



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Φαρμακογενετική της απρεμιλάστης σε ασθενείς με ψωρίαση

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Τσιάτσaros Αργύριος του Γεωργίου

Ακαδημαϊκό έτος: 2021-2022

“Φαρμακογενετική της απρεμιλάστης
σε ασθενείς με ψωρίαση”

“Pharmacogenetics of apremilast in
patients with psoriasis”

Τριμελής επιτροπή

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

Λιαδάκη Καλλιόπη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής
Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας –
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζαφειρίου Ευτέρπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Δερματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, είχα την τιμή να συνεργαστώ με ανθρώπους οι οποίοι με την εμπειρία, τη βοήθεια και την υποστήριξή τους σε πρακτικό και ψυχολογικό επίπεδο, με βοήθησαν να ολοκληρώσω το πείραμά μου. Για το λόγο αυτό, θα ήθελα να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, καθώς χωρίς αυτούς θα υπήρχαν αρκετές δυσκολίες.

Πρώτα από όλα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου στην κυρία Σαραφίδου Θεολογία, η οποία ήταν η επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς ήταν αυτή που μου έδωσε την ευκαιρία να προσπαθήσω να ολοκληρώσω το πρώτο προσωπικό μου πείραμα, με τις προσωπικές μου επιτυχίες και αποτυχίες. Χάρη στην εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου, ήρθα σε μία πρώτη επαφή με τον χώρο της επιστήμης, ενώ οι γνώσεις, οι εμπειρίες, η καθοδήγηση, η συνεχής βοήθεια και ο χρόνος της ήταν καθοριστικοί παράγοντες στην ολοκλήρωση του πειράματος. Χάρη στα παραπάνω που μου μετέδωσε κατάφερα να αναπτύξω πιο σωστή επιστημονική σκέψη και να καταλάβω ότι μου ταιριάζει και με αντιπροσωπεύει αυτός ο τομέας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη και την κυρία Ζαφειρίου Ευτέρπη που συμμετείχαν στην τριμελή επιτροπή της συγκεκριμένης εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την υποστήριξη, το ενδιαφέρον αλλά και την άμεση βοήθεια τους σε κάθε ερώτημα και δυσκολία που μου παρουσιαζόταν.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου, καθώς χωρίς αυτήν τίποτα δε θα ήταν εφικτό. Οι γονείς μου σε κάθε δυσκολία έκαναν πολλές θυσίες ώστε να ήταν πάντα παρόντες σε κάθε δυσκολία που μου παρουσιαζόταν για αυτό τους οφείλω ό,τι έχω καταφέρει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό (ύπαρξη γενετικής και περιβαλλοντικής συνιστώσας), φλεγμονώδες, δερματικό, αυτοάνοσο νόσημα το οποίο επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Όπως για τα περισσότερα αυτοάνοσα, έτσι και για την ψωρίαση δεν έχει βρεθεί οριστική θεραπεία και η αντιμετώπιση της ασθένειας αφορά κυρίως τη μείωση των δερματικών βλαβών. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες φαρμάκων έναντι της ψωρίασης, μεταξύ των οποίων οι συμβατικές θεραπείες, τα βιολογικά φάρμακα αλλά και οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους. Ένας τέτοιος αναστολέας είναι η απρεμιλάστη, η οποία είναι ένας από του στόματος εκλεκτικός αναστολέας του ενζύμου φωσφοδιεστεράση-4 (PDE4), το οποίο, φυσιολογικά διασπά την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP). Η απρεμιλάστη, αναστέλλοντας την PDE4, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της cAMP, με άμεση συνέπεια τη μείωση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως ο TNFα, η ιντερλευκίνη 17 και 23 καθώς και την αύξηση αντι-φλεγμονωδών παραγόντων όπως η ιντερλευκίνη 10.

Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στη μελέτη της συσχέτισης ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs4804134 (T/A/G) στο γονίδιο *PDE4A* και στην απόκριση των ασθενών με ψωρίαση που λαμβάνουν θεραπεία με απρεμιλάστη. Για το σκοπό αυτό, έγινε γονοτύπηση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε δείγμα 29 ασθενών που έλαβαν απρεμιλάστη. Η γονοτύπηση πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση προϊόντων PCR, ταυτοποιήθηκαν 20 ετερόζυγοι ασθενείς (T/G), 1 ασθενής ομόζυγος για το αλληλόμορφο G (G/G) και 8 ασθενείς ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T (T/T). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού με την απόκριση στη θεραπεία, ωστόσο η αξιολόγηση της συσχέτισης θα επαναληφθεί όταν ολοκληρωθεί η συλλογή και γονοτύπηση περισσότερων δειγμάτων, ώστε να είναι αξιόπιστη η στατιστική ανάλυση.

ABSTRACT

Psoriasis is a multifactorial (existence of genetic and environmental factors), inflammatory, skin, autoimmune disease which is influenced by the human immune system. As with most autoimmune diseases, no definitive cure has been found for psoriasis and the treatment of the disease mainly involves reducing the skin lesions. There are several classes of psoriasis medications, including conventional treatments, biologic drugs and low molecular weight inhibitors. One such inhibitor is apremilast, which is an oral selective inhibitor of the enzyme phosphodiesterase-4 (PDE4), which normally breaks down cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Apremilast, by inhibiting PDE4 leads to an increase of cAMP levels, with a direct consequence of the reduction of pro-inflammatory factors such as TNF α , interleukin 17 and 23 as well as an increase of anti-inflammatory factors such as interleukin 10.

This study focuses on the analysis of the association between the rs4804134 (T/A/G) polymorphism of the *PDE4A* gene and the response of psoriasis patients treated with apremilast. For this purpose, genotyping of the specific polymorphism in a sample of 29 patients who received apremilast was deemed necessary. Genotyping was accomplished with the help of sequencing, which is a method of reading DNA, allowing the detection of changes in it, the correlation with diseases and phenotypes and the identification of potential drug targets. Thanks to sequencing, 20 heterozygous patients (T/G), 1 patient homologous for the G allele (G/G) and 7 patients homologous for the T allele (T/T) were identified. An association analysis of the polymorphism with treatment response was carried out, however the correlation assessment will be repeated when more samples are collected genotyped, so that the statistical analysis will be reliable.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ψωρίαση.....	8
1.1.1. Τύποι και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ψωρίασης.....	8
1.1.2. Εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου.....	10
1.1.3. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ψωρίασης.....	10
1.1.4. Ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην ψωρίαση.....	11
1.1.5. Γενετική βάση της ασθένειας.....	13
1.1.6. Κληρονομησιμότητα της ψωρίασης.....	14
1.2. Θεραπεία της ψωρίασης.....	15
1.2.1. Φαρμακογενετική των συμβατικών συστημικών φαρμάκων.....	16
1.2.2. Φάρμακα κατά του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α).....	17
1.2.3. Φάρμακα κατά της Ιντερλευκίνης 12/23 (IL12/23).....	18
1.3. Η φωσφοδιεστεράση-4 (PDE4).....	19
1.3.1. Αναστολή της PDE4.....	20
1.4. Η απρεμιλάστη ως αναστολέας της PDE4 στη θεραπεία της ψωρίασης.....	22
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
3.1. Δείγματα μελέτης.....	25
3.2. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism – SNP) rs4804134 του γονιδίου <i>PDE4A</i>	25
3.3. Απομόνωση DNA.....	26
3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	28
3.5. Αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης.....	30
3.6. Η αλληλουχία των εκκινήτων για τον πολυμορφισμό rs4804134.....	32
3.7. Βελτιστοποίηση της PCR.....	33

3.8. Αλληλούχηση των προϊόντων της PCR.....	33
3.9. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	34
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
4.1. Βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για τον πολυμορφισμό rs4804134 του γονιδίου <i>PDE4A</i>	35
4.2. PCR για τον πολυμορφισμό rs4804134.....	36
4.3. Αλληλούχηση δειγμάτων και ανίχνευση του πολυμορφισμού rs4804134.....	39
4.4. Έλεγχος χ^2	63
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση αποτελεί μία χρόνια, υποτροπιάζουσα και φλεγμονώδη δερματική ασθένεια η οποία επηρεάζεται και από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. Κύριο χαρακτηριστικό της οι έντονα οριοθετημένες, ερυθηματώδεις πλάκες οι οποίες καλύπτονται με λευκά συνήθως λέπια (A. Rendon et al. , 2019). Αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή φλεγμονώδη δερματική νόσο, με αυξανόμενη συχνότητα τα τελευταία χρόνια. Στατιστικά, η ασθένεια επηρεάζει το 2-4% του πληθυσμού παγκοσμίως και σε γενικές γραμμές δεν υπάρχουν διαφορές ανάλογα με το φύλο. Έχουν παρατηρηθεί 2 τύποι της ψωρίασης, ο τύπος I όταν η ασθένεια εμφανίζεται στην ηλικιακή ομάδα 20 με 30 ετών, ενώ ο τύπος II εμφανίζεται στην ηλικιακή ομάδα 50 με 60 ετών (E. Pezzolo & L. Naldi, 2020). Η νόσος παρουσιάζει επιπολασμό με μεγάλη ποικιλότητα σε διαφορετικούς πληθυσμούς καθώς κυμαίνεται από 0.24% στην Ταϊβάν μέχρι 8.5% στη Νορβηγία (IM. Michalek et al. , 2017).

Παλαιότερα, αποτελούσε αποκλειστικά δερματοπάθεια ενώ σήμερα είναι γνωστή ως συστημακή φλεγμονώδης νόσος (A. Rendon, K. Schakel, 2019). Ο μηχανισμός που προκαλεί τη φλεγμονή συμβάλλει και στην συννοσηρότητα (J. Machado-Pinto et al. , 2016). Είναι γνωστό ότι περίπου 7/10 ασθενείς αναπτύσσουν τουλάχιστον ένα συνοδό νόσημα. Τα πιο κοινά είναι η ψωριασική αρθρίτιδα καθώς και η νόσος του Crohn (J. Takeshita et al. , 2017). Βέβαια, υπάρχει κίνδυνος και για άλλες ασθένειες όπως το μεταβολικό σύνδρομο, η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, η νόσος Hashimoto, η αυτοάνοση ηπατίτιδα, η σκλήρυνση κατά πλάκας κ.ά. (M. Furue, T. Kadono, 2017). Έχει αναφερθεί ότι σοβαρή νόσος μειώνει το προσδόκιμο ζωής σε κατά 3.5 χρόνια στους άνδρες και κατά 4.5 στις γυναίκες (DA. Springate et al. , 2017).

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η ψωρίαση δεν είναι πλήρως κατανοητός, όμως πρόκειται για μία πολυπαραγοντική ασθένεια καθώς οφείλεται τόσο σε περιβαλλοντικούς όσο και σε γενετικούς παράγοντες και επηρεάζεται σαφώς και από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου (F. Caron, 2017).

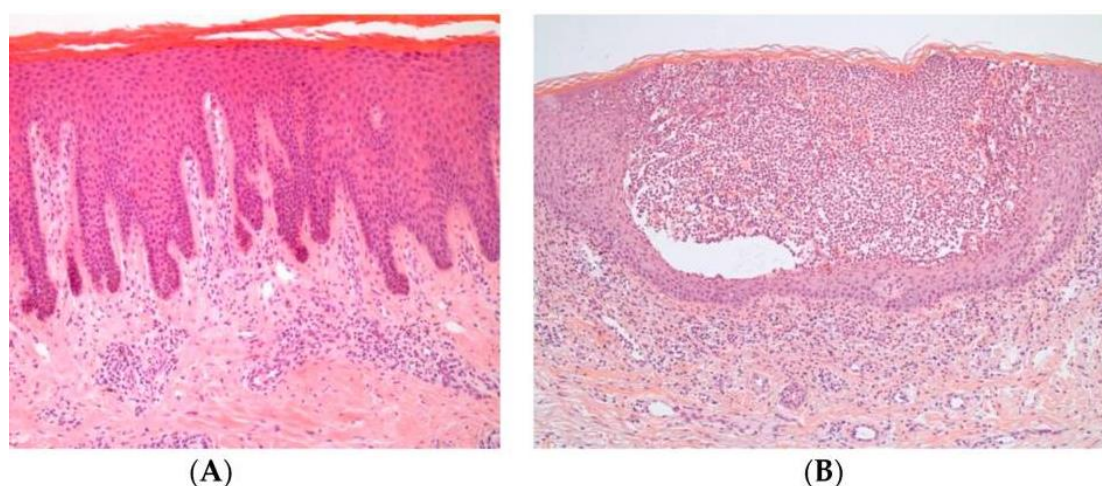
1.1.1 Τύποι και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ψωρίασης

Παρατηρείται ποικιλότητα όσον αφορά τις δερματολογικές εκδηλώσεις της ψωρίασης. Υπάρχουν διαφορετικοί κλινικοί υπότυποι και σημαντικές διακρίσεις ανάμεσά τους. Σήμερα, είναι γνωστοί οι παρακάτω τύποι της ασθένειας :

- Ψωρίαση Vulgaris ή ψωρίαση κατά πλάκας
- Ανάστροφη ψωρίαση
- Φλυκταινώδης ψωρίαση
- Ερυθροδερμική ψωρίαση
- Ψωριασική αρθρίτιδα
- Ψωριασική ονυχία

Η ψωρίαση κατά πλάκας αποτελεί περίπου το 90% των περιπτώσεων της ασθένειας και χαρακτηρίζεται από ερυθματώδεις και κνησμώδεις πλάκες καλυμμένες με ασημόλευκα λέπια. Η ανάστροφη ψωρίαση ή ψωρίαση των πτυχών έχει ως χαρακτηριστικό ελαφρώς διαβρωτικές ερυθματώδεις πλάκες χωρίς απολέπιση (J. Ortonne et al. , 2009). Βασικό χαρακτηριστικό της φλυκταινώδους μορφής είναι οι πολλαπλές συγχωνευόμενες στείρες φλύκταινες (AA. Navarini et al. , 2017). Κατά την ερυθροδερμική ψωρίαση, πάνω από το 90% της επιφάνειας του σώματος είναι ερυθματώδεις και φλεγμονώδεις.

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από φλεγμονή που έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την λανθασμένη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Ιστοπαθολογικά εμφανίζεται ακάνθωση δηλαδή επιδερμική υπερπλασία και φλεγμονώδεις διηθήσεις. Οι διηθήσεις αυτές αποτελούνται από μακροφάγα, ουδετερόφιλα, T κύτταρα και δερματικά δενδριτικά κύτταρα (A. Rendon et al. , 2019). Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά 2 κύριων τύπων ψωρίασης απεικονίζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Ιστοπαθολογία της ψωρίασης. (A) Ψωρίαση κατά πλάκας: Χαρακτηριστική ακάνθωση, υπερκεράτωση (πάχυνση της κεράτινης στιβάδας) και δερματικές φλεγμονώδεις διηθήσεις. (B) Φλυκταινώδης ψωρίαση: Ακάνθωση συνοδευόμενη από διηθήσεις με ουδετερόφιλα, με συνέπεια τον σχηματισμό φλυκταίων (A. Rendon et al. , 2019).

1.1.2. Εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου

Για να αξιολογηθεί η βαρύτητα των συμπτωμάτων της ψωρίασης χρησιμοποιούνται συνήθως τα εξής εργαλεία:

- PASI: Έκταση και σοβαρότητα της νόσου ανά ανατομική περιοχή
- BSA: Εμβαδόν επιφάνειας σώματος
- PGA: Αξιολόγηση γιατρού
- DLQI: Δείκτης ποιότητας ζωής

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο είναι το PASI, που βοηθάει στην εκτίμηση της έκτασης και της σοβαρότητας των βλαβών και έχει μία κλίμακα 0-72. Τα PASI 50, 75 και 90 χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της ποσοστιαίας βελτίωσης της νόσου από την έναρξη της θεραπείας, για παράδειγμα PASI 50 σημαίνει 50% βελτίωση. Γενικά, το PASI 75 αποτελεί τιμή στόχο για αποδεκτό θεραπευτικό αποτέλεσμα αν και τα τελευταία χρόνια ο στόχος είναι αρκετά υψηλότερος (PASI 90 και 100, δηλαδή σχεδόν πλήρης και πλήρης κάθαρση). Το PGA βασίζεται στην αξιολόγηση της ερυθρότητας και απολέπισης με κλίμακα 0-4, όπου 0 σημαίνει καθόλου εξάνθημα και 4 σοβαρή ψωρίαση. Το BSA δείχνει την ποσοστιαία επιφάνεια του δέρματος που καλύπτεται από ψωρίαση. Το DLQI εκτιμά κατά πόσο η ασθένεια επηρέασε τη ζωή του ασθενούς με κλίμακα 0-30.

