

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας:

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Θέμα Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Κατσιαμάνη Λευκοθέα - Άννα

Λάρισα 2021

Τίτλος Εργασίας:
Φαρμακογενετική της Ψωρίασης

Thesis Title:
Pharmacogenetics of Psoriasis

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σαραφίδου Θεολογία: Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Μούτου Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πίνακας Περιεχομένων

| | |
|--|----|
| Πίνακας Περιεχομένων | 4 |
| Περίληψη | 6 |
| Abstract | 7 |
| 1. Εισαγωγή..... | 8 |
| 1.1. Ψωρίαση..... | 8 |
| 1.1.1. Τύποι Ψωρίασης και Κλινική Εικόνα..... | 8 |
| 1.1.2. Ανοσοπαθολογικοί Παράγοντες | 9 |
| 1.1.3. Παθογένεια | 12 |
| 1.1.3.1. Γενετικοί Παράγοντες - Μελέτες και Μετα-αναλύσεις GWAS..... | 12 |
| 1.1.3.1.1. Έμφυτη Ανοσία | 16 |
| 1.1.3.1.2. Επίκτητη Ανοσία..... | 16 |
| 1.1.3.1.3. Δερματικός Φραγμός..... | 18 |
| 1.1.4. Φαρμακευτική Αγωγή | 18 |
| 1.2. Φαρμακογενετική – Φαρμακογονιδιωματική | 20 |
| 1.2.1. Γενετικοί Πολυμορφισμοί και Φαρμακογενετική | 21 |
| 1.2.2. Φαρμακογενετικές Μελέτες στην Ψωρίαση | 23 |
| 1.2.2.1. Μεθοτρεξάτη | 23 |
| 1.2.2.2. Κυκλοσπορίνη | 24 |
| 1.2.2.3. Ακιτρετίνη | 25 |
| 1.2.2.4. Αναστολείς του <i>TNF-α</i> | 25 |
| 1.2.2.5. Αναστολείς <i>IL12/IL23</i> | 27 |
| 1.2.2.6. Απρεμιλάστη | 28 |
| 1.3. Θεραπεία με Απρεμιλάστη..... | 29 |
| 1.3.1. Ο Μηχανισμός Δράσης της Απρεμιλάστης..... | 29 |
| 1.3.2. Αποτελεσματικότητα της Απρεμιλάστης | 29 |
| 1.4. Ισομορφές και Δραστικότητα της PDE4 | 31 |
| 2. Σκοπός..... | 34 |
| 3. Υλικά και Μέθοδοι..... | 35 |
| 3.1. Δείγματα αίματος..... | 35 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.2. | Απομόνωση DNA | 35 |
| 3.3. | Μέτρηση Συγκέντρωσης DNA | 35 |
| 3.4. | Επιλογή εκκινητών και έλεγχος με PCR..... | 35 |
| 3.5. | Μέθοδος High-Resolution Melt (HRM) | 38 |
| 3.5.1. | Αρχή της Μεθόδου..... | 39 |
| 3.5.2. | Σύγκριση Καμπυλών Τήξης | 42 |
| 3.5.3. | Εφαρμογές – Ανίχνευση Πολυμορφισμών | 43 |
| 3.6. | Αποτελέσματα | 47 |
| 3.6.1. | Επιλογή Εκκινητών | 47 |
| 3.6.2. | Ανάλυση HRM | 47 |
| 3.6.2.1. | Απομόνωση Γονιδιωματικού DNA..... | 47 |
| 3.6.2.2. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 14, <i>Apr</i> 16, <i>Apr</i> 24, <i>Apr</i> 30 και <i>Apr</i> 37..... | 49 |
| 3.6.2.3. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 6, <i>Apr</i> 14, <i>Apr</i> 24, <i>Apr</i> 25, <i>Apr</i> 30, <i>Apr</i> 37, <i>Cos</i> 2, <i>Cos</i> 10..... | 53 |
| 3.6.2.4. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 4, <i>Apr</i> 6, <i>Apr</i> 7, <i>Apr</i> 15, <i>Apr</i> 21, <i>Apr</i> 25, <i>Apr</i> 26, <i>Apr</i> 33, <i>Apr</i> 34, <i>Apr</i> 36, <i>Apr</i> 37, <i>Cos</i> 2, <i>Cos</i> 10..... | 56 |
| 3.6.2.5. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 1, <i>Apr</i> 2, <i>Apr</i> 9, <i>Apr</i> 16, <i>Apr</i> 18, <i>Apr</i> 19, <i>Apr</i> 20, <i>Apr</i> 21..... | 59 |
| 3.6.2.6. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 1, <i>Apr</i> 2, <i>Apr</i> 23, <i>Apr</i> 27, <i>Cos</i> 23 | 62 |
| 3.6.2.7. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 9, <i>Apr</i> 10, <i>Apr</i> 17, <i>Apr</i> 18..... | 64 |
| 3.6.2.8. | Γονοτύπηση των Δειγμάτων <i>Apr</i> 2, <i>Apr</i> 4, <i>Apr</i> 7, <i>Apr</i> 11, <i>Apr</i> 13, <i>Apr</i> 20, <i>Apr</i> 23, <i>Apr</i> 25, <i>Apr</i> 29, <i>Apr</i> 30, <i>Apr</i> 31, <i>Apr</i> 38 | 66 |
| 3.7. | Συζήτηση..... | 72 |
| | Βιβλιογραφία | 77 |

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια αυτοάνοση, πολυπαραγοντική νόσος η οποία πλήττει έναν μεγάλο αριθμό ανθρώπων παγκοσμίως και εκδηλώνεται κυρίως με δερματικές αλλοιώσεις σε όλο το σώμα. Μέχρι στιγμής οι θεραπείες που χορηγούνται για την ψωρίαση δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικές και συχνά συσχετίζονται με σοβαρές παρενέργειες. Μια καινούρια φαρμακευτική αγωγή για την ψωρίαση αποτελεί η απρεμιλάστη, ένας αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4 που φαίνεται να έχει καλή αποτελεσματικότητα και ήπιες παρενέργειες.

Η αποτελεσματικότητα και οι παρενέργειες μιας θεραπείας έχουν συσχετιστεί και με πολυμορφισμούς στο γονιδίωμα των ασθενών. Βασικός στόχος των φαρμακογενετικών μελετών είναι η εξατομικευμένη θεραπεία.

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας εξετάστηκαν 33 δείγματα DNA που απομονώθηκαν από αίμα ασθενών οι οποίοι έλαβαν απρεμιλάστη για την θεραπεία της ψωρίασης. Τα δείγματα αυτά γονοτυπήθηκαν για την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP rs2229228) στο γονίδιο *PDE4C* που κωδικοποιεί την φωσφοδιεστεράση 4. Η γονοτύπηση έγινε με την μέθοδο της High-Resolution Melt (HRM), μιας οικονομικής και ακριβούς μοριακής μεθόδου η οποία βασίζεται στην αρχή ότι ακόμη και πολυμορφισμοί της τάξης του ενός νουκλεοτιδίου είναι ικανοί να αλλάξουν την θερμοκρασία αποδιάταξης των δύο κλώνων του DNA. Κατόπιν της γονοτύπησης είναι σημαντικό να γίνει αλληλούχηση των δειγμάτων και να συσχετιστούν οι διαφορετικοί γονότυποι με την απόκριση στην θεραπεία. Με αυτό τον τρόπο θα είναι εφικτό να εκτιμηθεί η απόκριση και άλλων ασθενών στην θεραπεία με απρεμιλάστη και να προβλεφθεί ποια άτομα μπορούν να επωφεληθούν της θεραπείας.

Λέξεις Κλειδιά: Ψωρίαση, Φαρμακογενετική, Ανάλυση Καμπυλών Τήξης

Abstract

Psoriasis is an autoimmune, multifactorial disease that affects many people worldwide and is manifested mainly by skin lesions throughout the body. To date, treatments for psoriasis are not always effective and are often associated with serious side effects. Apremilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, is a new medication for psoriasis that appears to be effective and has mild side effects.

The effectiveness and side effects of a treatment have also been associated with polymorphisms in patients' genomes. The main goal of the pharmacogenetic studies is the personalized treatment.

In the present study, 33 DNA samples were isolated from the blood of patients who received apremilast for the treatment of psoriasis. These samples were genotyped for the presence of a specific mononucleotide polymorphism (SNP rs2229228) in the PDE4C gene encoding phosphodiesterase 4. Genotyping was performed by High-Resolution Melt (HRM), an economical and accurate molecular method based on the principle that SNPs can change the temperature in which the two DNA strands denature. The results of this study should be followed by sequencing of the samples and association of the different genotypes with the response to treatment. Thus, it will be possible to assess the response of other patients to apremilast treatment and to predict which individuals may benefit from the treatment.

Key Words: Psoriasis, Pharmacogenetics, High-Resolution Melt

1. Εισαγωγή

1.1. Ψωρίαση

1.1.1. Τύποι Ψωρίασης και Κλινική Εικόνα

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια δερματοπάθεια που πλήττει περίπου το 2% του παγκόσμιου πληθυσμού. Οι αιτιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση δεν είναι απολύτως κατανοητοί, ωστόσο είναι σαφές ότι πρόκειται για μια πολυπαραγοντική νόσο με γενετικό και ανοσολογικό υπόβαθρο ενώ σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση και την έκβασή της παίζουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τα υπάρχοντα στοιχεία υποδηλώνουν ότι πρόκειται για μια νόσο με ισχυρή κληρονομική συνιστώσα καθώς σε περισσότερο από το 1/3 των ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση υπάρχει οικογενειακό ιστορικό και μάλιστα έχουν βρεθεί συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι με τους οποίους έχει συσχετιστεί. Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνότητα εμφάνισης είναι μεγαλύτερη μεταξύ συγγενών πρώτου και δεύτερου βαθμού σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό¹.

Ακόμη, η σημαντικότητα του γενετικού υποβάθρου στην ψωρίαση υπογραμμίζεται από μελέτες μεταξύ δίδυμων αδερφών που δείχνουν πως ο κίνδυνος εμφάνισης ψωρίασης είναι δύο ή και τρεις φορές μεγαλύτερος ανάμεσα σε μονοζυγωτικά από ό,τι σε ετεροζυγωτικά δίδυμα αδέρφια².

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης φαίνεται να επιδεινώνεται ανάλογα με την εποχή (συγκεκριμένα εμφανίζει έξαρση τον χειμώνα), με την πρόσληψη φαρμάκων, με το ψυχολογικό στρες και με την εμφάνιση λοιμώξεων³.

Ο βασικός άξονας της παθογένειάς της είναι το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο αντιδρά στα κύτταρα του δέρματος του ασθενούς οδηγώντας έτσι στις χαρακτηριστικές ψωριασικές αλλοιώσεις. Δυστυχώς δεν επιδέχεται ολοκληρωτικής ίασης αλλά η θεραπεία αφορά τα επί μέρους συμπτώματά της. Προσβάλλει εξίσου συχνά άνδρες και γυναίκες και εμφανίζεται σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, ωστόσο φαίνεται ότι ο επιπολασμός στους Καυκάσιους είναι ελαφρώς υψηλότερος από ό,τι στους Αφροαμερικάνους (3,6% έναντι 1,9%). Ακόμη, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση και άλλων νόσων όπως ψωριασική αρθρίτιδα (η οποία προσβάλλει περίπου το 30% των ασθενών), λέμφωμα, καρδιαγγειακά νοσήματα, νόσος του Crohn και κατάθλιψη.

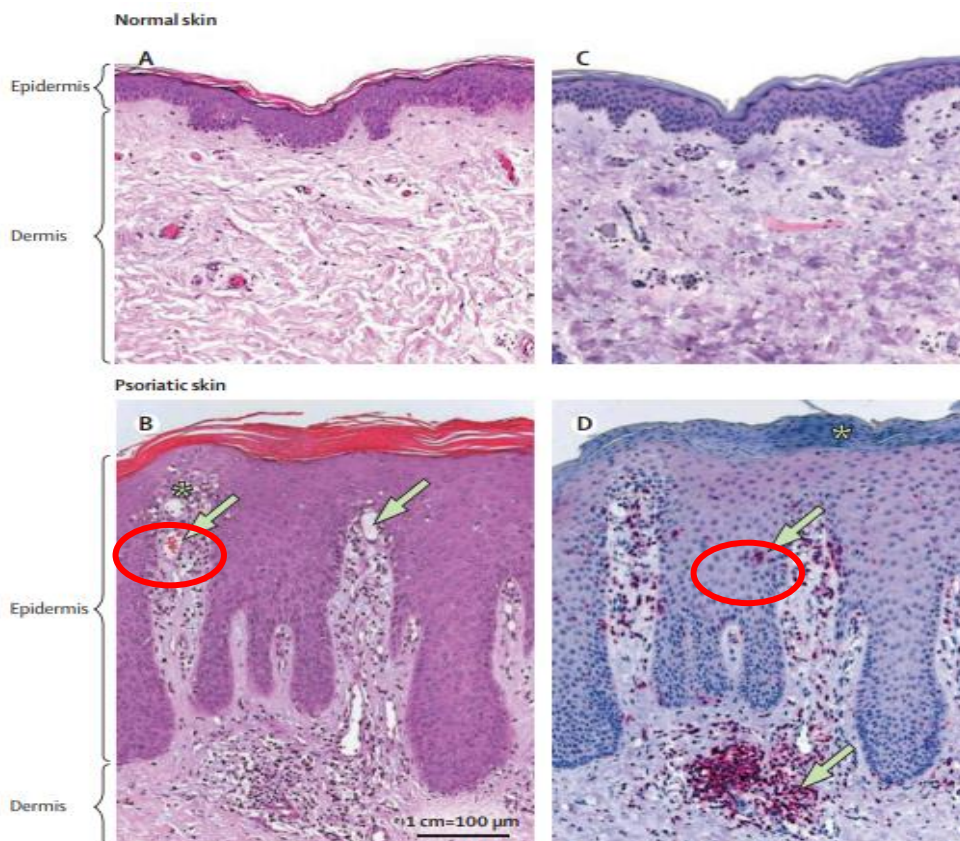
Χαρακτηριστικές είναι οι δερματικές αλλοιώσεις (Εικόνα 1) οι οποίες περιλαμβάνουν ερύθημα, ξηροδερμία, φαγούρα, πληγές και μπορεί να κυμαίνονται από ελαφρές τοπικές αλλοιώσεις μέχρι και εκτεταμένη δερματοπάθεια σε όλο το σώμα³.

Υπάρχουν πέντε τύποι ψωρίασης, η *κατά πλάκας ψωρίαση* αφορά το 90% των περιπτώσεων, συνήθως οι αλλοιώσεις εντοπίζονται στους αγκώνες, τα γόνατα, το τριχωτό της κεφαλής, το κατώτερο τμήμα της ράχης αλλά μπορεί να προσβληθεί οποιοδήποτε σημείο του σώματος⁴. Κύρια χαρακτηριστικά της είναι ο κνησμός, η απολέπιση και η αιμορραγία. Η *σταγονοειδής ψωρίαση* συνήθως εμφανίζεται μετά από στρεπτοκοκκική λοίμωξη σε νεότερους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν πολλαπλά κόκκινα στίγματα με την μορφή σταγόνας κυρίως στον κορμό, τα άνω και κάτω άκρα. Στην *φλυκταινώδη ψωρίαση* παρατηρούνται φυσαλίδες με υγρό που περιβάλλονται από κόκκινο δέρμα κυρίως σε παλάμες και πέλματα. Η *ανάστροφη ψωρίαση* παρατηρείται συχνότερα σε παχύσαρκα άτομα στις φυσιολογικές πτυχές του σώματος όπως κάτω από τους μαστούς, τη βουβωνική περιοχή και τις μασχάλες. Τέλος η *ερυθροδερμική ψωρίαση* είναι η πιο σπάνια. Το δέρμα σχεδόν σε όλο το σώμα είναι κόκκινο σαν καμένο και ξεφλουδίζει ενώ συνυπάρχει πόνος και κνησμός⁵.

1.1.2. Ανοσοπαθολογικοί Παράγοντες

Η άμεση σύνδεση της νόσου με το ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται από τον μεγάλο αριθμό ανοσοκυττάρων στο αίμα των ασθενών. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η διήθηση λευκοκυττάρων, κυρίως CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στον επιδερμικό ιστό μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να προηγείται της επιδερμικής υπερπλασίας καθυστερώντας την διάγνωση και την θεραπεία της νόσου. Ακόμη, συχνά παρατηρείται υπερέκφραση ορισμένων γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ευνοούν την προσκόλληση λευκοκυττάρων όπως εκείνα της γλυκοπρωτεΐνης ICAM1 (Intracellular Adhesion Molecule-1, *ICAM1*) και της E-σελεκτίνης (*SELE*) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του δέρματος.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, οι κυτταροκίνες που επικρατούν στις ψωριασικές πλάκες είναι εκείνες της οδού Th1 (INF- γ , ILE-2, ILE-12) για αυτό και η ψωρίαση, θεωρείται μια νόσος των λεμφοκυττάρων Th1 και όχι τόσο των Th2, τα οποία κυρίως σχετίζονται με άλλες δερματοπάθειες όπως η ατοπική δερματοπάθεια και το έκζεμα².



Εικόνα 1: Ιστοπαθολογική απεικόνιση της ψωρίασης. Εντός της ψωριασικής πλάκας παρατηρείται υπερκεράτωση και έντονη ακάνθωση.

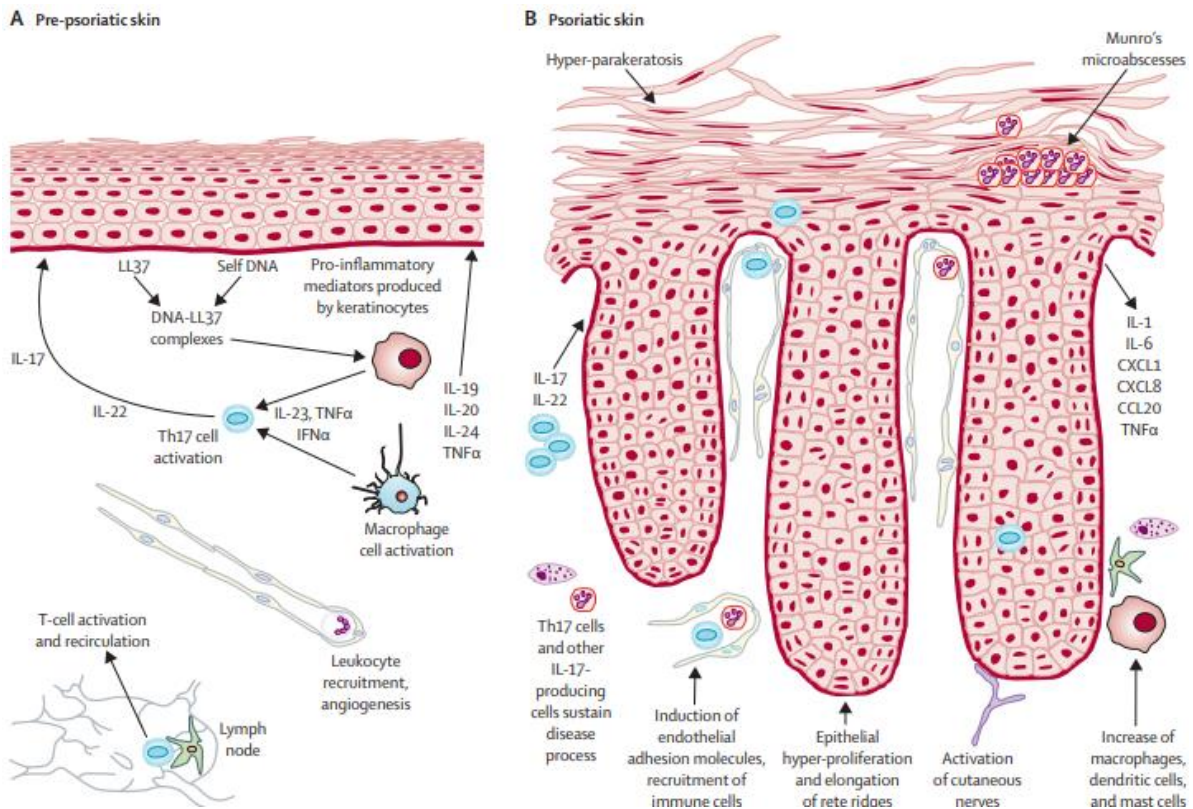
A: Φυσιολογικό δέρμα.

B: Δέρμα με ψωριασικές αλλοιώσεις. Στους κύκλους φαίνονται τα σημεία εντός της επιδερμίδας όπου συσσωρεύονται ουδετερόφιλα

C: Φυσιολογικό δέρμα

D: Δέρμα με ψωριασικές αλλοιώσεις. Στους κύκλους φαίνονται τα σημεία όπου συσσωρεύονται T λεμφοκύτταρα ⁶

Τα δενδριτικά κύτταρα, είναι μια ομάδα κυττάρων με αντιγονο-παρουσιαστική δράση, εντοπίζονται στο ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών και δρουν ως αγγελιοφόροι μεταξύ του έμφυτου και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού. Σε δείγματα δέρματος που έχουν υποστεί ψωριασικές αλλοιώσεις παρατηρείται αύξηση των δενδριτικών μυελοειδών κυττάρων και κατά συνέπεια πολλαπλασιασμός των T κυττάρων και αυξημένη έκκριση κυτταροκινών³. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι η ψωρίαση έχει άμεση σύνδεση και με ορισμένες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες που σχετίζονται με την ψωρίαση δρουν μέσω δύο βασικών οδών σηματοδότησης: της οδού JAK-STAT, που ενεργοποιείται όταν στην διαδικασία λαμβάνουν μέρος οι IF-1, IF- γ , IL-12, IL-22, IL-23 και της οδού ενεργοποίησης του NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) στην περίπτωση που η εμφάνιση της νόσου σχετίζεται με την δράση του TNF- α ³.



Εικόνα 2: Ανοσοπαθγένεια της ψωρίασης. Τα δερματικά κύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με την συμμετοχή μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων, T λεμφοκυττάρων και κυτταροκινών οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις αλλοιώσεις στο ψωριασικό δέρμα. **A:** Η IL-23 διεγείρει την διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων Th1 και Th17 (T helper) στα προφλεγμονώδη κύτταρα.

B: Τα T λεμφοκύτταρα και τα φαγοκύτταρα φυσικής ανοσίας (μακροφάγα, μαστοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα) παράγουν ορισμένους μεσολαβητές οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την επαγωγή και την διατήρηση των χαρακτηριστικών ψωριασικών αλλοιώσεων. Οι μεσολαβητές αυτοί ευνοούν την ανεξέλεγκτη αύξηση του αριθμού ενδοθηλιακών κυττάρων και κερατοκυττάρων, τα οποία είναι τελικώς και εκείνα που δημιουργούν τις προαναφερθείσες αλλοιώσεις⁶

Η ανάλυση του μεταγραφώματος κυττάρων που έχουν υποστεί ψωριασικές αλλοιώσεις παρείχε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την διακυτταρική επικοινωνία και την σηματοδότηση των νοσούντων ιστών. Η έκφραση ορισμένων γονιδίων και συγκεκριμένα εκείνων που κωδικοποιούν τις ιντερφερόνες τύπου 1 (*IFN-α*, *IFN-β*), την ιντερφερόνη-γ (*IFN-γ*) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (*TNF-α*) απορρυθμίζεται σε ψωριασικά κύτταρα ασθενών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι κυτταροκίνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου. Όλα τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία και μάλιστα επιβεβαιώνουν τα ευρήματα

των μελετών γενετικής συσχέτισης ότι πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν μεσολαβητές του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν θεμελιώδη ρόλο τόσο στην ευαισθησία του οργανισμού για την νόσο, στην εκδήλωση και την εγκατάσταση (βλ. ενότητα 1.1.3)⁷. Όλα τα παραπάνω υποστηρίζονται και από ιστολογικά ευρήματα σε κύτταρα δέρματος με ψωριασικές αλλοιώσεις, όπως η ύπαρξη Τ λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, η ύπαρξη κλωνικών Τ κυττάρων όσο προχωρά η νόσος, η αποτελεσματικότητα θεραπευτικών αγωγών που στοχεύουν στο ανοσοποιητικό σύστημα ⁷.

1.1.3. Παθογένεια

1.1.3.1. Γενετικοί Παράγοντες - Μελέτες και Μετα-αναλύσεις GWAS

Πολλά γονίδια σχετίζονται με την ψωρίαση, ωστόσο δεν είναι πάντα ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν το νόσημα ή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Με την βοήθεια της ανάλυσης σύνδεσης γονιδιώματος εντοπίστηκαν 15 γενετικοί τόποι και ονομάστηκαν περιοχές ευαισθησίας σε ψωρίαση 1-15 (*PSORS1-PSORS15*)⁸.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της ψωρίασης μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο, για παράδειγμα η σταγονοειδής ψωρίαση που τις περισσότερες φορές εκδηλώνεται σε εφήβους, έχει συσχετισθεί με τον *PSORS1* ενώ οι περιπτώσεις φλυκταινώδους και κατά πλάκας ψωρίασης δεν έχουν συσχετισθεί με τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο. Μια τέτοια γενετική ετερογένεια είναι σαφώς αναμενόμενη αν λάβουμε υπόψιν μας τους διαφορετικούς ιστούς και τους διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται σε κάθε μια από τις διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις της ψωρίασης⁹.

Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης όπως οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS) και μετα-αναλύσεις συσχέτισης γονιδιώματος (Genome-Wide Association Meta-Analysis, GWAMA) επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των παλαιότερων μελετών σύνδεσης και μάλιστα παρείχαν μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της γενετικής βάσης της ψωρίασης. Με την βοήθειά τους μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερα από 80 γονίδια που συσχετίζονται με την συγκεκριμένη ασθένεια όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Ένα βασικό προτέρημα των GWAS έναντι των μελετών σύνδεσης είναι ότι οι πρώτες μπορούν να εξετάσουν εκατομμύρια πολυμορφισμούς ταυτόχρονα ενώ οι μελέτες σύνδεσης καταλήγουν σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές που περιέχουν πολλά υποψήφια γονίδια¹⁰.

Ιδιαίτερως χρήσιμες έχουν φανεί και οι GWAMA οι οποίες επιτρέπουν την συγκεντρωτική ανάλυση δεδομένων από διαφορετικές μελέτες GWAS, οδηγώντας έτσι σε αποτελέσματα με

μεγάλη στατιστική σημαντικότητα και πολύ ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις.

Από το 2007 οπότε και πραγματοποιήθηκε η πρώτη GWAS για την ψωρίαση σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς μέχρι και σήμερα οι πληροφορίες που έχουν αντληθεί είναι πολλές και σημαντικές. Η αρχική αυτή μελέτη αφορούσε 1446 ασθενείς και 1432 άτομα ελέγχου, περιλάμβανε γονοτύπηση 25.215 πολυμορφισμών και επιβεβαίωσε ευρήματα μελετών σύνδεσης γονιδιώματος, όπως τα γονίδια *IL12-B* (Interleukin-12 subunit Beta) και *IL-23* (Interleukin-23) ως γονίδια προδιάθεσης για την ψωρίαση¹⁰.

Μεταγενέστερες μελέτες κατέδειξαν επιπλέον γονίδια ευαισθησίας, όπως τα *IL28RA* (Interleukin 28 receptor, alpha subunit), *RELB* (Transcription factor RelB), *TYK2* (Tyrosine Kinase 2), *ERAP1* (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1), *TRAF3IP2* (TRAF3 Interacting Protein 2), *NOS2* (Nitric Oxide Synthase 2) και *FBXL19* (F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 19). Μια μετα-ανάλυση που ανέλυσε συνδυαστικά τα αποτελέσματα από 8 διαφορετικές μελέτες σε Καυκάσιους προσδιόρισε ακόμη 16 γενετικούς τόπους και 6 επιπλέον συσχετιζόμενα γονίδια, τα *FASLG* (Fas Ligand), *IKBKE* (Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon), *BRAP* (BRCA1 Associated Protein), *MAPKAPK5* (MAP kinase-activated protein kinase 5), *TRIM47* (E3 ubiquitin-protein ligase) και *TRIM65* (Tripartite motif-containing protein 65)¹⁰.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 ένας ιδιαίτερα σημαντικός γενετικός τόπος για την εκδήλωση της ψωρίασης βρέθηκε στο Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC)¹¹. Οι μέχρι στιγμής μελέτες GWAS έχουν πραγματοποιηθεί σε Ευρωπαίους και Ασιάτες και ένα από τα βασικά σημεία σύγκλισης είναι η σημαντικότητα του MHC στην εμφάνιση και εγκατάσταση της ψωρίασης, ένα γεγονός που φαίνεται να μην επηρεάζεται από την πληθυσμιακή ομάδα. Ο γενετικός τόπος που συσχετίζεται συχνότερα με την εμφάνιση ψωρίασης είναι το αλληλόμορφο *HLA-C*06:02* το οποίο φαίνεται να συσχετίζεται όχι μόνο με την σοβαρότητα της νόσου αλλά και με πρώιμη έναρξή της. Ορισμένα αλληλόμορφα όπως τα *HLA-C*12:03*, *HLA-C*07:02*, *HLA-C*07:04*, *HLA-B*27*, *HLA-B*57*, *HLA-DPB1*05:01* εντοπίστηκαν σε ασθενείς και των δύο πληθυσμών (Ευρωπαίους και Ασιάτες) ενώ κάποια άλλα (το *HLA-B*07* και το *HLA-A*02:07*) σχεδόν απουσίαζαν στους Ασιάτες και τους Ευρωπαίους αντίστοιχα. Τέλος συσχέτιση φάνηκε και μεταξύ του αλληλόμορφου *HLA-B*27* και της μορφής εκδήλωσης της νόσου καθώς αυτό το ήταν πολύ συχνότερο σε άτομα που έπασχαν από ψωριασική αρθρίτιδα σε σχέση με εκείνα που εμφάνισαν μόνον δερματικές αλλοιώσεις¹⁰.

