



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΓΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΛΗΔΑ-ΜΕΛΙΝΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

**ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΨΩΡΙΑΣΗ**

**PHARMACOGENETIC
RESEARCH ON
PSORIASIS**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια

Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι ένα σχετικά συχνό πολυπαραγοντικό νόσημα με αυτοάνοσα χαρακτηριστικά, το οποίο έχει φάσμα κλινικών φαινοτύπων και η σοβαρότητα κυμαίνεται από ήπια ως σοβαρή. Υπάρχει πληθώρα φαρμακευτικών επιλογών ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου αλλά έχει παρατηρηθεί διαφορά στην απόκριση των ασθενών. Αυτό οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας νέων φαρμάκων, καθώς και φαρμακογενετικής έρευνας για αναζήτηση μοριακών δεικτών, που μπορούν να προβλέψουν την απόκριση. Ένα νέο φάρμακο κατά της ψωρίασης είναι η απρεμιλάστη, ένας εκλεκτικός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE4). Οι PDE4 είναι μία οικογένεια ενζύμων που υδρολύουν το cAMP, δρώντας με αυτόν τον τρόπο ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Η απρεμιλάστη έχει επιδείξει ένα καλό προφίλ ασφάλειας και απόκρισης των ασθενών. Παρόλο που έχουν προηγηθεί φαρμακογενετικές μελέτες για άλλες θεραπείες, δεν υπάρχουν ανάλογες έρευνες για την απρεμιλάστη. Στην παρούσα έρευνα επιχειρήθηκε μία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs11670370 του γονιδίου *PDE4C* και της απόκρισης 37 ασθενών που λάμβαναν απρεμιλάστη για τουλάχιστον έξι μήνες. Για τη γονοτύπηση των ασθενών χρησιμοποιήθηκε μία σχετικά καινούργια μέθοδος, η HRM (Υψηλής Ανάλυσης Καμπύλες Τήξης), η οποία προσφέρει χαμηλότερο κόστος, μεγαλύτερη ακρίβεια και ταχύτητα σε σχέση με άλλες τεχνικές. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μικρότερη συχνότητα σπάνιου αλληλόμορφου (18%) σε σχέση με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (29%). Βρέθηκαν 15 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (CC), 8 ασθενείς ετερόζυγοι (CT) και 5 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (TT). Λόγω του χαμηλού αριθμού των δειγμάτων δεν πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου και της απόκρισης των ασθενών. Αυτή η συσχέτιση, λοιπόν, εκκρεμεί μέχρι να συγκεντρωθούν τουλάχιστον 100 δείγματα, ώστε να μπορεί να γίνει στατιστικά σημαντική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Λέξεις-κλειδιά: Ψωρίαση, φαρμακογενετική, απρεμιλάστη, *PDE4C*, HRM, SNP

ABSTRACT

Psoriasis is a relatively common multifactorial disease with autoimmune features, that has a range of clinical phenotypes and its severity can range from mild to severe. There is a variety of choices when it comes to medication, depending on the severity of the disease, but a difference in patient response has been observed. This has led to a need for new drug development, as well as pharmacogenetic research to be done in search of biomarkers that can predict the response. A new anti-psoriasis drug is apremilast, a selective phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor. PDE4s are a family of enzymes that hydrolyze the cAMP, a second messenger, thus acting as anti-inflammatory agents. Apremilast has a good safety profile and a positive patient response. Although pharmacogenetic studies have been performed on other therapeutic choices, there is no research on apremilast. In the present study, a correlation was attempted between the rs11670370 polymorphism of the *PDE4C* gene and the response of 37 patients receiving apremilast for at least six months. A relatively new method was used to genotype patients, HRM, which offers a lower cost but also greater accuracy and speed than other techniques. The results of the study showed a lower frequency of the rare allele (18%) than the frequency in Europeans (29%). 15 patients were found to be homozygous for the common allele (CC), 8 patients were heterozygous (CT) and 5 patients were homozygous for the rare allele (TT). Due to the low number of samples, no correlation was made between genotype and patient response. This correlation, therefore, is pending until at least 100 samples are collected, so that a statistically significant analysis can be made.

Keywords: Psoriasis, pharmacogenetics, apremilast, *PDE4C*, HRM, SNP

Πίνακας Περιεχομένων		
		ΣΕΛ.
1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1.	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΨΩΡΙΑΣΗΣ	8
1.1.1.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	8
1.1.2.	ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΨΩΡΙΑΣΗΣ	8
1.1.3.	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	10
1.2.	ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	11
1.3.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	12
1.4.	ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ	14
1.5.	ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ 4 (PDE4) ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΨΩΡΙΑΣΗ	18
1.6.	Η ΑΠΡΕΜΙΛΑΣΤΗ	20
1.7.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	22
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1.	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	22
2.2.	ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, SNPs) ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ PDE4A ΚΑΙ PDA4C	23
2.3.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ (SNPs) ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ PDE4A και PDE4C	23
2.4.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΑΙΜΑ	25
2.5.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA	25
2.5.1.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ QUAWELL	25
2.5.2.	ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ QUBIT	25
2.6.	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	26
2.6.1.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	27
2.7.	SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA)	27
2.8.	HRM (High-Resolution Melting, Υψηλής Ανάλυσης Καμπύλες Τήξης)	29

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1.	ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs)	31
3.2.	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	35
3.3.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA	37
3.4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs11670370	38
3.5.	ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ SSCP	38
3.6.	ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ HRM	39
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	45
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

Πίνακας Περιεχομένων για τους πίνακες (tables)		
		ΣΕΛ.
Κεφάλαιο 2		
Πίνακας 2.α	Συστατικά PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 50μl	26
Πίνακας 2.β	Συστατικά για την πηκτική πολυακρυλαμίδης	28
Πίνακας 2.γ	Συστατικά για τη χρώση της πηκτικής πολυακρυλαμίδης	29
Κεφάλαιο 3		
Πίνακας 3.α	Η καθαρότητα (λόγος 260/280) και η συγκέντρωσή (ng/μl) όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	37
Πίνακας 3.β	Γονοτύπηση δειγμάτων με HRM για το SNP rs11670370 του γονιδίου <i>PDE4C</i>	43

Πίνακας Περιεχομένων για τις εικόνες (figures)		
		ΣΕΛ.
Κεφάλαιο 1		
1.5.1.	Μακρές, βραχείες, υπερ-βραχείες και dead-short ισομορφές της PDE4	19
1.6.1.	Μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης	21
Κεφάλαιο 3		
3.1.1.	Tag SNPs για το γονίδιο PDE4C	33
3.1.2.	Tag SNPs για το γονίδιο PDE4A	34
3.2.1.	Προϊόν PCR για το SNP rs11670370	35
3.2.2.	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης PCR κλίσης θερμοκρασίας (rs11670370)	35
3.2.3.	Προϊόν PCR για το SNP rs11670504	36
3.2.4.	Προϊόν PCR για το SNP rs4804134	36
3.2.5.	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης PCR κλίσης θερμοκρασίας (rs11670504, rs4804134)	36
3.4.1.	Αποτελέσματα PCR για 15 δείγματα για SSCP	38
3.5.1.	Αποτελέσματα SSCP	39
3.7.1.	Quantitation Analysis	41
3.7.2.	HRM Analysis	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η ψωρίαση είναι μια μη μεταδοτική (InformedHealth.org, 2017) χρόνια φλεγμονώδης νόσος πολλαπλών συστημάτων, που πλήττει κυρίως το δέρμα και τις αρθρώσεις (Whan B. Kim et al., 2017), έχει έντονη γενετική προδιάθεση και αυτοάνοσα παθογόνα χαρακτηριστικά (Rendon et al., 2019). Είναι μια συχνή ασθένεια με ένα φάσμα κλινικών φαινοτύπων και προκύπτει από την αλληλεπίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών και ανοσολογικών παραγόντων (Paola Di Meglio et al., 2014). Ως ασθένεια συστημικής φλεγμονής, η ψωρίαση σχετίζεται με πολλαπλές συννοσηρότητες, συμπεριλαμβανομένων καρδιαγγειακών παθήσεων και κακοήθειας (Whan B. Kim et al., 2017).

1.1.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ψωρίαση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μια σχετικά διαδεδομένη ασθένεια. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι περίπου το 2% του πληθυσμού επηρεάζεται (InformedHealth.org, 2017), ενώ η συχνότητα εμφάνισης διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Είναι σπάνια στους ασιατικούς και κάποιους αφρικανικούς πληθυσμούς αλλά σε καυκάσιους και σκανδιναβούς νοσεί το 11% περίπου (Rendon et al., 2019). Οι άνδρες και οι γυναίκες είναι εξίσου πιθανό να πάσχουν (InformedHealth.org, 2017).

Η ψωρίαση συχνά πρωτοεμφανίζεται κατά τα πρώτα 40 χρόνια της ζωής (ψωρίαση τύπου 1), και ιδιαίτερα σε εφήβους ή νεαρούς ενήλικες, αλλά μπορεί να ξεκινήσει και σε παιδική ηλικία. Εάν εμφανιστεί αργότερα, αρχίζει συνήθως μεταξύ των ηλικιών 50 και 70 (ψωρίαση τύπου 2) (InformedHealth.org, 2017). Δεν αποκλείεται ωστόσο να παρουσιαστεί σε οποιαδήποτε ηλικία (Pragya A. Nai et al., 2020).

1.1.2. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Τα κυριότερα συμπτώματα είναι κοκκινωπές περιοχές στο δέρμα με «λέπια» που μπορεί να προκαλούν κνησμό. Πρόκειται για μια κατάσταση κατά την οποία εναλλάσσονται περίοδοι σοβαρών με περιόδους ήπιων δερματικών προβλημάτων ή και απουσία αυτών (InformedHealth.org, 2017).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της ψωρίασης είναι η παρατεταμένη φλεγμονή που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων και δυσλειτουργική διαφοροποίηση αυτών. Η ιστολογία της ψωριασικής πλάκας δείχνει ακάνθωση (επιδερμική υπερπλασία), η οποία καλύπτει φλεγμονώδεις διηθήσεις αποτελούμενες από δερμικά δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, T κύτταρα και ουδετερόφιλα. Η νεοαγγείωση είναι επίσης ένα σημαντικό χαρακτηριστικό. Οι φλεγμονώδεις οδοί που δραστηριοποιούνται στην ψωρίαση κατά πλάκας και τις υπόλοιπες κλινικές

παραλλαγές αλληλεπικαλύπτονται, αλλά παρουσιάζουν επίσης διακριτές διαφορές που αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά αποτελέσματα φαινότυπου και θεραπείας (Rendon et al., 2019). Τα διαφορετικά είδη ψωρίασης απαριθμούνται παρακάτω.

Ψωρίαση κατά πλάκας

Ο πιο κοινός τύπος ψωρίασης είναι η ψωρίαση κατά πλάκας με σαφώς καθορισμένες περιοχές του δέρματος, κοκκινωπές και ανάγλυφες που φέρουν ασημένια «λέπια» και αναφέρονται ως "πλάκες". Στην ψωρίαση κατά πλάκας, το δέρμα αποκαλύπτεται επειδή τα κύτταρα που σκληρύνουν το δέρμα (κερατινοκύτταρα) πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται στο εξωτερικό στρώμα του δέρματος και σχηματίζουν την προστατευτική επιδερμίδα. Στην υγιή επιδερμίδα πολλαπλασιάζονται, περνούν μέσα από διάφορες φάσεις ανάπτυξης και στη συνέχεια, συνήθως μέσα σε τέσσερις εβδομάδες, αποκολλώνται και πέφτουν ως νεκρά κύτταρα. Στην ψωρίαση, τα κερατινοκύτταρα περνούν αυτόν τον κύκλο πολύ πιο γρήγορα, μερικές φορές σε μόλις τέσσερις ημέρες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα νεκρά κύτταρα του δέρματος να μην ρίπτονται αρκετά γρήγορα ώστε να συμβαδίζουν με τα νέα κύτταρα του δέρματος που παράγονται. Το δέρμα στη συνέχεια γίνεται παχύτερο και ξεφλουδίζει πολύ περισσότερο στις πληγείσες περιοχές (InformedHealth.org, 2017).

Η ταχεία ανάπτυξη των δερματικών κυττάρων σε άτομα με ψωρίαση προκαλείται από αυτοάνοση απάντηση. Διάφορες φλεγμονώδεις διαδικασίες παίζουν σημαντικό ρόλο εδώ. Το δέρμα είναι συχνά κόκκινο λόγω της φλεγμονής και της αυξημένης ροής του αίματος (InformedHealth.org, 2017).

Το μέγεθος των πλακών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό και μπορεί να έχει διάμετρο πάνω από δέκα εκατοστά και ο αριθμός τους μπορεί να είναι από μία έως πολύ περισσότερες. Μερικοί άνθρωποι έχουν μόνο μερικές πλάκες σε ορισμένα μέρη του σώματός τους, για παράδειγμα μόνο στο τριχωτό. Πιο συχνά επηρεάζονται το κεφάλι, οι αγκώνες, τα γόνατα και η πλάτη. Πλάκες επίσης συχνά εμφανίζονται πίσω από τα αυτιά, στα χέρια, τα πόδια και τον αφαλό (InformedHealth.org, 2017).

Ψωριασική αρθρίτιδα

Η ψωριασική αρθρίτιδα επηρεάζει περίπου το 30% των ασθενών με ψωρίαση. Η δερματική νόσος συνήθως προηγείται της αρθριτικής νόσου κατά περίπου μία δεκαετία, η οποία κυμαίνεται από 7 έως 12 έτη. Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι πλέον γνωστή ως μια πιο σοβαρή ασθένεια από ότι είχε αναγνωριστεί προηγουμένως. Μελέτες έχουν δείξει ότι σχεδόν το 47% των ασθενών μπορεί να αναπτύξει διαβρωτική ασθένεια μέσα στα πρώτα 2 χρόνια. Η παρουσίαση της αρθρίτιδας μπορεί να ποικίλλει. Μπορεί να επηρεάσει μικρές και μεγάλες αρθρώσεις και εμφανίζεται ως οίδημα των αρθρώσεων (Whan B. Kim et al., 2017).

Η ψωριασική αρθρίτιδα μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τον αξονικό σκελετό με φλεγμονώδη πόνο στην πλάτη. Παρόλα αυτά, η ψωριασική αρθρίτιδα συχνά παραβλέπεται. Το 30% των ασθενών με ψωρίαση που παρακολούθηθηκε στις κλινικές δερματολογίας βρέθηκε να έχει μη διαγνωσμένη ψωριασική αρθρίτιδα. Οι ασθενείς με ψωρίαση του τριχωτού της κεφαλής και ψωρίαση των νυχιών έχουν υψηλότερο κίνδυνο ψωριασικής αρθρίτιδας. Πολλές από τις διαθέσιμες θεραπείες σήμερα για τις δερματικές αλλοιώσεις είναι επίσης πολύ αποτελεσματικές στη θεραπεία των αρθρώσεων (Whan B. Kim et al., 2017).

Άλλες μορφές ψωρίασης

Μερικές φορές τα νύχια των ανθρώπων με ψωρίαση πλάκας επηρεάζονται επίσης. Σε ψωρίαση των νυχιών αναπτύσσονται μικρές τρύπες στα νύχια και γίνονται παχύτερα ή κιτρινωπά-καφέ. Τα νύχια μπορεί επίσης να χαλαρώσουν (InformedHealth.org, 2017).

Ένας άλλος τύπος ψωρίασης είναι γνωστός ως φλυκταινώδης ψωρίαση. Εδώ τα συμπτώματα περιλαμβάνουν επίσης κυψέλες γεμάτες με ουλές (φλύκταινες). Η φλυκταινώδης ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί μόνη της ή μαζί με την ψωρίαση κατά πλάκας (InformedHealth.org, 2017).

Μία αρκετά σπάνια μορφή ψωρίασης είναι η γλουτατική ψωρίαση, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονο εξάνθημα μεγάλης κλίμακας με μικρά σταγονοειδή εξογκώματα. Είναι συχνότερη σε παιδιά και εφήβους και συνήθως εμφανίζεται μία έως δύο εβδομάδες μετά από ένα συγκεκριμένο τύπο βακτηριακής λοίμωξης (στρεπτοκοκκική λοίμωξη). Η γλουτατική ψωρίαση μπορεί να επουλωθεί εντελώς μέσα σε λίγες εβδομάδες ή μήνες, αλλά μπορεί επίσης να επανέλθει ή να μετατραπεί σε ψωρίαση κατά πλάκας (InformedHealth.org, 2017).

Λιγότερο κοινές παραλλαγές της ψωρίασης είναι η αντίστροφη ψωρίαση, η ψωρίαση των ούλων, η ερυθροδερμική ψωρίαση και η δακτυλιοειδής ψωρίαση. Αυτές οι παραλλαγές μπορούν να διαφοροποιηθούν από τον κοινό τύπο κατά πλάκας παρατηρώντας την μορφολογία (Whan B. Kim et al., 2017).

1.1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση είναι πρωτίστως κλινική και σπάνια απαιτείται βιοψία δέρματος. Η σοβαρότητα της νόσου μπορεί να βοηθήσει στην καθοδήγηση της διαχείρισης και χαρακτηρίζεται ως ήπια, μέτρια και σοβαρή. Για περισσότερες άτυπες παρουσιάσεις, μια βιοψία δέρματος μπορεί να φανεί χρήσιμη (Whan B. Kim et al., 2017). Είναι γεγονός ότι η μοναδική προσβασιμότητα του δέρματος για βιοψία ιστού επιτρέπει τη λεπτομερέστερη μελέτη των κυτταρικών και μοριακών προσδιορισμών των δερματικών παθήσεων σε σύγκριση με άλλες διαταραχές (Paola Di Meglio et al., 2014).

Τέσσερις δεκαετίες κλινικής και επιστημονικής έρευνας για την ψωρίαση έχουν διασαφηνίσει πολλούς από τους παθογόνους μηχανισμούς που αποτελούν τη

βάση της νόσου και έχουν ανοίξει το δρόμο για αποτελεσματικές και στοχευμένες θεραπείες. Ως μία από τις πιο κοινές παθήσεις του δέρματος, η ψωρίαση έχει λάβει μεγάλη προσοχή από κλινικούς και άλλους επιστήμονες, καθιστώντας την μοντέλο για τη μελέτη χρόνιας φλεγμονής και αυτή οδήγησε στην αποσαφήνιση πολλών υποκείμενων παθογόνων μηχανισμών. Το σημαντικότερο είναι ότι συνέβαλε σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν βελτιώσει σε σημαντικό βαθμό τη φροντίδα των ασθενών (Paola Di Meglio et al., 2014).

