γονιδίου *TNF-α* και της θεραπείας έναντι αυτού, αλλά μόνο σε Καυκάσιους. Από τους παραπάνω πολυμορφισμούς, μόνο η συσχέτιση με το rs1799724 επιβεβαιώθηκε για την απόκριση σε ασθενείς με ψωρίαση. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι μόνο δύο από τις 15 μελέτες που αναλύθηκαν αφορούν την ψωρίαση (Murdaca, G., et al., 2014). Από μία μελέτη (n=109) αποδείχθηκε ότι οι ασθενείς με το αλληλόμορφο T του rs1799724 αποκρίνονται καλύτερα στα φάρμακα κατά του TNF-α. Αντίθετα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με ψωρίαση που φέρουν το αλληλόμορφο T είχαν μικρότερη απόκριση στο etanercept (De Simone, C., et al., 2015, Prieto-Pérez, R., et al., 2015, Vasilopoulos, V., et al., 2012). Ένα άλλο SNP του *TNF-α* που έχει συσχετιστεί με απόκριση σε αυτή τη θεραπεία είναι το rs1799964. Έχει παρατηρηθεί σε μελέτη σε 109 ασθενείς ότι οι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T αυτού του πολυμορφισμού είναι πιο πιθανόν να αποκριθούν στο infliximab στους 3 και 6 μήνες. Η ίδια μελέτη ανέλυσε τη συσχέτιση και μεταξύ των ακόλουθων SNP: rs6887695 και rs3212227 (στην υπομονάδα p40 του γονιδίου *IL-12B*), και rs7530511 και rs11209026 (*IL-23R*). Το αποτέλεσμα ήταν ότι οι ασθενείς που έφεραν τον γονότυπο GG για το rs1120902 (*IL-23R*) να έχουν καλύτερη απόκριση στο infliximab (n=33). Αντίθετα, για τα SNP του γονιδίου *IL-12B* δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση με την απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF-α (Gallo, E., et al., 2013).

Μια μελέτη σε 80 ασθενείς με ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με παράγοντες κατά του TNF-α είχε ως σκοπό να διερευνήσει την πιθανή επίδραση πέντε πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν: τον TNF-α (rs361525, rs1800629, rs1799724), τον υποδοχέα I του TNF-α (TNF Receptor Superfamily Member 1A, TNFRSF1A) (rs4149584) και τον υποδοχέα II του TNF-α (TNF Receptor Superfamily Member 1B, TNFRSF1B) (rs1061622) στην απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF-α αναστολείς. Από την μελέτη αυτή παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφισμού του *TNF-α* (γονότυπος CC για το rs1799724) και του πολυμορφισμού rs1061622 του *TNFRSF1B* (γονότυπος TT) με βελτιωμένη απόκριση στη θεραπεία με etanercept (Vasilopoulos, Y., et al., 2012). Η συσχέτιση του αλληλομόρφου T του SNP rs1061622 (*TNFRSF1B*) με καλύτερη απόκριση στα φάρμακα κατά του TNF-α έχει αποδειχθεί, επίσης, από μια μελέτη σε έναν ισπανικό πληθυσμό (n=90) (González-Lara, L., et al., 2014) αλλά και από μια πρόσφατη μετα-ανάλυση που περιλάμβανε αρκετές αυτοάνοσες ασθένειες [συνολικά αποτελούνταν από επτά μελέτες (n=929) από τις οποίες μόνο δύο περιλάμβαναν ασθενείς με ψωρίαση] (Chen, W., et al., 2015).

Επιπρόσθετα, έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες μελέτες από τις οποίες έχει βρεθεί ότι και παραλλαγές σε άλλα γονίδια μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόκρισης στα φάρμακα αντι-TNF-α. Συγκεκριμένα, από μια μελέτη σε 250 Καυκάσιους παρατηρήθηκε ότι το rs13190932 του *TRAF3IP2* και το rs9260313 του *HLA-A* συσχετίστηκαν με καλύτερη απόκριση στο etanercept, ενώ ο γονότυπος GG για το rs13190932 και ο TT για το rs9260313 έδειξαν καλύτερη συσχέτιση με την απόκριση στο infliximab και στο adalimumab, αντίστοιχα (Masouri, S., et al., 2016). Ακόμα, δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου *TNFAIP3* (rs2230926 και rs610604) συσχετίστηκαν θετικά με απόκριση σε αναστολείς του TNF-α σε μια μελέτη που διεξήχθη σε 433 ασθενείς με ψωρίαση από το Μίσιγκαν και 199 ασθενείς από το Τορόντο που είχαν λάβει θεραπεία με τρεις διαφορετικούς αναστολείς TNF-α (etanercept, infliximab και

adalimumab) (Tejasvi, T., et al., 2012). Μια άλλη μελέτη απόκρισης στη θεραπεία βασίστηκε σε 163 Καυκάσιους ασθενείς, που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α και/ή ustekinumab, και ανέλυσε τη συσχέτιση με δύο SNPs στο γονίδιο *IL-17A* (rs2275913 και rs10484879) και ένα SNP στο γονίδιο *IL-17F* (rs763780). Αποδείχθηκε ότι το rs763780 (*IL-17F*) συσχετίζεται με απόκριση στο infliximab (n = 36) στους 3 και 6 μήνες και με απόκριση στο adalimumab στους 6 μήνες (n=67) (Prieto-Pérez, R., et al., 2015). Μια άλλη συσχέτιση με απόκριση σε αναστολείς κατά του TNF-α έχει σημειωθεί για το SNP rs3794271 (*SLCO1C1*) σε μελέτη σε ισπανικό πληθυσμό (n=130) (Julià, A., et al., 2014). Επιπρόσθετα, από μια ανάλυση συσχέτισης μεταξύ 173 SNPs, που συσχετίζονται με την ψωρίαση, με απόκριση σε φάρμακα κατά του TNF-α παρατηρήθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs2916205 (*PGLYR4*), rs9304742 (*ZNF816A*), rs11126740 (*CTNNA2*), rs2546890 (*IL12B*), rs96844 (*MAP3K1*) και rs12191877 (*HLA-C*) συσχετίζονται με την απόκριση σε φάρμακα αντι-TNF-α στους 3 μήνες και οι πολυμορφισμοί rs1801274 (*FCGR2*), rs6311 (*HTR2A*) και rs6908425 (*CDKAL1*) συσχετίστηκαν με απόκριση στους 6 μήνες (Prieto-Pérez, R., et al., 2016). Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε έναν πληθυσμό της Δανίας (n=478, από αυτούς οι 376 είχαν υποβληθεί σε θεραπεία αντι-TNF-α) διαπίστωσε μια συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης σε φάρμακα κατά του TNF-α και έξι SNPs: rs1143623 και rs1143627 (*IL1B*); rs11465996 (*LY96*); rs11938228 και rs4696480 (*TLR2*) και rs352139 (*TLR9*) (Loft, ND., et al., 2017). Τέλος, οι Ovejero-Benito M.C., et al. (2017) ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ 124 SNPs και της απόκρισης στο etanercept σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας σε 3 μήνες (n=78) και 6 μήνες θεραπείας (n=68). Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν μια συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs13437088 (*HLA-B/MICA*), rs96844 (*MAP3K1*), rs2431697 (*PTTG1*) και rs9304742 (*ZNF816A*) και απόκρισης στο etanercept στους 3 μήνες και μια συσχέτιση μεταξύ rs928655 (*GBP6*) και rs2546890 (*IL-12B*) και απόκρισης στο etanercept στους 6 μήνες (Ovejero-Benito, M. C., et al., 2017).

## **2) Φάρμακο κατά της ιντερλευκίνης 12/ ιντερλευκίνης 23 (IL-12/IL-23)**

Έχει προταθεί ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην οδό σηματοδότησης IL-12 / IL-23 παίζουν σημαντικό ρόλο στη χρόνια επιθηλιακή φλεγμονή καθώς και στην απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία (Chen, X., et al., 2006). Το Ustekinumab είναι το βιολογικό φάρμακο που έχει σχεδιαστεί για να αναστείλει τις φλεγμονώδεις οδούς IL-12 / IL-23 στοχεύοντας την κοινή υπομονάδα p40 των ιντερλευκινών αυτών (Zweegers, J., et al., 2017). Μια φαρμακογενετική μελέτη σε 163 Καυκάσιους ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α και/ή ustekinumab έδειξε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs763780 του γονιδίου *IL-17F* και των μη αποκρινόμενων στο ustekinumab στους 3 και 6 μήνες (Prieto-Pérez, R., et al., 2015). Μια πρόσφατη μελέτη σε μια ελληνική ομάδα 250 ασθενών απέτυχε να παρατηρήσει συσχέτιση μεταξύ της παραλλαγής rs10484554 (*HLA-C*) και της απόκρισης σε ustekinumab, αλλά σημείωσε ότι οι πολυμορφισμοί rs151823 και rs26653 (*ERAP1*) συσχετίστηκαν με καλή απόκριση στο ustekinumab (Masouri, S., et al., 2016). Μια άλλη μελέτη που διεξήχθη σε έναν πληθυσμό της Δανίας (n=478, από αυτούς οι 230 είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με ustekinumab) βρήκε συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης στο ustekinumab και τεσσάρων SNPs: rs1143623, rs1143627 (*IL1B*), rs8177374 (*TIRAP*) και rs5744174 (*TLR5*) (Loft, N. D., et al., 2017). Μια πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε 121 πολυμορφισμούς σε σχέση με την απόκριση στο ustekinumab (n=69). Αυτό που διαπιστώθηκε ήταν μια συσχέτιση μεταξύ των SNPs στα γονίδια *CHUK*, *C17orf51*, *ZNF816A*, *STAT4*, *SLC22A4* και *Corf72* και καλής απόκρισης στο ustekinumab, ενώ τα SNPs στα γονίδια *TNFRSF1A*, *HTR2A*, *NFKBIA*, *ADAM33* και *IL13* συσχετίστηκαν με κακή απόκριση στο ustekinumab (Prieto-Pérez, R., et al., 2017). Μια άλλη

φαρμακογενετική μελέτη σε 51 ασθενείς δεν έδειξε καμία συσχέτιση μεταξύ του SNP rs610604 (*TNFAIP3*) και του ελλείματος των γονιδίων *LCE3B/3C* με την απόκριση στο ustekinumab. Αντίθετα, με καλή απόκριση στην θεραπεία κατά των IL-12 / IL-23 έχει συσχετιστεί το αλληλόμορφο HLA-Cw6 σε μια μελέτη που διεξήχθη σε 51 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Talamonti, M., et al., 2013), σε δύο άλλες μεγαλύτερες μελέτες με συνολικό αριθμό ασθενών 255 (Talamonti, M., et al., 2017) η μία και 134 (Talamonti, M., et al., 2016) η άλλη και τέλος σε δύο ακόμη μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κινέζικο πληθυσμό (Chiu, H. Y., et al., 2012) και σε πληθυσμό της Βόρειας Αμερικής (n=601, από τους οποίους οι 332 έλαβαν θεραπεία με ustekinumab) (Li, K., et al., 2016). Τέλος, από μια ανάλυση σε 64 ασθενείς με ψωρίαση που είχαν λάβει θεραπεία με ustekinumab για έως και ένα έτος παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που δεν είχαν τον γονότυπο AA για το SNP rs3212227 (*IL12B*), αλλά έφεραν τον γονότυπο GG για το SNP rs6887695 (*IL12B*) και το αλληλόμορφο HLA-Cw6 είχαν περισσότερες πιθανότητες να αποκριθούν στο ustekinumab (Galluzzo, M., et al., 2015). Συνοπτικά, το HLA-Cw6 είναι ένας πολλά υποσχόμενος μοριακός δείκτης της απόκρισης του ustekinumab, αν και πρέπει να επικυρωθεί σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών (Ovejero-Benito, M. C., et al., 2017).

Πριν την καθιέρωση μιας εξατομικευμένης θεραπείας για τη ψωρίαση, θα πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθούν περισσότερες μετα-αναλύσεις και αναλύσεις σε μεγαλύτερες ομάδες ατόμων σε πολυμορφισμούς που εμφανίζουν πιθανή συσχέτιση με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης (Julia, A., et al., 2016).

#### **1.4 Η φωσφοδιεστεράση-4 (Phosphodiesterase-4, PDE4), ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος για τη ψωρίαση**

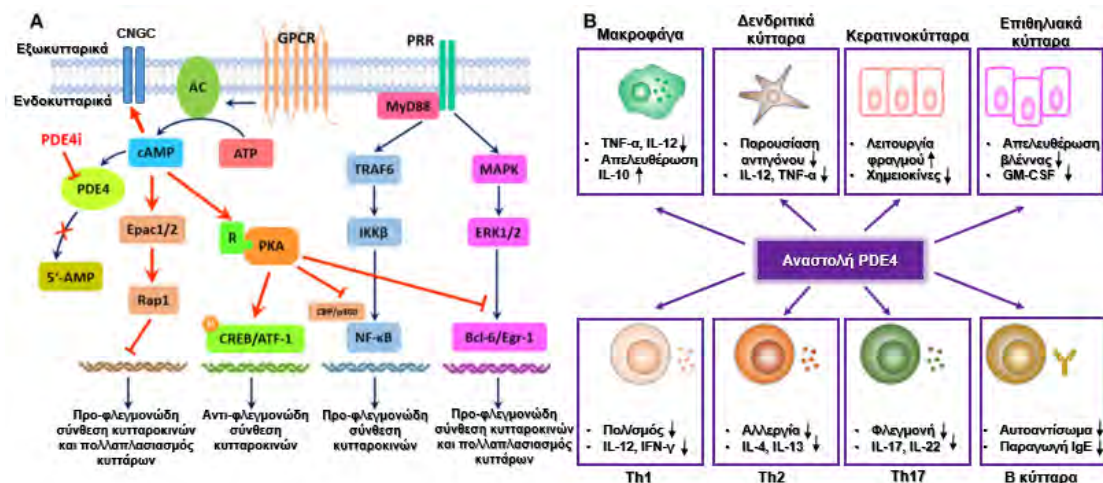
Οι φωσφοδιεστεράσες (PDEs) λειτουργούν ως βασικοί θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές για τις κυτταρικές αποκρίσεις (Lin, C.-H., et al., 2016). Ειδικότερα, είναι τα κύρια ένζυμα αποικοδόμησης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), ενός ενδοκυτταρικού δευτερογενούς αγγελιοφόρου που ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και διατηρεί την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος (Pincelli, C., et al., 2018). Με τη δράση τους αυτή οι PDEs ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις του cAMP σε φλεγμονώδη κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα (Schafer, P., 2012). Συνολικά υπάρχουν 11 υποοικογένειες PDEs (PDE1 - PDE11) (Lin, C.-H., et al., 2016) με την υποοικογένεια PDE4 να είναι στα περισσότερα ανοσοκύτταρα (Schafer, P., 2012), αλλά και αυτή στην οποία παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε ασθενείς με ψωρίαση (Schafer, P. H., et al., 2016).

Τα ισοένζυμα της PDE4 που είναι ειδικά για το cAMP κωδικοποιούνται από 4 γονίδια (A - D) (Keating, G. M., 2017) και εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο, τους καρδιαγγειακούς ιστούς, τους λείους μυς, τα κερατινοκύτταρα και τα ανοσοκύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των T κυττάρων, των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων, των δένδριτικών κυττάρων και των ηωσινόφιλων) (Chiricozzi et al., 2016). Επίσης, τα μέλη της οικογένειας PDE4 είναι παρόντα σε επιθηλιακά κύτταρα, το ενδοθήλιο και τους ινοβλάστες (Thaçi, D., et al., 2016). Η δραστηριότητα τους οδηγεί σε μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του cAMP και ταυτόχρονα προάγει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών και μειώνει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών (Schafer, P., 2012). Από την άλλη η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP με αναστολή της PDE4 μπορεί να ρυθμίσει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και να διατηρήσει την ανοσοποιητική ισορροπία (Maurice, et al., 2014). Επιπλέον, αυτό έχει αποδειχθεί και ως μια αποτελεσματική θεραπευτική

στρατηγική για διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και η ψωρίαση (Li, H., et al., 2018).

Αναλυτικότερα, η αναστολή της PDE4 (**Εικόνα 3A**) έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ενδοκυτταρικού cAMP, που οδηγεί στη συνέχεια στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (Protein Kinase A, PKA), των καναλιών ιόντων που ελέγχονται από κυκλικά νουκλεοτίδια (Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels, CNGC) και της πρωτεΐνης ανταλλαγής που ενεργοποιείται από το cAMP (Exchange protein directly activated by cAMP, Epac). Συνολικά, αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της σύνθεσης προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, στην ενεργοποίηση T κυττάρων, στην αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων, στην παρουσίαση αντιγόνου και στην επιθηλιακή ακεραιότητα μέσω εκκίνησης πολλαπλών καθοδικών στοιχείων (Li, H., et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της PKA οδηγεί σε φωσφορυλίωση παραγόντων μεταγραφής, όπως της πρωτεΐνης δέσμησης στοιχείων που αποκρίνεται στο cAMP (cAMP-Response Element Binding protein, CREB), του διαμορφωτή στοιχείων απόκρισης στο cAMP (cAMP Response Element Modulator, CREM) και της ενεργοποίησης του παράγοντα μεταγραφής 1 (Activating Transcription Factor 1, ATF1). Οι παράγοντες αυτοί σε ορισμένους τύπους κυττάρων συνδέονται σε στοιχεία απόκρισης του cAMP (cAMP-Response Element, CRE) εντός των υποκινητών των γονιδίων οδηγώντας στην αύξηση των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της ιντερλευκίνης 10 (IL-10) (Schafer, P., 2012, Schafer, P. H., et al., 2016, Wen, A. Y., et al., 2010). Επιπλέον, με την ενεργοποίηση της PKA μπορεί να ρυθμιστεί και η μεταγραφική δραστηριότητα του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (Nuclear factor-κΒ, NF-κΒ). Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της μεταγραφής που βασίζεται σε CRE στρατολογεί συμπαραγόντες της μεταγραφής, όπως την πρωτεΐνη δέσμησης CREB (CREB-Binding Protein, CBP) ή την ομόλογη πρωτεΐνη p300 (Raker, V. K., et al., 2016) που συνδέεται στενά με την υπομονάδα p65 του NF-κΒ (Li, H., et al., 2018), μακριά από αυτόν (Raker, V. K., et al., 2016). Αυτό προκαλεί αναστολή του NF-κΒ με αποτέλεσμα την μείωση της παραγωγής προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α), η ιντερλευκίνη 23 (IL-23) και η ιντερφερόνη-γ (Interferon gamma, INF-γ). Ακόμη, η ενεργοποίηση της PKA θα μπορούσε να επηρεάσει τη σύνθεση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη λεμφώματος 6 Β κυττάρων (B-cell lymphoma 6, Bcl-6) (Page, C. P., 2014, Hernández-Flórez, D., et al., 2016). Τέλος, η ενεργοποίηση του Epac 1/2 μετά την αύξηση του cAMP χρησιμεύει ως ένας πολλά υποσχόμενος εναλλακτικός μηχανισμός για τη στόχευση της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού (Lehrke, M., et al., 2015). Γενικά, η αναστολή της PDE4 έχει ένα ευρύ φάσμα αντιφλεγμονωδών αποτελεσμάτων και μπορεί να ρυθμίσει τόσο έμφυτες όσο και προσαρμοστικές αποκρίσεις (**Εικόνα 3B**). Πιο συγκεκριμένα έχει σημειωθεί ρύθμιση της δραστηριότητας των μακροφάγων (έχει παρατηρηθεί ότι η αναστολή της PDE4 αυξάνει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από αυτά τα κύτταρα), των ουδετερόφιλων, των μονοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (Crilly, A., et al., 2011, Schafer, P., 2012). Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της PDE4 έχει εξαιρετικές επιδράσεις στην ενεργοποίηση T κυττάρων που προκαλείται από τον υποδοχέα των T κυττάρων (T-Cell Receptor, TCR), η οποία εκδηλώνεται με μείωση της απελευθέρωσης κυτταροκινών και χημειοκινών από βοηθητικά T κύτταρα -1 (Th1), Th2 και Th17 (Sakkas, L. I., et al., 2017), ενώ η επίδραση στον φαινότυπο και τη λειτουργία των B κυττάρων έχει φανεί να είναι μικρή (Schafer, P. H., et al., 2014). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα cAMP στα κερατινοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα θα μπορούσε επίσης να αναστέλλει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και να ρυθμίζει την

ανάπτυξη των κυττάρων και τις λειτουργίες φραγμού (Page, C. P., 2014). Τέλος, το αντι-φλεγμονώδες περιβάλλον που δημιουργείται κατά την αναστολή της PDE4 μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερα επίπεδα διήθησης από άλλα ανοσοκύτταρα, καθώς και σε μειωμένη ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων (Parr, K., et al, 2015). Σήμερα, η αναστολή της PDE4 και συγκεκριμένα από την απρεμιλάστη, εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ψωρίασης. Η απρεμιλάστη για τη θεραπεία της μέτριας/σοβαρής ψωρίασης εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) το 2014 (Parr, K., et al., 2012).



**Εικόνα 3: Τρόπος αναστολής της PDE4 στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων** (προσαρμογή από Li, H., et al., 2018). **A)** Η PDE4 ρυθμίζει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω της αποικοδόμησης του cAMP. Η αναστολή της PDE4 οδηγεί στη συσσώρευση του ενδοκυτταρικού cAMP με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA, των CNGCs και της Erac. Η ενεργοποίηση της PKA έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της CREB και την ενεργοποίηση του ATF-1, μεταγραφικοί παράγοντες που αυξάνουν την μεταγραφή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών που προκαλούνται από την Bcl-6 και τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων. Από την άλλη, η PKA αναστέλλει τον παράγοντα μεταγραφής NF-κβ απομακρύνοντας την CBP ή p300 με συνέπεια την μείωση της παραγωγής προ-φλεγμονωδών παραγόντων. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Erac, που δρα ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, ενεργοποιεί τη μικρή GTPase Rap1 και χρησιμεύει ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός για τη στόχευση της φλεγμονής και του πολλαπλασιασμού. **B)** Εξαιτίας της κατανομής της PDE4 στον οργανισμό, η αναστολή της μπορεί να αναστείλει φλεγμονώδεις αποκρίσεις από μακροφάγα, δενδρική κύτταρα, Th1, Th2 και Th17 κύτταρα, να αυξήσει την παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών από μακροφάγα και να παρεμβαίνει στη λειτουργία των B κυττάρων. Τέλος, μπορεί να προάγει τη λειτουργία φραγμού των κερατινοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της καταστολής της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών.

### 1.4.1 Οι αναστολείς της PDE4

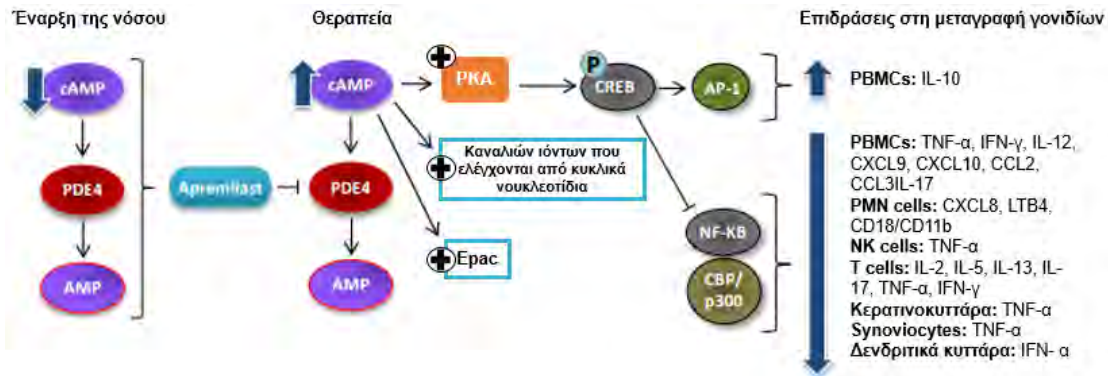
Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί πολλοί αναστολείς PDE4 για ασθενείς με φλεγμονώδεις ασθένειες (Li, H., et al., 2018). Ξεκινώντας με τον πρώτο εκλεκτικό αναστολέα PDE4 που αναγνωρίστηκε, το Rolipram, έχουν εντοπιστεί και άλλοι πιο ειδικοί αναστολείς PDE4, μεταξύ των οποίων η Roflumilast, η απρεμιλάστη και η Crisaborole που εγκρίθηκαν διαδοχικά (Sakkas, L. I., et al., 2017). Οι αναστολείς της PDE4 συνήθως εμφανίζουν γαστρεντερικές παρενέργειες όπως ναυτία και έμετο (Spina, D., 2008). Ωστόσο, αν και οι ανεπιθύμητες παρενέργειες φαίνεται να είναι

αναπόφευκτες στην κλινική εφαρμογή, εκτός από τη Roflumilast, την απρεμιλάστη και τη Crisaborole, μια σειρά νέων αναστολέων PDE4 έχουν σχεδιαστεί για την εξισορρόπηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας ελαχιστοποιώντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες (Li, H., et al., 2018). Ορισμένοι από αυτούς χρησιμοποιούνται, σήμερα, σε κλινικές δοκιμές ως νέα υποψήφια αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Lin, C.-H., et al., 2016). Για παράδειγμα, το Pefcalcitol (επίσης γνωστό ως M5181, είναι ένα ανάλογο της βιταμίνης D3) βρίσκεται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές φάσης III για ψωρίαση κατά πλάκας και το HFP034 έχει αναπτυχθεί σε προκλινικό στάδιο για τη θεραπεία της ψωρίασης (Li, H., et al., 2018).

## 1.5 Η χρήση της απρεμιλάστης ως θεραπευτική στρατηγική για τη ψωρίαση

Η απρεμιλάστη είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας μικρού μοριακού βάρους ειδικός για τη PDE4 (Schafer, P. H., et al., 2014, Man, H.-W., et al., 2009). Η αναστολή της PDE4 από την απρεμιλάστη αποτρέπει την υδρόλυση του cAMP σε AMP, με αποτέλεσμα την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του cAMP που τροποποιεί πολλαπλές καθοδικές ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των έμφυτων ανοσοκυττάρων (π.χ. μονοκύτταρα), προσαρμοστικών ανοσοκυττάρων (π.χ. T κύτταρα) και μη ανοσοκυττάρων (π.χ. κερατινοκύτταρα, αρθρικούς ινοβλάστες) (Schafer, P. H., et al., 2016, Schafer, P., 2012, Schafer, P. H., et al., 2014, Schafer, P.H., et al., 2010, McCann, F. E., et al., 2010).