Παρόλο που οι μελέτες GWAS αποτελούν μια καινοτόμα προσέγγιση της γονιδιωματικής

μελέτης δεν μπορούν να καλύψουν ολοκληρωτικά την μελέτη πολυπαραγοντικών γενετικών ασθενειών όπως οι αυτοάνοσες νόσοι λόγω της αδυναμίας τους να ανιχνεύουν σπάνιες αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος, γονιδίου-γονιδίου και πολυμορφισμού-πολυμορφισμού, που αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι αυτών των νόσων. Στους τομείς αυτούς ιδιαίτερα χρήσιμες έχουν φανεί οι τεχνικές της αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) και η αλληλούχηση του εξωνιώματος (Whole Exome Sequencing) που μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμη και σπάνιους πολυμορφισμούς που εμφανίζονται ακόμη και σε <1% του πληθυσμού¹².

Τέλος, σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των ψωριασικών αλλοιώσεων παίζουν και επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση του DNA. Συγκεκριμένα βρέθηκαν μεθυλιωμένοι υποκινητές σε εννέα διαφορετικά γονίδια που απομονώθηκαν από ψωριασικό δερματικό ιστό οι οποίοι δεν εντοπίστηκαν στα αντίστοιχα γονίδια των υγιών ατόμων. Περαιτέρω ανάλυση των ιστών αυτών έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορετικοί πολυμορφισμοί μεταξύ νοσούντων και υγιών ατόμων, ωστόσο η έκφραση των γονιδίων *CYP2S1* (Cytochrome P450 2S10), *ECE1* (Endothelin Converting Enzyme 1), *EIF2C2* (Protein Argonaute-2), *MAN1C1* (Mannosidase Alpha Class 1C) και *DLGAP4* (DLGAP4) ήταν σημαντικά διαφοροποιημένη σε άτομα που έπασχαν από ψωρίαση¹³.

Τα περισσότερα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την ευαισθησία στην ψωρίαση κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μηχανισμό εκδήλωσης της νόσου μέσω τριών μονοπατιών: της έμφυτης ανοσίας, της επίκτητης ανοσίας και του επιδερμικού φραγμού. Τα γονίδια αυτά εντοπίστηκαν με την βοήθεια τόσο μελετών και μετα-αναλύσεων GWAS όσο και λειτουργικών πειραμάτων, ορισμένες φορές και με συνδυασμό των δύο όπως αναλύεται παρακάτω.

Πίνακας 1: Οι μελέτες συσχέτισης που έχουν πραγματοποιηθεί για την ψωρίαση και τα αποτελέσματά τους συνοπτικά¹⁰.

| Έτος Δημοσίευσης | Χαρακτηριστικό | Εθνικότητα | Αριθμός Εξεταζόμενων | Ευρήματα – Γονίδια |
|-------------------------|--|-----------------------|-----------------------------|--|
| 2007 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ευρωπαίοι | 2.878 | <i>IL12B, IL23</i> |
| 2009 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Κινέζοι | 15.32 | <i>LCE3A ,LCE3D</i> |
| 2010 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Κινέζοι και Ευρωπαίοι | 29.700 | <i>HLA-C, HLA-B, HLA-DPB1</i> και <i>BTNL2</i> |
| 2010 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ευρωπαίοι | 8.289 | <i>L23R, REL, IL12B, TNFAIP3,</i> και <i>ERAP1</i> |
| 2010 | Ψωριασική Αρθρίτιδα | Ευρωπαίοι | 7.087 | <i>TRAF3IP2</i> |
| 2012 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ευρωπαίοι | 33.394 | Αλληλόμορφο <i>HLA-C*06:02</i> |
| 2015 | Ψωριασική Αρθρίτιδα Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ευρωπαίοι | 29.134 | <i>HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1</i> και <i>HLA-DRB1</i> |
| 2017 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ευρωπαίοι | 39.498 | <i>HLA-DPB1, HLA-A, HLA-B</i> και <i>HLA-DRB1</i> |
| 2018 | Κατά Πλάκας Ψωρίαση | Ιάπωνες | 2.658 | Αλληλόμορφο <i>HLA-A*02:07</i> |

1.1.3.1.1. Έμφυτη Ανοσία

Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία της έμφυτης ανοσίας ως απόκριση στο φυσιολογικό ή/και το οξειδωτικό στρες και σχετίζεται με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ, μιας συντηρημένης οδού μεταγωγής σήματος ζωτικής σημασίας για την εγκατάσταση της ψωρίασης.

Μελέτες GWAS έχουν εντοπίσει συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα γονίδια *TNFAIP3* και *TNIP1* τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μονοπάτι NF-κΒ αλληλεπιδρώντας με διάφορους υποδοχείς όπως οι TRAF2, TRAF6, TNF-α, EGF και Toll-like¹². Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα των μελετών GWAS ήταν η συσχέτιση πολυμορφισμών στο γονίδιο *FBXL19* με την κατά πλάκας ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αναστέλλοντας την ενεργότητα του υποδοχέα IL-33 οδηγεί σε μειωμένη σηματοδότηση μέσω του NF-κΒ¹².

Πολυμορφισμοί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CARD14/CARMA2 βρέθηκαν αρχικά με την βοήθεια μετα-αναλύσεων GWAS και στην συνέχεια εξετάστηκε η λειτουργικότητά τους μέσω πειραμάτων. Οι πολυμορφισμοί που οδήγησαν σε μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων DNA οδήγησαν σε αύξηση των φλεγμονώδων αποκρίσεων στα κερατινοκύτταρα που προκύπτουν επίσης από το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ¹².

Ακόμη, μελέτες συσχέτισης εξωνιώματος (Exome Wide Association) έδειξαν ότι πολυμορφισμοί σε εξόνια του *AIM2* είναι ικανοί να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση και κατ' επέκταση περαιτέρω εγκατάσταση των ψωριασικών βλαβών¹⁴.

Τέλος, μέσω λειτουργικών πειραμάτων εντοπίστηκαν γονίδια των οποίων η υπερέκφραση οδηγεί σε ενεργοποίηση του NF-κΒ. Τα γονίδια αυτά είναι το *UBE2L3* που κωδικοποιεί το ένζυμο E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) το οποίο με την σειρά του αποικοδομεί έναν αναστολέα του NF-κΒ και το *REL* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη c-Rel, έναν μεταγραφικό παράγοντα που ενεργοποιεί τον NF-κΒ¹².

1.1.3.1.2. Επίκτητη Ανοσία

Άμεσα εμπλεκόμενη στην εγκατάσταση της ψωρίασης είναι η ελαττωματική ρύθμιση των Τ λεμφοκυττάρων και ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κερατινοκυττάρων.

Πολυμορφισμοί σε γονίδια που επηρεάζουν την ικανότητα αντιγονο-παρουσίασης των Τ λεμφοκυττάρων επιδρούν στην φυσιολογική λειτουργία της επίκτητης ανοσίας. Μια μελέτη GWAS έδειξε ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *ERAP1*, που κωδικοποιεί την

ενδοπλασματική αμινοπεπτιδάση 1 και εμπλέκεται στην ικανότητα αντιγονο-παρουσίασης των μορίων τάξης I του MHC ήταν συχνότεροι σε ασθενείς που έφεραν το αλληλόμορφο *HLA-C*06:02*.

Με την βοήθεια μετα-αναλύσεων GWAS φάνηκε ότι ένα από τα γονίδια ευαισθησίας για την ψωρίαση ήταν και το *RUNX3* (Runt-Related Transcription Factor 3) το οποίο κωδικοποιεί τον αντίστοιχο μεταγραφικό παράγοντα και με την βοήθεια λειτουργικών πειραμάτων φάνηκε ότι μέσω της έκφρασής του ρυθμίζει την διαφοροποίηση των CD8+ T κυττάρων¹².

Εν μέρει η παθογένεια της ψωρίασης μπορεί να εξηγηθεί και από την οδό IL23/Th17, συγκεκριμένα η IL-23 προκαλεί διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων Th17 τα οποία εκκρίνουν μια ποικιλία κυτταροκινών όπως τις IL-17, IL-21 και IL-22. Αυτές οι κυτταροκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές αυτοάνοσες φλεγμονώδεις νόσους, μεταξύ αυτών και στην ψωρίαση¹⁵.

Με την βοήθεια μελετών GWAS εντοπίστηκε συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων πολυμορφισμών στο *TRAF3IP2* και ψωρίασης. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μονοπάτι NF-κB (βλ παραπάνω) και στην οδό IL-17¹².

Πέραν των μελετών GWAS πραγματοποιήθηκαν και λειτουργικά πειράματα τα οποία έδειξαν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Συγκεκριμένα, τα αντίγραφα mRNA της υπομονάδας p19 της IL-23 ήταν αυξημένα σε άτομα που νοσούσαν από ψωρίαση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και για υπομονάδα p40 που είναι κοινή στις IL-12 και IL-23¹².

Ακόμη πειράματα που ελέγξαν την έκφραση του *STAT3* σε ασθενείς και μη, βρήκαν ότι το εν λόγω γονίδιο υπερεκφραζόταν στους πρώτους. Το *STAT3* κωδικοποιεί τον αντίστοιχο υποδοχέα που έχει ρυθμιστικό ρόλο στην διαφοροποίηση των Th17 και την παραγωγή των αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών IL-6 και IL-10.

Τέλος, πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για το *SOCS1*. Το *SOCS1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την παραγωγή IFN αλληλεπιδρώντας με την κινάση τυροσίνης 2 (Tyrosine Kinase 2, TYK2) και ρυθμίζει την διαφοροποίηση των κυττάρων Th17. Στους ιστούς των νοσούντων το γονίδιο αυτό είχε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης¹².

1.1.3.1.3. Δερματικός Φραγμός

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης είναι η υπερκεράτωση της επιδερμίδας. Τα γονίδια της οικογένειας *DEFB* και συγκεκριμένα τα *DEFB4*, *DEFB103* και *DEFB104*, που κωδικοποιούν τις β-Defensines hBD-2, hBD-3 και hBD-4 αντίστοιχα, εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη έκφραση σε ασθενείς σε σχέση με τα άτομα ελέγχου¹².

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες LCE (Late Cornified Envelope) και βρίσκονται εντός του *PSORS4* είναι μια ακόμη οικογένεια που σχετίζεται με τον δερματικό ιστό, με διαφορετικό ωστόσο τρόπο, επηρεάζοντας την κυτταρική διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων. Κατόπιν μελέτης συσχέτισης και αλληλούχησης εξωνιώματος που πραγματοποιήθηκε σε ψωριασικούς ιστούς θεωρήθηκε πιθανό ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *LCE3* που οδηγούν σε μειωμένο αριθμό αντιγράφων διέκοψαν την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων κατά την δημιουργία ψωριασικών πλακών¹².

Ακόμη, με την ψωρίαση έχουν συσχετιστεί και πολυμορφισμοί στο γονίδιο *GJB2* το οποίο κωδικοποιεί την διακυτταρική πρωτεΐνη αγκίστρωσης (Gap Junction beta-2/Connexins 26). Η δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έγκειται στην διατήρηση της σταθερότητας των κερατινοκυττάρων και μελέτες GWAS έδειξαν ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο που την κωδικοποιεί συσχετίστηκαν με αυξημένη ευαισθησία Ασιατών στην νόσο¹⁶.

Παρόλο που η νόσος εμφανίζει κληρονομησιμότητα της τάξης του 60-90%, οι γενετικοί παράγοντες που έχουν βρεθεί ως τώρα από μόνιους τους δικαιολογούν ένα μόνο μέρος της γενετικής βάσης του νοσήματος, ένα φαινόμενο γνωστό και ως «ελλιπής κληρονομησιμότητα». Μία πιθανή εξήγηση είναι οι αλληλεπιδράσεις πολυμορφισμού-πολυμορφισμού, γονιδίου-γονιδίου και γονιδίου-περιβάλλοντος οι οποίες μπορούν να μεταβάλλουν τον φαινότυπο παρουσία κάποιου παράγοντα κινδύνου¹².

1.1.4. Φαρμακευτική Αγωγή

Ανάλογα με την κλινική εικόνα της ψωρίασης, υπάρχουν διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες στοχεύουν στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης¹⁷. Για τις πιο ελαφριές μορφές της νόσου, χορηγούνται τοπικές θεραπείες όπως:

- **Κορτικοστεροειδή:** Είναι η συχνότερη φαρμακευτική αγωγή για άτομα που πάσχουν από ελαφριάς και μέτριας σοβαρότητας ψωρίαση. Διατίθενται σε μορφή κρέμας,

αλοιφής, τζελ κ.α. και είναι κατάλληλα για εφαρμογή σε ευαίσθητες περιοχές όπως το πρόσωπο και οι εσωτερικές πτυχώσεις του σώματος.

- Ανάλογα Βιταμίνης D: Συνθετικές μορφές βιταμίνης D όπως η καλσιτριόλη και το καλσιποτριένιο που επιβραδύνουν την ανάπτυξη ψωριασικών πλακών και μπορούν να χορηγηθούν μόνα τους ή μαζί με κορτικοστεροειδή.
- Ρετινοειδή: Διατίθενται σε κρέμα ή τζελ και είναι καταλληλότερα για περιοχές που δεν εκτίθενται στον ήλιο (πλάτη, μαστοί κ.τ.λ.) λόγω πιθανής φωτο-ευαισθησίας που μπορεί να προκαλέσουν.
- Πίσσα: Χορηγείται με ή χωρίς συνταγή γιατρού και είναι ενδεδειγμένη για περιπτώσεις έντονης απολέπισης και κνησμού.
- Θεραπεία Goeckerman: Πρόκειται για τον συνδυασμό πίσσας και ακτινοβολίας. Η πίσσα καθιστά το δέρμα πιο ευαίσθητο στην ακτινοβολία UVB, οι δύο αυτές μέθοδοι είναι πιο αποτελεσματικές όταν χορηγούνται μαζί¹⁸.

Η ακτινοθεραπεία αποτελεί την κύρια θεραπευτική προσέγγιση για τις μέτριες έως σοβαρές μορφές της νόσου και εφαρμόζεται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τοπικές θεραπείες. Οι πιο συχνά εφαρμόσιμες μορφές φωτοθεραπείας είναι:

- Έκθεση στον ήλιο: Η σύντομη και τακτική έκθεση στον ήλιο μπορεί να βελτιώσει την κλινική εικόνα του ψωριασικού δέρματος.
- UVB: Η ακτινοβολία UVB μπορεί να βοηθήσει σε περιπτώσεις που οι τοπικές θεραπείες δεν αποδίδουν, υπάρχει όμως πιθανότητα να προκαλέσει εγκαύματα και παροδική ευαισθησία στους νοσούντες.
- UVA και ψωραλένιο: Η ακτινοβολία UVA έχει την ικανότητα να εισχωρεί σε βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας και σε συνδυασμό με το ψωραλένιο (ένα φάρμακο που αυξάνει την ευαισθησία του δέρματος στην UVA) έχει φανεί αποτελεσματική σε περιπτώσεις σοβαρής κατά πλάκας ψωρίασης. Ωστόσο αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του δέρματος και μελανώματος¹⁹.

Για τις σοβαρότερες και πιο επίμονες μορφές της νόσου χορηγούνται ενέσιμα ή από του στόματος φάρμακα ορισμένα από τα οποία πολλές φορές εναλλάσσονται με τοπικές θεραπείες ή/και θεραπευτική ακτινοβολία λόγω των ανεπιθύμητων παρενεργειών που παρουσιάζουν. Τα αποτελεσματικότερα μικρομοριακά φάρμακα περιλαμβάνουν:

- Στεροειδή: Το ακετονίδιο τριαμσινολόνης είναι ένα ενέσιμο κορτικοστεροειδές που χορηγείται συνήθως σε περιπτώσεις σοβαρής δερματικής βλάβης που προκαλεί πληγές και πόνο στους ασθενείς.
- Ρετινοειδή: Χορηγούνται από του στόματος και ομαλοποιούν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων.
- Κυκλοσπορίνη: Πρόκειται για έναν καταστολέα των T κυττάρων οποίος χορηγείται από το στόμα. Λόγω της δράσης της καλό είναι να χορηγείται για περιορισμένο χρονικό διάστημα και ο ασθενής να παρακολουθείται στενά κατά την διάρκεια της θεραπείας
- Μεθοτρεξάτη: Χορηγείται συνήθως μια φορά την εβδομάδα ως ανοσοκατασταλτικό για την μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης. Είναι λιγότερο αποτελεσματική από τους βιολογικούς παράγοντες αλλά με πιο ήπιες παρενέργειες.
- Βιολογικοί Παράγοντες: Είναι ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι συγκεκριμένων στόχων που προκαλούν φλεγμονή (όπως ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες) και δρουν εξουδετερωτικά αναστέλλοντας την δράση τους, μειώνοντας έτσι την φλεγμονή και την ενεργότητα της νόσου. Αυτή η κατηγορία φαρμάκων χορηγείται συνήθως με ένεση και στοχεύει στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι βιολογικοί παράγοντες που χορηγούνται συνήθως περιλαμβάνουν την ετανερσέπτη, την ινφλιξιμάβη, την αδαλιμουμάμπη, την ουστεκινουμάμπη σεκουκινουμάμπη και την ιξεκιζουμάμπη και λόγω των επιβλαβών επιπτώσεων τους χορηγούνται μόνον όταν οι θεραπείες πρώτης γραμμής αποτυγχάνουν. Ο ασθενής πρέπει να είναι υπό τακτική ιατρική παρακολούθηση για όσο διαρκεί η θεραπεία.
- Απρεμιλάστη: Είναι ένας αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης 4, μειώνει την έκφραση προφλεγμονώδων κυτταροκινών και έχει ευρεία αντιφλεγμονώδη δράση σε κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειές της είναι περιορισμένες και όχι ιδιαίτερα σοβαρές²⁰.

1.2. Φαρμακογενετική – Φαρμακογονιδιωματική

Ο όρος *φαρμακογενετική* πρωτοεμφανίστηκε το 1959 από τον Γερμανό γενετιστή Friedrich Vogel, ο οποίος πρώτος διαπίστωσε ότι μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων η φαρμακοκινητική των αντιυπερτικών ήταν παρόμοια ενώ όταν εξετάστηκαν διζυγωτικά δίδυμα, εντοπίστηκαν

σημαντικές διαφορές. Η απόκριση ενός ατόμου στην φαρμακευτική αγωγή είναι μια πολυ-παραγοντική κατάσταση και η φαρμακογενετική αποσκοπεί στην μελέτη των γενετικών παραλλαγών που επηρεάζουν τον μεταβολισμό, την απόκριση ή ακόμη και την τοξικότητα που εμφανίζουν διαφορετικοί ασθενείς στο ίδιο φάρμακο. Βασικός στόχος της φαρμακογενετικής είναι η εξατομικευμένη θεραπεία, η αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και η ταχύτερη ανακούφιση των ασθενών²¹.

Με την βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης, η γενετική βάση της διαφορετικής απόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή έγινε πιο σαφής ενώ με την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος, εισήχθη για πρώτη φορά ο όρος *φαρμακογονιδιωματική* ο οποίος είναι ευρύτερος και εξετάζει τον τρόπο που πολυμορφισμοί σε ολόκληρο το γονιδίωμα επηρεάζουν την απόκριση των ασθενών σε ένα φάρμακο ²².

Μέχρι και σήμερα οι φαρμακογενετικές μελέτες που αφορούν την ψωρίαση αποτελούνται είτε από αναλύσεις GWAS και μετα-αναλύσεις που στοχεύουν στην ανεύρεση γενετικών πολυμορφισμών στο γονιδίωμα των ασθενών που έχουν καλή και κακή απόκριση στο εκάστοτε φάρμακο είτε από μελέτες συσχέτισης συγκεκριμένων πολυμορφισμών με την απόκριση στην θεραπεία.

Η εφαρμογή της φαρμακογενετικής στην κλινική πράξη, θα καταστήσει δυνατή την χορήγηση των κατάλληλων φαρμάκων στην σωστή δοσολογία ώστε να μεγιστοποιείται η αποτελεσματικότητά τους και να ελαχιστοποιείται η τοξικότητα²³.

Μια τέτοια εξέλιξη πέραν των σαφών πλεονεκτημάτων που θα έχει για τους επαγγελματίες υγείας κάνοντας την συνταγογράφηση ταχύτερη και πιο αποτελεσματική θα έχει σημαντικό αντίκτυπο και στην καθημερινότητα των ασθενών βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής τους, ελαττώνοντας το κόστος, τον χρόνο θεραπείας καθώς και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων²⁴.

1.2.1. Γενετικοί Πολυμορφισμοί και Φαρμακογενετική

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) είναι μικρές παραλλαγές στην αλληλουχία του DNA, που οδηγούν σε μεταβολές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και εντοπίζονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Τα SNPs μπορεί να βρίσκονται τόσο εντός των γονιδίων, σε κωδικές και μη-κωδικές περιοχές όσο και εκτός. Τα SNPs που βρίσκονται στις κωδικές περιοχές μπορεί να αλλάζουν (μη συνώνυμα SNPs) ή να μην αλλάζουν (συνώνυμα SNPs) το τελικό προϊόν, ωστόσο τα περισσότερα

SNPs εντοπίζονται σε μη-κωδικές περιοχές. Τα SNPs αυτά μπορεί να επηρεάσουν το μάτισμα, την έκφραση γονιδίων εάν εντοπίζονται σε ρυθμιστικά στοιχεία, ή την αλληλουχία των μη-κωδικών RNA²³.

Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί περίπου 15 εκατομμύρια SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα οποία εμφανίζονται τουλάχιστον στο 1% του πληθυσμού. Τα καλύτερα μελετημένα SNPs στην φαρμακογενετική είναι εκείνα που μεταβάλλουν την ενζυμική δραστηριότητα επηρεάζοντας στον μεταβολισμό του εκάστοτε φαρμάκου και αλλάζοντας έτσι την συγκέντρωση της δραστικής του ουσίας ή των μεταβολιτών του²⁵. Ορισμένα SNPs είναι δυνατόν να προκαλέσουν κάποια απροσδόκητη ή και τοξική δράση του φαρμάκου (π.χ. το rs5030868 στο γονίδιο *G6PD* που αλλάζει το αμινοξύ σερίνη σε φαινυλαλανίνη και έχει σχετιστεί με αιμολυτική αναιμία σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ασπιρίνη²⁶) ενώ κάποια άλλα SNPs έχουν συσχετιστεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως ηπατοτοξικότητα²⁷. Άλλοι πολυμορφισμοί προκαλούν αλλαγές στους στόχους των φαρμάκων, οι οποίοι μπορεί να είναι υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια, συγκεκριμένα ένζυμα, ιοντικοί διάυλοι κ.α. οδηγώντας έτσι σε μειωμένη απόκριση στο φάρμακο ανεξαρτήτως δόσης²⁸.

Η μελέτη της φαρμακογενετικής κινείται γύρω από δύο άξονες: Αυτόν της φαρμακοκινητικής και αυτόν της φαρμακοδυναμικής. Η φαρμακοκινητική μελετά τον φυσιολογικό τρόπο που μεταβολίζεται και απεκκρίνεται το υπό μελέτη φάρμακο ή (στην περίπτωση προ-φαρμάκων) δημιουργείται ενεργός μεταβολίτης. Τα περισσότερα ένζυμα που έχουν μελετηθεί και εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 και πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα αυτά μπορούν να προκαλέσουν αυξημένο ή μειωμένο μεταβολισμό των φαρμάκων²⁵. Οι ασθενείς που φέρουν τέτοιους πολυμορφισμούς μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την ικανότητά τους να μεταβολίσουν το εκάστοτε φάρμακο: στους *υπερ-μεταβολιστές* που χρειάζονται μεγαλύτερη δόση φαρμάκου ή χορήγηση αναστολέων μεταβολισμού, στους εκτεταμένους *μεταβολιστές* που έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν πλήρως το φάρμακο όμως αυτό παραμένει στην κυκλοφορία για ελαφρώς λιγότερο χρόνο από ότι χρειάζεται για την πλήρη δράση του, τους *ενδιάμεσους μεταβολιστές* οι οποίοι συνήθως απαιτούν ελαφρώς μικρότερη δόση από την συνηθισμένη χρειάζονται όμως τακτική παρακολούθηση για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και τέλος τους *φτωχούς μεταβολιστές*, οι οποίοι κινδυνεύουν να εκδηλώσουν παρενέργειες λόγω μειωμένης αποβολής του φαρμάκου από τον οργανισμό και έλλειψη θεραπευτικής δράσης²⁵.

Ο δεύτερος άξονας μελέτης, εκείνος της φαρμακοδυναμικής, επικεντρώνεται στον μηχανισμό δράσης της φαρμακευτικής ουσίας και την αλληλεπίδρασή της με συγκεκριμένους υποδοχείς. Είναι επομένως αναμενόμενο ότι πολυμορφισμοί που επηρεάζουν τον αριθμό και την δομή των ενεργών υποδοχέων είναι σε θέση να μεταβάλλουν την απόκριση ενός ατόμου στο φάρμακο²⁹.

Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις ενώ μια φαρμακευτική αγωγή αρχικά έχει θεραπευτική δράση, η αποτελεσματικότητά της μειώνεται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μείωση της ευαισθησίας στην θεραπεία (ταχυφυλαξία) λόγω ανάπτυξης αντισωμάτων (στην περίπτωση των βιολογικών παραγόντων), αλλαγής του τρόπου που η ασθένεια επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα ή σε παρουσία άγνωστων παραγόντων με αντιγόνο δράση καθώς η ασθένεια εξελίσσεται²⁹.

1.2.2. Φαρμακογενετικές Μελέτες στην Ψωρίαση

Η βασική φαρμακογενετική προσέγγιση στην ψωρίαση αφορά την μελέτη πολυμορφισμών σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς ή πρωτεΐνες-υποδοχείς και εμπλέκονται είτε στη φαρμακοκινητική είτε στην φαρμακοδυναμική της υποκείμενης δραστικής ουσίας. Ειδικότερα, υπάρχουν μελέτες για τα φάρμακα συστημικής θεραπείας που χορηγούνται συχνότερα (μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη, ακιτρετίνη) καθώς και τους πιο αποτελεσματικούς βιολογικούς παράγοντες (αναστολείς του TNF-α και αναστολείς IL12/IL23) ενώ μόνο μια μελέτη έχει γίνει μέχρι στιγμής για την απρεμιλάστη.

Η αποτελεσματικότητα μιας φαρμακευτικής αγωγής για την ψωρίαση ορίζεται από τον δείκτη PASI (Psoriasis Area and Severity Index) και συχνότερα τον PASI-75 που αντιπροσωπεύει το ποσοστό ή τον αριθμό των ασθενών στους οποίους επετεύχθη μείωση των ψωριασικών αλλοιώσεων τουλάχιστον κατά 75%. Η βαρύτητα της νόσου ορίζεται από τον δείκτη BSA (Body Surface Area) που αντιπροσωπεύει το ποσοστό του σώματος του ασθενούς όπου εντοπίζονται οι ψωριασικές αλλοιώσεις²⁹.

1.2.2.1. Μεθοτρεξάτη

Ο μηχανισμός δράσης της μεθοτρεξάτης (MTX) στην ψωρίαση δεν είναι πλήρως κατανοητός όμως έχει υποτεθεί ότι εμπλέκεται στην οδό του 5-αμινοϊμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο ριβονουκλεοτιδίου (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAP) ενός μορίου που συμμετέχει στην δραστηριότητα της AMP-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης και έχει

ανοσορυθμιστικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο.

Όταν η MTX χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία, το 60% των ασθενών πέτυχε PASI-75 ενώ το 30% εμφάνισε παρενέργειες που κυμαίνονταν από ελαφρές (όπως γαστρεντερικές διαταραχές και αλωπεκία) μέχρι αρκετά σοβαρές (όπως νευροπάθειες και ηπατοτοξικότητα). Δυστυχώς επί του παρόντος δεν μπορεί να προβλεφθεί ποιοι ασθενείς θα επωφεληθούν της θεραπείας και ποιοι θα εμφανίσουν ανεπιθύμητες παρενέργειες όμως έχουν βρεθεί δυο κατηγορίες πολυμορφισμών που σχετίζονται με την απόκριση των ασθενών στην MTX. Συγκεκριμένα, πρόκειται για SNPs που είτε σχετίζονται με την διαμεμβρανική μεταφορά (στα γονίδια *ABCC1*, *ABCG2* και *SLC19A1*) είτε μεταβάλλουν την δραστικότητα ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στην οδό μεταβολισμού της MTX (στα γονίδια *MTHFR*, *DHFR*, *TYMS*, *ATIC* και *ADORA2A*)³⁰. Τρεις πολυμορφισμοί στο *ABCC1* (rs35592, rs2238476 και rs28364006) και δύο στο *ABCG2* (rs13120400 και rs17731538) συσχετίστηκαν με αυξημένη απόκριση στην MTX ενώ έξι SNPs του *ABCC1* (rs2238476, rs3784864, rs246240, rs3784862, rs1967120 και rs11075291) συσχετίστηκαν με σοβαρές παρενέργειες του φαρμάκου με τα δύο πρώτα να έχουν την ισχυρότερη συσχέτιση με τις παρενέργειες αυτές³¹.