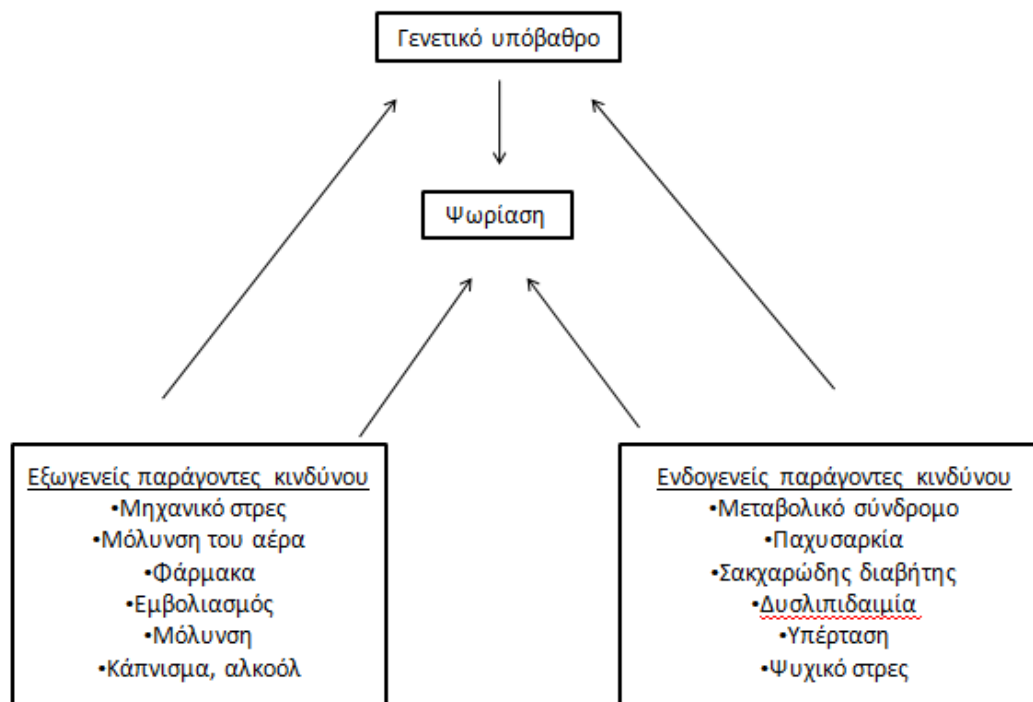
Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω, οι τιμές αναφοράς είναι οι εξής :

- ήπια: PASI <3, PGA <2, BSA <3, DLQI ≤5
- μέτρια: PASI 4–10, PGA = 3, BSA 3–10, DLQI 6–10
- σοβαρή: PASI >10, PGA = 4, BSA >10, DLQI >10 (A. Osmanovic et al. , 2017)

1.1.3. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ψωρίασης

Είναι γνωστό ότι η ψωρίαση οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γενετικό υπόβαθρο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη νόσηση (R. Parisi et al. , 2013). Σε άτομα με γενετική προδιάθεση, η πυροδότηση της νόσου μπορεί να γίνει από διάφορους παράγοντες. Για παράδειγμα, σε προηγούμενες μελέτες σε Ιάπωνες που διήρκησαν από το 1982 ως το 2012, οι παράγοντες αυτοί βρέθηκε ότι ήταν το άγχος, η εποχή, η μόλυνση αλλά και η έκθεση στον ήλιο (A. Kawada et al. , 2013 & T.Ito et al. , 2018). Στην έρευνα παρατηρήθηκαν και συννοσηρότητες όπως υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, αμυγδαλίτιδα κ.ά. (H.Takahashi et al. , 2011). Με βάση τα παραπάνω, οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας

μπορούν να χωριστούν σε 2 ομάδες, σε ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.



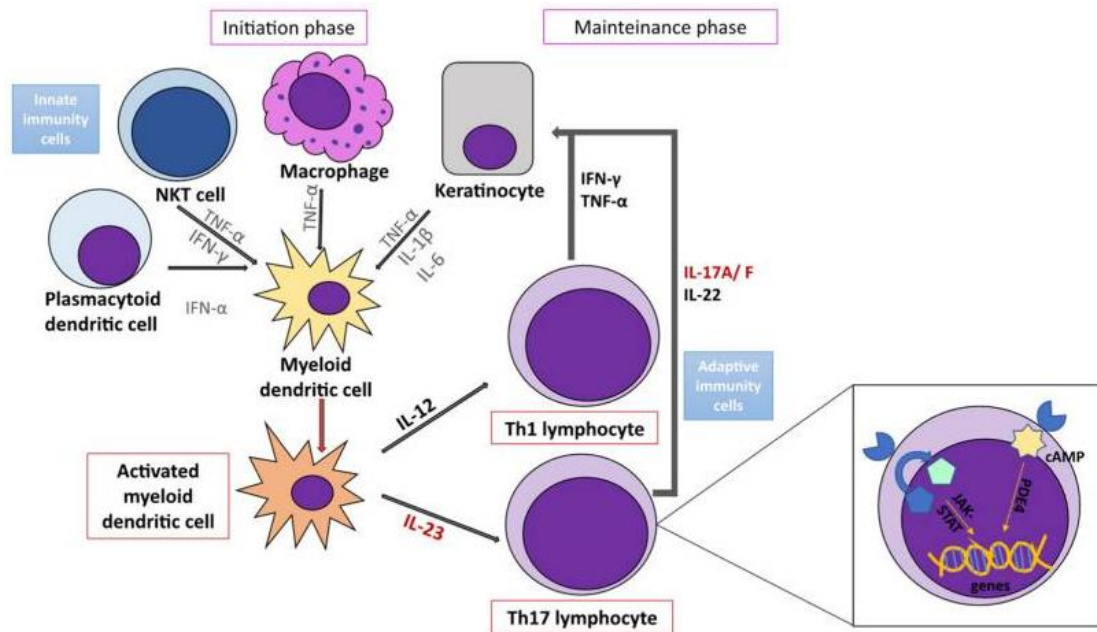
Εικόνα 2: Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση και την έξαρση της ψωρίασης. Εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες σχετίζονται με την εμφάνιση και την έξαρση της ψωρίασης (Προσαρμογή από K. Kamiya et al. , 2019).

1.1.4. Ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην ψωρίαση

Έχει βρεθεί ότι διαταραχές στο ανοσοποιητικό σύστημα σχετίζονται σημαντικά με την παθογένεση της ψωρίασης. Η έναρξη και διατήρηση της ασθένειας οφείλεται στην αμοιβαία αλληλεπίδραση εγγενών και προσαρμοστικών κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα, τα T λεμφοκύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα (M. Vicić et al. , 2021). Τα κερατινοκύτταρα συμβάλλουν στην πυροδότηση έμφυτων και προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων και αποτελούν τον κύριο δερματικό τύπο που εκφράζει υποδοχείς IL-17 , συνεπώς το ανοσοποιητικό κύκλωμα ενισχύεται από κερατινοκύτταρα που εκφράζουν προφλεγμονώδη μόρια. Η ρύθμιση της ενεργοποίησης των T κυττάρων και η παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών που ενισχύουν τη φλεγμονή γίνεται από τα δερματικά μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα. Η

πλειοψηφία των ψωριασικών T κυττάρων συμβάλλουν στην παραγωγή ιντερφερόνης- γ , ιντερλευκίνης-17 και-22 (J. Kim & J. Krueger, 2015).

Η ανάπτυξη της ψωρίασης περιλαμβάνει δύο φάσεις, τη φάση έναρξης και τη φάση συντήρησης της νόσου. Σύμπλοκα DNA με το αντιμικροβιακό πεπτίδιο καθελιδίνη (LL-37), που απελευθερώνεται από τραυματισμένα κερατινοκύτταρα, διεγείρουν πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (Pdc). Τα pdc με τη σειρά τους πυροδοτούν τον προφλεγμονώδη καταρράκτη κυτοκίνης (K. Ronholt et al. , 2017). Ομοίως, από κατεστραμμένα μελανοκύτταρα είναι πιθανή η παραγωγή της ADAMTS-like protein 5, που είναι ένα άλλο αυτοαντιγόνο στην ψωρίαση (Jorg Christoph Prinz, 2017). Σε απόκριση παραγωγής του αντιγόνου αυτού, τα pDCs εκκρίνουν μία βασική κυτοκίνη της φάσης έναρξης, την IFN- α . Η IFN- α παίζει σημαντικό ρόλο στην στρατολόγηση των τοπικών μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων(mDCs) και στην μετανάστευσή τους στους περιφερειακούς λεμφαδένες (S. R. Georgescu et al. , 2019). Στη στρατολόγηση των mDCs συμβάλλουν επίσης και τα κερατινοκύτταρα και τα μακροφάγα μέσω έκκρισης INF- γ , TNF- α , IL-1- β και IL-6. Τα μεταναστευμένα mDCs οδηγούν στην παραγωγή TNF- α , IL-12 και IL-23. Αυτά με τη σειρά τους διαφοροποιούν τα T-λεμφοκύτταρα σε ώριμα TH1, TH17 και TH22, που μπορούν να επιβιώνουν στο δέρμα. Από τα TH1 απελευθερώνονται τα IFN- γ και TNF- α , ενώ από τα TH17 εκκρίνεται η προφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-17A (C. Conrad et al. , 2018). Από το μονοπάτι IL-23/Th17 (απεικονίζεται στην εικόνα 3) παράγονται οι κυτοκίνες IL-22 και IL-17A/F, οι οποίες διαφοροποιούν τα κερατινοκύτταρα και προκαλούν τον φαινότυπο της ψωρίασης (A. Chiricozzi et al. , 2018). Κατά τη φάση διατήρησης της νόσου σημαντικό ρόλο έχουν και τα κερατινοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν AMP, κυτοκίνες και χημειοκίνες. Αυτά ενεργοποιούν περαιτέρω τα T λεμφοκύτταρα και κινητοποιούν άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα οδηγώντας σε χρόνια φλεγμονή (K. Ronholt et al. , 2017). Οι κυτοκίνες οδηγούν σε ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών οδών. Δηλαδή, οι INF- γ , IL-12, IL-22 και IL-23 ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK-STAT, ενώ η φωσφοδιεστεράση PDE-4 αναστέλλει την αντιφλεγμονώδη δράση του cAMP (W. Alwan et al. , 2015).



Εικόνα 3: Σηματοδοτικές οδοί και τελεστικά κύτταρα στην ανοσοπαθογένεση της ψωρίασης. Κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως κερατινοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα πυροδοτούν έναν φλεγμονώδη καταρράκτη που οδηγεί σε ανοσοπαθογένεση. Η αλληλεπίδραση των κυττάρων αυτών με τα προσαρμοστικά T λεμφοκύτταρα συμβάλλει στην διατήρηση και εξέλιξη της ασθένειας. Το μονοπάτι IL-23/Th17 αποτελεί το βασικό μηχανισμό της ασθένειας σύμφωνα με το οποίο, οι κυτοκίνες IL-22 και IL-17A/F οδηγούν σε πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων, παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών και AMP και σχηματισμό βρόχου θετικής ανάδρασης, που διατηρεί τη φλεγμονώδη διαδικασία. Οι κυτοκίνες στα κύτταρα ενεργοποιούν τις οδούς σηματοδότησης και μεταγραφής (cAMP, JAK-STAT), που επιτυγχάνουν αυξημένη μεταγραφή γονιδίων και κυτοκινών που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου (M. Vasic et al. , 2021).

1.1.5. Γενετική βάση της ασθένειας

Για την απόδειξη ύπαρξης γενετικής συνιστώσας στην εμφάνιση της ψωρίασης πραγματοποιήθηκαν μελέτες οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως οικογένειες, διδύμους και ανάλυση κληρονομησιμότητας. Για παράδειγμα, σε Κινέζους ασθενείς, περίπου το 30% είχε οικογενειακό ιστορικό ψωρίασης, ενώ η κληρονομησιμότητα σε συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού ήταν 67% και 47% αντίστοιχα (X. Zhang et al. , 2002). Επιπλέον, τα τελευταία 20 χρόνια οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε μονοζυγωτικούς (MZ) και διζυγωτικούς (ΔΖ) διδύμους, με τους MZ να έχουν μεγαλύτερα ποσοστά συμπτωτικότητας για την εμφάνιση της ψωρίασης (E. Generali et al. , 2017 & AS. Lonnberg et al. , 2013).

Με τη χρήση γενετικών δεικτών πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση σε μέλη οικογενειών και έγινε ανάλυση σύνδεσης. Η μελέτη εντόπισε 15 περιοχές ευαισθησίας στην ψωρίαση που ονομάστηκαν Psoriasis Susceptibility 1-15 (PSORS1-15), οι οποίες αποτελούν τους κύριους παράγοντες που συμβάλλουν

στη γενετική παθογένεση της ασθένειας (S. Singh et al. , 2019). Η πιο σημαντική είναι η περιοχή PSORS1, που ευθύνεται για το 35-50% των περιπτώσεων ψωρίασης (N. Dand et al. , 2020). Βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 εντός της περιοχής του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC: Major Histocompatibility Complex) (XJ. Zhang et al. , 2002).

1.1.6. Κληρονομησιμότητα της ψωρίασης

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές επικεντρώνονται σε μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS: Genome-Wide Association Studies) (N. Dand et al. , 2020). Οι GWAS είναι μια στρατηγική για την εύρεση γενετικών παραλλαγών που επηρεάζουν πολύπλοκα χαρακτηριστικά. Βασίζεται σε τεχνολογία γονοτύπησης υψηλής απόδοσης, μέσω ανάλυσης εκατομμυρίων πολυμορφισμών μεμονωμένων νουκλεοτιδίων για την εύρεση σχετικών κλινικών εκδηλώσεων ή φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Οι βοηθούν στον εντοπισμό γονιδίων και ψευδοαυτοσωματικών περιοχών που δεν έχουν ανακαλυφθεί προηγουμένως, και έτσι μπορεί να παρέχει περισσότερες ενδείξεις για την παθογένεση πολύπλοκων ασθενειών (R. Delin et al. ,2019).

Η πρώτη GWAS για την ψωρίαση δημοσιεύθηκε το 2007, που επιβεβαίωσε την *IL12B* και την *IL23R* ως τόπους κινδύνου σε Αμερικάνους (M. Cargill et al. , 2007). Μέχρι σήμερα, μέσω μιας σειράς μελετών GWAS και μετα-αναλύσεων, οι ερευνητές έχουν εντοπίσει >80 γονίδια ευαισθησίας για ψωρίαση, κυρίως για ευρωπαϊκούς και ασιατικούς πληθυσμούς. Το πρώτο GWAS της ψωρίασης σε έναν κινεζικό πληθυσμό διεξήχθη το 2009 (XJ. Zhang et al. , 2009), στην οποία εντοπίστηκε εκτός από τους ήδη γνωστούς πολυμορφισμούς εντός της περιοχής MHC και ο πολυμορφισμός rs4085613 εντός του γονιδίου *LCE* στο 1q21. Μεταγενέστερη μελέτη GWAS επιβεβαίωσε ότι τα γονίδια *ERAP1* και *ZNF816A* συσχετίστηκαν με πρώιμη έναρξη της ψωρίασης στον πληθυσμό των Κινέζων Χαν (LD. Sun et al. , 2010), ενώ GWAS σε Ευρωπαίους εντόπισαν διάφορα στα γονίδια *IL28RA*, *RELB*, *TYK2*, *ERAP1*, *TRAF3IP2*, *NOS2* και *FBXL19* (E. Ellinghaus et al. , 2010). Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μια μεγάλης κλίμακας μετα-ανάλυση δεδομένων από οκτώ ανεξάρτητες μελέτες και 439000 άτομα, η οποία εντόπισε 16 γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τα γονίδια *FASLG*, *IKBKE*, *BRAP*, *MAPKAPK5*, *TRIM47* και *TRIM65*. Περαιτέρω λειτουργική ανάλυση κατέδειξε τον σημαντικό ρόλο του καταρράκτη NF-κB και της σηματοδότησης της ιντερφερόνης για την παθοφυσιολογία της νόσου (LC. Tsoi et al. , 2017). Για την αναζήτηση γενετικών παραλλαγών που είναι κοινές μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, διεξήχθη μια μετα-ανάλυση τόσο σε κινεζικούς όσο και σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς η οποία εντόπισε τέσσερις τόπους κινδύνου, τους *LOC144817*, *COG6*, *RUNX1* και *TP63* (X. Yin et al. , 2015). Μεταξύ των γενετικών παραλλαγών που εντοπίστηκαν, η περιοχή MHC συνέβαλε σημαντικό μέρος στη γενετική παθογένεση της νόσου. Σε αυτήν την περιοχή, το πιο σημαντικό αλληλόμορφο κινδύνου είναι το *HLA-C*06:02*, το οποίο σχετίζεται με έναν υπότυπο πρώιμης έναρξης ψωρίασης και με τη σοβαρότητα της. Επιπλέον, οι ερευνητές έχουν εντοπίσει και άλλους γενετικούς τόπους που συσχετίζονται με το νόσημα στα

μόρια HLA τάξης I και τάξης II (Y. Okada et al. , 2014), όπως τα αλληλόμορφα HLA-C*12:03 , HLA-C*07:02 , HLA-C*07:04 , HLA-B*27 , HLA-B*57 , HLA-A*02:07 , HLA-DPB1*05: 01 (O. FitzGerald et al. , 2015).

1.2. Θεραπεία της ψωρίασης

Ως γνωστόν, η ψωρίαση είναι ένα πολυπαραγοντικό νόσημα που επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, γενετικούς και περιβαλλοντικούς. Επιπλέον, τα συμπτώματά της παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλότητα, και όπως ισχύει για τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα δεν έχει βρεθεί κάποια standard θεραπεία. Έχουν προταθεί διάφορες θεραπείες που στοχεύουν στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, όμως δεν ανταποκρίνονται όλοι οι ασθενείς με τον ίδιο τρόπο σε κάθε θεραπεία. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται και από τις συννοσηρότητες του καθενός (E. Sbidian et al. , 2020). Η επιτυχία ή όχι της θεραπείας κρίνεται από τη μέτρηση των 4 τιμών, PASI, BSA, PGA και DLQI με σημαντικότερο το PASI του ασθενή (A. Osmanovic et al. , 2017)

Οι θεραπείες για την ψωρίαση μπορούν να χωριστούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες: τις συμβατικές θεραπείες και τα βιολογικά φάρμακα. Οι συμβατικές θεραπείες περιλαμβάνουν τις τοπικές θεραπείες (κορτικοστεροειδή, βιταμίνη D και διάφορα ανάλογα), τη φωτοθεραπεία και τα συστημικά φάρμακα (μεθοτρεξάτη, κυκλοσπορίνη A, ακιτρετίνη). Οι ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ψωρίαση δεν ανταποκρίνονται στις τοπικές θεραπείες και στη φωτοθεραπεία, για αυτό τους χορηγούνται συστημικά φάρμακα. Ωστόσο, ένα υψηλό ποσοστό δεν ανταποκρίνεται ούτε σε αυτού του είδους θεραπεία (E. Sbidian et al. , 2020). Από την άλλη, τα βιολογικά φάρμακα είναι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και συγκεκριμένα αντισώματα ή πρωτεΐνες σύντηξης που μπλοκάρουν τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ή τους υποδοχείς τους (E. Dauden et al. , 2016). Οι διαθέσιμες ομάδες βιολογικών φαρμάκων είναι οι εξής:

- anti-TNF (όπως adalimumab, etanercept ή infliximab)
- anti-IL12/23 (ustekinumab)
- anti-IL17 (secukinumab, ixekizumab)
- υποδοχέας anti-IL17 (brodalumab)
- anti-IL23 (guselkumab, risankizumab και tildrakizumab) (R. Prieto-Perez et al. , 2013).