1.2. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η έναρξη πολυπαραγοντικών ασθενειών, όπως η ψωρίαση, λαμβάνει χώρα σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα στα οποία εμφανίζεται μια μη ρυθμισμένη ανοσοαπόκριση μετά από έκθεση σε ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρόλο που οι συσχετίσεις που συνδέουν διακριτούς περιβαλλοντικούς παράγοντες με συγκεκριμένους γενετικούς και μη ρυθμισμένες ανοσολογικές διεργασίες είναι ακόμα πολύ περιορισμένες/ελάχιστες, εντοπίστηκαν κρίσιμοι καθοριστικοί συντελεστές αυτής της παθολογικής αλληλεπίδρασης (Paola Di Meglio et al., 2014). Έχει παρατηρηθεί, για παράδειγμα, ότι περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με ψωρίαση επηρεάζεται από την ψωριασική αρθρίτιδα. Επιπλέον, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η λιπώδης ηπατική νόσος, το μεταβολικό σύνδρομο και οι καρδιαγγειακές διαταραχές συσχετίζονται συχνά με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση (Paolo Gisondi et al., 2017).

Από την άλλη, η ψωρίαση έχει γενετική συνιστώσα που υποστηρίζεται από πρότυπα οικογενειακής επανεμφάνισης. Οι συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού των ασθενών με ψωρίαση έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ψωρίασης, ενώ στα μονοζυγωτικά δίδυμα υπάρχει διπλάσια έως και τριπλάσια αύξηση κινδύνου σε σύγκριση με τα διζυγωτικά δίδυμα. Ο προσδιορισμός της ακριβούς επίδρασης της γενετικής στη διαμόρφωση των έμφυτων και προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων έχει αποδειχθεί προβληματικός για την ψωρίαση και άλλες πολυάριθμες ασθένειες στις οποίες μεσολαβεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την ψωρίαση εμπλέκονται σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών λειτουργιών όπως η παρουσίαση αντιγόνου, η φλεγμονή και η βιολογία των κερατινοκυττάρων (Rendon et al., 2019).

Ακόμη, η έλλειψη πλήρους συμφωνίας μεταξύ της έρευνας σε μονοζυγωτικά δίδυμα και της οικογενειακής επανεμφάνισης της νόσου, που δεν ακολουθεί ένα σαφές μοντέλο κληρονομικότητας, επιβεβαιώνει τον ορισμό της ψωρίασης ως ενός πολυπαραγοντικού γενετικού νοσήματος που προκύπτει από αλληλεπιδράσεις γονιδίου-γονιδίου και γονιδίου-περιβάλλοντος και εγείρει το ερώτημα σχετικά με την επιρροή της επιγενετικής στην ασθένεια (Paola Di Meglio et al., 2014).

Σε αντίθεση με τον ταχέως αναπτυσσόμενο κατάλογο γονιδίων ευαισθησίας στην ψωρίαση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την έναρξη της νόσου παραμένουν ασαφείς. Μεταξύ των γνωστών περιβαλλοντικών παραγόντων που υποβοηθούν την εμφάνιση της ψωρίασης, είναι τα φάρμακα, οι λοιμώξεις, τα σωματικά τραύματα, το κάπνισμα, το αλκοόλ και το άγχος (Paola Di Meglio et al., 2014).

Μεγάλες προσπάθειες για την κατανόηση της γενετικής συνιστώσας της ψωρίασης έχουν γίνει με τη χρήση διαφορετικών προσεγγίσεων και τεχνολογιών, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση ορισμένων γενετικών παραγόντων της ψωρίασης (Paola Di Meglio et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, στον κατάλογο GWAS (Genome Wide Association Studies, Μελέτες Ευρείας Γονιδιωματικής Συσχέτισης) (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) υπάρχουν 4.733 δημοσιεύσεις που αφορούν την ψωρίαση. Στις GWA μελέτες μεγάλος αριθμός tag SNPs ελέγχεται για όλο το γονιδίωμα, σε υγιείς και ασθενείς, για εντοπισμό διαφορών στη συχνότητα εμφάνισης αυτών με αποτέλεσμα τη συσχέτιση SNPs με την ασθένεια. Από το σύνολο αυτών των δημοσιεύσεων για την ψωρίαση προς το παρόν έχουν προκύψει 230 SNP τα οποία συσχετίζονται με την ψωρίαση. Λίστα με όλους τους γενετικούς τόπους που έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση βρίσκεται στο Παράρτημα 1.

1.3. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ψωρίαση συχνά απαιτεί μακροχρόνια θεραπεία (Rendon et al., 2019) και ενώ διατίθενται διάφορες μορφές, οι οποίες μπορούν να ανακουφίσουν τα συμπτώματα, δεν κατέστη δυνατή η εξάλειψή της (InformedHealth.org, 2017). Επιπλέον, η επιλογή θεραπείας καθορίζεται από τη σοβαρότητα της νόσου και τις συννοσηρότητες. Οι ασθενείς με ψωρίαση κατηγοριοποιούνται συχνά σε δύο ομάδες, ήπια ως μέτρια και μέτρια ως σοβαρή ψωρίαση, ανάλογα με την κλινική σοβαρότητα των βλαβών, το ποσοστό της πληγείσας επιφάνειας του σώματος και την ποιότητα ζωής του ασθενούς (Rendon et al., 2019).

Η κλινική σοβαρότητα της νόσου και η ανταπόκριση στη θεραπεία μπορούν να ταξινομηθούν μέσω διάφορων βαθμολογιών. Η βαθμολογία PASI (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε κλινικές δοκιμές, ειδικά σε εκείνες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των βιολογικών φαρμάκων (Rendon et al., 2019).

Η ήπια έως μέτρια ψωρίαση μπορεί να αντιμετωπιστεί τοπικά με συνδυασμό γλυκοκορτικοειδών, αναλόγων βιταμίνης D και φωτοθεραπείας (Rendon et al., 2019). Η φωτοθεραπεία, περιλαμβάνει την έκθεση των πλακών σε υπεριώδες φως (UV) που μειώνει τη φλεγμονή στο δέρμα και επίσης επιβραδύνει την παραγωγή των κυττάρων. Μερικές φορές φάρμακα που κάνουν το δέρμα πιο ευαίσθητο στο φως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τη φωτοθεραπεία (InformedHealth.org, 2017).

Για μέτρια ή σοβαρή ψωρίαση υπάρχουν φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα ή ενέσιμα και αποτελούν θεραπευτική επιλογή για να αναστέλλουν την

ανοσολογική απόκριση του σώματος (InformedHealth.org, 2017). Συχνά απαιτείται συστηματική θεραπεία, ενώ η παρουσία συννοσηρότητας, όπως αρθρίτιδα, κρίνεται ως πολύ σημαντική στην επιλογή θεραπείας (Rendon et al., 2019).

Για αυτούς που έχουν σοβαρές δερματικές αλλοιώσεις χρησιμοποιούνται συστηματικές θεραπείες, όπως μεθοτρεξάτη, και κυκλοσπορίνη. Αν οι συστηματικές θεραπείες αδυνατούν να ελέγξουν τις πληγείσες περιοχές στο δέρμα, τότε βιολογικοί παράγοντες λαμβάνονται υπόψη ως πιθανή θεραπεία, γιατί, γενικά, επιδεικνύουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τις συστηματικές θεραπείες (Sutherland et al, 2016).

Η χρήση παραγόντων που εμποδίζουν τη δράση του TNF-α έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος να θεραπευθούν ασθένειες με έντονη φλεγμονώδη δράση, όπως η ψωρίαση (Prieto-Pérez et al, 2013). Τα τρία πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα για την ψωρίαση είναι τα anti-TNF-α αδαλιμουμάμπη, ετανερσέπτη και ινφλιξιμάμπη (Sutherland et al, 2016).

Καθώς η γνώση μας για το μεταβολικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην παθογένεση της ψωρίασης έχει προοδεύσει, μας έχει οδηγήσει σε αναζήτηση νέων θεραπευτικών στόχων και στην ανάπτυξη νέων βιολογικών φαρμάκων όπως η ουστεκινουμάμπη (Prieto-Pérez et al, 2013) που στοχεύει anti-(IL)-12/230 (Sutherland et al, 2016). Νέες βιολογικές θεραπείες έχουν αναπτυχθεί για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας με στόχους την IL17 (ιξεκιζουμάμπη και σεκουκινουμάμπη) και τον υποδοχέα IL17R (μπροδαλουμάμπη) (Prieto-Pérez et al, 2013). Οι βιολογικές θεραπείες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για ασθένειες με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση ή ψωριασική αρθρίτιδα (Sutherland et al, 2016).

Παρόλο που η θεραπεία με παράγοντες anti-TNF-α είναι ασφαλής και καλά αποδεκτή, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με παρενέργειες (Prieto-Pérez et al, 2013). Παρά την πρόοδο της βιολογικής θεραπείας, εξακολουθούν να υπάρχουν επιπλέον ανάγκες στην καταπολέμηση της ψωρίασης, καθώς οι τρέχουσες επιλογές είναι περιορισμένες όσον αφορά τη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα, ανεκτικότητα, ασφάλεια, οδό χορήγησης και κόστος (Torres T. et al., 2018).

Οι περιορισμοί, λοιπόν, των βιολογικών φαρμάκων οδήγησαν στη διερεύνηση άλλων θεραπευτικών επιλογών, όπως τα μικρομοριακά φάρμακα, δηλαδή χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις, οι οποίες στοχεύουν βασικά μόρια που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση, με στόχο την ελαχιστοποίηση της γενικής ανοσοκαταστολής. Ακόμη και αν η αποτελεσματικότητά τους είναι, σε ορισμένες περιπτώσεις, μικρότερη από αυτή των βιολογικών φαρμάκων, αυτά τα μόρια έχουν μια οικονομικότερη διεργασία παρασκευής, μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα και έχουν δείξει ένα καλό προφίλ ασφάλειας μέχρι στιγμής, αν και απαιτούνται μακροπρόθεσμα δεδομένα που να επιβεβαιώνουν τις αρχικές μελέτες και να βρουν τη θέση τους στη θεραπεία των λιγότερο σοβαρών μορφών ψωρίασης. (Paola Di Meglio et al., 2014).

1.4. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η φαρμακογενετική μελετάει μεταβολές στο γενετικό υλικό και οι τρέχουσες γνώσεις μας σε αυτό το πεδίο επιτρέπουν τη μελέτη σε επίπεδο ενός μεμονωμένου γονιδίου, μιας περιοχής που αποτελεί θεραπευτικό στόχο ή κάποιου συγκεκριμένου φαρμάκου (Ann K Daly, 2017).

Η φαρμακογενετική ήταν και θεωρείται ένα δυναμικά σημαντικό εργαλείο για τη βελτίωση της φαρμακευτικής θεραπείας. Επιτρέπει την προσαρμοσμένη δοσολογία φαρμάκων ή την επιλογή φαρμάκου, με βάση το γενετικά καθορισμένο μεταβολικό δυναμικό του ατόμου (Ron HN van Schaik et al., 2014), επειδή ο γενετική ποικιλομορφία μπορεί να οδηγήσει σε αλλοιώσεις στους στόχους των φαρμάκων (Ann K Daly, 2017). Το γεγονός ότι οι ασθενείς μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς την ικανότητά τους να μεταβολίζουν τα φάρμακα είναι τώρα αναγνωρισμένο (Ron HN van Schaik et al., 2014).

Εκτός από τις μεταβολές του μεταβολισμού των φαρμάκων και των στόχων φαρμάκου, η φαρμακογενετική καλύπτει επίσης την περιοχή ανεπιθύμητων αντιδράσεων φαρμάκου που μπορεί να περιλαμβάνουν υπερβολική ανταπόκριση φαρμάκου, αλληλεπίδραση με έναν ακατάλληλο στόχο ή ακατάλληλη ανοσοαπόκριση στο φάρμακο (Ann K Daly, 2017). Η ποικιλομορφία στον μεταβολισμό των φαρμάκων είναι ένας από τους τομείς της φαρμακογενετικής που μελετήθηκαν καλύτερα. Τα περισσότερα φάρμακα υποβάλλονται σε μεταβολισμό, συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών παραγόντων αλλά και ορισμένων μικρομοριακών φαρμάκων (Ann K Daly, 2017). Επομένως, πριν η θεραπεία για την ψωρίαση να μπορεί να γίνει εξατομικευμένη, περισσότερες έρευνες πρέπει να μελετήσουν τους πολυμορφισμούς και την πιθανή συσχέτισή τους με τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για να θεραπευτεί η ψωρίαση (Prieto-Pérez et al, 2013).

Από τους πρώτους που δραστηριοποιήθηκαν στον τομέα της φαρμακογενετικής έρευνας για την ψωρίαση ήταν η ομάδα του Tejasvi et al. (2012). Αξιολόγησε τη συσχέτιση μεταξύ δύο SNP (rs2230926 και rs610604) που βρίσκονται στο γονίδιο *TNFAIP3* και την απόκριση μιας ομάδας ασθενών από το Μίσιγκαν (433) και το Τορόντο (199) στη θεραπεία που στοχεύει TNF. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο G στο SNP rs610604 συσχετίζεται με θετική απόκριση στη θεραπεία με αναστολείς TNF (ετανερσέπτη, ινφλιξιμάμπη και αδαλιμουμάμπη). Ακόμη, συσχετίστηκε ο απλότυπος T-G των rs2230926-rs610604 με την απόκριση σε αυτά τα φάρμακα. Μία άλλη έρευνα σε ελληνικό πληθυσμό (80 ασθενείς) από τους Vasilopoulos et al. βρήκε συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφισμού στο TNF-a (rs1799724) για τον γονότυπο CC και στο TNFRSF1B (rs1061622) και τον γονότυπο TT, όσον αφορά την καλύτερη απόκριση σε θεραπεία anti-TNF-a (ετανερσέπτη) (Prieto-Pérez et al, 2013).

Για το ίδιο SNP (rs1061622) πραγματοποίησαν έρευνα οι González-Lara et al. σε Καυκάσιους από την Ισπανία. Κατέληξαν στο αποτέλεσμα ότι τα άτομα με το σπάνιο αλληλόμορφο G συχνά δεν αποκρίνονται στη θεραπεία με βιολογικό

παράγοντα και άτομα θετικά για το *CW6* συχνότερα είχαν αυτό το αλληλόμορφο. Πιο συγκεκριμένα, η έρευνα έγινε σε 518 ασθενείς με ψωρίαση και 480 υγιείς, 90 από τους οποίους έλαβαν βιολογική θεραπεία και με βάση τον δείκτη PASI χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την απόκριση (καλή, μέτρια, μηδενική). Επομένως, η γονοτύπηση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού θα μπορούσε να βοηθήσει στη βελτιστοποίηση της θεραπείας προσδιορίζοντας ασθενείς που είναι πιθανό να μην αποκριθούν σε βιολογικά φάρμακα (González-Lara et al., 2015).

Η ομάδα του Seitz (2007) χρησιμοποίησε 54 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, 10 με ψωριασική αρθρίτιδα και 22 ασθενείς με αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, τους οποίους γονοτύπησε για το SNP στην θέση -308 του γονιδίου TNF- α . 63 ασθενείς έλαβαν θεραπεία με ινφλιξιμάμπη, 13 με ετανερσέπτη και 10 με αδαλιμουμάμπη. Όλοι οι ασθενείς που είχαν θετική απόκριση ανήκαν στην ομάδα που φέρει τον γονότυπο TNF- α -308 G/G ανεξαρτήτως της ασθένειας από την οποία έπασχαν. Μέτρια απόκριση στη θεραπεία είχαν οι ασθενείς με τον γονότυπο TNF- α -308 A/G (Murdaca G. et al., 2014).

Οι ομάδες των Schmeling (2007) και Stojanovic (2011) επιβεβαίωσαν ότι ο γονότυπος TNF- α -308 A/A ελαττώνει την απόκριση στην ετανερσέπτη. Η ομάδα του Marotte (2008) ανέφερε ότι το κυκλοφορούν επίπεδο του βιοδραστικού TNF- α ήταν υψηλότερο σε ασθενείς με τον γονότυπο TNF- α -308 A/A ή A/G. Παρόλα αυτά, αυτό το επίπεδο δεν μπορεί να μετρηθεί, καθώς ο ελεύθερος TNF- α και οι IL-1, IL-6 και IL-17 δρουν μέσω συνεργατικών αλληλεπιδράσεων με τον TNF- α . Επιπλέον, το SNP -857 C/T, το οποίο βρίσκεται επίσης στην περιοχή του υποκινητή του TNF- α αυξάνει την απόκριση στην ετανερσέπτη (Murdaca G. et al., 2014).

Η ερευνητική ομάδα του Giuseppe Murdaca (2014) συγκέντρωσε μία ομάδα από 57 ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα οι οποίοι λάμβαναν αναστολείς TNF- α ως θεραπεία και 155 υγιείς (control) και διερεύνησε τον ρόλο των SNP στις θέσεις -238, -308 και +489 στο γονίδιο TNF- α , όσον αφορά την ευαισθησία στην ψωριασική αρθρίτιδα, τη σοβαρότητα και την απόκριση στα ετανερσέπτη, ινφλιξιμάμπη και αδαλιμουμάμπη. Απέδειξαν ότι το SNP +489 και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο A συσχετίζεται σημαντικά με την ευαισθησία σε ψωριασική αρθρίτιδα και τη σοβαρότητα των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων. Επιπροσθέτως, για τα SNP -308 και -238 οι γονότυποι δεν μπόρεσαν να συσχετιστούν με κάποιο κλινικό αποτέλεσμα στους ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα μετά από θεραπεία με αναστολείς TNF- α . Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της ομάδας του Seitz (2007). Παρόλα αυτά, οι γονότυποι +489 GG και +489 GA συσχετίστηκαν με θετική απόκριση στην ετανερσέπτη, ενώ παρατηρήθηκε μηδενική απόκριση στους ασθενείς που φέρουν τον γονότυπο +489 AA (Murdaca G. et al., 2014).

Επίσης, οι De Simone et al. σε 97 ασθενείς ιταλικής καταγωγής βρήκαν ότι οι ετερόζυγοι ασθενείς με ψωρίαση για τον πολυμορφισμό 238G>A του γονιδίου TNF- α ήταν πιο πιθανό να μην αποκριθούν στη θεραπεία με την ετανερσέπτη σε σχέση με αυτούς με τον γονότυπο GG (De Simone et al, 2015).

Αντίστοιχους μοριακούς δείκτες είχαν ως στόχο να μελετήσουν οι Masouri et al. για να βρουν πιθανή συσχέτιση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την απόκριση σε θεραπεία για ψωρίαση, οι οποίοι έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι επηρεάζουν το αποτέλεσμα της βιολογικής θεραπείας anti-TNF-a (ετανερσέπτη, αδαλιμουμάμπη και ινφλιξιμάμπη), antiIL-12/23 (ουστεκινουμάμπη) σε ελληνικό πληθυσμό (250 ασθενείς). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός rs10484554 στο γονίδιο *HLA-C* συσχετίζεται με καλή απόκριση στα φάρμακα anti-TNF-a αλλά όχι στην ουστεκινουμάμπη, ενώ οι πολυμορφισμοί rs151823 και rs26653 στο γονίδιο *ERAP1* συσχετίστηκαν με καλή απόκριση στην ουστεκινουμάμπη (Masouri et al, 2016).