Αλληλόμορφα πολυμορφισμών που συσχετίστηκαν με μικρότερη τοξικότητα του φαρμάκου εντοπίστηκαν και στα *SLC19A1* (rs1051266) και *ADORA2A* (rs5760410) ενώ άτομα με μηδενική απόκριση στο φάρμακο έφεραν τουλάχιστον μια τριπλή επανάληψη ενός τμήματος μήκους 28bp στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *TYMS*. Η τοξικότητα ήταν συχνότερη σε άτομα που έφεραν ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο του *SLC19A1* (το 80A) και σε άτομα από τα οποία απουσίαζε μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 6bp από την 3' αμετάφραστη περιοχή του *TYMS*. Τέλος, όσοι ασθενείς έφεραν αλληλόμορφα ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού στο γονίδιο *ATIC* είχαν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν παρενέργειες ενώ αλληλόμορφα ενός συγκεκριμένου SNP στο *MTHFR* ήταν σπανιότερα σε όσους αργότερα εμφάνισαν ηπατοτοξικότητα²⁹.

Παρά το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα ευρήματα των φαρμακογενετικών μελετών για την MTX ακόμη δεν έχουν καταφέρει να αξιοποιηθούν στην κλινική πράξη.

1.2.2.2. Κυκλοσπορίνη

Πρόκειται για ένα αρκετά αποτελεσματικό φάρμακο στην θεραπεία της ψωρίασης, που επιφέρει PASI-75 στο 70% των ασθενών στους οποίους χορηγείται, μπορεί όμως να συνοδεύεται και από αρκετά σημαντικές παρενέργειες όπως νεφροτοξικότητα, υπερλιπιδαιμία και

νευροτοξικότητα³².

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση όσον αφορά την κυκλοσπορίνη είναι ότι η αποτελεσματικότητά της δεν φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωσή της στον ορό των ασθενών ενώ η απορρόφησή της που πραγματοποιείται κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια.

Η ετερογένεια αυτή μπορεί να συσχετίζεται εν μέρει με πολυμορφισμούς στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ισοένζυμα 3A του CYP450 (CYP3A4 και CYP3A5) και στο γονίδιο *ABCB1* που κωδικοποιεί τον διαμεμβρανικό μεταφορέα P-γλυκοπρωτεΐνη²⁹.

Τα ένζυμα της οικογένειας CYP3 σχετίζονται με τον μεταβολισμό και την αποβολή φαρμάκων που χορηγούνται από του στόματος όμως μέχρι τώρα δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που να μπορούν να συσχετίσουν SNPs στα γονίδια των CYP3A με την απόκριση στην θεραπεία για την ψωρίαση, έτσι η όποια συσχέτιση παραμένει θεωρητική.

Τέλος σε μια άλλη μελέτη στην οποία πήραν μέρος 84 ασθενείς με ψωρίαση οι οποίοι λαμβάναν θεραπεία με κυκλοσπορίνη, ο γονότυπος *ABCB1:3435T* ήταν ο συχνότερος μεταξύ των ατόμων που δεν αποκρίθηκαν στο φάρμακο²⁹.

1.2.2.3. Ακιτρετίνη

Όταν χορηγείται ως μονοθεραπεία, η ακιτρετίνη είναι λιγότερο αποτελεσματική από τα υπόλοιπα συστημικά φάρμακα καθώς μόνο 25% των ασθενών επιτυγχάνει PASI-75 όμως οι ασθενείς με φλυκταινώδη ψωρίαση φαίνεται να επωφελούνται της θεραπείας σε ένα αξιόλογο ποσοστό της τάξης του 84%^{29,32}. Πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου *VEGF*, την έκφραση του οποίου στοχεύει να καταστείλει η ακιτρετίνη, έχουν συσχετιστεί με την απόκριση των ασθενών στο συγκεκριμένο ρετινοειδές. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός *VEGF-460C>T* (rs 833061) συσχετίστηκε με πρώιμη εμφάνιση της νόσου και μειωμένη απόκριση στην ακιτρετίνη²⁹.

1.2.2.4. Αναστολείς του TNF-α

Αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α) όπως μονοκλωνικά αντισώματα (ινφλιξιμάβη, αδαλιμουμάμπη κ.α.) και μια πρωτεΐνη που δρα ως αναστολέας πρόσδεσης (ετανερσέπτη) έχουν χορηγηθεί σε άτομα που πάσχουν από ψωρίαση και έχουν φανεί ιδιαίτερα αποτελεσματικοί σε τυχαιοποιημένες μελέτες είτε σαν μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τοπικές θεραπείες. Δεδομένου του ρόλου που παίζει ο TNF-

α στην δημιουργία φλεγμονώδων αποκρίσεων, αυξημένα επίπεδα του μορίου αυτού έχουν βρεθεί τόσο σε δερματικούς ιστούς που έχουν υποστεί ψωριασικές βλάβες όσο και στο αίμα των ασθενών²⁹.

Ο ρόλος αυτός του TNF-α υπογραμμίζεται και από το γεγονός ότι κατόπιν αποτελεσματικής θεραπείας και αφού τα επίπεδά του επανέλθουν στα φυσιολογικά, υποχωρούν και τα συμπτώματα³³. Σε γενετικό επίπεδο, πολυμορφισμοί στα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης του TNF-α είναι σαφές ότι επηρεάζουν την απελευθέρωση της εν λόγω κυτταροκίνης και κατ' επέκταση την ένταση των φλεγμονώδων αποκρίσεων και την εγκατάσταση της ψωρίασης (ή άλλων αυτοάνοσων παθήσεων)²⁹. Πράγματι, πολυμορφισμοί σε συγκεκριμένες περιοχές του υποκινητή του γονιδίου της πρωτεΐνης TNF-α έχουν σχετιστεί με αλλαγές στην έκφρασή του ενώ ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο του SNP rs1800629 στο γονίδιο αυτό συσχετίστηκε με την δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων και τα επίπεδα του TNF-α στα κύτταρα³⁴.

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 80 ασθενείς που ήταν σε θεραπεία με αναστολείς του TNF-α βρήκε συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων αλληλομόρφων των rs361525, rs1800629 και rs1799724 στο γονίδιο *TNF-α*, του rs1061622 στο *TNFRSF1B*, του rs4149584 στο *TNFRSF1A*, των rs2230926 και rs610604 στο *TNFAIP3* και της απόκρισης στην θεραπεία με αναστολείς TNF-α³⁵.

Εκτός όμως από το προφανές, ότι η απόκριση στην θεραπεία εξαρτάται από πολυμορφισμούς στα παραπάνω γονίδια, φάνηκε ότι και άλλα γονίδια, με λιγότερο προφανή συσχέτιση συνδέονται με την απόκριση στην καταστολή του TNF-α και συγκεκριμένα εκείνα της οδού Th17³⁶. Κάποιοι γονότυποι του *IL23R* συσχετίστηκαν με θετική απόκριση στην θεραπεία με αναστολείς ενώ λιγότερο ξεκάθαρος ήταν ο ρόλος του γονιδίου *IL17F* όπου αλληλόμορφα του ίδιου πολυμορφισμού (rs763780) βρέθηκε ότι συσχετίζονται με καλή απόκριση στην ινφλιξιμάβη και κακή στην αδαλιμουμάμπη²⁹.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Έλληνες που έλαβαν ετανερσέπτη, αδαλιμουμάμπη και ινφλιξιμάβη φάνηκε ότι ένα αλληλόμορφο του SNP rs10484554 στο γονίδιο *HLA-C* συσχετίστηκε με καλή απόκριση και στα τρία φάρμακα, με την αδαλιμουμάμπη να είναι το αποτελεσματικότερο από τα τρία. Επίσης αλληλόμορφα των SNPs rs13190932 στο *TRAF3IP2*, rs610604 στο *TNFAIP3* και rs9260313 στο *HLA-A* συσχετίστηκαν με καλή απόκριση στην ινφλιξιμάβη, την ετανερσέπτη και την αδαλιμουμάμπη αντίστοιχα²⁹.

Μετά την χορήγηση ινφλιξιμάβης, ετανερσέπτης και αδαλιμουμάμπης οι ασθενείς που

έφεραν αλληλόμορφα του SNP rs4819554 στον επαγωγέα (enhancer) του γονιδίου *IL17RA-A* είχαν καλή απόκριση και στα τρία φάρμακα μετά από 12 και 24 εβδομάδες χορήγησης²⁹. Τέλος μόνο 6 από τους 173 διαφορετικούς πολυμορφισμούς που εξετάστηκαν ως προς την συσχέτισή τους με διαφορετικές αποκρίσεις στους καταστολείς του TNF-α (ινφλιξιμάβη, ετα-νερσέπτη, αδαλιμουμάμπη) έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα τρεις μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με ετανερσέπτη, αδαλιμουμάμπη και ινφλιξιμάβη. Ειδικότερα, πρόκειται για αλληλόμορφα των SNPs rs2916205 στο *PGLYR4*, rs9304742 στο *ZNF816A*, rs11126740 στο *CTNNA2*, rs2546890 στο *IL12B*, rs96844 στο *MAP3K1* και rs12191877 στο *HLA-C*. Αλληλόμορφα των τεσσάρων πρώτων συσχετίστηκαν με κακή απόκριση στην θεραπεία και αλληλόμορφα των άλλων δύο με καλή απόκριση ενώ έναν χρόνο μετά την πρώτη αυτή μελέτη τα άτομα που έφεραν αλληλόμορφα του rs2546890 συνέχισαν να έχουν καλύτερη απόκριση στην θεραπεία²⁹.

1.2.2.5. Αναστολείς *IL12/IL23*

Η χορήγηση αντισωμάτων κατά της υπομονάδας p40 των ιντερλευκινών *IL-12* και *IL-23* έχει φανεί πολύ αποτελεσματική για την θεραπεία της κατά πλάκας ψωρίασης σε αρκετούς ασθενείς. Το καλύτερα μελετημένο φάρμακο αυτής της κατηγορίας είναι η ουστεκινουμάμπη, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που χορηγείται για την θεραπεία της ψωρίασης και άλλων αυτοάνοσων παθήσεων²⁹.

Αναλύσεις GWAS έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα της *IL-23* (*IL23R*) και τις υπομονάδες A και B των ιντερλευκινών 23 και 12 αντίστοιχα (*IL23A* και *IL12B*) συσχετίζονται με την εμφάνιση ψωρίασης χωρίς όμως αυτά τα SNPs να παίζουν κάποιο ρόλο στην θεραπευτική δράση της ουστεκινουμάμπης²⁹.

Ενώ από μόνοι τους πολυμορφισμοί στα γονίδια *IL12B*, *IL23R* και *IL6* δεν συσχετίστηκαν με διαφορετική απόκριση στην θεραπεία, όταν εξετάστηκε η θεραπευτική της δράση σε σχέση με το *HLA-C*6:02* φάνηκε ότι τα άτομα που έφεραν το συγκεκριμένο αλληλόμορφο και δεν έφεραν αλληλόμορφα των τα SNPs rs3212227 στο *IL12B*, rs1800795 στο *IL6* ή έφεραν αλληλόμορφα του rs6887695 στο *IL12B* είχαν καλύτερη απόκριση στο φάρμακο²⁹.

Στην προσπάθεια των ερευνητών να μελετηθεί η συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs4406273 στο *HLA-C*06*, rs610604 στο *TNFAIP3*, rs11209026 στο *IL23R*, rs27524 στο *ERAP1*, rs3213094 στο *IL12B*, rs17716942 στο *IFIH1*, rs240993 στο *TRAF3IP2* και του rs6427528 στο *CD84* με τα θεραπευτικά αποτελέσματα της ουστεκινουμάμπης προέκυψε θετική συσχέτιση

μεταξύ αλληλομόρφων των rs6887695 (στο *IL12B*) και rs610604 (στο *TNFAIP3*) και της θεραπευτικής δράσης του φαρμάκου³⁷.

Μια ακόμη μελέτη που αφορούσε 121 SNPs και πραγματοποιήθηκε σε 69 ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε ουστεκινουμάμπη εντόπισε ότι άτομα που έφεραν συγκεκριμένα αλληλόμορφα πολυμορφισμών στα *TNFRSF1A*, *HTR2A*, *NFKBIA*, *ADAM33*, *IL13*, *CHUK*, *C17orf51*, *ZNF816A*, *STAT4*, *SLC22A4* και *C9orf72* πέτυχαν PASI-75 4 μήνες μετά την χορήγηση του αναστολέα²⁹.

1.2.2.6. Απρεμιλάστη

Μια αρκετά πρόσφατη, φαρμακογενετική μελέτη για την απρεμιλάστη εντόπισε συγκεκριμένα SNPs που σχετίζονται με την απόκριση στην θεραπεία. Στην μελέτη έλαβαν μέρος 34 Ρώσοι ασθενείς με μέτριας ή βαριάς μορφής κατά πλάκας ψωρίαση και βρέθηκαν 72 SNPs, σε 4 χρωμοσώματα που συσχετίστηκαν με διαφορετικές αποκρίσεις στη θεραπεία.

Τα SNPs αυτά εντοπίστηκαν σε γενετικούς τόπους με άγνωστη λειτουργία και κάποιοι από αυτούς έδειξαν μεγαλύτερη συσχέτιση με την απόκριση στην απρεμιλάστη από ότι κάποιοι άλλοι. Τέλος η μελέτη GWAS που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της έρευνας δεν κατάφερε να εντοπίσει SNPs που να σχετίζονται και με την απόκριση στην θεραπεία και με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Πρόκειται σαφώς για μια έρευνα με πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων όμως η απρεμιλάστη είναι ένα φάρμακο με ήπιες παρενέργειες και καλή αποτελεσματικότητα το οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα από φαρμακογενετικής άποψης και χρήζει περαιτέρω μελέτης³⁸.

Λειτουργικά πειράματα έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με ψωρίαση παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την οικογένεια των φωσφοδιεστερασών 4 (PDE4) οι οποίες αποτελούν στόχο της απρεμιλάστης. Η PDE4, μειώνοντας τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής cAMP ενισχύει την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Ο ρόλος αυτός της PDE4 στην ρύθμιση των φλεγμονώδων αποκρίσεων έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών με αποτέλεσμα να μελετώνται όλο και περισσότερο οι χημικές ενώσεις που είναι ικανές να ρυθμίσουν την δραστηριότητά της³⁹.

1.3. Θεραπεία με Απρεμιλάστη

1.3.1. Ο Μηχανισμός Δράσης της Απρεμιλάστης

Η απρεμιλάστη χορηγείται από το στόμα και δρα αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Η αναστολή της PDE4 από την απρεμιλάστη οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικής cAMP και μειώνει την φλεγμονώδη απόκριση ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν συγκεκριμένες κυτταροκίνες.

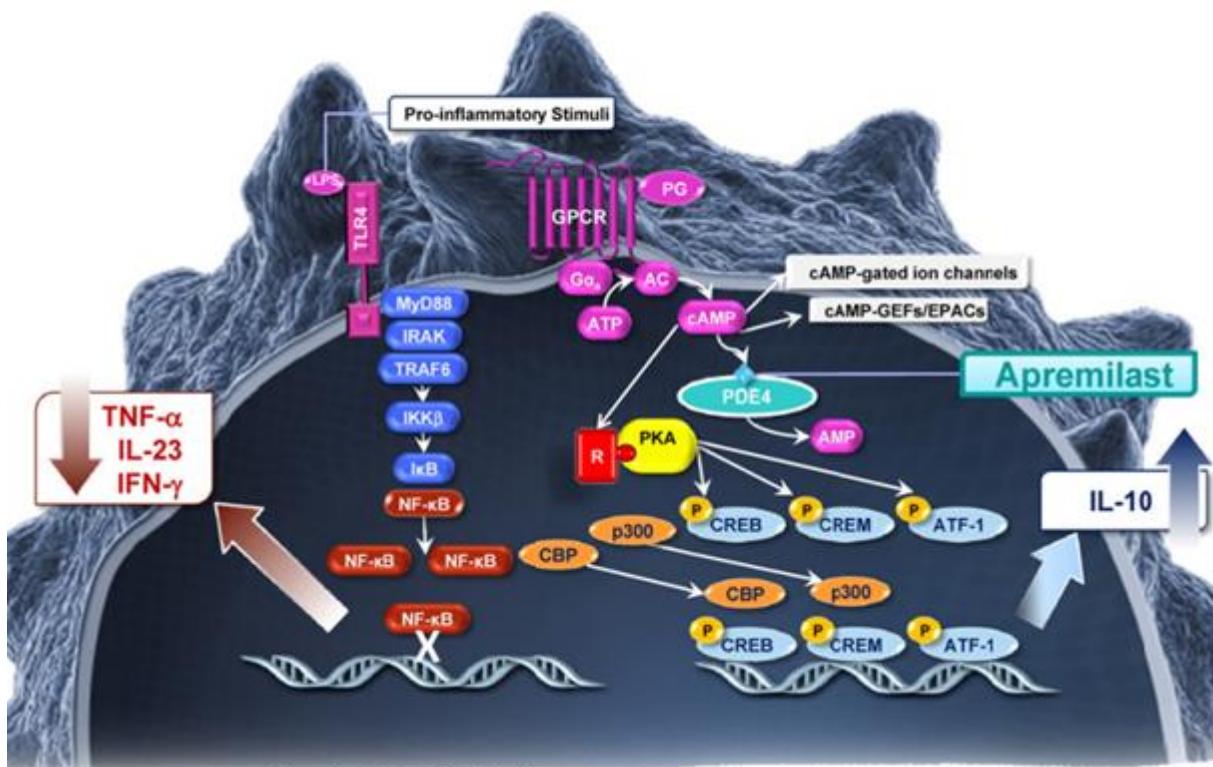
Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, με την αύξηση της ενδοκυτταρικής cAMP διεγείρεται η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), CREM (cAMP Responsive Element Modulator) και ATF-1 (Activating Transcription Factor-1). Μαζί με αυτές επιστρατεύονται βοηθητικά και οι πρωτεΐνες p300 και CBP (CRE Binding Protein) οι οποίες έχουν δραστηριότητα ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών, (Histone Acetyltransferase, HAT) χαλαρώνοντας την δομή της χρωματίνης στα ρυθμιστικά στοιχεία και βοηθώντας με αυτό τον τρόπο την μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την IL-10 οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση του και αυξημένη παραγωγή της αντίστοιχης αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης.

Με τις p300 και CBP ενεργές σε γονίδια μακριά από τα εκείνα που κωδικοποιούν τον NF-κΒ καταστέλλεται η ικανότητα μεταγραφής του, έτσι η έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων και η παραγωγή IL-23, TNF-α και TNF-γ μειώνεται⁴⁰.

Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση, χαμηλά επίπεδα διείσδυσης από τα ανοσοκύτταρα και μειωμένο πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων που είναι και εκείνα τα οποία τελικά προκαλούν τις ψωριασικές αλλοιώσεις.

1.3.2. Αποτελεσματικότητα της Απρεμιλάστης

Δύο μεγάλες, τυχαιοποιημένες, διπλά τυφλές μελέτες υποδεικνύουν με σαφήνεια την απρεμιλάστη ως αποτελεσματική θεραπεία για την κατά πλάκας ψωρίαση. Στις μελέτες ESTEEM 1 και ESTEEM 2 έλαβαν μέρος 1.257 άτομα με μέτρια και σοβαρή μορφή της νόσου που εμφάνισαν BSA \geq 10% και PASI \geq 12. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (σε αναλογία 2:1), στην ομάδα απρεμιλάστης και την ομάδα ελέγχου.

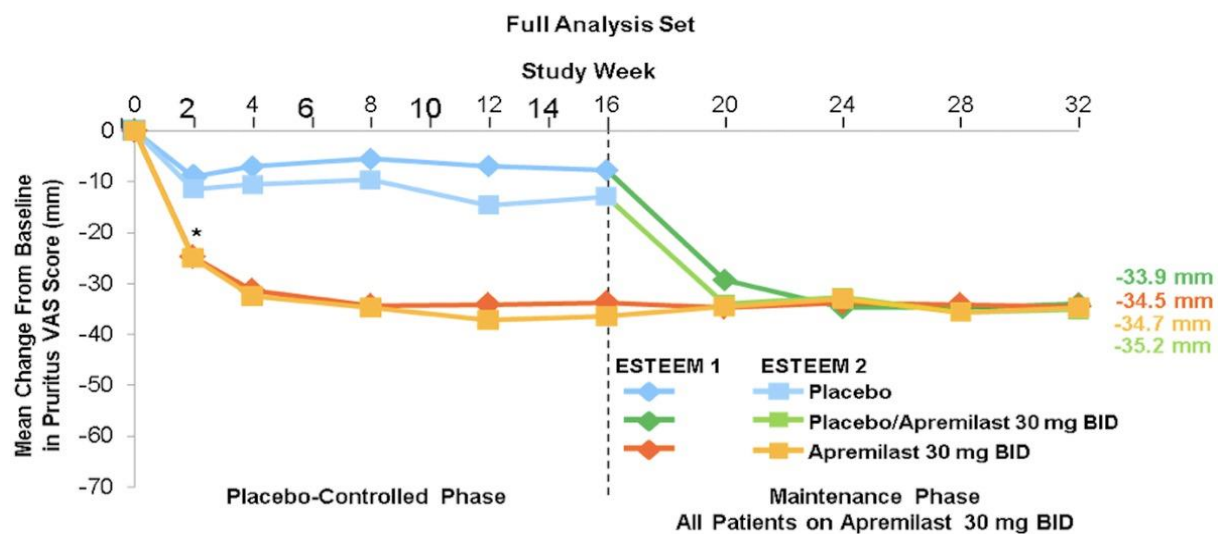


Εικόνα 3: Ο μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης στα σηματοδοτικά μονοπάτια⁴⁰

Οι μελέτες διήρκησαν συνολικά 52 εβδομάδες, τις πρώτες 16 στην ομάδα απρεμιλάστης χορηγήθηκαν 30mg της φαρμακευτικής ουσίας ημερησίως και στην ομάδα ελέγχου εικονικό φάρμακο ενώ από την 16^η έως την 32^η εβδομάδα δόθηκαν 30mg απρεμιλάστης την ημέρα σε όλους τους ασθενείς. Στην τρίτη και τελευταία φάση της μελέτης, οι ασθενείς στους οποίους είχε παρατηρηθεί μείωση του PASI κατά 75% (ESTEEM 1) και εκείνοι στους οποίους είχε παρατηρηθεί μείωση του PASI κατά 50% (ESTEEM 2) τυχαιοποιήθηκαν ξανά σε χορήγηση εικονικού φαρμάκου και σε χορήγηση 30mg απρεμιλάστης ημερησίως (32^η-52^η εβδομάδα). Οι ασθενείς που συνέχισαν να παίρνουν απρεμιλάστη διατήρησαν σταθερή την μείωση του PASI ενώ εκείνοι που στην τρίτη φάση τυχαιοποιήθηκαν στην νέα ομάδα ελέγχου επανεμφάνισαν μέρος των ψωριασικών πλακών. Και από τις δύο μελέτες φάνηκε με σαφήνεια ότι η απρεμιλάστη είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για την μέτρια και σοβαρή ψωρίαση και μάλιστα βοήθησε στην καταπολέμηση ψωριασικών αλλοιώσεων σε δύσκολα σημεία όπως στο τριχωτό της κεφαλής και στα νύχια⁴¹.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4, τις πρώτες 16 εβδομάδες η ομάδα ελέγχου δεν είχε

σημαντική βελτίωση (ο δείκτης VAS παρέμεινε σχετικά σταθερός) ενώ από την 16^η έως την 32^η εβδομάδα (οπότε και χορηγήθηκε απρεμιλάστη σε ποσότητα 30mg ημερησίως) ο δείκτης VAS μειώθηκε σημαντικά, από -8 την 16^η εβδομάδα σε -33,9 (ESTEEM1) και από -11 σε -35,2 (ESTEEM2). Η ομάδα την οποία χορηγήθηκε απρεμιλάστη πέτυχε μείωση του δείκτη VAS από την 2^η εβδομάδα ο οποίος παρέμεινε σταθερά μειωμένος από την 8^η εβδομάδα και μετά (-34,5 ESTEEM1 και -34,7 ESTEEM2).



| | Week 2 | | | | Week 16 | | | | Week 32 | | | |
|--------------------|--------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|
| ESTEEM 1 | | | | | | | | | | | | |
| Placebo, n=282 | 266 | 268 | 264 | 248 | 248 | | | | 242 | 237 | 226 | 216 |
| Apremilast n=562 | 543 | 540 | 522 | 509 | 500 | 487 | 475 | 448 | 424 | | | |
| ESTEEM 2 | | | | | | | | | | | | |
| Placebo, n=135 | 132 | 125 | 120 | 110 | 110 | | | | | | | |
| Placebo/Apremilast | | | | | | 106 | 102 | 99 | 98 | | | |
| Apremilast, n=274 | 260 | 256 | 246 | 241 | 238 | 230 | 220 | 211 | 191 | | | |

BID, twice daily; VAS, visual analog scale.

* $p < .001$ vs. placebo (post hoc analysis).

Pruritus was measured on a 100-mm VAS. Baseline values: ESTEEM 1 – 65.0 mm (placebo) and 66.1 mm (apremilast 30 mg BID); ESTEEM 2 – 65.3 mm (placebo) and 67.7 mm (apremilast 30 mg BID). Data are as observed.

In ESTEEM 1 at week 16, $n = 248$ (placebo) and $n = 500$ (apremilast 30 mg BID); at week 32, $n = 216$ (placebo) and $n = 424$ (apremilast 30 mg BID). In ESTEEM 2 at week 16, $n = 110$ (placebo) and $n = 238$ (apremilast 30 mg BID); at week 32, $n = 98$ (placebo) and $n = 191$ (apremilast 30 mg BID).

Εικόνα 4: Τα αποτελέσματα των ESTEEM1 και ESTEEM2 σχηματικά⁴¹

1.4. Ισομορφές και Δραστικότητα της PDE4

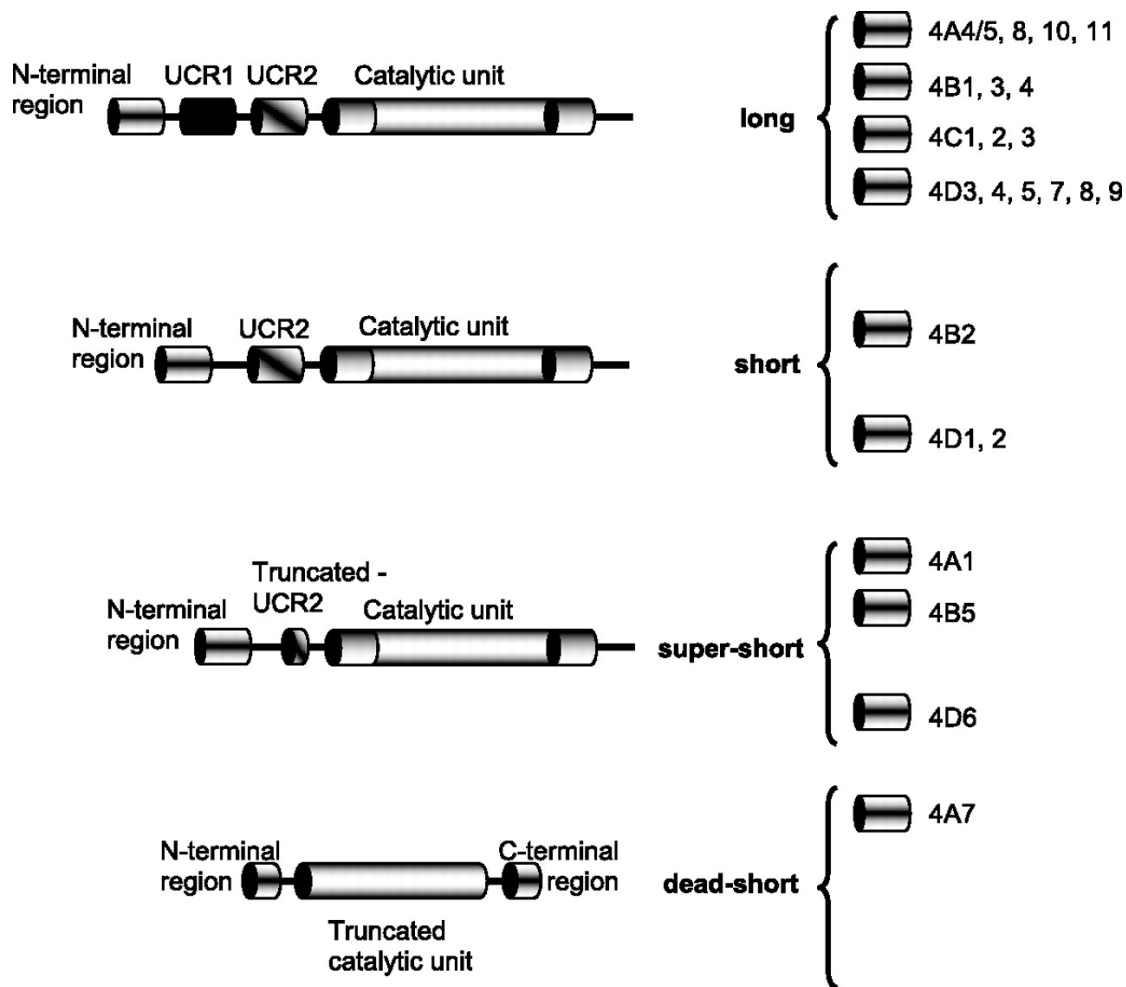
Η PDE4 είναι μέλος της υπεροικογένειας των φωσφοδιεστερασών και κωδικοποιείται από 4 γονίδια: το *PDE4A* που βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19, στην περιοχή 13.2, το *PDE4B* στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 1 στην περιοχή 31, το *PDE4C* στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 19 στην περιοχή 13.1 και το *PDE4D* στον μικρό

βραχίονα του χρωμοσώματος 5 στην περιοχή 12. Όλα τα παραπάνω γονίδια έχουν μήκος περίπου 50kb, αποτελούνται από περίπου 20 εξώνια και έχουν 3-11 ισομορφές το κάθε ένα καταλήγοντας έτσι σε 20 διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου συνολικά⁴².