*In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η απρεμιλάστη αναστέλλει την έκφραση και/ή την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών από διάφορους τύπους κυττάρων (Schafer, P. H., et al., 2016, Schafer, P. H., et al., 2014, Schafer, P.H., et al., 2010, McCann, F. E., et al., 2010). Για παράδειγμα, η έκφραση και/ή παραγωγή των κυτταροκινών TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 και IL-23 και οι χημειοκίνες CXCL9, CXCL10, CCL2 και CCL3 από διεγερμένα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) παρεμποδίστηκαν από την απρεμιλάστη (Schafer, P. H., et al., 2016, Schafer, P. H., et al., 2014, Schafer, P.H., et al., 2010). Επιπλέον, φάνηκε ότι η απρεμιλάστη αναστέλλει την παραγωγή TNF- $\alpha$  από φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer cells, NK cells), κερατινοκύτταρα (Schafer, P.H., et al., 2010) και ανθρώπινα ρευματοειδή αρθρικά κύτταρα (McCann, F. E., et al., 2010). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η απρεμιλάστη αναστέλλει την παραγωγή IL-2, IL-5, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$  και IFN- $\gamma$  από διεγερμένα T κύτταρα και IFN- $\alpha$  από δενδριτικά κύτταρα (Schafer, P. H., et al., 2014). Επίσης, παρεμποδίστηκαν από την απρεμιλάστη η *in vitro* έκφραση και/ή η παραγωγή CXCL8, τα μόρια προσκόλλησης CD18 και CD11b και ο χημειοτακτικός παράγοντας λευκοτριένιο B4 (Leukotriene B4, LTB4) από πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (Polymorphonuclear cells, PMN cells) (Schafer, P.H., et al., 2010). Τέλος, σημειώθηκε ότι η απρεμιλάστη αυξάνει την παραγωγή της IL-10 σε διεγερμένα PBMCs (Schafer, P. H., et al., 2016, Schafer, P.H., et al., 2010). Τα αποτελέσματα αυτά που προκαλούνται από τη δράση της απρεμιλάστη παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4**.



**Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης** (προσαρμογή από Keating, G. M., 2017). Η απρεμιλάστη αναστέλλει τη δράση της PDE4, με αποτέλεσμα να μην υδρολύεται το cAMP και να ενεργοποιείται η PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων μεταγραφικοί παράγοντες όπως CREB, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών (κυτταροκινών και χημειοκινών) και την αυξημένη έκφραση των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των διεγερμένων μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs), των φυσικών φονικών κυττάρων (NK cells), των κερατινοκυττάρων, των Synovialocytes (τύπος κυττάρων που βρίσκεται μέσα στις αρθρώσεις του αρθρικού χόνδρου) και των δενδρικών κυττάρων.

Τα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της απρεμιλάστης στη θεραπεία της ψωρίασης από κλινικές δοκιμές είναι τα εξής:

Σύμφωνα με μια μελέτη (n=254) που είχαν λάβει απρεμιλάστη 20mg ή 30mg δύο φορές/ημέρα ή εικονικό φάρμακο για 16 εβδομάδες (Ohtsuki, M., et al., 2017) σε δοκιμή φάσης 2β που πραγματοποιήθηκε στην Ιαπωνία σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας, σημαντικά μεγαλύτερες μέσες ποσοστιαίες μειώσεις στα επίπεδα του πλάσματος των IL-17A, IL-17F και IL-22 από την έναρξη έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα παρατηρήθηκαν σε αυτούς που έλαβαν απρεμιλάστη 30 mg δύο φορές ημερησίως από ότι σε εκείνους που έλαβαν εικονικό φάρμακο (Keating, G. M., 2017). Αυτό επαληθεύτηκε και σε δοκιμή φάσης 3 (ESTEEM-2 n= 411) (Paul, C., et al., 2015) στην οποία σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας εμφανίστηκαν σημαντικά μεγαλύτερες μέσες ποσοστιαίες μειώσεις στα επίπεδα του πλάσματος των IL-17A, IL-17F, IL-22 αλλά και του TNF-α από την έναρξη έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα σε αυτούς που έλαβαν μονοθεραπεία με απρεμιλάστη (30 mg δύο φορές ημερησίως) από ότι σε εκείνους που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Από την ίδια μελέτη παρατηρήθηκε, επίσης, σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής στα επίπεδα IL-17A, IL-17F και IL-22 από την έναρξη έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα και της ποσοστιαίας βελτίωσης στην περιοχή της ψωρίασης καθώς και της βαθμολογίας του δείκτη έκτασης και βαρύτητας της ψωρίασης (PASI) από την έναρξη έως την 16<sup>η</sup> εβδομάδα. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι σε ασθενείς με ψωρίαση, η IL-17F είναι ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας της απόκρισης βάσει PASI στην απρεμιλάστη (Keating, G. M., 2017).

Συμπερασματικά, η απρεμιλάστη είναι μια αποτελεσματική, γενικά καλά ανεκτή και κατάλληλη επιλογή για τη θεραπεία της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας καθώς έχει βρεθεί ότι μειώνει τη σοβαρότητα της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας, βελτιώνει τον κνησμό και την ποιότητα ζωής του ασθενούς (Keating, G. M., 2017).



Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η απρεμιλάστη δρα σε προγενέστερο σημείο στον φλεγμονώδη καταρράκτη από τους βιολογικούς παράγοντες που στοχεύουν τον TNF-α (π.χ. infliximab, adalimumab), την IL-12/23 (ustekinumab) ή την IL-17A (secukinumab, ixekizumab), με αποτέλεσμα την ευρεία ρύθμιση πολλαπλών φλεγμονωδών μεσολαβητών (Haber, S. L., et al., 2016). Ωστόσο, θεωρείται ότι έχει μικρότερο θεραπευτικό αποτέλεσμα από τα βιολογικά φάρμακα (Gossec, L., et al., 2016). Από την άλλη δεν έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης όπως οι βιολογικοί παράγοντες (Keating, G. M., 2017), αλλά οι πιο συχνές ανεπιθύμητες παρενέργειες που εμφανίζονται κατά τα αρχικά στάδια της θεραπείας και συνήθως επιλύονται με τη συνεχή θεραπεία είναι διάρροια, ναυτία, λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, ρινοφαρυγγίτιδα και πονοκέφαλος (Paul, C., et al., 2015, Papp, K., et al., 2015, Kavanaugh, A., et al., 2014, Cutolo, M., et al., 2016, Edwards, C. J., et al., 2016, Wells, A., et al., 2014).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μέχρι σήμερα δεν έχει δημοσιευτεί κάποια φαρμακογενετική μελέτη που αφορά την απόκριση στη θεραπεία με απρεμιλάστη. Όμως, μια τέτοια μελέτη καθίσταται αναγκαία, γιατί η απρεμιλάστη αποτελεί θεραπεία δεύτερης γραμμής για τη ψωρίαση με καλή απόκριση και λίγες παρενέργειες. Τέλος, αλλά πολύ σημαντικό είναι ότι η απρεμιλάστη μπορεί να συμβάλλει στη ρύθμιση πολλαπλών φλεγμονωδών μεσολαβητών, γιατί σε σύγκριση με τις μέχρι τώρα διαθέσιμες θεραπείες δρα σε προγενέστερο σημείο στον φλεγμονώδη καταρράκτη.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος της φαρμακογενετικής μελέτης που ελέγχει τη συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα γονίδια της φωσφοδιεστεράσης 4 με την απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με απρεμιλάστη, που αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου. Ειδικότερα, ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η γονοτύπηση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs172043 (G/A) του γονιδίου *PDE4C* σε 37 ασθενείς με ψωρίαση οι οποίοι λάμβαναν θεραπεία με απρεμιλάστη καθώς και η βελτιστοποίηση της τεχνικής ανάλυσης καμπύλης τήξης υψηλής διακριτικότητας (HRM) με βάση την οποία έγινε ο προσδιορισμός του γονοτύπου των δειγμάτων.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

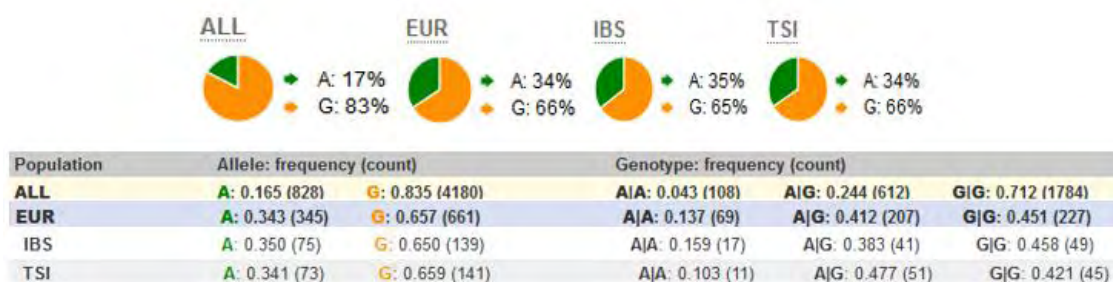
#### 3.1 Δείγματα μελέτης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 37 δείγματα αίματος, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε ερυθρά αιμοσφαίρια, ασθενών με ψωρίαση που λαμβάνουν αγωγή με απρεμιλάστη. Τα δείγματα προέρχονται από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (συνεργασία με Επικ. Καθηγήτρια Δερματολογία Ε. Ζαφειρίου και Καθηγήτρια Δερματολογίας Ρουσσάκη-Σούλτσε Α-Β).

#### 3.2 Στοιχεία του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (single-nucleotide polymorphism - SNP) rs172043 του γονιδίου *PDE4C*

Η παρούσα εργασία εστιάζει στην μελέτη του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού rs172043. Ο πολυμορφισμός αυτός χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 19 στη θέση chr19:18,240,864 στο γονίδιο *PDE4C* (βάση δεδομένων dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, GRCh38.p12). Το SNP rs172043 εντοπίζεται στο πρώτο ιντρονίο του γονιδίου. Επειδή το γονίδιο υφίσταται εναλλακτική συρραφή, αυτό το SNP εντοπίζεται στο πρώτο ιντρονίο του πρόδρομου μεταγράφου "ENST00000594617.7" (Ensembl, <https://www.ensembl.org> και NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), αλλά σε άλλα μικρότερα μετάγραφα στο 5' που έχουν απομονωθεί (Oberholte, R., et al., 1997) είναι ανοδικά (genic upstream transcript variant) (βάση δεδομένων NCBI).

Για τον πολυμορφισμό rs172043 οι δύο πιθανές παραλλαγές νουκλεοτιδίων είναι Α ή Γ και η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται κατά μέσο όρο παγκοσμίως είναι 0,165 και 0,835 αντίστοιχα (**Εικόνα 5**). Στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς η συχνότητα για το σπάνιο αλληλόμορφο (Minor allele Frequency - MAF) είναι 0,343. Εντός του πληθυσμού αυτού ενδιαφέρον έχει η MAF στους Ιταλούς και τους Ισπανούς, διότι αυτοί οι πληθυσμοί φαίνεται πως έχουν παρόμοια γενετική δομή με τους Έλληνες για τους οποίους δεν υπάρχουν δεδομένα στη βάση δεδομένων Ensembl. Στην **Εικόνα 5** απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων παγκοσμίως, στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, στους Ισπανούς και στους Ιταλούς.



**Εικόνα 5. Συχνότητα του πολυμορφισμού rs172043 παγκοσμίως (ALL), στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (European-EUR), στους Ισπανούς (Iberian populations in Spain-IBS) και στους Ιταλούς (Toscani in Italy-TSI).** Απεικονίζεται η συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου σε σύνολο ατόμων 5008 για ALL, 1006 για EUR και 214 τόσο για IBS όσο και για TSI. Στον πίνακα αναφέρεται η συχνότητα γονοτύπου για αυτό τον πολυμορφισμό (A|A: ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο, A|G: ετερόζυγο, G|G: ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο) σε σύνολο ατόμων 2504 για ALL, 503 για EUR και 107 τόσο για IBS όσο και για TSI (από τη βάση δεδομένων Ensembl).

### 3.3 Απομόνωση DNA

Ο σκοπός της τεχνικής αυτής είναι να διαχωρίσει το DNA από όλα τα συστατικά του κυττάρου. Η ποσότητα, η ποιότητα, η ακεραιότητα και η καθαρότητα του DNA, που θα απομονωθεί, θα επηρεάσουν άμεσα τα αποτελέσματά της μελέτης.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την απομόνωση του DNA, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ανάλογα με το αρχικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί, το είδος του DNA που θα απομονωθεί, την μοριακή κατάσταση του απομονωμένου DNA αλλά και από το αν η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί με απλά χημικά αντιδραστήρια, με εμπορικά διαθέσιμα κιτ ή με χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων. Όλες, όμως, οι μέθοδοι απομόνωσης πυρηνικού DNA ακολουθούν τα παρακάτω κοινά στάδια:

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα.
2. Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες με την επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων που τις αποικοδομούν.
3. Διαχωρισμός του DNA από τα διάφορα είδη RNA με τη βοήθεια ενζύμων-ριβονουκλεασών.
4. Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα που περιέχει αιθανόλη.
5. Ανασύσταση του DNA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης.

Το DNA μπορεί να απομονωθεί από οποιοδήποτε βιολογικό υλικό που περιέχει εμπύρηννα κύτταρα. Στους ανθρώπους, η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής ποιότητας και συγκέντρωσης.

Στην παρούσα εργασία η απομόνωση του DNA έγινε από δείγματα αίματος πλούσια σε ερυθροκύτταρα και όχι σε λευκά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να απομονωθεί DNA σε μεγάλη συγκέντρωση από όλα τα δείγματα. Όσον αφορά την μέθοδο της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε το κιτ PureLink® Genomic DNA Mini Kit K1820-02 της invitrogen. Το κιτ αυτό βασίζεται στην επιλεκτική και παροδική πρόσδεση των μορίων DNA σε μια μεμβράνη με πυρίτιο που βρίσκεται στο εσωτερικό της στήλης απομόνωσης παρουσία χατροπικών αλάτων. Σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA έχουν μεγάλη συγγένεια προς τα θετικά φορτισμένα μόρια του πυριτίου της μεμβράνης με αποτέλεσμα να συγκρατούνται πάνω σε αυτή. Αντίθετα, η δέσμευση αυτή αναστρέφεται παρουσία ενός ελαφρά αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος που οδηγεί στην έκλυση του DNA από τη μεμβράνη.

Η διαδικασία απομόνωσης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Τα αντιδραστήρια που παρέχονται με το συγκεκριμένο κιτ είναι: α) Πρωτεΐνάση K (πρωτεάση σερίνης) (20 mg/ml) → Δρα έναντι διαφόρων πρωτεϊνών του κυττάρου με αποτέλεσμα την απομάκρυνση αυτών. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της κυμαίνεται από 50°C έως 70°C. Επίσης, με την προσθήκη της απενεργοποιούνται οι ενδογενείς νουκλεάσες (DNAσες) του κυττάρου, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. β) RNase A (20 mg/ml σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) → Συμβάλλει στην αποικοδόμηση του RNA που υπάρχει στο δείγμα. γ) PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer → Χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων του δείγματος. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει ανιονικά απορρυπαντικά το πιο συχνό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate - SDS) που προκαλεί τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών χάρη στη

λιποδιαλυτή δράση του. Επίσης, το SDS δρώντας ως αποδιατακτικός παράγοντας διαταράσσει τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αποδιατάσσει προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Επιπλέον, στο ρυθμιστικό διάλυμα περιέχονται χαοτροπικά άλατα που βοηθούν στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και την εκχύλιση του DNA. Αυτό συμβαίνει, διότι τα χαοτροπικά άλατα διασπών τις ασθενείς αλληλεπιδράσεις οδηγώντας στη μείωση της διαλυτότητας του DNA στο νερό καθώς και στην αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο προάγεται και η πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου. δ) Wash Buffer 1 και 2 (ρυθμιστικά διαλύματα για την έκπλυση) → Βοηθούν στην περαιτέρω απομάκρυνση αλάτων, τμημάτων πρωτεϊνών και μικρών RNA, ενώ το DNA παραμένει προσδεμένο στη μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται, διότι περιέχουν αιθανόλη, που βοηθά στη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης. Μέσω των δύο αυτών διαδοχικών εκπλύσεων αυξάνεται και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA. ε) PureLink Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) - διάλυμα έκλουσης → Αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος το οποίο μειώνει τη συγγένεια του DNA με την μεμβράνη πυριτίου βοηθώντας έτσι στην απελευθέρωση του DNA από αυτή. Επιπλέον, το EDTA που περιέχεται στο διάλυμα έκλουσης αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών, που είναι ένζυμα που καταστρέφουν τα νουκλεϊκά οξέα. Όσον αφορά τον όγκο που προστίθεται από το διάλυμα έκλουσης εξαρτάται από το πόσο πυκνό ή αραιό επιθυμείται να είναι το DNA που θα απομονωθεί. Στο συγκεκριμένο πείραμα όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος πλούσια σε ερυθροκύτταρα και όχι σε λευκά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να απομονωθεί DNA σε μεγάλη συγκέντρωση. Λόγω αυτού ο όγκος του διαλύματος έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30μl, ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατόν πιο πυκνό γίνεται μετά την απομόνωση.

Το απομονωμένο DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C στην περίπτωση άμεσης επεξεργασίας ή στους -20°C όπου μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, διότι είναι εξαιρετικά σταθερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης, γίνεται ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA, με σκοπό να ελεγχθεί το μέγεθος, η ακεραιότητα, η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται συνήθως με φωτομέτρηση. Με την μέθοδο αυτή ταυτόχρονα ελέγχεται και η καθαρότητα του DNA από προσμίξεις. Ο ποιοτικός προσδιορισμός για το μέγεθος και την ακεραιότητα γίνεται με την βοήθεια της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα.

### 3.4 Ποσοτικοποίηση του DNA φασματοφωτομετρικά

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απομόνωσης του DNA η καθαρότητα και η ποσότητα του απομονωμένου DNA μπορούν να αξιολογηθούν με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για κάθε μόριο υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος ( $\lambda_{max}$ ) στο οποίο εμφανίζει την μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα το DNA, αλλά και το RNA, εμφανίζουν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Στο συγκεκριμένο πείραμα η φωτομέτρηση του απομονωμένου DNA έγινε με τη χρήση του φωτομέτρου Quawell.

Το Quawell είναι ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους (UV), μικρού όγκου που λειτουργεί με ειδικά συστήματα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες λόγω επιφανειακής τάσης, χωρίς τη χρήση κυψελίδων. Επίσης, παρέχει

την δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρών ποσοτήτων (1,5-2,5μl) από το δείγμα σε ελάχιστο χρόνο. Για την καλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα συνιστάται η χρήση 2-2,5μl από το δείγμα. Τέλος, με αυτού του είδους τα φασματοφωτόμετρα επιτρέπεται η ακριβής μέτρησης διαλυμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από 1ng/μl έως 4000ng/μl.

Ο χειρισμός του Quawell γίνεται ως εξής: αρχικά, γίνεται μηδενισμός της συσκευής με το διάλυμα έκλουσης του DNA. Έπειτα, τοποθετείται μία σταγόνα DNA από το δείγμα (στην παρούσα εργασία χρήση 2μl) στην ειδική βάση (κάτω επιφάνεια) όταν ο βραχίονας της συσκευής είναι ανοιχτός. Όταν ο βραχίονας κλείσει και έρθουν σε επαφή οι δύο επιφάνειες γίνεται η μέτρηση του δείγματος. Μετά από κάθε μέτρηση, πρέπει να σκουπιστεί η πάνω και κάτω επιφάνεια απαλά με χαρτί. Στο τέλος όλης της διαδικασίας γίνεται πλύση με καθαρό νερό και μετά πρέπει να σκουπιστούν απαλά με χαρτί και οι δύο επιφάνειες.

Το Quawell εκτελεί ταυτόχρονα μία μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm στην οποία το DNA παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση και μία μέτρηση στα 280nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνες. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) δίνει πληροφορίες για την καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Γενικά ένας λόγος με τιμή μεγαλύτερη από 1,7 έως 2 θεωρείται ικανοποιητικός. Στην περίπτωση που ο λόγος είναι μικρότερος από 1,7 τότε πιθανόν υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Από την άλλη, όταν ο λόγος έχει τιμή μεγαλύτερη από 1,8 αποτελεί ένδειξη πρόσμιξης με RNA. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων καταγράφονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μηχάνημα.

### 3.5 Ποσοτικοποίηση του DNA με φασματοφθορισμομετρία

Μία εναλλακτική μέθοδος για την εκτίμηση της ποσότητας του απομονωμένου DNA αποτελεί η μέθοδος της φασματοφθορισμομετρίας. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα που έχουν ορισμένα άτομα ή μόρια, όταν απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, να εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος (φαινόμενο φθορισμού). Η μέθοδος της φασματοφθορισμομετρίας σε σύγκριση με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας είναι πολύ πιο ευαίσθητη και διαθέτει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες προσδένονται εκλεκτικά στο μόριο που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (DNA ή RNA) και φθορίζουν μόνο όταν είναι προσδεμένες σε αυτό. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των φθορίζουσων χρωστικών είναι ότι δεν δεσμεύονται στο αποδιαταγμένο DNA και RNA. Λόγω του τελευταίου η συγκέντρωση που υπολογίζεται αντανακλά σε μεγαλύτερο βαθμό την πραγματική συγκέντρωση του «λειτουργικού» DNA ή RNA του δείγματος. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται επίσης και η μικρή αρχική ποσότητα δείγματος που απαιτείται (1-10 μl), όπως και το ότι δεν απαιτείται η χρήση τυφλού. Από την άλλη μειονέκτημα είναι ότι δεν παρέχονται πληροφορίες για τυχόν προσμίξεις από άλλες ουσίες, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες και ότι σαν μέθοδος έχει υψηλό κόστος. Στο συγκεκριμένο πείραμα η φθορισμομετρία έγινε με τη χρήση του kit της Invitrogen™ - Qubit™ dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit.

Το kit Qubit™ dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit καθιστά τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA εύκολο και ακριβή. Αναλυτικότερα ο προσδιορισμός είναι επιλεκτικός για δίκλωνο DNA (dsDNA) έναντι RNA και είναι ακριβής για αρχικές συγκεντρώσεις δείγματος από 100 pg / μl έως 1000 ng / μl. Όσον αφορά την αρχική ποσότητα του δείγματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί είναι αποδεκτός

οποιοσδήποτε όγκος από 1-20 μl. Όσον αφορά την ίδια τη διαδικασία, συνήθως σε κάθε ανάλυση πριν την μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται μία βαθμονόμηση με τη χρήση των δύο πρότυπων δειγμάτων (0 ng/μl και 100 ng/μl) που περιέχονται στο κιτ. Με βάση αυτά δημιουργείται μια καμπύλη που χρησιμοποιείται από το φθορισμόμετρο Qubit για να παραχθούν τα δεδομένα συγκέντρωσης για τα άγνωστα δείγματα. Σημαντικό για τις αναλύσεις Qubit είναι ο προσδιορισμός να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, διότι τυχόν διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια της ανάλυσης. Εξίσου σημαντική είναι και η επώαση των δειγμάτων μετά την ανάμειξη τους με το διάλυμα εργασίας, ώστε να είναι δυνατόν να σημειωθεί ο μέγιστος φθορισμός της χρωστικής ουσίας. Η επώαση αυτή συμβάλλει και στο να παραμείνει το σήμα φθορισμού σταθερό έως και τρεις ώρες. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιούνται ειδικοί σωλήνες και συγκεκριμένα σωλήνες ανάλυσης Qubit® (Cat. no. Q32856) ή σωλήνες Axygen® PCR-05-C (part no. 10011-830).

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων είναι η ακόλουθη:

1. Δημιουργία διαλύματος εργασίας αραιώνοντας το αντιδραστήριο Qubit® dsDNA BR 1: 200 με ρυθμιστικό διάλυμα Qubit® dsDNA BR.

Ο τελικός όγκος σε κάθε σωλήνα πρέπει να είναι 200μl. Και συγκεκριμένα κάθε σωλήνας πρότυπου απαιτεί 190μl διαλύματος εργασίας και κάθε σωλήνας δείγματος οποιοδήποτε όγκο από 180 έως 199μl. Για την παρασκευή επαρκούς ποσότητας διαλύματος εργασίας θεωρήθηκε ότι για κάθε σωλήνα χρειάζεται από το διάλυμα εργασίας ~ 200μl.

2. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος εργασίας σε κάθε σωλήνα.
3. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας πρότυπου και δείγματος στους αντίστοιχους σωλήνες, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200μl όπως προαναφέρθηκε.
  - Για πρότυπα : 10μl
  - Για δείγματα : 1 έως 20μl (ανάλογα τον όγκο του διαλύματος εργασίας)

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl από κάθε δείγμα, άρα ο όγκος του διαλύματος εργασίας για κάθε δείγμα ήταν 198μl.

4. Vortex για 2-3 δευτερόλεπτα
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min
6. Μέτρηση των πρότυπων και των δειγμάτων με τη χρήση του φθορισμόμετρου Qubit® 2.0.

Ο χειρισμός του Qubit® 2.0 γίνεται ως εξής: αρχικά, πρέπει να επιλεγθεί το είδος του νουκλεϊκού οξέος για το οποίο θα γίνει ο προσδιορισμός (στο πείραμα DNA) και μετά ο τύπος της ανάλυσης που στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν dsDNA Broad Range. Στη συνέχεια ακολουθεί η μέτρηση των δύο πρότυπων ξεκινώντας με αυτό με τη συγκέντρωση 0 ng/μl. Όταν ολοκληρωθεί και η ανάγνωση του πρότυπου 100 ng/μl στην οθόνη του μηχανήματος εμφανίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης με βάση την οποία θα βρεθούν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων. Μετά στο θάλαμο ανάγνωσης δείγματος τοποθετούνται ένα, ένα τα δείγματα DNA που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν. Κάθε φορά που ολοκληρώνεται η ανάγνωση εμφανίζεται στην οθόνη η συγκέντρωση του δείγματος σε μg/mL. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που έχει το δείγμα μετά την αραιώσή του με το διάλυμα εργασίας. Το φθορισμόμετρο Qubit® 2.0 έχει το κατάλληλο λογισμικό με το οποίο μπορεί να υπολογίζει την αρχική συγκέντρωση του δείγματος με βάση τον όγκο του δείγματος

που χρησιμοποιήθηκε. Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο υπολογισμός πρέπει μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης του δείγματος να επιλεγεί στην οθόνη του φθορισμόμετρου “ Calculate Stock Conc. ”. Κατόπιν, γίνεται επιλογή του όγκου του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, είναι δυνατόν να αλλάξει η μονάδα μέτρησης πατώντας πάνω στο  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε το  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Τα βήματα αυτά δεν χρειάζεται να εκτελούνται μετά την μέτρηση κάθε δείγματος, αλλά αρκεί να γίνουν μόνο στο πρώτο. Για τα υπόλοιπα δείγματα το φθορισμόμετρο αυτόματα εμφανίζει την αρχική συγκέντρωση του δείγματος, αλλά σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Για να εμφανιστεί η συγκέντρωση στη επιθυμητή μονάδα επιλέγεται το “ Calculate Stock Conc. ” (βήμα το οποίο πρέπει να γίνεται σε κάθε δείγμα).

### 3.6 Ποιοτικός έλεγχος του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία τα φορτισμένα μακρομόρια (όπως το DNA) κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια τα οποία διαφέρουν ως προς το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος και τη δομή τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες σε ηλεκτρικό πεδίο και έτσι είναι δυνατό να διαχωριστούν. Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για τον ποιοτικό προσδιορισμό των μακρομορίων αλλά είναι δυνατόν να προσδιοριστεί αδρά και η ποσότητα τους, η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται.