Κατά την ίδια περίοδο οι Galluzzo et al. αξιολογούν την επίδραση ορισμένων SNP στα γονίδια *IL12B* και *IL6* όσον αφορά την απόκριση στην ουστεκινουμάμπη. Γονοτυπήθηκαν 64 ασθενείς ιταλικής καταγωγής που λάμβαναν για έναν χρόνο ουστεκινουμάμπη. Ανακάλυψαν ότι η παρουσία του γονότυπου GG στο SNP rs6887695 του *IL12B* και η απουσία του γονότυπου AA στο SNP rs3212227 του *IL12B* αυξάνει σημαντικά το θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα στους ασθενείς που έχουν το αλληλόμορφο HLA-Cw6 (Galluzzo et al, 2016).

Στην αναζήτηση για πιθανούς μοριακούς δείκτες πρόβλεψης απόκρισης για βιολογικούς παράγοντες έρχεται να προσθέσει η ερευνητική ομάδα της E. Mendrinou που έκανε φαρμακογενετική έρευνα σε 100 Καυκάσιους ασθενείς με μέτρια ως σοβαρή χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας. Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία με κάποιον βιολογικό παράγοντα (ινφλιξιμάμπη, ετανερσέπτη και αδαλιμουμάμπη) για τουλάχιστον έξι μήνες. Άτομα με βελτίωση του δείκτη PASI τουλάχιστον 64% θεωρήθηκε ότι ανταποκρίνονται στο φάρμακο και για ΔPASI μικρότερο από 50% θεωρήθηκε ότι δεν ανταποκρίνονται στο φάρμακο. Τα SNP τα οποία μελετήθηκαν ως πιθανοί μοριακοί δείκτες για τη θετική απόκριση σε θεραπεία anti-TNF-a είναι τα FCGR2A-H131R (rs1801274) και FCGR3A-V158F (rs396991). Η συχνότητα για το συχνό αλληλόμορφο FCGR3AV158 βρέθηκε να είναι αρκετά μειωμένη στα άτομα που δεν αποκρίθηκαν στη θεραπεία σε σύγκριση με αυτά που αποκρίθηκαν, θέτοντάς το ως πιθανό μοριακό δείκτη κινδύνου για την ετανερσέπτη. Αντιθέτως, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση γι' αυτόν το μοριακό δείκτη και την απόκριση στην ινφλιξιμάμπη ή την αδαλιμουμάμπη (Mendrinou E. et al., 2017).

Οι van den Reek et al., που έκαναν έρευνα σε 234 ασθενείς στην Ολλανδία, βρήκαν ότι ασθενείς ετερόζυγοι για το SNP rs6427528 (στο CD84) είχαν καλύτερη απόκριση στην ετανερσέπτη μετά από τρεις μήνες απ' ότι τα ομόζυγα άτομα (GG) σε αυτή την ομάδα. Επιπλέον, οι ετερόζυγοι ασθενείς για τον πολυμορφισμό rs3213094 στο γονίδιο *IL12b* έδειξαν καλύτερη απόκριση στην ουστεκινουμάμπη, ενώ ασθενείς ομόζυγοι (GG) για το SNP rs610604 στο γονίδιο *TNFAIP3* είχαν χειρότερη απόκριση (van den Reek et al, 2017).

Οι Ovejero-Benito et al. πραγματοποίησαν μία φαρμακογενετική μελέτη για το βιολογικό φάρμακο ετανερσέπτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 78 ασθενείς που λάμβαναν το εν λόγω φάρμακο ανά δύο εβδομάδες για έξι μήνες. Για

την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης PASI. Μόνο τα άτομα που έδειξαν 75% βελτίωση και πάνω σε σχέση με την αρχική τους βαθμολογία θεωρήθηκαν ότι αποκρίνονται στο φάρμακο. Μετά από τρεις μήνες θεραπείας, αφού δοκιμάστηκαν σε ανάλυση με πολλές μεταβλητές, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα λήφθηκαν μόνο για τέσσερις πολυμορφισμούς, τους rs13437088 (*HLAB/MICA*), rs96844 (*MAP3K1*), rs2431697 (*PTTG1*) και rs9304742 (*ZNF816A*). Μετά από έξι μήνες, σε ανάλυση με πολλές μεταβλητές, στατιστικά σημαντικά φαίνεται να είναι επιπλέον και τα ακόλουθα: rs928655 (*GBP6*) και rs2546890 (*IL12B*). Τέλος, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που είχαν το αλληλόμορφο T στον πολυμορφισμό rs13437088 (*HLA-B/MICA*) είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να μην αποκριθούν στο φάρμακο (Ovejero-Benito MC et al., 2017).

Η ίδια ομάδα (Ovejero-Benito et al.) προχώρησε σε επόμενη έρευνα για θεραπεία anti-TNF- α σε ασθενείς με ψωρίαση (την πρώτη φαρμακογενετική μελέτη με υψηλό αριθμό υποψήφιων SNP). Συμμετείχαν 95 ασθενείς στους οποίους χορηγούνταν το φάρμακο αδαλιμουμάμπη ή ινφλιξιμάμπη. Για να κριθεί η θετική, αρνητική ή καθόλου απόκριση χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης PASI. Από τα 124 SNP που μελετήθηκαν, 5 συσχετίστηκαν με θετική απόκριση στους τρεις μήνες. Αυτά ήταν τα rs6661932 (*IVL*), rs2546890 (*IL-12B*), rs2145623 (*NFKBIA*), rs9304742 (*ZNF816A*) και rs645544 (*SLC9A8*). Επιπλέον, το rs1061624 (*TNFR1B*) έδωσε θετική απόκριση στους 6 μήνες. Τέλος, πολυμορφισμοί στα γονίδια *IVL*, *NL-KB* και *SLC9A8* αυξάνουν τον κίνδυνο ο ασθενής να μην αποκριθεί καθόλου στα φάρμακα αδαλιμουμάμπη και ινφλιξιμάμπη, ενώ SNP στα γονίδια *IL-12B* και *ZNF816A* μειώνουν αυτό τον κίνδυνο μη απόκρισης για τα συγκεκριμένα βιολογικά φάρμακα (Ovejero-Benito et al., 2018).

Οι Prieto-Pérez et al. πραγματοποίησαν μια έρευνα σε 197 υγιείς εθελοντές, και 194 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας σε ισπανικό πληθυσμό. Ανέλυσαν τρία SNP, στο *IL-17A* (rs2275913 και rs10484879) και στο *IL-17F* (rs763780) στο πλαίσιο συσχέτισης μεταξύ αυτών και της ψωρίασης και/ή της απόκρισης στο ustekinumab. Βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του rs763780 (*IL-17F*) και της απόκρισης στην ουστεκινουμάμπη και την ινφλιξιμάμπη στους τρεις και έξι μήνες και συσχέτιση μεταξύ του rs763780 και της απόκρισης στην αδαλιμουμάμπη στους έξι μήνες. Δεν βρέθηκε όμως καμία συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των δύο SNP στο *IL-17A* (Prieto-Pérez et al, 2015).

Σε παραπλήσιο αποτέλεσμα κατέληξε και η ερευνητική ομάδα του L.J. van Vugt που πραγματοποίησε μια πολυκεντρική φαρμακογενετική μελέτη σε ευρωπαϊκό πληθυσμό για αναστολείς της *IL-17A* σε ασθενείς με ψωρίαση. Στους ασθενείς χορηγούνταν σεκουκινουμάμπη ή ιξεκιζουμάμπη καθημερινά. Για όλους τους συμμετέχοντες το γονιδίου *IL-17A* αλληλουχήθηκε κατά Sanger. Όλοι οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν ελέγχθηκαν για να ανιχνευθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης στις σεκουκινουμάμπη/ιξεκιζουμάμπη και αυτών. Συνολικά στην έρευνα συμπεριλήφθηκαν 134 ασθενείς που λάμβαναν ένα από τα δύο αυτά φάρμακα. Με τη γονοτύπηση του πληθυσμού αυτού αναγνωρίστηκαν πολυμορφισμοί

στις αμετάφραστες και ιντρονικές περιοχές αλλά δεν βρέθηκαν σε περιοχές που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη IL-17A. Πέντε SNP (rs2275913, rs8193037, rs3819025, rs7747909 και rs3748067) σε μη κωδική περιοχή, τα οποία είναι γνωστό ή υπάρχει ένδειξη ότι έχουν λειτουργικό ρόλο στην έκφραση της IL-17A, επιλέχθηκαν για ανάλυση συσχέτισης. Μετά από 12 εβδομάδες το 62% των ασθενών είχε βελτίωση στο δείκτη PASI75 και το 39% είχε ακόμη μεγαλύτερη βελτίωση (PASI90). Στις 24 εβδομάδες τα ποσοστά αυτών των δύο ομάδων αυξήθηκαν σε 72% και 62% αντίστοιχα. Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και ΔPASI μετά από 12 και 24 εβδομάδες που οι ασθενείς λάμβαναν anti-IL-17A (van Vugt et al., 2019).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έρευνα για μη βιολογικά συστημικά φάρμακα από την ερευνητική ομάδα του Wangqing Chen. Συγκέντρωσε 113 ασθενείς με ψωρίαση κατά πλάκας και 176 υγιείς από τη Νότια Κίνα. Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία με καλσιποτριόλη και ακιρετίνη 30 mg/ημέρα και τα SNP που μελετήθηκαν ήταν τα rs833061 (T > C), rs10434 (G > A) στο γονίδιο VEGFA και rs4444903 (G > A), rs2237051 (A > G) στο γονίδιο EGF. Τα άτομα με 50% βελτίωση στον δείκτη PASI θεωρήθηκε ότι ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Οποιοσδήποτε παρενέργειες αναφέρθηκαν από τους ασθενείς καταγράφηκαν. Κανένα από τα SNP δεν συσχετίστηκε με ευαισθησία ή αποτελεσματικότητα όσον αφορά την ψωρίαση, παρόλα αυτά το σπάνιο αλληλόμορφο rs10434A συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της ασθένειας προ θεραπείας και το αλληλόμορφο rs2237051G συσχετίστηκε με αυξημένο ερύθημα κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυτά τα ευρήματα μπορεί να συμβάλλουν στη χορήγηση ακριβέστερης θεραπείας για την ψωρίαση με σκοπό να μειωθούν οι παρενέργειες των φαρμάκων στους ασθενείς (Wangqing Chen et al., 2018).

Οι γενικές πληροφορίες για τους μεμονωμένους πολυμορφισμούς και η σχέση της φαρμακογενετικής με ορισμένα φάρμακα ταξινομούνται και επιμελούνται από το αμερικανικό Pharmacogenomics Research Network (PGRN) στην ιστοσελίδα του PharmGKB (Ann K Daly, 2017).

1.5. ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗ 4 (PDE4) ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΨΩΡΙΑΣΗ

Οι φωσφοδιεστεράσες είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, τα οποία είναι προϊόντα 11 διαφορετικών οικογενειών γονιδίων, ομαδοποιημένων σύμφωνα με τη δομή, τη λειτουργία και τη συγγενειά τους για cAMP και cGMP (Bracy A. Fertig et al., 2018).

Υπάρχουν πολλές οικογένειες PDE, όλες οι ισομορφές των οποίων αφορούν την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του cAMP και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Οι PDE4, 7 και 8 αποικοδομούν ειδικά το cAMP (Wittmann M. et al., 2013). Η PDE4 εκφράζεται ευρέως σε αιματοποιητικά κύτταρα, μη αιματοποιητικά κύτταρα, αισθητήριους

νευρώνες και νευρώνες μνήμης (Georg Schett et al., 2010). και είναι το κύριο ισoenζυμο PDE που βρίσκεται σε ανοσοκύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα, T-κύτταρα και ουδετερόφιλα (Forchhammer S. et al., 2015).

Κωδικοποιείται από τέσσερα ξεχωριστά γονίδια (*PDE4 A-D*) και κάθε PDE4 ελέγχει διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες (Wittmann M. et al., 2013). Τα τέσσερα γονίδια PDE4 (*A, B, C* και *D*) παρουσιάζουν διακριτούς στόχους και ρυθμιστικές ιδιότητες. Κάθε ένα από αυτά τα γονίδια μπορεί και παράγει πολλαπλά πρωτεϊνικά προϊόντα λόγω του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA, με αποτέλεσμα περίπου 19 διαφορετικές πρωτεΐνες PDE4 (Georg Schett et al., 2010).

Όλες οι φωσφοδιεστεράσες έχουν συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο με καταλυτική ενεργότητα, ενώ οι αμινοτελικές περιοχές τους διαφέρουν μεταξύ οικογενειών, υποοικογενειών και ειδικών ισομορφών. Οι αμινοτελικές περιοχές έχουν έναν αριθμό λειτουργικών ρόλων. Αυτοί περιλαμβάνουν τη στόχευση σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις και σε σηματοδοτικά σωμάτια (signalosomes) και τη ρύθμιση της απόκρισης σε σήματα από ρυθμιστικά μόρια και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Με βάση την παρουσία και το μέγεθος των UCR1 και UCR2, οι ισομορφές PDE4 μπορούν να ταξινομηθούν σε μακρές, βραχείες, υπερ-βραχείες και dead-short ισομορφές, όπως φαίνονται στην εικόνα 1.5.1 (Bracy A. Fertig et al., 2018). Οι μακρές ισομορφές διαφοροποιούνται από τις βραχείες με μια πρόσθετη συντηρημένη περιοχή (UCR) πιο αμινοτελικά, που περιέχει μια θέση φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικής κινάσης (Georg Schett et al., 2010). Τα τέσσερα γονίδια *PDE4* κωδικοποιούν πάνω από 16 ισομορφές, κάθε μία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από μία μοναδική αμινοτελική περιοχή (Houslay et al., 2003).



Εικόνα 1.5.1: Μακρές, βραχείες, υπερ-βραχείες και dead-short ισομορφές της PDE4. Επεξεργασμένη εικόνα (Bracy A. Fertig et al., 2018).

Το cAMP είναι ένας δεύτερος αγγελιοφόρος που ελέγχει πολλές βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Ο μόνος τρόπος απενεργοποίησης του cAMP είναι η αποικοδόμησή του μέσω της δράσης φωσφοδιεστερασών cAMP (PDEs). Επομένως, τα PDEs καλούνται να διαδραματίσουν έναν βασικό ρυθμιστικό ρόλο (Houslay et al., 2003).

Οι PDE4 που είναι ειδικές για το cAMP έχουν εκλεκτικούς αναστολείς που χρησιμεύουν ως ισχυροί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Ο σχετικά πρόσφατος προσδιορισμός της δομής της καταλυτικής υπομονάδας της PDE4 επιτρέπει την κατανόηση του μοριακού τρόπου κατάλυσης, καθώς και της εκλεκτικότητας του υποστρώματος και του αναστολέα. Οι ισομορφές PDE4 ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση ERK στο καρβοξυτελικό άκρο (Houslay et al., 2003).

Η καταλυτική περιοχή της PDE4 έχει μελετηθεί εκτενώς και οι κρυσταλλικές δομές ακτίνων Χ έχουν δείξει τον βαθύ υδρόφοβο θύλακα κατασκευασμένο από πολυάριθμες έλικες που αποτελούν την ενεργό θέση για την υδρόλυση του cAMP. Η δομή αυτού του τομέα ήταν αναπόσπαστο κομμάτι για το σχεδιασμό ειδικών για την οικογένεια αναστολέων, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο κλινικά όσο και πειραματικά (Bracy A. Fertig et al., 2018).

1.6. Η ΑΠΡΕΜΙΛΑΣΤΗ

Η απρεμιλάστη είναι ένας από στόματος χορηγούμενος μικρομοριακός αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 που λειτουργεί ενδοκυτταρικά, εμποδίζοντας την αποικοδόμηση του cAMP, με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδά του σε κύτταρα που εκφράζουν την φωσφοδιεστεράση 4. Αυτή η αναστολή έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών και την αυξημένη έκφραση των αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών δίνοντας στην απρεμιλάστη τη δυνατότητα να δρα με αντιφλεγμονώδη και όχι ανοσοκατασταλτικό τρόπο.

Η απρεμιλάστη είναι μια νέα θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με ψωρίαση και ψωριασική αρθρίτιδα για τους οποίους άλλες θεραπείες απέτυχαν. Είναι αποτελεσματική σε μορφές ψωρίασης που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν και παρέχει ένα καλό προφίλ ασφάλειας, καμία ανάγκη εργαστηριακού ελέγχου καταλληλότητας ή συνεχούς παρακολούθησης για εργαστηριακές παραμέτρους, λόγω απουσίας τοξικότητας. Τέλος, είναι εύχρηστη η από του στόματος χορήγηση. Η αποτελεσματικότητα και το κόστος είναι αποφασιστικής σημασίας για την ένταξη της απρεμιλάστης στο θεραπευτικό «οπλοστάσιο» για την ψωρίαση (Tiago Torres et al., 2018).