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, ανάλογα με το μέγεθός τους οι ισομορφές αυτές χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες, τις μεγάλες (περιλαμβάνουν τις PDE4A4, PDE4A5, PDE4A8, κ.α.), τις μικρές (PDE4B2, PDE4D1 κ.α.), τις πολύ μικρές (PDE4A1, PDE4B5 κ.α.) και τις νεκρές (Dead-Short) (PDE4A7). Ενώ όλες περιέχουν μια συντηρημένη καταλυτική περιοχή, οι μεγάλες ισομορφές έχουν δύο υψηλά συντηρημένες αμινοτελικές περιοχές (Upstream Conserved Regions, UCR-1 και UCR-2), οι μικρές περιέχουν μόνο την UCR-1, οι πολύ μικρές έχουν ένα μικρό τμήμα της UCR-2 ενώ οι νεκρές δεν έχουν καμία ενζυμική δραστηριότητα ούτε συντηρημένη περιοχή και η καταλυτική τους ομάδα είναι ανενεργή⁴³.

Ορισμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, παίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστηριότητα των φωσφοδιεστερασών. Οι ισομορφές B-D έχουν μια θέση φωσφορυλίωσης από την ERK (Extracellularly Regulated Kinase). Η φωσφορυλίωση της PDE4 από την ERK αλλάζει την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου, αναστέλλει την δράση των μεγάλων PDE4 B-D, ενεργοποιεί τις μικρότερες ενώ δεν έχει καμία ή ελάχιστη επίδραση στις πολύ μικρές ισομορφές.

Ακόμη, στην περιοχή UCR-1 υπάρχει μια επιπλέον θέση πρόσδεσης για την PKA που μπορεί να αυξήσει την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου ανάλογα με το μέγεθός του, αυξάνοντας εκείνη των μεγάλων ισομορφών ενώ δεν έχει καμία επίδραση στις ισομορφές (μικρές και πολύ μικρές) από τις οποίες απουσιάζει η αντίστοιχη περιοχή. Ανάλογα λοιπόν με το είδος φωσφορυλίωσης που συμβαίνει, παρατηρείται ότι οι διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου έχουν και διαφορετική δραστηριότητα⁴⁴.



Εικόνα 5: Ισομορφές της PDE4.

Σε όλες τις ισομορφές το μέγεθος της καταλυτικής υπομονάδας είναι το ίδιο. Η διαφορά μεγέθους των ισομορφών καθορίζεται από το χαρακτηριστικό N-τελικό άκρο και την ύπαρξη ή μη των περιχών UCR-1 και UCR-2⁴²

Έτσι, ορισμένοι αναστολείς της PDE4, όπως η απρεμιλάστη, είναι πιθανό να μην έχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα σε όλους τους ασθενείς καθώς οι αναστολείς που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής δεν στοχεύουν σε συγκεκριμένες ισομορφές του ενζύμου. Το φάσμα των φωσφοδιεστερασών είναι μεγάλο, ως εκ τούτου μια πρωτοπόρα προσέγγιση για ταχύτερη και ακριβέστερη καταστολή της PDE4 θα ήταν η δημιουργία και η χορήγηση των κατάλληλων αναστολέων λαμβάνοντας υπόψιν εάν στο γονιδίωμα του ασθενούς υπάρχουν SNPs που να σχετίζονται με διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου και άρα διαφορετική δραστικότητα του.

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η γονοτύπηση ασθενών που έλαβαν απρεμιλάστη για την θεραπεία της ψωρίασης, με την μέθοδο της HRM. Στα πλαίσια της εργασίας εξετάστηκε ένα SNP (rs2229228) στο γονίδιο *PDE4C*. Η επιλογή του συγκεκριμένου πολυμορφισμού έγινε με βάση βιοπληροφορικά δεδομένα αναφορικά με την συχνότητα και την επίδρασή του σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και κυρίως σε κατοίκους της Μεσογείου. Στόχος είναι να δημιουργηθούν επιμέρους ομάδες με βάση τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά των ασθενών οι οποίες μελλοντικά θα συσχετιστούν με την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία βάσει του γενετικού τους υποβάθρου. Σε συνέχεια αυτής της μελέτης μπορούν να αναλυθούν περισσότερα δείγματα DNA ώστε να αυξηθεί η ισχύς της ανάλυσης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Δείγματα αίματος

Η ανάλυση έγινε σε DNA που απομονώθηκε από δείγματα αίματος που προήλθαν από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (Επικ. Καθηγήτρια Ε. Ζαφειρίου).

3.2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με το PureLink Genomic DNA Kit (κωδικός προϊόντος K182002) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία Thermo Fisher. Ο όγκος αίματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 200μl και έγινε έκλουση εις διπλούν με 25μl διαλύματος έκλουσης την κάθε φορά (50μl σύνολο).

3.3. Μέτρηση Συγκέντρωσης DNA

Η ανάλυση της HRM απαιτεί συγκεκριμένη συγκέντρωση DNA, έτσι είναι απαραίτητη η σωστή ποσοτικοποίησή του. Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση με φωτόμετρο της εταιρίας Quawell. Για την διαδικασία της φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκαν 2 μl διαλύματος DNA από το κάθε δείγμα. Συνολικά έγιναν 3 φωτομετρήσεις για το κάθε δείγμα και ο μέσος όρος τιμών τους ορίστηκε ως η συγκέντρωση του δείγματος σε DNA. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 2μl διαλύματος έκλουσης.

3.4. Επιλογή εκκινητών και έλεγχος με PCR

Προκειμένου να γονοτυπηθούν τα δείγματα DNA πρέπει προηγουμένως να αυξηθεί η ποσότητα του συγκεκριμένου τμήματος που περιέχει τον υπό μελέτη πολυμορφισμό με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η PCR αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 και είναι μια μοριακή μέθοδος που στόχο έχει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA με σκοπό την μετέπειτα μελέτη τους. Πρόκειται για μια *in vitro* διαδικασία που χρησιμοποιείται με πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών παθήσεων⁴⁵.

Η ενίσχυση του DNA επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητά του να αποδιατάσσεται, να αντιγράφεται και να επαναδιατάσσεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και

παρουσία του κατάλληλου ενζύμου, υποστρώματος και εκκινητών⁴⁶.

Στο πρώτο στάδιο της PCR, οι δύο κλώνοι του DNA διαχωρίζονται λόγω της υψηλής θερμοκρασίας στην οποία υποβάλλεται το δείγμα η οποία μετέπειτα μειώνεται και οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA. Οι δύο κλώνοι είναι πλέον διαθέσιμοι για ενζυμική επιμήκυνση από την πολυμεράση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με διαδοχικούς κύκλους αποδιάταξης, υβριδοποίησης εκκινητών και αντιγραφής, έτσι στο τέλος της αντίδρασης το DNA έχει ενισχυθεί εκθετικά σε σύντομο χρονικό διάστημα⁴⁷.

Η ποσότητα DNA που θα παράγει μια PCR εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων η οποία όσο προχωράει η αντίδραση περιορίζεται. Για μια πετυχημένη ενίσχυση είναι απαραίτητα:

- Δείγμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.
- DNA (Tag) Πολυμεράση: Το ένζυμο που πολυμερίζει τους νέους κλώνους DNA. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ένζυμο είναι η Taq πολυμεράση λόγω της θερμοανθεκτικότητάς της.
- Ζεύγος Εκκινητών (Εμπρόσθιος και Ανάστροφος): Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς στα 3' άκρα των αντισηματικών κλώνων του DNA. Αυτά παρέχουν 3' ελεύθερα άκρα τα οποία αναγνωρίζει η πολυμεράση ώστε να δημιουργήσει θέσεις έναρξης αντιγραφής. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή ειδικότητα, ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης και να είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτουν την περιοχή ενδιαφέροντος και να παράγουν τελικό προϊόν με κατάλληλο μέγεθος.
- Τριφωσφορικά Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): Νουκλεοτίδια με τρεις φωσφορικές ομάδες και με τα οποία η πολυμεράση συνθέτει τους νέους κλώνους
- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Buffer): Παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για να δράσει η πολυμεράση⁴⁸

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών με την βοήθεια του εργαλείου Primer Design Tool του NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Οι λυοφυλιοποιημένοι εκκινητές συντέθηκαν από την εταιρία Eurofins Genomics, αναμείχθηκαν με νερό και ρυθμίστηκαν σε συγκέντρωση 50pm/μl.

Τα δύο ζεύγη εκκινητών (F4A-R4A και F4B-R4B) εξετάστηκαν με PCR σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Το ζεύγος F4A-R4A, που έχει την αλληλουχία:

F4A: 5'-AAGACACCAACAAGTGGGGA-3', R4A: 5'-GGCAGGGTAGGTACCTGAAAAA-3', εξετάστηκε στους 59°C-61°C-63°C και παράγει προϊόν 106bp ενώ το ζεύγος F4B-R4B που έχει την αλληλουχία:

F4B: 5'-GAAGACACCAACAAGTGGGGA-3', R4B: 5'-GGCAGGGTAGGTACCTGAAAAAT-3, εξετάστηκε στους 60°C-62°C-64°C και παράγει προϊόν 107bp (βλ. παρακάτω)

Για την κάθε PCR χρησιμοποιήθηκαν:

- 5μl Ρυθμιστικό Διάλυμα (10x Taq Buffer)
- 1μl από τον κάθε εκκινητή (Εμπρόσθιος και Ανάστροφος) συγκέντρωσης 50pm/μl
- 1μl dNTPs (10mM)
- 0,2μl Taq Polymerase (Kappa Taq 5 units/μl)
- 40,8μl νερό
- 1μl DNA συγκέντρωσης 44,2ng/μl

Ο τελικός όγκος αντίδρασης ορίστηκε στα 50μl.

Για περισσότερες PCR δημιουργείται ένα μείγμα που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το DNA ώστε να μειωθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι χειρισμοί. Γι' αυτό οι ποσότητες πολλαπλασιάστηκαν επί των αριθμών των αντιδράσεων (και επιπλέον ~10% περισσότερη ποσότητα γιατί συνυπολογίστηκε η πιθανότητα λάθους στον χειρισμό). Σε κάθε PCR χρησιμοποιείται και αρνητικός μάρτυρας δηλαδή αντίδραση που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το DNA.

Μετά την ανάμιξη των συστατικών, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στιγμιαία στην μέγιστη ταχύτητα ώστε να κατακαθίσουν σταγονίδια που πιθανώς παρέμειναν στα τοιχώματα. Η PCR έγινε με το μηχάνημα Thermal Cycler της Applied Biosystems Ο έλεγχος των προϊόντων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης η οποία διαχωρίζει τα προϊόντα ανάλογα με το μέγεθός τους. Για το πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2,5% χρησιμοποιήθηκαν:

- 1,25γρ αγαρόζη
- 50ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 1x (Tris 40 mM, Acetate 40 mM, EDTA 1 mM)
- 4μl χρωστικής Xpert Green της εταιρίας GriSP 20.000x

Σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 500ml αναμείχθηκε η αγαρόζη με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης, η φιάλη σφραγίστηκε με πώμα ώστε να μην εξατμιστεί το διάλυμα και θερμάνθηκε έως ότου η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Στην συνέχεια το μείγμα ψύχθηκε μέχρι περίπου τους 40°C, προστέθηκε σε αυτό η χρωστική και ανακινήθηκε ελαφρώς ώστε να είναι ομοιογενές. Τέλος το μείγμα μεταφέρθηκε σε καλούπι πηκτώματος ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν:

- 5μl προϊόντος PCR, αναμειγμένα με 3μl διαλύματος φόρτωσης που περιείχε χρωστική κυανού του ξυλενίου [10mM Tris-HCl (pH7,6), 0,03% ξυλένιο, 60% γλυκόζη, 60mM EDTA]. Η συγκέντρωση του διαλύματος φόρτωσης είναι 6x αλλά όταν υπάρχει δυνατότητα προστίθεται περισσότερο γιατί βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στο πηγάδι του πηκτώματος.
- Ladder (Μάρτυρας Μήκους Μεγεθών) 100bp της εταιρίας Geneon αναμειγμένα με 3μl διαλύματος φόρτωσης
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x

Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 150V για 15 min και τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Τελικά επιλέχθηκε το ζεύγος που είχε την καλύτερη απόδοση (βλ. παρακάτω)

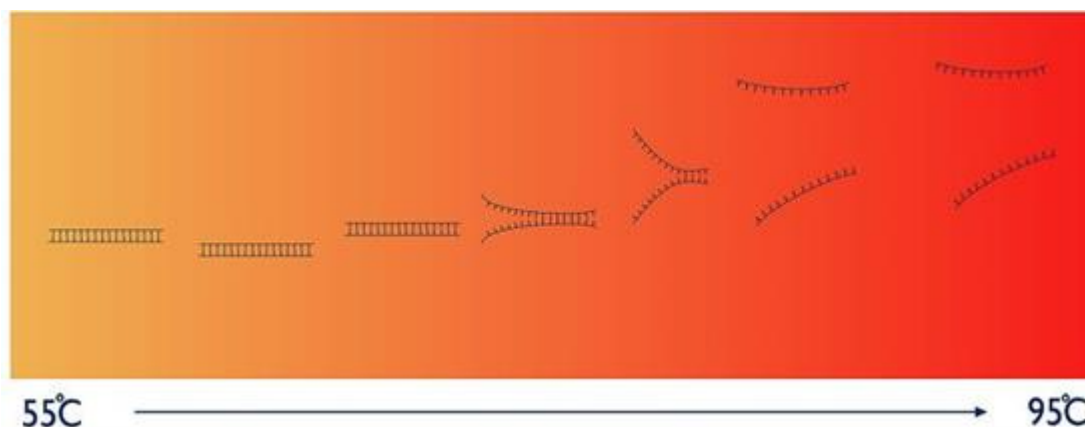
3.5. Μέθοδος High-Resolution Melt (HRM)

Η Ανάλυση Καμπυλών Τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (High-Resolution Melt, HRM) αποτελεί μια ισχυρή και ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο της μοριακής βιολογίας η οποία αναπτύχθηκε στο πανεπιστήμιο της Utah και μπορεί να γίνει ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών⁴⁹. Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις εναλλακτικές μοριακές μεθόδους. Η HRM είναι μια μέθοδος γρήγορη, οικονομική και εύχρηστη,

γεγονός που την καθιστά ιδανική για τον γονοτυπικό χαρακτηρισμό μεγάλου όγκου δειγμάτων. Ακόμη έχει υψηλή ευαισθησία καθώς μπορεί να ανιχνεύσει διαφορές της τάξεως ακόμη και του ενός ζεύγους βάσεων^{50,51}.

3.5.1. Αρχή της Μεθόδου

Η αντίδραση ξεκινά με την ενίσχυση του τμήματος DNA που περιέχει τον πολυμορφισμό ενδιαφέροντος, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR ή Quantitative PCR, qPCR) και παρουσία ειδικής χρωστικής (βλ. παρακάτω). Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της qPCR, το τμήμα DNA που έχει πολλαπλασιαστεί θερμαίνεται διαδοχικά από τους 55° C μέχρι τους 95° C. Μέσα σε αυτό το οποίο φάσμα βρίσκεται και η θερμοκρασία τήξης (Melting Temperature) του δείγματος, δηλαδή η θερμοκρασία στην οποία οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται⁵² όπως φαίνεται στην Εικόνα 6



Εικόνα 6: Καθώς το DNA υποβάλλεται σε θέρμανση οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων σπάνε και οι κλώνοι διαχωρίζονται.

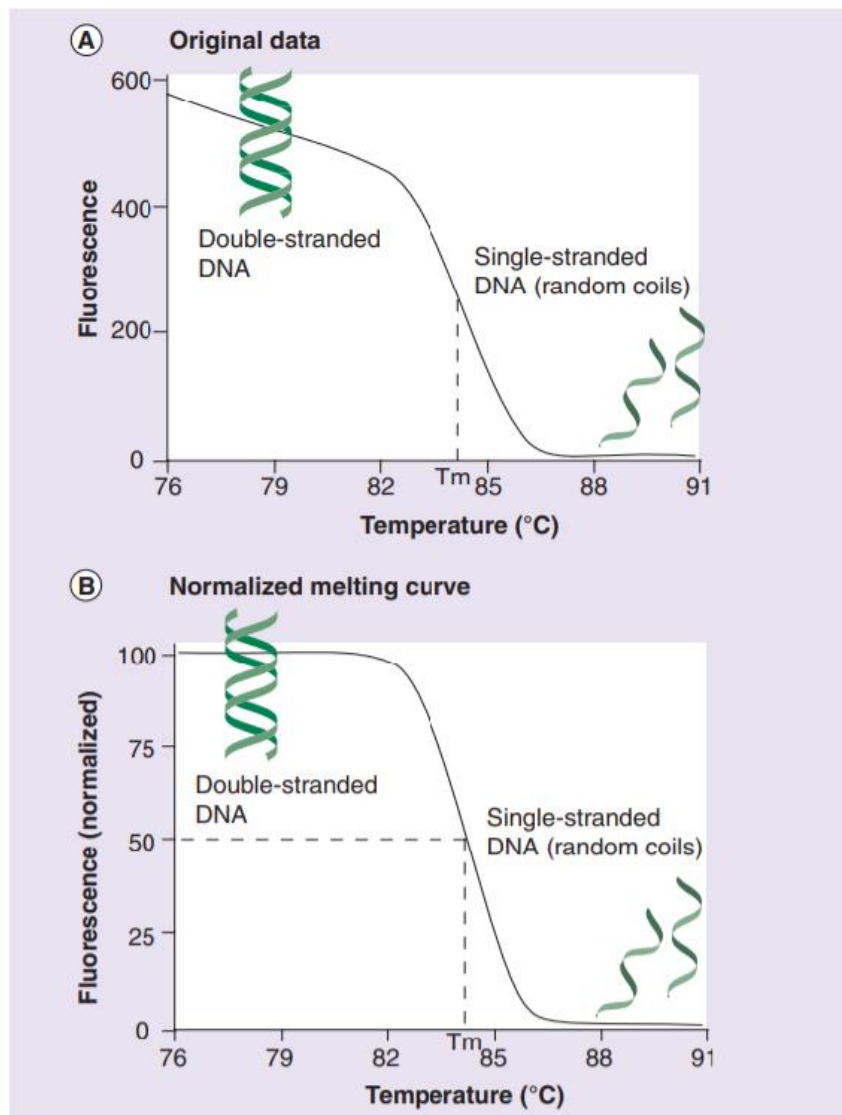
Πηγή εικόνας: <https://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-cls.pdf> (εγχειρίδιο χρήσης)

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της HRM είναι ότι μας δίνει την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την διαδικασία αυτή σε πραγματικό χρόνο, να γνωρίζουμε δηλαδή όχι μόνο ότι οι δύο κλώνοι έχουν διαχωριστεί αλλά και σε ποια ακριβώς θερμοκρασία συνέβη αυτό. Η ακριβής παρακολούθηση της διαδικασίας είναι δυνατή χάρη σε μια ειδική χρωστική που φθορίζει όταν προσδένεται στο δίκλωνο DNA, και σε ένα φωτόμετρο που διαθέτει το μηχάνημα και παρακολουθεί αυτό τον φθορισμό⁵³. Στην αρχή της διαδικασίας που η θερμοκρασία είναι

ακόμη χαμηλή και υπάρχει μεγάλη ποσότητα δίκλωνου DNA η χρωστική προσδέεται ισχυρά σε αυτό και ο φθορισμός είναι έντονος ενώ όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και οι κλώνοι του DNA στο δείγμα αποδιατάσσονται, η χρωστική απελευθερώνεται μέχρι τελικά όλα τα μόρια DNA να γίνουν μονόκλινα οπότε και δεν ανιχνεύεται καθόλου φθορισμός⁵⁴.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, ο ρυθμός μείωσης του φθορισμού είναι μεγαλύτερος κοντά στην θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος. Ως T_m ορίζεται η θερμοκρασία εκείνη στην οποία το 50% των μορίων του DNA στο δείγμα είναι σε δίκλινη μορφή ενώ το υπόλοιπο 50% σε μονόκλινη και είναι ίση με την θερμοκρασία στην οποία ο φθορισμός είναι κατά 50% χαμηλότερος από ό,τι κατά την έναρξη της τήξης. Η T_m και κατ' επέκταση η κλίση της καμπύλης τήξης εξαρτάται από την αλληλουχία του προϊόντος, την περιεκτικότητά του σε GC (είναι υψηλότερη σε προϊόντα που είναι πλούσια σε GC λόγω των περισσότερων δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται) και το μέγεθός του⁵².

Προκειμένου να προσδιοριστεί η καθαρότητα του δείγματος και η παρουσία διμερών στο προϊόν, είναι χρήσιμο να απεικονιστούν οι T_m όλων των μορίων DNA του δείγματος. Η θερμοκρασία τήξης του προϊόντος εμφανίζεται σαν κορυφή ενώ εάν υπάρχουν μη ειδικά προϊόντα θα δώσουν χαμηλότερες κορυφές που αναπαριστούν μικρότερη μεταβολή φθορισμού που οφείλεται σε παραπροϊόντα μικρότερου μήκους, που αποδιατάσσονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία⁵².



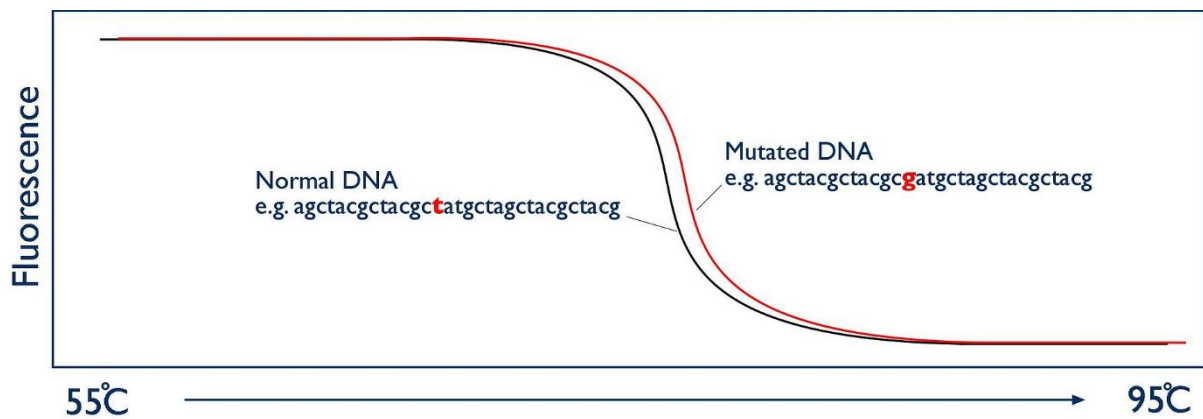
Εικόνα 7: Καμπύλη Τήξης.

A: Ο φθορισμός παρουσιάζει γραμμική μείωση όσο το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την θερμοκρασία τήξης ενώ ελαττώνεται απότομα όσο πλησιάζει στην T_m . Ο φθορισμός μετά την T_m είναι πολύ χαμηλός, λόγω της έλλειψης δίκλωνου DNA.

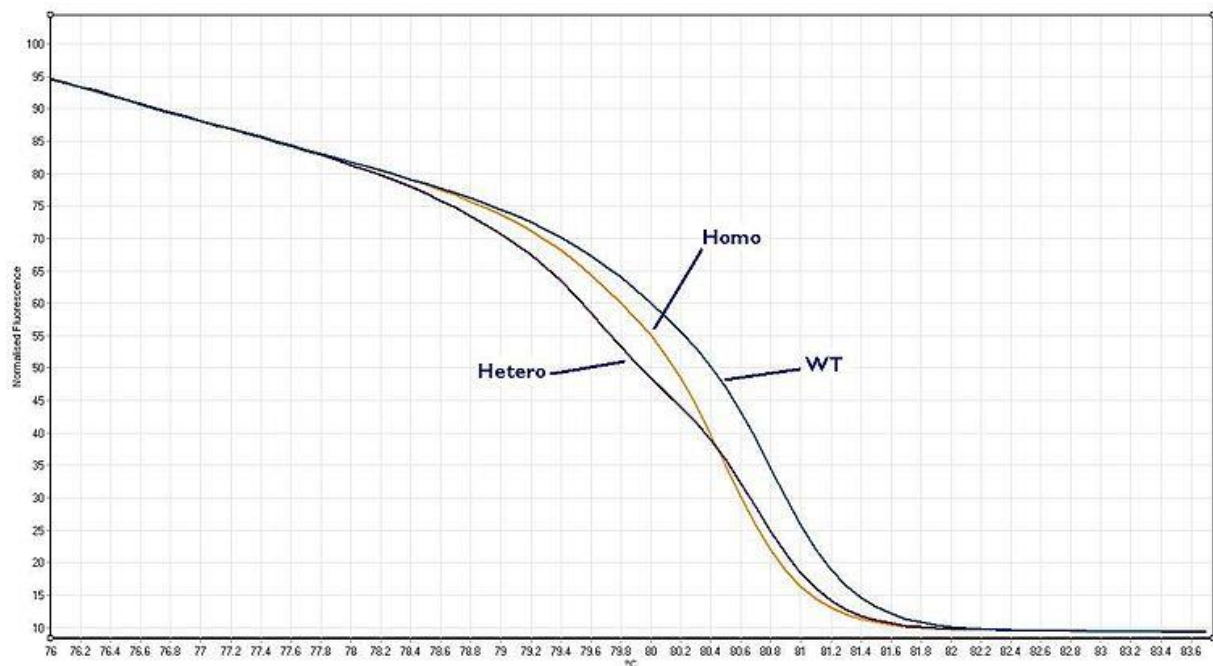
B: Τα δεδομένα παρουσιάζονται κανονικοποιημένα (ανάλογα με το ποσοστό φθορισμού που παρατηρείται σε κάθε θερμοκρασία) ξεκινώντας από το 100% του αρχικού φθορισμού σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου το DNA είναι σε δίκλωνη μορφή και καταλήγοντας στο 0% του αρχικού φθορισμού για υψηλότερες θερμοκρασίες (μεγαλύτερες της T_m) όταν πλέον το DNA σε όλα τα δείγματα είναι μονόκλωνο. Η T_m αντιπροσωπεύει το θερμοκρασιακό σημείο που το 50% του DNA είναι δίκλωνο και το 50% μονόκλωνο (δηλαδή την τιμή 50 στον άξονα του κανονικοποιημένου φθορισμού)

3.5.2. Σύγκριση Καμπυλών Τήξης

Ένα από τα πιο χρήσιμα χαρακτηριστικά της HRM είναι ότι δίνει την δυνατότητα να συγκρίνουμε τους γονοτύπους διαφορετικών ατόμων τόσο μεταξύ τους όσο και με μια πρότυπη καμπύλη. Οι καμπύλες τήξης δύο δειγμάτων που έχουν τη ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία θα εφάπτονται πλήρως ή μια της άλλης, ωστόσο εάν υπάρχει διαφορά ακόμη και σε ένα ζεύγος βάσεων, η θερμοκρασία και συνεπώς η καμπύλη τήξης θα αλλάξει όπως φαίνεται στην Εικόνα 8. Έτσι, διαφορετικοί γονότυποι δίνουν καμπύλες τήξης με διαφορετική κλίση και διαφορετικές T_m όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 ⁴⁹



Εικόνα 8: Διαχωρισμός των καμπυλών τήξης. Ακόμη και μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία μπορούν να προκαλέσουν διαφοροποίηση στην T_m μεταξύ δυο δειγμάτων. Πηγή εικόνας: <https://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-cls.pdf> (εγχειρίδιο χρήσης)



Εικόνα 9: Κανονικοποιημένος φθορισμός σε συνάρτηση με την θερμοκρασία σε δείγματα διαφορετικών γονοτύπων.

Homo: Ο γονότυπος φέρει τον πολυμορφισμό που εξετάζεται σε ομοζυγωτία. Hetero: Ο γονότυπος φέρει τον πολυμορφισμό που εξετάζεται σε ετεροζυγωτία. WT: Ο γονότυπος δεν φέρει καθόλου τον πολυμορφισμό που εξετάζεται. Παρατηρείται ότι οι τρεις καμπύλες διαφέρουν σημαντικά. Εκτός των διαφορετικών T_m έχουν και διαφορετικό σχήμα⁵⁵
 Πηγή εικόνας: <https://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-clis.pdf> (εγχειρίδιο χρήσης)

3.5.3. Εφαρμογές – Ανίχνευση Πολυμορφισμών

Το μήκος του προϊόντος είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της ανάλυσης HRM. Παρόλο που μεγάλου μήκους προϊόντα μπορούν να δώσουν ορισμένες φορές αξιόπιστα αποτελέσματα, όταν εξετάζονται μικρές αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία (SNPs, SNVs) τα μικρότερα προϊόντα φαίνεται να παρέχουν ακριβέστερα αποτελέσματα⁵². Οι πιθανότητες ύπαρξης και δεύτερου πολυμορφισμού στο δείγμα αυξάνονται ανάλογα με το μήκος της υπό εξέταση αλληλουχίας (σε περιπτώσεις που δεν είναι καταγεγραμμένοι όλοι οι πολυμορφισμοί του γονιδιώματος του είδους που μελετάται), από την άλλη εάν το μέγεθος της αλυσίδας είναι πολύ μικρό ελλοχεύει ο κίνδυνος ανεπαρκούς πρόσδεσης της χρωστικής και άρα ανακριβών αποτελεσμάτων⁵⁶. Έτσι, ο σχεδιασμός των εκκινητών πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να υπάρχει αφ' ενός ικανοποιητική πρόσδεση της χρωστικής και αφ' ετέρου να μειωθεί η πιθανότητα να υπάρχει και δεύτερος πολυμορφισμός εκτός της αλληλουχίας ενδιαφέροντος. Ιδανικά το τελικό προϊόν πρέπει να είναι από 80 έως 130bp⁵⁷.