Για την μελέτη και το διαχωρισμό μορίων DNA το πήκτωμα συχνά κατασκευάζεται από ένα πολυσακχαρίτη που ονομάζεται αγαρόζη. Καθώς, τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα, λόγω των φωσφορικών ομάδων τους, κινούνται διαμέσου των πόρων του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου και διαχωρίζονται με βάση μόνο το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους. Στην περίπτωση των γραμμικών μορίων, η κίνηση γίνεται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού τους βάρους. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που πρόκειται να διαχωριστούν χρησιμοποιείται και διαφορετική πυκνότητα στο πήκτωμα αγαρόζης, η οποία κυμαίνεται από 0,8 έως 2,5%.

Τα μόρια διαφορετικού μήκους, καθώς μετακινούνται, διαχωρίζονται σε ζώνες. Κάθε ζώνη είναι χαρακτηριστική και αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μορίων DNA όμοιου μεγέθους. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σύνδεσης του DNA με χρωστικές που προστίθενται στο πήκτωμα κατά την παρασκευή του. Οι χρωστικές έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στην διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA. Συνεπώς, εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) τα φθορίζοντα σύμπλοκα εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες. Επιπλέον, με τη βοήθεια ενός μάρτυρα (ladder) γνωστών μοριακών μεγεθών μπορεί να εκτιμηθεί το μέγεθος των μορίων DNA μίας ζώνης.

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή του πηκτώματος είναι:

- **Αγαρόζη** σε συγκέντρωση τέτοια που να οδηγεί σε πήκτωμα πυκνότητας κατάλληλο για τα μόρια DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε 2,5% για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα** που διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Χρησιμοποιήθηκε TAE (Tris acetate EDTA) 1X (40mM Tris, 20mM οξικό οξύ, 1mM EDTA pH=8).



- **Χρωστική δέσμευσης:** χρήση της Xpert Green DNA stain 1ml (20.000X) της grisp.
- **Διάλυμα φόρτωσης (gel loading buffer)** που περιέχει μια χρωστική, συνήθως κυανό του ξυλενίου (Xylene cyanol) ή/και μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue), καθώς και μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη). Ανάλογα τη χρωστική, η οποία μετακινείται μαζί με το DNA ορισμένου μεγέθους, χρησιμεύει στην αξιολόγηση της μετακίνησης των δειγμάτων στο πήκτωμα ώστε να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση. Στο συγκεκριμένο πείραμα στην περίπτωση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε το κυανό του ξυλενίου (Xylene cyanol). Όσον αφορά την γλυκερόλη, αυτή προσδίδει μεγάλη πυκνότητα στο δείγμα και δεν το αφήνει να βγει έξω από το πηγαδάκι και να διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη δημιουργία του πηκτώματος είναι η εξής:

Αναμιγνύεται αгарόζη σε σκόνη (1,25g για αгарόζη 2,5%) με 50ml TAE 1X. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη και το διάλυμα να είναι διαυγές. Στη συνέχεια, ψύχεται το μίγμα με συνεχή ανάδευση στη βρύση και ακολούθως προστίθονται 4μl από τη χρωστική. Μετά, το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο στο οποίο έχουν ήδη τοποθετηθεί οι χτένες που δημιουργούν τα «πηγαδάκια» στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα DNA. Όταν σταθεροποιηθεί το πήκτωμα (~15-20 min), αφαιρείται το χτενάκι και το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X σε ποσότητα τέτοια που να καλύπτεται το πήκτωμα. Ακολουθεί η εισαγωγή των δειγμάτων στις θέσεις του πηκτώματος, αφού πρώτα προηγηθεί η ανάμιξη μιας ποσότητας DNA (στην παρούσα εργασία 5μl προϊόντος PCR από τα συνολικά 50μl) με το κατάλληλο διάλυμα φόρτωσης (6X με ξυλένιο, 30%w/v γλυκερόλη και 0,25%w/v κυανό ξυλενίου). Για τα 5μl προϊόντος PCR πρέπει να χρησιμοποιηθεί ποσότητα όχι < 3μl από το διάλυμα φόρτωσης, ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι μεγαλύτερη από 6X για να προσδίδει μεγάλη πυκνότητα στο δείγμα και να μην το αφήνει να διαχυθεί. Επίσης, σε κάποιο πηγαδάκι, προστίθεται και ο μάρτυρας (ladder) μοριακών μεγεθών. Τέλος, ρυθμίζεται η τάση στα 150V και μετά από περίπου 15 min είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα, αφού τοποθετηθεί στη συσκευή υπεριώδους φωτός.

### 3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μια μέθοδος της μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκε από τον Karry Mullis το 1983. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος, σε μία in vitro ενζυμική αντίδραση. Η PCR βασίζεται στη χρήση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, της Taq DNA πολυμεράσης, που έχει την ικανότητα να συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον κλώνο του πρότυπου DNA. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει ένα νουκλεοτίδιο μόνο σε μια προϋπάρχουσα 3'-OH ομάδα, απαιτείται η χρήση μιας μικρής αλληλουχίας εκκινητή (primer). Αυτή η απαίτηση καθιστά δυνατή την οριοθέτηση της αλληλουχίας του DNA – στόχου που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με ένα ζεύγος εκκινητών. Στην PCR εκτός από τους εκκινητές, την Taq DNA πολυμεράση και το εκμαγείο DNA, χρειάζονται επίσης και: τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP και dGTP), ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη ρύθμιση του pH και τα ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) που απαιτούνται για την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης (μερικές φορές περιλαμβάνονται στο ρυθμιστικό διάλυμα).

Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση των δύο εκκινητών που υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του DNA - στόχου. Η PCR πραγματοποιείται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών σταδίων. Τα στάδια αυτά είναι:

**1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA**

Το DNA – στόχος επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (92-95°C), ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δίκλωνων αλυσίδων. Τα μονόκλιωνα μόρια θα χρησιμεύσουν ως πρότυπα για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση

**2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στις αλληλουχίες του DNA – στόχου**

Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου η αντίδραση ψύχεται στους 50 - 65°C ανάλογα με το μέγεθος και την αλληλουχία των εκκινητών. Αυτό επιτρέπει στους εκκινητές να συνδεθούν με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες του DNA – στόχου. Ο ένας είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται ανοδικά της αλληλουχίας-στόχου στον ένα κλώνο του DNA και αναφέρεται ως εμπρόσθιος (forward) εκκινητής και ο άλλος είναι συμπληρωματικός με την περιοχή που βρίσκεται καθοδικά της αλληλουχίας στόχου στον άλλον κλώνο του DNA και αναφέρεται ως ανάστροφος (reverse) εκκινητής. Οι εκκινητές είναι μονόκλιωνα μόρια DNA μήκους 20-30 νουκλεοτίδια.

**3. Επέκταση των εκκινητών**

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο ενός κύκλου της PCR η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-78°C. Συνήθως, ο πολυμερισμός του DNA γίνεται στους 72°C που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq DNA πολυμεράσης. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο προέρχεται από το *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφιλό βακτήριο που ζει σε θερμές πηγές. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους δύο εκκινητές σύμφωνα με το συμπληρωματικό DNA – στόχο προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η PCR ολοκληρώνεται μετά από 30–40 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου. Τα μόρια DNA που συντίθενται σε κάθε κύκλο λειτουργούν ως πρότυπα για τους επόμενους κύκλους. Τις περισσότερες φορές μετά το τέλος των κύκλων της PCR περιλαμβάνεται ακόμη ένα στάδιο τελικής επέκτασης των εκκινητών, που καλύπτει κενά με ελεύθερα νουκλεοτίδια.

Η διαδικασία της PCR διεξάγεται σε ειδικές αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμικούς κυκλοποιητές, που είναι προγραμματισμένες να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία κατά τα διάφορα στάδια της PCR, ώστε να επωάζουν την αντίδραση στις κατάλληλες θερμοκρασίες και για τα κατάλληλα χρονικά διαστήματα.

Βασικό μέρος μιας PCR αποτελεί η διάγνωση της επιμόλυνσης που επιτυγχάνεται με τη χρήση αρνητικού μάρτυρα (negative control). Το τελευταίο πρόκειται για ένα επιπλέον δείγμα που ετοιμάζεται μαζί με τα υπόλοιπα και περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA – στόχο και στη θέση αυτού έχει ίσο όγκο νερού.

Η PCR γίνεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης καθώς και η ποσότητα του κάθε συστατικού της αντίδρασης εξαρτάται από το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50μl. Στον **Πίνακα 3** αναγράφονται τα αντιδραστήρια μιας PCR καθώς και ο όγκος που απαιτείται για καθένα από αυτά.

<b>Πίνακας 3: Τα αντιδραστήρια μιας PCR και οι ποσότητές τους</b>	
<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος ανά αντίδραση (50μl)</b>
10X ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο (KAPA Taq Buffer A (10X), 1,5mM Mg <sup>2+</sup> at (1X))	5μl
dNTPs (10mM)	1μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
Ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	1μl
Kappa taq (5units/μl)	0,2μl
DNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση (συνήθως 1μl)
ddH <sub>2</sub> O	Μέχρι τα 50μl (για 1μl DNA απαιτείται 40,8μl)

Αν χρησιμοποιηθούν περισσότερα του ενός δείγματα, τότε παρασκευάζεται ένα master mix που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το DNA, που είναι διαφορετικό από δείγμα σε δείγμα, σε ποσότητα πολλαπλάσια τόσες φορές όσα είναι τα δείγματα συν 10% επιπλέον για τυχόν μικροαπώλειες λόγω λαθών στο πιπιτάρισμα.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την προετοιμασία της PCR είναι:

1. Σε σωληνάρια τύπου erpendorf τοποθετείται το DNA.
2. Παρασκευάζεται το master mix ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Προσθέτοντας τελευταίο το ένζυμο που είναι στην κατάψυξη.
3. Ισόποσα σε κάθε σωληνάριο του βήματος 1 προστίθενται 49μl από το master mix, αφού έχει προηγηθεί ανάδευση αυτού.
4. Πραγματοποιείται ανάδευση με πιπιτάρισμα.
5. Τοποθετούνται τα δείγματα στον θερμικό κυκλοποιητή και επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο πείραμα απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακα 4**).

<b>Πίνακας 4: Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή</b>			
<b>Βήματα</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Αριθμός κύκλων</b>
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	35 κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C	40 sec	
Υβριδοποίηση εκκνητών	Ta <sup>[1]</sup>	40 sec	
Επέκταση	72°C	40 sec	
Τελική επέκταση	72°C	10 min	
Διατήρηση	4°C	∞	

<sup>[1]</sup> Είναι η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκνητών και εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους. Κατά κανόνα η PCR πραγματοποιείται σε θερμοκρασία υβριδισμού όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θερμοκρασία τήξεως (T<sub>m</sub>) των εκκνητών και όχι χαμηλότερη από T<sub>m</sub> - 5°C. Ta = T<sub>m</sub> - 5°C = [2(A+T) + 4(G+C)] - 5°C (εμπειρικός υπολογισμός).

### 3.8 Η αλληλουχία του ζεύγους εκκνητών για τον πολυμορφισμό rs172043

Οι εκκνητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs172043 είναι οι εξής:

- **Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward), F6:**

Η αλληλουχία του είναι 5'-TCCACAACACGAGTCAGAGG-3' με θερμοκρασία τήξης (Tm) 59,4°C.

- **Ανάστροφος εκκινητής (Reverse), R6:**

Η αλληλουχία του είναι 5'-CGGAGAACGGATGTGAGTTG-3' με θερμοκρασία τήξης (Tm) 59,4°C.

Οι πληροφορίες για το ζεύγος των εκκινητών προέρχονται από το ειδικό πιστοποιητικό ανάλυσης της εταιρείας. Συνήθως, όμως η θεωρητική Tm δεν είναι κατάλληλη και εκτιμάται εμπειρικά με βάση τον τύπο  $Tm = [2(A+T) + 4(G+C)]$  που ισούται με 62°C. Έτσι, πρέπει να δοκιμάζονται διάφορες θερμοκρασίες υβριδισμού (όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θεωρητική θερμοκρασία τήξεως (Tm) των εκκινητών και όχι χαμηλότερη από  $Tm - 5^\circ C$ ) στο στάδιο της υβριδοποίησης.

Από τη βάση δεδομένων NCBI η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs172043 (φαίνεται με κόκκινο) απεικονίζεται στην **Εικόνα 6** [αφορά τον reverse complement κλώνο του positive κλώνου (5' > 3') που δίνεται στη βάση δεδομένων].

```
TCAGGTGCCC CTGGGAAAGG
GTGGGGACAA GTTGTGCTCA AATGCGGGGA ACAGTCCTAG AAGGATGAGA TCTGAGCGTG
GCTCAAGCCC CCAGCTGTGT GACTCCAGC AAGCAGGTCA TTTTCTCTCC AAGCTTTGAT
GTCTTCCTCC ACAACACGAG TCAGAGGGCC CTCCACTCAT AGGCAAGGAA ATGAGCTATG
[T/C]
TGCATCCCTT ACACACACAG
AAGTTCAAGT TCAACTCACA TCCGTTCTCC GCACCCTCTT CCTCCACCC CACTTTGCC
TGGCTCTGGT CCTGATTAGC AGCATGGTCT TGGACCTCAG TTTCCCATTT TTTTCTTGAG
ACGTAGTCTC GCTCTGTTGC CAGGCTGGAG TGCAGTGGCA TGATCTCGGC TCACTGCAAC
```

**Εικόνα 6.** Η αλληλουχία του τμήματος του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs172043.

Στην **Εικόνα 6** οι εκκινητές επισημαίνονται με έντονα γράμματα και υπογράμμιση και παρατηρείται ότι ο πρώτος αντιστοιχεί στον forward και ο δεύτερος στον reverse (η αλληλουχία του είναι η reverse complement). Το μέγεθος του προϊόντος PCR είναι 105bp.

### 3.9 Βελτιστοποίηση της PCR

Παρότι η τεχνική της PCR είναι μια απλή διαδικασία, στην πράξη πολλές φορές παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες. Από τα πιο συχνά προβλήματα που εμφανίζονται είναι η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος σε ελάχιστη ποσότητα ή η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων όπως τα διμερή των εκκινητών ή ακόμα και να μην παρατηρηθεί καθόλου ενίσχυση. Για τη βελτιστοποίηση μιας PCR χρειάζεται να ρυθμιστούν διάφοροι παράγοντες. Από τους πιο βασικούς είναι η επιλογή της ιδανικής θερμοκρασίας σύνδεσης των εκκινητών και η συγκέντρωση του μαγνησιού ( $Mg^{2+}$ ). Στην παρούσα εργασία η βελτιστοποίηση της μεθόδου PCR πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αρχικής PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού, που ονομάζεται Gradient PCR. Ο θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει 96 θέσεις (12 στήλες με 8 θέσεις η κάθε μία) και ανά δύο στήλες μπορεί να ελεγχθεί μια θερμοκρασία. Έγινε έλεγχος για θερμοκρασία υβριδισμού τόσο μικρότερη όσο και μεγαλύτερη από την θεωρητική θερμοκρασία τήξης. Συγκεκριμένα οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν 58°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C και 64°C. Στο τέλος έγινε έλεγχος των προϊόντων με

ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπου με βάση τις ζώνες που εμφανίζονται μπορεί να οριστεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα.

### 3.10 Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism – SSCP)

Μία μέθοδος για την ταυτοποίηση σημειακών μεταλλαγών τμημάτων DNA, είναι η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Strand Conformational Polymorphism, SSCP). Ωστόσο, δεν μπορεί να ανιχνεύσει την ακριβή αλλαγή του νουκλεοτιδίου και γι' αυτό απαιτείται να ακολουθήσει και η αλληλούχηση του DNA.

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι τα μονόκλινα τμήματα DNA μπορούν να διαχωριστούν σε ένα πήκτωμα σε μη αποδιατακτικές συνθήκες με τρόπο που εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Πιο συγκεκριμένα η SSCP στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει το μονόκλινο DNA να δημιουργεί δευτεροταγείς δομές, λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων του, οι οποίες εξαρτώνται από την αλληλουχία. Αυτό συνεπάγεται ότι μονόκλινα DNA που διαφέρουν ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο θα παρουσιάσουν διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε ένα μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου λόγω της διαφορετικής δευτεροταγής δομής που θα αποκτήσουν. Έτσι, με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να εντοπιστεί η μετάλλαξη.

Η ανάλυση SSCP περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Ενίσχυση του τμήματος DNA που περιλαμβάνει την προς μελέτη σημειακή μεταλλαγή μέσω της PCR.
2. Αποδιάταξη των προϊόντων της PCR.
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες.
4. Χρώση του πηκτώματος για την εμφάνιση των ζωνώσεων.

Πιο αναλυτικά η διαδικασία μετά το βήμα της PCR είναι: Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης που στην SSCP πρόκειται για πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε κάθετη ηλεκτροφόρηση. Επιπλέον, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα από αυτή της αγαρόζης, διότι μπορεί να διαχωρίσει ακόμα και τμήματα DNA που διαφέρουν μόνο σε μία βάση. Η διαχωριστική ικανότητα αυτής της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πηκτώματος και από την αναλογία ακρυλαμίδης προς δις-ακρυλαμίδη. Τα δύο τελευταία επηρεάζουν το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος που επιλέγεται με βάση το μέγεθος των τμημάτων του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί. Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 14% διότι το μέγεθος των προϊόντων PCR που μελετήθηκε με την SSCP ήταν μικρό και συγκεκριμένα ίσο με 105 bp.

Στον **Πίνακα 5** αναγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πηκτώματος καθώς και η ποσότητα που απαιτείται για καθένα από αυτά, ώστε η συγκέντρωση να είναι 14%. Σε διαφορετική συγκέντρωση πηκτώματος αλλάζει μόνο η ποσότητα της ακρυλαμίδης και της δις-ακρυλαμίδης.

<b>Πίνακας 5: Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 14% και οι ποσότητες τους</b>	
<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα</b>
Ακρυλαμίδη	8,75gr
Δις-ακρυλαμίδη	0,22gr
γλυκερόλη 50%	6,25ml
TBE 10X (0,9M Tris, 0,9M βορικό οξύ, 20mM EDTA pH=8)	3,2ml
ddH <sub>2</sub> O	Προστίθεται έως 62,5ml
Τετρα-μεθυλ-εθυλεν-διαμίνη, TEMED	62,5μl
Υπερθεϊκό αμμώνιο, APS 20%	375μl

Πριν τη δημιουργία του μίγματος του πηκτώματος προετοιμάζεται η συσκευή παρασκευής αυτής. Όσον αφορά το μίγμα του πηκτώματος αυτό δημιουργείται ως εξής:

- Σε ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται όλα τα υλικά εκτός από το TEMED και το APS στον μαγνητικό αναδευτήρα.
- Φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί σε έναν ογκομετρικό σωλήνα το παραπάνω διάλυμα και προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 62,5ml.
- Μεταφέρεται το διάλυμα σε κωνική φιάλη και προστίθεται το TEMED και το APS, ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης.

Το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS το οποίο πυροδοτεί τον πολυμερισμό.

- Το διάλυμα περιχύνεται στο καλούπι, τοποθετούνται τα χτενάκια δημιουργίας πηγαδιών και χρειάζονται περίπου 40 min για να πήξει.

Μέχρι να σταθεροποιηθεί το πήκτωμα γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων, δηλαδή η αποδιάταξη των προϊόντων της PCR. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η χρήση του διαλύματος αποδιάταξης το οποίο περιέχει μια αποδιατακτική ουσία, το φορμαμίδιο, που βοηθάει στην αποδιάταξη των δίκλωνων προϊόντων της PCR. Επίσης, περιέχει δύο χρωστικές, το κυανό του ξυλενίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης οι οποίες αποτελούν χρήσιμους δείκτες κατά την ηλεκτροφόρηση, γιατί συμβάλλουν στην επιλογή του κατάλληλου χρόνου που πρέπει τα τμήματα του DNA να ηλεκτροφορηθούν στο πήκτωμα καθώς μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα.

Αναλυτικότερα η διαδικασία έχει ως εξής:

- Προσθήκη 10μl διαλύματος αποδιάταξης σε τόσα σωληνάρια τύπου erpendorf ειδικά για PCR όσα είναι τα δείγματα.
- Προσθήκη 10μl από το προϊόν της PCR του αντίστοιχου δείγματος.
- Αποδιάταξη με θέρμανση υπό την επίδραση της αποδιατακτικής ουσίας του διαλύματος αποδιάταξης.

Στην παρούσα εργασία το βήμα της αποδιάταξης με θέρμανση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός θερμικού κυκλοποιητή σε υψηλή θερμοκρασία για περίπου 10 λεπτά παρουσία του διαλύματος αποδιάταξης. Στον **Πίνακα 6** απεικονίζονται τα στάδια που εκτελέστηκαν από τον θερμικό κυκλοποιητή επιλέγοντας το πρόγραμμα της αποδιάταξης.

Πίνακας 6: Το πρόγραμμα της αποδιάταξης στον θερμικό κυκλοποιητή		
Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος
Πρώτο	95°C	2 min
Δεύτερο		
1 <sup>ο</sup> βήμα	97°C	2 min
2 <sup>ο</sup> βήμα	99°C	9 min
Διατήρηση	4°C	∞

Τα δείγματα ακολούθως τοποθετούνται αμέσως στον πάγο που αποτρέπει τον υβριδισμό μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών. Ωστόσο, τα μονόκλιωνα μόρια σταδιακά και κατά την ηλεκτροφόρηση δημιουργούν μερικώς ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, η κινητικότητα των μονόκλωνων μορίων δεν εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους αλλά και από την δομή τους, η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία του κάθε κλώνου.

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων και εφόσον το πήκτωμα έχει σταθεροποιηθεί γίνονται τα εξής τελικά βήματα:

- Τα χτενάκια αφαιρούνται
- Μεταφορά του πηκτώματος στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5X στο λουτρό
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια»
- Ρύθμιση του μηχανήματος στα 240V για περίπου 14 ώρες

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται χρώση του πηκτώματος με διάλυμα νιτρικού αργύρου, ώστε να εμφανιστούν οι ζώνες. Τα διαλύματα που πρέπει να παρασκευαστούν για τη διαδικασία της χρώσης είναι: **Διάλυμα 1<sup>ο</sup> – Διάλυμα οξικού οξέος** (0,5ml οξικού οξέος + 400ml ddH<sub>2</sub>O) → Με το διάλυμα αυτό επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα αποτρέποντας τη διάχυση αυτών. **Διάλυμα 2<sup>ο</sup> – Διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO<sub>3</sub>)** (0,2gr AgNO<sub>3</sub> + 200ml ddH<sub>2</sub>O) → Ο νιτρικός άργυρος συμβάλλει στον χρωματισμό του πηκτώματος καθώς συνδέεται με το DNA. **Διάλυμα 3<sup>ο</sup>** (3gr NaOH (υδροξείδιο του νατρίου) + 0,01gr NaBH<sub>4</sub> (βοροϋδρίδιο του νατρίου) + 1ml φορμαλδεΐδη + 200ml ddH<sub>2</sub>O) → Με το διάλυμα αυτό γίνεται η εμφάνιση των ζωνών μέσω της αντίδρασης της φορμαλδεΐδης με το νιτρικό άργυρο παρουσία βάσης. Οι ζώνες του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα. Συγκεκριμένα η διαδικασία της χρώσης του πηκτώματος ξεκινάει με το διάλυμα 1 με το οποίο πραγματοποιούνται δύο πλύσεις. Σε κάθε πλύση το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 200ml του διαλύματος 1 για 2 min και μετά από κάθε πλύση γίνεται και μια πλύση με ddH<sub>2</sub>O (ποσότητα ~ 200ml) πάλι για 2 min, αφού πρώτα έχει απομακρυνθεί το διάλυμα 1. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> στο οποίο το πήκτωμα επωάζεται για 15 min. Μετά, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O (ποσότητα ~ 200ml) διάρκειας 2 min η κάθε μία. Έπειτα, ακολουθεί επώαση στο διάλυμα 3 μέχρι την εμφάνιση των ζωνών σε ικανοποιητικό βαθμό. Ο χρόνος της επώασης δεν είναι συγκεκριμένος, αλλά για να είναι ορατές οι ζώνες δεν πρέπει να γίνει πολύ σκούρο το πήκτωμα. Τέλος, πραγματοποιείται μια σύντομη πλύση με ddH<sub>2</sub>O (ποσότητα ~ 200ml). Όλη η διαδικασία αυτή γίνεται πάνω σε αυτόματο αναδευτήρα. Επίσης, πρέπει σε κάθε στάδιο το διάλυμα ή το ddH<sub>2</sub>O που προστίθεται να καλύπτει το πήκτωμα. Μετά τη χρώση του πηκτώματος είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών πάνω σε επιφάνεια που διαθέτει φωτισμό. Κατά την ανάλυση αναμένονται δύο ζώνες για τα ομόζυγα άτομα και μέχρι τέσσερις για τα ετερόζυγα, ανάλογα με τα

είδη των δευτεροταγών δομών που θα σχηματίσουν. Η κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε μία αλυσίδα του μορίου του DNA.

Με την μέθοδο αυτή, λοιπόν, είναι δυνατόν να βρεθούν τα διάφορα πρότυπα για τον πολυμορφισμό που εξετάζεται. Επιπλέον, αφού ομαδοποιηθούν τα δείγματα που εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο, είναι δυνατόν να σταλθεί για αλληλούχηση μόνο ένα δείγμα για κάθε διαφορετικό πρότυπο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να επιβεβαιωθεί ποιο αλληλόμορφο σχετίζεται με κάθε πρότυπο. Τέλος, τα δείγματα στα οποία έχει επιβεβαιωθεί το πρότυπό τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες για περαιτέρω διαλογή και γονοτύπηση των άλλων δειγμάτων του πειράματος χρησιμοποιώντας άλλες μεθόδους.

### 3.11 Ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας

Η ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (High Resolution Melting analysis, HRM) είναι μια σχετικά νέα μέθοδος που ακολουθεί μετά από μια PCR. Παρέχει υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία, δίνοντας ταυτόχρονα την δυνατότητα ανάλυσης σε κλίμακα υψηλής απόδοσης. Η HRM χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του γονοτύπου SNPs, σάρωσης μεταλλάξεων και ανίχνευσης επιγενετικών διαφορών σε δείγματα δίκλωνου DNA. Η μέθοδος αυτή πρόκειται για ένα σύστημα κλειστού σωλήνα που εξασφαλίζει ότι όλη η αντίδραση και η ανάλυση πραγματοποιούνται χωρίς επιπλέον βήματα επεξεργασίας. Αυτό σημαίνει ότι μειώνονται οι πιθανότητες για μόλυνση, ένα πρόβλημα πολλών μεθόδων.