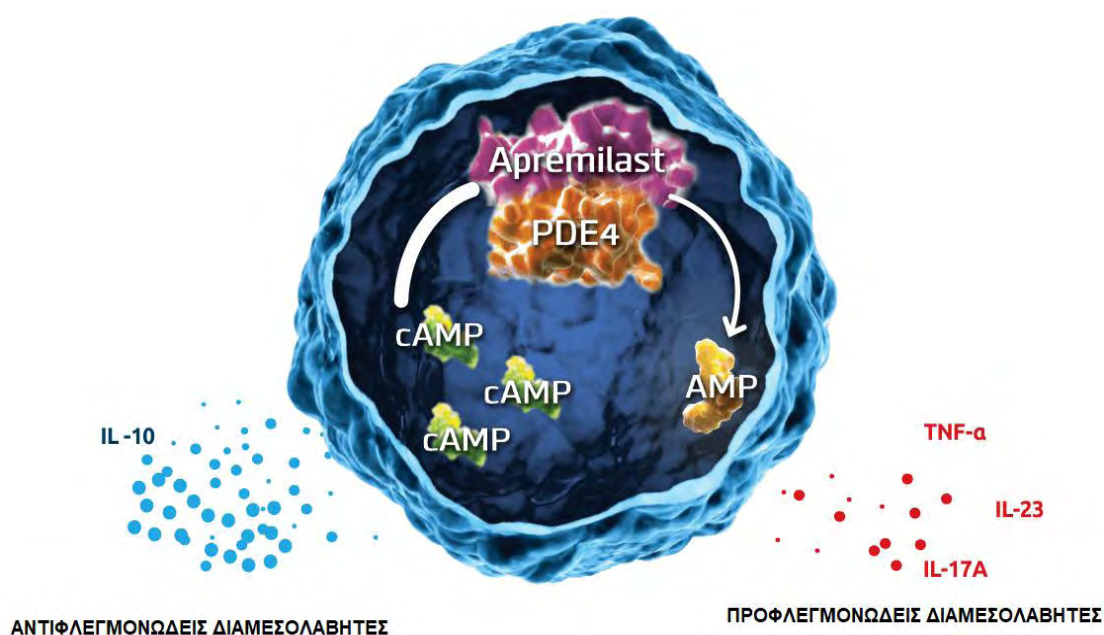
Η απρεμιλάστη λαμβάνεται από το στόμα και συνεπώς αποτελεί βελτιωμένη εκδοχή σε σχέση με τις τρέχουσες βιολογικές θεραπείες που διατίθενται μόνο σε ενέσιμες μορφές. Μεταβολίζεται στο ήπαρ, κυρίως μέσω του CYP3A4. Το φάρμακο έχει χρόνο ημιζωής 6 έως 9 ώρες. Οι αναστολείς PDE4 χρησιμοποιούνται επίσης και για τη θεραπεία άλλων καταστάσεων, όπως φλεγμονή στο άσθμα, πνευμονική ουδετεροφιλία, αρθρίτιδα, ασθένεια φλεγμονώδους εντέρου κ.λπ. (Brent C Martin et al., 2017).

Η απρεμιλάστη (Otezla ©) εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία της ψωριασικής αρθρίτιδας τον Μάρτιο του 2014. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η

απρεμιλάστη έχει χαμηλό προφίλ παρενεργειών και έχει ταξινομηθεί από "ήπιο έως μέτριο" από τους περισσότερους ερευνητές. Η απρεμιλάστη είναι ελαφρώς φτηνότερη και με λιγότερες παρενέργειες σε σύγκριση με τη βιολογική θεραπεία. Φαίνεται να είναι καλά ανεκτή και αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ψωριασικής αρθρίτιδας και έχει επίσης εγκριθεί από τον Σεπτέμβριο του 2014 για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής ψωρίασης κατά πλάκας. Μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε ασθενείς που δεν επιθυμούν να υποβάλλονται σε θεραπεία έγχυσης, εφόσον έχουν ανάγκη συστημικής θεραπείας ή ασθενείς στους οποίους απέτυχαν άλλες θεραπείες λόγω παρενεργειών, τοξικότητας ή έλλειψης αποτελεσματικότητας. Επιπλέον, δεν απαιτείται τακτική εργαστηριακή παρακολούθηση για ασθενείς που την λαμβάνουν. Λόγω του χρόνου ημιζωής των 6-9 ωρών, οι παρενέργειες, όταν εμφανίζονται, μπορούν να επιλυθούν ταχύτερα σε εκείνους που παίρνουν απρεμιλάστη (Brent C Martin et al., 2017).

Μηχανισμός δράσης

Ο μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης επιτρέπει τη στόχευση του καταρράκτη αντιδράσεων της φλεγμονής σε προγενέστερο σημείο σε σχέση με τις συστημικές θεραπείες, ώστε να διακόπτει και να ρυθμίζει την προ-φλεγμονώδη απόκριση. Η υπερέκκριση των T κυττάρων που ακολουθείται από παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών συνδέεται σημαντικά με την ψωριασική αρθρίτιδα. Η PDE4 υδρολύει το cAMP σε AMP και είναι η κυρίαρχη μορφή φωσφοδιεστεράσης που βρίσκεται στα κερατινοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, και ουδετερόφιλα. Το cAMP είναι ένας δευτέρος αγγελιοφόρος που ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η αύξηση του cAMP με την αναστολή της PDE4 καταστέλλει την παραγωγή TNF και την ανοσοαπόκριση (Brent C Martin et al., 2017), όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6.1.



Εικόνα 1.6.1: Μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης. Η απρεμιλάστη αναστέλλει τη δράση των PDE4 με αποτέλεσμα την αύξηση του ελεύθερου cAMP, γεγονός που οδηγεί στη μείωση των προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών (TNF-α, IL-23, IL-17A) και στην αύξηση των αντιφλεγμονωδών διαμεσολαβητών (IL-10). Επεξεργασμένη εικόνα (<https://www.otezlapro.com/>)

Ο TNF εμπλέκεται στην αύξηση της ρύθμισης της αποδόμησης του χόνδρου και του κολλαγόνου στις αρθρώσεις και οι αναστολείς του TNF μπορούν να καταστείλουν αυτές τις δράσεις. Ως ευρέος φάσματος αντιφλεγμονώδης παράγοντας, η απρεμιλάστη αναστέλλει επίσης την απόκριση των πολυμορφοκυτταρικών κυττάρων (PMN) και την παραγωγή του TNF από τα κύτταρα NK (Natural Killers) και τα κερατινοκύτταρα. Και οι δύο τύποι κυττάρων εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης. Η απρεμιλάστη ρυθμίζει επίσης τους αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη ομοιόσταση, με αποτέλεσμα τη μείωση των κλινικών συμπτωμάτων και την αναστροφή της φλεγμονώδους παθοφυσιολογίας του δέρματος και των αρθρώσεων που συνδέονται με την ψωριασική αρθρίτιδα και την ψωρίαση (Brent C Martin et al., 2017).

1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Διαπιστώνοντας την έλλειψη φαρμακογενετικών μελετών που αφορούν την απρεμιλάστη, η παρούσα μελέτη, έχει ως στόχο τη συσχέτιση πολυμορφισμών (SNPs) με την απόκριση ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με απρεμιλάστη. Τέτοια SNP μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες για την πρόβλεψη της απόκρισης των ασθενών πριν τη χορήγηση της απρεμιλάστης. Γνωρίζοντας την πιθανή απόκριση του κάθε ασθενούς, μπορεί η θεραπεία να γίνει εξατομικευμένα. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο έλεγχος της ανισορροπίας σύνδεσης και η επιλογή tag SNPs στα γονίδια *PDE4* και η γονοτύπηση των διαθέσιμων δειγμάτων από ασθενείς που λάμβαναν απρεμιλάστη για τον πολυμορφισμό rs11670370 του γονιδίου *PDE4C*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 37 δείγματα αίματος τα οποία ήταν εμπλουτισμένα σε ερυθρά αιμοσφαίρια και λήφθηκαν από ασθενείς με ψωρίαση που τους χορηγούνταν Otezla (απρεμιλάστη) για τουλάχιστον 6 μήνες. Τα προς εξέταση δείγματα χορηγήθηκαν από τη Δερματολογική Κλινική του Παν/κού Νοσ/μείου Λάρισας (σε συνεργασία με την καθηγήτρια Α. Ρουσσάκη και την Επίκουρο καθηγήτρια Ε. Ζαφειρίου).

2.2. ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, SNPs) ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *PDE4A* ΚΑΙ *PDA4C*

Για να εντοπιστούν τα SNPs, καθώς και για την επιλογή αυτών, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα υπολογιστικά εργαλεία. Πρώτα έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) για την εύρεση όλων των SNPs των γονιδίων *PDE4A* και *PDA4C*. Η Ensembl είναι ένας φυλλομετρητής περιήγησης γονιδιώματος για γονιδιώματα σπονδυλωτών, που υποστηρίζει την έρευνα σε διάφορους τομείς, όπως η συγκριτική γονιδιωματική, η εξέλιξη και οι παραλλαγές στην ακολουθία του DNA. Στην Ensembl αναγράφεται επίσης σχολιασμός γονιδίων, προβλέψεις για τις λειτουργίες τους και δεδομένα για διάφορες ασθένειες. Για την εύρεση όλων των SNPs των εν λόγω γονιδίων επιλέχθηκε: «Human» (στο αριστερό μέρος της σελίδας). Έπειτα πληκτρολογήθηκε το όνομα του κάθε υπό εξέταση γονιδίου, στην προκειμένη περίπτωση «*PDE4A*» και «*PDA4C*». Στη συνέχεια ακολούθησε η επιλογή «variant table» (στο αριστερό μέρος της σελίδας). Ο πίνακας που προέκυψε περιλαμβάνει όλους τους πολυμορφισμούς. Ρυθμίστηκε το Global MAF (minor allele frequency, συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες) για 0,1-0,5% και τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε αρχείο excel, επιλογή που δίνεται στο πάνω δεξιά μέρος του πίνακα. Στο αρχείο excel που προέκυψε έγινε κατάταξη των SNPs με βάση τη θέση τους στο γονίδιο, πληροφορία η οποία υπήρχε στον πίνακα της Ensembl.

Για να μπορέσει να γίνει επιλογή του ελάχιστου αριθμού SNPs που χρειάζεται να γονοτυπηθούν για να ληφθούν πληροφορίες για όλο το γονίδιο, πρέπει να ελεγχθεί η ανισορροπία σύνδεσης (Linkage Disequilibrium, LD). Αυτό έγινε με τη χρήση του εργαλείου της Ensembl «Linkage Disequilibrium Calculator» (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/LD?db=core). Στο «Choose calculation» επιλέχθηκε το «LD for a given list of variants», στο «select one or more populations» επιλέχθηκε ο πληθυσμός των Ιταλών, δηλαδή το «1000GENOMES:phase 3:TSI», επειδή αυτός ο πληθυσμός φαίνεται πως έχει παρόμοια γενετική δομή με τους Έλληνες (Michael F Seldin et al., 2006) και, τέλος, στην επιλογή «either paste data», όπου υπάρχει δυνατότητα γραφής μέχρι 20 πολυμορφισμών, επιλέχθηκαν σταδιακά όλοι από το αρχείο excel. Στον πίνακα που προέκυψε φαίνονται τιμές για D' και r^2 για κάθε ζεύγος SNPs. Ως κατώτατο αποδεκτό όριο τέθηκε $D'=0,95$, για να δημιουργηθούν ομάδες (blocks) SNPs ανάλογα με την LD.

2.3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ (SNPs) ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *PDE4A* ΚΑΙ *PDE4C*

Για την εύρεση της γονιδιωματικής αλληλουχίας των προαναφερόμενων γονιδίων έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Αρχικά, στη μπάρα

αναζήτησης γράφτηκε το όνομα του γονιδίου και στο αριστερό μέρος της μπάρας επιλέχθηκε το «Gene». Για να ανακτηθεί η αλληλουχία του γονιδίου αριθμημένη, επιλέχθηκε GenBank format από το NCBI Reference Sequences (RefSeq). Για να βρεθεί η θέση των υποψήφιων προς γονοτύπηση SNPs στο γονίδιο έγινε blast της αλληλουχίας που περιλαμβάνει το SNP με αυτήν του γονιδίου, χρησιμοποιώντας το εργαλείο του NCBI, blastn (blast 2 sequences). Η αλληλουχία που περιλαμβάνει το SNP βρέθηκε από την NCBI πατώντας στο drop down menu την επιλογή «SNP» και συμπληρώνοντας στη μπάρα αναζήτησης τον κωδικό του SNP. Στη σελίδα που προέκυψε επιλέχθηκε ξανά το SNP πατώντας πάνω στον κωδικό του. Στη νέα σελίδα, όπου εμφανίστηκαν πληροφορίες για το εν λόγω SNP, επιλέχθηκε «Submissions» και πατώντας επάνω στο Submission ID, στην προκειμένη περίπτωση 1000 GENOMES, οδήγησε σε σελίδα στην οποία αναγράφεται η αλληλουχία που περιέχει το SNP.

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο Primer designing tool του NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου, πριν και μετά τον υπό μελέτη πολυμορφισμό, περίπου 240-300bp σε μέγεθος. Έπειτα επιλέχθηκαν οι εξής παράμετροι: στο «Range» γράφτηκε το εύρος των θέσεων των νουκλεοτιδίων που επιτρέπεται να προσδεθούν οι εκκινητές, εξαιρώντας περίπου 40 νουκλεοτίδια είτε δεξιά ή αριστερά του SNP. Ένας τουλάχιστον από τους εκκινητές που θα επιλεγούν θα πρέπει να απέχει τουλάχιστον 40 νουκλεοτίδια από το προς γονοτύπηση SNP, επειδή σκοπός είναι να γίνει αλληλούχηση για την εύρεση γονοτύπων που θα χρησιμοποιηθούν αργότερα στην HRM ως πρότυπα και κατά την αλληλούχηση τα πρώτα νουκλεοτίδια «δεν διαβάζονται». Στο «PCR product size» σημειώθηκε το επιθυμητό εύρος για το μέγεθος του προϊόντος της PCR, στην προκειμένη περίπτωση 90-120bp, μέγεθος κατάλληλο για την HRM. Για το «Primer melting temperatures (Tm)» επιλέχθηκε το εύρος 55-63°C και το «Max Tm difference» (διαφορά θερμοκρασίας τήξης μεταξύ των εκκινητών) ρυθμίστηκε στην τιμή 3. Στην επιλογή «Database» επιλέχθηκε το «Genomes for selected organisms» και εισήχθη το Homo sapiens και τέλος στην επιλογή «Primer specificity stringency», που αφορά την ειδικότητα του εκκινητή, τέθηκε το «Primer must have at least 6 total mismatches to unintended targets, including at least 4 mismatches within the last 5bps at the 3' end» και «Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer». Συνήθως, προκύπτουν πολλά ζεύγη εκκινητών και επιλέγεται το καλύτερο, δηλαδή αυτό με τη μεγαλύτερη ειδικότητα και αυτό που δίνει το επιθυμητό μέγεθος προϊόντος. Θα πρέπει να είναι ειδικό για την αλληλουχία-στόχο, ώστε να αποφευχθεί η ενίσχυση ανεπιθύμητων αλληλουχιών. Σημαντικό είναι, επίσης, η ίδια η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να μην έχει θέσεις ενδοσυμπληρωματικότητας, για να μην δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές (δομές φουρκέτας) ή διμερή εκκινητών.

2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΑΙΜΑ

Η απομόνωση του DNA από τα δείγματα έγινε με το kit της Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit (1820-02) ακολουθώντας το περιλαμβανόμενο πρωτόκολλο με κάποιες τροποποιήσεις. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 200μl αίματος, στα οποία προστέθηκαν πρωτεϊνάση K, RNase A και PureLink® Genomic lysis/Binding Buffer και αναδεύθηκαν με vortex. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15min, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της RNase A και 2^η επώαση στους 55°C για τουλάχιστον 30min, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της πρωτεϊνάσης K. Τέλος, έγινε έκλουση σε 30μl elution buffer.

2.5. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA

2.5.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ QUAWELL

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του DNA μετά την απομόνωση και λαμβάνοντας υπόψη ότι θα ακολουθήσει HRM, η οποία απαιτεί ακριβή ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το QUAWELL (Q3000) που προσφέρει αυτήν τη δυνατότητα. Το QUAWELL είναι ένα φασματοφωτόμετρο UV μέτρησης μικρού όγκου δείγματος. Είναι ειδικά σχεδιασμένο για τη μέτρηση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Το QUAWELL μετράει 2μl δείγματος σε λιγότερο από 2sec με υψηλό βαθμό ακρίβειας και καλή επαναληψιμότητα.

Αρχικά, ρυθμίστηκε το μηχάνημα με τη χρήση τυφλού (blank), στην προκειμένη περίπτωση διάλυμα έκλουσης στο οποίο είναι διαλυμένο το DNA μετά την απομόνωσή του. Ειδικότερα 2μl διαλύματος έκλουσης τοποθετήθηκαν στην ειδική θέση του μηχανήματος και επιλέχθηκε η εντολή «blank» στο πρόγραμμα. Αφού ολοκληρώθηκε η επεξεργασία από τον υπολογιστή εμφανίστηκε η ειδοποίηση «ready». Το βήμα επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Τοποθετήθηκαν 2μl από κάθε δείγμα, επιλέχθηκε η εντολή «measure» και σημειώθηκαν η συγκέντρωση (ng/μl) και ο λόγος 260/280 για κάθε ένα από αυτά. Ανά 5 δείγματα γινόταν πλύσεις στο μηχάνημα με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό (water for injection), τοποθετώντας 2μl στην ειδική θέση του μηχανήματος και επιλέγοντας την εντολή «measure», έως ότου η συγκέντρωση και ο λόγος να πλησιάζουν το 0. Μετά το πέρας της διαδικασίας μέτρησης των δειγμάτων έγιναν πλύσεις με τον τρόπο που προαναφέρθηκε. Μεταξύ δύο τοποθετήσεων οποιασδήποτε ουσίας απαιτείται καθαρισμός της ειδικής θέσης με χαρτί.

2.5.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ QUBIT

Η Qubit είναι μία μέθοδος ποσοτικοποίησης με τη χρήση φθορισμού. Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος ήταν γιατί χρησιμοποιεί χρωστική που προσδένεται ειδικά στο δίκλωνο DNA, γεγονός που ελαχιστοποιεί το πιθανό σφάλμα. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Qubit™ dsDNA BR Assay Kit της Invitrogen™.

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με βάση τις οδηγίες του kit και χρησιμοποιήθηκαν 4μl από το κάθε δείγμα. Με αυτήν τη μέθοδο παρατηρήθηκε πολύ καλύτερη επαναληψιμότητα.

2.6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA στην οποία περιέχεται το αντίστοιχο προς μελέτη SNP.

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5min
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 40sec
3. Υβριδοποίηση των εκκινητών στους 61°C για 40sec (η θερμοκρασία ποικίλλει ανάλογα με τους εκκινητές, οπότε η βέλτιστη θερμοκρασία εντοπίζεται πειραματικά). Αυτή ήταν η βέλτιστη θερμοκρασία για το ζεύγος εκκινητών F: CTGTTGGGGAATGTGCTTC και R: GCATTTAAGCACCTACTGGGT
4. Επιμήκυνση στους 72°C για 40sec

Τα παραπάνω βήματα επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους. Στον Πίνακα 2.α αναγράφονται τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 2.α: Συστατικά PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 50μl

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	(μl)
10 x Kappa taq Buffer	5
dNTPs (10mM)	1
F εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	1
R ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	1
Kappa taq (5 units/ μl)	0,2
DNA	1
ddH ₂ O	40,8

Η τελική ποσότητα των συστατικών υπολογίζεται με βάση τον αριθμό των αντιδράσεων που θα γίνουν κάθε φορά, συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα και μιας ποσότητας 10% επιπλέον για λόγους ασφαλείας (διαφοροποίηση στην ακρίβεια της πιπέτας). Ο αρνητικός μάρτυρας έχει όλα τα συστατικά της αντίδρασης εκτός από το DNA και χρησιμοποιείται για να εξακριβωθεί ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση.