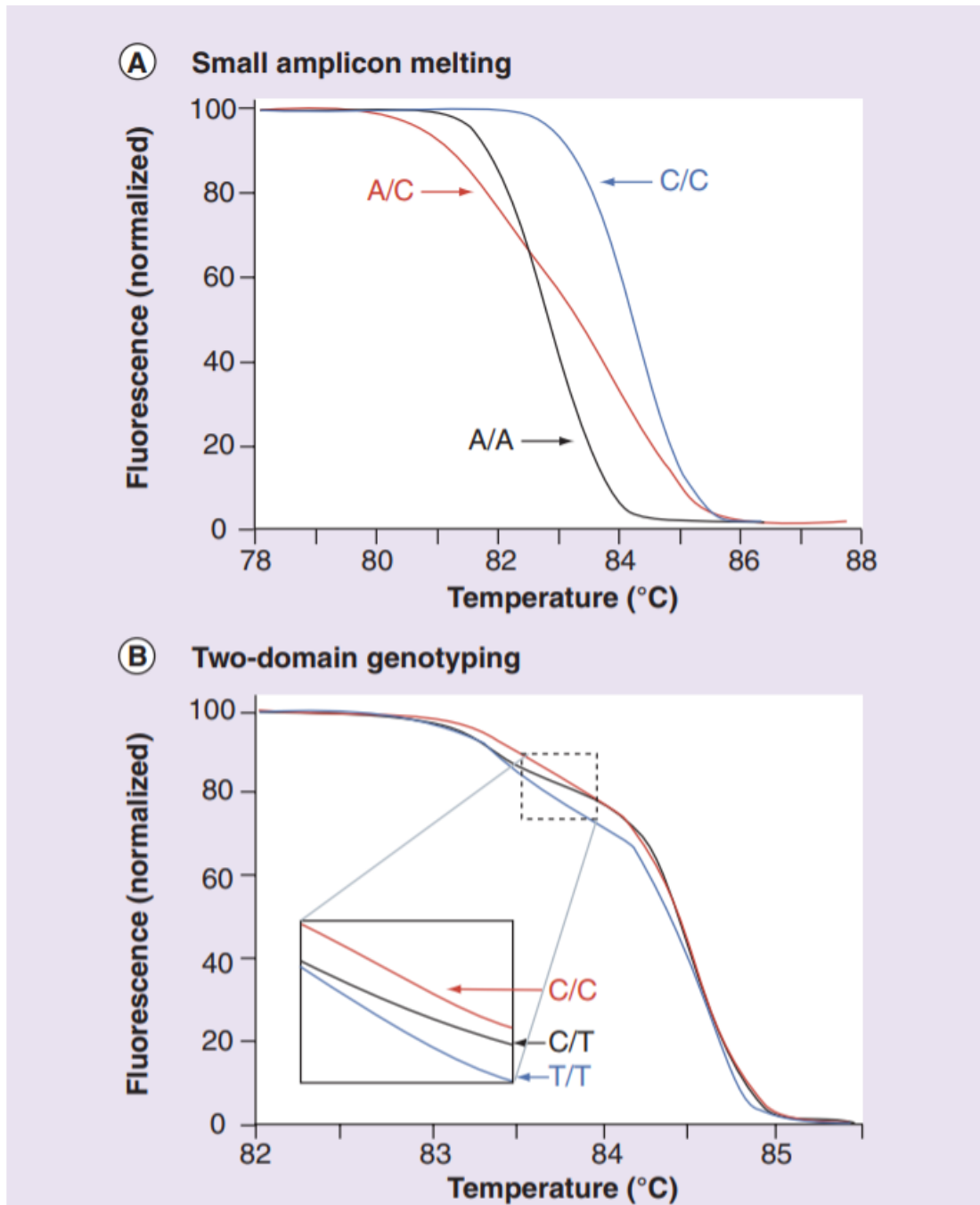
Στην Εικόνα 10 φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο το μήκος του προϊόντος μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση HRM. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα εξετάζεται μια σημειακή μετάλλαξη C>T. Στην πρώτη εικόνα όπου το προϊόν είναι μικρότερο, παρατηρείται σαφής διάκριση μεταξύ ομόζυγου, ετερόζυγου και άγριου τύπου, γεγονός που οφείλεται στην διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών τήξης των τριών δειγμάτων. Αντιθέτως στην δεύτερη εικόνα όπου το προϊόν είναι μεγαλύτερου μήκους, το κάθε δείγμα παρουσιάζει δύο θερμοκρασίες τήξης (μία για τον κάθε πολυμορφισμό που φέρει) ενώ οι κλώνοι διαχωρίζονται σε μεγαλύτερη θερμοκρασία. Επίσης, δεν είναι σαφής ο διαχωρισμός μεταξύ των τριών γονοτύπων στο τμήμα DNA που εξετάζεται αφού πλέον η θερμοκρασία τήξης και ο γονότυπος δεν εξαρτάται μόνο από έναν πολυμορφισμό. Το γεγονός ότι όσο μεγαλύτερο είναι το προϊόν αυξάνεται και η θερμοκρασία τήξης, πιθανώς οφείλεται αφ' ενός στην αυξημένη περιεκτικότητα του προϊόντος σε GC και αφ' ετέρου στην περισσότερη ενέργεια που χρειάζονται οι μεγαλύτεροι πλέον κλώνοι για να αποδιαταχθούν λόγω των περισσότερων δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν στο δείγμα ⁵⁶.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, η ανάλυση των καμπυλών τήξης (HRM Analysis) πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα Rotor-Gene Q της εταιρίας Qiagen και με τα αναλώσιμα που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρία. Τα δείγματα DNA και οι εκκινητές αραιώθηκαν ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ng/μl και 10pmole/μl αντίστοιχα.

Το DNA για μια επιτυχή ανάλυση δεν πρέπει να ξεπερνά τα 50ng συνολικά. Πιο αναλυτικά για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν:

- 12,5μl Master Mix 2x (Περιέχει HotStarTaq Plus DNA Polymerase, Χρωστική EvaGreen, Q-solution, dNTPs και MgCl₂)
- 1,75μl από τον κάθε εκκινητή
- 4μl RNase-free Water
- 5μl DNA (50 ng) από το κάθε δείγμα που επρόκειτο να αναλυθεί ή RNA-se free Water

Ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε στα 25μl σύμφωνα με το πρωτόκολλο.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο το μέγεθος του προϊόντος μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της ανάλυσης HRM.

A: Μικρότερα προϊόντα συνήθως περιέχουν έναν πολυμορφισμό και έτσι οι καμπύλες τήξης που αντιστοιχούν στον κάθε γονότυπο έχουν μια T_m

B: Μεγαλύτερα προϊόντα πιθανώς να περιέχουν και δεύτερο πολυμορφισμό, έτσι ή κάθε καμπύλη έχει δύο T_m που επηρεάζουν την ακρίβεια της ανάλυσης όταν δεν είναι γνωστά όλα τα SNPs του γονιδιώμα του είδους που εξετάζεται ⁵⁶

Οι ποσότητες αναλώσιμων πολλαπλασιάστηκαν ανάλογα με την ποσότητα των δειγμάτων ($n+1$ για αναλύσεις μέχρι και 15 δειγμάτων όπου $n=0$ αριθμός των δειγμάτων) και δημιουργήθηκε το μείγμα HRM. Η αντίδραση έγινε σε φιαλίδια χωρητικότητας 0,5ml όπου προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα μείγματος (20μl) και 5μl DNA. Για τον αρνητικό μάρτυρα αντί για DNA προστέθηκαν 5μl RNase-free Water στο αντίστοιχο φιαλίδιο.

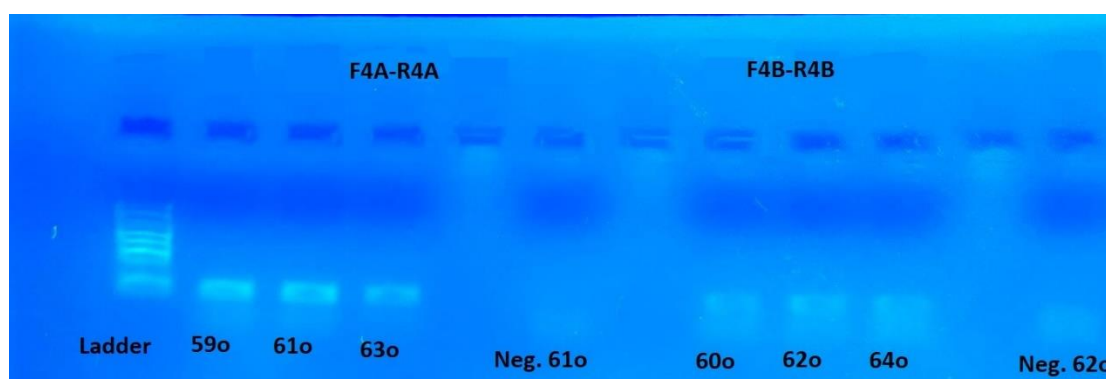
Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στιγμιαία στην μέγιστη ταχύτητα ώστε να κατακαθίσουν σταγονίδια που πιθανώς παρέμειναν στα τοιχώματα. Η αντίδραση έγινε ως ακολούθως και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας:

1. Η Real-Time PCR (που προηγήθηκε της HRM) ξεκίνησε με την ενεργοποίηση της πολυμεράσης που περιέχεται στο Master Mix, με θέρμανση για 5min στους 95°C. Η συγκεκριμένη πολυμεράση είναι ανενεργή σε θερμοκρασία δωματίου κάτι που κάνει την προετοιμασία ευκολότερη και εμποδίζει τον σχηματισμό διμερών. Στην συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 40 κύκλους qPCR. Το πρώτο βήμα του κάθε κύκλου ρυθμίστηκε στους 95°C για 10 sec ώστε να αποδιαταχθούν οι δύο κλώνι του DNA ενώ το δεύτερο στους 55°C για 30 sec ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA (υβριδισμός).
2. Εφόσον το DNA πολλαπλασιάστηκε επαρκώς, ακολούθησε η ανάλυση HRM. Προκειμένου να βρεθεί η θερμοκρασία τήξης (T_m) του προϊόντος πρώτα ορίστηκε ένα εύρος θερμοκρασιών που περιλαμβάνει εκείνη στην οποία οι δύο κλώνι του DNA διαχωρίζονται. Η T_m θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ της βέλτιστης θερμοκρασίας των εκκινητών (βλ. παραπάνω) και της μέγιστης θερμοκρασίας τήξης. Έτσι το δείγμα υποβλήθηκε σε θέρμανση ξεκινώντας από τους 65°C και καταλήγοντας στους 95°C, με διαδοχική αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,1°C κάθε 2 sec. Αφού ρυθμίστηκαν όλες οι παράμετροι και ολοκληρώθηκε η διαδικασία της HRM ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων.

3.6. Αποτελέσματα

3.6.1. Επιλογή Εκκινητών

Για να επιλεγεί το ζεύγος εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί στην qPCR (που προηγείται της HRM) για την γονοτύπηση των 33 ασθενών με ψωρίαση που έλαβαν αγωγή με απρεμιλάστη, σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών, τα F4A-R4A και F4B-R4B. Πραγματοποιήθηκε PCR για το κάθε ζεύγος σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και το τελικό προϊόν διαχωρίστηκε βάσει μεγέθους σε πήκτωμα αγαρόζης. Το μέγεθος των προϊόντων προσδιορίστηκε με την βοήθεια δείκτη μεγέθους βάσεων (Ladder) όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Τελικά επιλέχθηκε εκείνο που πολλαπλασιάζει το DNA με μεγαλύτερη επιτυχία, δηλαδή το ζεύγος F4A-R4A.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για επιλογή ζεύγους εκκινητών σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% v/w. Με την PCR κλίσης θερμοκρασίας φάνηκε ότι το ζεύγος με την μεγαλύτερη απόδοση είναι το F4A-R4A

3.6.2. Ανάλυση HRM

3.6.2.1. Απομόνωση Γονιδιωματικού DNA

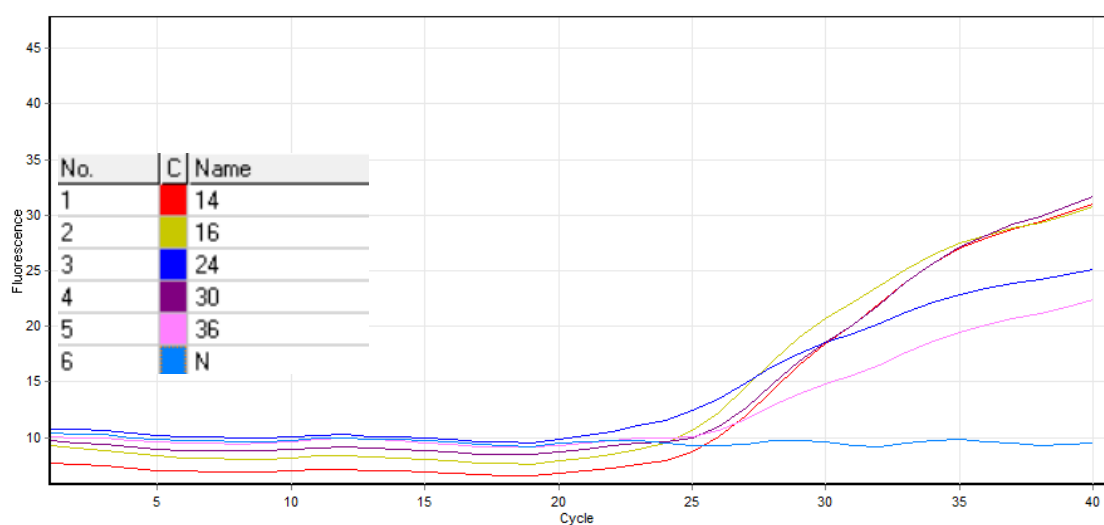
Αρχικά απομονώθηκε DNA από δείγματα αίματος το οποίο στην συνέχεια ποσοτικοποιήθηκε με φωτομέτρηση. Η συγκέντρωση DNA όλων των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα 2. Επειδή η ανάλυση HRM απαιτεί συγκεκριμένη ποσότητα DNA (50ng), το DNA που προέκυψε από την απομόνωση αραιώθηκε ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10ng/μl και να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα από κάθε δείγμα (5μl) στην αντίδραση.

Πίνακας 2: Οι αρχικές συγκεντρώσεις DNA των δειγμάτων που γονοτυπήθηκαν

| Κωδικός Δείγματος | Αρχική Συγκέντρωση DNA (ng/μl) |
|--------------------------|---|
| Apr1 | 158,1 |
| Apr2 | 117,6 |
| Apr4 | 34,1 |
| Apr6 | 70 |
| Apr7 | 26,3 |
| Apr9 | 23,2 |
| Apr10 | 64,1 |
| Apr11 | 26,2 |
| Apr13 | 46,4 |
| Apr14 | 25,1 |
| Apr15 | 44 |
| Apr16 | 44,2 |
| Apr17 | 13,6 |
| Apr18 | 53,7 |
| Apr19 | 35,9 |
| Apr20 | 233,5 |
| Apr21 | 21,1 |
| Apr23 | 28,8 |
| Apr24 | 27,2 |
| Apr25 | 70,8 |
| Apr26 | 77,8 |
| Apr27 | 76,4 |
| Apr29 | 70,8 |
| Apr30 | 76,5 |
| Apr31 | 76,5 |
| Apr33 | 18,8 |
| Apr34 | 68,4 |
| Apr36 | 65,6 |
| Apr37 | 65,6 |
| Apr38 | 13,2 |
| Cos2 | 176,7 |
| Cos10 | 69,3 |
| Cos23 | 43,3 |

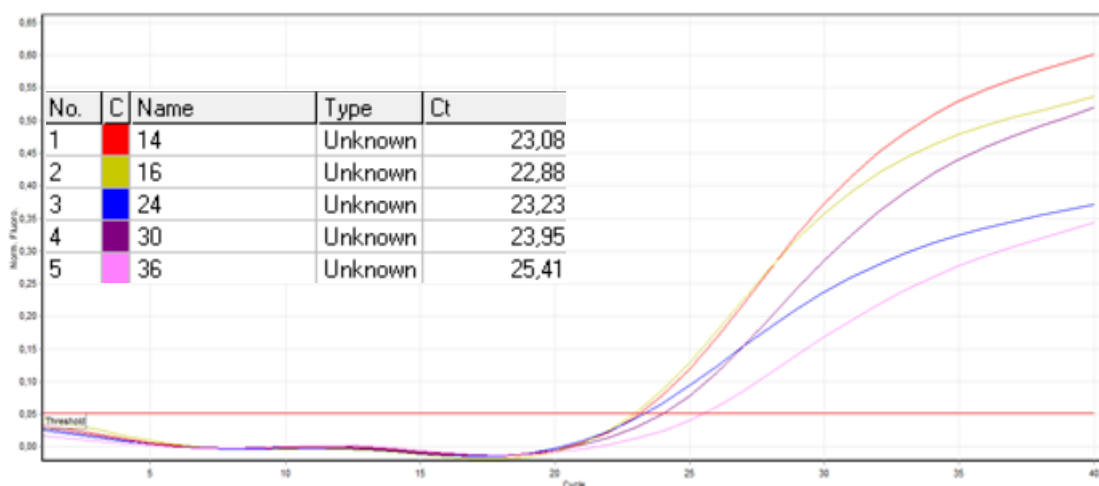
3.6.2.2. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre14, Apre16, Apre24, Apre30 και Apre37

Μετά την αραίωση των δειγμάτων ακολούθησε η qPCR και η ανάλυση HRM για τα δείγματα Apre14, Apre16, Apre24, Apre30, Apre36. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12 ο αρνητικός μάρτυρας (μπλε γραμμή) δεν παράγει φθορισμό, συνεπώς δεν υπάρχει επιμόλυνση των δειγμάτων και έτσι ακολουθεί η ανάλυση των δεδομένων. Η καμπύλη που αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα αφαιρέθηκε από τα υπόλοιπα διαγράμματα για λόγους ευκρίνειας.



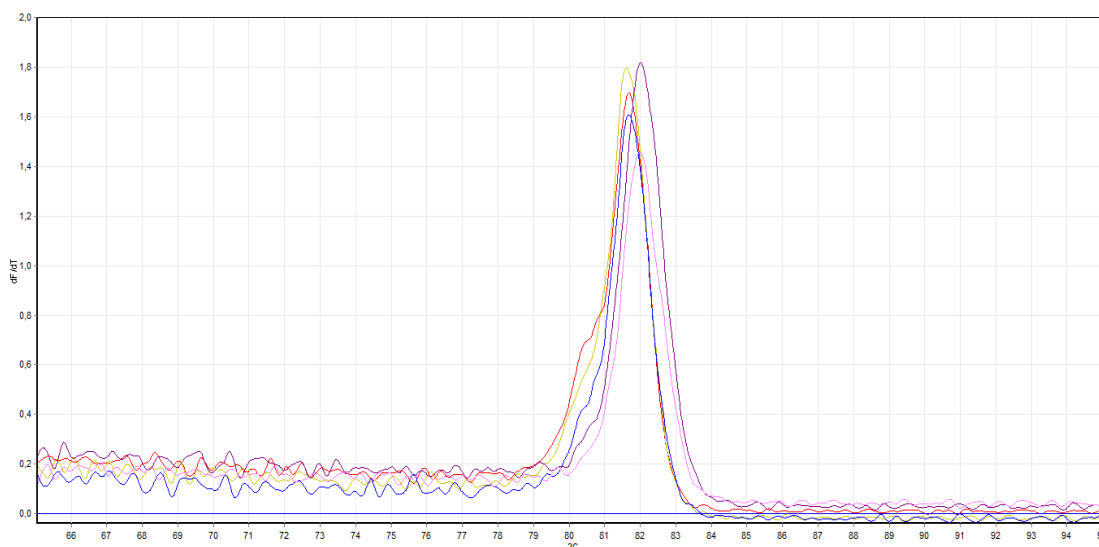
Εικόνα 12: Αποτελέσματα ανάλυσης qPCR. Τα αποτελέσματα αξιολογούνται βάσει του φθορισμού ανά κύκλο αντίδρασης.

Είναι σημαντικό όλα τα δείγματα να έχουν ίση ποσότητα DNA ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Αυτό ελέγχεται από τον κύκλο της PCR που αρχίζει ο εκθετικός πολλαπλασιασμός για το κάθε δείγμα. Στην Εικόνα 13 φαίνεται ότι, θέτοντας το κατώφλι (Threshold, κόκκινη γραμμή) στο κατώτατο σημείο μεταβολής του κανονικοποιημένου φθορισμού, όλα τα δείγματα ξεπερνούν το όριο του φθορισμού υποβάθρου (Background Fluorescence) με διαφορά λιγότερη από τρεις κύκλους που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο.



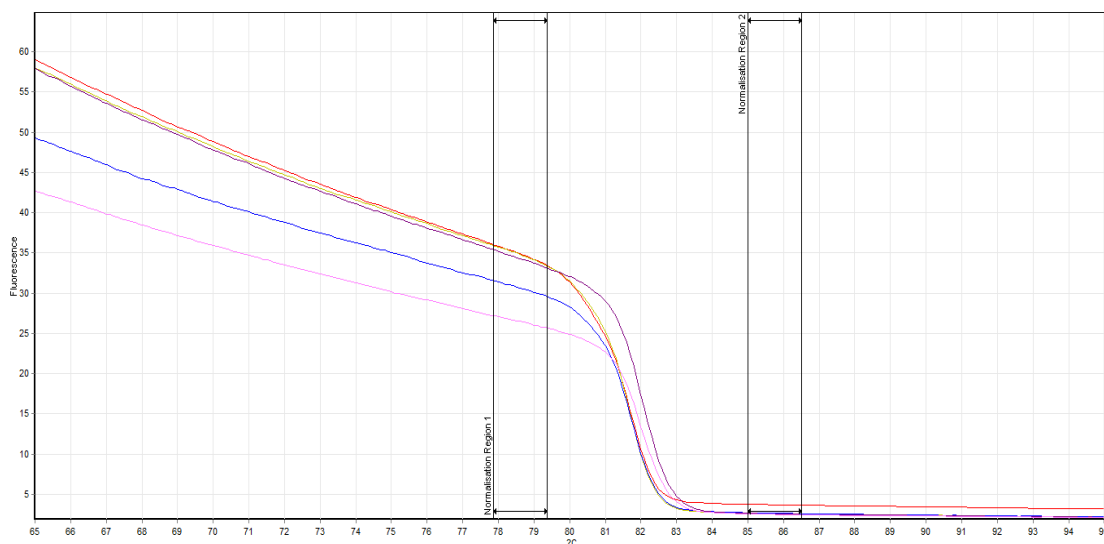
Εικόνα 13: Έλεγχος του κύκλου PCR όπου το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού.

Από την Εικόνα 14 από τις κορυφές των καμπυλών φαίνεται ότι για τα συγκεκριμένα δείγματα, ο φθορισμός εμφανίζει την μέγιστη μεταβολή (dF/dT , όπου dF είναι η μεταβολή φθορισμού και dT η μεταβολή του χρόνου) της τάξεως των 1,4-1,8 μονάδων ανάμεσα στις θερμοκρασίες 81,5°-82,5°C. Σε αυτή την περιοχή φαίνεται πως βρίσκονται και οι T_m των προϊόντων. Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης ότι δεν υπάρχουν παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών τα οποία θα έδιναν χαμηλότερες κορυφές που υποδηλώνουν μικρότερη μεταβολή φθορισμού σε θερμοκρασίες μικρότερες της T_m του αντίστοιχου προϊόντος.



Εικόνα 14: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apre14, Apre16, Apre24, Apre30 και Apre36. Εξετάζεται η μεταβολή του φθορισμού σε σχέση με την θερμοκρασία της αντίδρασης.

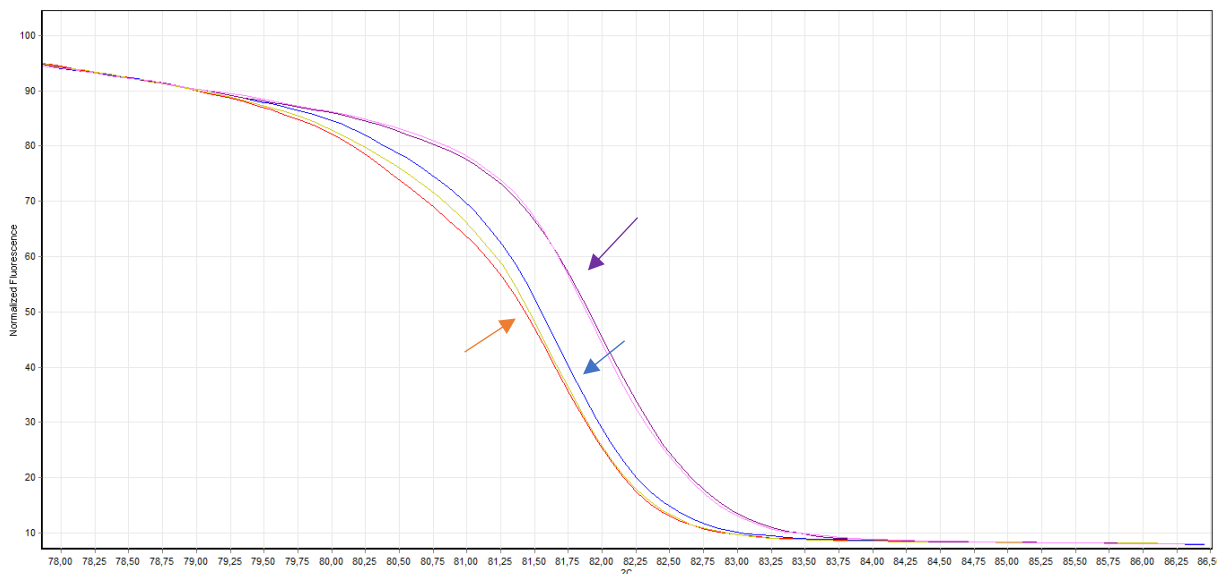
Στην Εικόνα 15 διακρίνεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) του κάθε δείγματος και εξάγονται τα πρώτα συμπεράσματα για την γονοτυπική ομοιότητα μεταξύ τους. Από τους 66°C μέχρι και τους 79°C τα επίπεδα φθορισμού όλων των δειγμάτων μειώνονται σταδιακά, από τους 79°C μέχρι και τους 83°C η μείωση των επιπέδων φθορισμού είναι μεγαλύτερη ενώ μετά τους 83°C όλα τα μόρια DNA στα δείγματα είναι μονόκλινα γι' αυτό και δεν ανιχνεύεται καθόλου φθορισμός. Η περιοχή ανάμεσα στους κέρσορες περιλαμβάνει τις θερμοκρασίες τήξης όλων των δειγμάτων, τις θερμοκρασίες δηλαδή όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων φθορισμού. Αυτή η περιοχή θερμοκρασιών θα μελετηθεί πιο λεπτομερώς στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης για να εξεταστεί ο κανονικοποιημένος φθορισμός όλων των δειγμάτων σε σχέση με την θερμοκρασία, δηλαδή ο θερμοκρασία όπου ο φθορισμός του κάθε δείγματος μειώνεται στο 50% του αρχικού φθορισμού.



Εικόνα 15: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre14, Apre16, Apre24, Apre30 και Apre36. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Από την Εικόνα 16 φαίνεται ότι τα δείγματα της συγκεκριμένης ανάλυσης μπορούν να χωριστούν σε 3 ομάδες βάσει των καμπυλών τήξης που προκύπτουν. Οι καμπύλες των δειγμάτων 30 και 36 (μωβ βέλος) σχεδόν εφάπτονται η μια της άλλης και η θερμοκρασία που αντιστοιχεί στην τιμή 50 κανονικοποιημένου φθορισμού (και αντιπροσωπεύει την τιμή θερμοκρασίας όπου το 50% των μορίων DNA είναι μονόκλινα και το 50% δίκλινα, δηλαδή την T_m) είναι η ίδια ενώ τα 14 και 16 (κόκκινο βέλος) εμφανίζουν παρεμφερείς καμπύλες τήξης με μια μικρή

διαφορά στις θερμοκρασίες που αντιστοιχούν στην τιμή 50 του κανονικοποιημένου φθορισμού και συνεπάγονται δύο διαφορετικές T_m μεταξύ $81,3^{\circ}$ - $81,5^{\circ}$ C. Η καμπύλη του δείγματος 24 (μπλε βέλος) αν και εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τις δύο προηγούμενες (14 και 16) δεν έχει την ίδια T_m με αυτές. Για περαιτέρω έλεγχο της γονοτυπικής ομοιότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονοτύπων τους βάσει του λογισμικού.



Εικόνα 16: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apr14, Apr16, Apr24, Apr30, Apr36. Αναπαριστάται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 95% στο 10%

Τα δείγματα DNA συγκρίνονται και ομαδοποιούνται βάσει γονοτυπικής ομοιότητας. Το λογισμικό εξετάζει την ομοιότητα αυτή βάσει των θερμοκρασιών τήξης όλων των δειγμάτων και ομαδοποιεί εκείνα που εμφανίζουν τιμή εμπιστοσύνης, δηλαδή πιθανότητα τα δείγματα αυτά να έχουν όμοιο γονότυπο ως προς SNP εξετάζεται (rs2229228, C>T) στο γονίδιο *PDE4C* τουλάχιστον 90% (Confidence % \geq 90).