Η μέθοδος HRM βασίζεται στην ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA. Ειδικότερα χαρακτηρίζει δείγματα DNA σύμφωνα με τη συμπεριφορά μετουσίωσης τους, δηλαδή το πώς μεταβαίνουν από δίκλωνο (dsDNA) σε μονόκλωνο DNA (ssDNA) με αυξανόμενη θερμοκρασία και ανιχνεύει μικρές διαφορές στις ενισχυμένες αλληλουχίες DNA με PCR μόνο μέσω άμεσης τήξης. Επίσης, έχει τη δυνατότητα να διακρίνει τα δείγματα DNA ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας τους, το περιεχόμενο GC ή τη συμπληρωματικότητα των κλώνων. Οι διαφορές αυτές για να γίνουν αντιληπτές απαιτείται η χρήση ειδικών χρωστικών του DNA, θερμικοί κυκλοποιητές για PCR πραγματικού χρόνου καθώς και ένα εξελιγμένο λογισμικό ανάλυσης ειδικό για HRM.

Πιο αναλυτικά σε μια ανάλυση HRM πραγματοποιούνται τα κάτωθι γεγονότα:

Αρχικά, πραγματοποιείται ενίσχυση της περιοχής DNA στην οποία βρίσκεται το SNP με PCR, είτε συμβατική είτε πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής δέσμησης dsDNA. Στην παρούσα εργασία η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου έγινε με PCR πραγματικού χρόνου και η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η EvaGreen. Μετά την PCR ξεκινά η ανάλυση HRM η οποία περιλαμβάνει σταδιακή θέρμανση του προϊόντος PCR από περίπου 50°C έως περίπου 95°C. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, σε κάποιο σημείο επιτυγχάνεται η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του προϊόντος PCR με αποτέλεσμα οι δύο κλώνοι του DNA να διαχωριστούν. Στο αρχικό στάδιο της ανάλυσης HRM υπάρχει ισχυρός φθορισμός λόγω του μεγάλου αριθμού αντιγράφων του προϊόντος PCR. Καθώς, όμως, το προϊόν θερμαίνεται και οι δύο αλυσίδες του DNA τήκονται, η παρουσία δίκλωνου DNA μειώνεται και, επομένως, μειώνεται και ο φθορισμός. Το μηχάνημα της HRM καταγράφει τη μεταβολή αυτή του φθορισμού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως γράφημα, γνωστό και ως καμπύλη τήξης (απεικονίζεται το επίπεδο φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία). Επειδή η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του προϊόντος PCR εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλουχία DNA, ακόμη και δύο αλληλουχίες του ίδιου μήκους, που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο, θα έχουν διαφορετικές τιμές



$T_m$ . Η διαφορά της θερμοκρασίας τήξης είναι δυνατόν να ανιχνευθεί και ανάμεσα σε ετερόζυγα και ομόζυγα άτομα για μία παραλλαγή στα υπό μελέτη δείγματα.

Βέβαια, όπως όλες οι μέθοδοι γονότυπου έτσι και η ανάλυση HRM έχει ορισμένους περιορισμούς. Αυτοί είναι οι εξής:

- Σε όλα τα δείγματα πρέπει η απομόνωση του DNA να έχει πραγματοποιηθεί με την ίδια μέθοδο, ώστε να αποφεύγονται τυχόν διαφορές που μπορεί να προκληθούν από τη χρήση διαφορετικών διαλυμάτων έκλουσης ανάλογα την μέθοδο απομόνωσης.
- Πρέπει όλα τα δείγματα να έχουν συγκρίσιμες ποσότητες DNA και συγκεκριμένα 1-50ng ανά αντίδραση. Αυτό είναι σημαντικό, ώστε σε όλα τα δείγματα η τιμή  $C_t$ , δηλαδή ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται ώστε το σήμα φθορισμού που θα παραχθεί κατά την αντίδραση PCR να υπερβεί το κατώτερο όριο, να επιτευχθεί σε αριθμό κύκλων μικρότερο του 30, αλλά και τα δείγματα μεταξύ τους να μην παρουσιάζουν διαφορά μεγαλύτερη από 3 κύκλους μέχρι να φτάσουν στην τιμή  $C_t$ . Στην παρούσα εργασία όλα τα δείγματα προσαρμόστηκαν σε ποσότητα ~ 50ng.
- Σε μια ανάλυση SNP, συνιστάται η χρήση προϊόντων PCR των 70-150 bp. Η χρήση μεγαλύτερων προϊόντων έχει σαν αποτέλεσμα συνήθως χαμηλότερη απόδοση και ευαισθησία. Από την άλλη δεν συνιστάται ούτε η χρήση μικρότερων προϊόντων, διότι τότε μπορεί κατά την PCR να παραχθεί σήμα φθορισμού πιο ασθενές.
- Χρησιμοποιώντας την μέθοδο HRM δεν είναι δυνατόν να διακριθούν όλες οι παραλλαγές. Και αυτό, διότι μερικές αλλαγές νουκλεοτιδίων μπορούν να δώσουν εξαιρετικά παρόμοια προφίλ, όπως στην περίπτωση που τα δύο αλληλόμορφα ενός πολυμορφισμού είναι A και T. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά μιας καμπύλης τήξης επηρεάζονται περισσότερο από τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων παρά από τη γειτονική αλληλουχία.
- Η ακρίβεια στη συγκέντρωση άλατος είναι σημαντική, διότι τυχόν διαφορές σε αυτήν μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολές στη συμπεριφορά της τήξης του DNA.

Σε μια ανάλυση HRM για τον προσδιορισμό του γονότυπου ενός SNP πρέπει να συμπεριληφθεί, επίσης, τουλάχιστον ένας έλεγχος για κάθε πιθανό γονότυπο, καθένας από τους οποίους δίνει μια ελαφρώς διαφορετική καμπύλη τήξης. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο προσδιορισμός αυτών των γονότυπων, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες, έγινε με την μέθοδο της SSCP. Ακόμα, όπως σε όλα τα πειράματα ανίχνευσης πρέπει να συμπεριληφθεί και ένας αρνητικός μάρτυρας (negative control).

Στην παρούσα εργασία όλη η διαδικασία εκτελέστηκε με τη χρήση του θερμικού κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Rotor-Gene Q, που επιτρέπει τόσο τη διεξαγωγή μιας PCR πραγματικού χρόνου όσο και την ανάλυση HRM. Ο κυκλοποιητής αυτός είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο, ώστε να διαθέτει μια μοναδική περιστροφική μορφή που εξασφαλίζει τη βέλτιστη θερμική και οπτική ομοιομορφία μεταξύ των δειγμάτων. Αυτή η ομοιομορφία είναι κρίσιμη για την ακριβή και αξιόπιστη ανάλυση HRM. Λόγω του ότι τα δείγματα καθ' όλη τη διαδικασία περιστρέφονται δεν απαιτείται πριν την εκκίνηση φυγοκέντρηση. Επιπλέον, στο πρωτόκολλο ανίχνευσης μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με τη χρήση του Rotor-Gene Q χρησιμοποιείται το kit "Type-it HRM PCR Kit".

Το κιτ αυτό εξασφαλίζει μεγάλη εξειδίκευση και συνήθως δεν απαιτείται βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR πραγματικού χρόνου. Το 2x HRM PCR Master Mix, που παρέχεται με το κιτ περιέχει:

- Την DNA πολυμεράση (HotStarTaq Plus DNA Polymerase)

Πρόκειται για μια τροποποιημένη μορφή της QIAGEN Taq DNA πολυμεράσης, η οποία παρέχεται σε ανενεργή κατάσταση και η οποία δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ένζυμο ενεργοποιείται στην αρχή μιας αντίδρασης με ένα στάδιο επώασης 5 λεπτών στους 95°C.

- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα, Type-it HRM PCR Buffer
- Το διάλυμα Q-Solution
- Την χρωστική δέσμευσης σε δίκλωνο DNA, EvaGreen

Πρόκειται για μια φθορίζουσα χρωστική που δεσμεύεται επιλεκτικά σε dsDNA. Το μέγιστο απορρόφησης της είναι στα 500nm (με δεσμευμένο DNA) και το μέγιστο των εκπομπών της στα 530nm.

- Μείγμα dNTPs: Περιέχει dATP, dCTP, dGTP και dTTP

Τέλος, μαζί με το κιτ παρέχεται και νερό χωρίς RNases (RNase-free water).

Όλη η διαδικασία, μπορεί να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας τόσο τα κλασικά σωληνάρια τύπου erpendorf ειδικά για PCR όσο και σωληνάρια ειδικά για PCR πραγματικού χρόνου τα οποία είναι πολλά ενωμένα μαζί. Ανάλογα τον τύπο που θα επιλέχθει αλλάζει και η βάση που θα χρησιμοποιηθεί στο θερμικό κυκλοποιητή. Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση των κλασικών σωληναρίων τύπου erpendorf ειδικά για PCR για τα οποία η κατάλληλη βάση είναι η " 36-Well Rotor ".

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης καθώς και η ποσότητα του κάθε συστατικού της αντίδρασης εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Στον **Πίνακα 7** αναγράφονται τα κύρια αντιδραστήρια μιας ανάλυσης PCR - HRM καθώς και ο όγκος που απαιτείται για καθένα από αυτά.

<b>Πίνακας 7: Τα αντιδραστήρια μιας ανάλυσης PCR - HRM και οι ποσότητές τους</b>	
<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος ανά αντίδραση (25μl)</b>
2x HRM PCR Master Mix	12,5μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 μM)	1,75μl ή 0,875μl
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	1,75μl ή 0,875μl
DNA	Εξαρτάται από τη συγκέντρωση στην οποία έχουν ρυθμίσει όλα τα δείγματα (απαιτείται στο τέλος η ποσότητα του DNA να είναι 1-50ng)
RNase-free water	Μέχρι τα 25μl (εξαρτάται από τον όγκο του DNA)

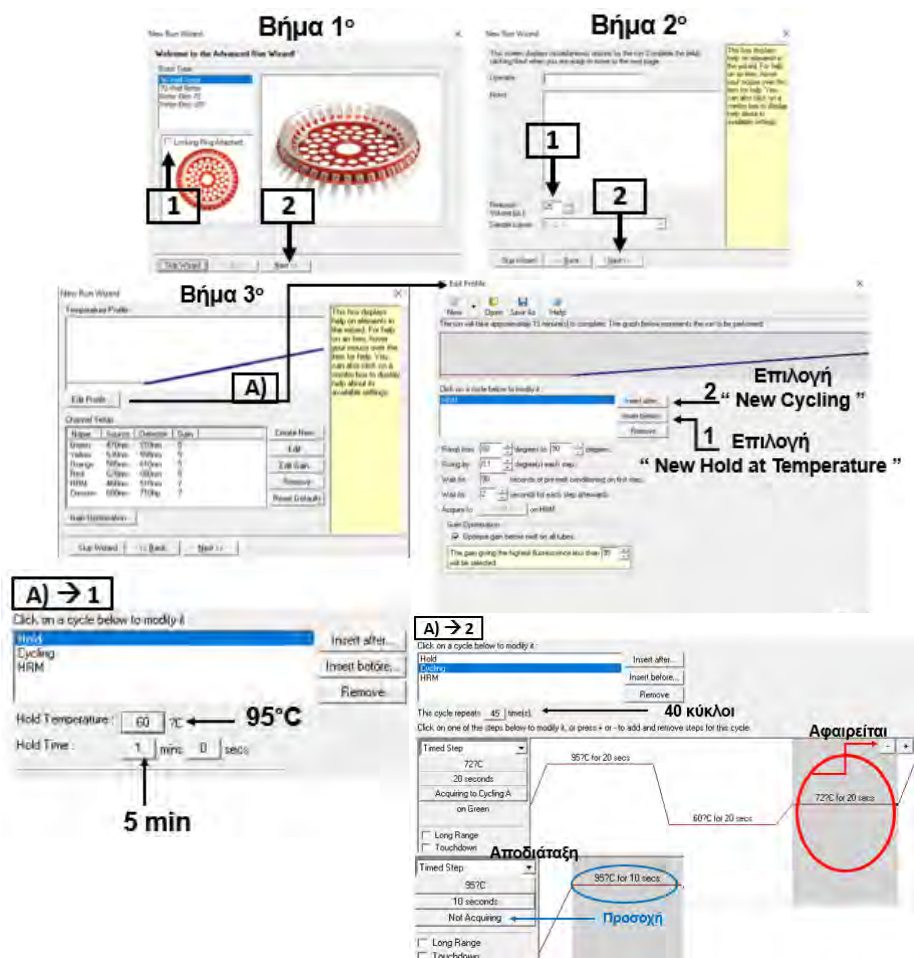
Στην παρούσα εργασία όλα τα δείγματα ρυθμίστηκαν σε συγκέντρωση ~ 10ng/μl και επειδή μετά από δοκιμές σε διάφορες ποσότητες προέκυψε ότι τα αποτελέσματα είναι

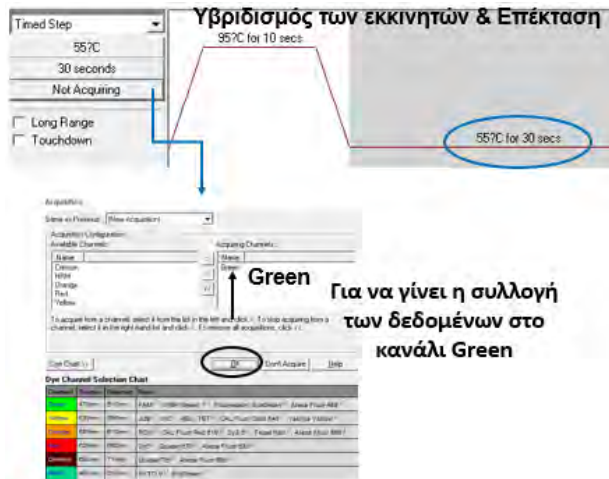
καλύτερα για ποσότητα DNA ίση με ~ 50ng χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση όγκος DNA ίσος με 5μl έως 10,75μl. Συνεπώς, από το RNase-free water σε κάθε αντίδραση χρειαζόταν να προστεθούν 4μl ή να μην προστεθεί καθόλου.

Όπως και στη συμβατική PCR, έτσι και στην ανάλυση PCR – HRM, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα του ενός δείγματα, παρασκευάζεται ένα master mix. Επιπλέον, η ρύθμιση της αντίδρασης μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).

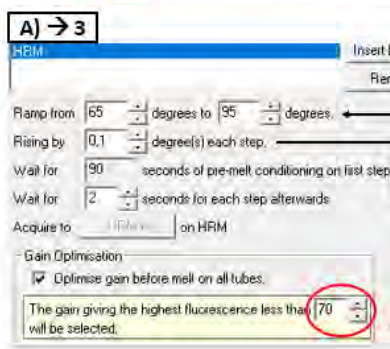
Η διαδικασία που ακολουθείται για την προετοιμασία μιας ανάλυσης PCR - HRM είναι:

1. Προσθήκη DNA ποσότητας ίσης με 50ng (που αντιστοιχεί σε 5μl έως 10,75μl) σε κάθε σωληνάριο και στον αρνητικό μάρτυρα 5μl έως 10,75μl RNase-free water.
2. Προετοιμασία του master mix ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων.
3. Ισόποσα σε κάθε σωληνάριο του βήματος 2 προστίθενται 14,25μl έως 20μl από το master mix, αφού έχει προηγηθεί καλή ανάδευση αυτού.
4. Τοποθέτηση των δειγμάτων στην κατάλληλη βάση και μετά εφαρμογή του δακτυλίου ασφάλισης.
5. Τοποθέτηση των παραπάνω στο Rotor-Gene Q και ανάλογα με το πρωτόκολλο που έχει εφαρμοστεί ρυθμίζεται κατάλληλα το πρόγραμμα. Τα βήματα για τη ρύθμιση του προγράμματος που εφαρμόστηκε στο πείραμα απεικονίζονται στην **Εικόνα 7**.





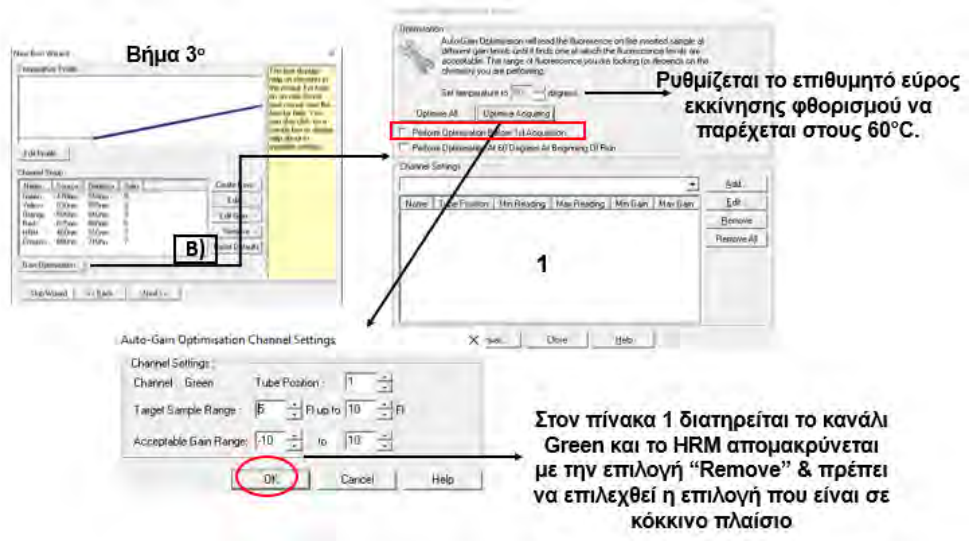
↑ Green Για να γίνει η συλλογή των δεδομένων στο κανάλι Green



65°C - 95°C για να καλυφθεί όλο το φάσμα των αναμενόμενων σημείων τήξεως

Αύξηση θερμοκρασίας κατά 0,1°C σε κάθε βήμα

Ρυθμίζεται ο υψηλότερος φθορισμός να λαμβάνεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 70°C στην οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί τήξη σε όλα τα δείγματα.



Ρυθμίζεται το επιθυμητό εύρος εκκίνησης φθορισμού να παρέχεται στους 60°C.

Στον πίνακα 1 διατηρείται το κανάλι Green και το HRM απομακρύνεται με την επιλογή "Remove" & πρέπει να επιλεγεί η επιλογή που είναι σε κόκκινο πλαίσιο

**Εικόνα 7: Ρύθμιση του προγράμματος για την ανάλυση PCR – HRM. Βήμα 1°:** Επιβεβαίωση ότι έχει μπει ο δακτύλιος ασφάλισης. **Βήμα 2°:** Ρύθμιση του όγκου της αντίδρασης. **Βήμα 3°:** **A)** Ρύθμιση των συνθηκών του θερμικού κυκλοποιητή. **A)→1:** Ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης, HotStarTaq Plus DNA Polymerase. **A)→2:** Ενίσχυση μέσω PCR που περιλαμβάνει μια αρχική αποδιάταξη, και ο υβριδισμός των εκκινήτων (πρέπει να έχουν θερμοκρασία τήξεως (Tm) τουλάχιστον 56°C) και η επέκταση πραγματοποιούνται στο ίδιο βήμα. **A)→3:** Ρύθμιση του βήματος της HRM. **Βήμα 3°: B)** Ρύθμιση του καναλιού στο οποίο ανακτάται ο φθορισμός Αυτή η ρύθμιση επιτρέπει τη βελτιστοποίηση του αποτελέσματος που θα προκύψει στο σήμα φθορισμού. Με την επιλογή " Optimise Acquiring ", η βελτιστοποίηση γίνεται μόνο στο κανάλι που έχει προεπιλεγθεί, και με την επιλογή " Perform Optimisation Before 1st Acquisition ", η βελτιστοποίηση συμβαίνει στον πρώτο κύκλο όπου πραγματοποιείται η απόκτηση δεδομένων. Τότε, η ρύθμιση του προγράμματος έχει ολοκληρωθεί και μπορεί να ξεκινήσει η αντίδραση.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Απομόνωση του DNA

Από τα 37 δείγματα των ασθενών με ψωρίαση που είχαν λάβει θεραπεία με απρεμιλάστη πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA σε 17 από αυτά τα δείγματα (δείγματα με έντονη γραφή στον **Πίνακα 8**), διότι για τα υπόλοιπα είχε πραγματοποιηθεί απομόνωση DNA προηγουμένως στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής διατριβής της Αλεξούδας Σοφίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2019. Στη συνέχεια ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός όλων των δειγμάτων με τη χρήση του φωτόμετρου Quawell. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα κάθε δείγματος αναγράφεται στον **Πίνακα 8**.

<b>Πίνακας 8: Η συγκέντρωση και η καθαρότητα κάθε δείγματος μετά την μέτρηση στο φωτόμετρο Quawell</b>		
<b>Δείγμα</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/μl</b>
<b>Apr 1</b>	1,55	158,1
<b>Apr 2</b>	1,71	117,6
<b>Apr 4</b>	1,49	34,1
<b>Apr 5</b>	1,37	14,4
Apr 6	1,56	70,0
<b>Apr 7</b>	1,36	26,3
Apr 8	1,48	44,7
<b>Apr 9</b>	1,64	23,2
Apr 10	1,44	64,1
Apr 11	1,34	26,2
Apr 13	1,64	46,4
Apr 14	1,76	25,1
<b>Apr 15</b>	1,62	44,0
Apr 16	1,51	44,2
<b>Apr 17</b>	1,32	13,6
Apr 18	1,38	53,7
<b>Apr 19</b>	1,58	35,9
<b>Apr 20</b>	1,07	233,5
Apr 21	1,46	21,1
<b>Apr 23</b>	1,57	28,8
Apr 24	1,79	27,2
Apr 25	1,44	70,8
<b>Apr 26</b>	1,28	77,8
Apr 27	1,61	76,4
Apr 29	1,49	20,9
<b>Apr 30</b>	1,52	76,5
<b>Apr 31</b>	1,48	74,0
<b>Apr 33</b>	1,37	18,8
<b>Apr 34</b>	1,62	68,4
Apr 36	1,63	155,6
Apr 37	1,36	65,6
Apr 38	1,20	13,2
Cos 2	1,65	176,7
<b>Cos 5</b>	1,40	23,2
Cos 10	1,46	69,3
Cos 21	1,64	16,7

Cos 23	1,45	43,3
--------	------	------

Με βάση τις συγκεντρώσεις που προέκυψαν για κάθε δείγμα έγινε η αραιώσή τους, ώστε να ρυθμιστούν όλα τα δείγματα στην ίδια συγκέντρωση και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση ίση με 10ng/μl. Αυτό έγινε, διότι όλα τα δείγματα έπρεπε να έχουν την ίδια αρχική ποσότητα για την ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας που θα πραγματοποιούνταν.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί ξανά απομόνωση γονιδιωματικού DNA για κάποια δείγματα (δείγματα με έντονη γραφή στον **Πίνακα 9**). Αυτή τη φορά ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με φθορισμόμετρο, λόγω του ότι είναι σαν μέθοδος πιο ακριβής (εξήγηση στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι: 3.5 Ποσοτικοποίηση του DNA με φασματοφθορισμομετρία και στο κεφάλαιο Συζήτηση). Τα αποτελέσματα από την μέτρηση με βάση το φθορισμόμετρο Qubit® 2.0 φαίνονται στον **Πίνακα 9**.

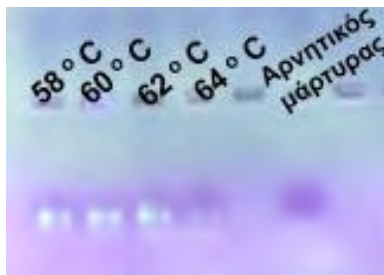
<b>Πίνακας 9: Η συγκέντρωση κάθε δείγματος μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό με το φθορισμόμετρο Qubit® 2.0</b>		
<b>Δείγμα</b>	<b>ng/μl</b>	<b>ng/μl (μέτρηση προηγούμενης απομόνωσης)</b>
Apr 1	90	
Apr 2	66,94	
Apr 4	19,4	
<b>Apr 5</b>	2,44	6,8
Apr 6	33	
Apr 7	14,97	
<b>Apr 8</b>	6,31	
<b>Apr 9</b>	7,15	
<b>Apr 10</b>	1,95	
<b>Apr 11</b>	7,38	9,2
<b>Apr 13</b>	4,65	
<b>Apr 14</b>	18,9	
<b>Apr 15</b>	3,45	
Apr 16	25,28	
<b>Apr 17</b>	2,36	
Apr 18	11,6	
<b>Apr 19</b>	2,47	19,67
Apr 20	20,4	
<b>Apr 21</b>	1,24	
Apr 23	6,22	
Apr 24	33	
Apr 25	86,64	
Apr 26	44,28	
Apr 27	42,2	
<b>Apr 29</b>	2,31	11,89
Apr 30	24,67	
Apr 31	1,37	
<b>Apr 33</b>	1,21	
Apr 34	38,97	
Apr 36	47,9	

Apr 37	16,1	
<b>Apr 38</b>	5,55	
Cos 2	100,7	
<b>Cos 5</b>	1,04	5,85
Cos 10	22	
Cos 21	9,5	
Cos 23	21,9	

Με βάση τις συγκεντρώσεις που προέκυψαν για κάθε δείγμα έγινε η αραιώσή τους, ώστε να ρυθμιστούν όλα τα δείγματα στην ίδια συγκέντρωση και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση ίση με 10ng/μl όπως είχε γίνει και μετά την ποσοτικοποίηση με το φωτόμετρο Quawell. Όμως, όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 9** αυτό δεν ήταν δυνατόν για όλα τα δείγματα, διότι κάποια ήταν πολύ αραιά. Γι' αυτό το λόγο στις αντιδράσεις της ανάλυσης καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας που έγιναν με βάση την μέτρηση από το φθορισμόμετρο Qubit® 2.0 από τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός όγκος από το καθένα, ώστε η αρχική ποσότητα του DNA σε όλα τα δείγματά να είναι 50ng (αναλυτικότερη περιγραφή στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι: 3.11 Ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας). Επίσης, τα δείγματα που δεν μπορούσαν να προσαρμοστούν ούτε με αυτό τον τρόπο σε ποσότητα ίση με 50ng λόγω του ότι ο όγκος που απαιτούνταν για την αντίδραση ξεπερνούσε το επιτρεπτό όριο δεν χρησιμοποιήθηκαν. Για αυτά τα δείγματα αποτελέσματα λήφθηκαν με βάση την ποσοτικοποίηση τους από το φωτόμετρο Quawell (Βλ. στο κεφάλαιο Συζήτηση).

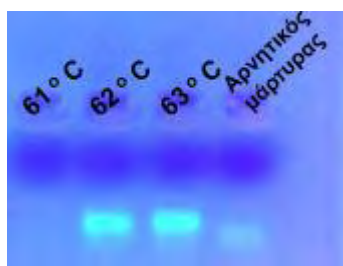
#### 4.2 Βελτιστοποίηση των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για τον πολυμορφισμό rs172043 του *PDE4C*

Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR πραγματοποιήθηκε μια αρχική PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού (Gradient PCR) (αναλυτικότερη περιγραφή στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι: 3.9 Βελτιστοποίηση της PCR) με τους εκκινητές F6 και R6 που ενισχύουν το τμήμα του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs17204 παράγοντας προϊόν μεγέθους 105bp (αναλυτικότερη περιγραφή στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι: 3.8 Η αλληλουχία του ζεύγους εκκινητών για τον πολυμορφισμό rs172043). Στη συγκεκριμένη εργασία οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν στο στάδιο υβριδοποίησης ήταν 58°C, 60°C, 62°C και 64°C καθώς η θεωρητική θερμοκρασία τήξης που υπολογίστηκε και για τους δύο εκκινητές είναι 62°C και αυτή που αναγράφεται στο πιστοποιητικό είναι ίση με 59,4°C. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή είναι ίδιο με αυτό που απεικονίζεται στον **Πίνακα 4** και διαφοροποιείται μόνο στο βήμα της υβριδοποίησης που δεν εφαρμόστηκε μόνο μία θερμοκρασία υβριδισμού όπως συμβαίνει σε μια κλασική PCR, αλλά ταυτόχρονα ελέγχθηκαν τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα, το Apr 30. Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγάροζης 2,5% των προϊόντων και τα οποία φαίνονται στην **Εικόνα 8** προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ζεύγος των εκκινητών παράγει προϊόν για τις θερμοκρασίες 58°C, 60°C και 62°C, αλλά όχι στους 64°C.