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε χρήση της PCR για την ενίσχυση τμημάτων που περιέχουν το προς μελέτη SNP. Σκοπός ήταν η εύρεση δειγμάτων με όλους τους

γονότυπους (ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο, ετερόζυγο και ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο) με την χρήση της SSCP, που παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.7.

2.6.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Για τη διαπίστωση επιτυχούς ενίσχυσης στην PCR χωρίς επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2,5% [(επειδή το προϊόν της PCR είναι πολύ μικρό σε μέγεθος (bp)].

Για την παρασκευή πηκτής ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Ζυγίστηκαν 1,25gr αγαρόζης και προστέθηκαν σε 50ml TAE 1x (40mM Tris, 20mM οξικό οξύ, 1mM EDTA, pH=8) σε κωνική φιάλη
2. Η κωνική φιάλη κλείστηκε με πώμα και τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων (σε χαμηλή ένταση)
3. Μετά τη διάλυση της αγαρόζης προστέθηκαν 4μl χρωστικής Xpert Green της εταιρείας GriSP (20.000x) και το μείγμα μεταφέρθηκε σε καλούπι
4. Μετά τη σταθεροποίηση η πηκτική μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και βυθίστηκε σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1x
5. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 5μl προϊόντος PCR μαζί με 3μl loading buffer με ξυλένιο [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% ξυλένιο, 60% γλυκερόλη, 60 mM EDTA]. Για τον έλεγχο των μοριακών μεγεθών των προϊόντων της PCR προστέθηκε σε ένα πηγαδάκι μάρτυρας (GENEON, 100 bp DNA Ladder χωρίς χρωστική) μαζί με 3μl loading buffer με ξυλένιο
6. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο 150V για περίπου 15min
7. Η πηκτική μεταφέρθηκε σε τράπεζα με λάμπα UV με σκοπό να γίνουν διακριτά τα μόρια DNA σαν φωτεινές ζώνες.

2.7. SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση Πολυμορφισμών Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA)

Πραγματοποιήθηκε SSCP για να εντοπιστούν άτομα με τους τρεις γονότυπους που προαναφέρθηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες στην HRM που θα ακολουθήσει. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι σε ένα δίκλωνο DNA μία μονονουκλεοτιδική αλλαγή δεν μπορεί να διακριθεί με ηλεκτροφόρηση, γιατί οι δομικές ιδιότητες του δίκλωνου μορίου είναι σχεδόν πανομοιότυπες και για τα δύο αλληλόμορφα. Παρόλα αυτά, μετά την αποδιάταξη, το μονόκλωνο DNA αποκτά τρισδιάστατη δομή και μπορεί να αναδιπλωθεί με μοναδικό τρόπο, πράγμα που βασίζεται στην αλληλουχία του. Το αποτέλεσμα είναι ότι, όταν αυτά τα δύο μονόκλινα μόρια ηλεκτροφορηθούν, αν και έχουν τον ίδιο αριθμό νουκλεοτιδίων, η διαφορά στη στερεοδιάταξη θα τα αναγκάσει να μετακινηθούν διαφορετικά.

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

A. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

1. Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε η ακρυλαμίδα, η μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδα, η γλυκερόλη 50%, το TBE 10% και ποσότητα ddH₂O ικανή να διαλύσει τη σκόνη. Αναδεύτηκαν στον μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν και να ομογενοποιηθούν
2. Το διάλυμα της ακρυλαμίδης διηθήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε στα 62,5ml με προσθήκη ddH₂O.
3. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη όπου προστέθηκαν τα TEMED και APS 20%
4. Το διάλυμα της πηκτής μεταφέρθηκε σε ειδικό κάθετο καλούπι* και τοποθετήθηκε το χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών.

Στον Πίνακα 2.β αναγράφονται τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Πίνακας 2.β: Συστατικά για την πηκτή πολυακρυλαμίδης

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	14%
Ακρυλαμίδα	8,75g
Μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδα	0,22g
Γλυκερόλη 50%	6,25ml
TBE 10%	3,2ml
Τετρα-μεθυλ-εθυλεν-διαμίνη (TEMED)	62,5μl
Υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) 20%	375μl
H ₂ O	Ρύθμιση τελικού όγκου στα 62,5ml

B. Προετοιμασία δειγμάτων

1. Σε σωληνάριο PCR αναμείχθηκαν 10μl προϊόντος PCR με 10μl χρωστικής SSCP (95% φορμαμίδα, 10mM NaOH, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,5% ξυλένιο)
2. Έγινε αποδιάταξη στους 99°C για 10min και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο αμέσως μετά, για να αποφευχθεί η επαναφορά του σε δίκλωνη κατάσταση

Γ. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (14%)

1. Η πηκτή μεταφέρθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και φορτώθηκε με τα δείγματα, έπειτα συνδέθηκε με τροφοδοτικό και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο 150V για 14 ώρες.

Η ηλεκτοφόρηση γίνεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5% (παρασκευάζεται με αραιώση πυκνότερου διαλύματος 10xTBE: 0,9M Trizma base, 0,9M βορικό οξύ, 20mM EDTA pH 8.0)

Δ. Χρώση της πηκτής

1. Η πηκτή αφαιρέθηκε από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και μεταφέρθηκε σε σκεύος το οποίο τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα
2. Βυθίστηκε σε 200ml διαλύματος οξικού οξέως για 2min και ακολούθησαν 2 πλύσεις με ddH₂O για 2min η κάθε μία. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε άλλη μία φορά
3. Στη συνέχεια βυθίστηκε σε διάλυμα νιτρικού αργύρου για 15min και ακολούθησαν 2 πλύσεις με ddH₂O για 2min η κάθε μία
4. Έπειτα βυθίστηκε σε διάλυμα καυστικού νατρίου με φορμαλδεΐδη μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες και ακολούθησε σύντομη πλύση με ddH₂O
5. Τέλος, μεταφέρθηκε σε φωτεινή τράπεζα για να παρατηρηθεί και αποθηκεύτηκε

Στον Πίνακα 2.γ τα συστατικά για τη χρώση της πηκτής.

Πίνακας 2.γ: Συστατικά για τη χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Συστατικά διαλύματος οξικού οξέος	400ml νερό + 0,5ml οξικό οξύ
Συστατικά διαλύματος νιτρικού αργύρου	200ml νερό + 0,2g AgNO ₃
Διάλυμα καυστικού νατρίου με φορμαλδεΐδη	200ml νερό + 3g NaOH + 0,01g NaBH ₄ + 1ml φορμαλδεΐδη 70%

2.8. HRM (High-Resolution Melting, Υψηλής Ανάλυσης Καμπύλες Τήξης)

Η HRM είναι μία καινοτόμος τεχνική ταυτοποίησης σημειακών μεταλλάξεων, η οποία βασίζεται στην ανάλυση της τήξης του DNA. Με τη χρήση της μπορούν να χαρακτηριστούν δείγματα DNA με βάση τη συμπεριφορά διαχωρισμού τους, καθώς μεταβαίνουν από τη δίκλωνη κατάσταση σε μονόκλωνη με την αύξηση της θερμοκρασίας. Πριν γίνει αυτή η ανάλυση, η αλληλουχία-στόχος πρέπει να ενισχυθεί σε πολλαπλά αντίγραφα παρουσία της χρωστικής, στη συγκεκριμένη περίπτωση EvaGreen, η οποία προσδένεται μόνο σε δίκλωνο μόριο DNA και φθορίζει έντονα όταν είναι προσδεμένη. Αυτός ο φθορισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της αύξησης της συγκέντρωσης του DNA στο προϊόν της PCR και μετά απευθείας να μετρηθεί η τήξη του DNA που προκλήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την HRM.

Για να πραγματοποιηθεί η HRM αυξάνεται η θερμοκρασία σταδιακά σε ένα εύρος που προτείνεται. Ο φθορισμός από τη χρωστική EvaGreen μετριέται συνεχώς, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται και εμφανίζεται σε διάγραμμα η μεταξύ τους σχέση. Επειδή έχει προηγηθεί ενίσχυση, ο φθορισμός θα είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα κατά την έναρξη της HRM. Καθώς ξεκινάει η τήξη του δίκλωνου DNA η EvaGreen αποδεσμεύεται και ο φθορισμός μειώνεται σε επίπεδο υπόβαθρου.

Η HRM ως τεχνική είναι πιο εύκολη και πιο οικονομική σε σχέση με άλλες μεθόδους γονοτύπησης και, επειδή πρόκειται για τεχνική κλειστού συστήματος, δεν τίθενται θέματα επιμόλυνσης μεταξύ των δύο βημάτων.

Για να μπορεί να γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων, σε κάθε αντίδραση θα πρέπει να υπάρχει τουλάχιστον ένα δείγμα γνωστού γονότυπου. Στην παρούσα μελέτη υπήρχαν τρία δείγματα, ένα από κάθε γονότυπο (ομόζυγος για το συχνό, ετερόζυγος, ομόζυγος για το σπάνιο αλληλόμορφο).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

A. Προετοιμασία δειγμάτων

1. Σε σωληνάρια PCR τοποθετήθηκε προκαθορισμένος όγκος δείγματος, έτσι ώστε η ποσότητα του DNA να είναι 50ng, και συμπληρώθηκε σε τελικό όγκο 25μl με το μείγμα που περιέχει 12,5μl 2x HRM PCR Master Mix (HotStarTaq Plus DNA Polymerase, fluorescent dye EvaGreen, Type-it HRM PCR Buffer, Q-Solution και dNTPs) από το Type-it HRM PCR Kit της QIAGEN, 1,75μl από τον κάθε εκκινητή (10pmol/μl) και ποσότητα RNase Free Water για ρύθμιση τελικού όγκου αντίδρασης στα 25μl (το οποίο περιλαμβάνεται στο ίδιο Kit)
2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον Rotor-Gene® Q cycler της QIAGEN

Η τελική ποσότητα των συστατικών για το mix υπολογίζεται με βάση τον αριθμό των αντιδράσεων που θα γίνουν κάθε φορά, συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα και μιας ποσότητας 10% επιπλέον για λόγους ασφαλείας (διαφοροποίηση στην ακρίβεια της πιπέτας). Ο αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση.

B. Ρύθμιση συνθηκών PCR

1. Ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης στους 95°C για 5min
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 10sec
3. Υβριδοποίηση και επέκταση στους 55°C για 30sec
4. Τα στάδια της PCR επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους

Γ. HRM

1. HRM, η οποία ξεκινάει στους 65°C με σταδιακή άνοδο της θερμοκρασίας έως τους 95°C.

Αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 40min

Δ. Ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα «Rotor-Gene Q Series Software»

1. Επιλέχθηκε «Analysis» → «Quantitation» → «Show» και μετά «Linear Scale» για να εμφανιστεί το διάγραμμα σε λογαριθμική κλίμακα από γραμμική

2. Ρυθμίστηκε το «Threshold» στη θέση όπου τα δείγματα αρχίζουν την εκθετική φάση και ελέγχθηκε το Ct, το οποίο εμφανίζεται αυτόματα σε πίνακα για όλα τα δείγματα, για να αποκλειστούν από περαιτέρω ανάλυση τυχόν δείγματα που η διαφορά κύκλων ξεπερνάει τους 3

3. Επιλέχθηκε «Analysis» → «Melt» → «Show» όπου ελέγχθηκε πιθανή ύπαρξη διμερών

4. Επιλέχθηκε «Analysis» → «Other» → «High Resolution Melt Analysis» → «Show»

5. Στο διάγραμμα με τα Raw Data επιλέχθηκε «Genotypes» και στον πίνακα που προέκυψε ρυθμίστηκε ο γονότυπος των γνωστών δειγμάτων και σε ποια θέση βρίσκονται και επιλέχθηκε «Ok»

6. Στο ίδιο διάγραμμα μετακινήθηκαν τα «Normalization Regions» στις θέσεις ακριβώς πριν και μετά την τήξη. Οι καμπύλες που περικλείονται από αυτές τις δύο περιοχές κανονικοποιούνται και εμφανίζονται σε ξεχωριστό διάγραμμα. Η κανονικοποίηση επιτρέπει όλες οι καμπύλες να συγκριθούν με ίδιο επίπεδο έναρξης και λήξης σήματος φθορισμού, κάτι που βοηθάει στην ανάλυση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε πίνακα εμφανίστηκαν τα δείγματα που έχουν τον ίδιο γονότυπο με τα γνωστά αυτομάτως

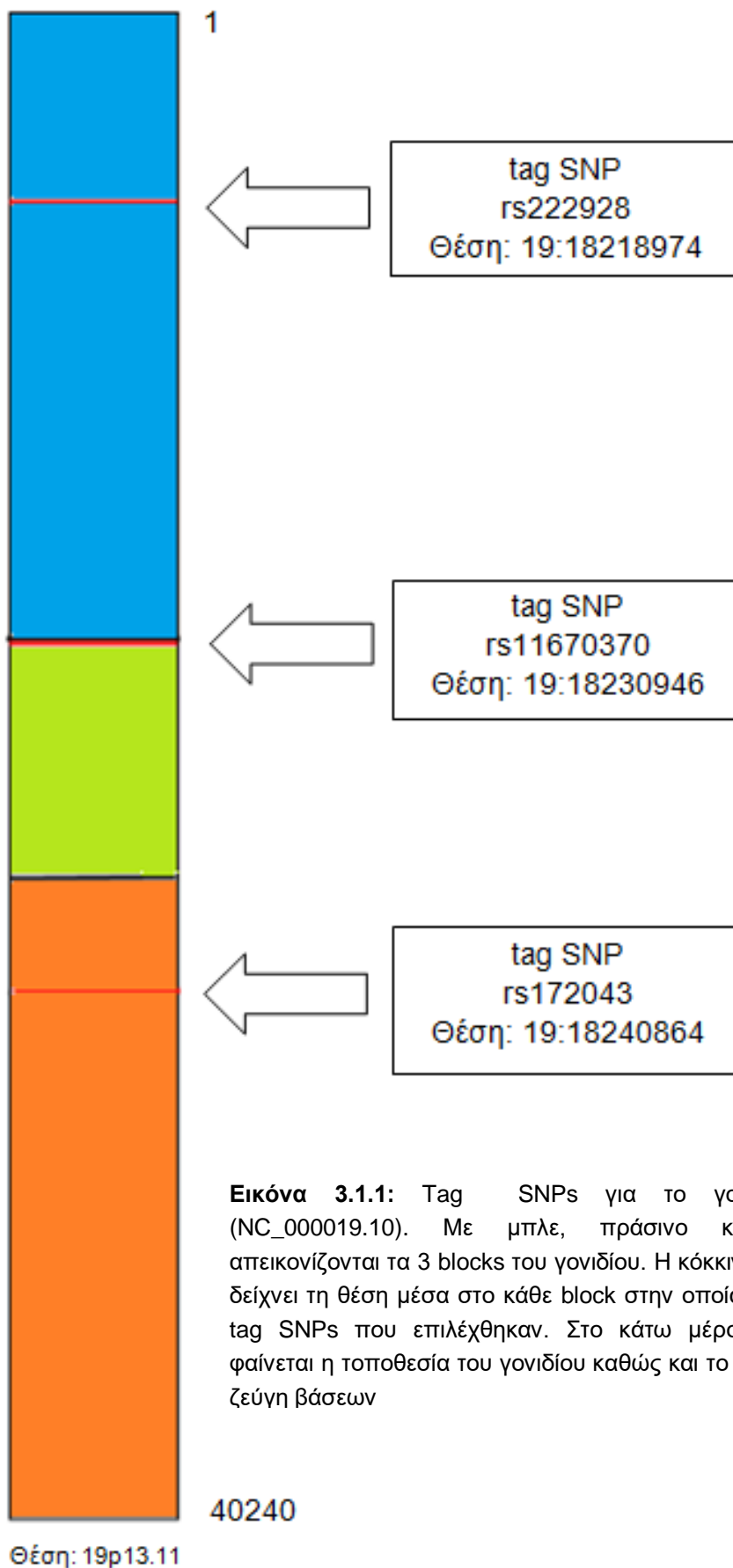
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ (SNPs) ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *PDE4A* ΚΑΙ *PDE4C*

Η απρεμιλάστη επιδρά στην *PDE4*, η οποία κωδικοποιείται από τέσσερα γονίδια τα A, B, C και D. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τα γονίδια *PDE4A* και *PDE4C* προς ανάλυση, επειδή το *PDE4B* έχει ήδη μελετηθεί στα συγκεκριμένα δείγματα ενώ παράλληλα το μικρότερό τους μέγεθος, σε σχέση με το *PDE4D*, τα καθιστά πιο εύχρηστα. Η επιλογή των SNPs που γονοτυπήθηκαν έγινε με τη διαδικασία που αναφέρεται στην ενότητα 2.2 και βασίστηκε στη συχνότητα εμφάνισης αυτών των SNPs στον υπό μελέτη πληθυσμό, καθώς και στη δυνατότητα σχεδιασμού εκκινητών. Από αυτή την αναζήτηση βρέθηκε πως ο συνολικός αριθμός των SNPs του γονιδίου *PDE4A* είναι 13.428, από τα οποία 60 έχουν συχνότητα μεγαλύτερη από 10% παγκοσμίως και του γονιδίου *PDE4C* είναι 10.529, από τα οποία 91 έχουν

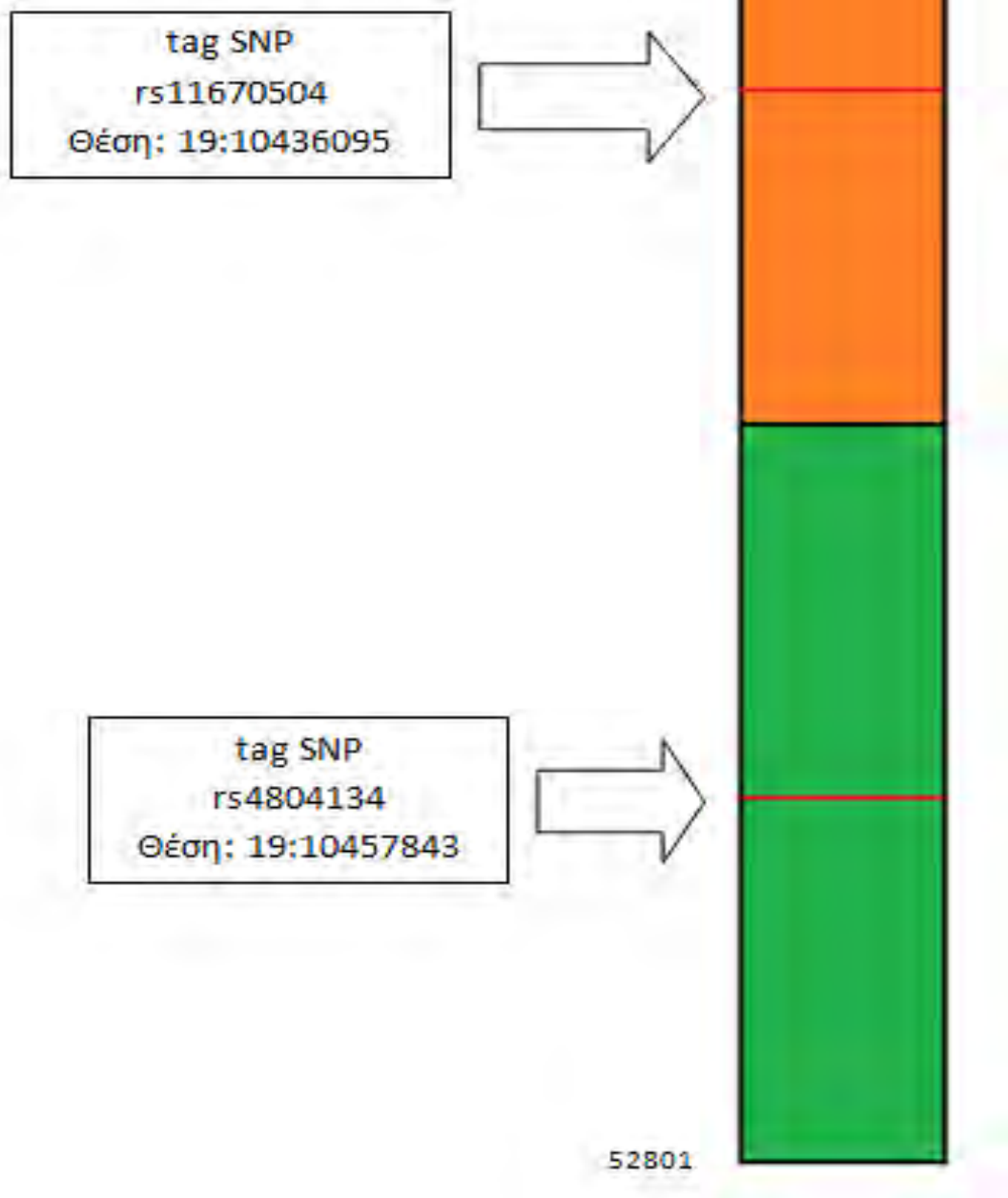
συχνότητα μεγαλύτερη από 10% παγκοσμίως. Για το *PDE4A* προέκυψαν δύο ομάδες SNPs τα οποία εμφανίζουν μεταξύ τους υψηλά επίπεδα ανισορροπίας σύνδεσης (blocks) και για το *PDE4C* προέκυψαν τρεις ομάδες. Επιλέχθηκε ένα SNP από κάθε ομάδα προς γονοτύπηση, με βάση τη συχνότητά τους στον Ιταλικό και Ισπανικό πληθυσμό.