1.2.1. Φαρμακογενετική των συμβατικών συστημικών φαρμάκων

Μεθοτρεξάτη (mtx)

Η μεθοτρεξάτη (ανάλογο φυλλικού οξέος) είναι ένας ανοσοκατασταλτικός και αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως σε ασθενείς με μέτρια ως σοβαρή ψωρίαση (SB. Kaushik et al. , 2019 & O. Yelamos et al. , 2015). Πραγματοποιήθηκαν μελέτες βασισμένες σε υποθέσεις με σκοπό την επιλογή 16 υποψήφιων πολυμορφισμών που είχε αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την απόκριση στη μεθοτρεξάτη ή ότι είναι σημαντική στο μεταβολισμό φυλλικού οξέος-ομοκυστεΐνης. Από αυτούς, εντοπίστηκαν πέντε πιθανοί βιοδείκτες των αποτελεσμάτων της θεραπείας με μεθοτρεξάτη: πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του κύκλου μεθειονίνης GNMT, DNMT3b και BHMT (οι δύο πρώτοι συσχετίστηκαν με την αποτελεσματικότητα της μεθοτρεξάτης και ο τρίτος με ηπατοτοξικότητα) και πολυμορφισμοί για τα γονίδια ABCC2 και SLC01B1 (και τα δύο σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα) (J. Grzelj et al. , 2021).

Η μεθυλενοτετραϋδροφολική αναγωγή (MTHFR) είναι ένα κρίσιμο ένζυμο στο μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης/μεθειονίνης που καταλύει το σχηματισμό του 5-μεθυλοτετραϋδροφολικού, το οποίο είναι ο μεθυλο-δότης για τη σύνθεση της μεθειονίνης από την ομοκυστεΐνη (Hcy) (M. Kubota et al. , 2014). Η μετάλλαξη 677 C>T (rs1801133) στο MTHFR διαταράσσει τη θερμοσταθερότητά του, οδηγώντας σε ελαττωματική ενζυμική δραστηριότητα και αύξηση των επιπέδων Hcy (R. Rozen, 1996). Τα άτομα που είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο 677T έχουν μόνο το 32% της ενζυματικής δραστηριότητας MTHFR που μετράται σε άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο C άγριου τύπου, ενώ οι ετεροζυγώτες διατηρούν το 64% της ενζυματικής δραστηριότητας MTHFR άγριου τύπου. Αντίθετα, η ομοζυγωτία στη μετάλλαξη 1298 A>C (rs1801131) δεν οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα Hcy (MJ. Vieira et al. , 2019).

Η συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *MTHFR* και της ευαισθησίας στην ψωρίαση έχει υποστηριχθεί σε Καυκάσιους, Τούρκους και Κινέζους (M. Izmirli et al. , 2016 & Q. Luo et al. , 2018 & X. Zuo et al. , 2015). Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα ανέφερε ότι το αλληλόμορφο rs1801133 T και το αλληλόμορφο rs1801131 C σχετίζονταν όλα με αυξημένο κίνδυνο ψωρίασης (Q. Luo et al. , 2018). Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί μελέτες που να ερευνήσαν τη συχνότητα των πολυμορφισμών *MTHFR* σε ασθενείς με PsA στους Κινέζους πληθυσμούς των Χαν. Επιπλέον, μόνο δύο μελέτες προσπάθησαν να διερευνήσουν τη συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του *MTHFR* και της αποτελεσματικότητας της MTX στην ψωρίαση, υποδηλώνοντας και οι δύο ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές γονοτυπικές συσχετίσεις (RB. Warren et al. , 2009 & E. Campalani et al. , 2007).

1.2.2. Φάρμακα κατά του παράγοντα νέκρωσης όγκου(TNF- α)

Τα Τ βοηθητικά 17 (Th17) λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν IL22 και IL17 , τα οποία εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο ψωριασικό δέρμα (J.G. Krueger et al. , 2012). Αυτά τα λεμφοκύτταρα παράγουν επίσης IL2, IFN γ και TNF α (P. Schafer , 2012). Η προφλεγμονώδης κυτοκίνη TNF α παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης (T. Hohler et al. , 1997). Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο TNF α μπορεί να αλλάξουν την απελευθέρωση αυτής της κυτοκίνης σε υγιή άτομα (E. Louis et al. , 1998). Μια μελέτη που διεξήχθη σε Καυκάσιους ασθενείς με πρώιμη έναρξη ψωρίασης έδειξε ισχυρή συσχέτιση με πολυμορφισμούς TNF α (rs1800629 και rs361525) (T. Hohler et al. , 1997). Υπό αυτή την έννοια, μια μετα-ανάλυση 18 δημοσιευμένων μελετών περιπτώσεων ελέγχου έδειξε ότι όταν ο γονότυπος GA + AA συγκρίθηκε με τον γονότυπο GG, ο κίνδυνος ψωρίασης αυξήθηκε για το rs361525 και μειώθηκε για το rs1800629 στο γονίδιο TNF α (C. Li et al. , 2007). Οι Kaluza et al. (2000) παρατήρησαν μια μείωση στην παραγωγή TNF α σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (47 περιπτώσεις και 43 controls) που διεγείρονται με μιτογόνα σε ψωριασικούς ασθενείς που ήταν φορείς αλληλόμορφων A του rs361525 (γονίδιο TNF α) σε σύγκριση με τους control (W. Kaluza et al., 2000). Επιπλέον, οι συγγραφείς βρήκαν μια συσχέτιση μεταξύ του αλληλόμορφου A στο rs361525 στο γονίδιο TNF α και της αυξημένης παραγωγής του TNF α και της πρώιμης έναρξης της ψωρίασης (K. Reich et al. , 2002). Μια μελέτη που διεξήχθη σε αιγυπτιακό πληθυσμό (46 περιπτώσεις και 96 controls) αποκάλυψε μια συσχέτιση μεταξύ των SNPs στον TNF α (αλληλόμορφο GG στο rs1800629) και της ψωρίασης ($P < 0,05$) (A. Settin et al. , 2009). Ωστόσο, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα rs1800629 και rs361525 σε αυτό το γονίδιο σε Κορεάτες ασθενείς με ψωρίαση ($n = 103$) και controls ($n = 125$) (T.G. Kim et al. , 2003).

Οι Reich et al. (1999) ανέλυσαν τα rs361525 και rs1800629 στο γονίδιο TNF α σε ασθενείς με ψωρίαση τύπου I (εμφάνιση πριν από 40 χρόνια, $n = 100$) και τύπου II (εμφάνιση πέραν των 40 ετών, $n = 51$) και σε controls ($n = 123$). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το αλληλόμορφο rs361525*A ήταν πιο συχνό και το αλληλόμορφο rs1800629*A ήταν λιγότερο συχνό σε ασθενείς με ψωρίαση τύπου I από ό,τι στους control ($P = 0,0012$ και $P = 0,041$, αντίστοιχα), αν και δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ αυτών πολυμορφισμούς και ψωρίαση τύπου II (K. Reich et al. , 1997). Ο Nedoszytko και οι συνεργάτες του (2007) ανέλυσαν 166 ασθενείς με ψωρίαση (134 με τύπου I και 32 με τύπο II) και 65 υγιείς μάρτυρες και βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των Reich et al. , με υψηλότερο επιπολασμό του αλληλόμορφου A στο rs361525 και χαμηλότερη συχνότητα του αλληλόμορφου A στο rs1800629 (γονίδιο TNF α) σε Καυκάσιους ασθενείς από ό,τι στους ελέγχους (B. Nedoszytko et al.,2007). Μια προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη σε 99 Καυκάσιους ασθενείς (64 με ψωρίαση τύπου I και 35 με ψωρίαση τύπου II) έδειξε μειωμένη συχνότητα του γονότυπου GG και αυξημένη συχνότητα του γονότυπου GA του rs361525 (γονίδιο TNF α) σε ασθενείς με ψωρίαση τύπου I σε σύγκριση με στοιχεία ελέγχου ($n = 123$). Επομένως, ο γονότυπος GG σε αυτό το SNP σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο νόσου τύπου I (Al. Arias et al. , 1997).

1.2.3. Φάρμακα κατά της Ιντερλευκίνης 12/23(IL12/23)

Η IL23 είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ενεργοποίησης, διαφοροποίησης και επιβίωσης των λεμφοκυττάρων Th17 (E. Toussiroot , 2012) και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις ψωριασικές βλάβες (J.G. Krueger et al. , 2012). Από την άλλη, η IL12 συμβάλλει στην παραγωγή της IFN- γ από Th1. Έχει βρεθεί ότι η υπομονάδα p40 των IL23 και IL12 είναι ο στόχος του βιολογικού φαρμάκου ustekinumab για τη θεραπεία της ψωρίασης (Y. Li et al. , 2009).

Έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε IL23R και IL12B συσχετιζόμενοι με ευαισθησία στην ψωρίαση τόσο σε Καυκάσιους όσο και σε Ασιάτες ασθενείς (M. Cargill et al. , 2007 & RP. Nair et al. , 2010). Ένα GWAS σε Καυκάσιους ασθενείς (1446 περιπτώσεις και 1432 controls) έδειξε ότι ο συνδυασμός rs3212227 και rs6887695 στην IL12B αποτελεί απλότυπο κινδύνου στην ψωρίαση. Βρέθηκε επίσης μια συσχέτιση ανάμεσα στο rs11209026 στο γονίδιο IL23R και στην ψωρίαση (M. Cargill et al. , 2007). Σε ένα άλλο GWAS με 1810 περιπτώσεις και 2522 controls βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των SNPs στο IL23R (rs7530511 και rs11209026) και το IL12B (rs6887695 και rs3212227) και την προδιάθεση για ψωρίαση σε Καυκάσιους (RP. Nair et al. , 2008). Σε άλλη έρευνα, βρέθηκαν ανάλογα αποτελέσματα συσχετίζοντας αυτά τα 4 SNPs (RL.Smith et al. , 2008), ενώ ο Liu και οι συνεργάτες του το 2008 εντόπισαν συσχέτιση μεταξύ της ψωρίασης, της IL23R (rs11209026) και της IL12B (rs6887695) (Y. Liu et al. , 2008). Μια άλλη πρόσφατη μελέτη συσχέτισε επίσης το rs11209026 στο γονίδιο IL23R με την ψωρίαση (A. Julia et al. , 2012). Άλλοι τόποι ευαισθησίας σε IL12B και IL23R που εντοπίστηκαν στο GWAS σε Καυκάσιους ασθενείς περιλαμβάνουν rs2201841 και rs2066808 (IL23R) και rs2082412 και rs2546890 (IL12B) (E. Ellinghaus et al. , 2010).

Το SNP rs11209026 στο γονίδιο IL23R και το rs3212227 στο γονίδιο IL12B έχουν επίσης μελετηθεί σε Ιάπωνες ασθενείς (143 περιπτώσεις και 100 μάρτυρες) και το αλληλόμορφο A (rs3212227) ήταν πιο συχνό σε ασθενείς με ψωρίαση παρά σε υγιή άτομα (Y. Tsunemi et al. , 2002). Σε ένα GWAS που πραγματοποιήθηκε σε Ταϊλανδούς (206 περιπτώσεις και 144 controls), βρέθηκε οριακά σημαντική συσχέτιση μεταξύ rs7530511 (γονίδιο IL23R) και ψωρίασης. Το rs3212227 (IL23R) συσχετίστηκε επίσης με τη νόσο. Ωστόσο, οι συγγραφείς δεν βρήκαν συσχέτιση με το rs6887695 στο γονίδιο IL12 (RP. Nair et al., 2010). Ένα GWAS που πραγματοποιήθηκε σε κινεζικό πληθυσμό (217 περιπτώσεις και 288 μάρτυρες) εντόπισε άλλους πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την ψωρίαση στο IL23R (αλληλόμορφο rs11465817-A απλότυπος rs1343152) και στο IL12B (rs6887695). Το SNP στην IL12B επαναλήφθηκε με 578 περιπτώσεις και 1422 controls και οι ερευνητές βρήκαν θετική συσχέτιση με την ψωρίαση (Y. Wu et al. , 2010).

1.3. Η φωσφοδιεστεράση-4 (PDE4)

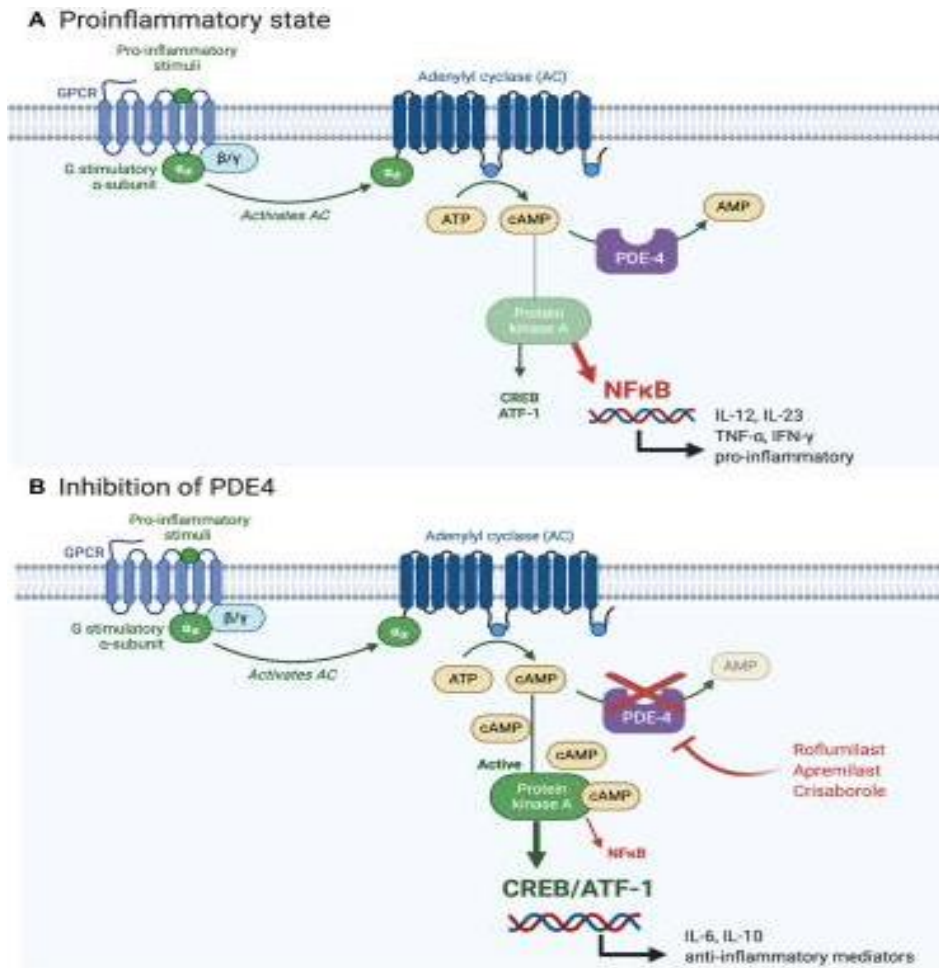
Οι PDEs είναι μια μεγάλη υπερ-οικογένεια ενζύμων, τα οποία είναι προϊόντα 11 διαφορετικών οικογενειών γονιδίων, ομαδοποιημένα ανάλογα με τη δομή, τη λειτουργία και τη συγγενείά τους για το cAMP και το cGMP. Δομικά, όλες οι PDEs έχουν διατηρημένους καρβοξυτελικούς καταλυτικούς πυρήνες ενώ οι αμινοτελικές περιοχές τους διαφέρουν μεταξύ των οικογενειών, των υποοικογενειών και των συγκεκριμένων ισομορφών. Οι N-τερματικές περιοχές έχουν έναν αριθμό λειτουργικών ρόλων. Αυτές περιλαμβάνουν τη στόχευση σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις και σε σηματοδοτούμενα, και τη διαμόρφωση των αποκρίσεων σε σήματα από ρυθμιστικά μόρια ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (MD. Houslay et al. , 2007 & H. Ke et al. , 2007). Οι ειδικές για cAMP PDE4 αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια με περισσότερες από 20 ισομορφές που κωδικοποιούνται από τέσσερα γονίδια (A, B, C και D). Κάθε ισομορφή έχει μια μοναδική N-τερματική περιοχή, που αποτελείται από μια N-τερματική περιοχή στόχευσης (TD). Επιπλέον, η N-τερματική περιοχή περιέχει προς τα πάνω διατηρημένες περιοχές 1 και 2 (UCR1 και UCR2), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους και με την καταλυτική περιοχή από την περιοχή συνδέτη 1 και 2 (LR1 και LR2) αντίστοιχα (GB. Bolger , 1996). Με βάση την παρουσία και το μέγεθος των UCR1 και UCR2, οι ισομορφές PDE4 μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μακριές, βραχείες, υπερ-κοντές και νεκρές-κοντές ισομορφές. Οι μακριές ισομορφές έχουν και UCR1 και 2, οι βραχείες ισομορφές έχουν μόνο UCR2, οι υπερ-κοντές έχουν περικομμένο UCR2 και οι νεκρές-βραχείς ισομορφές δεν έχουν και τις δύο περιοχές UCR και έχουν μια περικομμένη καταλυτική περιοχή (MD. Houslay , 2001).

Η φωσφοδιεστεράση (PDE) 4 εμπλέκεται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης αποικοδομώντας την κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), έναν βασικό δεύτερο αγγελιοφόρο. Η αποδόμηση του cAMP σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) μειώνει τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης A, οδηγώντας σε παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. παράγοντα νέκρωσης όγκου [TNF]-α και ιντερλευκίνη [IL]-23) και αναστολή των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. IL-10) (P. Schafer , 2012 & PH. Schafer et al. , 2014) . Συνεπώς, για την αποφυγή δημιουργίας φλεγμονής, κρίνεται χρήσιμη η αναστολή της PDE-4.