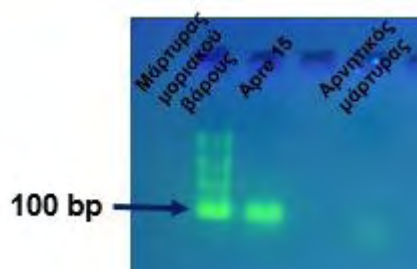
**Εικόνα 8. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας.** Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Arge 30 και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%.

Στις θερμοκρασίες 58°C, 60°C και 62°C που φαίνεται το προϊόν οι ζώνες δεν είναι πολύ έντονες και για τις τρεις θερμοκρασίες. Γι' αυτό πραγματοποιήθηκε και μια δεύτερη PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας στην οποία οι θερμοκρασίες που ελέγχθηκαν ήταν 61°C, 62°C και 63°C χρησιμοποιώντας και αυτή την φορά το δείγμα Arge 30. Επιλέχθηκαν αυτές οι θερμοκρασίες, γιατί από την πρώτη PCR τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα στους 60°C και 62°C. Στους 59°C δεν έγινε δοκιμή ακόμη και αν είχε παραχθεί προϊόν στους 58°C, επειδή κατά τις δομικές που γίνονται για την εύρεση της ιδανικής θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα. Με βάση τα αποτελέσματα της δεύτερης PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας που απεικονίζονται στην **Εικόνα 9** φαίνεται ότι το ζεύγος των εκκινητών δεν παράγει προϊόν στους 61°C. Αντίθετα, στους 62°C και 63°C οι εκκινήτες δίνουν αμφότερα καθαρή, ίδιας έντασης και πολύ ειδική ζώνη χωρίς να εμφανίζουν μη ειδικά προϊόντα. Από αυτές τις θερμοκρασίες επιλέχθηκε η θερμοκρασία στους 63°C ως η ιδανική.



**Εικόνα 9. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της δεύτερης PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας.** Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Arge 30 και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%.

Στην **Εικόνα 10** απεικονίζεται το αποτέλεσμα μιας ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% για το δείγμα Arge 15. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιήθηκε και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους για να γίνει η επιβεβαίωση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100bp DNA Ladder marker (0.5μg/μl) της εταιρείας Minotech.



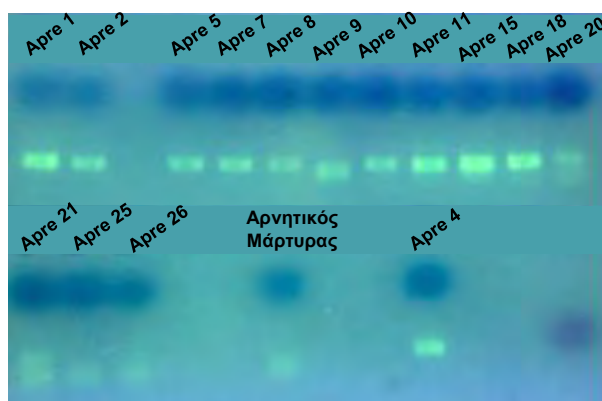
**Εικόνα 10. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης του δείγματος Arge 15.** Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% και διήρκεσε 15 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε και μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100 bp.

Το προϊόν που προκύπτει από την ενίσχυση των εκκινητών πρέπει να είναι ίσο με 105 bp. Με βάση την **Εικόνα 10** επιβεβαιώνεται ότι το μέγεθος του προϊόντος είναι ίσο με 105 bp.



### 4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον πολυμορφισμό rs172043

Μετά τη βελτιστοποίηση της PCR, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs172043 με PCR σε 15 δείγματα (η επιλογή τους ήταν τυχαία) από τα 37. Η PCR πραγματοποιήθηκε μόνο σε τόσα δείγματα, γιατί αυτός ο αριθμός δειγμάτων ήταν θεωρητικά αξιόπιστος για να βρεθούν τα δύο από τα τρία τουλάχιστον πρότυπα του πολυμορφισμού με την μέθοδο της SSCP που ακολούθησε. Μετά την ολοκλήρωση της PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR, μεγέθους 105bp απεικονίζονται στην **Εικόνα 11**.

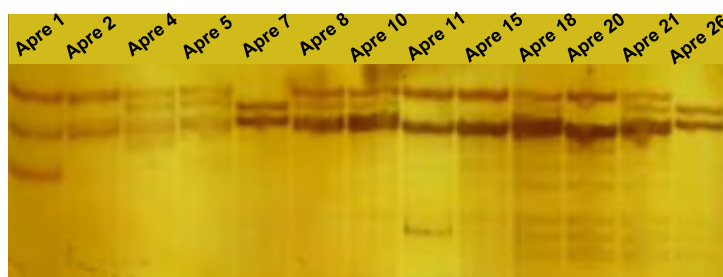


**Εικόνα 11. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR.** Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% και πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά (από τα 50μl χρησιμοποιήθηκαν 5μl).

Με βάση την **Εικόνα 11** φαίνεται ότι η αντίδραση ήταν επιτυχής για τα περισσότερα δείγματα και ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση. Ταυτόχρονα, όμως, παρατηρείται ότι τα δείγματα Apre 9 και Apre 25 δεν ενισχύθηκαν καθώς η ζώνη τους βρίσκεται στο ίδιο ύψος με τον αρνητικό μάρτυρα και η ζώνη που φαίνεται αντιστοιχεί στους εκκινητές. Για το λόγο αυτό στην SSCP αυτά τα δύο δείγματα δεν χρησιμοποιήθηκαν.

### 4.4 Τα πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 στην ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP)

Σε όλα τα δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε PCR, εκτός των Apre 9 και Apre 25 τα οποία όπως προαναφέρθηκε δεν ενισχύθηκαν, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της SSCP, ώστε να βρεθούν τα διάφορα πρότυπα για τον πολυμορφισμό που εξετάζετε, δηλαδή του rs172043. Αυτό είναι σημαντικό να προηγηθεί πριν από μια ανάλυση HRM, διότι για τον προσδιορισμό του γονότυπου ενός SNP με την μέθοδο της HRM πρέπει να συμπεριληφθεί τουλάχιστον ένας θετικός έλεγχος για κάθε πιθανό γονότυπο. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της SSCP απεικονίζονται στην **Εικόνα 12**.



**Εικόνα 12. Αποτελέσματα από την ανάλυση της SSCP.** Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 14% για 14 ώρες. Μετά τη χρώση του πηκτώματος εμφανίστηκαν οι ζώνες που φαίνονται.

Με βάση την **Εικόνα 12** τα δείγματα ομαδοποιούνται σε τρεις ομάδες, δηλαδή σε τρία διαφορετικά πρότυπα. Ανάλογα με τον αριθμό των ζωνών και με βάση ότι δύο ζώνες αναμένονται για τα ομόζυγα άτομα και μέχρι τέσσερις για τα ετερόζυγα, πρόκυπτουν οι εξής ομάδες:

1. Πρότυπο Α (ομόζυγα άτομα): Apre 1, Apre 2, Apre 11, Apre 15 και Apre 20
2. Πρότυπο Β (ετερόζυγα άτομα): Apre 4, Apre 5, Apre 8, Apre 10, Apre 18 και Apre 21
3. Πρότυπο Γ (ομόζυγα άτομα): Apre 7 και Apre 26

Όσον αφορά τα δύο διαφορετικά πρότυπα που αφορούν ομόζυγα άτομα βλέποντας τη συχνότητα εμφάνισης τους στο σύνολο των 13 δειγμάτων (**Πίνακας 10**) που αναλυθήκαν θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι το πρότυπο Α αφορά άτομα που είναι ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο (G) του SNP rs172043 και το πρότυπο Γ αφορά άτομα που είναι ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο (A).

<b>Πίνακας 10: Η συχνότητα εμφάνισης κάθε προτύπου που προέκυψαν από την ανάλυση SSCP σε 13 δείγματα</b>	
<b>Πρότυπο</b>	<b>Συχνότητα</b>
Πρότυπο Α	0,384
Πρότυπο Β	0,461
Πρότυπο Γ	0,153

Αυτό φαίνεται ότι συνάδει και με τις συχνότητες των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs172043 που αναφέρονται στον ευρωπαϊκό πληθυσμό καθώς και με αυτές που αναφέρονται στον ισπανικό και ιταλικό πληθυσμό. Οι συχνότητες καταγράφονται στον **Πίνακα 11**.

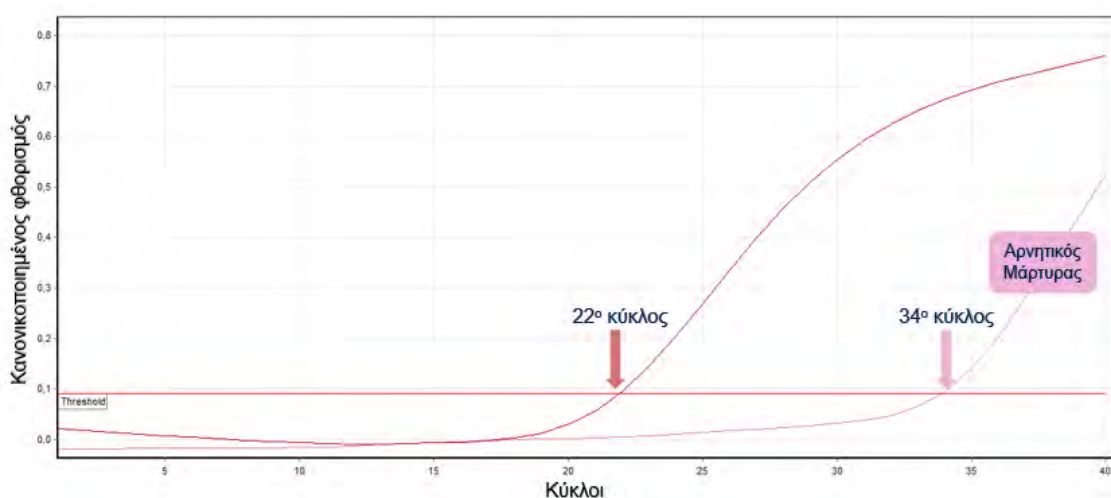
<b>Πίνακας 11: Οι συχνότητες των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs172043</b> (Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων Ensembl <a href="https://www.ensembl.org">https://www.ensembl.org</a> )			
<b>Πληθυσμός (αριθμός δειγματος)</b>	<b>Συχνότητα GG</b>	<b>Συχνότητα GA</b>	<b>Συχνότητα AA</b>
Ευρωπαίοι (503)	0,451	0,412	0,137
Ισπανοί (107)	0,458	0,383	0,159
Ιταλοί (107)	0,421	0,477	0,103

Συνεπώς, με βάση όλα τα παραπάνω τα τρία πρότυπα που προαναφέρθηκαν αντιστοιχούν πιθανότητα στους εξής γονοτύπους:

- Το πρότυπο Α αντιστοιχεί σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο G, άρα έχουν γονότυπο GG.
- Το πρότυπο Β αντιστοιχεί σε ετερόζυγα άτομα, άρα έχουν γονότυπο GA.
- Το πρότυπο Γ αντιστοιχεί σε ομόζυγα άτομα για το αλληλόμορφο A, άρα έχουν γονότυπο AA.

#### 4.5 Οι εκκινητές του πολυμορφισμού rs172043 σε μία ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου – HRM

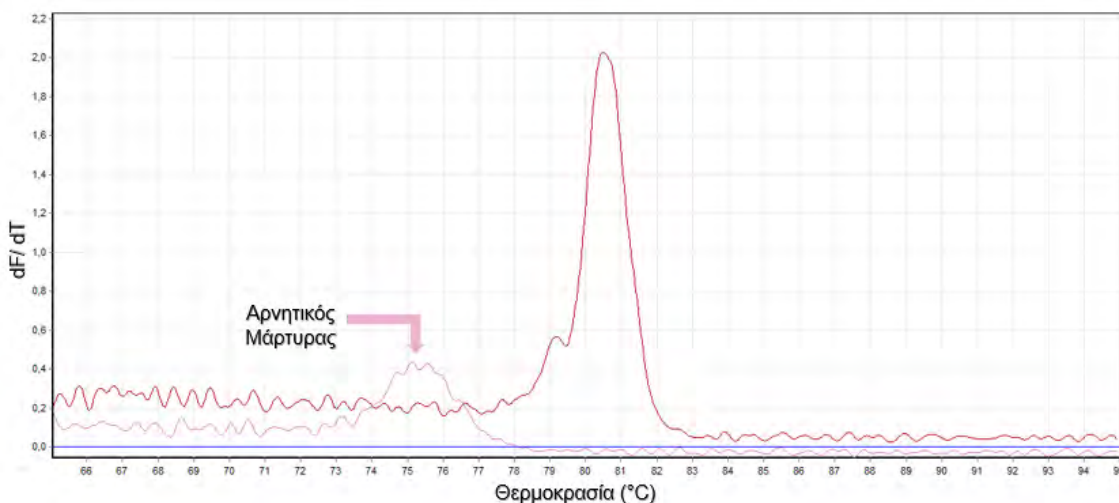
Πριν διεξαχθεί η ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας και στα 37 δείγματα ασθενών με ψωρίαση με στόχο την γονοτύπησή τους για τον πολυμορφισμό rs172043, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμαστική αντίδραση χρησιμοποιώντας ένα μόνο δείγμα για να ελεγχθούν οι εκκινητές σε μια τέτοιου είδους ανάλυση στην οποία πρώτα διεξάγεται PCR πραγματικού χρόνου. Από την καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου, που απεικονίζεται στην **Εικόνα 13**, φαίνεται ότι ο αρνητικός μάρτυρας έδωσε σήμα περίπου στον 34<sup>ο</sup> κύκλο. Άρα, πιθανόν αυτό το σήμα να οφείλεται σε εσωτερική επιμόλυνση ή σε σχηματισμό διμερών.



**Εικόνα 13. Γραφική παράσταση της καμπύλης ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου.**

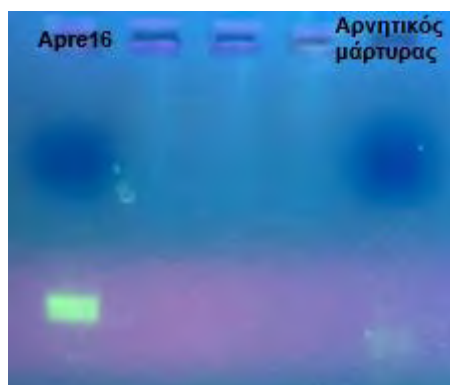
Η γραφική παράσταση ενίσχυσης είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει το κατώφλι φθορισμού (Threshold), το οποίο ορίζεται με δύο κριτήρια: 1) σε όλα τα δείγματα να αποδίδεται μια τιμή  $C_t$  (ο κύκλος στον οποίο κάθε δείγμα περνάει αυτό το κατώτερο όριο φθορισμού) και 2) σε όλα τα δείγματα η τιμή  $C_t$  να είναι  $< 30$ . Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την αντίδραση ήταν το Apr6 16.

Στη συνέχεια, από την ανάλυση της καμπύλης τήξης (**Εικόνα 14**) θεωρήθηκε ότι τελικά το σήμα που έδωσε ο αρνητικός μάρτυρας πιθανόν οφείλεται σε διμερή που σχηματίστηκαν από τους εκκινητές. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από την κορυφή που φαίνεται στην **Εικόνα 14** σε θερμοκρασία αποδιάταξης ίση με 75°C, ενώ για το κύριο προϊόν της αντίδρασης το σημείο τήξης του φαίνεται να είναι γύρω στους 80°C.



**Εικόνα 14. Γραφική παράσταση της καμπύλης τήξης της PCR πραγματικού χρόνου.** Η συγκεκριμένη γραφική παράσταση είναι η παράγωγος της συνάρτησης «φθορισμός έναντι θερμοκρασίας αποδιάταξης», ( $dF / dT$ ). Αυτή η γραφική παράσταση αντιπροσωπεύει την μεταβολή του φθορισμού (τη μείωση του φθορισμού λόγω της μετουσίωσης του DNA) ως κορυφή. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την αντίδραση ήταν το Apre 16.

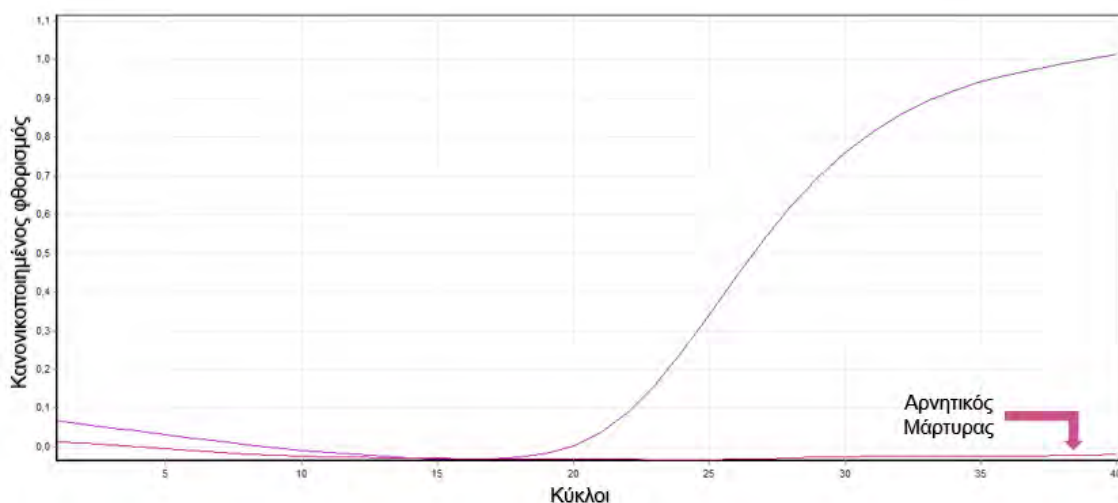
Ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το σήμα που έδωσε ο αρνητικός μάρτυρας δεν οφείλεται σε επιμόλυνση, αλλά σε πιθανό σχηματισμό διμερών. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην **Εικόνα 15**.



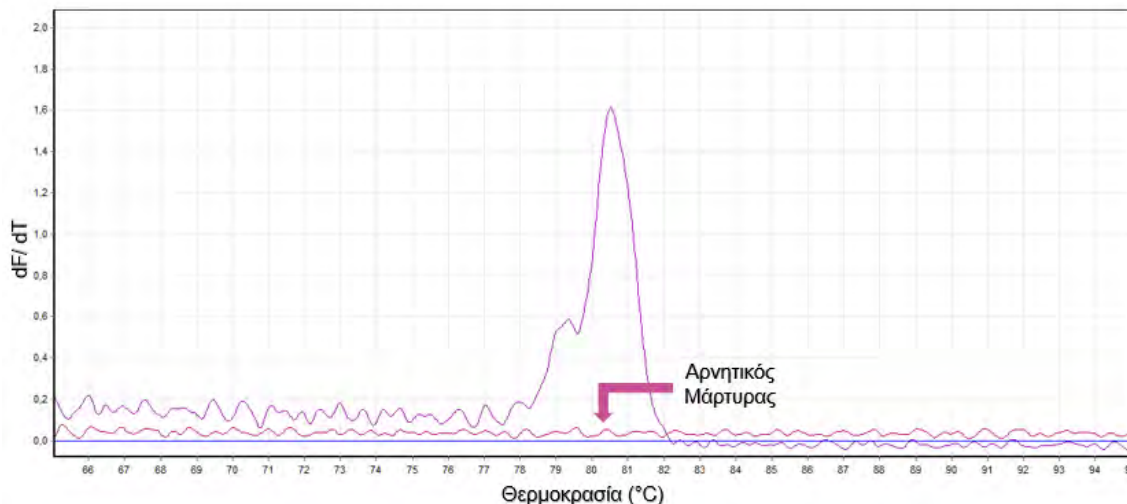
**Εικόνα 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων μιας ανάλυσης PCR πραγματικού χρόνου - HRM.** Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% και διήρκησε για 15 λεπτά (από τα 25μl χρησιμοποιήθηκαν 10μl).

Από **Εικόνα 15** φαίνεται ότι η ενίσχυση που παρατηρήθηκε στον αρνητικό μάρτυρα όντως τελικά δεν οφείλεται σε επιμόλυνση, καθώς η ζώνη του αρνητικού μάρτυρα αντιστοιχεί σε DNA μικρότερου μεγέθους από αυτό του προϊόντος της PCR. Συνεπώς, το σήμα από τον αρνητικό μάρτυρα οφείλεται σε διμερή των εκκινητών.

Στη συνέχεια για να μειωθεί το σήμα των διμερών πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιώντας και πάλι το δείγμα Apre 16, αλλά αυτή τη φορά η συγκέντρωση των εκκινητών ήταν διαφορετική. Αναλυτικότερα η συγκέντρωση των εκκινητών μειώθηκε στο μισό, δηλαδή από τη συγκέντρωση των 10μM, που έλεγε το πρωτόκολλο, χρησιμοποιήθηκαν 5μM. Τα αποτελέσματα από την ενίσχυση απεικονίζονται στην **Εικόνα 16** και τα αποτελέσματα από την καμπύλη τήξης στην **Εικόνα 17**.



**Εικόνα 16. Γραφική παράσταση της καμπύλης ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου.**  
Η γραφική παράσταση ενίσχυσης είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την αντίδραση ήταν το Apre 16.



**Εικόνα 17. Γραφική παράσταση της καμπύλης τήξης της PCR πραγματικού χρόνου για το δείγμα Apre 16 με συγκέντρωση των εκκινητών ίση με 5μΜ.**

Από τις παραπάνω εικόνες (**Εικόνα 16** και **Εικόνα 17**) παρατηρείται ότι με την μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών στα 5μΜ το σήμα των διμερών περιορίστηκε πλήρως στη συγκεκριμένη αντίδραση. Όσον αφορά το σήμα που δίνεται από το DNA – στόχο στην καμπύλη ενίσχυσης, παρατηρώντας συγκριτικά τις **Εικόνες 13** και **16**, φαίνεται ότι η μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών δεν επηρεάζει την απόδοση της αντίδρασης. Επίσης, στην καμπύλη τήξης, παρατηρώντας συγκριτικά τις **Εικόνες 14** και **17**, το σήμα σημειώνει μια μικρή μείωση όταν η συγκέντρωση των εκκινητών είναι 5μΜ. Λόγω όλων των παραπάνω για τις επόμενες αντιδράσεις η αρχική συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τους εκκινητές ήταν ίση με 5μΜ.

#### 4.6 Ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (HRM analysis)

Ύστερα από τη βελτιστοποίηση του σήματος των διμερών μέσω της μείωσης της αρχική συγκέντρωσης των εκκινητών ακολούθησε η πραγματοποίηση της ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (HRM) και στα 37 δείγματα με σκοπό να βρεθεί σε ποιο από τα τρία πρότυπα, που προέκυψαν κατά την SSCP (αναλυτικότερη περιγραφή στο κεφάλαιο Αποτελέσματα: 4.4 Τα πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 στην ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP)), ομαδοποιείται το κάθε δείγμα. Στο τέλος κάθε αντίδρασης πραγματοποιούνταν η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού “ Rotor-Gene Q Software version 2.3.1 ”, η οποία γίνεται σε τρία στάδια.

##### 1. Καμπύλη ενίσχυσης της PCR πραγματικού χρόνου

Οριοθετώντας το κατώφλι φθορισμού (Threshold) ελέγχεται ο κύκλος στον οποίο κάθε αντίδραση (δείγμα) περνάει αυτό το κατώτερο όριο φθορισμού ( $C_t$ ) και είναι σημαντικό αυτό να αντιστοιχεί σε  $C_t < 30$ . Τέλος, σημαντικό σε αυτό το βήμα της ανάλυσης είναι να παρατηρηθεί και η διαφορά που έχουν τα δείγματα στο  $C_t$ . Συγκεκριμένα αποδεκτή είναι μια διαφορά στο  $C_t$  που δεν είναι μεγαλύτερη από 3 κύκλους.

Όσον αφορά το βήμα αυτό της ανάλυσης σε όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος γενικά η διαφορά στο  $C_t$  μεταξύ των δειγμάτων ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων, δηλαδή δεν ξεπερνούσε τους τρεις κύκλους. Εξαιρέση σε αυτό αποτέλεσε το δείγμα Arge 31, που ήταν το μόνο από όλα τα δείγματα, το οποίο εμφάνιζε μια διαφορά περίπου 4 κύκλους σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Βλ. στο κεφάλαιο Συζήτηση).

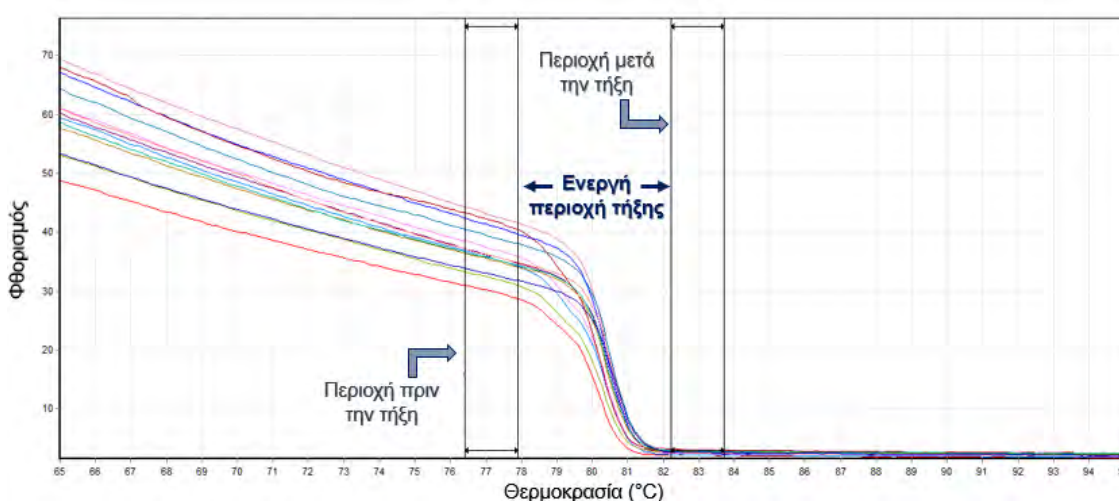
## 2. Καμπύλη τήξης της PCR πραγματικού χρόνου

Μέσω αυτού του σταδίου της ανάλυσης πρέπει να γίνει έλεγχος για τυχόν σχηματισμό διμερών. Επίσης, είναι δυνατόν να εντοπισθεί το σημείο τήξης κάθε δείγματος το οποίο συμβάλλει στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κατά το τελευταίο στάδιο της ανάλυσης.