Στην Εικόνα 17 φαίνεται ότι ονομάζοντας (π.χ. ως wt) ένα από τα δείγματα ως πρότυπο συγκεκριμένου γονοτύπου, στην προκειμένη περίπτωση το δείγμα 16, αυτό παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με το 14 (με τιμή εμπιστοσύνης 93,16%) οπότε τα δύο δείγματα προέρχονται από άτομα με όμοιο γονότυπο ως προς το SNP που εξετάζεται. Με ανάλογο τρόπο ομαδοποιήθηκαν και τα δείγματα 30 και 36 τα οποία κατά 97,97% έχουν όμοιο γονότυπο. Το δείγμα 24 δεν φαίνεται να έχει ομοιότητα με καμία από τις παραπάνω ομάδες.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 14 | | wt | 93,26 |
| 2 | 16 | | wt | 100,00 |
| 3 | 24 | | Variation | 77,67 |
| 4 | 30 | | Variation | 0,58 |
| 5 | 36 | | Variation | 0,66 |

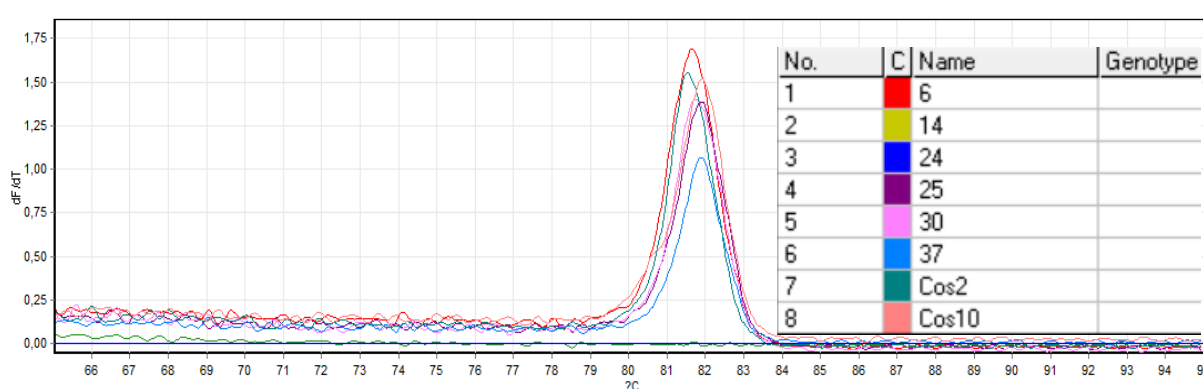
| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 14 | | Variation | 0,25 |
| 2 | 16 | | Variation | 0,58 |
| 3 | 24 | | Variation | 3,83 |
| 4 | 30 | | ht | 100,00 |
| 5 | 36 | | ht | 97,97 |

Εικόνα17: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apr14, Apr16, Apr24, Apr30 και Apr36. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα

3.6.2.3. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apr6, Apr14, Apr24, Apr25, Apr30, Apr37, Cos2, Cos10

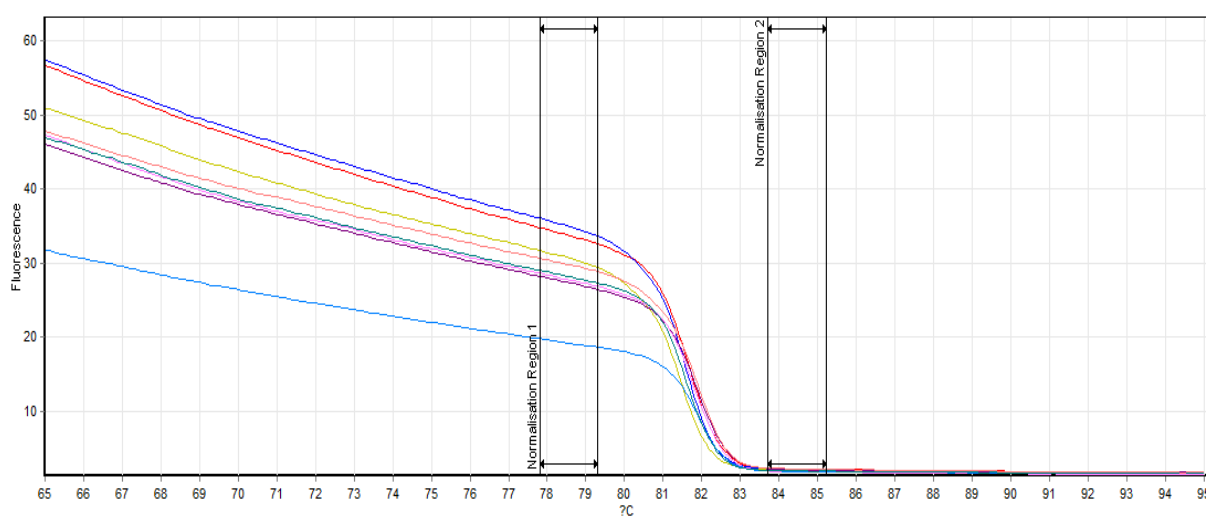
Αρχικά όλα τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα με βάση τις αρχικές τους συγκεντρώσεις (Πίνακας 2). Στη συνέχεια ακολούθησε qPCR και ανάλυση HRM για τα δείγματα Apr6, Apr14, Apr24, Apr25, Apr30, Apr37, Cos2 και Cos10.

Στην Εικόνα 18 φαίνεται ότι για τα συγκεκριμένα δείγματα, ο φθορισμός εμφανίζει την μέγιστη μεταβολή (dF/dT) της τάξεως των 1,1-1,6 μονάδων ανάμεσα στις θερμοκρασίες 81,5°-82,5°C. Ανάμεσα στις θερμοκρασίες αυτές βρίσκονται και οι Tm των προϊόντων ενώ δεν υπάρχουν παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών.



Εικόνα 18: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apr6, Apr14, Apr24, Apr25, Apr30, Apr37, Cos2 και Cos10.

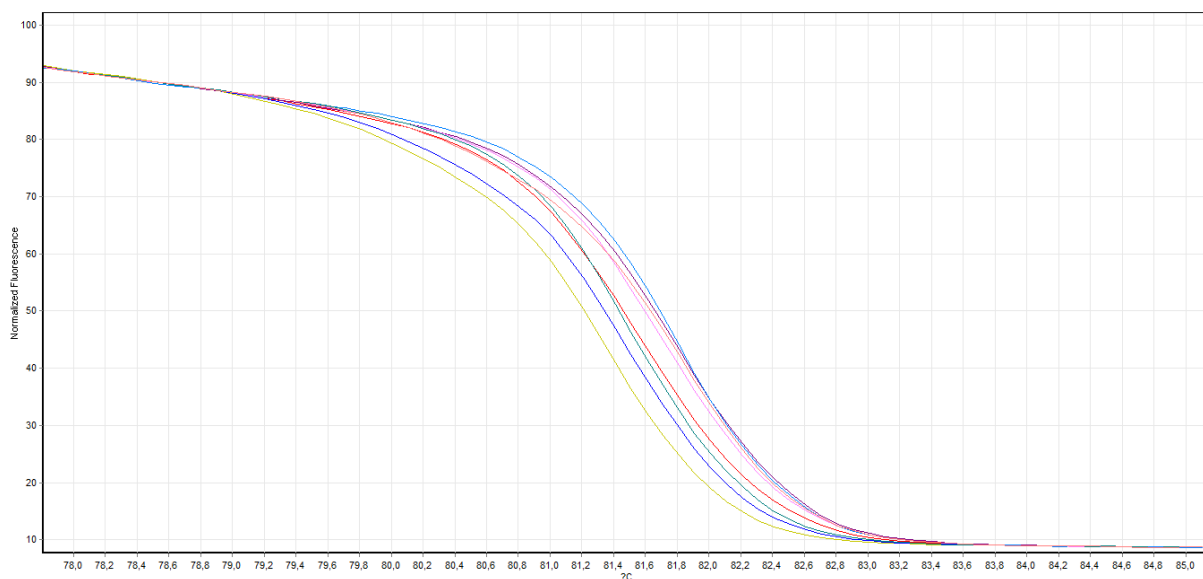
Στην Εικόνα 19 διακρίνεται η θερμοκρασία τήξης που αντιστοιχεί στο κάθε δείγμα. Η περιοχή που περικλείεται από τους κέρσορες περιλαμβάνει τις Tm όλων των δειγμάτων και είναι η περιοχή θερμοκρασιών που θα μελετηθεί πιο λεπτομερώς στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης.



Εικόνα 19: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre6, Apre14, Apre24, Apre25, Apre30, Apre37, Cos2, Cos10. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Στην Εικόνα 20 φαίνεται ότι το κάθε δείγμα έχει διαφορετική T_m μεταξύ $81,2^{\circ}\text{C}$ και $81,8^{\circ}\text{C}$. Κάποιες από τις καμπύλες τήξης έχουν ίδια κλίση και διαφορετικές T_m , φαίνεται λοιπόν ότι έχουν όμοιους γονοτύπους ως προς το SNP που εξετάζεται ενώ κάποιες άλλες με διαφορετική κλίση προέρχονται από δείγματα με διαφορετικούς γονοτύπους.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 για την γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκαν άγνωστα δείγματα (Apre 24, Apre25, Apre37, Cos2, Cos10) αλλά και δείγματα που από προηγούμενη ανάλυση έχουν ομαδοποιηθεί με άλλα (Apre 14 που έχει ομαδοποιηθεί με το 16 και Apre 30 που έχει ομαδοποιηθεί με το 36). Αυτό γίνεται για εξοικονόμηση αναλώσιμων, DNA και χρόνου. Από την Εικόνα 21 φαίνεται ότι τα δείγματα 6 και Cos2 κατά 94,06% έχουν όμοιο γονότυπο, τα 25, 30, 37 και Cos10 είναι όμοια με τιμή εμπιστοσύνης >92% ενώ τα 14 και 24 δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν με κανένα από τα παραπάνω παρόλο που κατά 68,07% έχουν όμοιο γονότυπο μεταξύ τους. Τα δείγματα DNA ομαδοποιούνται ανάλογα με την γονοτυπική τους ομοιότητα με το δείγμα-πρότυπο της κάθε ομάδας. Το κατά πόσο δύο ή περισσότερα δείγματα έχουν όμοιο γονότυπο εξαρτάται από τις θερμοκρασίες τήξης τους.



Εικόνα 20: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre6, Apre14, Apre24, Apre25, Apre30, Apre37, Cos2, Cos10. Αναπαριστάται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 92% στο 10%

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 6 | 6 | aa | 100,00 |
| 2 | 14 | 14 | Variation | 18,84 |
| 3 | 24 | 24 | Variation | 62,53 |
| 4 | 25 | 25 | Variation | 45,35 |
| 5 | 30 | 30 | Variation | 67,44 |
| 6 | 37 | 37 | Variation | 34,64 |
| 7 | Cos2 | Cos2 | aa | 94,06 |
| 8 | Cos10 | Cos10 | Variation | 61,19 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 6 | 6 | Variation | 45,35 |
| 2 | 14 | 14 | Variation | 0,96 |
| 3 | 24 | 24 | Variation | 9,12 |
| 4 | 25 | 25 | ab | 100,00 |
| 5 | 30 | 30 | ab | 92,57 |
| 6 | 37 | 37 | ab | 95,90 |
| 7 | Cos2 | Cos2 | Variation | 32,59 |
| 8 | Cos10 | Cos10 | ab | 92,90 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 6 | 6 | Variation | 62,53 |
| 2 | 14 | 14 | Variation | 68,07 |
| 3 | 24 | 24 | ac | 100,00 |
| 4 | 25 | 25 | Variation | 9,12 |
| 5 | 30 | 30 | Variation | 18,74 |
| 6 | 37 | 37 | Variation | 5,68 |
| 7 | Cos2 | Cos2 | Variation | 67,35 |
| 8 | Cos10 | Cos10 | Variation | 17,24 |

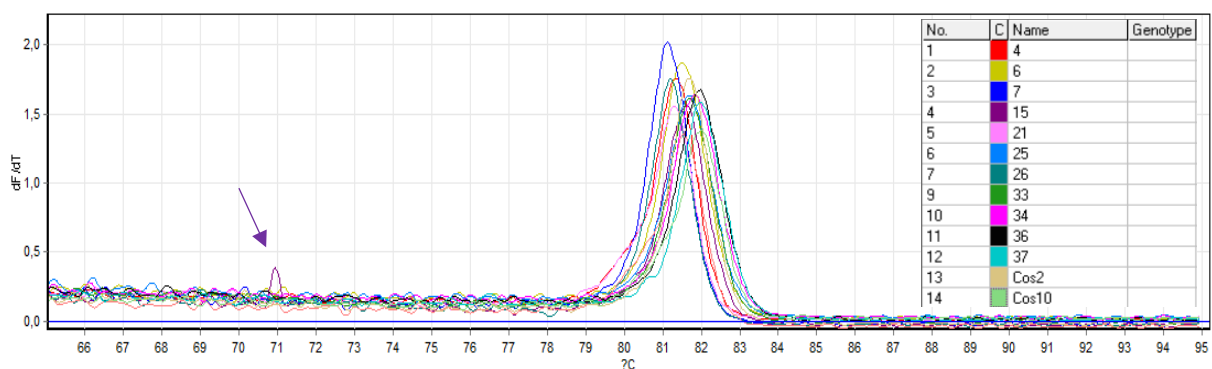
| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 6 | 6 | Variation | 18,84 |
| 2 | 14 | 14 | ad | 100,00 |
| 3 | 24 | 24 | Variation | 68,07 |
| 4 | 25 | 25 | Variation | 0,96 |
| 5 | 30 | 30 | Variation | 2,64 |
| 6 | 37 | 37 | Variation | 0,49 |
| 7 | Cos2 | Cos2 | Variation | 22,67 |
| 8 | Cos10 | Cos10 | Variation | 2,43 |

Εικόνα 21: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apre6, Apre14, Apre24, Apre25, Apre30, Apre37, Cos2, Cos10. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα

3.6.2.4. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2, Cos10

Για τη γονοτύπηση των δειγμάτων Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2 και Cos10 προηγήθηκε αραίωσή τους (η αρχική συγκέντρωση φαίνεται στον Πίνακα 2), και πολλαπλασιασμός του DNA με qPCR.

Στην Εικόνα 22 φαίνεται ότι η μέγιστη μεταβολή φθορισμού (από 1,6 έως 2 μονάδες) για όλα τα δείγματα συμβαίνει ανάμεσα στις θερμοκρασίες 81°C και 82°C που σημαίνει ότι οι T_m όλων των προϊόντων της ανάλυσης βρίσκονται σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών. Παρατηρείται ακόμη μια κορυφή του δείγματος 7 στους 71°C που αντιστοιχεί σε προϊόν μικρότερου μεγέθους καθώς η μεταβολή φθορισμού για την θερμοκρασία αυτή είναι σημαντικά χαμηλότερη (<0,5 μονάδα). Πιθανώς να πρόκειται για διμερή των εκκινητών καθώς η κορυφή είναι πολύ μικρή για να αντιστοιχεί σε DNA.

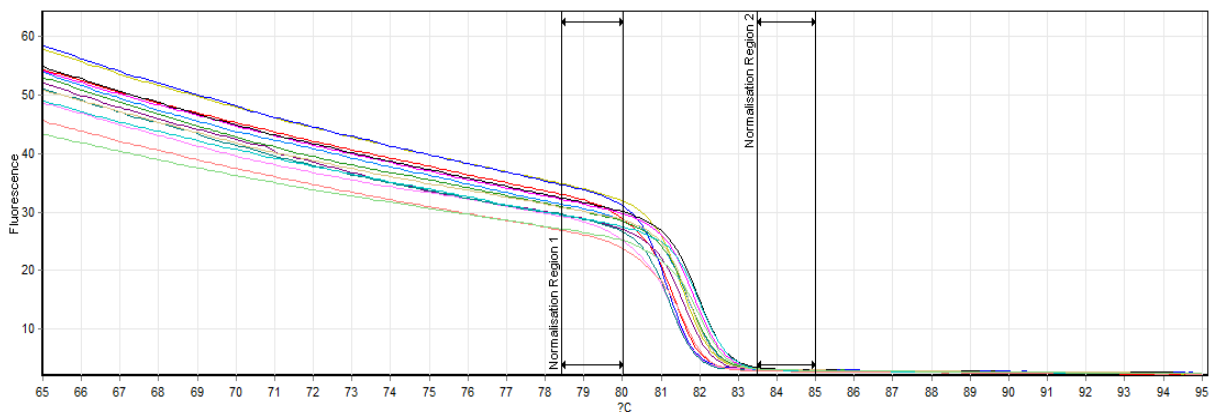


Εικόνα 22: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2, Cos10.

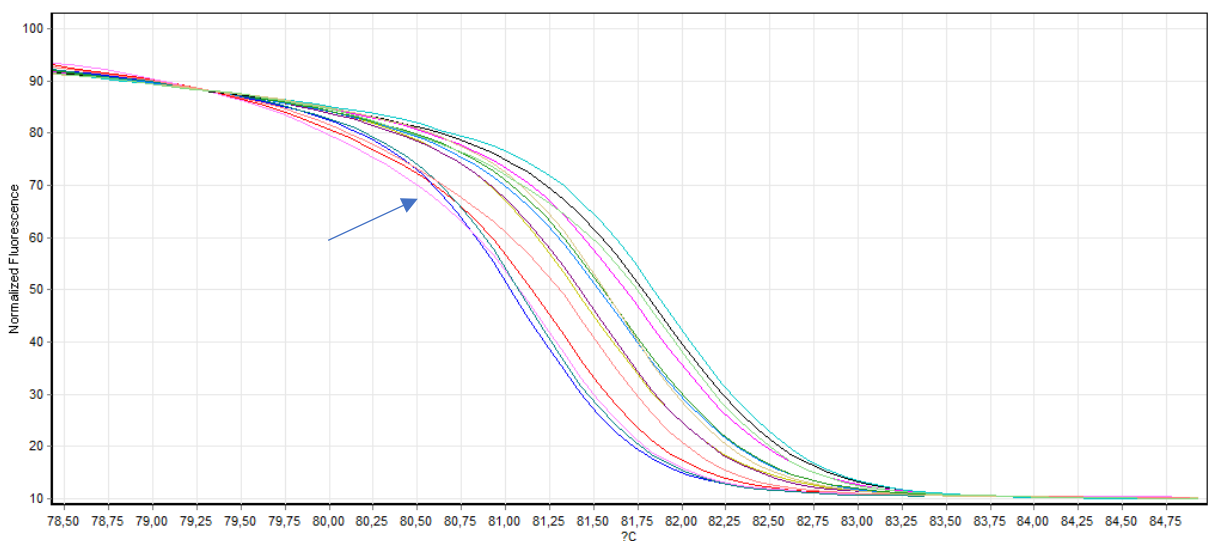
Στην Εικόνα 23 φαίνονται οι T_m όλων των δειγμάτων. Η περιοχή ανάμεσα στους κέρσορες περιλαμβάνει τις T_m όλων των δειγμάτων και θα μελετηθεί αναλυτικότερα στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης.

Στην Εικόνα 24 παρατηρείται ότι το κάθε δείγμα έχει διαφορετική T_m μεταξύ 81°C και 81,8°C. Οι καμπύλες τήξης των δειγμάτων διαφέρουν ως προς την κλίση και το σχήμα τους ενώ ορισμένες φαίνεται να τέμνονται μεταξύ τους. Αυτό υποδηλώνει ότι ορισμένα από τα

δείγματα της ανάλυσης είναι ομόζυγα και κάποια άλλα ετερόζυγα ως προς το SNP που εξετάζεται.



Εικόνα 23: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2, Cos10. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία



Εικόνα 24: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2, Cos10. Αναπαριστάται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 92% στο 10%.

Τα δείγματα DNA συγκρίνονται μεταξύ τους και ομαδοποιούνται. Η ομαδοποίηση γίνεται με βάση τις T_m τους, οι οποίες καθορίζονται από τον γονότυπο του κάθε δείγματος.

Στην Εικόνα 25 φαίνεται η ομαδοποίηση των δειγμάτων σε 5 υποομάδες:

Τα 6 και 15 κατά 98,89% έχουν όμοιο γονότυπο και αποτελούν την πρώτη υποομάδα. Τα 7 και 15 είναι όμοια κατά 95,09% (δεύτερη υποομάδα), τα 25 και Cos2 έχουν τιμή εμπιστοσύνης 92,8% και αποτελούν την τρίτη υποομάδα, τα 34 και Cos10 προέρχονται από άτομα με όμοιο γονότυπο ως προς το SNP που εξετάζεται κατά 93,1% και αποτελούν την τέταρτη υποομάδα ενώ τα 36 και 37 αποτελούν την πέμπτη και τελευταία υποομάδα του συγκεκριμένου πειράματος. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι το 36 φαίνεται να έχει ομοιότητα κατά 89,98% με το Cos10 και μια σημαντική τιμή εμπιστοσύνης (της τάξης του 81,94%) με το συγγενικό προς αυτό (βλ παραπάνω) 34 ωστόσο σύμφωνα με το λογισμικό τα δείγματα αυτά δεν μπορούν να θεωρηθούν όμοια μεταξύ τους. Τέλος τα δείγματα 4 και 21, αν και δεν μπορούν να θεωρηθούν γονοτυπικά όμοια, εμφανίζουν τιμή εμπιστοσύνης 86,43%.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | aa | 100,00 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 17,46 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 68,78 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 14,93 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 86,43 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 2,81 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 80,97 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 63,76 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 1,74 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 0,13 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 0,01 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 0,00 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 1,40 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 0,06 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 17,46 |
| 2 | 6 | 6 | ab | 100,00 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 3,23 |
| 4 | 15 | 15 | ab | 98,89 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 5,61 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 68,71 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 6,51 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 58,64 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 58,96 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 17,66 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 4,57 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 1,38 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 56,21 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 10,66 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 68,78 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 3,23 |
| 3 | 7 | 7 | ac | 100,00 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 2,49 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 85,75 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 0,27 |
| 7 | 26 | 26 | ac | 95,09 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 20,79 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 0,15 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 0,01 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 0,00 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 0,00 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 0,11 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 0,00 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 2,81 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 68,71 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,27 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 73,71 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 0,61 |
| 6 | 25 | 25 | ad | 100,00 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 0,66 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 20,63 |
| 9 | 33 | 33 | ad | 98,15 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 60,29 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 26,48 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 11,69 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | ad | 92,80 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 44,66 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 63,76 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 58,64 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 20,79 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 55,53 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 34,73 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 20,63 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 31,16 |
| 8 | 31 | 31 | ae | 100,00 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 14,93 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 2,29 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 0,36 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 0,08 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 12,87 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 1,31 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 0,13 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 17,66 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,01 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 20,44 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 0,02 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 60,29 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 0,02 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 2,29 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 69,41 |
| 10 | 34 | 34 | af | 100,00 |
| 11 | 36 | 36 | Variation | 81,94 |
| 12 | 37 | 37 | Variation | 56,45 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 64,01 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | af | 93,10 |

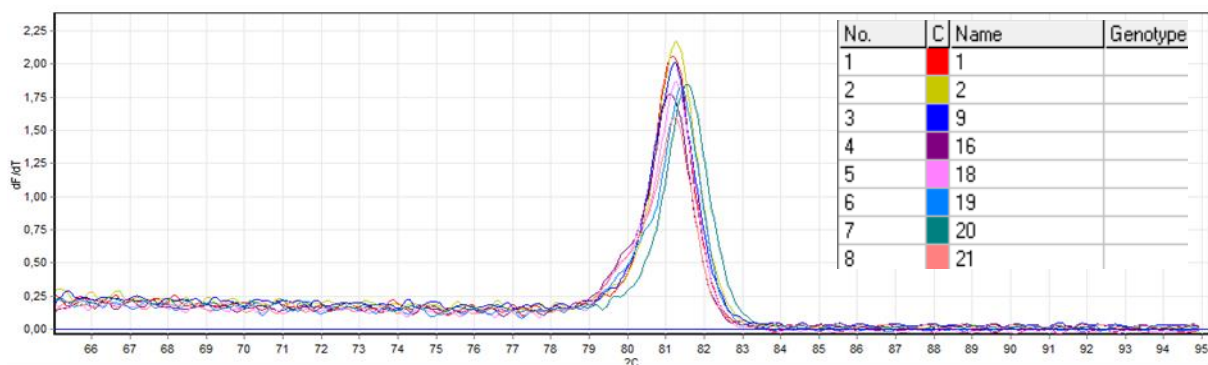
| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 4 | 4 | Variation | 0,01 |
| 2 | 6 | 6 | Variation | 4,57 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,00 |
| 4 | 15 | 15 | Variation | 5,52 |
| 5 | 21 | 21 | Variation | 0,00 |
| 6 | 25 | 25 | Variation | 26,48 |
| 7 | 26 | 26 | Variation | 0,00 |
| 8 | 31 | 31 | Variation | 0,36 |
| 9 | 33 | 33 | Variation | 33,34 |
| 10 | 34 | 34 | Variation | 81,94 |
| 11 | 36 | 36 | ag | 100,00 |
| 12 | 37 | 37 | ag | 90,50 |
| 13 | Cos2 | Cos2 | Variation | 29,74 |
| 14 | Cos10 | Cos10 | Variation | 89,98 |

Εικόνα 25: Σύγκριση Γονοτύπων για Apre4, Apre6, Apre7, Apre15, Apre21, Apre25, Apre26, Apre33, Apre34, Apre36, Apre37, Cos2, Cos10. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα ενώ μέσα στους κύκλους φαίνονται τα δείγματα που παρουσιάζουν τιμή εμπιστοσύνης >85% με το πρότυπο δείγμα κάθε ομάδας χωρίς να εντάσσονται όμως στην αντίστοιχη ομάδα.

3.6.2.5. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre1, Apre2, Apre9, Apre16, Apre18, Apre19, Apre20, Apre21

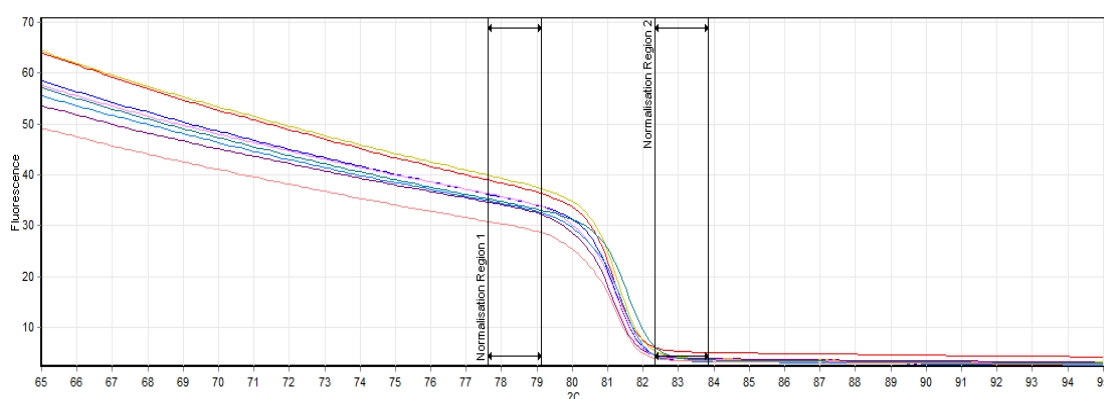
Μετά την αραίωση των δειγμάτων Apre1, Apre2, Apre9, Apre16, Apre18, Apre19, Apre20, Apre21 (η αρχική συγκέντρωση φαίνεται στον Πίνακα 2) και τον πολλαπλασιασμό του DNA με qPCR ακολουθεί η ανάλυση HRM.

Από τις καμπύλες στην Εικόνα 26 φαίνεται ότι για όλα τα συγκεκριμένα δείγματα, ο φθορισμός μεταβάλλεται από 1,75 έως 2,1 μονάδες ανάμεσα στις θερμοκρασίες 81°C-82°C, σε αυτή την περιοχή βρίσκονται και οι Tm τους. Στο διάγραμμα φαίνεται επίσης ότι δεν υπάρχουν παραπροϊόντα ή διμερή εκκινητών καθώς δεν υπάρχουν άλλες κορυφές.



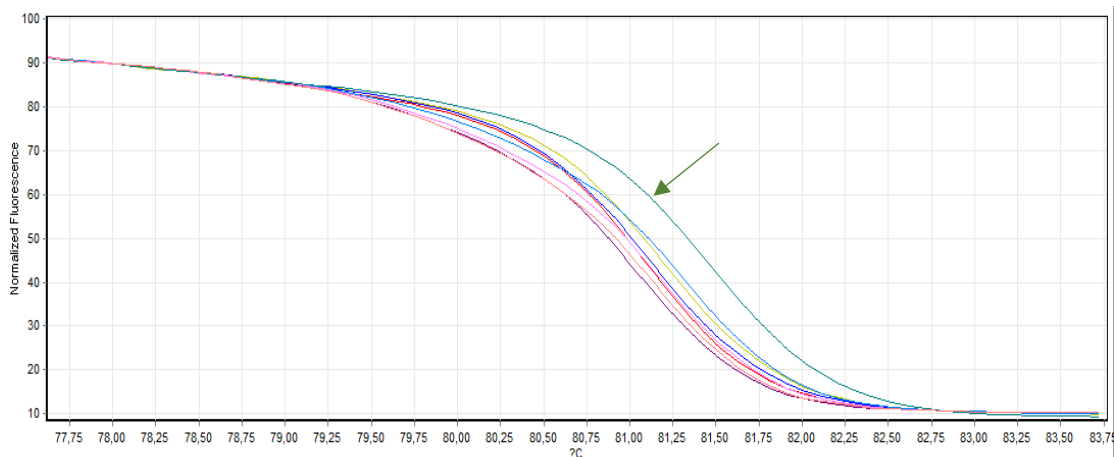
Εικόνα 26: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apr1, Apr2, Apr9, Apr16, Apr18, Apr19, Apr20, Apr21.