Η εκλεκτική έκφραση της PDE4 σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί στην ενεργοποίηση και ανοδική ρύθμισή τους στη χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας και σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Εκτός από την έκφρασή του σε κύτταρα του ανοσοποιητικού, η PDE4 εκφράζεται επίσης σε δομικούς κυτταρικούς τύπους, όπως κερατινοκύτταρα, αγγειακό ενδοθήλιο και αρθρικό υμένα (PH. Schafer et al. , 2014). Η ψωρίαση είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, που εκδηλώνεται στο δέρμα, στις αρθρώσεις και πιθανώς στο έντερο. Κάθε μία από αυτές τις εκδηλώσεις εκφράζεται μέσω μιας φλεγμονώδους διαδικασίας που προκαλείται από το ανοσοποιητικό (DJ. Najarian et al. , 2003).

1.3.1. Αναστολή της PDE4

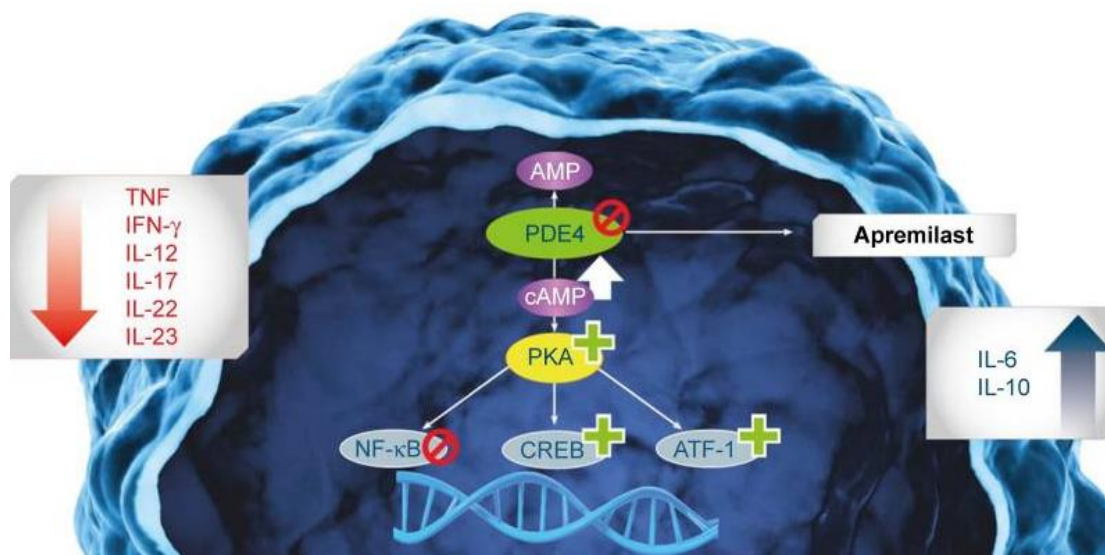
Ορισμένοι χρησιμοποιούμενοι αναστολείς της PDE4 είναι η απρεμιλάστη, η ροφλουμιλάστη και η αλοιφή Crisaborole (M. Milakovic et al. , 2021). Οι εκλεκτικοί αναστολείς PDE4 έχουν διερευνηθεί σε μια ευρεία ποικιλία δερματολογικών φλεγμονωδών καταστάσεων εκτός από την ψωρίαση, συμπεριλαμβανομένης της δερματικής σαρκοείδωσης, του δισκοειδούς ερυθρηματώδους λύκου, του σκληρόδερμα, της νόσου του Behcet και της ατοπικής δερματίτιδας (M. Wittmann et al. , 2013 & G. Hatemi et al. , 2015). Το κύριο ζήτημα της συστηματικής αναστολής της PDE4 είναι οι γαστρεντερικές ανεπιθύμητες ενέργειες και οι νεότερες γενεές, πιο εκλεκτικοί παράγοντες έχουν βελτιωμένη ανεκτικότητα. Πολλαπλές κλινικές δοκιμές έχουν υποστηρίξει τη χρήση του αναστολέα PDE4, της απρεμιλάστης, ο οποίος έχει εγκριθεί για χρήση στην ψωρίαση, την ψωριασική αρθρίτιδα και τη νόσο του Behcet. Ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ναυτία, έμετος, πονοκέφαλος, απώλεια βάρους και κατάθλιψη έχουν αναφερθεί και μπορεί να περιορίσουν τη χρήση σε ορισμένους ασθενείς. Δεδομένου ότι οι αναστολείς PDE4 είναι μικρά μόρια, επιδέχονται τοπική εφαρμογή και ως εκ τούτου, οι τοπικοί αναστολείς PDE4 διερευνώνται επί του παρόντος με στόχο την αποφυγή συστημικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Η τοπική ροφλουμιλάστη διερευνάται στην ψωρίαση, την ατοπική δερματίτιδα και τη σμηγματορροϊκή δερματίτιδα και η τοπική κρισαμπορόλη έχει ήδη λάβει έγκριση για χρήση στην ατοπική δερματίτιδα (M. Wittmann et al. , 2013 & ED. Deeks , 2015 & M. Gooderham et al. , 2015). Το μονοπάτι για την αναστολή της PDE4 απεικονίζεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Μονοπάτι PDE4/PKA. Α) Σε προφλεγμονώδη κατάσταση το cAMP ενεργοποιείται από υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνη, οι οποίοι κατά την ενεργοποίηση του cAMP, μεσολαβούν στη μεταγωγή σήματος κυρίως μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης Α (PKA). Η PKA στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεΐνη που δεσμεύει το στοιχείο απόκρισης cAMP (CREB), ένα στοιχείο απόκρισης που κατέχεται από πολλά γονίδια που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ψωρίασης, συμπεριλαμβανομένων των IL-2, IL-6, IL-10 και TNF α . Β) Η αναστολή του PDE4 οδηγεί σε αύξηση του cAMP που ενεργοποιεί την οδό PKA. Το PKA καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών και προάγει την παραγωγή αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως η IL-10, μέσω της γονιδιακής μεταγραφής που καθοδηγείται από το CREB και το ATF-1 (M. Milakovic et al. , 2021).

1.4. Η απρεμιλάστη ως αναστολέας της PDE4 στη θεραπεία της ψωρίασης

Η απρεμιλάστη, ένας από του στόματος, μικρομοριακός αναστολέας PDE4, εγκρίθηκε για τη διαχείριση της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας το 2014 από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ και το 2015 από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Στην ΕΕ, η απρεμιλάστη ενδείκνυται για ενήλικες ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση κατά πλάκας που απέτυχαν να ανταποκριθούν ή έχουν αντένδειξη ή έχουν δυσανεξία σε άλλη συστηματική θεραπεία. Στην ενεργό ψωριασική αρθρίτιδα, η απρεμιλάστη χορηγείται μόνη της ή σε συνδυασμό με συμβατικά φάρμακα σε ενήλικες ασθενείς που είχαν ανεπαρκή ανταπόκριση ή είχαν δυσανεξία σε προηγούμενη συμβατική θεραπεία. Η απρεμιλάστη είναι ο πρώτος μικρομοριακός αναστολέας της PDE4, ενός ενζύμου που εμπλέκεται στις χρόνιες φλεγμονώδεις οδούς, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με την ψωρίαση (W. Baumer et al. , 2007). Ο μηχανισμός δράσης της δίνεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης απρεμιλάστης. Η PDE4 είναι το κύριο cAMP-ειδικό PDE σε φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των μονοκυττάρων, των μαστοκυττάρων, των δενδριτικών κυττάρων, των ηωσινόφιλων και των T κυττάρων. Οι αναστολείς PDE4 εμποδίζουν την αποικοδόμηση του ενδοκυτταρικού cAMP. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της απρεμιλάστης είναι η αναστολή της PDE4, η οποία κατά συνέπεια αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της cAMP και ρυθμίζει τις οδούς σηματοδότησης, με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A και τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης που δεσμεύει το στοιχείο απόκρισης cAMP, που αναστέλλουν την έκκριση φλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. TNF-α, ιντερφερόνη-γ, IL-2, IL-12 και IL-23) και διεγείρουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-6 και η IL-10 (P. Gisondi et al. , 2016).

Για να διερευνηθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της απρεμιλάστης σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση πραγματοποιήθηκε δοκιμή Αποτελεσματικότητας και Ασφάλειας Αξιολόγησης των Επιδράσεων της Απρεμιλάστης στην Ψωρίαση (ESTEEM) στη φάση III κλινικών δοκιμών. Έλαβαν χώρα δύο αναλύσεις, η ESTEEM 1 με 844 ασθενείς και η ESTEEM 2 με 411 ασθενείς (K. Papp et al. , 2015 & C. Paul et al. , 2015). Και οι δύο δοκιμές είχαν παρόμοιο

σχεδιασμό. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: χορήγηση απρεμιλάστης 30 mg δύο φορές την ημέρα ή εικονικού φαρμάκου για 16 εβδομάδες. Στη δεύτερη φάση της μελέτης, όλοι οι ασθενείς έλαβαν απρεμιλάστη για άλλες 16 εβδομάδες (μέχρι την εβδομάδα 32). Στη συνέχεια, οι ασθενείς που αρχικά τυχαιοποιήθηκαν στην απρεμιλάστη με μείωση κατά 75% (ESTEEM 1) ή 50% (ESTEEM 2) στη βαθμολογία PASI (απόκριση PASI 75 ή 50) επανατυχαιοποιήθηκαν στη συνέχιση της απρεμιλάστης ή του εικονικού φαρμάκου (σε αυτήν την ομάδα, η απρεμιλάστη επανεκκινήθηκε σε περίπτωση απώλειας ανταπόκρισης). Και στις δύο δοκιμές ESTEEM, το κύριο τελικό σημείο ήταν το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν PASI 75 την εβδομάδα 16. Στην ESTEEM 1, σημαντικά περισσότεροι ασθενείς που έλαβαν απρεμιλάστη από το εικονικό φάρμακο πέτυχαν PASI 75 την εβδομάδα 16, δηλαδή 33,1% έναντι 5,3%. Η σοβαρότητα του κνησμού μειώθηκε σε ασθενείς που έλαβαν απρεμιλάστη σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο και στις δύο ESTEEM (S. Feldman et al. , 2015). Η απρεμιλάστη ήταν αποτελεσματική στη θεραπεία ασθενών με ψωρίαση που εντοπίζεται στις περιοχές των νυχιών, του τριχωτού της κεφαλής και της παλαμοπελματιαίας περιοχής. Μια συγκεντρωτική ανάλυση των δοκιμών ESTEEM 1 και 2 έδειξε ότι η απρεμιλάστη βελτίωσε σημαντικά τους περιορισμούς στην εργασία, καθώς και αύξησε την παραγωγικότητα της εργασίας σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (K. Papp et al. , 2015). Οι δοκιμές ESTEEM 1 και 2 επιβεβαίωσαν το γνωστό και διαχειρίσιμο προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας της απρεμιλάστης. Σε αυτές τις μελέτες, οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν ως επί το πλείστον ήπιες έως μέτριες σε βαρύτητα σε όλες τις περιόδους της μελέτης (βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες). Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν η διάρροια (17,8%), η ναυτία (16,6%) και οι λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (8,4%). Η συχνότητα εμφάνισης διάρροιας και ναυτίας ήταν υψηλότερη κατά τις πρώτες 2 εβδομάδες θεραπείας σε σύγκριση με άλλες περιόδους της μελέτης και συνήθως υποχώρησε εντός 4 εβδομάδων. Συνεπώς, αξίζει να σημειωθεί ότι η χορήγηση απρεμιλάστης σε ασθενείς με ψωρίαση είναι τόσο ασφαλής όσο και αποτελεσματική (K. Reich et al. , 2016).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η γονοτύπηση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) rs4804134 (T/G) του γονιδίου *PDE4A* σε 29 άτομα που έπασχαν από ψωρίαση και λάμβαναν θεραπεία με απρεμιλάστη. Τα 29 αυτά δείγματα θα βοηθήσουν στη συγκέντρωση συνολικά 100 δειγμάτων ασθενών με ψωρίαση. Με τη συγκέντρωση 100 δειγμάτων, είναι εφικτή η αξιολόγηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού rs4804134 με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με απρεμιλάστη, καθώς έτσι θα είναι αξιόπιστη η στατιστική ανάλυση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

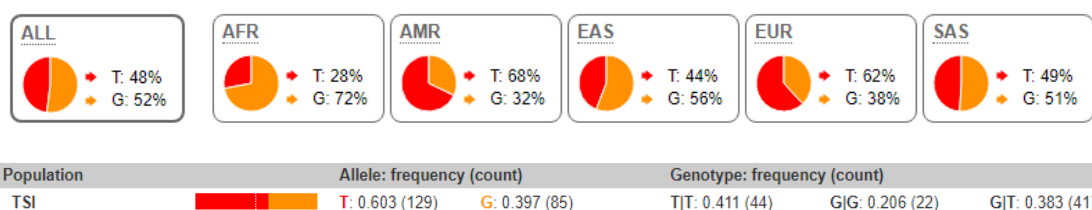
3.1. Δείγματα μελέτης

Στη συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκαν επιτυχή πειράματα σε 29 δείγματα ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση και λαμβάνουν θεραπεία με απρεμιλάστη. Μερικά δείγματα αίματος προέρχονται από τη Δερματολογική και άλλα από την Ρευματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

3.2. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism – SNP) rs4804134 του γονιδίου *PDE4A*

Η συγκεκριμένη εργασία αφορά τη μελέτη του SNP rs4804134 του γονιδίου *PDE4A*. Η χαρτογράφησή του παρατηρείται σε ιντρόνιο στο χρωμόσωμα 19 και ειδικότερα στη θέση chr19:10,457,843 του γονιδίου *PDE4A* (<https://ensembl.org/>).

Για τον πολυμορφισμό rs4804134, οι πιθανές παραλλαγές νουκλεοτιδίων είναι T/A/G, με το A να έχει εξαλειφθεί με την πάροδο του χρόνου και προγονικό το G. Για τις άλλες δύο παραλλαγές, το T και το G, η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται κατά μέσο όρο παγκοσμίως είναι 0.476 και 0.524 αντίστοιχα. Στους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς η συχνότητα για το σπάνιο αλληλόμορφο (Minor allele Frequency - MAF) είναι 62%. Εντός του πληθυσμού αυτού ενδιαφέρον έχει η MAF στους Ιταλούς καθώς έχουν παρόμοια γενετικά στοιχεία με τους Έλληνες, για τους οποίους δεν υπάρχουν δεδομένα στη βάση δεδομένων Ensembl. Στην εικόνα 6, απεικονίζεται η συχνότητα εμφάνισης των παραλλαγών παγκοσμίως, στους Αφρικανούς, στους Αμερικανούς, στους Ανατολικούς και Νοτιο – Ασιάτες, στους Ευρωπαίους και στους Ιταλούς.



Εικόνα 6. Συχνότητα του πολυμορφισμού rs4804134 παγκοσμίως (ALL), στους Αφρικανούς (AFR), στους Ανατολικούς και Νότιους Ασιάτες (East Asian-EAS και South Asian-SAS), στους Ευρωπαίους (EUR) και στους Ιταλούς (Toscani in Italy-TSI). Παρόλο που το αλληλόμορφο T είναι το MAF, σε ορισμένους πληθυσμούς κυριαρχεί, στους Αμερικανούς, στους Ευρωπαίους και στους Ιταλούς σε ποσοστό 68%, 62% και 60% αντίστοιχα.

3.3. Απομόνωση DNA

Τρεις γενικές μέθοδοι για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA είναι κοινές και η καθεμία βασίζεται σε διαφορετική βιοχημική αρχή. Η επιλογή μιας μεθόδου βασίζεται στην απαιτούμενη απόδοση, τον εξοπλισμό που διατίθεται στο εργαστήριο και τον τρόπο με τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί το καθαρισμένο γονιδιωματικό DNA. Οι μέθοδοι είναι οι εξής:

- 1) Οργανική εκχύλιση και καθίζηση. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA με οργανική εκχύλιση περιλαμβάνει την προσθήκη φαινόλης και ισοθειοκυνικής κανιδίνης για διαχωρισμό του DNA και των πρωτεϊνών σε διαφορετικές οργανικές φάσεις. Η οργανική εκχύλιση είναι μια μέθοδος χαμηλού κόστους και, με προηγμένα αντιδραστήρια όπως το DNAzol, είναι μια απλή μέθοδος που απαιτεί πολύ λίγο εξοπλισμό.
- 2) Πυρίτιο. Το DNA συνδέεται με πυρίτιο (γνωστές και ως ίνες γυαλιού) υπό συνθήκες υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι και μπορεί να απελευθερωθεί υπό συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι. Οι στήλες που περιέχουν πυρίτιο παρέχουν έναν εύκολο τρόπο σύνδεσης, πλύσης και έκλουσης καθαρισμένου γονιδιωματικού DNA από πολλαπλά διαυγασμένα κυτταρολύματα. Οι στήλες έχουν σχεδιαστεί για να ρέουν προσκρουστήρες μέσω φυγοκέντρησης, κενού ή βαρύτητας. Τα Mini Kit PureLink Genomic DNA χρησιμοποιούν τεχνολογία στήλης περιστροφής και λειτουργούν σε μικροφυγόκεντρο για εύκολη προετοιμασία έως και 18 δειγμάτων κάθε φορά. Οι πλάκες περιστροφής παρέχουν την ίδια τεχνολογία απομόνωσης σε μορφή υψηλής απόδοσης, φιλική προς τον αυτοματισμό.
- 3) Παραμαγνητικά σφαιρίδια. Σε αυτή τη μέθοδο, παραμαγνητικά σφαιρίδια (που έλκονται από μαγνήτη) προστίθενται στο δείγμα και το γονιδιωματικό DNA συνδέεται με τα σφαιρίδια. Χρησιμοποιώντας έναν ισχυρό μαγνήτη, οι χάντρες συγκρατούνται στη θέση τους ενώ αφαιρείται το ανεπιθύμητο υλικό. Μετά την πλύση, το γονιδιωματικό DNA εκλύεται από τα σφαιρίδια σε νερό ή σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι. Η μέθοδος που βασίζεται σε σφαιρίδια, που χρησιμοποιείται στην απομόνωση DNA πολλαπλών δειγμάτων MagMAX και σε σχετικά κιτ, είναι επεκτάσιμη και συμβατή με αυτοματισμό.