Όσον αφορά την παρούσα εργασία από τη συγκεκριμένη ανάλυση κάθε φορά γινόταν έλεγχος για το σήμα των διμερών. Από αντίδραση σε αντίδραση αυτό διέφερε, αλλά γενικότερα παρατηρούνταν ένα μικρό σήμα από τα διμερή ακόμα και αν είχε μειωθεί η αρχική συγκέντρωση των εκκινητών. Επιπλέον, μέσω της ανάλυσης της καμπύλης τήξης παρατηρήθηκε ότι η ενεργή περιοχή τήξης, δηλαδή η περιοχή στην οποία γίνεται η τήξη του κυρίου προϊόντος της κάθε αντίδρασης, έχει εύρος από τους 77°C έως 82°C.

## 3. Καμπύλη τήξης υψηλής διακριτικότητας

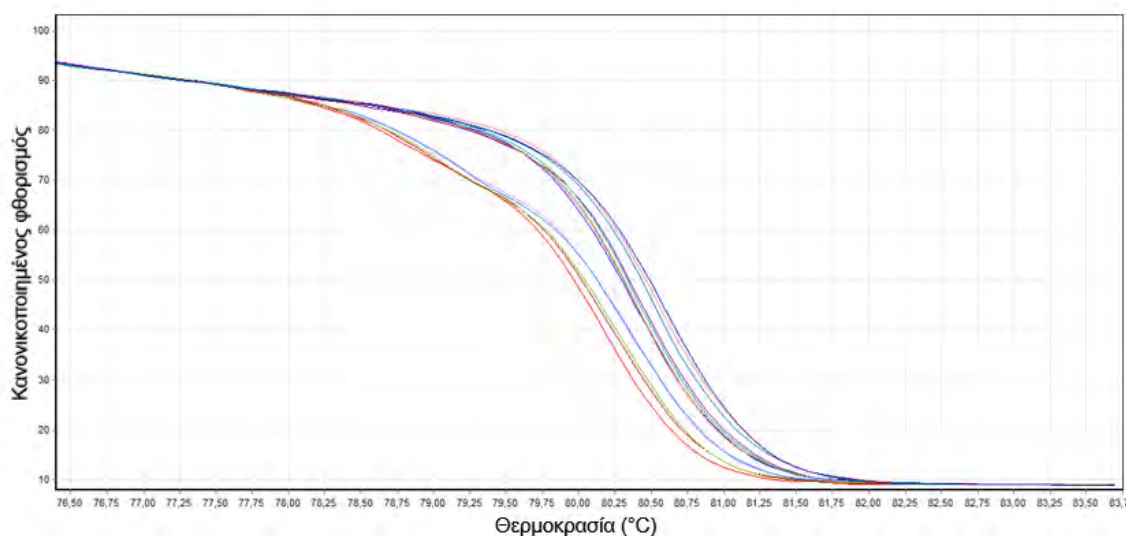
Από αυτό το βήμα είναι δυνατόν να γίνει η ομαδοποίηση των δειγμάτων, με βάση τη συμπεριφορά τήξης τους, με τα τρία πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 (αναλυτικότερη περιγραφή στο κεφάλαιο Αποτελέσματα: 4.4 Τα πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 στην ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP)) που είναι και ο σκοπός για τον οποίο πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου – HRM. Αρχικά, λόγω του ότι τα δεδομένα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια ενός πειράματος τήξης υψηλής διακριτικότητας εμφανίζουν ένα εύρος αρχικών μετρήσεων φθορισμού είναι δύσκολο να διακριθούν μικρές διαφορές στην αλλαγή φθορισμού για μεμονωμένα δείγματα. Αυτά αφορούν την καμπύλη τήξης πρωτογενών δεδομένων (Raw Data Melt Curve). Στην **Εικόνα 18** απεικονίζεται μια ενδεικτική τέτοια καμπύλη.



**Εικόνα 18. Καμπύλη τήξης πρωτογενών δεδομένων (Raw Data Melt Curve).** Κάθε χρώμα στην καμπύλη αντιστοιχεί και σε ένα διαφορετικό δείγμα.

Με τη βοήθεια, όμως, του λογισμικού “Rotor-Gene Q Software version 2.3.1” είναι δυνατή η κανονικοποίηση των δεδομένων αυτών με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός

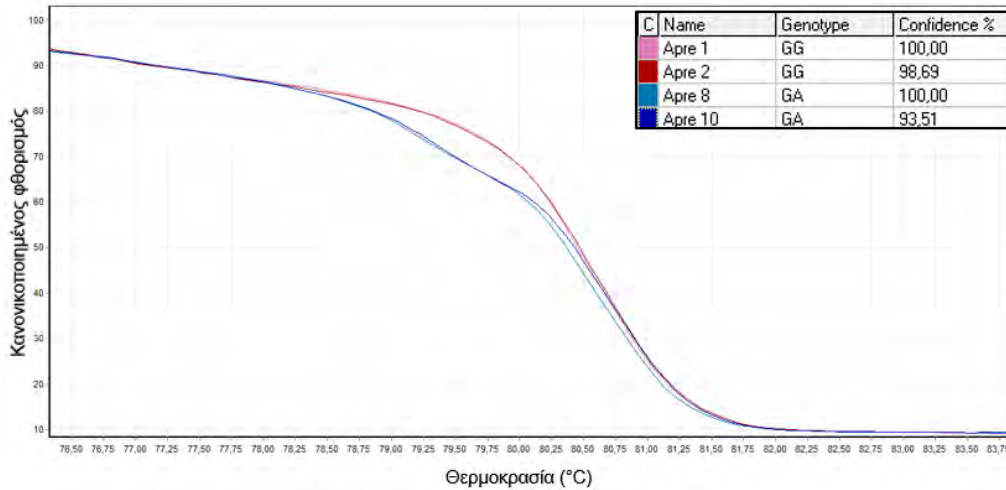
κανονικοποιημένου γραφήματος (Normalised Graph) από το οποίο είναι πιο εύκολο να διακριθεί ποια δείγματα ομαδοποιούνται και άρα έχουν το ίδιο πρότυπο. Ένα ενδεικτικό κανονικοποιημένο γράφημα παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**.



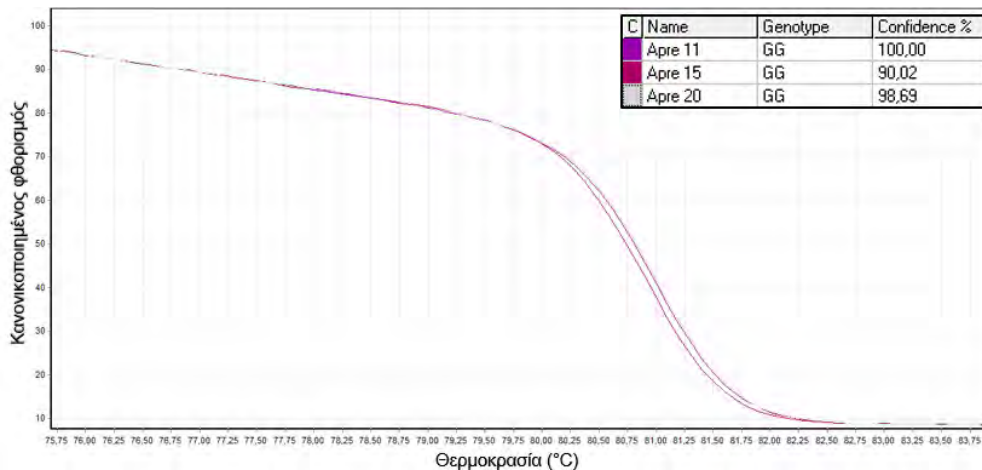
**Εικόνα 19. Κανονικοποιημένο γράφημα της καμπύλη τήξης πρωτογενών δεδομένων (Normalised Graph).** Κάθε χρώμα στην καμπύλη αντιστοιχεί και σε ένα διαφορετικό δείγμα.

Αναλυτικότερα στην καμπύλη τήξης πρωτογενών δεδομένων η ενεργή περιοχή τήξης ορίζεται από περιοχές πριν και μετά την τήξη (διπλές ράβδους) που χρησιμοποιούνται για την ευθυγράμμιση των δεδομένων, ώστε να παραχθεί μια πιο καθαρή εικόνα των αποτελεσμάτων της καμπύλης τήξης. Η τοποθέτηση των περιοχών πριν και μετά την τήξη γίνεται με βάση κάποιο κριτήριο. Συγκεκριμένα η περιοχή πριν την τήξη τοποθετείται λίγο πριν την θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ), στο σημείο εκείνο που οι καμπύλες είναι ακόμα παράλληλες και η περιοχή μετά την τήξη στο σημείο όπου σε όλα τα δείγματα έχει γίνει τήξη. Τέλος, μετά την κανονικοποίηση της καμπύλης τήξης δίνεται η δυνατότητα να δηλωθεί ο γονότυπος ενός γνωστού δείγματος με βάση τον οποίο το λογισμικό δίνει αυτόματα σε τι ποσοστό σχετίζονται τα υπόλοιπα δείγματα με αυτό το γονότυπο. Όταν το ποσοστό είναι μεγαλύτερο ή ίσο με το 90% τότε το λογισμικό κατατάσσει τα δείγματα στο ίδιο πρότυπο.

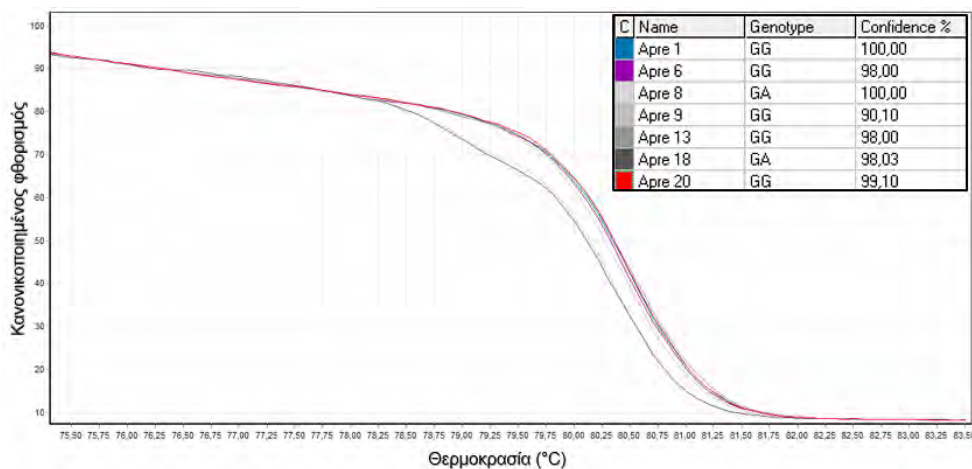
Τα αποτελέσματά από το τρίτο και τελευταίο στάδιο ανάλυσης απεικονίζονται στις **Εικόνες 20** έως **27**. Όλες οι εικόνες δείχνουν το κανονικοποιημένο γράφημα της καμπύλη τήξης πρωτογενών δεδομένων. Επίσης, σε κάθε εικόνα απεικονίζεται και ένας πίνακας που δείχνει ποιο χρώμα αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα, με βάση ποιο/α δείγμα/τα γίνεται η ομαδοποίηση (αυτά έχουν το Confidence ίσο με 100%). Τέλος, στη στήλη "Genotype" του πίνακα αυτού, όταν ο γονότυπος του δείγματος είναι γνωστός από την SSCP δηλώνεται, διαφορετικά αναφέρεται ως "άγνωστο".



**Εικόνα 20. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM.** Για όλα τα δείγματα (Apr 1, Apr 2, Apr 8 και Apr 10) ο γονότυπος ήταν γνωστός από την SSCP. Συνεπώς, η ομαδοποίηση με βάση το Apr 1 και το Apr 8 ήταν η αναμενόμενη και επιβεβαιώνεται έτσι και το αποτέλεσμα από την SSCP.



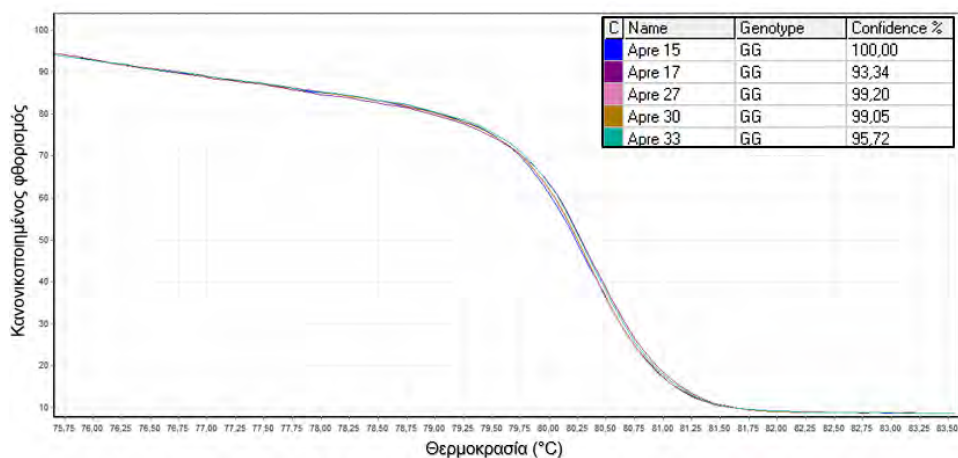
**Εικόνα 21. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM για τα δείγματα Apr 11, Apr 15 και Apr 20.** Από την SSCP είχε φανεί ότι αυτά τα δείγματα είναι ομόζυγα για το συχνό αλληλομορφο (G) του rs172043. Από την HRM επιβεβαιώθηκε ότι ανήκουν στο ίδιο πρότυπο.



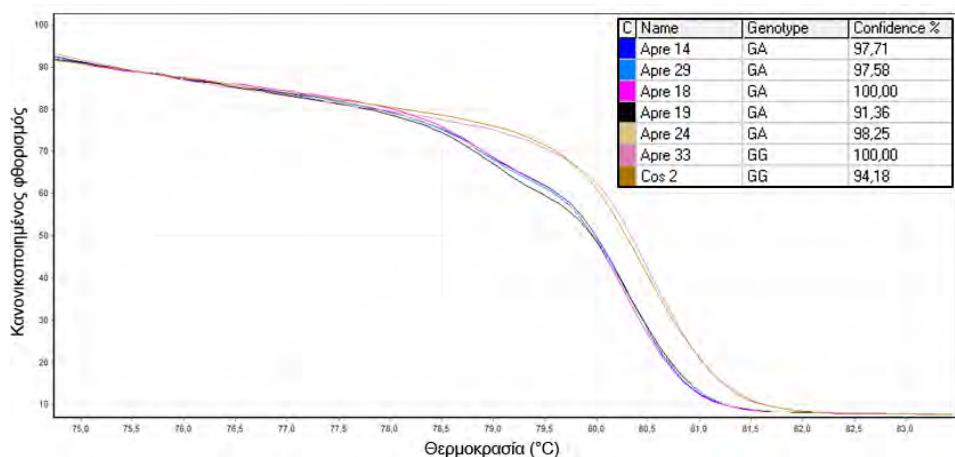
**Εικόνα 22. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM.** Για τα δείγματα (Apr 1, Apr 20, Apr 8 και Apr 18) ο γονότυπος ήταν γνωστός από την SSCP. Άρα, η ομαδοποίηση με βάση



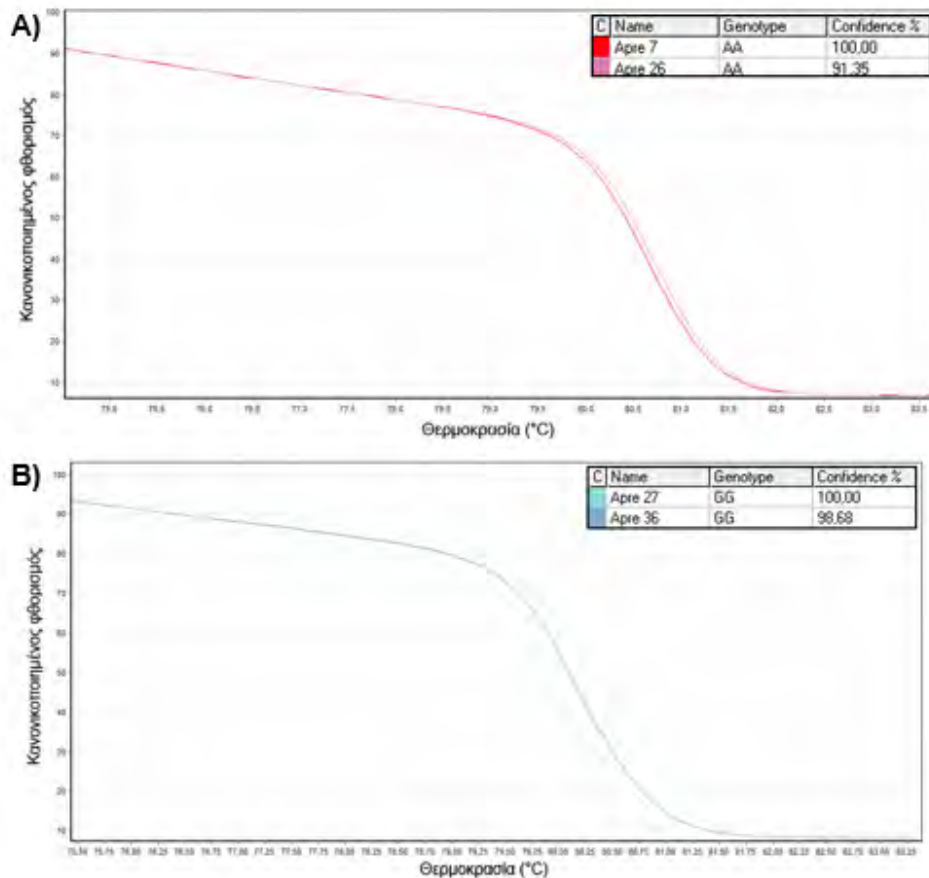
το Apr 1 και το Apr 8 έδωσε για αυτά τα τέσσερα δείγματα αποτέλεσμα που συνάδει με το αποτέλεσμα της SSCP. Στο πρότυπο του δείγματος Apr 1 και Apr 20 εντάχθηκαν επιπλέον τέσσερα νέα δείγματα (φαίνονται στο πίνακα της εικόνας).



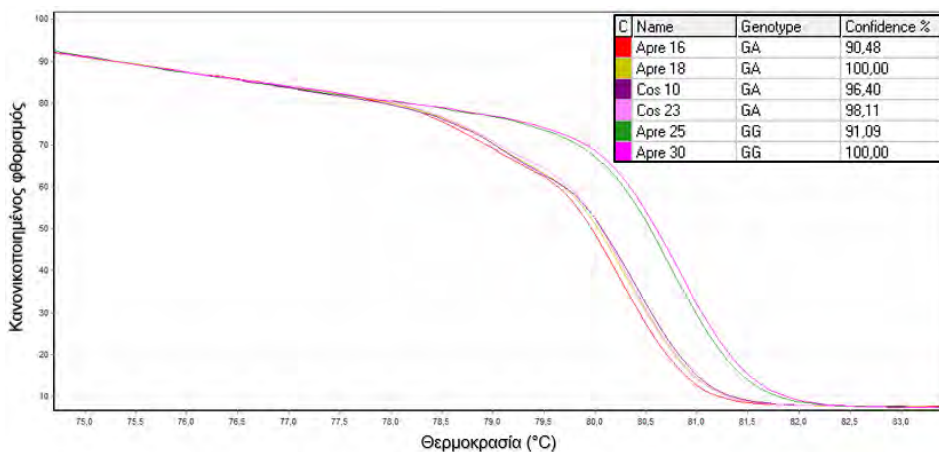
**Εικόνα 23. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM – Προσδιορισμός του γονοτύπου με βάση το δείγμα Apr 15.**



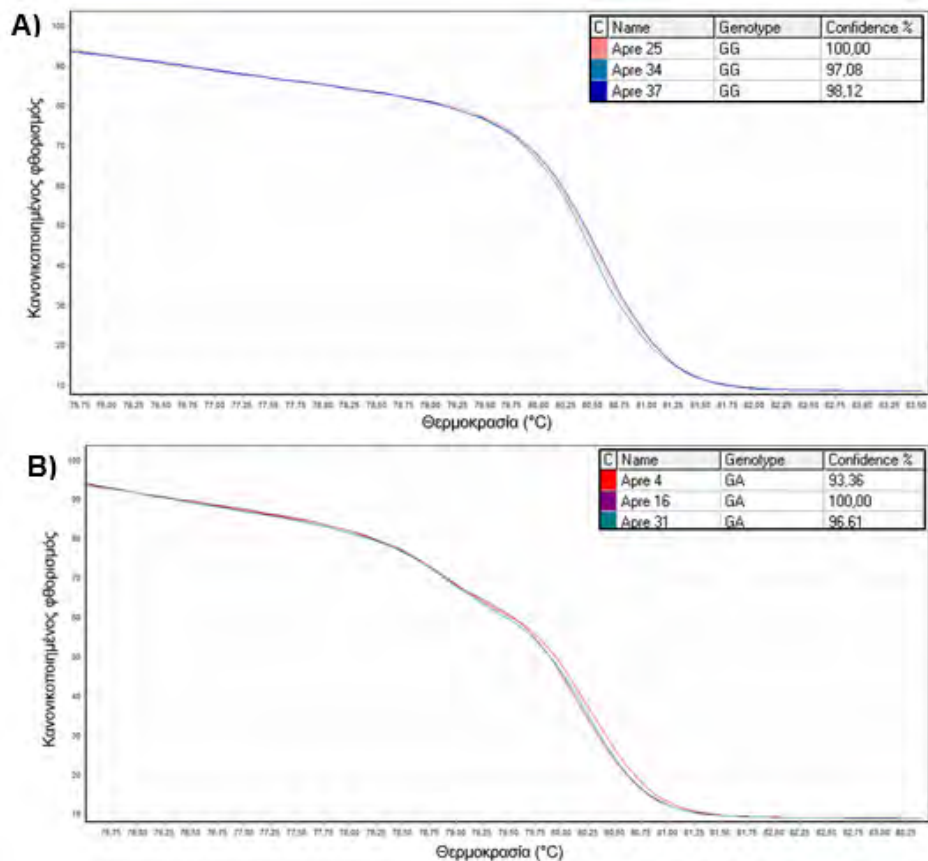
**Εικόνα 24. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM.** Η ομαδοποίηση έγινε με βάση το δείγμα Apr 18 που ο γονότυπος του ήταν γνωστός από την SSCP και με το Apr 33 που ο γονότυπος του είχε βρεθεί από προηγούμενη ανάλυση (βλ. **Εικόνα 23**).



**Εικόνα 25. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM για τα δείγματα Apr 7, Apr 26, Apr 27 και Apr 36. Α)** Από την SSCP είχε φανεί ότι αυτά τα δείγματα είναι ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο (A) του rs172043 και από την HRM επαληθεύτηκε ότι ανήκουν στο ίδιο πρότυπο. **Β)** Ο προσδιορισμός του γονοτύπου έγινε με βάση το δείγμα Apr 27 που από προηγούμενη ανάλυση είχε φανεί ότι ο γονότυπος του είναι GG (βλ. **Εικόνα 23**).

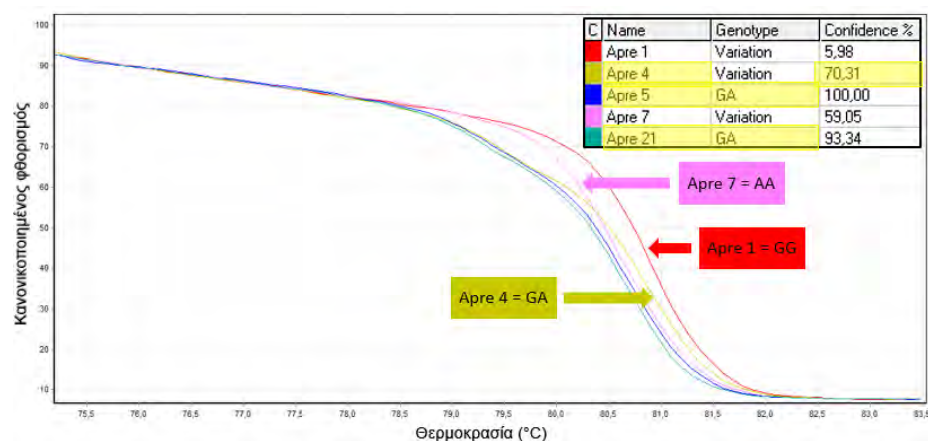


**Εικόνα 26. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM.** Χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός έλεγχος για τα ετερόζυγα άτομα (δείγμα Apr 18) και ένας για τα ομόζυγα άτομα GG (δείγμα Apr 30). Βρέθηκε ότι τα δείγματα Apr 16, Cos 10 και Cos 23 ανήκουν στο ίδιο πρότυπο με το Apr 18. Στον γονότυπο GG ομαδοποιήθηκε το Apr 25.