Στις εικόνες 3.1.1 και 3.1.2 εμφανίζονται τα tag SNPs, όπως επιλέχθηκαν.



Εικόνα 3.1.1: Tag SNPs για το γονίδιο *PDE4C* (NC_000019.10). Με μπλε, πράσινο και πορτοκαλί απεικονίζονται τα 3 blocks του γονιδίου. Η κόκκινη διαγράμμιση δείχνει τη θέση μέσα στο κάθε block στην οποία βρίσκονται τα tag SNPs που επιλέχθηκαν. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η τοποθεσία του γονιδίου καθώς και το μέγεθός του σε ζεύγη βάσεων

Εικόνα 3.1.2: Tag SNPs για το γονίδιο *PDE4A* (NC_000019.10). Με πορτοκαλί και πράσινο απεικονίζονται τα 2 blocks του γονιδίου. Η κόκκινη διαγράμμιση δείχνει τη θέση μέσα στο κάθε block στην οποία βρίσκονται τα tag SNPs που επιλέχθηκαν. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων



3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΑ TAG SNPs ΤΩΝ *PDE4A* ΚΑΙ *PDE4C*

Η επιλογή κατάλληλου ζεύγους εκκινήτων καθορίζει την ορθότητα των αποτελεσμάτων της μελέτης. Ένα ζεύγος εκκινήτων, για να θεωρηθεί κατάλληλο θα πρέπει να τηρεί κάποιες προϋποθέσεις, όπως αναφέρονται στην ενότητα 2.3.

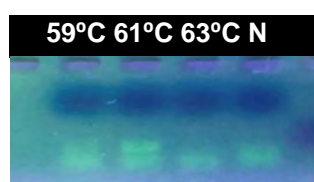
Στην εικόνα 3.2.1 φαίνεται ένα μικρό κομμάτι της αλληλουχίας του *PDE4C* από τη βάση δεδομένων NCBI (NC_000019), το οποίο περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs11670370, καθώς και τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων. Ο εμπρόσθιος εκκινήτης αποτελείται από 20 νουκλεοτίδια, έχει θερμοκρασία τήξης 59,4°C και 55% περιεκτικότητα σε GC και ο ανάστροφος εκκινήτης από 21 νουκλεοτίδια, με θερμοκρασία τήξης 57,9°C και 47,6% περιεκτικότητα σε GC. Αυτό το ζεύγος εκκινήτων δίνει προϊόν με μήκος 99bp, μέγεθος που είναι κατάλληλο για την γονοτύπηση με HRM.



c tcttgggggaatgtgcttc ccacagcccc agatggatca cagggtatg ggagggtcta agcattttgtgagaaggca ttaagcacc tactgggt

Εικόνα 3.2.1: Προϊόν της PCR, όπου αποτυπώνονται με κίτρινο χρώμα οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων και με κόκκινο χρώμα η θέση του SNP rs11670370 .

Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης εκκινήτων ακολουθείται αρχικά ο εμπειρικός κανόνας $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$, ο οποίος μας δίνει τη θεωρητική θερμοκρασία και ακολουθεί PCR κλίσης θερμοκρασίας, στην οποία ελέγχεται πειραματικά. Για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινήτων που προαναφέρθηκε η θεωρητική θερμοκρασία ήταν 62°C και, αφού δοκιμάστηκε πειραματικά στους 59/61/63°C, βρέθηκε πως η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 61°C , όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.2



Εικόνα 3.2.2: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης PCR κλίσης θερμοκρασίας. Η βέλτιστη θερμοκρασία εντοπίζεται παρατηρώντας τον πιο έντονο φθορισμό (61°C). Σε όλες τις θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δείγμα. Το δείγμα N αποτελεί τον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης.

Στην εικόνα 3.2.3 φαίνεται ένα μικρό κομμάτι της αλληλουχίας του *PDE4A* από τη βάση δεδομένων NCBI (NC_000019), το οποίο περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs11670504, καθώς και τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων. Ο εμπρόσθιος εκκινήτης αποτελείται από 20 νουκλεοτίδια, έχει θερμοκρασία τήξης 60,39°C και 60% περιεκτικότητα σε GC και ο ανάστροφος εκκινήτης από 20 νουκλεοτίδια, με θερμοκρασία τήξης 60,25°C και 60% περιεκτικότητα σε GC. Αυτό το ζεύγος εκκινήτων

δίνει προϊόν με μήκος 113bp, μέγεθος που είναι κατάλληλο για την γονοτύπηση με HRM.

```
gacgtgag ctgagtcctcct tggggctggt ggatgtacca ggatgtgcta gctgggcacc tgcttggaa caagatctca  
ccctcctaaa ctgcagctta aatcctaagg cgggg
```

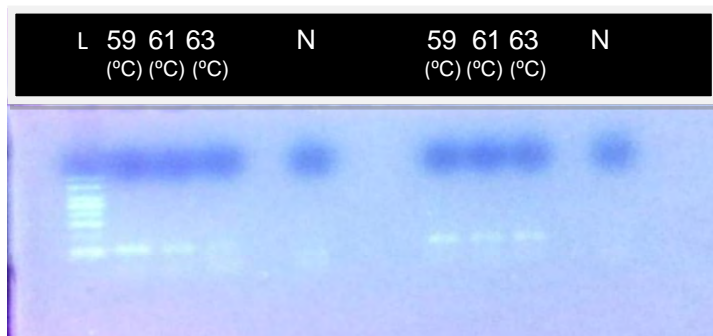
Εικόνα 3.2.3: Προϊόν της PCR, όπου αποτυπώνονται με κίτρινο χρώμα οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών και με κόκκινο χρώμα η θέση του SNP rs11670504.

Στην εικόνα 3.2.4 φαίνεται ένα μικρό κομμάτι της αλληλουχίας του *PDE4A* από τη βάση δεδομένων NCBI (NC_000019), το οποίο περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό rs4804134, καθώς και τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών. Ο εμπρόσθιος εκκινητής αποτελείται από 21 νουκλεοτίδια, έχει θερμοκρασία τήξης 59,79°C και 52% περιεκτικότητα σε GC και ο ανάστροφος εκκινητής από 21 νουκλεοτίδια, με θερμοκρασία τήξης 59,86°C και 52% περιεκτικότητα σε GC. Αυτό το ζεύγος εκκινητών δίνει προϊόν με μήκος 115bp, μέγεθος που είναι κατάλληλο για την γονοτύπηση με HRM.

```
Tgggctga agaataaggg agcctccagg ggtggaaggg ctgttcacac ttgttcctgc tccccatctt  
ctgcagacaaa acagaatgaa gtggagatcc catcacccac gatgaag
```

Εικόνα 3.2.4: Προϊόν της PCR, όπου αποτυπώνονται με κίτρινο χρώμα οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών και με κόκκινο χρώμα η θέση του SNP rs4804134

Για τα δύο αυτά ζεύγη εκκινητών που προαναφέρθηκαν η θεωρητική θερμοκρασία ήταν 64°C και, αφού δοκιμάστηκε πειραματικά στους 59/61/63°C, βρέθηκε πως η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 59°C και για τα δύο, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.5.



Εικόνα 3.2.5: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης PCR κλίσης θερμοκρασίας. Η βέλτιστη θερμοκρασία εντοπίζεται παρατηρώντας τον πιο έντονο φθορισμό (59°C). Σε όλες τις θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε το ίδιο δείγμα. Το δείγμα N αποτελεί τον αρνητικό έλεγχο της αντίδρασης και με L συμβολίζεται ο ladder. Η πρώτη ομάδα δειγμάτων αφορά τον πολυμορφισμό rs11670504 και η δεύτερη τον rs4804134.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

Όπως αναφέρθηκε στις μεθόδους, έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από δείγματα ασθενών με ψωρίαση που λαμβάνουν Otezla και ακολούθησε η ποσοτικοποίησή τους με το Quawell και το Qubit, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 3.α. Αφού ολοκληρώθηκε η ποσοτικοποίηση με το Quawell, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε καλή επαναληψιμότητα στις μετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα, η απόκλιση 1^{ης} και 2^{ης} μέτρησης του ίδιου δείγματος μπορεί να ήταν πάνω από 20 ng/μl. Επιπλέον, οι τιμές των συγκεντρώσεων ήταν πολύ μεγαλύτερες από τις πραγματικές με βάση τις καμπύλες που λήφθηκαν από την HRM. Αυτοί ήταν οι λόγοι που οδήγησαν σε αλλαγή μεθόδου ποσοτικοποίησης.

Πίνακας 3.α: Η καθαρότητα (λόγος 260/280) και η συγκέντρωση (ng/μl) όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

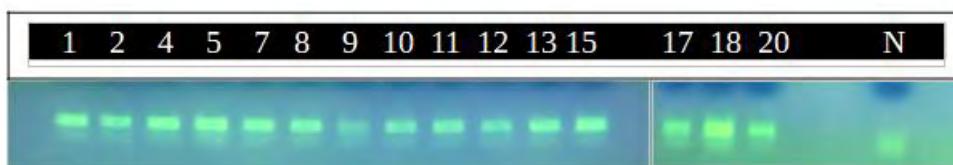
Δείγμα	Quawell		Qubit	Δείγμα	Quawell		Qubit
	260/280	ng/μl	ng/μl		260/280	ng/μl	ng/μl
Apré 1	1,55	158,1	90	Apré 23	1,57	28,8	6,22
Apré 2	1,71	117,6	66,94	Apré 24	1,79	27,2	33
Apré 4	1,49	34,1	19,4	Apré 25	1,44	70,8	86,64
Apré 5	1,37	14,4	3,55	Apré 26	1,28	77,8	44,28
Apré 6	1,56	70,0	33	Apré 27	1,61	76,4	7,7
Apré 7	1,36	26,3	14,97	Apré 29	1,49	20,9	11,89
Apré 8	1,48	44,7	9	Apré 30	1,52	76,5	7,66
Apré 9	1,64	23,2	8,14	Apré 31	1,48	74,0	7,4
Apré 10	1,44	64,1	9	Apré 33	1,37	18,8	1,88
Apré 11	1,34	26,2	9,2	Apré 33	1,37	18,8	1,88
Apré 13	1,64	46,4	15,74	Apré 34	1,62	68,4	38,97
Apré 14	1,76	25,1	8,5	Apré 36	1,63	155,6	15,56
Apré 15	1,62	44,0	4,4	Apré 37	1,36	65,6	6,56
Apré 16	1,51	44,2	25,28	Apré 38	1,20	13,2	1,32
Apré 17	1,32	13,6	1,36	Cos 2	1,65	176,7	100,7
Apré 18	1,38	53,7	11,6	Cos 5	1,40	23,2	2,32
Apré 19	1,58	35,9	3,59	Cos 10	1,46	69,3	6,81
Apré 20	1,07	233,5	20,4	Cos 21	1,64	16,7	9,5
Apré 21	1,46	21,1	1,84	Cos 23	1,45	43,3	4,3

Τα δείγματα που ποσοτικοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις προέρχονται από την ίδια απομόνωση. Παρατηρώντας τον πίνακα 3.α., βλέπουμε ότι οι συγκεντρώσεις που λήφθηκαν από το Quawell είναι σχεδόν σε όλα τα δείγματα μεγαλύτερες από αυτές που υπολογίστηκαν με το Qubit και αυτή η διαφορά δεν έχει κάποιο μοτίβο. Όπως προαναφέρθηκε, κατά την ποσοτικοποίηση με το Quawell εντοπίστηκε απουσία επαναληψιμότητας, γεγονός που καθιστά το Qubit καταλληλότερο και ίσως πιο αξιόπιστο.

3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ rs11670370 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *PDE4C*

Όπως αναφέρεται στην ενότητα 2.6 των «Υλικών και Μεθόδων», πραγματοποιήθηκε PCR σε 15 δείγματα, με σκοπό την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος που περικλείει τον προς μελέτη πολυμορφισμό. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτός ο αριθμός δειγμάτων ήταν ότι θα ακολουθούσε αρχικά γονοτύπηση με SSCP ώστε να υπάρχουν ενδείξεις για τους γονοτύπους για την HRM που θα ακολουθούσε σε όλα τα δείγματα, η οποία είναι μία μέθοδος που δεν είχε βελτιστοποιηθεί, και βάση της συχνότητας του SNP που μελετάται οι πιθανότητες να βρεθεί άτομο ομόζυγο για το σπάνιο αλληλόμορφο ήταν ικανοποιητικές.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2,5% για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της ενίσχυσης. Στην εικόνα 3.4.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα.

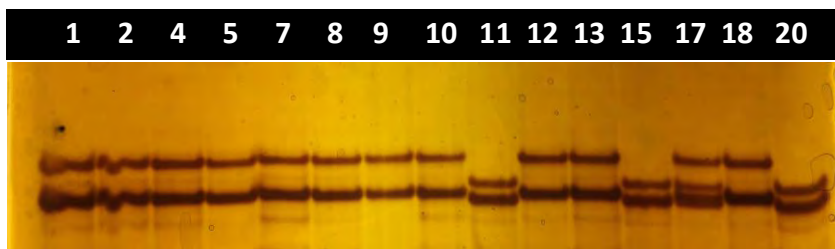


Εικόνα 3.4.1: Αποτελέσματα PCR. Από τη ζώνωση σε όλα τα δείγματα εκτός του αρνητικού μάρτυρα (N) συμπεραίνουμε την επιτυχή ενίσχυση του προς μελέτη τμήματος. Σε ορισμένα δείγματα φαίνεται και η περίσσεια των εκκινητών.

3.5. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΜΕ SSCP

Αρχικά δοκιμάστηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική συγκέντρωσης 12% για 18 ώρες αλλά μετά τη χρώση δεν υπήρχαν εμφανείς ζώνες. Ακολούθησε δοκιμή για 14 ώρες, στην οποία εμφανίστηκαν ζώνες αλλά ήταν πολύ χαμηλά στη πηκτική και, τέλος, καταλήξαμε στις ιδανικές συνθήκες για προϊόν PCR μεγέθους γύρω στα 100bp, οι οποίες αναγράφονται στην ενότητα 2.7.

Τα προϊόντα της PCR από τη διαδικασία που προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν για τη γονοτύπηση με SSCP, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στην εικόνα 3.5.1.