Στον σημερινό κόσμο της ανάλυσης DNA με πολυπλεξία και PCR σε πραγματικό χρόνο, η σημασία του υψηλής ποιότητας, καθαρισμένου DNA δεν μπορεί να υποτιμηθεί. Η εύρεση ενός κατάλληλου συστήματος απομόνωσης DNA είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Το DNA μπορεί να απομονωθεί από οποιοδήποτε βιολογικό υλικό που περιέχει εμπύρνα κύτταρα. Στους ανθρώπους, η πιο συνηθισμένη πηγή DNA είναι τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος, από τα οποία απομονώνεται εύκολα γενετικό υλικό υψηλής ποιότητας και συγκέντρωσης. Ανάλογα με το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί, μπορεί, η απομόνωση του DNA μπορεί να γίνει με διαφορετική μέθοδο.

Στην συγκεκριμένη εργασία, η απομόνωση του DNA έγινε από αίμα και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι το kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit της Invitrogen.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας είναι τα εξής:

- I. Προσθήκη πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml), η οποία δρα έναντι ορισμένων πρωτεϊνών οδηγώντας στην απομάκρυνσή τους. Παρουσιάζει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης μεταξύ των 50°C και 70°C, ενώ με τη χρήση της απενεργοποιούνται οι ενδογενείς νουκλεάσες (DNAase), οι οποίες μπορούν να καταστρέψουν το DNA κατά την απομόνωση.
- II. Χρήση RNase A (20 mg/ml σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), η οποία συμβάλλει στην αποικοδόμηση του RNA που υπάρχει στο δείγμα.
- III. Προσθήκη PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer κυττάρων του δείγματος. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα περιέχει ανιονικά απορρυπαντικά το πιο συχνό εκ των οποίων είναι το δωδεκυλοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate - SDS) που προκαλεί τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών χάρη στη λιποδιαλυτή δράση του. Επίσης, το SDS δρώντας ως αποδιατακτικός παράγοντας διαταράσσει τους δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αποδιατάσσει προστατεύοντας έτσι το DNA από τις νουκλεάσες. Επιπλέον, στο ρυθμιστικό διάλυμα περιέχονται χαστροπικά άλατα που βοηθούν στην μετουσίωση των πρωτεϊνών και την εκχύλιση του DNA. Αυτό συμβαίνει, διότι τα χαστροπικά άλατα διασπούν τις ασθενείς αλληλεπιδράσεις οδηγώντας στη μείωση της διαλυτότητας του DNA στο νερό καθώς και στην αποσταθεροποίηση των πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο προάγεται και η πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου.
- IV. Έκπλυση με τα ρυθμιστικά διαλύματα Wash Buffer 1 και 2, τα οποία βοηθούν στην περαιτέρω απομάκρυνση αλάτων, τμημάτων πρωτεϊνών και μικρών RNA, ενώ το DNA παραμένει προσδεμένο στη μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται, διότι περιέχουν αιθανόλη, που βοηθά στη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης. Μέσω των δύο αυτών διαδοχικών εκπλύσεων αυξάνεται και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA.

- V. Προσθήκη του διαλύματος έκλουσης PureLink Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) που είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος το οποίο μειώνει τη συγγένεια του DNA με την μεμβράνη πυριτίου βοηθώντας έτσι στην απελευθέρωση του DNA από αυτή. Επιπλέον, το EDTA που περιέχεται στο διάλυμα έκλουσης αναστέλλει τη δράση των νουκλεασών, που είναι ένζυμα που καταστρέφουν τα νουκλεϊκά οξέα. Όσον αφορά τον όγκο που προστίθεται από το διάλυμα έκλουσης εξαρτάται από το πόσο πυκνό ή αραιό επιθυμείται να είναι το DNA που θα απομονωθεί.

3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

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

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

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

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την παρασκευή του πηκτώματος είναι:

- Αγαρόζη σε συγκέντρωση τέτοια που να οδηγεί σε πήκτωμα πυκνότητας κατάλληλο για τα μόρια DNA που πρόκειται να διαχωριστούν. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε 2,5% για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR.
- Ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Χρησιμοποιήθηκε TAE (Tris acetate EDTA) 1X (40mM Tris, 20mM οξικό οξύ, 1mM EDTA pH=8).
- Χρωστική δέσμησης: χρήση της Xpert Green DNA stain 1ml (20.000X) της grisp.
- Διάλυμα φόρτωσης (gel loading buffer) που περιέχει μια χρωστική, συνήθως κυανό του ξυλενίου (Xylene cyanol) ή/και μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue), καθώς και μια ουσία υψηλής πυκνότητας (όπως γλυκερόλη). Ανάλογα τη χρωστική, η οποία μετακινείται μαζί με το DNA ορισμένου μεγέθους, χρησιμεύει στην αξιολόγηση της μετακίνησης των δειγμάτων στο πήκτωμα ώστε να σταματήσει η ηλεκτροφόρηση. Στο συγκεκριμένο πείραμα στην περίπτωση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε το κυανό του ξυλενίου (Xylene cyanol). Όσον αφορά την γλυκερόλη, αυτή προσδίδει μεγάλη πυκνότητα στο δείγμα και δεν το αφήνει να βγει έξω από το πηγαδάκι και να διαχυθεί στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

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

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

min είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στο πήκτωμα, αφού τοποθετηθεί στη συσκευή υπεριώδους φωτός.

3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) είναι μια μέθοδος της μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis το 1983. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος, σε μία *in vitro* ενζυμική αντίδραση. Η PCR βασίζεται στη χρήση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης, της Taq DNA πολυμεράσης, που έχει την ικανότητα να συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον κλώνο του πρότυπου DNA. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέσει ένα νουκλεοτίδιο μόνο σε μια προϋπάρχουσα 3'-OH ομάδα, απαιτείται η χρήση μιας μικρής αλληλουχίας εκκινητή (primer). Αυτή η απαίτηση καθιστά δυνατή την οριοθέτηση της αλληλουχίας του DNA – στόχου που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί με ένα ζεύγος εκκινητών. Στην PCR εκτός από τους εκκινητές, την Taq DNA πολυμεράση και το εκμαγείο DNA, χρειάζονται επίσης και: τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP και dGTP), ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη ρύθμιση του pH και τα ιόντα μαγνησίου (Mg²⁺) που απαιτούνται για την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης (μερικές φορές περιλαμβάνονται στο ρυθμιστικό διάλυμα).

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

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

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

βρίσκεται καθοδικά της αλληλουχίας στόχου στον άλλον κλώνο του DNA και αναφέρεται ως ανάστροφος (reverse) εκκινητής. Οι εκκινητές είναι μονόκλιωνα μόρια DNA μήκους 20-30 νουκλεοτίδια.

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

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

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

Η PCR γίνεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης καθώς και η ποσότητα του κάθε συστατικού της αντίδρασης εξαρτάται από το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται. Στο συγκεκριμένο πείραμα ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl. Στον Πίνακα 1 αναγράφονται τα αντιδραστήρια μιας PCR καθώς και ο όγκος που απαιτείται για καθένα από αυτά.

Πίνακας 1: Συστατικά και ποσότητες μιας PCR	
Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (25 μl)
10X ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο (KAPA Taq Buffer A (10X), 1,5mM Mg ²⁺ at (1X))	2,5 μl
dNTPs (10mM)	0,5 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	0,5 μl
Ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	0,5 μl
Kappa taq (5units/μl)	0,2 μl
DNA	Ανάλογα με τη συγκέντρωσή του
ddH ₂ O	Προσθήκη μέχρι τα 25 μl

Η διαδικασία που ακολουθείται για την προετοιμασία της PCR είναι:

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

Πίνακας 2: Συνθήκες λειτουργίας του θερμικού κυκλοποιητή			
Βήματα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	65°C	30 sec	
Επέκταση	72°C	1,5 min	
Τελική επέκταση	72°C	10 min	
Διατήρηση	4°C	∞	

Η υβριδοποίηση των εκκινητών, στο συγκεκριμένο πείραμα, έγινε στους 65°C. Γενικότερα, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους. Κατά κανόνα η PCR πραγματοποιείται σε θερμοκρασία υβριδισμού όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θερμοκρασία τήξεως (T_m) των εκκινητών και όχι χαμηλότερη από $T_m - 5^\circ\text{C}$. $T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = [2(A+T) + 4(G+C)] - 5^\circ\text{C}$.

3.6. Η αλληλουχία των εκκινητών για τον πολυμορφισμό rs4804134

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *PDE4A* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs4804134 είναι οι εξής:

Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward): 5'- CCACATCCCCTCTGGTTTCC -3'

Ανάστροφος εκκινητής (Reverse): 5'- GTAAGTGTGGTACAGGGGGC -3'

Η T_m εκτιμάται εμπειρικά με βάση τον τύπο $T_m = [2(A+T) + 4(G+C)]$ που ισούται με 64°C . Έτσι, πρέπει να δοκιμάζονται διάφορες θερμοκρασίες υβριδισμού (όσο το δυνατόν πιο κοντά στη θεωρητική θερμοκρασία τήξεως (T_m) των εκκινητών και όχι χαμηλότερη από $T_m - 5^\circ\text{C}$) στο στάδιο της υβριδοποίησης.

3.7. Βελτιστοποίηση της PCR

Παρότι η τεχνική της PCR είναι μια απλή διαδικασία, στην πράξη πολλές φορές παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες. Από τα πιο συχνά προβλήματα που εμφανίζονται είναι η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος σε ελάχιστη ποσότητα ή η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων όπως τα διμερή των εκκινητών ή ακόμα και να μην παρατηρηθεί καθόλου ενίσχυση. Για τη βελτιστοποίηση μιας PCR χρειάζεται να ρυθμιστούν διάφοροι παράγοντες. Από τους πιο βασικούς είναι η επιλογή της ιδανικής θερμοκρασίας σύνδεσης των εκκινητών και η συγκέντρωση του μαγνησιού (Mg^{2+}). Στην παρούσα εργασία η βελτιστοποίηση της μεθόδου PCR πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αρχικής PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού, που ονομάζεται Gradient PCR. Ο θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει 96 θέσεις (12 στήλες με 8 θέσεις η κάθε μία) και ανά δύο στήλες μπορεί να ελεγχθεί μια θερμοκρασία. Έγινε έλεγχος για θερμοκρασία υβριδισμού τόσο μικρότερη όσο και μεγαλύτερη από την θεωρητική θερμοκρασία τήξης. Συγκεκριμένα οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν ήταν 59°C , 61°C , 63°C και 65°C . Στο τέλος έγινε έλεγχος των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπου με βάση τις ζώνες που εμφανίζονται μπορεί να οριστεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα.

3.8. Αλληλούχηση των προϊόντων της PCR

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR λαμβάνει μέρος σε εξειδικευμένο εργαστήριο. Για την αλληλούχηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά ο πρόσθιος εκκινητής του πολυμορφισμού rs4804134 (Forward). Η αλληλούχηση των δειγμάτων γίνεται με την μέθοδο Sanger και τα αποτελέσματα αποστέλλονται ηλεκτρονικά υπό την μορφή χρωματογραφημάτων. Για την μελέτη και επεξεργασία των δεδομένων αυτών γίνεται χρήση του προγράμματος BioEdit version 7.2.6 (Hall, T.A. 1999).

3.9. Βιοπληροφορική ανάλυση

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, πέρα από το πειραματικό σκέλος πραγματοποιήθηκε και βιοπληροφορική ανάλυση. Ειδικότερα, υπήρχε η επιθυμία εύρεσης του συνολικού αριθμού των SNPs που περιλαμβάνει το γονίδιο *PDE4A*. Για να γίνει αυτό, χρησιμοποιήθηκε το variant table της βάσης δεδομένων Ensembl. Έγινε λήψη του αρχείου σε μορφή Excel. Από το Excel βγήκε το συμπέρασμα ότι υπάρχουν 78 διαφορετικά SNPs στο γονίδιο *PDE4A* (μερικά SNPs ήταν ίδια, απλά άλλαζε το αλληλόμορφο) (<https://ensembl.org/>). Από τα 78 αυτά SNPs υπάρχουν αρκετά που συν-κληρονομούνται, οπότε μπορούν να δημιουργηθούν ορισμένα Blocks. Σε ένα Block μπορούμε να αντιμετωπίσουμε το ένα SNP όπως το άλλο αφού υπάρχει συν-κληρονόμηση. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο LD calculator της Ensembl, ώστε να βρεθεί η LD (Linkage Disequilibrium – Ανισορροπία Σύνδεσης) ανάμεσα στα 78 SNPs. Στο εργαλείο αυτό μπορούν να τοποθετηθούν μέχρι 20 SNPs τη φορά. Για να υπολογιστεί η LD, στις παραμέτρους του εργαλείου ρυθμίστηκε ότι η D' πρέπει να είναι >0.9 . Τα SNPs που είχαν ίδια D' είναι αυτά που συγκροτούν ένα block και μπορούμε να τα αντιμετωπίσουμε ως ένα. Από την ανάλυση προέκυψαν τα εξής 15 Blocks ενώ τα 57 από τα 78 SNPs βρέθηκε ότι ανήκουν σε κάποιο Block:

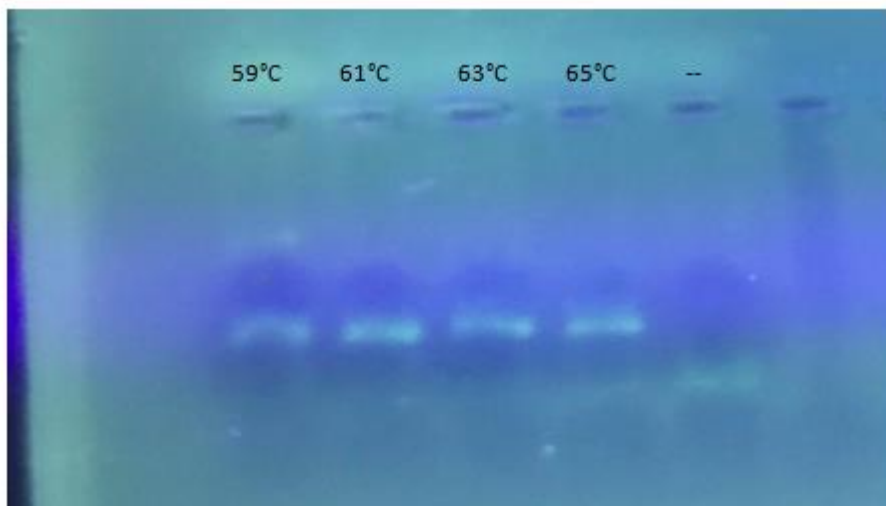
- Rs6417247, rs10854116, rs3561535, rs1188782 και rs35916055 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs35164067 και rs34953890 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs2633971 και rs6511698 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs7249459, rs12983665 και rs8112675 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs135426 και rs1387025 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs7252897, rs930229, rs11878850, rs139275453, rs923367, rs10424109, rs58344707 και rs73923221 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs11670504 και rs35670850 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs7260594, rs7253185, rs34246431, rs4804133 και rs2043330 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs11878725, rs1187887, rs1188227, rs11879176, rs59451338, rs4804503, rs76619635 και rs59919460 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs11672021, rs10416143, rs60167376, rs35452057, rs74179926, rs58172634, rs11666164 και rs1051738 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs2358681 και rs5827100 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs35084366 και rs36107724 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs7259385, rs7259088, rs7259116 και rs7343087 με μεταξύ τους $D'=1$.
- Rs12983921 και rs11670704 με μεταξύ τους $D'=1$.

- Rs112359394 και rs112947570 με μεταξύ τους $D'=1$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για τον πολυμορφισμό rs4804134 του γονιδίου *PDE4A*

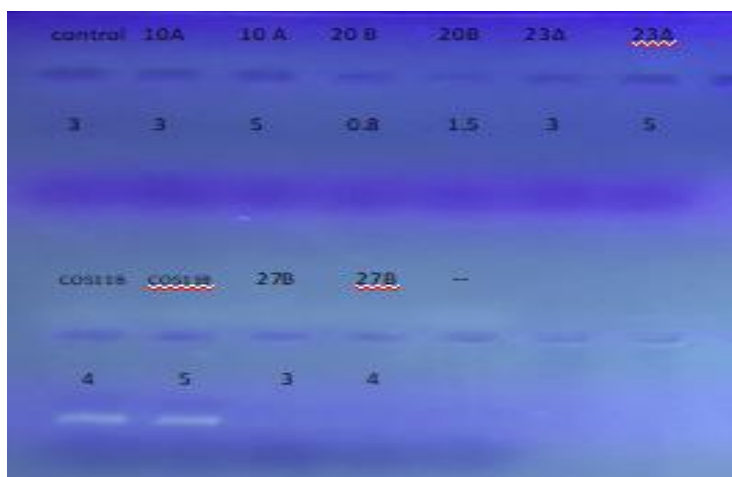
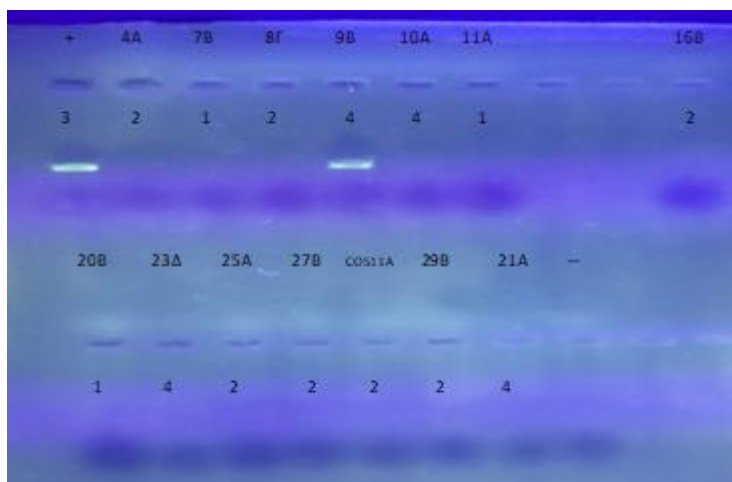
Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR πραγματοποιήθηκε μια αρχική PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας υβριδισμού (Gradient PCR) για τους εκκινητές Forward και Reverse που ενισχύουν το τμήμα του γονιδίου *PDE4A*, το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό rs4804134. Στη συγκεκριμένη εργασία οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν στο στάδιο υβριδοποίησης ήταν 59°C, 61°C, 63°C και 65°C καθώς η θεωρητική θερμοκρασία τήξης που υπολογίστηκε και για τους δύο εκκινητές είναι 64°C. Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή είναι ίδιο με αυτό που απεικονίζεται στον Πίνακα 2 και διαφοροποιείται μόνο στο βήμα της υβριδοποίησης που δεν εφαρμόστηκε μόνο μία θερμοκρασία υβριδισμού όπως συμβαίνει σε μια κλασική PCR, αλλά ταυτόχρονα ελέγχθηκαν τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα, το COS 10. Από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, όπως φαίνεται στην εικόνα 6, βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι εκκινητές παράγουν προϊόν και για τις 4 θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν.