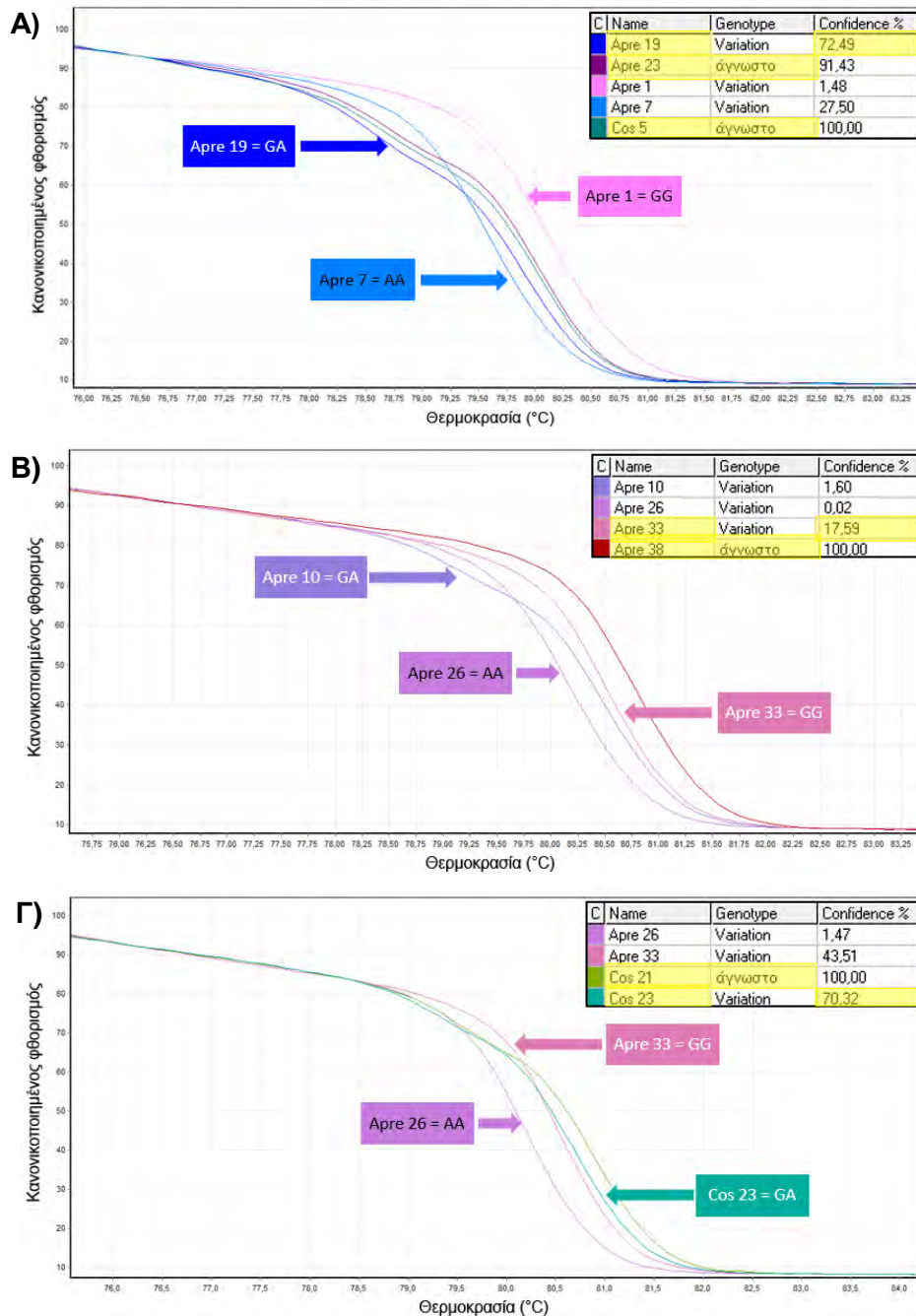
**Εικόνα 27. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM για τα δείγματα Apr 4, Apr 16, Apr 25, Apr 31, Apr 34 και Apr 37.** Τόσο στο **A)** (Apr 25) όσο και στο **B)** (Apr 16) για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα του οποίου ο γονότυπος είχε βρεθεί με προηγούμενη ανάλυση (βλ. **Εικόνα 26**). **B)** Με την ομαδοποίηση του δείγματος Apr 4 στα ετερόζυγα άτομα επιβεβαιώθηκε το αποτέλεσμα της SSCP, από την οποία ήταν γνωστό ότι το Apr 4 έχει γονότυπο GA.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αφορούν τα 31 από τα 37 δείγματα που μελετήθηκαν. Τα υπόλοιπα 6 δεν ομαδοποιήθηκαν σε κάποιο πρότυπο, αλλά για αυτά με βάση τις πληροφορίες που έχουν προκύψει από την ανάλυση της HRM μπορεί να θεωρηθεί ποιος είναι ο γονότυπος τους. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 28 και 29**), στις οποίες φαίνονται όμοιες πληροφορίες με αυτές των **Εικόνων 20 – 27**.



**Εικόνα 28. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM για τα δείγματα Apr 5 και Apr 21.** Τα δείγματα αυτά από τη SSCP είχε αποδειχθεί ότι πρόκειται για ετερόζυγα άτομα. Από την ανάλυση HRM επαληθεύτηκε ότι αυτά τα δύο δείγματα ανήκουν στο ίδιο πρότυπο. Κανονικά

θα έπρεπε να ομαδοποιηθεί μαζί τους και το Apre 4, το οποίο παρουσιάζει μία τάση ~ 70% να είναι όμοιο. Τα δείγματα Apre 5 και Apre 21 σε όλες τις αναλύσεις που συμπεριλήφθηκαν εμφάνιζαν πάντα μόνο μία τάση με τα υπόλοιπα δείγματα γονοτύπου GA. Έτσι, θεωρήθηκε ότι αυτά τα δύο δείγματα μάλλον ανήκουν σε αυτό το πρότυπο χωρίς, όμως, να έχει επιβεβαιωθεί με την ανάλυση της HRM.



**Εικόνα 29. Αποτελέσματα από την ανάλυση της HRM – Προσδιορισμός του γονοτύπου για τα δείγματα Apre 23, Cos 5, Apre 38 και Cos 21.** Για τα δείγματα των οποίων ο γονότυπος είναι γνωστός απεικονίζεται πάνω στην εικόνα. Τα δείγματα Apre 23, Cos 5, Apre 38 και Cos 21 δεν ομαδοποιήθηκαν με κανένα από τα τρία γνωστά πρότυπα του πολυμορφισμού rs172043 (φαίνονται μέσα σε χρωματιστά πλαίσια στα **A)**, **B)** και **Γ)**). Αναλυτικότερα: **A)** Η ομαδοποίηση με βάση το Cos 5 έδειξε ότι τα Apre 23 και Cos 5 ανήκουν στο ίδιο πρότυπο και παρουσιάζουν μία τάση ~72% να είναι όμοια με το δείγμα Apre 19. Τα δείγματα Apre 23 και Cos 5 σε όλες τις αναλύσεις που συμπεριλήφθηκαν εμφάνιζαν πάντα μία τάση με τα δείγματα γονοτύπου GA. Έτσι, φαίνεται ότι πιθανόν αυτά τα δύο δείγματα ανήκουν σε αυτό το πρότυπο χωρίς, όμως, να έχει επιβεβαιωθεί με την ανάλυση της HRM σε ποσοστό  $\geq 90\%$ . **B)** Ο προσδιορισμός του γονοτύπου έγινε με το Apre 38, το οποίο εμφάνισε μια μικρή τάση ~18% με

το γονότυπο GG. Όμως, επειδή σε όλες τις αναλύσεις που συμπεριλήφθηκε δεν συσχετίστηκε σημαντικά με κάποιο γονότυπο δεν ήταν δυνατόν να θεωρηθεί σε ποιο πρότυπο ανήκει. Γ) Στη συγκεκριμένη ανάλυση η ομαδοποίηση έγινε με βάση το Cos 21 το οποίο συσχετίστηκε με ποσοστό ~70% με το δείγμα Cos 23. Το δείγμα Cos 21 σε όλες τις αναλύσεις που συμπεριλήφθηκε εμφάνιζε πάντα μία τάση με τα δείγματα γονοτύπου GA. Έτσι, θεωρήθηκε ότι μάλλον πρόκειται για ετερόζυγο άτομο.

Ένα άλλο στοιχείο το οποίο μπορεί να βοηθήσει για το πως ομαδοποιούνται τα δείγματα είναι το σχήμα της καμπύλης τήξης τους. Όπως φαίνεται και από την **Εικόνας 28** και **29** τα ομόζυγα δείγματα έχουν καμπύλες τήξης με παρόμοιο σχήμα και διακρίνονται μεταξύ τους από τη διαφορά στη θερμοκρασία τήξης (Tm) του κάθε DNA (δείγμα). Αντίθετα, οι καμπύλες τήξης που εμφανίζουν ένα ξεχωριστό σχήμα καμπύλης από τις καμπύλες τήξης των ομόζυγων συνήθως προέρχονται από ετερόζυγα δείγματα. Επιπλέον, μια ακόμα πληροφορία από την οποία είναι δυνατόν να φανεί αν πρόκειται για ομόζυγο ή ετερόζυγο δείγμα είναι ο αριθμός των κορυφών στην καμπύλη τήξης της PCR πραγματικού χρόνου που προηγείται της HRM. Συγκεκριμένα μετά την ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα με το γονότυπο GA εμφανίζουν δύο κορυφές (Βλ. **Εικόνας 14** και **17**, στις οποίες απεικονίζεται το δείγμα Apre 16 που είναι ετερόζυγο) καθώς και τα δείγματα τα οποία εμφανίζουν μια τάση με αυτό το γονότυπο. Με βάση τα παραπάνω μπορεί να θεωρηθεί ίσως με μεγάλη πιθανότητα ότι τα δείγματα Apre 5, Apre 21, Apre 23, Cos 5 και Cos 21 είναι ετερόζυγα και άρα έχουν γονότυπο GA. Όσον αφορά το δείγμα Apre 38 το μόνο που μπορεί να ειπωθεί είναι ότι πρόκειται για ομόζυγο άτομο.

Συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 12** παρουσιάζονται οι γονότυποι όλων των δειγμάτων (με εξαίρεση το δείγμα Apre 38 που δεν συσχετίστηκε σημαντικά με κάποιο από τα ομόζυγα πρότυπα) που προέκυψαν μετά την ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου – HRM. Στον **Πίνακα 12** τα δείγματα στα οποία έχει θεωρηθεί ποιος είναι ο γονότυπός τους είναι σημειωμένα με έντονη γραφή.

<b>Πίνακας 12. Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με απρεμιλάστη.</b>		
<b>Γονότυπος GG</b>	<b>Γονότυπος AA</b>	<b>Γονότυπος GA</b>
Apre 1	Apre 7	Apre 4
Apre 2	Apre 26	<b>Apre 5</b>
Apre 6		Apre 8
Apre 9		Apre 10
Apre 11		Apre 14
Apre 13		Apre 16
Apre 15		Apre 18
Apre 17		Apre 19
Apre 20		<b>Apre 21</b>
Apre 25		<b>Apre 23</b>
Apre 27		Apre 24
Apre 30		Apre 29
Apre 33		Apre 31
Apre 34		<b>Cos 5</b>
Apre 36		Cos 10
Apre 37		<b>Cos 21</b>
Cos 2		Cos 23

Τέλος, στον **Πίνακα 13** καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε γονοτύπου για τα 36 δείγματα από τα 37 που μελετήθηκαν καθώς επίσης και οι συχνότητες των

γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs172043 που αναφέρονται στον ευρωπαϊκό, στον ισπανικό και στον ιταλικό πληθυσμό (Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από τη βάση δεδομένων Ensembl <https://www.ensembl.org>) με τις οποίες φαίνεται ότι συνάδουν.

<b>Πίνακας 13: Οι συχνότητες των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs172043</b>			
<b>Πληθυσμός (αριθμός δείγματος)</b>	<b>Συχνότητα GG</b>	<b>Συχνότητα GA</b>	<b>Συχνότητα AA</b>
Ευρωπαίοι (503)	0,451	0,412	0,137
Ισπανοί (107)	0,458	0,383	0,159
Ιταλοί (107)	0,421	0,477	0,103
<b>Αποτελέσματα πειράματος (36)</b>	0,47	0,47	0,05

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο μιας ευρύτερης μελέτης, την διερεύνηση της συσχέτισης SNPs στα γονίδια που κωδικοποιούν την PDE4C με την απόκριση των ασθενών με ψωρίαση στην θεραπεία με απρεμιλάστη, που αποτελεί εκλεκτικό αναστολέα του ενζύμου. Ειδικότερα, σε αυτήν την εργασία έγινε γονοτύπηση του SNP rs172043 (G/A) του γονιδίου *PDE4C* σε δείγμα 37 ασθενών με ψωρίαση που βρίσκονται σε αγωγή με απρεμιλάστη. Μέχρι τώρα δεν έχει δημοσιευτεί κάποια αντίστοιχη φαρμακογενετική μελέτη οπότε δεν υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων, με αποτελέσματα άλλων ερευνών. Οι περισσότερες φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, αφορούν τις συστημικές θεραπείες και τους βιολογικούς παράγοντες. Η ανάγκη, όμως, για τη συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει από το γεγονός ότι η απρεμιλάστη συνίσταται ως επιλογή δεύτερης γραμμής στη θεραπεία της ψωρίασης. Πιο συγκεκριμένα, χορηγείται, όταν οι συστημικές θεραπείες αποτύχουν, αντενδείκνυνται ή προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες (Nast, A., et al., 2018). Αυτό συμβαίνει, γιατί η απρεμιλάστη αποτελεί μια θεραπεία με καλή απόκριση και εμφανίζει ελάχιστες παρενέργειες. Ένας άλλος λόγος που κάνει αναγκαία μια τέτοια μελέτη είναι το γεγονός ότι έχει αναφερθεί ότι η απρεμιλάστη δρα σε προγενέστερο σημείο στον φλεγμονώδη καταρράκτη από τους βιολογικούς παράγοντες που στοχεύουν τον TNF- $\alpha$  (π.χ. infliximab, adalimumab), την IL-12/23 (ustekinumab) ή την IL-17A (secukinumab, ixekizumab), με αποτέλεσμα την ευρεία ρύθμιση πολλαπλών φλεγμονωδών μεσολαβητών (Haber, S. L., et al, 2016).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη γονοτύπηση, έδειξαν ότι η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου είναι 0,291 και βρίσκεται σε συμφωνία με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (0,343). Σχετικά με τις γονοτυπικές συχνότητες, ταυτοποιήθηκαν 17 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (G/G), 2 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (A/A) και 12 ετερόζυγοι ασθενείς (G/A). Στους ετερόζυγους ασθενείς πιθανόν εντάσσονται ακόμα 5 ασθενείς (δείγματα Apre 5, Apre 21, Apre 23, Cos 5 και Cos 21) λόγω της τάσης περίπου 70% έως 72% που έδειξαν, αλλά αυτό το συμπέρασμα χρειάζεται επιβεβαίωση. Επιπλέον, στο σύνολο των 37 δειγμάτων για ένα δείγμα, το Apre 38, από την ανάλυση δεν ήταν δυνατόν να προκύψει κάποιο συμπέρασμα για τον γονότυπό του. Τα παραπάνω δείγματα δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστούν με κάποιο πρότυπο με ποσοστό  $\geq 90\%$  πιθανόν, γιατί η ενεργή περιοχή τήξης, δηλαδή η περιοχή στην οποία γίνεται η τήξη του κυρίου προϊόντος, όλων των δειγμάτων είχε εύρος από 77°C - 82°C. Συνεπώς, πολύ μικρές διαφορές στο Tm να μην επέτρεπαν την ταυτοποίηση του γονοτύπου. Επιπλέον, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι στο τμήμα του DNA που περιέχεται το SNP που εξετάζεται να υπάρχει και κάποιο άλλο SNP. Ωστόσο, αυτό ελέγχθηκε για τα SNPs που βρίσκονται εντός του προϊόντος της PCR και η συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου είναι  $< 0,01$ . Αρά, δεν οφείλεται σε αυτό η δυσκολία της εύρεσης του γονοτύπου. Τέλος, ένας άλλος λόγος που πιθανόν δυσκολεύει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι ότι οι εκκινήτες, που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *PDE4C* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs17204, σχηματίζουν διμερή (<https://www.qiagen.com>).

Στην παρούσα εργασία ο προσδιορισμός του γονοτύπου έγινε με τη μέθοδο της ανάλυση καμπύλης τήξης DNA υψηλής διακριτικότητας (HRM). Πρόκειται για μια σχετικά νέα μέθοδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση του γονοτύπου σε SNPs αντί των παραδοσιακών μεθόδων όπως είναι η ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) και η αλληλούχηση του DNA, η οποία έχει και μεγαλύτερο κόστος. Η HRM παρέχει υψηλή εξειδίκευση, ευαισθησία και είναι

γρήγορη και εξαιρετικά αποδοτική μέθοδος που βασίζεται στην ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA. Ειδικότερα, χαρακτηρίζει δείγματα DNA σύμφωνα με τη συμπεριφορά μετουσίωσης τους και ανιχνεύει μικρές διαφορές στις ενισχυμένες αλληλουχίες DNA με PCR μόνο μέσω άμεσης τήξης χωρίς την ανάγκη επεξεργασίας μετά την PCR. Τέλος, η μέθοδος αυτή επιτρέπει και τη διάκριση ανάμεσα σε ετερόζυγα και ομόζυγα άτομα για μία παραλλαγή στα υπό μελέτη δείγματα.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της τεχνικής αυτής και από την εφαρμογή της παρατηρήθηκε ότι πρόκειται για μια μέθοδο αρκετά ευαίσθητη λόγω του ότι σε πρώτο στάδιο προηγείται ενίσχυση με PCR πραγματικού χρόνου. Η επιτυχία της αντίδρασης φάνηκε ότι βασίζεται στην πολύ καλή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων του DNA. Σε αυτό μεγάλο ρόλο παίζει πρωτίστως η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό όσο και οι πιπέτες που χειρίζονται. Σε πρώτη φάση για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Quawell (εναλλακτικό του Nanodrop), διότι μέσα από βιβλιογραφική έρευνα παρατηρήθηκε ότι σε μελέτες που γίνονταν χρήση της τεχνικής HRM η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιούνταν με το φωτόμετρο Nanodrop. Ένας άλλος λόγος που συνέβαλε στην επιλογή του Quawell για την ποσοτικοποίηση είναι ότι δεν υπάρχει κόστος ως προς τα αναλώσιμα. Ωστόσο, λόγω του ότι το σήμα φθορισμού δεν ήταν πολύ υψηλό, θεωρήθηκε ότι αυτό οφείλεται στην ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε και η οποία πιθανόν ήταν υπερεκτιμημένη. Το Quawell στηρίζεται στη ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Συγκεκριμένα τόσο το DNA, αλλά και το RNA, εμφανίζουν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm. Λόγω αυτού μικρή ποσότητα RNA που μπορεί να υπήρχε στο δείγμα να μετρήθηκε με αποτέλεσμα να γίνει υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA. Λόγω αυτού υπήρχε πρόβλημα και στην ανάλυση της HRM. Γενικά, η χρήση πολύ μικρής αρχικής ποσότητας DNA μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα χωρίς επαναληψιμότητα. Έτσι, έγινε ποσοτικοποίηση και με τη χρήση του φθορισμόμετρου Qubit® 2.0 που σαν μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη, διότι γίνεται χρήση χρωστικής που δεσμεύεται εκλεκτικά στο DNA. Οι μετρήσεις από το φθορισμόμετρο σε σχέση με αυτές του Quawell ήταν αρκετά μικρότερες επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι τα δείγματά ήταν πιο αραιά από ότι έδειξαν οι μετρήσεις από το φωτόμετρο. Το πρόβλημα με την πολύ μικρή αρχική ποσότητα του DNA δεν ήταν δυνατόν να αποφευχθεί. Αυτό πιθανόν οφείλεται κυρίως στο ότι τα δείγματα αίματος ήταν πλούσια σε ερυθροκύτταρα και όχι σε λευκά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να απομονωθεί DNA σε μεγάλη συγκέντρωση από όλα τα δείγματα. Συνεπώς, και το βιολογικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να επηρεάσει σε ένα βαθμό την ακρίβεια της μεθόδου. Επιπρόσθετα, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει και η ποσότητα που θα χρησιμοποιηθεί από κάθε δείγμα. Ειδικότερα, απαιτείται να χρησιμοποιούνται ίδιες ποσότητες από το γονιδιωματικό DNA για όλα τα δείγματα και να μη διαφέρουν στο  $C_i$  περισσότερο από τρεις κύκλους. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια όλου του πειράματος παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που ανήκουν στο ίδιο πρότυπο ομαδοποιούνται όταν η διαφορά στο  $C_i$  τους είναι το πολύ μέχρι 2 κύκλους. Σε αυτό εξαίρεση αποτέλεσε ένα δείγμα, το Apr 31, το οποίο εμφάνιζε μια διαφορά περίπου 4 κύκλους στο  $C_i$  σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ύστερα από την αραιώση που του έγινε με βάση τις μετρήσεις που είχαν γίνει να καθυστερεί να ξεκινήσει σε σχέση με τα άλλα δείγματα. Από αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι το κυριότερο και σημαντικότερο ρόλο για την εύρεση του γονοτύπου μέσω της μεθόδου της HRM έχει η αρχική ποσότητα του DNA. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί και από το γεγονός ότι η συγκέντρωση ενός θραύσματος DNA επηρεάζει τη θερμοκρασία τήξης του ( $T_m$ ) και κατ' επέκταση στην περίπτωση της HRM



την ταυτοποίηση του γονοτύπου και την ομαδοποίηση των δειγμάτων. Τέλος, η χρήση εκκινητών που σχηματίζουν διμερή μπορεί να δυσκολέψει την ανάλυση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της HRM (<https://www.qiagen.com>). Σε αυτό φαίνεται, λοιπόν, να οφείλεται και το πρόβλημα που προέκυψε για την ταυτοποίηση 6 δειγμάτων από τα 37 δείγματα ασθενών με ψωρίαση που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία. Συνεπώς, η εφαρμογή της HRM για τη γονοτύπηση ενός μόνο SNP, όπως φαίνεται από τα παραπάνω, είναι τελικά “επίπονη” και χρονοβόρα. Και αυτό, διότι το σημαντικότερο βήμα πριν τη χρήση αυτής της μεθόδου είναι η ακριβής ποσοτικοποίηση όλων των δειγμάτων DNA που θα χρησιμοποιηθούν. Ωστόσο, αν έχει επιτευχθεί καλή ποσοτικοποίηση σε ένα μεγάλο αριθμό δειγματος θα μπορούσε να αποτελέσει ίσως και την πρώτη επιλογή ως μέθοδο για τον προσδιορισμό του γονοτύπου, στην περίπτωση γονοτύπησης πολλών SNPs στη ίδια ομάδα ασθενών.

Στα αποτελέσματα δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης, επειδή ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν επαρκεί έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστα συμπεράσματα με στατιστική ισχύ για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs172043 με την απόκριση στη θεραπεία με απρεμιλάστη. Αυτό θα γίνει σε επόμενο στάδιο της μελέτης όταν θα έχει συλλεχθεί ικανός αριθμός δειγμάτων. Επίσης, για την επιβεβαίωση των γονοτύπων των δειγμάτων πρέπει να γίνει και αλληλούχηση. Συγκεκριμένα, πρέπει να γίνει αλληλούχηση για ένα δείγμα από τα δείγματα που έχουν τον ίδιο γονότυπο όσο και για τα δείγματα των οποίων ο γονότυπος τους δεν συσχετίστηκε με ποσοστό  $\geq 90\%$  με το γονότυπο τον οποίο έχει θεωρηθεί ότι έχουν. Ωστόσο, ένα προϊόν PCR μεγαλύτερου μεγέθους από 105 bp για το ίδιο SNP ίσως θα καθιστούσε πιο αποτελεσματική την μέθοδο της αλληλούχησης.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agúndez, J. A. G., Abad-Santos, F., Aldea, A., Alonso-Navarro, H., Bernal, M. L., Borobia, A. M., ... García-Martín, E. (2012). Toward a clinical practice guide in pharmacogenomics testing for functional polymorphisms of drug-metabolizing enzymes. Gene/drug pairs and barriers perceived in Spain. *Frontiers in Genetics*, 3.
- Alexander, H. & Nestle, F. O. (2017). Pathogenesis and immunotherapy in cutaneous psoriasis: what can rheumatologists learn?. *Curr Opin Rheumatol*, 29(1), p.71-78.
- Ayala-Fontanez, N., Soler, D.C., McCormick, T.S. (2016). Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis*, 6, p.7–32.
- Batalla, A., Coto, E., González-Fernández, D., ... Coto-Segura, P. (2015). The Cw6 and late-cornified envelope genotype plays a significant role in anti-tumor necrosis factor response among psoriatic patients. *Pharmacogenet Genomics*, 25, p.313–316.
- Baurecht, H., Hotze, M., Brand, S., Büning, C., Cormican, P., Corvin, A., ... Brown, S. J. (2015). Genome-wide Comparative Analysis of Atopic Dermatitis and Psoriasis Gives Insight into Opposing Genetic Mechanisms. *The American Journal of Human Genetics*, 96(1), p.104–120.
- Bejaoui, Y., Witte, M., Abdelhady, M., Eldarouti, M., Abdallah, N. M. ., Elghzaly, A. A., ... Ibrahim, S. M. (2019). Genome-wide association study of psoriasis in an Egyptian population. *Experimental Dermatology*.
- Bender, A. T. & Beavo, J. A. (2006). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacological Reviews*, 58(3), p.488–520.
- Bernard, F.-X., Morel, F., Camus, M., Pedretti, N., Barrault, C., Garnier, J., & Lecron, J.-C. (2012). Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Journal of Allergy*, 2012.
- Boehncke, W.-H. & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *Lancet*, 386(9997), p.983-994.
- Bowcock, A. M. (2005). THE GENETICS OF PSORIASIS AND AUTOIMMUNITY. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, p.93–122.
- Campalani, E., Allen, M. H., Fairhurst, D., Young, H. S., Mendonca, C. O., Burden, A. D., ... Smith, C. H. (2006). Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with psoriasis but do not determine disease response to acitretin. *British Journal of Dermatology*, 154(2), p.345–352.
- Campalani, E., Arenas, M., Marinaki, A. M., Lewis, C. M., Barker, J. N. W. N., & Smith, C. H. (2007). Polymorphisms in Folate, Pyrimidine, and Purine Metabolism Are Associated with Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8), p.1860–1867.
- Capon, F., Bijlmakers, M.-J., Wolf, N., Quaranta, M., Huffmeier, U., Allen, M., ... Trembath, R. C. (2008). Identification of ZNF313 / RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene. *Human Molecular Genetics*, 17(13), p.1938–1945.
- Capon, F., Munro, M., Trembath, R., & Barker, J. (2002). Searching for the Major Histocompatibility Complex Psoriasis Susceptibility Gene. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(5), p.745–751.
- Chen, W., Xu, H., Wang, X., Gu, J., Xiong, H., & Shi, Y. (2015). The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 28(1), p.146–153.
- Chen, X., Tan, Z., Yue, Q., ... Li, J. (2006). The expression of interleukin-23 (p19/ p40) and interleukin-12 (p35/p40) in psoriasis skin. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 26, p.750–752.
- Chiricozzi, A., Caposiena, D., Garofalo, V., Cannizzaro, M. V., Chimenti, S., & Saraceno, R. (2016). A new therapeutic for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: apremilast. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(3), p.237–249.
- Chiricozzi, A., Romanelli, P., Volpe, E., Borsellino, G., & Romanelli, M. (2018). Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), p.179.
- Chiu, H.Y., Huang, P.-Y., Jee, S.-H., Hu, C.-Y., ... Tsai, T.-F. (2012). HLA polymorphism among Chinese patients with chronic plaque psoriasis: subgroup analysis: HLA polymorphism among Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 166, p.288–297.
- Chularojanamontri, L., Charoenpipatsin, N., Silpa-Archa, N., Wongpraparut, C. & Thongboonkerd, V. (2019). Proteomics in Psoriasis. *Int J Mol Sci*, 20(5), p.1141.
- Claudia, C.-D., María-Elena, V.-H., Josué, V.-E., María-Carmen, B.-C., Alain-Raimundo, R.-O., & Martha-Estrella, G.-P. (2020). Small molecules under development for psoriasis: on the road to the individualized therapies. *Archives of Dermatological Research*, 312(9), p.611-627.
- Crilly, A., Robertson, S. E., Reilly, J. H., ... McInnes, I. B. (2011). Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis*, 70, p.1130–1137.
- Cuddapah, S., Barski, A., & Zhao, K. (2010). Epigenomics of T cell activation, differentiation, and memory. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), p.341–347.
- Cutolo, M., Myerson, G. E., Fleischmann, R. M., ... Poder, A. (2016). A phase III, randomized, controlled trial of apremilast in patients with psoriatic arthritis: results of the PALACE 2 trial. *J Rheumatol*, 43(9), p.1724–1734.