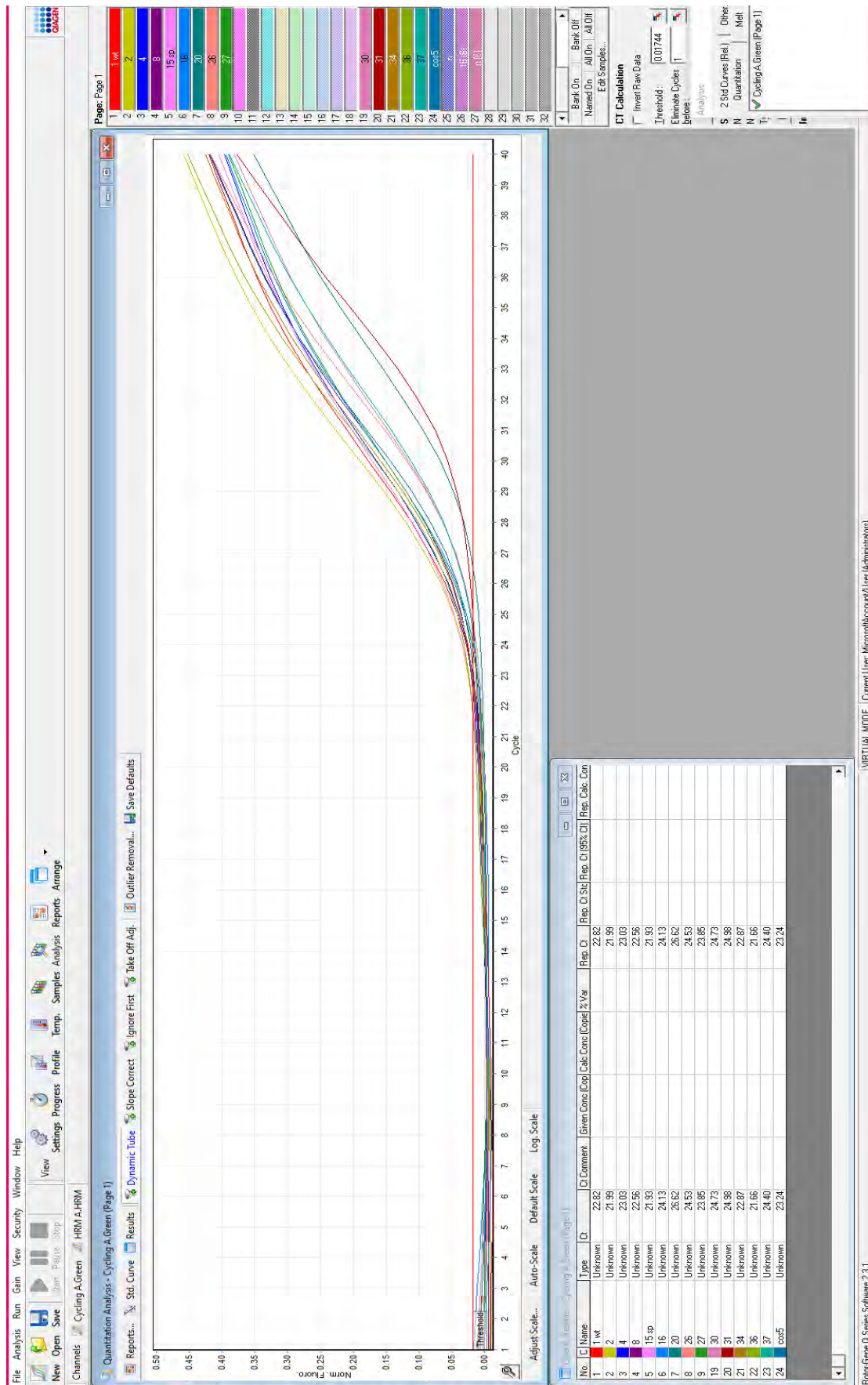


Εικόνα 3.5.1: Απεικόνιση διαφορετικών γονοτύπων από την SSCP. Οι πιθανοί γονότυποι είναι: δείγματα 1-10, 12, 13, 18: ομόζυγο για το συχνό αλληλόμορφο, επειδή είναι το πιο συχνό πρότυπο ζώνωσης (2 ζώνες) που παρατηρείται σε αυτή την τυχαία επιλογή δειγμάτων. Δείγματα 11, 15, 20: ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο, αφού παρατηρείται διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης (2 ζώνες). Δείγμα 17: ετερόζυγο, διότι παρατηρείται πρότυπο ζώνωσης (3 ζώνες) που είναι συνδυασμός των άλλων δύο.

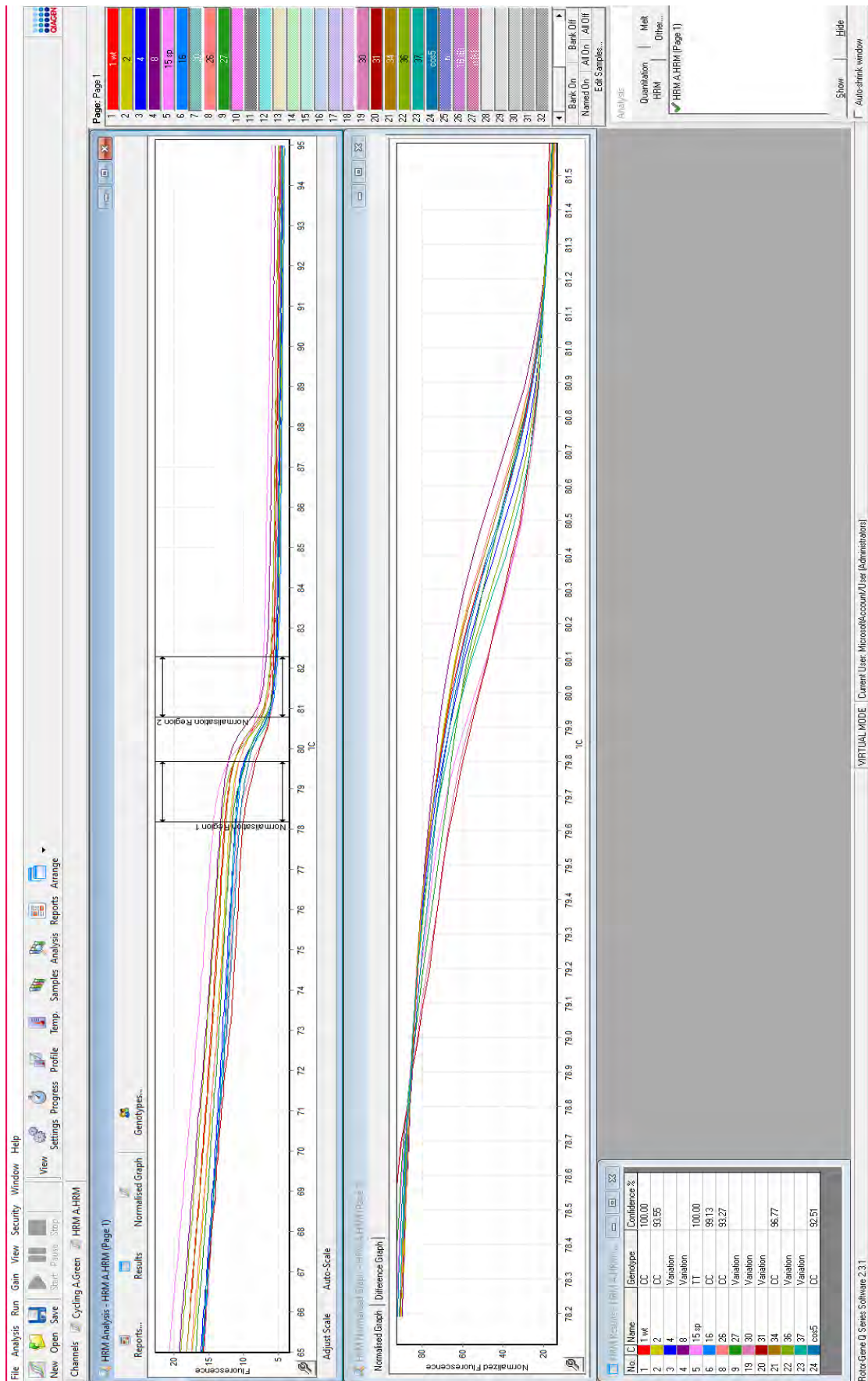
3.6. ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ HRM

Ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.9 πραγματοποιήθηκε η γονοτύπηση του συνόλου των δειγμάτων για το SNP rs11670370 του γονιδίου *PDE4C*. Στις εικόνες 3.7.1 και 3.7.2 παρατίθενται ενδεικτικά στάδια της διαδικασίας ανάλυσης. Στο Quantitation Analysis (εικόνα 3.7.1) σε διάγραμμα, όπου στον κάθετο άξονα φαίνεται η ένταση του φθορισμού σε λογαριθμική κλίμακα και στον οριζόντιο ο αριθμός από τους κύκλους, φαίνεται η επιτυχημένη ενίσχυση των δειγμάτων. Τα διαφορετικά δείγματα απεικονίζονται με χρωματιστές γραμμές μέσα στο διάγραμμα και το όνομα του κάθε δείγματος σε πλαίσιο αντίστοιχου χρώματος στο δεξί μέρος της εικόνας. Με κόκκινη οριζόντια γραμμή εμφανίζεται η θέση στην οποία τέθηκε το Threshold. Στο πλαίσιο κάτω αριστερά της εικόνας εμφανίζεται το Ct για το κάθε δείγμα, το οποίο είναι το σημείο όπου το σήμα της χρωστικής περνάει το κατώφλι και είναι πλέον ανιχνεύσιμο. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το δείγμα 20 ξεκινάει πάνω από τρεις κύκλους αργότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, το οποίο σημαίνει ότι η αρχική ποσότητα του DNA που εμπεριέχονταν σε αυτό το δείγμα ήταν μικρότερη. Συνεπώς, εξαιρέθηκε από περαιτέρω ανάλυση. Στην εικόνα 3.7.2 φαίνεται το HRM Analysis. Στο πάνω διάγραμμα είναι τα Raw Data, όπου στον κάθετο άξονα είναι η ένταση του φθορισμού και στον οριζόντιο η θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου. Τα δείγματα απεικονίζονται και πάλι με χρωματιστές γραμμές και επειδή και οι δύο εικόνες προέρχονται από το ίδιο run, το χρώμα του κάθε δείγματος είναι ίδιο. Στο κάτω διάγραμμα είναι τα Normalized Data, τα οποία διαμορφώνονται ανάλογα με τις θέσεις που τίθενται τα Normalized Regions. Αφού ρυθμίστηκαν οι γονότυποι στα γνωστά δείγματα, στην προκειμένη περίπτωση το 1 (CC, συχνό αλληλόμορφο) και το 15 (TT, σπάνιο αλληλόμορφο), στο πλαίσιο κάτω αριστερά εμφανίστηκαν αυτόματα όλα όσα έχουν ίδιο γονότυπο με τα γνωστά. Στην προκειμένη περίπτωση προέκυψε ότι τα δείγματα 2, 16, 26, 34 και cos5 έχουν το συχνό αλληλόμορφο.

Τα αποτελέσματα του συνόλου της ανάλυσης παρατίθενται στον πίνακα 3.β. Όλα τα δείγματα τα οποία ομαδοποιήθηκαν αυτόματα με κάποιο από τα γνωστά φαίνονται στον πίνακα 3.β κάτω από την αντίστοιχη ομάδα. Δείγματα τα οποία ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους αυτόματα αλλά όχι με κάποιο από τα γνωστά φαίνονται στον ίδιο πίνακα ως Ομάδες Α και Β.



Εικόνα 3.7.1.: Quantitation Analysis



Εικόνα 3.7.2.: HRM Analysis

Πίνακας 3.β.: Γονοτύπηση δειγμάτων με HRM για το SNP rs11670370 του γονιδίου *PDE4C*

Συχνό Αλληλόμορφο (CC)	Ετερόζυγος (CT)	Σπάνιο Αλληλόμορφο (TT)	Ομάδα Α	Ομάδα Β
Apr 1	Apr 17	Apr 5	Apr 13	Apr 9
Apr 2	Apr 19	Apr 6	Apr 14	Apr 11
Apr 4	Apr 27	Apr 15	Apr 18	
Apr 7	Apr 30	Apr 20	Apr 23	
Apr 8	Apr 31	Apr 21	Apr 24	
Apr 16	Apr 33		Apr 25	
Apr 26	Cos 10			
Apr 29	Cos 23			
Apr 34				
Apr 36				
Apr 37				
Apr 38				
Cos 2				
Cos 5				
Cos 21				

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ψωρίαση είναι μία αυτοάνοση ασθένεια που απασχολεί ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού. Στις θεραπείες που προσφέρονται για την ψωρίαση συγκαταλέγονται συστημικά φάρμακα και βιολογικοί παράγοντες, οι οποίες, αν και αποτελεσματικές για κάποιους ασθενείς, είναι μη αποτελεσματικές ή τοξικές για άλλους. Έτσι, κοντά στα συστημικά φάρμακα και τους βιολογικούς παράγοντες, έρχεται να προστεθεί σχετικά πρόσφατα ένα νέο φάρμακο, η απρεμιλάστη, η οποία καλύπτει ένα κενό για ασθενείς που δεν αποκρίνονται στις προηγούμενες θεραπείες ή εμφανίζουν παρενέργειες. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται η ανάγκη φαρμακογενετικών μελετών, οι οποίες θα προσφέρουν τη δυνατότητα εξατομικευμένης θεραπείας, με δυνητικά καλύτερα αποτελέσματα.

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες φαρμακογενετικές μελέτες, οι οποίες αφορούν κυρίως βιολογικά φάρμακα (ινφλιξιμάμπη, αδαλιμουμάμπη, ετανερσέπτη, ουστεκινουμάμπη) και συστημικές θεραπείες με μη βιολογικούς παράγοντες (μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη, ακιτρετίνη). Από την άλλη δεν έχει γίνει κάποια μελέτη για την απρεμιλάστη, παρόλο που ως φάρμακο έχει ελάχιστες παρενέργειες και μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Η παρούσα φαρμακογενετική μελέτη αφορά την απρεμιλάστη, η οποία δρα με ανασταλτικό τρόπο στη φωσφοδιεστεράση 4 και άρα, πολυμορφισμοί πάνω στα τέσσερα γονίδια που την κωδικοποιούν είναι λογικό πεδίο έρευνας. Οι πολυμορφισμοί που υπάρχουν σε αυτά τα γονίδια είναι πάρα πολλοί για να μελετηθούν όλοι αλλά, λόγω της ανισορροπίας σύνδεσης που υπάρχει μεταξύ αυτών, ανάλογα με την πληθυσμιακή ομάδα η οποία μελετάται κάθε φορά μπορούν να επιλεγούν tag SNPs

προς μελέτη τα οποία είναι πολύ λιγότερα σε αριθμό. Το γονίδιο *PDE4A* που αναλύθηκε, βάσει ανισορροπίας σύνδεσης χωρίστηκε σε δύο blocks και άρα επιλέχθηκαν δύο SNPs, ένα από κάθε block, τα rs11670504 και rs4804134. Για το γονίδιο *PDE4C* από την ανάλυση προέκυψαν τρία blocks και επιλέχτηκε ένα tag SNP για κάθε ένα από αυτά. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή την εργασία μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs11670370 αυτού του γονιδίου σε 37 ασθενείς με ψωρίαση που λάμβαναν απρεμιλάστη για τουλάχιστον έξι μήνες.

Για τη γονοτύπηση των ασθενών χρησιμοποιήθηκε μία σχετικά καινούργια μέθοδος, η HRM. Προσφέρει χαμηλότερο κόστος, μεγαλύτερη ακρίβεια και ταχύτητα σε σχέση με άλλες τεχνικές, ωστόσο έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Για να επιτευχθούν αποτελέσματα με ακρίβεια χρειάζεται η μέθοδος ποσοτικοποίησης των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθεί να είναι επίσης ακριβής, το οποίο από μόνο του μπορεί να είναι μία πρόκληση. Για παράδειγμα, στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης (με Quawell και Qubit), επειδή η πρώτη δεν πρόσφερε ικανοποιητική επαναληψιμότητα. Επίσης, τα δείγματα είναι καλό να ρυθμιστούν στην ίδια αρχική συγκέντρωση, αφού ακόμη και διαφορά ελάχιστων νανογραμμαρίων μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση, όπως παρατηρήθηκε πειραματικά, πράγμα που δεν αφήνει μεγάλο περιθώριο για τη διαφοροποίηση της πιπέτας.

Η HRM είναι μία μέθοδος που δεν έχει βελτιστοποιηθεί ακόμη και έτσι δεν μπορούμε να αξιοποιήσουμε τα θετικά που έχει να προσφέρει. Και αυτό γιατί παρατηρήθηκε ότι από αντίδραση σε αντίδραση υπήρχαν διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα, δηλαδή δείγματα τα οποία σε μία αντίδραση φάνηκε να έχουν έναν γονότυπο, σε ακόλουθη φάνηκε να έχουν άλλον. Υπήρχαν, επίσης, δείγματα τα οποία είχαν ομαδοποιηθεί από την SSCP αλλά οι ομάδες στις οποίες κατέληξαν με την HRM ήταν διαφορετικές. Συνεπώς, αν είναι δυνατή η βελτιστοποίηση, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και με συγκεκριμένα DNAs να γονοτυπηθούν γρήγορα και οικονομικά πολλά SNPs.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μικρότερη συχνότητα σπάνιου αλληλόμορφου (18%) σε σχέση με τη συχνότητα στους Ευρωπαίους (29%). Βρέθηκαν 15 ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό αλληλόμορφο (CC), 8 ασθενείς ετερόζυγοι (CT) και 5 ασθενείς ομόζυγοι για το σπάνιο αλληλόμορφο (TT). Λόγω του χαμηλού αριθμού των δειγμάτων δεν πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου και της απόκρισης των ασθενών.