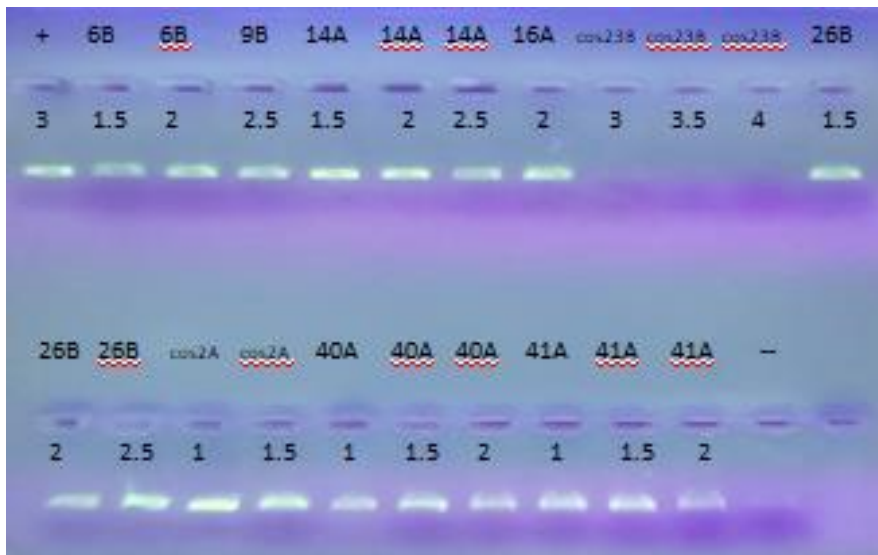
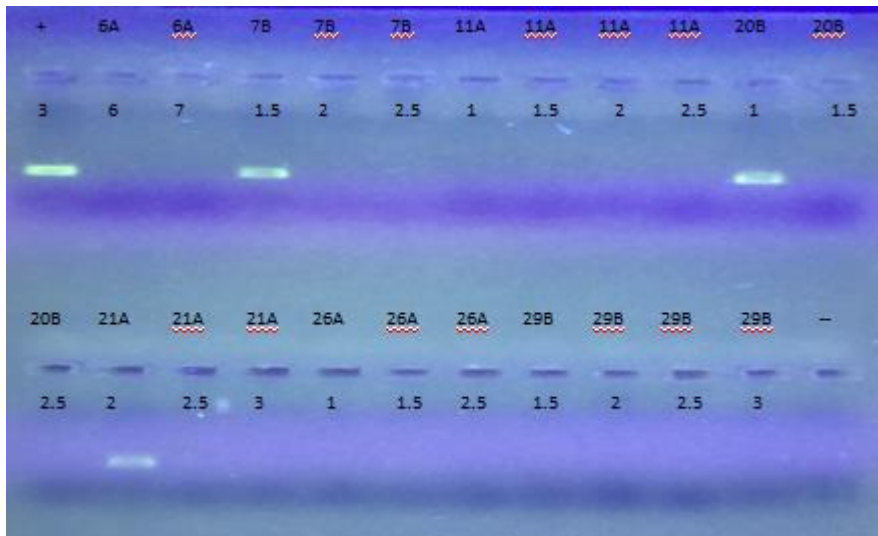
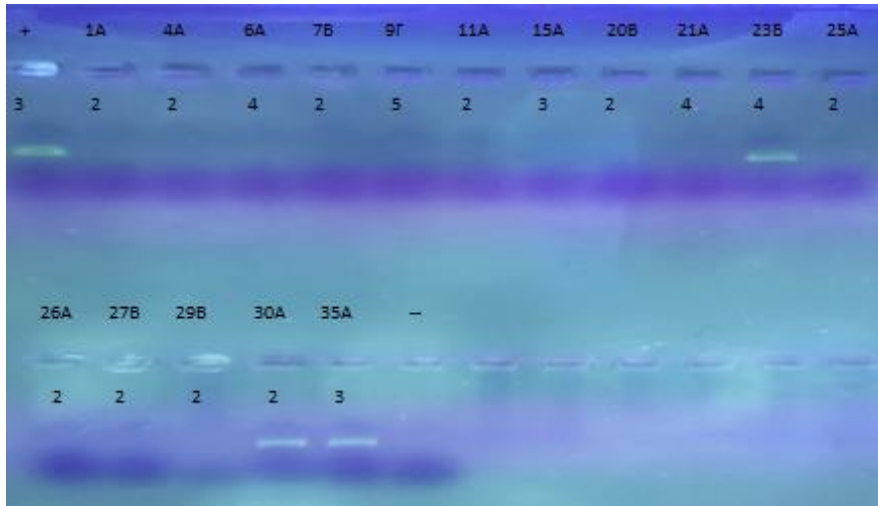


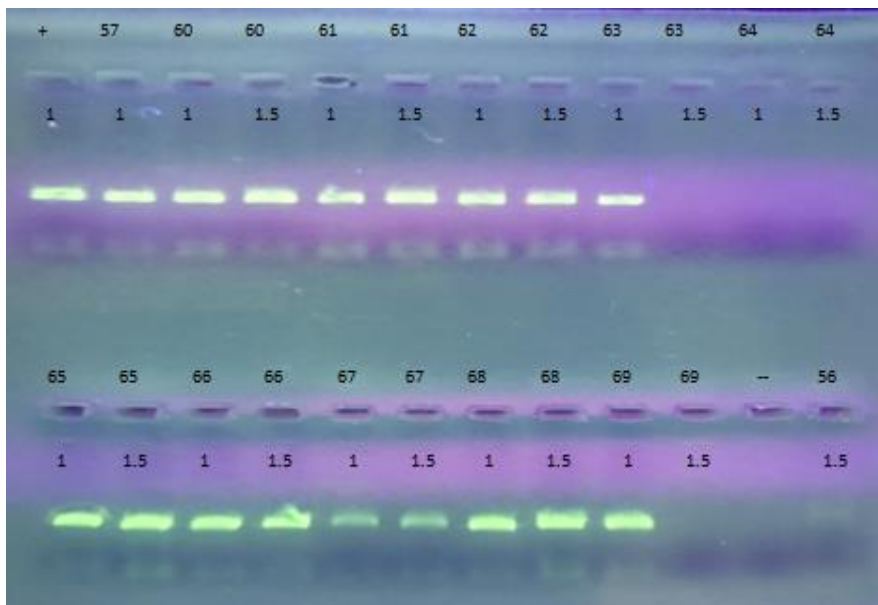
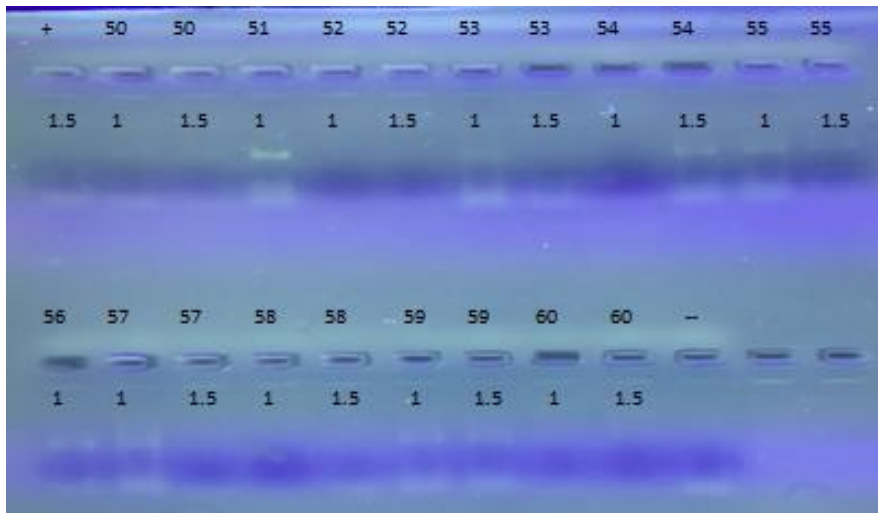
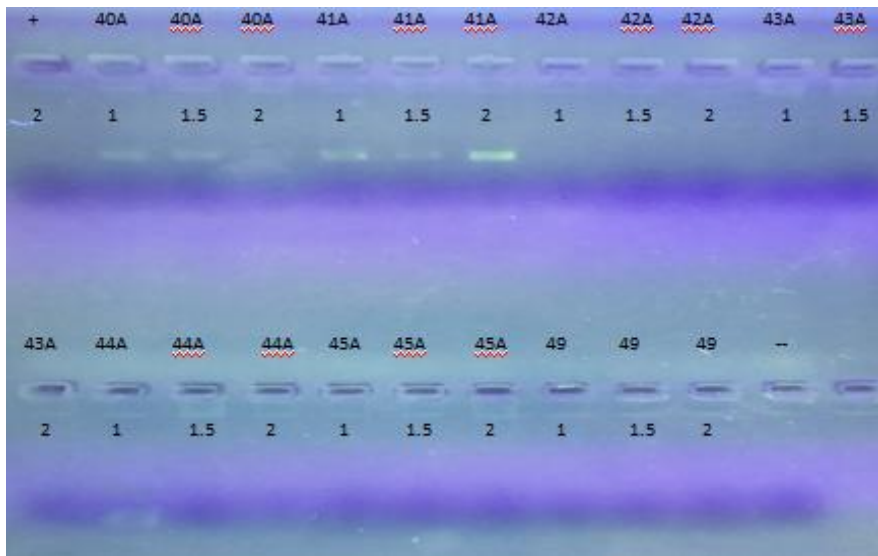
Εικόνα 7. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR διαβάθμισης θερμοκρασίας. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το COS 10 και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

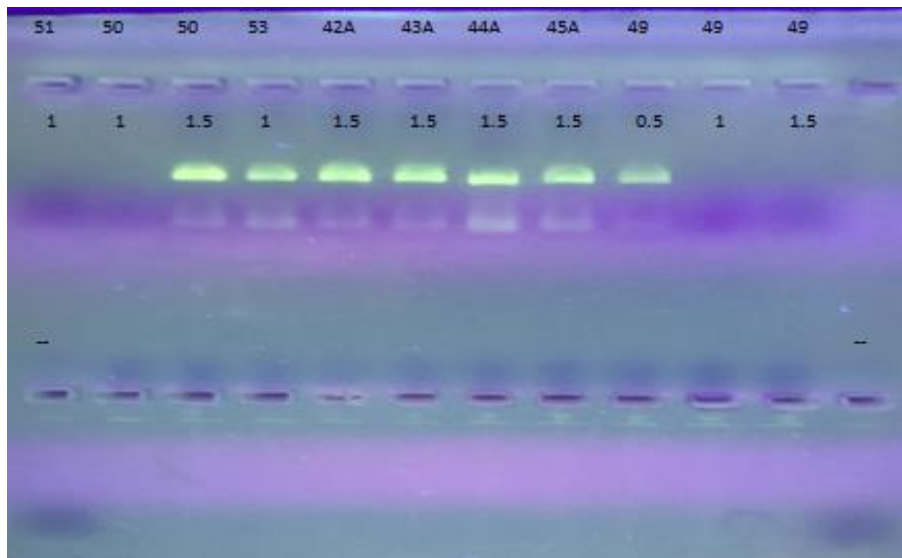
4.2. PCR για τον πολυμορφισμό rs4804134

Μετά την βελτιστοποίηση της PCR, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου *PDE4A* που περιέχει τον πολυμορφισμό rs4804134, με τη βοήθεια της PCR, σε αρκετά δείγματα, από τα οποία 29 έδωσαν επιθυμητό αποτέλεσμα μέσω ηλεκτροφόρησης. Μετά την ολοκλήρωση της PCR, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.









Εικόνες 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 & 16. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά (από τα 25 μl χρησιμοποιήθηκαν 5μl).

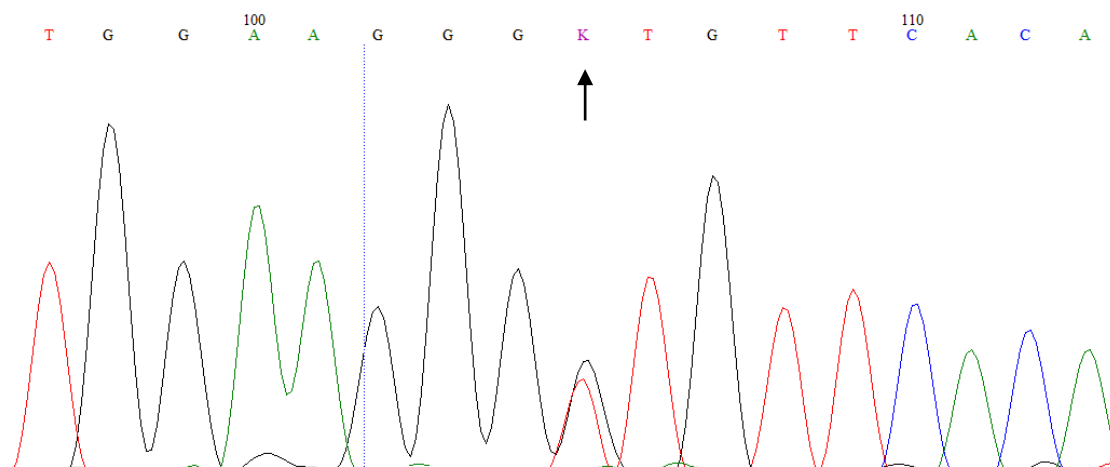
Από τις εικόνες 7-15, φαίνεται ότι οι ηλεκτροφορήσεις ήταν επιτυχημένες καθώς δεν παρατηρείται σήμα στο αρνητικό control. Ωστόσο, παρατηρείται ότι πολλά δείγματα δεν ενισχύονται μέσω της PCR. Αυτό οφείλεται συνήθως στην ποσότητα του DNA του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον υπάρχει το ενδεχόμενο να μην έγινε σωστά η απομόνωση του DNA από το αίμα του ασθενή.

4.3. Αλληλούχηση δειγμάτων και ανίχνευση του πολυμορφισμού rs4804134

Στις εικόνες 17 έως 45 δίνονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR. Οι εικόνες έχουν εστιαστεί στην περιοχή που απαντάται ο πολυμορφισμός rs4804134.

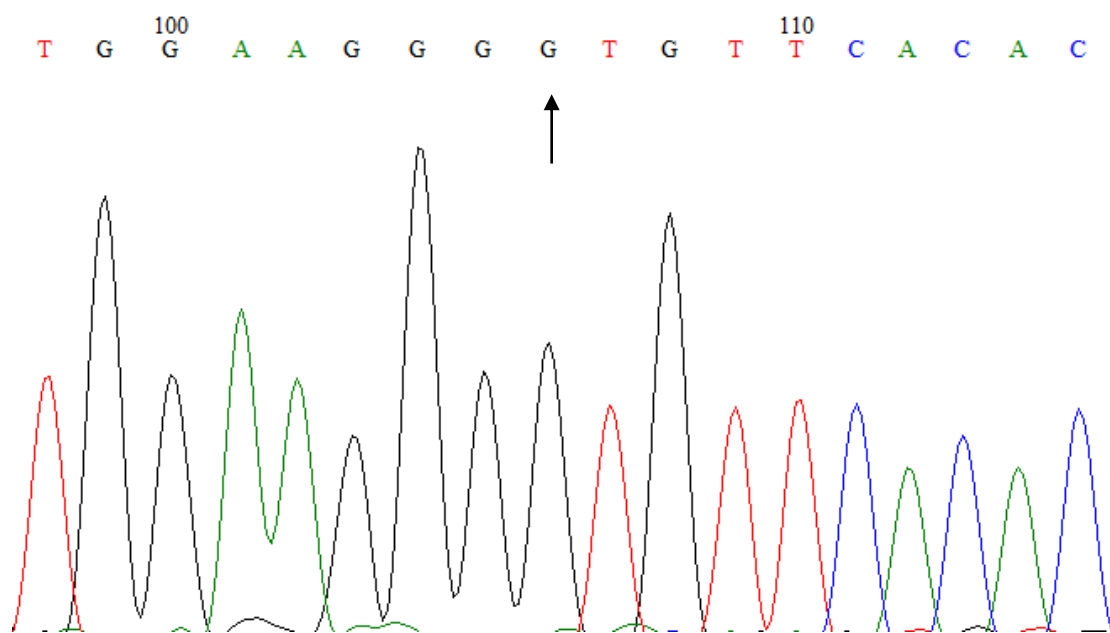
Από τις εικόνες, βγαίνει το συμπέρασμα ότι βρέθηκαν άτομα που είναι ομόζυγα για κάθε αλληλόμορφο, είτε TT είτε GG, αλλά και άτομα που είναι ετερόζυγα (GT). Ειδικότερα, από τα 29 δείγματα μόλις το ένα βρέθηκε ομόζυγο για το αλληλόμορφο G, ενώ τα υπόλοιπα είναι είτε ομόζυγα για το αλληλόμορφο T, είτε ετερόζυγα. Μπορεί να φαίνεται παράξενο το γεγονός ότι το αλληλόμορφο T εμφανίζεται πιο συχνά από το G καθώς το T είναι το MAF στον παγκόσμιο πληθυσμό, όμως όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, στους Ιταλούς το πιο συχνό αλληλόμορφο είναι το T σε ποσοστό περίπου 60%, και όπως σημειώθηκε οι Ιταλοί έχουν παρόμοια γενετική δομή με τους Έλληνες. Στις εικόνες που ακολουθούν, με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο πολυμορφισμός rs4804134.