Οι T_m του κάθε δείγματος φαίνονται στην Εικόνα 27 ενώ ανάμεσα στους κέρσορες βρίσκονται οι T_m όλων των δειγμάτων. Οι θερμοκρασίες αυτές είναι σημαντικές για την ομαδοποίηση των δειγμάτων και θα αναλυθούν περισσότερο παρακάτω



Εικόνα 27: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apr1, Apr2, Apr9, Apr16, Apr18, Apr19, Apr20, Apr21. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28 οι T_m των δειγμάτων κυμαίνονται μεταξύ 80,8°C και 81,5°C. Παρατηρείται ότι οι T_m των περισσότερων δειγμάτων είναι παρόμοιες και τα δείγματα τείνουν να ομαδοποιηθούν μεταξύ τους εκτός από το δείγμα 20 η καμπύλη του οποίου φαίνεται να διαφέρει αρκετά από των υπόλοιπων δειγμάτων.



Εικόνα 28: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre9, Apre16, Apre18, Apre19, Apre20, Apre21. Αναπαρίσταται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 91% στο 10%.

Τα δείγματα DNA συγκρίνονται μεταξύ τους και κατατάσσονται σε υποομάδες όμοιων γονοτύπων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29 Τα δείγματα 1, 9 και 18 παρουσιάζουν ομοιότητα των γονοτύπων τους με τιμή εμπιστοσύνης μεγαλύτερη του 90%. Αντιστοίχως όμοιους γονοτύπους ως προς το SNP που εξετάζεται φαίνεται να έχει και το δείγμα 2 με το 19 (τιμή εμπιστοσύνης 90,18%) ενώ σημαντική ομοιότητα με αυτά (κατά 88,10%) παρουσιάζει και το 9 από την προηγούμενη ομάδα. Τέλος, ομοιότητα μεταξύ τους παρουσιάζουν το 16 (το οποίο από προηγούμενο πείραμα είναι όμοιο με το 14) με το 21 με τιμή εμπιστοσύνης 96,95%. Το δείγμα 20 δεν παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | aa | 100,00 |
| 2 | 2 | 2 | Variation | 74,19 |
| 3 | 9 | 9 | aa | 95,68 |
| 4 | 16 | 16 | Variation | 69,66 |
| 5 | 18 | 18 | aa | 90,29 |
| 6 | 19 | 19 | Variation | 68,06 |
| 7 | 20 | 20 | Variation | 4,26 |
| 8 | 21 | 21 | Variation | 76,12 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | Variation | 74,19 |
| 2 | 2 | 2 | ab | 100,00 |
| 3 | 9 | 9 | Variation | 88,10 |
| 4 | 16 | 16 | Variation | 29,02 |
| 5 | 18 | 18 | Variation | 60,72 |
| 6 | 19 | 19 | ab | 90,18 |
| 7 | 20 | 20 | Variation | 21,31 |
| 8 | 21 | 21 | Variation | 36,86 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | Variation | 69,66 |
| 2 | 2 | 2 | Variation | 29,02 |
| 3 | 9 | 9 | Variation | 54,74 |
| 4 | 16 | 16 | ac | 100,00 |
| 5 | 18 | 18 | Variation | 81,56 |
| 6 | 19 | 19 | Variation | 31,65 |
| 7 | 20 | 20 | Variation | 0,52 |
| 8 | 21 | 21 | ac | 96,95 |

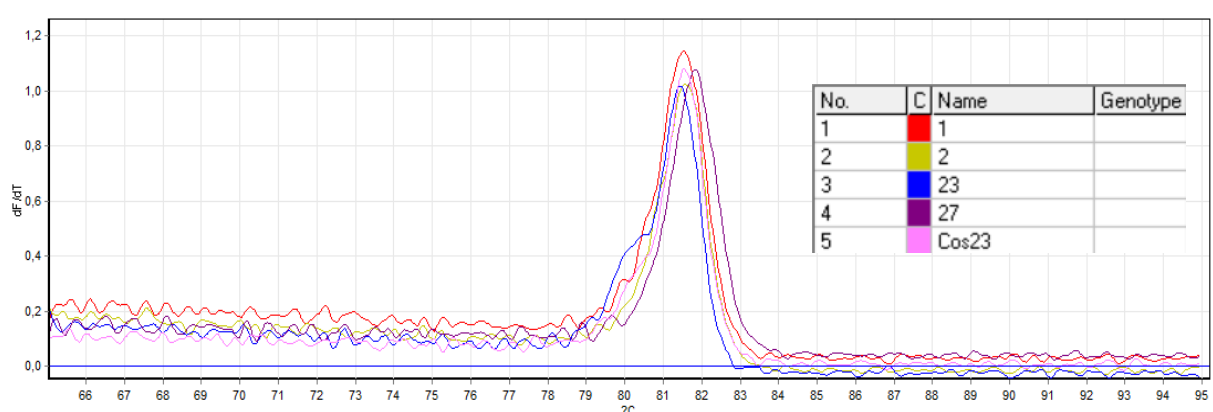
| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | Variation | 4,26 |
| 2 | 2 | 2 | Variation | 21,31 |
| 3 | 9 | 9 | Variation | 8,13 |
| 4 | 16 | 16 | Variation | 0,52 |
| 5 | 18 | 18 | Variation | 3,16 |
| 6 | 19 | 19 | Variation | 21,37 |
| 7 | 20 | 20 | ad | 100,00 |
| 8 | 21 | 21 | Variation | 0,94 |

Εικόνα 29: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre9, Apre16, Apre18, Apre19, Apre20, Apre21. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα ενώ μέσα στους κύκλους φαίνονται τα δείγματα που παρουσιάζουν τιμή εμπιστοσύνης >85% με το πρότυπο δείγμα κάθε ομάδας χωρίς να εντάσσονται στην ομάδα αυτή.

3.6.2.6. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23

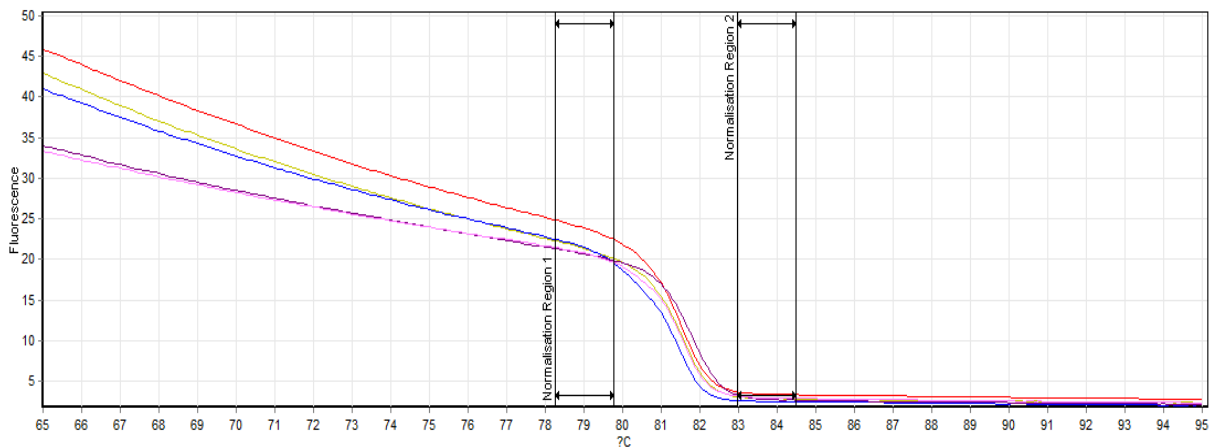
Μετά την αραίωση των δειγμάτων (η αρχική πυκνότητα των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 2) και την qPCR ακολουθεί η ανάλυση HRM για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23.

Από τις κορυφές στην Εικόνα 30 φαίνεται ότι για τα συγκεκριμένα δείγματα, ο φθορισμός εμφανίζει την μέγιστη μεταβολή (μεταξύ 1 και 1,1 μονάδων) όταν τα δείγματα θερμανθούν στους 81°C-82°C ενώ δεν διακρίνονται παραπροϊόντα και διμερή.



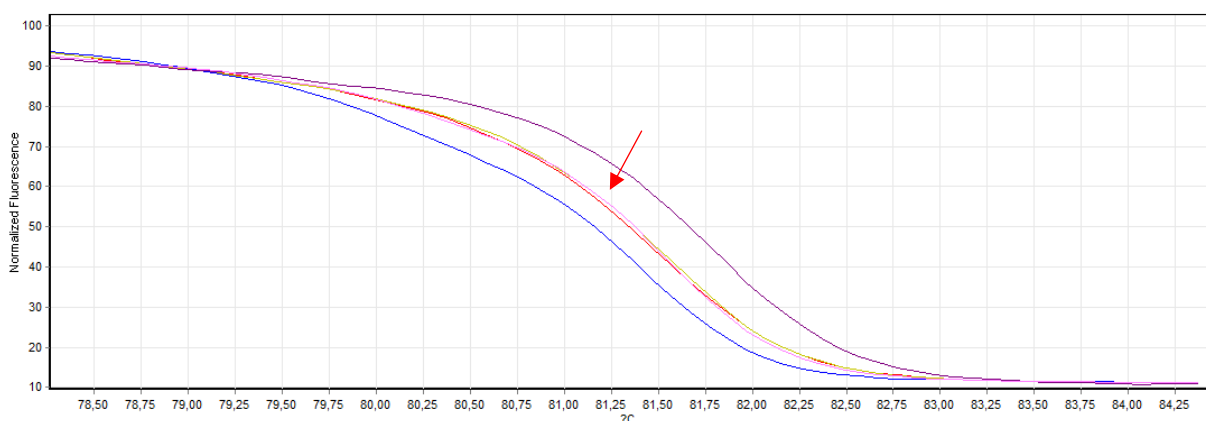
Εικόνα 30: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23.

Στην Εικόνα 31 φαίνεται η θερμοκρασία που αποδιατάσσονται οι κλώνοι του κάθε δείγματος και ακόμη η θερμοκρασιακή περιοχή που περιλαμβάνει όλες τις T_m των δειγμάτων της ανάλυσης (ανάμεσα στους κέρσορες).



Εικόνα 31: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Από την Εικόνα 32 εξάγεται το συμπέρασμα ότι το κάθε δείγμα έχει διαφορετική T_m μεταξύ $81,2^{\circ}\text{C}$ και $81,7^{\circ}\text{C}$ ενώ παρατηρείται ότι οι καμπύλες των δειγμάτων 1 και 2 σχεδόν εφάπτονται (κόκκινο βέλος), υποδηλώνοντας ότι η αλληλουχία DNA ως προς το SNP που εξετάζεται είναι όμοια.



Εικόνα 32: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23. Αναπαρίστανται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 92% στο 10%.

Βάσει του λογισμικού και όπως φαίνεται στην Εικόνα 33 τα δείγματα μπορούν να ομαδοποιηθούν ως εξής: Τα δείγματα 1, 2 και Cos23 παρουσιάζουν γονοτυπική ομοιότητα ως προς το SNP που εξετάζεται με τιμή εμπιστοσύνης 97,81%, ωστόσο τα 1 και 2, όπως έχει φανεί σε

προηγούμενη ανάλυση δεν ανήκουν στην ίδια γονοτυπική ομάδα. Τέλος τα 23 και 27 δεν είναι όμοια ούτε μεταξύ τους ούτε με κάποιο άλλο από τα υπόλοιπα δείγματα DNA της συγκεκριμένης ανάλυσης.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | aa | 98,17 |
| 2 | 2 | 2 | aa | 97,81 |
| 3 | 23 | 23 | Variation | 34,18 |
| 4 | 27 | 27 | Variation | 10,84 |
| 5 | Cos23 | Cos23 | aa | 100,00 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | Variation | 35,79 |
| 2 | 2 | 2 | Variation | 28,29 |
| 3 | 23 | 23 | ab | 100,00 |
| 4 | 27 | 27 | Variation | 0,22 |
| 5 | Cos23 | Cos23 | Variation | 34,18 |

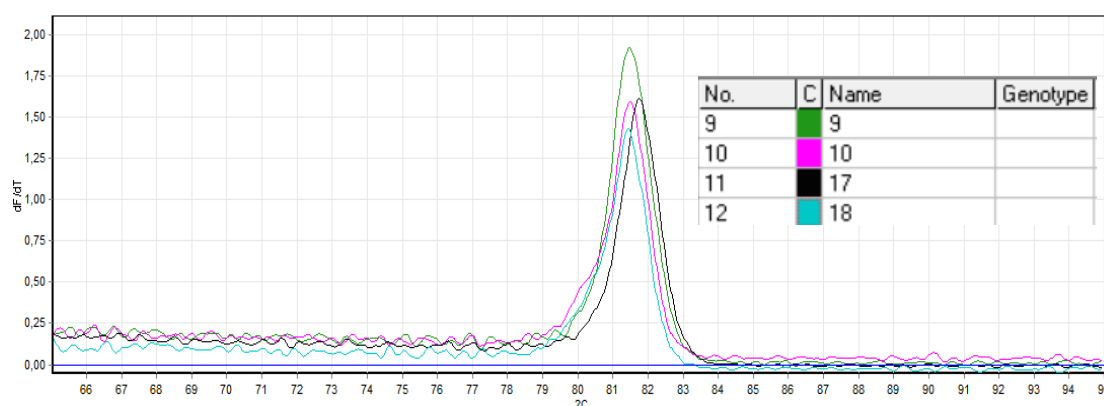
| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|-------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | Variation | 10,69 |
| 2 | 2 | 2 | Variation | 14,34 |
| 3 | 23 | 23 | Variation | 0,22 |
| 4 | 27 | 27 | ac | 100,00 |
| 5 | Cos23 | Cos23 | Variation | 10,84 |

Εικόνα 33: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apre1, Apre2, Apre23, Apre27, Cos23. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγθεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα.

3.6.2.7. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre9, Apre10, Apre17, Apre18

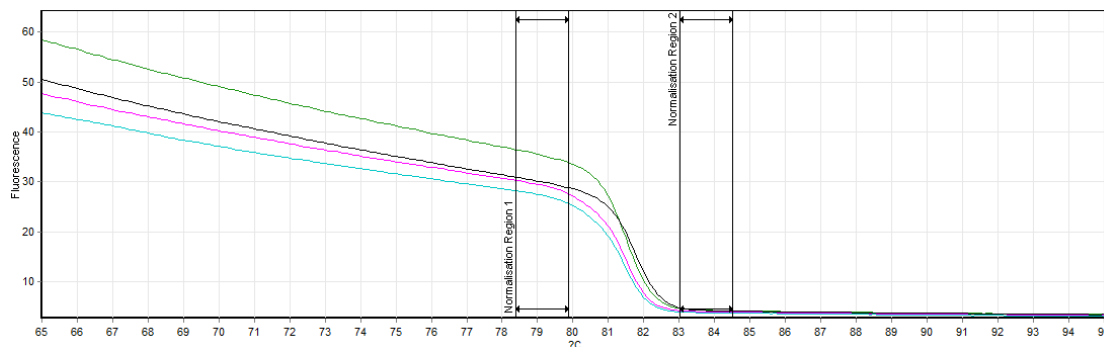
Αρχικά τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17 και Apre18 αραιώθηκαν κατάλληλα (οι αρχικές συγκεντρώσεις φαίνονται στον Πίνακα 2) και υποβλήθηκαν σε qPCR. Κατόπιν έγινε ανάλυση HRM και γονοτύπησή τους.

Στην Εικόνα 34 παρατηρείται ότι για τα συγκεκριμένα δείγματα, ο φθορισμός μεταβάλλεται σημαντικά (από 1,5 μέχρι 1,9 μονάδες) μεταξύ των 81°C-82°C ενώ δεν υπάρχουν παραπροϊόντα ή διμερή εκκινήτων καθώς δεν παρατηρούνται μικρότερες καμπύλες στο σχήμα.



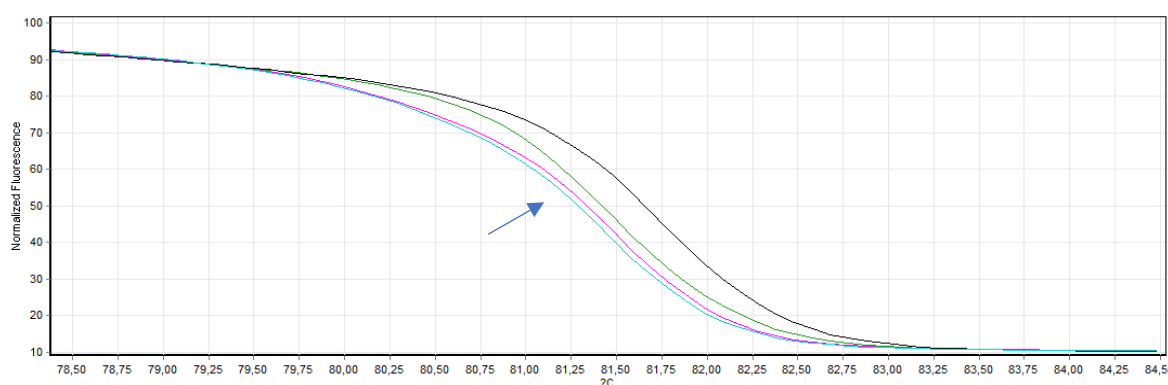
Εικόνα 34: Καμπύλες Μεταβολής Φθορισμού για τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17 και Apre18

Οι θερμοκρασίες τήξης του κάθε δείγματος ξεχωριστά φαίνονται στην Εικόνα 35 ενώ η περιοχή ανάμεσα στους κέρσορες περιλαμβάνει τις θερμοκρασίες τήξης όλων των δειγμάτων της ανάλυσης. Οι T_m όλων των δειγμάτων θα εξεταστούν και θα συγκριθούν στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης.



Εικόνα 35: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17, Apre18. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.

Στην Εικόνα 36 παρατηρείται ότι οι καμπύλες κανονικοποιημένου φθορισμού των δειγμάτων 10 και 18 έχουν ίδια κλίση και σχεδόν την ίδια θερμοκρασία τήξης (την θερμοκρασία που αντιστοιχεί στην τιμή 50 του κανονικοποιημένου φθορισμού). Αυτό συμβαίνει όταν δύο ή περισσότερα δείγματα έχουν όμοιο γονότυπο ως προς το χαρακτηριστικό που εξετάζεται. Είναι ωστόσο απαραίτητο να εξεταστεί η γονοτυπική ομοιότητα από το κατάλληλο λογισμικό.



Εικόνα 36: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17, Apre18. Αναπαρίσταται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 92% στο 10%.

Στην Εικόνα 37 φαίνονται τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης: Το 10 και το 18 παρουσιάζουν ομοιότητα κατά 94,63% ενώ το 18 σε προηγούμενη ανάλυση έχει δειχθεί ως γονοτυπικά όμοιο με τα 1 και 9. Τα δείγματα 9 και 17 δεν εμφανίζουν ομοιότητα μεταξύ τους ή με τα

υπόλοιπα δείγματα της συγκεκριμένης ανάλυσης. Τα αποτελέσματα ως προς το δείγμα 9 δεν συμφωνούν μεταξύ τους και για αυτό τον λόγο δεν μπορεί να ενταχθεί με ασφάλεια σε αυτή την ομάδα.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 9 | 9 | 9 | aa | 100,00 |
| 10 | 10 | 10 | Variation | 68,17 |
| 11 | 17 | 17 | Variation | 31,07 |
| 12 | 18 | 18 | Variation | 49,96 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 9 | 9 | 9 | Variation | 31,07 |
| 10 | 10 | 10 | Variation | 7,15 |
| 11 | 17 | 17 | ab | 100,00 |
| 12 | 18 | 18 | Variation | 3,27 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 9 | 9 | 9 | Variation | 68,17 |
| 10 | 10 | 10 | ab | 100,00 |
| 11 | 17 | 17 | Variation | 7,15 |
| 12 | 18 | 18 | ab | 94,63 |

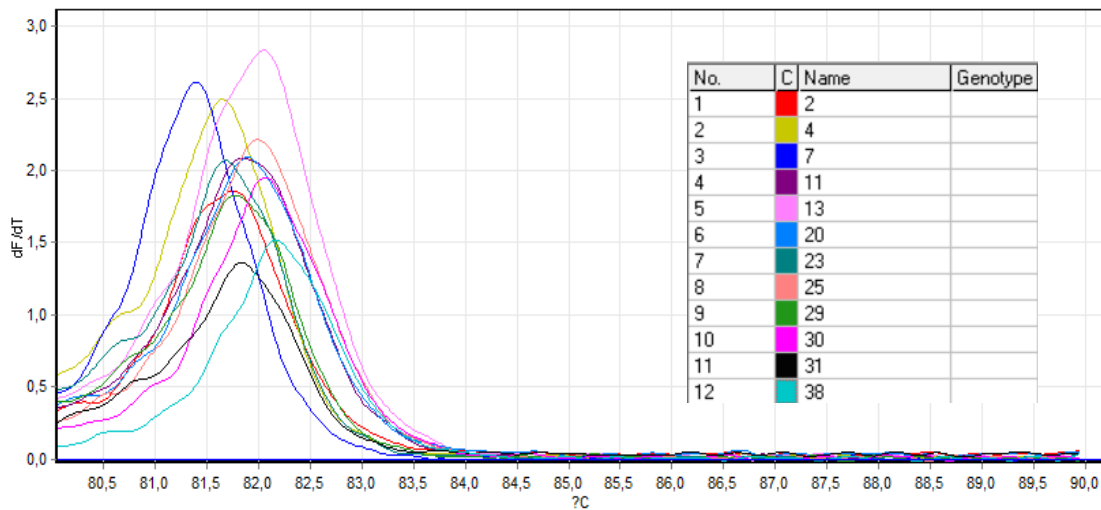
Εικόνα 37: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17, Apre18. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα.

3.6.2.8. Γονοτύπηση των Δειγμάτων Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31, Apre38

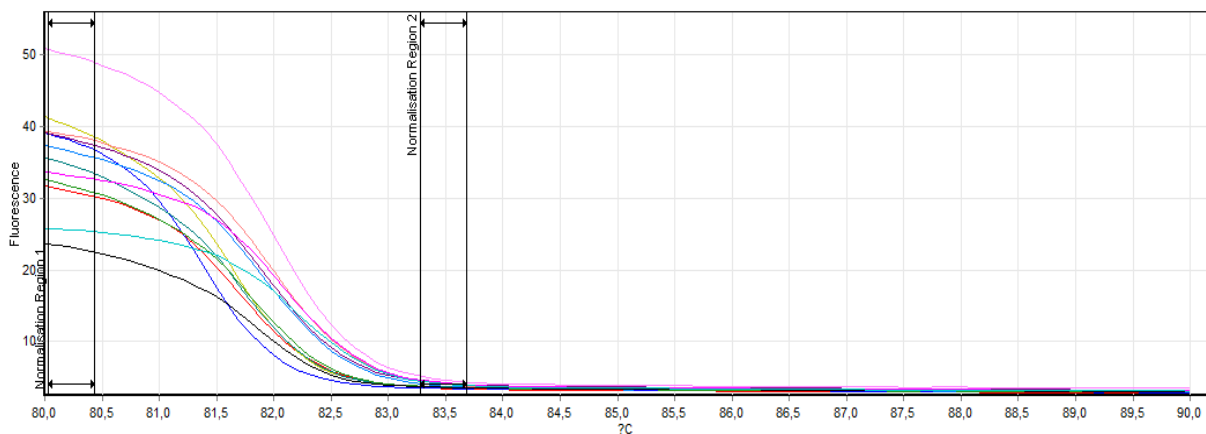
Για την ανάλυση των δειγμάτων Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31 και Apre38 (οι αρχικές συγκεντρώσεις φαίνονται στον Πίνακα 2) έγινε πρώτα αραίωση και κατόπιν το DNA πολλαπλασιάστηκε με qPCR. Ακολούθησε ανάλυση HRM. Από τις καμπύλες στην Εικόνα 38 φαίνεται ότι ο φθορισμός για τα συγκεκριμένα δείγματα μειώνεται περισσότερο ανάμεσα στις θερμοκρασίες 81,4°C και 82,2°C (από 2,6 μέχρι 2,8 μονάδες). Ανάμεσα σε αυτές τις θερμοκρασίες εντοπίζονται και οι Tm των προϊόντων. Τέλος δεν υπάρχουν διμερή ή παραπροϊόντα.

Στην Εικόνα 39 φαίνονται οι θερμοκρασίες τήξης των δειγμάτων και η θερμοκρασιακή περιοχή που περιλαμβάνει όλες τις Tm. Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης η περιοχή αυτή θα εξεταστεί ώστε εξαχθούν πιο λεπτομερή συμπεράσματα σχετικά με τους γονοτύπους των δειγμάτων.

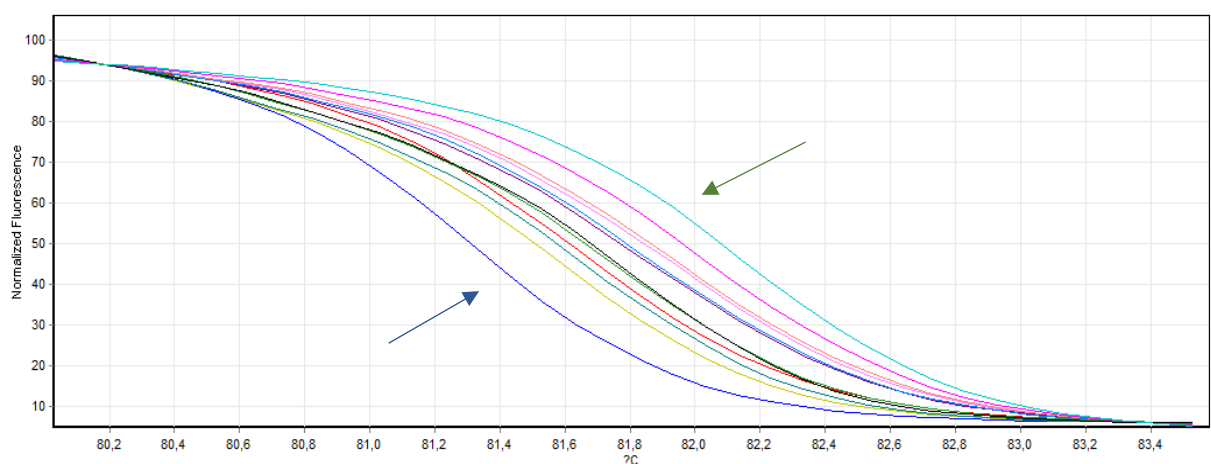
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 40, οι Tm όλων των δειγμάτων της ανάλυσης βρίσκονται μεταξύ 81,2°C και 82,2°C. Παρατηρείται ακόμη ότι οι καμπύλες και οι θερμοκρασίες τήξης των δειγμάτων 7 και 38 διαφέρουν σημαντικά από αυτές τις υπόλοιπες



Εικόνα 38: Καμπύλες Μεταβολής για τα δείγματα Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31, Apre38.



Εικόνα 39: Καμπύλες Τήξης για τα δείγματα Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31, Apre38. Στο σχήμα φαίνεται το επίπεδο φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία.



Εικόνα 40: Κανονικοποιημένος Φθορισμός Συναρτήσεως Θερμοκρασίας για τα δείγματα Apre9, Apre10, Apre17, Apre18, Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31, Apre38. Αναπαρίστανται το εύρος θερμοκρασιών όπου ο φθορισμός για όλα τα δείγματα μειώνεται από το 95% στο 10%.

Στην Εικόνα 41 παρατηρείται ότι τα δείγματα 2, 23 και 29 εμφανίζουν γονοτυπική ομοιότητα με τιμή εμπιστοσύνης >90% ενώ το δείγμα 31 παρουσιάζει κατά 99,21% ομοιότητα με το 29 και έτσι μπορεί και αυτό να ενταχθεί σε αυτή την ομάδα. Τα δείγματα 11, 13 και 20 έχουν επίσης όμοιους γονοτύπους και μπορούν να ομαδοποιηθούν μαζί ενώ το δείγμα 25 είναι κατά 98% όμοιο με το 13 και μπορεί έτσι να ενταχθεί σε αυτή την ομάδα.

Το δείγμα 4 εμφανίζει μια σημαντική ομοιότητα με το 23 όμως όχι και με τα υπόλοιπα της υποομάδας γι' αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ως γονοτυπικά όμοιο και να ενταχθεί σε αυτή την ομάδα. Τα δείγματα 7, 30 και 38 δεν εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα αυτής της ανάλυσης.