Ένας από τους μελλοντικούς στόχους της παρούσας έρευνας, συνεπώς, είναι η συγκέντρωση και ανάλυση τουλάχιστον 100 δειγμάτων, ώστε να μπορεί να γίνει στατιστικά σημαντική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, σε δεύτερο χρόνο, θα μελετηθούν πολυμορφισμοί και στα υπόλοιπα γονίδια της φωσφοδιεστεράσης 4. Αξιοποιώντας την ανισορροπία σύνδεσης, ο αριθμός των SNPs που θα πρέπει να γονοτυπηθούν είναι μικρός. Η γνώση αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προ-θεραπευτικό έλεγχο σε ασθενείς με ψωρίαση, γεγονός που θα μας φέρει πιο κοντά στην εξατομικευμένη θεραπεία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

SNP	Gene	Population	Sample	PubMed ID
rs10036748-?	TNIP1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs1008953-C	SYS1, SDC4	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs10138228-?	AL110505.1, AL512361.1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs1042636-?	CASR	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs10459953-?	AC005697.1, NOS2	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs10484554-?	HLA-B	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs10484554-T	HLA-B	Northern European, U.S., U.K ,European	223 cases and 519 controls, 577 cases and 737 controls and 576 patients and 480 controls (accordingly), 1,430 cases and 1,417 controls	18369459, 26626624
rs1056198-C	RNF114	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs10746839-A	AL451142.2, RPSAP49	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs1076160-T	TSC1	European	5,048 cases and 5,041 controls	19169254
rs10782001-G	FBXL19	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs10789285-G	LINC01758, LINC02791	European	5,033 cases and 5,707 controls	25939698
rs10794648-C	LINC02800, IFNLR1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs10814247-G	RUSC2	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs10832027-?	ARNTL	Egyptian	574 cases and 702 controls	30921485
rs10865331-?	AC093159.2, RN7SL51P	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs10865331-A	AC093159.2, RN7SL51P	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs10888501-?	LCE3E, CRCT1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs10960680-?	TYRP1, RNU2-47P	Egyptian	574 cases and 702 controls	30921485
rs10979182-A	AC068050.1, CHCHD4P2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs11121129-A	LINC01714	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs11209026-?	IL23R	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs11249215-?	AL445471.2	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114212579-?	SKIV2L	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114265779-?	HCG17, TRIM26	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114383947-?	MUC22	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114598684-?	AL645933.5, MICA	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114757170-?	MRPS18B, PPP1R10	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs114934997-C	AC093277.1, AC108105.1	European	5,033 cases and 5,707 controls	25939698
rs115112280-?	TSBP1-AS1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115145466-?	NOTCH4, TSBP1-AS1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115295573-?	HSPA1B, HSPA1A	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115429782-?	HLA-B, LINC02571	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115429849-?	MICC	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115529844-?	AL645929.3	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs11554776-G	STING1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs115618145-?	RNF39, TRIM31	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115645848-?	GABBR1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173

rs115872194-?	BAG6	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs115928623-?	MICD	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs11593576-?	ZMIZ1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs116199901-?	HCG18, HCG17	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs116340302-?	RPL15P4	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs11652075-C	CARD14, AC087741.1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs116805908-?	POU5F1, PSORS1C3	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs11795343-T	DDX58	European Caucasian, Caucasian and Chinese, European	10,588 cases and 22,806 controls, meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 25903422, 26626624
rs11922372-C	OSTN, GMNC	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs11934907-A	AC116634.1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs12044149-T	C1orf141	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs12188300-T	AC008691.1	European Caucasian, German	10,588 cases and 22,806 controls, 609 cases and 990 controls	23143594, 20953186
rs12191877-?	HLA-B	German	472 cases and 1,146 controls & replication studies	20953188
rs12191877-T	HLA-B	European	1,430 cases and 1,417 controls, 5,048 cases and 5,041 controls	26626624, 19169254
rs12199223-?	HLA-B	Egyptian	574 cases and 702 controls	30921485
rs12356475-C	CTNNA3	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs12445568-C	STX1B	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs12489120-C	BHLHE40-AS1	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs1250544-G	ZMIZ1	European, Germany, Estonia, Italy, U.K., and U.S.	1,430 cases and 1,417 controls, 2,529 cases and 4,955 controls	26626624, 22482804
rs1250546-A	ZMIZ1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs12564022-T	C1orf141, IL23R	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs12580100-A	RPS26, ERBB3	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs12586317-T	PRORP, AL121594.1	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs12602912-G	BPTF	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs12650590-?	GUCY1A1, AC107208.1	Egyptian	574 cases and 702 controls	30921485
rs1265181-?	AL662844.4, POU5F1	Egyptian, Chinese	574 cases and 702 controls, 5,182 cases and 6,516 controls	30921485, 19169255
rs12720356-A	TYK2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 2,622 cases and 5,667 controls	23143594, 20953190
rs12884468-?	AL133163.1, AL133163.2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs12884468-G	AL133163.1, AL133163.2	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs12895275-G	RGS6	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs12924903-A	FBXL19-AS1, CTF2P	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs1295685-G	IL13, TH2LCRR	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs13017599-G	NONOP2	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs13190932-?	TRAF3IP2-AS1, TRAF3IP2	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs13191343-T	HLA-B	German	609 cases and 990 controls	20953186
rs13199524-?	AL662884.2, TNXB	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs13437088-T	HLA-S, AL645933.3	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs13708-G	STX1B	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs1386478-A	ZDHHC23	Germany, Estonia, Italy, U.K., and U.S.	2,529 cases and 4,955 controls	22482804
rs145699582-T	INSL6	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs1473247-?	RNF145	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761

rs149997688-?	DDR1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs1576-?	CCHCR1	Egyptian	574 cases and 702 controls	30921485
rs1610601-?	HLA-F, HLA-F-AS1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs16858224-?	TNS1, RPL7L1P9	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs17052344-A	UBBP4	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs17716942-A	KCNH7	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs17716942-T	KCNH7	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs17728338-A	ANXA6, TNIP1	Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls, 5,048 cases and 5,041 controls	25903422, 26626624, 19169254
rs181359-A	UBE2L3	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs191667458-T	USP49	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs1975974-G	UBBP4	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs1990760-T	IFIH1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs2020854-T	STAT2	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs20541-G	TH2LCRR, IL13	Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls, 5,048 cases and 5,041 controls	25903422, 26626624, 19169254
rs2066807-G	STAT2	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs2066808-?	STAT2	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs2066808-A	STAT2	European	5,048 cases and 5,041 controls	19169254
rs2066819-C	STAT2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs2082412-G	UBLCP1, AC008691.1	European	1,430 cases and 1,417 controls, 5,048 cases and 5,041 controls	26626624, 19169254
rs2111485-G	FAP, IFIH1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs2201841-G	C1orf141, IL23R	European	5,048 cases and 5,041 controls	19169254
rs2233278-C	TNIP1	European Caucasian, European, Japanese	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls, 606 cases and 2,052 controls	23143594, 26626624, 29031612
rs2235617-?	RNF114	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs2276405-?	AIM2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs2295359-A	C1orf141, IL23R	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs2395029-C	HCP5	Northern European, U.S., U.K	223 cases and 519 controls, 577 cases and 737 controls and 576 patients and 480 controls (accordingly)	18369459
rs240993-A	MFSD4B, REV3L	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs240993-T	MFSD4B, REV3L	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs2451258-C	AL356417.3, AL035530., AL035530.2	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs249038-?	AC008771.1, ZFYVE16	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs2504779-A	CD164L2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs2546890-A	AC008691.1	German	472 cases and 1,146 controls & replication studies	20953188
rs2621322-?	AL669918.1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs2675662-A	CAMK2G	European	5,033 cases and 5,707 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25939698, 26626624
rs2675669-T	PLAU, CAMK2G	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs2700987-A	ELMO1	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs27044-G	ERAP1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs27432-A	ERAP1	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs27524-A	CAST, ERAP1	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs2778031-A	AL451142.2, RPSAP49	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761

rs2781377-?	SYNE2, ESR2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs280519-A	TYK2	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs2847500-A	POU2F3	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs28512356-C	TP63, P3H2	Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25903422, 26626624
rs2853694-G	AC008691.1, IL12B	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs28724231-?	HLA-DQA1, HLA-DQB1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs28780111-?	HCG20	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs28998802-A	NOS2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs2910686-C	ERAP2, AC009126.1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs3134792-?	HLA-B	British Caucasian	318 cases and 288 controls	18364390
rs3174808-?	DONSON, SON	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs3213094-?	AC008691.1, IL12B	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs3213094-A	AC008691.1, IL12B	Chinese	5,182 cases and 6,516 controls	19169255
rs33980500-T	TRAF3IP2-AS1, TRAF3IP2	European Caucasian, European, German	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls, 472 cases and 1,146 controls & replication studies, 609 cases and 990 controls	23143594, 26626624, 20953188, 20953186
rs34172843-A	FLT3	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs34394770-T	COG6	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs34536443-G	TYK2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs34725611-A	TYK2	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs35343117-G	AKAP13	European	5,033 cases and 5,707 controls	25939698
rs354528-?	SLC16A10	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs35960711-G	SCRN1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs367569-C	RMI2	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs3730682-G	POLI	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs3747517-T	IFIH1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs3782886-A	BRAP	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs3799296-T	EXOC2	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs3802826-A	ETS1	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs4085613-A	LCE3D, LCE3E	Chinese	5,182 cases and 6,516 controls	19169255
rs4112788-?	LCE3D, LCE3E	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs41268474-?	C1orf68	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs4141001-?	ITPRID1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs417065-A	LINC01714	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs4379175-G	AC008691.1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs4406273-A	LINC02571, HLA-B	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs4561177-A	RDX	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs458017-?	MFSD4B, REV3L	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs458017-G	MFSD4B, REV3L	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs4649203-A	LINC02800, IFNLR1	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs4655683-?	C1orf141, IL23R	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs4683946-G	AC020651.2	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs4685408-G	PLCL2	European	5,033 cases and 5,707 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25939698, 26626624

rs4712528-C	CDKAL1	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs4780355-T	RMI2	Germany, Estonia, Italy, U.K., and U.S.	2,529 cases and 4,955 controls	22482804
rs4795067-G	NOS2	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany, Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls, meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	20953189, 25903422, 26626624
rs4821124-C	YDJC, UBE2L3	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs4845454-T	LCE3A, LCE3B	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs4845459-A	LCEP4, LCE3A	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs4908343-A	AHDC1, FGR	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs4921482-T	AC008691.1	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs4921483-?	AC008691.1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs4921493-T	AC008691.1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs4921493-T	AC008691.1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs495337-?	SPATA2	British Caucasian	318 cases and 288 controls	18364390
rs495337-G	SPATA2	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs5063-?	CLCN6, NPPA	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs545979-T	POLI	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs55974252-C	LINC02098, ETS1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs56364076-C	CAVIN1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs56677333-C	AF233439.1, RPL23AP96	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs57996174-C	IFNGR2, TMEM50B	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs582757-C	TNFAIP3	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs6056869-A	PAK5	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs610037-?	AP5B1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs610604-?	TNFAIP3	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs610604-G	TNFAIP3	European	1,430 cases and 1,417 controls, 5,048 cases and 5,041 controls	26626624, 19169254
rs62149416-T	LINC01185	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs643177-T	TNFAIP3	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs6444895-?	GPR160	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs645078-A	RPS6KA4	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs6480305-A	MYPN	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs6517178-?	GART	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs6590334-T	ETS1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs6677595-T	LCE3B, LCE3A	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs671-G	ALDH2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs6736203-?	GYPC	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs6809854-G	SATB1-AS1	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs694739-A	AP003774.2, CCDC88B	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs702873-G	LINC01185	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs71562294-?	TRAF3IP2-AS1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs72933970-?	C1orf141	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs7352944-T	SNAI1, TRERNA1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs744487-?	AL161640.1, AL161640.2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761

rs74817271-?	TNIP1	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs7536201-C	AL445471.2, RUNX3	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs7552167-G	LINC02800, IFNLR1	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624
rs76337351-?	KPRP	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs7637230-A	LINC02085	European, European	5,033 cases and 5,707 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25939698, 26626624
rs7665090-G	MANBA, NFKB1	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs7667-?	CAPZB	Germany, Estonia, Italy, U.K., and U.S.	2,529 cases and 4,955 controls	22482804
rs76956521-C	TNIP1	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs7709212-T	AC008691.1	Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25903422, 26626624
rs7769061-G	TRAF3IP2	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs7922314-C	AC067751.1	European	1,430 cases and 1,417 controls	26626624
rs7933433-T	ETS1, LINC02098	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs7993214-?	COG6	Northern European, U.S., U.K	223 cases and 519 controls, 577 cases and 737 controls and 576 patients and 480 controls (accordingly)	18369459
rs8016947-C	AL133163.2	European	2,622 cases and 5,667 controls	20953190
rs8016947-G	AL133163.2	European Caucasian, Caucasian and Chinese	10,588 cases and 22,806 controls, meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	23143594, 25903422
rs8128234-T	RUNX1	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs842625-G	LINC01185	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs842636-G	LINC01185	Michigan, Toronto, Newfoundland and Germany	meta-analysis 1,831 cases and 2,546 controls + replication study in 4,064 cases and 4,685 controls	20953189
rs892085-A	QTRT1	European Caucasian, Caucasian and Chinese, European	10,588 cases and 22,806 controls, meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 25903422, 26626624
rs9304742-T	ZNF816-ZNF321P	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs9305556-A	RCAN1, CLIC6	Caucasian and Chinese	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls	25903422
rs9378127-?	HLA-DMA	Spain	835 cases and 1558 controls	30552173
rs9394026-G	MUC22	Japanese	606 cases and 2,052 controls	29031612
rs9504361-A	EXOC2	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs9533962-C	LINC00330, AL356515.1	Caucasian and Chinese, European	meta-analysis 15,369 cases and 19,517 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	25903422, 26626624
rs963986-C	CAVIN1	European Caucasian	10,588 cases and 22,806 controls	23143594
rs9808753-?	IFNGR2	Han Chinese	exome-wide association study 17,614 cases and 25,216 controls	25854761
rs9988642-T	IL23R, RNU4ATAC4P	European Caucasian, European	10,588 cases and 22,806 controls, 1,430 cases and 1,417 controls	23143594, 26626624

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bracy A, Fertig, George S. 2018. Baillie PDE4-Mediated cAMP Signalling. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, , 5(1), 8
2. Chen W., Wu L., Zhu W., Chen X. (2018). The polymorphisms of growth factor genes (VEGFA & EGF) were associated with response to acitretin in psoriasis, *National Center for Biotechnology Information*, 1;15(3):181-188
3. Daly AK. (2017) Pharmacogenetics: a general review on progress to date, *National Center for Biotechnology Information*, 124(1):65-79.
4. De Simone, C., Farina, M., Maiorino, A., Fanali, C., Perino, F., Flamini, A., (...), Sgambato, A. (2015). TNF-alpha gene polymorphisms can help to predict response [47] to etanercept in psoriatic patients, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(9), 1786–1790.
5. Di Meglio P, Farrera C, Melchiotti R, Petrov N, Weng Teng KW, Wong MT, Loh CY, Villanova F, Tosi I, Chen J, Grys K, Sreeneebus H, Chapman A, Perera GK, Heck S, Gracio F, de Rinaldis E, Barker JN, Smith CH, Nestle FO, Newell EW (2014). Psoriasis, *Cold Spring Harb Perspect in Medicine*, 145(3):1021-1025.e15.
6. Forchhammer S, Ghoreschi K., 2015. Update on the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis – role of apremilast, *National Center for Biotechnology Information*, 7;5:117-124
7. Galluzzo, M., Boca, A. N., Botti, E., Potenza, C., Malara, G., Malagoli, P., (...), Costanzo, A. (2016). IL12B (p40) Gene Polymorphisms Contribute to Ustekinumab Response Prediction in Psoriasis, *Dermatology*, 232(2), 230–236.
8. Georg Schett, Victor S. Sloan, Randall M. Stevens, Peter Schafer, 2010. Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2(5), 271-278
9. Gisondi P, Fostini AC, Fossà I, Girolomoni G, Targher G. (2017). Treatment Approaches to Moderate to Severe Psoriasis, *International Journal of Molecular Sciences*, 36(1):21-28.
10. González-Lara, L., Batalla, A., Coto, E., Gómez, J., Eiris, N., Santos-Juanes, J., (...), Coto-Segura, P. (2015). The TNFRSF1B rs1061622 polymorphism (p.M196R) is associated with biological drug outcome in Psoriasis patients, *Archives of Dermatological Research*, 307(5), 405–412.
11. InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. Psoriasis: Overview. 2013 Jul 31 [Updated 2017 May 18].
12. Keating GM. (2017). Apremilast: A Review in Psoriasis and Psoriatic Arthritis, *National Center for Biotechnology Information*, 77(4):459-472.
13. Kim WB, Jerome D, Yeung J. (2017). Diagnosis and management of psoriasis, *The official journal of the College of Family Physicians of Canada*, 63(4): 278–285.

14. Martin BC, Thomas LW, Dann FJ. (2017). Apremilast for the treatment of psoriatic arthritis, *National Center for Biotechnology Information*, 15;23(2):13030
15. Masouri, S., Stefanaki, I., Ntritsos, G., Kypreou, K. P., Drakaki, E., Evangelou, E., (...), Antoniou, C. (2016). A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF- α and Anti-IL-12/23 Agents, *Molecular Diagnosis and Therapy*, 20(3), 221–225.
16. Mendrinou E, Patsatsi A, Zafiriou E, Papadopoulou D, Aggelou L, Sarri C, Mamuris Z, Kyriakou A, Sotiriadis D, Roussaki-Schulze A, Sarafidou T, Vasilopoulos Y. (2017). FCGR3A-V158F polymorphism is a disease-specific pharmacogenetic marker for the treatment of psoriasis with Fc-containing TNF α inhibitors, *National Center for Biotechnology Information*, 17(3):237-241.
17. Miles D. Houslay, David R. Adams (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem Journal*, 370 (1): 1–18.
18. Murdaca G, Spanò F, Contatore M, Guastalla A, Magnani O, Puppo F. (2014). Pharmacogenetics of etanercept: role of TNF- α gene polymorphisms in improving its efficacy, *National Center for Biotechnology Information*, 10(12):1703-10.
19. Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Muñoz-Aceituno E, Reolid A, Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Talegón M, Cabaleiro T, Daudén E, Abad-Santos F.(2018). Polymorphisms associated with adalimumab and infliximab response in moderate-to-severe plaque psoriasis, *National Center for Biotechnology Information*, 19(1):7-16.
20. Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Belmonte C, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Talegón M, Saiz-Rodríguez M, Daudén E, Abad-Santos F. (2017). Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis, *National Center for Biotechnology Information*, 18(7):631-638.
21. 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*, 78(3):798-800.
22. Prieto-Pérez, R., Solano-López, G., Cabaleiro, T., Román, M., Ochoa, D., Talegón, M., (...), Abad-Santos, F. (2015). The polymorphism rs763780 in the IL-17F gene is associated with response to biological drugs in patients with psoriasis, *Pharmacogenomics*, 16(15), 1723–1731.
23. Pragma A. Nai, Talel Badri, (2020). Psoriasis, *StatPearls*.
24. Rendon A, Schäkel K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment, *International journal of Molecular Sciences*, 20(6): 1475.
25. Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, Man HW, Muller GW, Stirling DI, Chopra R. (2016). Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity, *National Center for Biotechnology Information*, 26(9):2016-29.

26. Seldin MF, Shigeta R, Villoslada P, Selmi C, Tuomilehto J, Silva G, Belmont JW, Klareskog L and Gregersen PK. (2006). European Population Substructure: Clustering of Northern and Southern Populations. *PLoS Genetics*,
27. Sutherland, A., Power, R. J., Rahman, P., O’Rielly, D. D. (2016). Pharmacogenetics and pharmacogenomics in psoriasis treatment: current challenges and future prospects, *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 12(8), 923-935.
28. Torres T, Puig L. (2018). Apremilast: A Novel Oral Treatment for Psoriasis and Psoriatic Arthritis, *National Center for Biotechnology Information*, 19(1):23-32.
29. van den Reek, J. M. P. A., Coenen, M. J. H., van de L’Isle Arias, M., Zweegers, J., Rodijk-Olthuis, D., Schalkwijk, J., (...), de Jong, E. M. G. J. (2017). Polymorphisms in CD84, IL12B and TNFAIP3 are associated with response to biologics in patients with psoriasis, *British Journal of Dermatology*, 176(5), 1288–1296.
30. van Schaik RHN, de Man FM, Goey AKL, Mathijssen RHJ, Bins S.(2014) Clinical Application of Pharmacogenetics: Where are We Now?, *The journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 57(10):1229-1254.
31. van Vugt LJ, van den Reek JMPA, Meulewaeter E, Hakobjan M, Heddes N, Traks T, Kingo K, Galluzzo M, Talamonti M, Lambert J, Coenen MJH, de Jong EMGJ. (2019). Response to IL-17A inhibitors secukinumab and ixekizumab cannot be explained by genetic variation in the protein-coding and untranslated regions of the IL-17A gene: results from a multicentre study of four European psoriasis cohorts, *National Center for Biotechnology Information*, 34(1):112-118
32. Wittmann, M., Helliwell, P.S. (2013). Phosphodiesterase 4 Inhibition in the Treatment of Psoriasis, Psoriatic Arthritis and Other Chronic Inflammatory Diseases. *DermatolTher (Heidelb)* 3, 1–15