Rs4804134 (tggaagg^t/gt)



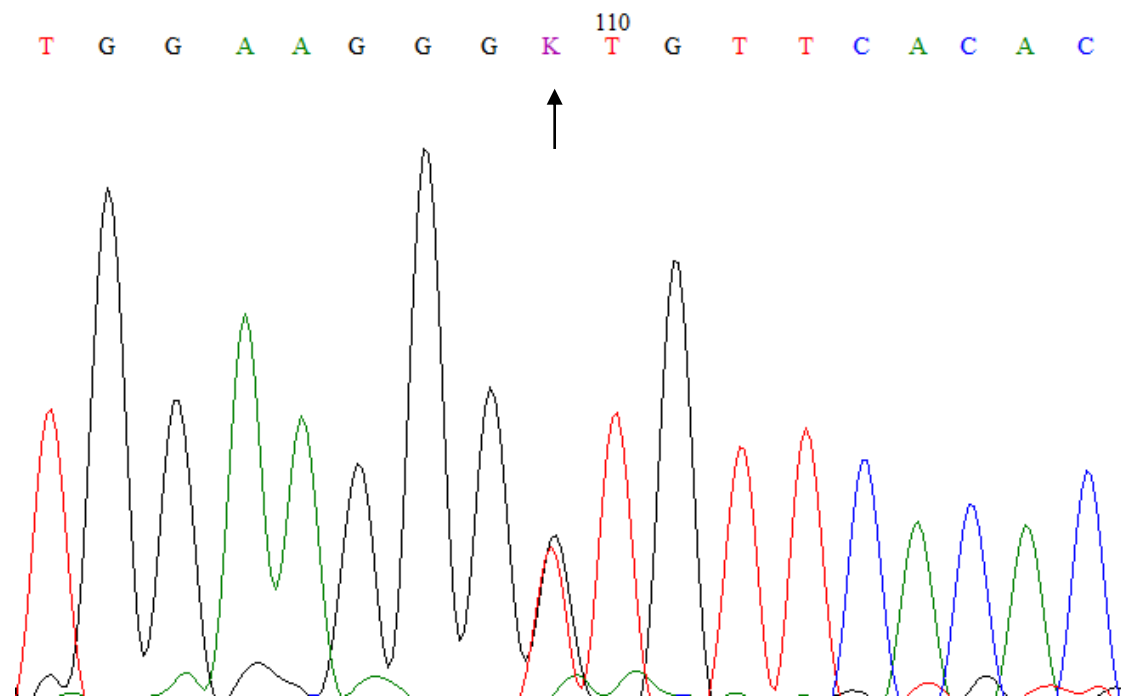
Εικόνα 17. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (COS 11), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagg^gt)



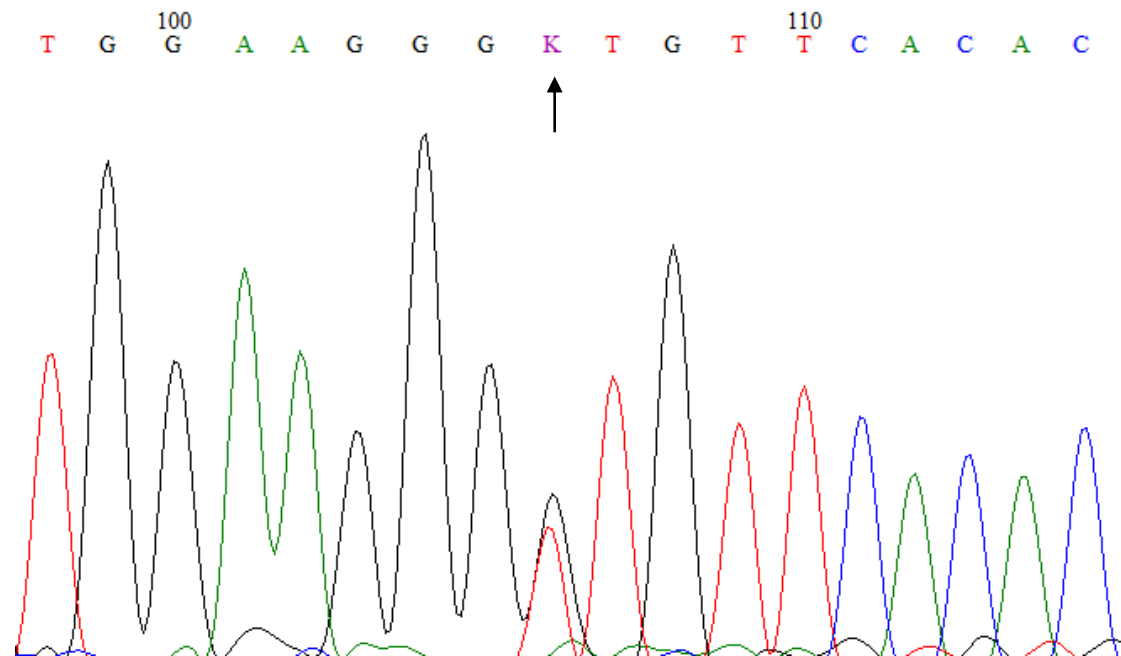
Εικόνα 18. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 7), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο G.

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



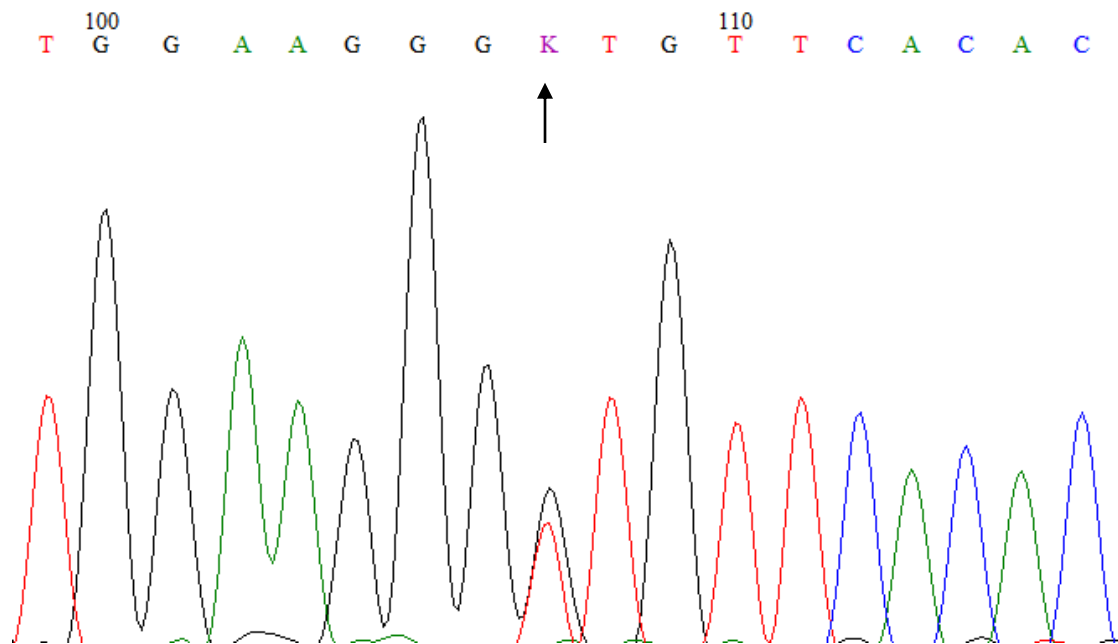
Εικόνα 19. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr9), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



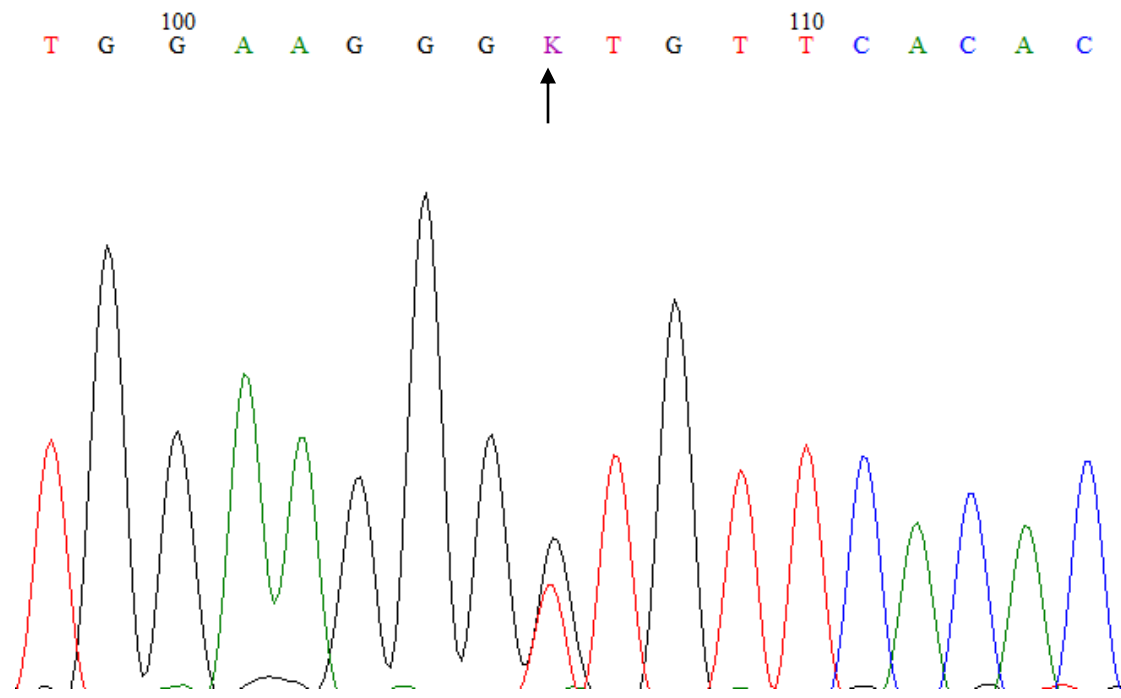
Εικόνα 20. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr16), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



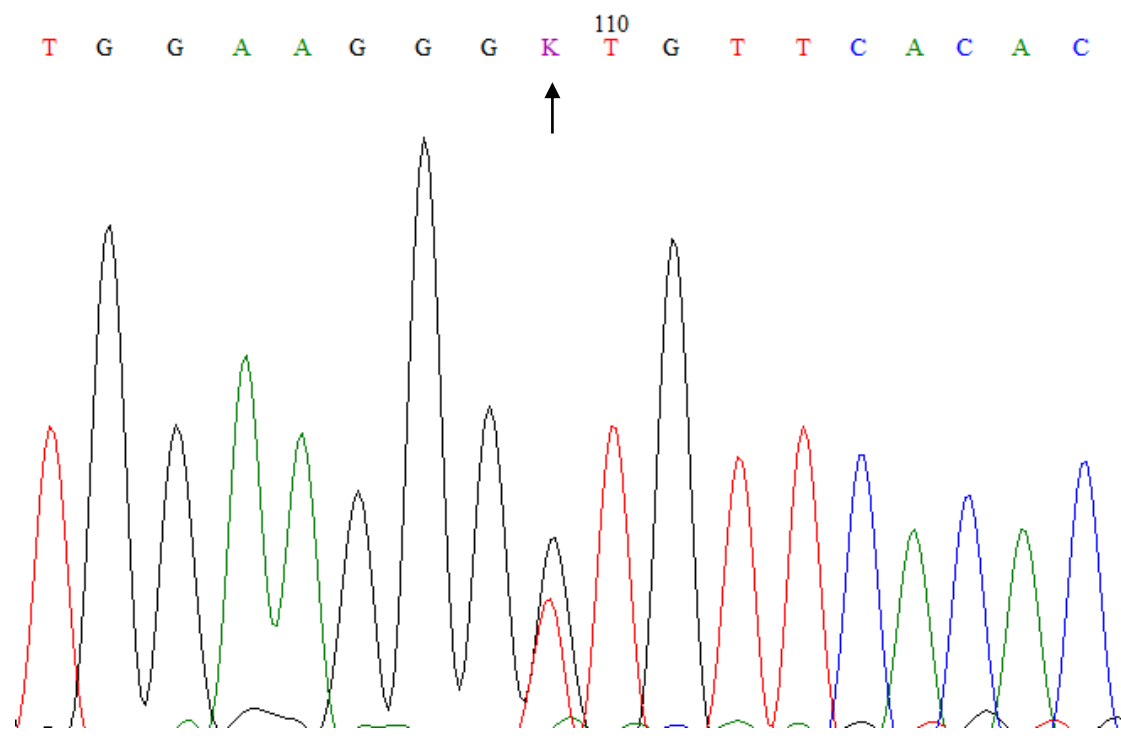
Εικόνα 21. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 20), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



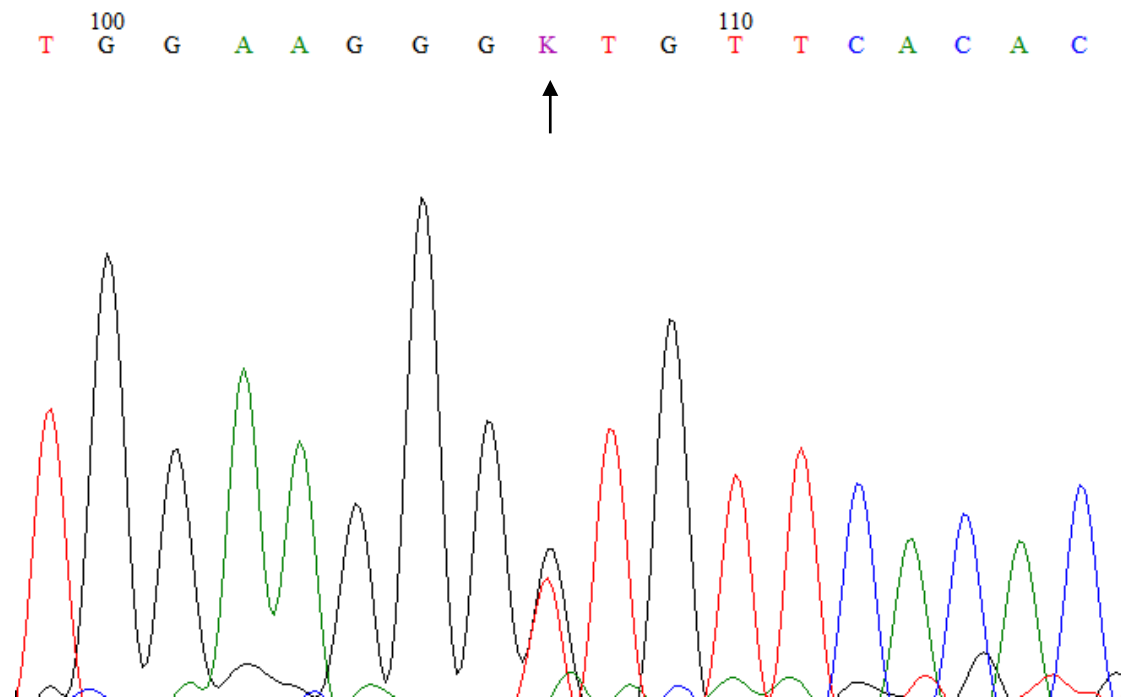
Εικόνα 22. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 21), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



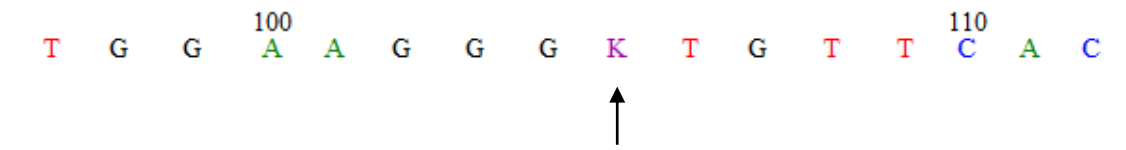
Εικόνα 23. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 23), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



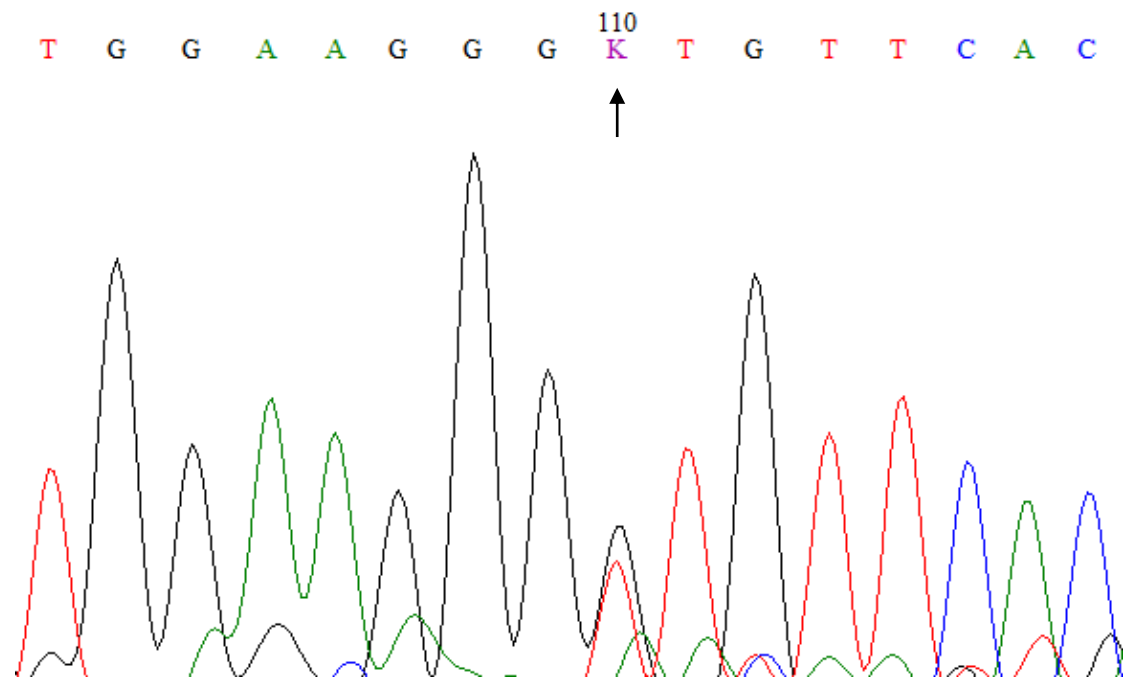
Εικόνα 24. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 30), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