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | aa | 100,00 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 71,12 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 5,32 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 43,52 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 20,45 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 36,50 |
| 7 | 23 | 23 | aa | 93,15 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 14,63 |
| 9 | 29 | 29 | aa | 90,54 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 2,71 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 87,63 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 0,17 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | Variation | 60,25 |
| 2 | 4 | 4 | ab | 100,00 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 29,34 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 8,71 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 2,39 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 6,29 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 87,51 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 1,41 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 46,95 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 0,10 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 43,23 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 0,00 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | Variation | 4,19 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 29,34 |
| 3 | 7 | 7 | ac | 100,00 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 0,11 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 0,01 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 0,06 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 11,79 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 0,01 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 2,21 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 0,00 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 1,81 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 0,00 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | Variation | 43,62 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 14,96 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,22 |
| 4 | 11 | 11 | ad | 100,00 |
| 5 | 13 | 13 | ad | 90,25 |
| 6 | 20 | 20 | ad | 98,94 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 35,59 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 82,62 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 71,05 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 44,18 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 72,73 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 10,72 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | ae | 93,25 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 87,10 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 9,62 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 28,60 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 11,52 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 22,62 |
| 7 | 23 | 23 | ae | 100,00 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 7,63 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 80,27 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 1,13 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 76,42 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 0,05 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | Variation | 14,02 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 1,38 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,01 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 77,15 |
| 5 | 13 | 13 | af | 98,00 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 84,67 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 5,31 |
| 8 | 25 | 25 | af | 100,00 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 22,83 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 73,09 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 24,64 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 22,67 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | ag | 91,38 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 46,98 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 2,14 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 60,38 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 31,25 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 51,68 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 77,45 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 22,83 |
| 9 | 29 | 29 | ag | 100,00 |
| 10 | 30 | 30 | Variation | 4,32 |
| 11 | 31 | 31 | ag | 99,21 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 0,28 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|----|------|-----------|--------------|
| 1 | 2 | 2 | Variation | 2,16 |
| 2 | 4 | 4 | Variation | 0,10 |
| 3 | 7 | 7 | Variation | 0,00 |
| 4 | 11 | 11 | Variation | 32,00 |
| 5 | 13 | 13 | Variation | 61,60 |
| 6 | 20 | 20 | Variation | 39,36 |
| 7 | 23 | 23 | Variation | 0,57 |
| 8 | 25 | 25 | Variation | 73,09 |
| 9 | 29 | 29 | Variation | 4,32 |
| 10 | 30 | 30 | ah | 100,00 |
| 11 | 31 | 31 | Variation | 4,87 |
| 12 | 38 | 38 | Variation | 64,25 |

| No. | C | Name | Genotype | Confidence % |
|-----|---|------|-----------|--------------|
| 1 | | 2 | Variation | 0,11 |
| 2 | | 4 | Variation | 0,00 |
| 3 | | 7 | Variation | 0,00 |
| 4 | | 11 | Variation | 5,15 |
| 5 | | 13 | Variation | 16,04 |
| 6 | | 20 | Variation | 7,17 |
| 7 | | 23 | Variation | 0,02 |
| 8 | | 25 | Variation | 22,67 |
| 9 | | 29 | Variation | 0,28 |
| 10 | | 30 | Variation | 64,25 |
| 11 | | 31 | Variation | 0,32 |
| 12 | | 38 | ai | 100,00 |

Εικόνα 41: Σύγκριση Γονοτύπων για τα δείγματα Apre2, Apre4, Apre7, Apre11, Apre13, Apre20, Apre23, Apre25, Apre29, Apre30, Apre31, Apre38. Στα πλαίσια φαίνεται το δείγμα που έχει επιλεγεί ως πρότυπο για την κάθε ομάδα ενώ μέσα στους κύκλους φαίνονται τα δείγματα που παρουσιάζουν τιμή εμπιστοσύνης >85% με το πρότυπο δείγμα κάθε ομάδας χωρίς να εντάσσονται στην ομάδα αυτή

Συμπερασματικά, τα δείγματα που εξετάστηκαν μπορούν να χωριστούν σε 7 ομάδες:

1^η Ομάδα: Apre14, Apre16, Apre21

2^η Ομάδα: Apre30, Apre34, Apre36, Apre37, Cos10

3^η Ομάδα: Apre1, Apre18, Apre10

4^η Ομάδα: Apre2, Apre19, Apre23, Apre29, Apre31

5^η Ομάδα: Apre11, Apre13, Apre20, Apre25

6^η Ομάδα: Apre6, Apre15, Apre33, Cos2

7^η Ομάδα: Apre7, Apre26

Τέλος ορισμένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν με σαφήνεια σε καμία από τις παραπάνω ομάδες είτε διότι εμφανίζουν κοινό γονότυπο με δείγματα που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες (Apre9 και Cos23) ή επειδή δεν εμφανίζουν αρκετή ομοιότητα με κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα (Apre4, Apre24, Apre17, Apre27, Apre38).

Από τα δείγματα που δεν εντάσσονται με σαφήνεια σε κάποια ομάδα, το Apre9 ενώ αρχικά φάνηκε ως γονοτυπικά όμοιο με τα 1 και 18, σε επόμενη ανάλυση δεν είχε αρκετά μεγάλη τιμή εμπιστοσύνης με το 18 ώστε να επιβεβαιωθεί η ομαδοποίηση. Ωστόσο θα ήταν χρήσιμο

να γίνει μια ανάλυση που να συγκρίνει τα τέσσερα αυτά δείγματα (Apr1, Apr9, Apr10, Apr18) μεταξύ τους και να εξεταστούν οι τιμές εμπιστοσύνης όλων των δειγμάτων συνολικά. Το Cos23 φάνηκε να έχει όμοιο γονότυπο με δύο δείγματα που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, ωστόσο εξετάστηκε μόνον σε μια ανάλυση όπου το επίπεδο φθορισμού του ήταν χαμηλότερο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα κάτι που μπορεί να σχετίζεται με την ύπαρξη μικρότερης ποσότητας DNA στο συγκεκριμένο δείγμα. Σε επόμενη ανάλυση θα ήταν χρήσιμο να γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης DNA πριν και μετά την αραίωση για την καλύτερη ποσοτικοποίησή του.

Από τα δείγματα που δεν εντάχθηκαν σε καμία από τις παραπάνω ομάδες, το Apr4 εμφανίζει υψηλή τιμή εμπιστοσύνης με τα Apr21 και Apr23 τα οποία όμως ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Θα ήταν χρήσιμο να γίνει αλληλούχηση των τριών δειγμάτων ώστε να εξακριβωθεί εάν υπάρχει γονοτυπική ομοιότητα μεταξύ τους. Τα δείγματα Apr24 Apr17 και Apr38 αναλύθηκαν μόνο μια φορά το καθένα και φαίνεται ότι διαφέρουν αρκετά από τα υπόλοιπα όσον αφορά τον γονότυπό τους. Θα ήταν καλό να γίνει στο μέλλον μια επόμενη ανάλυση που να περιλαμβάνει και τα 3 καθώς και ένα δείγμα από την κάθε υποομάδα. Τέλος το δείγμα 27 εξετάστηκε μόνον μια φορά και συγκρίθηκε με έναν μικρό αριθμό δειγμάτων ωστόσο όπως και το Cos23 (βλ. παραπάνω), έδωσε χαμηλότερα επίπεδα φθορισμού από τα υπόλοιπα. Έτσι είναι χρήσιμο, αρχικά να γίνει ποσοτικοποίησή του πριν και μετά την αραίωση και σε επόμενη ανάλυση να συγκριθεί με περισσότερα δείγματα από διαφορετικές υποομάδες. Εάν κατόπιν αυτών τα δείγματα δεν εντάσσονται σε κάποια ομάδα θα είναι χρήσιμο να επανασχεδιαστούν οι εκκινητές ώστε να δίνουν μικρότερο προϊόν PCR.

3.7. Συζήτηση

Από την εισαγωγή της HRM στην έρευνα μέχρι και σήμερα υπάρχουν διαφορετικές επιλογές εξοπλισμού και λογισμικού που μπορούν να πραγματοποιήσουν την ανάλυση αυτή. Ενώ οι αρχές της HRM παραμένουν οι ίδιες ανεξαρτήτως εξοπλισμού, η ρύθμιση των πειραματικών παραμέτρων και η ανάλυση δεδομένων διαφέρουν και απαιτούν προσοχή, κυρίως για την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Μέχρι στιγμής οι βασικότερες εφαρμογές της ανάλυσης HRM στον κλάδο της γενετικής είναι η σάρωση γονιδίων για την ανεύρεση πολυμορφισμών (κατά την οποία τα προς εξέταση δείγματα συγκρίνονται με έναν άγριου τύπου γονότυπο) και η γονοτύπηση (σε συνδυασμό με αλληλούχηση τουλάχιστον ενός δείγματος που αντιστοιχεί στον κάθε γονότυπο)⁵². Ειδικά για την γονοτύπηση, η HRM αποτελεί μια ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδο με χαμηλό κόστος και υψηλή ευαισθησία. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθούν οι κυριότεροι περιορισμοί και τα σημεία που χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή κατά την πειραματική διαδικασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Δείγματα DNA

Σημαντικό ρόλο για επιτυχή HRM παίζει η μέθοδος με την οποία έχει γίνει η απομόνωση DNA, καθώς η επαναληψιμότητα είναι το κλειδί για την μελλοντική γονοτύπηση περισσότερων δειγμάτων. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι όταν απομονώθηκε DNA με διαφορετικές μεθόδους, τα ίδια δείγματα έδωσαν διαφορετικές καμπύλες τήξης. Μεγάλη σημασία για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων παίζει και η ποιότητα του DNA στα υπό εξέταση δείγματα. Συγκεκριμένα, μεγάλη συγκέντρωση αλάτων κατά την διαδικασία της απομόνωσης μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην θερμοκρασία τήξης των κλώνων του DNA, οδηγώντας έτσι σε πιθανότητα σφάλματος στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων⁵⁵.

Όταν η απομόνωση γίνεται από δείγματα αίματος με μεγάλη συγκέντρωση ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία ως απύρνα κύτταρα δεν περιέχουν γενετικό υλικό, η συγκέντρωση DNA θα είναι κατά κανόνα χαμηλότερη. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος εμπλουτισμένα σε ερυθρά αιμοσφαίρια και γι' αυτό το πρωτόκολλο απομόνωσης εφαρμόστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίσουμε την μεγαλύτερη δυνατή συγκέντρωση DNA (βλ. ενότητα 4.2.)⁵⁷.

Ποσοτικοποίηση DNA

Η ποσοτικοποίηση του DNA έγινε με φωτομέτρηση. Είναι σημαντικό τα δείγματα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά να έχουν μετρηθεί με την ίδια μέθοδο ώστε να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν η πιθανότητα σφάλματος λόγω της ποσοτικοποίησης. Δείγματα που έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA παρουσιάζουν μεγαλύτερη T_m ανεξαρτήτως γονοτύπου. Έτσι για να είναι συγκρίσιμα τα δείγματα μεταξύ τους θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι έχουν παρόμοια αρχική συγκέντρωση και εισέρχονται στην εκθετική φάση της qPCR με διαφορά έως 3 κύκλους.

Σχεδιασμός Εκκινητών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το μέγεθος του προϊόντος PCR είναι πολύ σημαντικό για μια επιτυχημένη HRM. Το ιδανικό μέγεθος όταν εξετάζεται συγκεκριμένος, γνωστός πολυμορφισμός είναι από 80 έως 100bp ώστε η ανάλυση να έχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα.

Δοκιμασίες γονοτύπησης στο παρελθόν έδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα και για προϊόντα 40-125bp όταν εξεταζόταν η ύπαρξη κάποιου SNP και για προϊόντα 99-248bp όταν έγινε σάρωση κάποιου τμήματος DNA για να εξεταστεί η ύπαρξη άγνωστων πολυμορφισμών⁵⁸. Ωστόσο σε μια άλλη μελέτη στην οποία εξεταζόταν η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού (rs1045642 στο *ABCB1*), η αρχική ανάλυση HRM, στην οποία το προϊόν είχε μέγεθος 108bp, δεν έδειξε καλή διάκριση μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων και μόνο όταν το μέγεθος του προϊόντος μειώθηκε, η ανάλυση HRM ήταν ακριβέστερη⁵⁷.

Ακόμη είναι πιθανό ορισμένοι πολυμορφισμοί να μην ανιχνευθούν σωστά. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι όταν συνυπήρχαν δυο διαδοχικοί πολυμορφισμοί (T>C και C>T στο *ABCC1*) στον γονότυπο των ετεροζυγωτών, η καμπύλη τήξης του δείγματος που τους έφερε δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά από την πρότυπη καμπύλη των ομοζυγωτών, πιθανώς διότι η T_m και κατά συνέπεια η καμπύλη τήξης έχει άμεση συσχέτιση με την νουκλεοτιδική αλληλουχία. Ακόμη, όταν υπήρχαν δύο όμοιοι πολυμορφισμοί (G>A στο *ABCG2*) στον γονότυπο των ετεροζυγωτών η καμπύλη τήξης των δειγμάτων αυτών έτεινε να ομαδοποιηθεί με εκείνη των ομοζυγωτών ενώ όταν υπήρχε και τρίτος όμοιος πολυμορφισμός οι καμπύλες τήξης διέφεραν σημαντικά μεταξύ ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών.

Συνεπώς, αν και δεν μπορεί να ορισθεί ένα ακριβές όριο για το μέγεθος του προϊόντος που πρόκειται να αναλυθεί, οι μέχρι τώρα μελέτες συμφωνούν ότι οι εκκινητές θα πρέπει να

σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στον πολυμορφισμό που εξετάζεται για να αυξηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η ευαισθησία της ανάλυσης.

Προβλήματα στην ομαδοποίηση εμφάνισαν και δείγματα DNA που έφεραν και δεύτερο πολυμορφισμό, πέραν αυτού που εξετάστηκε. Τα δείγματα αυτά είτε δεν εμφάνιζαν επαρκή ομοιότητα με τα υπόλοιπα, όπως είναι αναμενόμενο, είτε ομαδοποιήθηκαν με μη συγγενικά προς αυτά δείγματα, όπως φάνηκε από την αλληλούχηση που ακολούθησε την HRM⁵⁷. Μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση, είναι ότι η ανάλυση της HRM δεν μπορεί να ανιχνεύσει SNPs τα οποία είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία των εκκινητών και σε αυτή την περίπτωση οι εκκινητές θα πρέπει να επανασχεδιαστούν ώστε η περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί με PCR να περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό⁵⁷.

Αναπαραγωγιμότητα Αποτελεσμάτων:

Ο ρόλος του σωστού εξοπλισμού και των κατάλληλων αντιδραστηρίων είναι απαραίτητη προϋπόθεση σε όλες τις μοριακές μεθόδους. Έτσι και για την αξιόπιστη ανάλυση HRM είναι πολύ σημαντικό τα αποτελέσματα να μπορούν να αναπαραχθούν και για αυτό τον λόγο πρέπει οι χειρισμοί να είναι πολύ προσεκτικοί ώστε όλα τα αντιδραστήρια να έχουν τον ίδιο όγκο και την ίδια συγκέντρωση καθώς και να υπάρχει παντού ίδια ποσότητα DNA. Το σημείο της στάθμης από όπου λαμβάνεται το μείγμα αντιδραστηρίων και το δείγμα DNA θα πρέπει να είναι πάντα το ίδιο και όσο το δυνατόν πιο κοντά στην επιφάνεια του φιαλιδίου καθώς διαφορές στην συγκέντρωση και στην ποσότητα των αλάτων στο φιαλίδιο της αντίδρασης (που περιέχει το μείγμα HRM και το DNA) μπορεί να αλλάξει την θερμοκρασία τήξης⁵⁵. Θα πρέπει ακόμη στην αρχή του πειράματος να προετοιμάζεται ένα μείγμα με όλα τα απαραίτητα αναλώσιμα αντί αυτά να προστίθενται ξεχωριστά στο κάθε φιαλίδιο που περιέχει DNA. Αυτό είναι χρήσιμο ώστε να μειωθούν όσο το δυνατόν οι χειρισμοί.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι όταν έγινε προσπάθεια να επαληθευτούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων μόνο με ανάλυση HRM σε προϊόντα που είχαν ήδη υποβληθεί σε qPCR και είχαν ήδη αναλυθεί, τα αποτελέσματα ομαδοποίησης δεν συμφωνούσαν σε πολλές περιπτώσεις, ενδεχομένως διότι οι διαδοχικές αποδιατάξεις και επαναδιατάξεις των κλώνων του DNA αλλοίωσαν την ποιότητά του και συνεπώς την ευαισθησία των αποτελεσμάτων.

Ανίχνευση Πολυμορφισμών:

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα υπάρχει ασυμφωνία για το εάν το σημείο στο οποίο εντοπίζεται ένας πολυμορφισμός επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου⁵⁹, ωστόσο φαίνεται ότι SNPs που εντοπίζονται σε περιοχές του γονιδιώματος πλούσιες σε GC θα μπορούσαν να μην ανιχνευθούν σωστά δεδομένης της υψηλής θερμοκρασίας τήξης του προϊόντος.

Τέλος, όταν εξετάστηκε η ευαισθησία της HRM για την ανίχνευση άγνωστων πολυμορφισμών σε μη-κωδικές περιοχές του γονιδίου *TP53*, τα αποτελέσματα της γονοτύπησης επιβεβαιώθηκαν πλήρως από την αλληλούχηση που ακολούθησε⁶⁰.

Γενικά, η HRM θα πρέπει να ακολουθείται από αλληλούχηση όλων των δειγμάτων DNA που δεν μπορούν να γονοτυπηθούν με σαφήνεια. Επίσης, όταν εξετάζονται λίγα δείγματα η απευθείας αλληλούχηση είναι μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος ενώ όταν αυξάνεται ο αριθμός των δειγμάτων η HRM αρχικά και η αλληλούχηση ενός δείγματος από την κάθε γονοτυπική ομάδα στην συνέχεια είναι σαφώς πιο οικονομική και δίνει την δυνατότητα δημιουργίας πρότυπων καμπυλών για μελλοντική χρήση και γονοτύπηση⁶¹.

Είναι σημαντικό λοιπόν να γίνει αλληλούχηση για όλους τους διαφορετικούς γονοτύπους που βρέθηκαν στα πλαίσια της παρούσης εργασίας και μελλοντικά αυτοί να συσχετιστούν με την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με απρεμιλάστη. Αυτό θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης με τη θεραπεία και μελλοντικά για τη χορήγηση εξατομικευμένης θεραπευτικής αγωγής για την ψωρίαση και την πρόβλεψη της απόκρισης των ασθενών στην απρεμιλάστη με βάση το γενετικό τους υπόβαθρο.

Μέχρι στιγμής στην μοναδική φαρμακογενετική μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί για την απρεμιλάστη ως θεραπεία για την ψωρίαση έλαβε μέρος ένας μικρός αριθμός ασθενών με μέτρια έως σοβαρή μορφή της νόσου³⁸. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης συσχέτισαν την απόκριση στην θεραπεία με έναν μεγάλο αριθμό πολυμορφισμών σε 4 διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι περισσότεροι από τους πολυμορφισμούς αυτούς βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος με άγνωστη λειτουργία ενώ μόνον ένας από αυτούς βρέθηκε σε γονίδιο, στο *ARSF*.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, δείγματα DNA που ελήφθησαν από ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με απρεμιλάστη γονοτυπήθηκαν με βάση την ύπαρξη ενός συγκεκριμένου SNP στο γονίδιο *PDE4C* που κωδικοποιεί την φωσφοδιεστεράση 4, το ένζυμο του οποίου την δραστηριότητα στοχεύει να καταστείλει η απρεμιλάστη. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η

συγκεκριμένη μελέτη θα πρέπει να ακολουθήσει αλληλούχηση των προϊόντων PCR σε ένα δείγμα από την κάθε γονοτυπική ομάδα και όλων των δειγμάτων που δεν έχουν ενταχθεί με σαφήνεια σε κάποια γονοτυπική ομάδα. Κατόπιν της αλληλούχηση θα πρέπει να εξεταστεί η απόκριση των ασθενών στην θεραπεία μετά από 3 και 6 μήνες χορήγησης απρεμιλάστης και να συσχετιστεί ο γονότυπος τους με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Η παρούσα εργασία αποτελεί επί του παρόντος την βάση για τη μοναδική μελέτη συσχέτισης συγκεκριμένου πολυμορφισμού στην φωσφοδιεστεράση 4 με την απόκριση των ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση στην θεραπεία με απρεμιλάστη.

Βιβλιογραφία

- 1 Farber, E. M. & Nall, M. L. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica* **148**, 1-18, doi:10.1159/000251595 (1974).
- 2 Alshobaili, H. A. *et al.* Genetic background of psoriasis. *Int J Health Sci (Qassim)* **4**, 23-29 (2010).
- 3 Nestle, F. O., Kaplan, D. H. & Barker, J. Psoriasis. *N Engl J Med* **361**, 496-509, doi:10.1056/NEJMra0804595 (2009).
- 4 Griffiths, C. E. & Barker, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* **370**, 263-271, doi:10.1016/S0140-6736(07)61128-3 (2007).
- 5 Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E. & Raychaudhuri, S. P. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev* **13**, 490-495, doi:10.1016/j.autrev.2014.01.008 (2014).
- 6 Boehncke, W. H. & Schon, M. P. Psoriasis. *Lancet* **386**, 983-994, doi:10.1016/S0140-6736(14)61909-7 (2015).
- 7 Bowcock, A. M. & Krueger, J. G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* **5**, 699-711, doi:10.1038/nri1689 (2005).
- 8 Singh, S. *et al.* Genomic alterations driving psoriasis pathogenesis. *Gene* **683**, 61-71, doi:10.1016/j.gene.2018.09.042 (2019).
- 9 Bowes, J. *et al.* Cross-phenotype association mapping of the MHC identifies genetic variants that differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. *Ann Rheum Dis* **76**, 1774-1779, doi:10.1136/annrheumdis-2017-211414 (2017).
- 10 Ogawa, K. & Okada, Y. The current landscape of psoriasis genetics in 2020. *J Dermatol Sci* **99**, 2-8, doi:10.1016/j.jdermsci.2020.05.008 (2020).
- 11 Nair, R. P. *et al.* Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* **78**, 827-851, doi:10.1086/503821 (2006).
- 12 Ran, D., Cai, M. & Zhang, X. Genetics of psoriasis: a basis for precision medicine. *Precision Clinical Medicine* **2**, 120-130, doi:10.1093/pcmedi/pbz011 %J Precision Clinical Medicine (2019).
- 13 Zhou, F. *et al.* Epigenome-Wide Association Analysis Identified Nine Skin DNA Methylation Loci for Psoriasis. *J Invest Dermatol* **136**, 779-787, doi:10.1016/j.jid.2015.12.029 (2016).
- 14 Zuo, X. *et al.* Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nat Commun* **6**, 6793, doi:10.1038/ncomms7793 (2015).
- 15 Beringer, A., Noack, M. & Miossec, P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med* **22**, 230-241, doi:10.1016/j.molmed.2016.01.001 (2016).
- 16 Sun, L. D. *et al.* Association analyses identify six new psoriasis susceptibility loci in the Chinese population. *Nat Genet* **42**, 1005-1009, doi:10.1038/ng.690 (2010).
- 17 Kim, W. B., Jerome, D. & Yeung, J. Diagnosis and management of psoriasis. *Can Fam Physician* **63**, 278-285 (2017).
- 18 Rendon, A. & Schakel, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20061475 (2019).
- 19 Zhang, P. & Wu, M. X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers Med Sci* **33**, 173-180, doi:10.1007/s10103-017-2360-1 (2018).
- 20 Ronholt, K. & Iversen, L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18112297 (2017).
- 21 Relling, M. V. & Evans, W. E. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature* **526**, 343-350, doi:10.1038/nature15817 (2015).
- 22 Krynetski, E. Y. & Evans, W. E. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res* **16**, 342-349, doi:10.1023/a:1011909315614 (1999).
- 23 Ovejero-Benito, M. C. *et al.* Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *Am J Clin Dermatol* **19**, 209-222, doi:10.1007/s40257-017-0322-9 (2018).

- 24 Fulton, C. R. *et al.* Pharmacogenetics and Practice: Tailoring Prescribing for Safety and Effectiveness. *J Nurse Pract* **14**, 697-704 e691, doi:10.1016/j.nurpra.2018.09.021 (2018).
- 25 Valdes, R., Jr. & Yin, D. T. Fundamentals of Pharmacogenetics in Personalized, Precision Medicine. *Clin Lab Med* **36**, 447-459, doi:10.1016/j.cll.2016.05.006 (2016).
- 26 McDonagh, E. M. *et al.* PharmGKB summary: very important pharmacogene information for G6PD. *Pharmacogenet Genomics* **22**, 219-228, doi:10.1097/FPC.0b013e32834eb313 (2012).
- 27 Roden, D. M., Wilke, R. A., Kroemer, H. K. & Stein, C. M. Pharmacogenomics: the genetics of variable drug responses. *Circulation* **123**, 1661-1670, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.914820 (2011).
- 28 Gray, I. C., Campbell, D. A. & Spurr, N. K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* **9**, 2403-2408, doi:10.1093/hmg/9.16.2403 (2000).
- 29 Talamonti, M., D'Adamio, S., Bianchi, L. & Galluzzo, M. The Role of Pharmacogenetics in Chronic Plaque Psoriasis: Update of the Literature. *Mol Diagn Ther* **21**, 467-480, doi:10.1007/s40291-017-0274-z (2017).
- 30 Ranganathan, P. & McLeod, H. L. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 1366-1377, doi:10.1002/art.21762 (2006).
- 31 Warren, R. B. *et al.* Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* **128**, 1925-1929, doi:10.1038/jid.2008.16 (2008).
- 32 Menter, A. *et al.* Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *J Am Acad Dermatol* **61**, 451-485, doi:10.1016/j.jaad.2009.03.027 (2009).
- 33 Mizutani, H., Ohmoto, Y., Mizutani, T., Murata, M. & Shimizu, M. Role of increased production of monocytes TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in psoriasis: relation to focal infection, disease activity and responses to treatments. *J Dermatol Sci* **14**, 145-153, doi:10.1016/s0923-1811(96)00562-2 (1997).
- 34 Louis, E. *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* **113**, 401-406, doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00662.x (1998).
- 35 Vasilopoulos, Y. *et al.* Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Mol Diagn Ther* **16**, 29-34, doi:10.2165/11594660-000000000-0000010.1007/BF03256427 (2012).
- 36 Gallo, E. *et al.* The relationship between tumour necrosis factor (TNF)-alpha promoter and IL12B/IL-23R genes polymorphisms and the efficacy of anti-TNF-alpha therapy in psoriasis: a case-control study. *Br J Dermatol* **169**, 819-829, doi:10.1111/bjd.12425 (2013).
- 37 van den Reek, J. *et al.* Polymorphisms in CD84, IL12B and TNFAIP3 are associated with response to biologics in patients with psoriasis. *Br J Dermatol* **176**, 1288-1296, doi:10.1111/bjd.15005 (2017).
- 38 Verbenko, D. A. *et al.* Apremilast Pharmacogenomics in Russian Patients with Moderate-to-Severe and Severe Psoriasis. *J Pers Med* **11**, doi:10.3390/jpm11010020 (2020).
- 39 Schafer, P. H. *et al.* Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal* **26**, 2016-2029, doi:10.1016/j.cellsig.2014.05.014 (2014).
- 40 Schafer, P. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochem Pharmacol* **83**, 1583-1590, doi:10.1016/j.bcp.2012.01.001 (2012).
- 41 Rich, P. *et al.* Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with difficult-to-treat nail and scalp psoriasis: Results of 2 phase III randomized, controlled trials (ESTEEM 1 and ESTEEM 2). *J Am Acad Dermatol* **74**, 134-142, doi:10.1016/j.jaad.2015.09.001 (2016).

- 42 Houslay, M. D., Baillie, G. S. & Maurice, D. H. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* **100**, 950-966, doi:10.1161/01.RES.0000261934.56938.38 (2007).
- 43 Beard, M. B. *et al.* UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem* **275**, 10349-10358, doi:10.1074/jbc.275.14.10349 (2000).
- 44 Valones, M. A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* **40**, 1-11, doi:10.1590/S1517-83822009000100001 (2009).
- 45 Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491, doi:10.1126/science.2448875 (1988).
- 46 Green, M. R. & Sambrook, J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, doi:10.1101/pdb.prot095117 (2018).
- 47 Lorenz, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, e3998, doi:10.3791/3998 (2012).
- 48 Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E. & Wittwer, C. T. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin Chem* **51**, 1295-1298, doi:10.1373/clinchem.2005.051516 (2005).
- 49 Er, T. K. & Chang, J. G. High-resolution melting: applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta* **414**, 197-201, doi:10.1016/j.cca.2012.09.012 (2012).
- 50 Montgomery, J. L., Sanford, L. N. & Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **10**, 219-240, doi:10.1586/erm.09.84 (2010).
- 51 Erali, M., Voelkerding, K. V. & Wittwer, C. T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* **85**, 50-58, doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.012 (2008).
- 52 Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T. & Voelkerding, K. V. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* **52**, 494-503, doi:10.1373/clinchem.2005.063438 (2006).
- 53 Erali, M. & Wittwer, C. T. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* **50**, 250-261, doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.013 (2010).
- 54 Tucker, E. J. & Huynh, B. L. Genotyping by high-resolution melting analysis. *Methods Mol Biol* **1145**, 59-66, doi:10.1007/978-1-4939-0446-4_5 (2014).
- 55 Reed, G. H., Kent, J. O. & Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**, 597-608, doi:10.2217/14622416.8.6.597 (2007).
- 56 Slomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G. & Strapagiel, D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18112316 (2017).
- 57 Slomka, M. *et al.* Genetic variation of the ABC transporter gene ABCC1 (Multidrug resistance protein 1-MRP1) in the Polish population. *BMC Genet* **16**, 114, doi:10.1186/s12863-015-0271-3 (2015).
- 58 Valisheva, I., Harris, R. J. & Zhu-Shimoni, J. A sensitive mutation screening method supporting cell line development for biotherapeutics. *Anal Biochem* **505**, 73-75, doi:10.1016/j.ab.2016.04.007 (2016).
- 59 Garritano, S. *et al.* Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics* **10**, 5, doi:10.1186/1471-2156-10-5 (2009).
- 60 Thomas, V. *et al.* UGT1A1 (TA)_n genotyping in sickle-cell disease: high resolution melting (HRM) curve analysis or direct sequencing, what is the best way? *Clin Chim Acta* **424**, 258-260, doi:10.1016/j.cca.2013.06.023 (2013).