- De Cid, R., Riveira-Munoz, E., Zeeuwen, P.L., ... Estivill, X. (2009). Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis population. *Nat Genet*, 41, p.211–215.
- Deng, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2016). The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 50(3), p.377–389.
- De Simone, C., Farina, M., Maiorino, A., Fanali, C., Perino, F., ... Flamini, A. (2015). TNF-alpha gene polymorphisms can help to predict response to etanercept in psoriatic patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29, p.1786–1790.
- Di Meglio, P., Villanova, F., & Nestle, F. O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(8).
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Goss, C., Anz, D., ... Schaubert, J. (2011). Cytosolic DNA Triggers Inflammasome Activation in Keratinocytes in Psoriatic Lesions. *Science Translational Medicine*, 3(82).
- Edwards, C. J., Blanco, F. J., Crowley, J., ... Bird, P. (2016). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with psoriatic arthritis and current skin involvement: a phase III, randomised, controlled trial (PALACE 3). *Ann Rheum Dis*, 75(6), p.1065–1073.
- Elder, J. T. (2006). PSORS1: Linking Genetics and Immunology. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(6), p.1205–1206.
- Elder, J.T., Nair, R.P., Guo, S.W., Henseler, T., Christophers, E., Voorhees, J.J. (1994). The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*, 130(2), p.216–24.
- Ellinghaus, D., Ellinghaus, E., Nair, R. P., Stuart, P. E., Esko, T., Metspalu, A., ... Franke, A. (2012). Combined Analysis of Genome-wide Association Studies for Crohn Disease and Psoriasis Identifies Seven Shared Susceptibility Loci. *The American Journal of Human Genetics*, 90(4), p.636–647.
- Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., ... Bethune, J. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature Genetics*, 48(5), p.510–518.
- Ellinghaus, E., Ellinghaus, D., Stuart, P. E., Nair, R. P., Debrus, S., Raelson, J. V., ... Franke, A. (2010). Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2. *Nature Genetics*, 42(11), p.991–995.
- Farber, E. M., & Nall, L. (1974). The Natural History of Psoriasis in 5,600 Patients. *Dermatology*, 148(1), p.1–18.
- Farber, E.M., Nall, M.L., Watson, W. (1974). Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch. Dermatol*, 109(2), p.207–211.
- Frischknecht, L., Vecellio, M., & Selmi, C. (2019). The role of epigenetics and immunological imbalance in the etiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 11.
- Gallo, E., Cabaleiro, T., Román, M., Solano-López, G., Abad-Santos, F., García-Díez, A., & Daudén, E. (2013). The relationship between tumour necrosis factor (TNF)-α promoter and IL12B/IL-23R genes polymorphisms and the efficacy of anti-TNF-α therapy in psoriasis: a case-control study. *British Journal of Dermatology*, 169(4), p.819–829.
- Galluzzo, M., Boca, A.N., Botti, E., Potenza, C., Malara, G., ... Costanzo, A. (2015). IL12B (p40) gene polymorphisms contribute to ustekinumab response prediction in psoriasis. *Dermatology*, 232, p.230–236.
- Garcês, S., Demengeot, J., & Benito-Garcia, E. (2012). The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(12), p.1947–1955.
- García-Pérez, M.-E., Jean, J., & Pouliot, R. (2012). Antipsoriatic Drug Development: Challenges and New Emerging Therapies. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 6(1), p.3–21.
- García-Pérez, M.-E., Stevanovic, T., & Poubelle, P. E. (2013). New therapies under development for psoriasis treatment. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(4), p.480–487.
- Gerke, J., Lorenz, K., & Cohen, B. (2009). Genetic Interactions Between Transcription Factors Cause Natural Variation in Yeast. *Science*, 323(5913), p.498–501.
- Glant, T. T., Mikecz, K., & Rauch, T. A. (2014). Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Medicine*, 12.
- Golan, D., Lander, E. S., & Rosset, S. (2014). Measuring missing heritability: Inferring the contribution of common variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49).
- González-Lara, L., Batalla, A., Coto, E., Gómez, J., Eiris, N., Santos-Juanes, J., ... Coto-Segura, P. (2014). The TNFRSF1B rs1061622 polymorphism (p.M196R) is associated with biological drug outcome in Psoriasis patients. *Archives of Dermatological Research*, 307(5), p.405–412.
- Gossec, L., Smolen, J. S., Ramiro, S., ... van der Heijde, D. (2016). European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Ann Rheum Dis*, 75(3), p.499–510.
- Gourraud, P.-A., Khankhanian, P., Cereb, N., Yang, S. Y., Feolo, M., Maiers, M., ... Oksenberg, J. (2014). HLA Diversity in the 1000 Genomes Dataset. *PLoS ONE*, 9(7).
- Grän, F., Kerstan, A., Serfling, E., Goebeler, M., & Muhammad, K. (2020). Current Development in the Immunology of Psoriasis. *Yale J Biol Med*, 93(1), p.97–110.

- Gunter, N. V., Yap, B. J., Chua, C. L. & Yap, W. H. (2019). Combining Understanding of Immunological Mechanisms and Genetic Variants Toward Development of Personalized Medicine for Psoriasis Patients. *Front. Genet.*, 10.
- Haber, S. L., Hamilton, S., Bank, M., ... Pierce, E. (2016). Apremilast: a novel drug for treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Pharmacother*, 50(4), p.282–290.
- Hägg, D., Eriksson, M., Sundström, A., Schmitt-Egenolf, M. (2013). The higher proportion of men with psoriasis treated with biologics may be explained by more severe disease in men. *PLoS One*.
- Harden, J. L., Krueger, J. G., & Bowcock, A. M. (2015). The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64, p.66–73.
- Hernández-Flórez, D., & Valor, L. (2016). Selective phosphodiesterase inhibitors: a new therapeutic option in inflammation and autoimmunity. *Reumatol. Clin*, 12, p.303–306.
- Hüffmeier, U., Bergboer, J. G. M., Becker, T., Armour, J. A., Traupe, H., Estivill, X., ... Reis, A. (2010). Replication of LCE3C–LCE3B CNV as a Risk Factor for Psoriasis and Analysis of Interaction with Other Genetic Risk Factors. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(4), p.979–984.
- Hüffmeier, U., Uebe, S., Ekici, A. B., Bowes, J., Giardina, E., Korendowych, E., ... Reis, A. (2010). Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nature Genetics*, 42(11), p.996–999.
- Hunt, K. A., Mistry, V., Bockett, N. A., Ahmad, T., Ban, M., Barker, J. N., ... van Heel, D. A. (2013). Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability. *Nature*, 498(7453), p.232–235.
- Indhumathi, S., Rajappa, M., Chandrashekar, L., Ananthanarayanan, P. H., Thappa, D. M., & Negi, V. S. (2017). Pharmacogenetic markers to predict the clinical response to methotrexate in south Indian Tamil patients with psoriasis. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 73(8), p.965–971.
- Julià, M., Guilabert, A., Lozano, F., Suarez-Casasús, B., Moreno, N., Carrascosa, J. M., ... Mascaró, J. M. (2013). The Role of Fcγ Receptor Polymorphisms in the Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Psoriasis. *JAMA Dermatology*, 149(9), p.1033-1039.
- Julià, A., Ferrándiz, C., Dauden, E., ... Marsal, S. (2014). Association of the PDE3A-SLCO1C1 locus with the response to anti-TNF agents in psoriasis. *Pharmacogenomics J*, 15, p.322–325.
- Julià, A. & Marsal, S. (2016). Pharmacogenomics of anti-TNF response in psoriasis, where are we? *Pharmacogenomics*, 17, p.323–6.
- Jullien, D., Prinz, J. C., & Nestle, F. O. (2015). Immunogenicity of Biotherapy Used in Psoriasis: The Science Behind the Scenes. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(1), p.31–38.
- Kamata, M. & Tada, Y. (2017). Safety of biologics in psoriasis. *J Dermatol*, 45(3), p.279-286.
- Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2019). Risk Factors for the Development of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), p.4347.
- Kavanaugh, A., Mease, P. J., Gomez-Reino, J. J., ... Schett, G. (2014). Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor. *Ann Rheum Dis*, 73(6), p.1020–1026.
- Keating, G. M. (2017). Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Drugs*, 77(4), p.459–472.
- Kenna, T. J., Robinson, P. C., & Haroon, N. (2015). Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, 54(9), p.1549–1556.
- Krieckaert, C., Rispens, T., & Wolbink, G. (2012). Immunogenicity of biological therapeutics. *Current Opinion in Rheumatology*, 24(3), p.306–311.
- Lee, K.-Y., Leung, K.-S., Tang, N. L. S., & Wong, M.-H. (2018). Discovering Genetic Factors for psoriasis through exhaustively searching for significant second order SNP-SNP interactions. *Scientific Reports*, 8(1).
- Lehrke, M., Kahles, F., Makowska, A., ... Findeisen, H. M. (2015). PDE4 inhibition reduces neointima formation and inhibits VCAM-1 expression and histone methylation in an Epac-dependent manner. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 81, p.23–33.
- Li, K., Huang, C. C., Randazzo, B., Li, S., Szapary, P., Curran, M., ... Brodmerkel, C. (2016). HLA-C\*06:02 Allele and Response to IL-12/23 Inhibition: Results from the Ustekinumab Phase 3 Psoriasis Program. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(12), p.2364–2371.
- Li, H., Zuo, J. & Tang, W. (2018). Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*, 9.
- Liang, Y., Sarkar, M.K., Tsoi, L.C., Gudjonsson, J.E. (2017). Psoriasis: A mixed autoimmune and autoinflammatory disease. *Curr. Opin. Immunol*, 49, p.1–8.
- Lin, C.-H., Chang, S.-H. & Fang, J.-Y. (2016). Recent Advances Using Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitors to Treat Inflammatory Disorders: Animal and Clinical Studies. *Current Drug Therapy*, 11(1).
- Linares-Pineda, T. M., Cañadas-Garre, M., Sánchez-Pozo, A. & Calleja-Hernández, M. Á. (2016). Gene polymorphisms as predictors of response to biological therapies in psoriasis patients. *Pharmacol Res*, 113, p.71–80.
- Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L. C., Duan, S., Gardner, J., ... Bowcock, A. M. (2008). A Genome-Wide Association Study of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Identifies New Disease Loci. *PLoS Genetics*, 4.

- Loft, N.D., Skov, L., Iversen, L., Gniadecki, R., Dam, T.N., Brandslund, I., ... Andersen, V. (2017). Associations between functional polymorphisms and response to biological treatment in Danish patients with psoriasis. *Pharmacogenomics J.*
- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of Psoriasis. *Annual Review of Immunology*, 32, p.227–255.
- Lysell, J., Padyukov, L., Kockum, I., Nikamo, P., & Ståhle, M. (2013). Genetic association with ERAP1 in psoriasis is confined to disease onset after puberty and not dependent on HLA-C\*06. *J. Investig. Dermatol.*, 133, p.411–417.
- Ma, H.L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., ... Young, D. A. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest*, 118, p.597–607.
- Mabuchi, T., Chang, T. W., Quinter, S., & Hwang, S. T. (2012). Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 65(1), p.4–11.
- Mahil, S. K., Capon, F., & Barker, J. N. (2015). Genetics of Psoriasis. *Dermatologic Clinics*, 33(1), p.1–11.
- Mahil, S. K., Capon, F., Barker, J. N. (2016). Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. *Semin Immunopathol*, 38(1), p.11-27.
- Man, H.-W., Schafer, P., Wong, L. M., ... Muller, G. W. (2009). Discovery of (S)-N-[2-[1-(3-ethoxy-4-methoxyphenyl)-2-methanesulfonylethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-yl] acetamide (apremilast), a potent and orally active phosphodiesterase 4 and tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor. *J Med Chem*, 52(6), p.1522–1524.
- Masouri, S., Stefanaki, I., Ntritsos, G., Kypreou, K. P., Drakaki, E., Evangelou, E., ... Antoniou, C. (2016). A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF- $\alpha$  and Anti-IL-12/23 Agents. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 20(3), p.221–225.
- Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov*, 13, p.290–314.
- McCann, F. E., Palfreeman, A. C., Andrews, M., ... Brennan, F. M. (2010). Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor- $\alpha$  from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12(3).
- Menter, A., Korman, N. J., Elmets, C. A., ... Bhushan, R. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 6. Guidelines of care for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: case-based presentations and evidence-based conclusions. *J Am Acad Dermatol*, 65, p.137–174.
- Michalek, I.M., Loring, B., John, S.M. (2017). A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*, 31(2), p.205–212.
- Moore, J. H., Asselbergs, F. W., & Williams, S. M. (2010). Bioinformatics challenges for genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 26(4), p.445–455.
- Murdaca, G., Gulli, R., Spanò, F., Lantieri, F., Burlando, M., Parodi, A., ... Puppo, F. (2014). TNF- $\alpha$  Gene Polymorphisms: Association with Disease Susceptibility and Response to Anti-TNF- $\alpha$  Treatment in Psoriatic Arthritis. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(10), p.2503–2509.
- Naesens, M., Kuypers, D.R. & Sarwal, M. (2009). Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, p.481–508.
- Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., ... Feng, B.-J. (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature Genetics*, 41(2), p.199–204.
- Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V. C., Jenisch, S., ... Elder, J. T. (2006). Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis Susceptibility 1 Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 78(5), p.827–851.
- Nestle, F. O., Turka, L. A. & Nickoloff, B. J. (1994). Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest*, 94(1), p.202-209.
- O’Rielly, D. D., & Rahman, P. (2015). Genetic, Epigenetic and Pharmacogenetic Aspects of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 41(4), p.623–642.
- O’Rielly, D. D., & Rahman, P. (2011). Pharmacogenetics of psoriasis. *Pharmacogenomics*, 12(1), p.87–101.
- Ohtsuki, M., Okub, Y., Komine, M., ... Nemoto, O. (2017). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in the treatment of Japanese patients with moderate to severe psoriasis: Efficacy, safety and tolerability results from a phase 2b randomized controlled trial. *J Dermatol*, 44(8), p.873-884.
- Ovejero-Benito, M. C., Muñoz-Aceituno, E., Reolid, A., Saiz-Rodríguez, M., Abad-Santos, F., & Daudén, E. (2017). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(2), p.209–222.
- Ovejero-Benito, M.C., Prieto-Perez, R., Llamas-Velasco, M., Belmonte, C., Cabaleiro, T., Roman, M., ... Abad-Santos, F. (2017). Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics*, 18, p.631–638.
- Page, C. P. (2014). Phosphodiesterase Inhibitors for the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, 165(3), p.152–164.

- Papp, K., Cather, J. C., Rosoph, L., Sofen, H., Langley, R. G., ... Day, R. M. (2012) Efficacy of apremilast in the treatment of moderate to severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Lancet*, 380(9843), p.738–746.
- Papp, K., Reich, K., Leonardi, C. L., Kircik, L., ... Griffiths, C. E. M. (2015). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, in patients with moderate to severe plaque psoriasis: results of a phase III, randomized, controlled trial (efficacy and safety trial evaluating the effects of apremilast in psoriasis [ESTEEM] 1). *J Am Acad Dermatol*, 73, p.37–49.
- Parisi, R., Symmons, D.P., Griffiths, C.E., Ashcroft, D.M., IMPACT project team. (2013). Global epidemiology of psoriasis: A systematic review of incidence and prevalence. *J. Invest. Dermatol*, 133(2), p.377-385.
- Paul, C., Cather, J., Gooderham, M., ... Gottlieb, A. B. (2015). Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis over 52 weeks: a phase III, randomized controlled trial (ESTEEM 2). *Br J Dermatol*, 173(6), p.1387–99.
- Pedersen, O. B., Svendsen, A. J., Ejstrup, L., Skytthe, A., & Junker, P. (2008). On the heritability of psoriatic arthritis. Disease concordance among monozygotic and dizygotic twins. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(10), p.1417–1421.
- Pincelli, C., Schafer, P. H., French, L. E., Augustin, M., Krueger, J. G. (2018). Mechanisms Underlying the Clinical Effects of Apremilast for Psoriasis. *J Drugs Dermatol*, 7(8), p.835-840.
- Pollock, R. A., Abji, F., & Gladman, D. D. (2017). Epigenetics of psoriatic disease: A systematic review and critical appraisal. *Journal of Autoimmunity*, 78, p.29–38.
- Popa, O. M., Cherciu, M., Cherciu, L. I., Dutescu, M. I., Bojinca, M., Bojinca, V., ... Popa, L. O. (2016). ERAP1 and ERAP2 gene variations influence the risk of psoriatic arthritis in Romanian population. *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 64, p.123–129.
- Prieto-Pérez, R., Cabaleiro, T., Daudén, E., Ochoa, D., Roman, M., & Abad-Santos, F. (2013). Genetics of Psoriasis and Pharmacogenetics of Biological Drugs. *Autoimmune Diseases*, 2013, p.1–13.
- Prieto-Pérez, R., Llamas-Velasco, M., Cabaleiro, T., ... Abad-Santos, F. (2017). Pharmacogenetics of ustekinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics*, 18(2), p.157-164.
- Prieto-Pérez, R., Solano-López, G., Cabaleiro, T., ... Abad-Santos, F. (2016). New polymorphisms associated with response to anti-TNF drugs in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics J*.
- Prieto-Pérez, R., Solano-López, G., Cabaleiro, T., Román, M., Ochoa, D., Tategón, M., ... Abad-Santos, F. (2015). The polymorphism rs763780 in the IL-17F gene is associated with response to biological drugs in patients with psoriasis. *Pharmacogenomics*, 16(15), p.1723–1731.
- Rajguru, J. P., Maya, D., Kumar, D., Suri, P., Bhardwaj, S. & Patel, N. D. (2020). Update on psoriasis: A review. *J Family Med Prim Care*, 9(1), p.20–24.
- Raker, V. K., Becker, C., Steinbrink, K. (2016). The cAMP Pathway as therapeutic target in autoimmune and inflammatory diseases. *Front Immunol*.
- Ranganathan, P. & McLeod, H. L. (2006). Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, p.366–1377.
- Rauschenberger, T., Schmitt, V., Azeem, M., Klein-Hessling, S., Murti, K., Grän, F., ... Muhammad, K. (2019). T Cells Control Chemokine Secretion by Keratinocytes. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci*, 20(6), p.1475.
- Riveira-Munoz, E., He, S.-M., Escaramís, G., Stuart, P. E., Hüffmeier, U., Lee, C., ... Estivill, X. (2011). Meta-Analysis Confirms the LCE3C\_LCE3B Deletion as a Risk Factor for Psoriasis in Several Ethnic Groups and Finds Interaction with HLA-Cw6. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(5), p.1105–1109.
- Roden, D. M., Wilke, R. A., Kroemer, H. K., & Stein, C. M. (2011). Pharmacogenomics: The Genetics of Variable Drug Responses. *Circulation*, 123(15), p.1661–1670.
- Ryan, C., Kelleher, J., Fagan, M. F., Rogers, S., Collins, P., Barker, J. N. W. N., ... Kirby, B. (2014). Genetic markers of treatment response to tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors in the treatment of psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 39(4), p.519–524.
- Sakkas, L. I., Mavropoulos, A., & Bogdanos, D. P. (2017). Phosphodiesterase 4 inhibitors in immune-mediated diseases: mode of action, clinical applications, current and future perspectives. *Curr. Med. Chem*, 24, p.3054–3067.
- Schafer, P. (2012). Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochemical Pharmacology*, 83(12), p.1583–1590.
- Schafer, P. H., Parton, A., Capone, L., Cedzik, D., Brady, H., Evans, J. F., ... Chopra, R. (2014). Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cellular Signalling*, 26(9), p.2016–2029.
- Schafer, P. H., Parton, A., Gandhi, A. K., ... Stirling, D. I. (2010). Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol*, 159(4), p.842–55.
- Schafer, P.H., Truzzi, F., Parton, A., ... Pincelli, C. (2016). Phosphodiesterase 4 in inflammatory diseases: effects of apremilast in psoriatic blood and in dermal myofibroblasts through the PDE4/CD271 complex. *Cell Signal*, 28(7), p.753–763.

- Spina, D. (2008). PDE4 inhibitors: current status. *Br J Pharmacol*, 155, p.308-15.
- Strand, V., Balsa, A., Al-Saleh, J., ... Marshall, L. (2017). Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. *BioDrugs*, 31(4), p.299-316.
- Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C. A., Knight, J., Weale, M. E., ... Bellenguez, C. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genetics*, 42(11), p.985–990.
- Strohal, R., Chimenti, S., Vena, G. A. & Girolomoni, G. (2013). Etanercept provides an effective, safe and flexible short-and long-term treatment regimen for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review of current evidence. *J Dermatol Treat*, 24, p.199–208.
- Stuart, P. E., Nair, R. P., Ellinghaus, E., Ding, J., Tejasvi, T., Gudjonsson, J. E., ... Elder, J. T. (2010). Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. *Nature Genetics*, 42(11), p.1000–1004.
- Sun, L.-D., Cheng, H., Wang, Z.-X., Zhang, A.-P., Wang, P.-G., Xu, J.-H., ... Zhang, F.-R. (2010). Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nature Genetics*, 42(11), p.1005–1009.
- Sutherland, A., Power, R. J., Rahman, P. & O'Rielly, D. D. (2016). Pharmacogenetics and pharmacogenomics in psoriasis treatment: current challenges and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 12(8), p.923-35.
- Talamonti, M., Botti, E., Galluzzo, M., Teoli, M., Spallone, G., ... Costanzo, A. (2013). Pharmacogenetics of psoriasis: HLA-Cw6 but not LCE3B/3C deletion nor TNFAIP3 polymorphism predisposes to clinical response to interleukin 12/23 blocker ustekinumab. *Br J Dermatol*, 169, p.458–63.
- Talamonti, M., Galluzzo, M., Chimenti, S., & Costanzo, A. (2016). HLA-C\*06 and response to ustekinumab in Caucasian patients with psoriasis: Outcome and long-term follow-up. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(2), p.374–375.
- Talamonti, M., Galluzzo, M., van den Reek, J.M., de Jong, E.M., ... Costanzo, A. (2017). Role of the HLA-C\*06 allele in clinical response to ustekinumab: evidence from real life in a large cohort of European patients. *Br. J. Dermatol*.
- Talamonti, M., Galluzzo, M., Zangrilli, A., Papoutsaki, M., Egan, C.G., Bavetta, M., ... Bianchi, L. (2017). HLA-C\*06:02 does not predispose to clinical response following long-term adalimumab treatment in psoriatic patients: a retrospective cohort study. *Mol Diagn Ther*, 21, p.295–301.
- Talaee, R., Hajheydari, Z., Moghaddam, A.Y., Moraveji, S.A., Ravandi, B.F. (2017). Prevalence of oral mucosal lesions and their association with severity of psoriasis among psoriatic patients referred to dermatology clinic: A cross-sectional study in Kashan/Iran. *Open Access Maced J Med Sci*, 5, p.978–982.
- Tang, H., Jin, X., Li, Y., Jiang, H., Tang, X., Yang, X., ... Mei, J. (2014). A large-scale screen for coding variants predisposing to psoriasis. *Nature Genetics*, 46(1), p.45–50.
- Tejasvi, T., Stuart, P. E., Chandran, V., Voorhees, J. J., Gladman, D. D., Rahman, P., ... Nair, R. P. (2012). TNFAIP3 Gene Polymorphisms Are Associated with Response to TNF Blockade in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), p.593–600.
- Thaçi, D., Kimball, A., ... Feldman, S. R. (2017). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, improves patient-reported outcomes in the treatment of moderate to severe psoriasis: results of two phase III randomized, controlled trials. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
- Tsoi, L. C., Spain, S. L., Ellinghaus, E., Stuart, P. E., Capon, F., Knight, J., ... Elder, J. T. (2015). Enhanced meta-analysis and replication studies identify five new psoriasis susceptibility loci. *Nature Communications*, 6.
- Tsoi, L. C., Spain, S. L., Knight, J., Ellinghaus, E., Stuart, P. E., ... Tejasvi, T. (2012). Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nature Genetics*, 44(12), p.1341–1348.
- Tsoi, L. C., Stuart, P. E., Tian, C., Gudjonsson, J. E., ... Elder, J. T. (2017). Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nat Commun*, 8.
- Van de Kerkhof, P.C.M. (2008). Options for the treatment of psoriasis: a multifactorial approach. *Clin Dermatol*, 26, p.419–423.
- Van Schouwenburg, P. A., Rispens, T., & Wolbink, G. J. (2013). Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 9(3), p.164–172.
- Vasilopoulos, Y., Manolika, M., Zafiriou, E., Sarafidou, T., Bagiatis, V., Krüger-Krasagaki, S., ... Roussaki-Schulze, A. (2012). Pharmacogenetic Analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B Gene Polymorphisms and Prediction of Response to Anti-TNF Therapy in Psoriasis Patients in the Greek Population. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 16(1), p.29–34.
- Vasilopoulos, Y., Sarri, C., Zafiriou, E., Patsatsi, A., Stamatis, C., Ntoumou, E., ... Sarafidou, T. (2014). A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *The Pharmacogenomics Journal*, 14(6), p.523–525.
- Warren, R.B., Smith, R.L., Campalani, E., ... Griffiths, C. E. M. (2008). Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128, p.1925–1929.

- Wells, A., Adebajo, A. O., Aelion, J. A., ... Edwards, C. J. (2014). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, is associated with long-term (52-week) improvement in the signs and symptoms of psoriatic arthritis in DMARD-naive patients: results from a phase 3, randomized, controlled trial [abstract no. 1543]. *Arthritis Rheumatol*, 66.
- Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol*, 185(11), p.6413–6419.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., ... de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 8, p.950–957.
- Wolf, R., Mascia, F., Dharamsi, A., Howard, O. M. Z., Cataisson, C., Bliskovski, V., ... Yuspa, S. H. (2010). Gene from a Psoriasis Susceptibility Locus Primes the Skin for Inflammation. *Science Translational Medicine*, 2(61).
- Woolf, R. T., & Smith, C. H. (2010). How genetic variation affects patient response and outcome to therapy for psoriasis. *Expert Review of Clinical Immunology*, 6(6), p.957–966.
- Xu, L., Li, Y., Zhang, X., Sun, H., Sun, D., Jia, X., ... Fu, S. (2011). Deletion of LCE3C and LCE3B genes is associated with psoriasis in a northern Chinese population. *British Journal of Dermatology*, 165(4), p.882–887.
- Yin, X., Low, H. Q., Wang, L., Li, Y., Ellinghaus, E., Han, J., ... Liu, J. (2015). Genome-wide meta-analysis identifies multiple novel associations and ethnic heterogeneity of psoriasis susceptibility. *Nature Communications*, 6.
- Young, H. S., Summers, A. M., Read, I. R., Fairhurst, D. A., Plant, D. J., Campalani, E., ... Griffiths, C. E. M. (2006). Interaction between Genetic Control of Vascular Endothelial Growth Factor Production and Retinoid Responsiveness in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(2), p.453–459.
- Zhang, X.-J., Huang, W., Yang, S., Sun, L.-D., Zhang, F.-Y., Zhu, Q.-X., ... Pu, X.-M. (2009). Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nature Genetics*, 41(2), p.205–210.
- Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., & Ouyang, W. (2006). Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445(7128), p.648–651.
- Zuo, X., Sun, L., Yin, X., Gao, J., Sheng, Y., Xu, J., ... Zhang, X. (2015). Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nature Communications*, 6.
- Zweegers, J., Groenewoud, J. M. M., van den Reek, J. M. P. A., ... de Jong, E. M. G. J. (2017). 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. *British Journal of Dermatology*, 176(4), p.1001–1009.