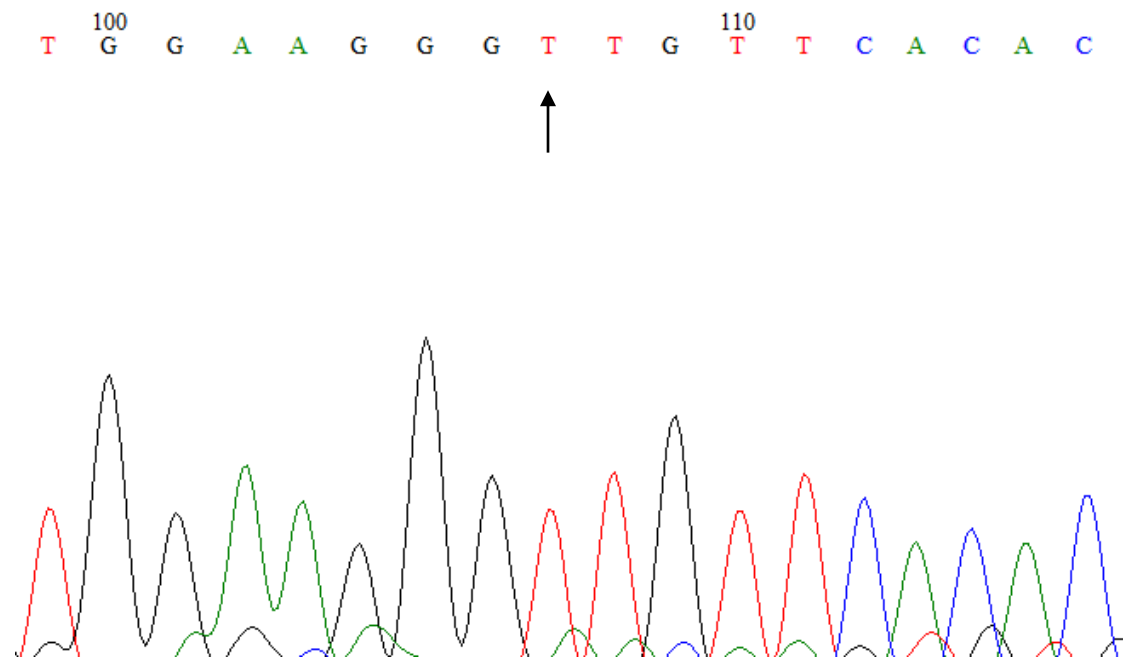
Εικόνα 25. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 35), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagg^t/gt)



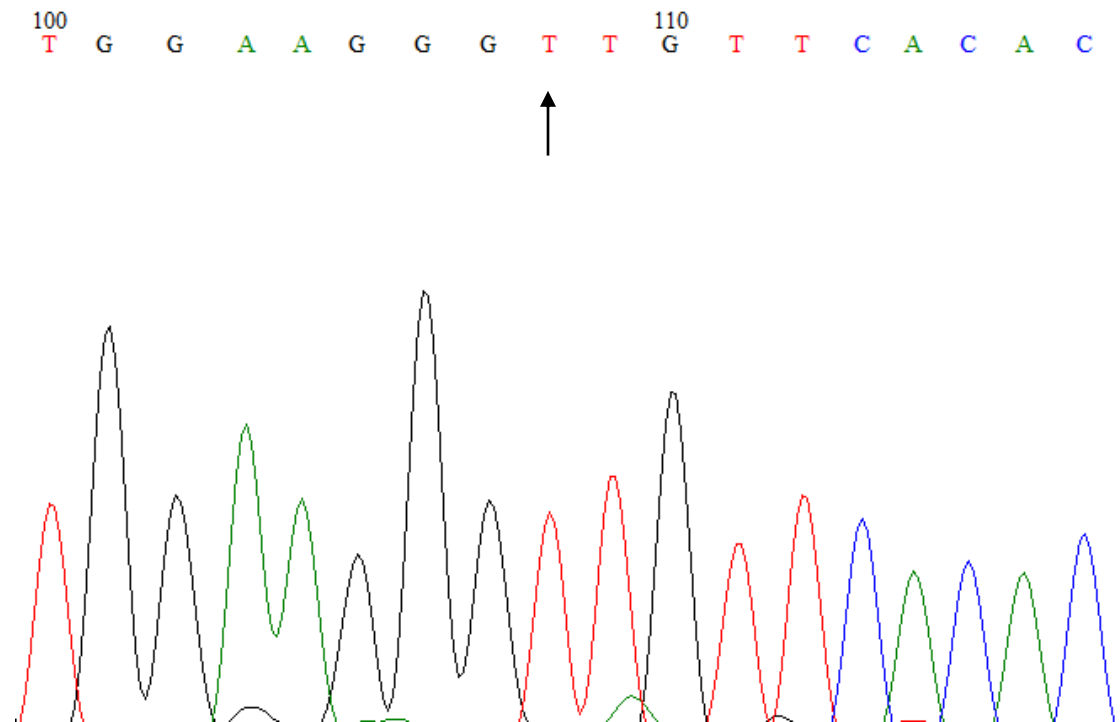
Εικόνα 26. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 40), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagg^tt)



Εικόνα 27. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 41), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaaggtt**)**

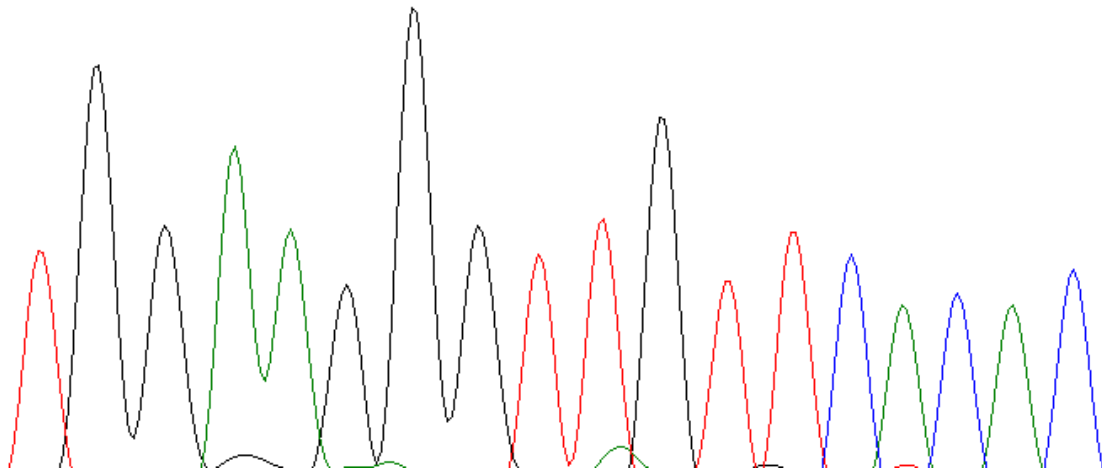


Εικόνα 28. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 42), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaagggtt)

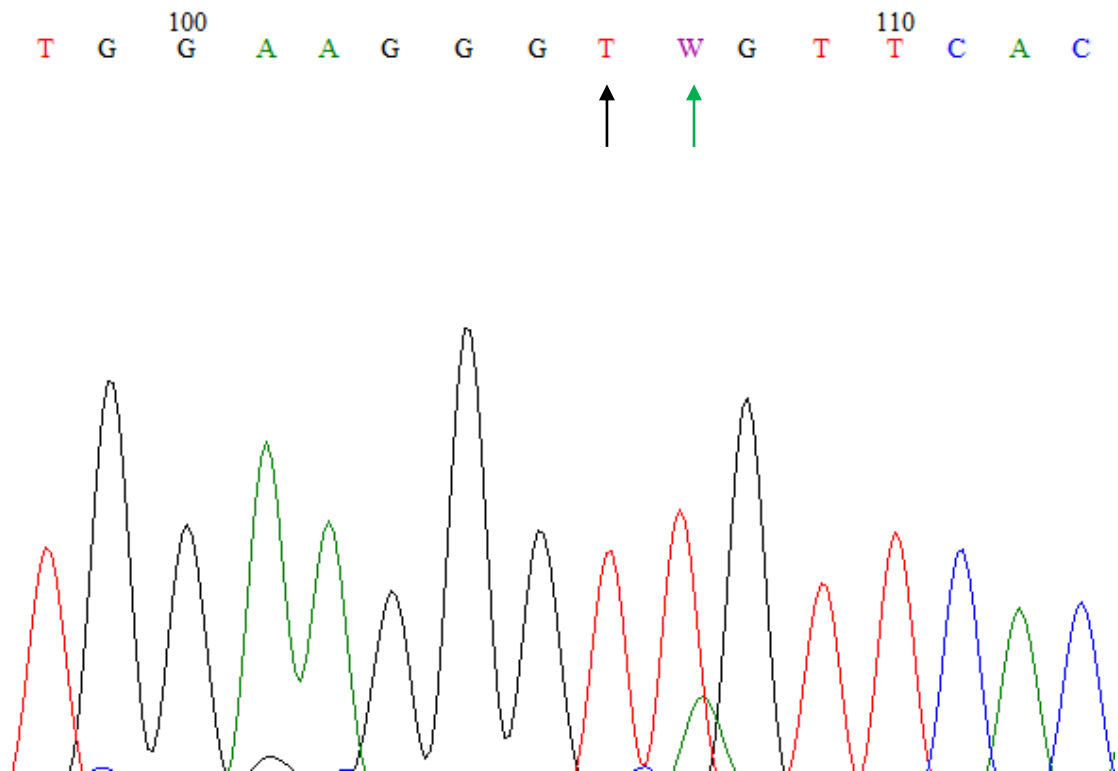
T¹⁰⁰ G G A A G G G T T G T¹¹⁰ T C A C A C

↑



Εικόνα 29. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 43), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

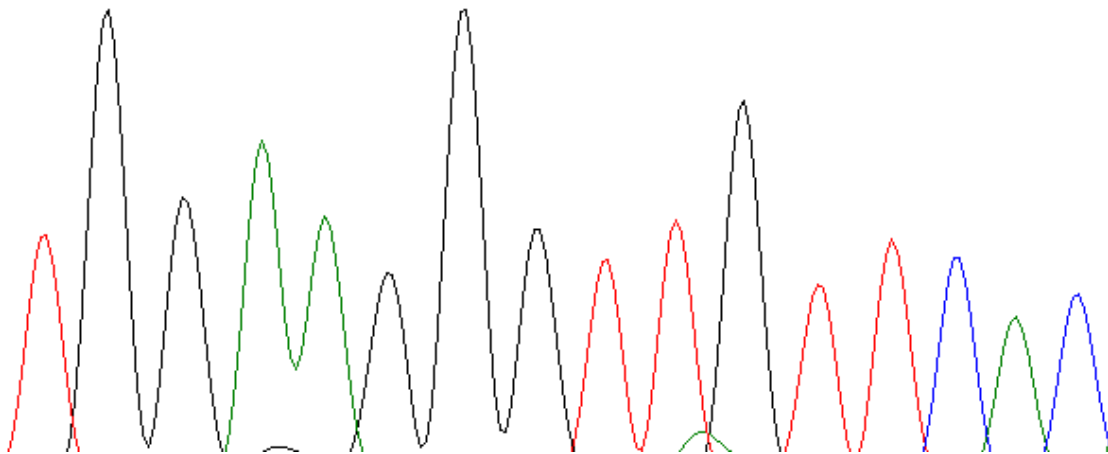
Rs4804134 (tggaagg^{tt})



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apre 44), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T. Στη θέση W που την υποδεικνύει το πράσινο βέλος φυσιολογικά πρέπει να υπάρχει το νουκλεοτίδιο θυμίνη (T). Ωστόσο, η αλληλούχηση έδειξε ότι το νουκλεοτίδιο στη θέση αυτή είναι T ή A.

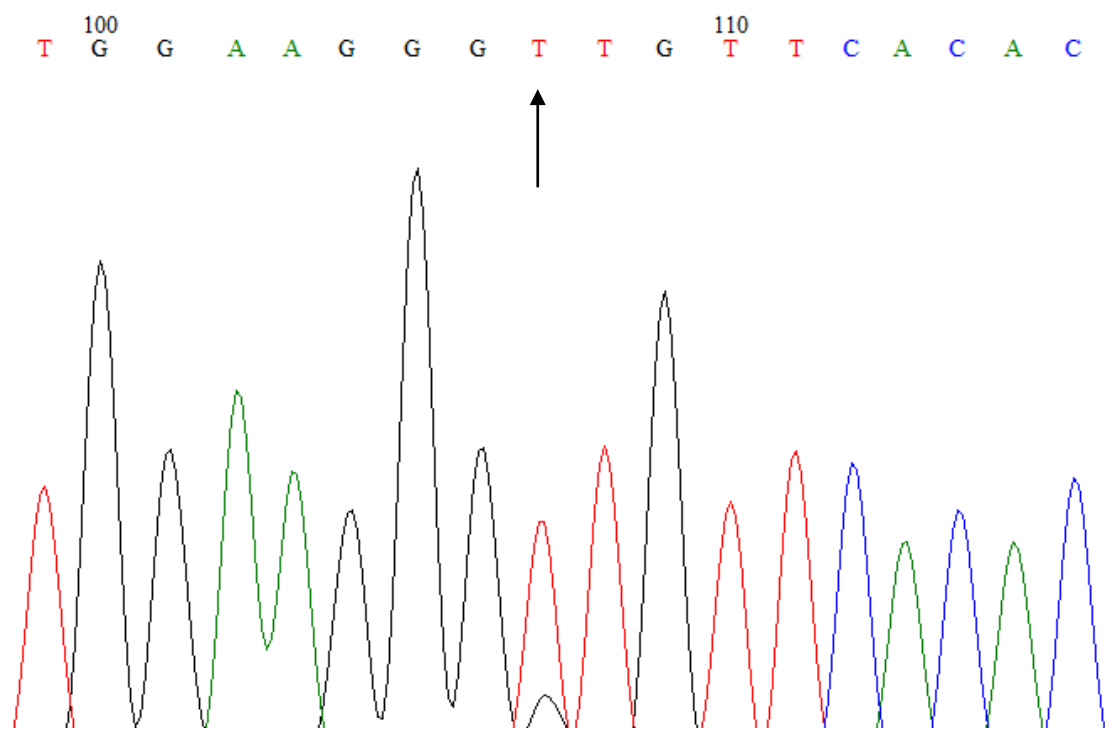
Rs4804134 (tggaagggtt)

T¹⁰⁰ G A A G G G T T G¹¹⁰ T C A C
↑



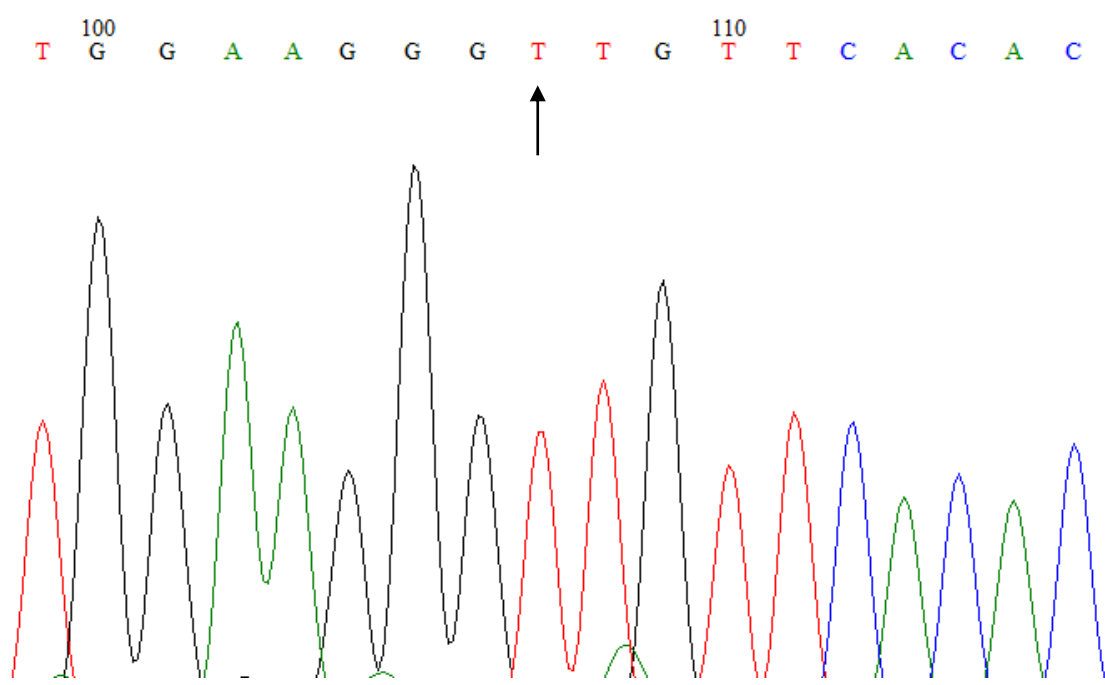
Εικόνα 31. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου PDE4A που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 45), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaagg^{tt})



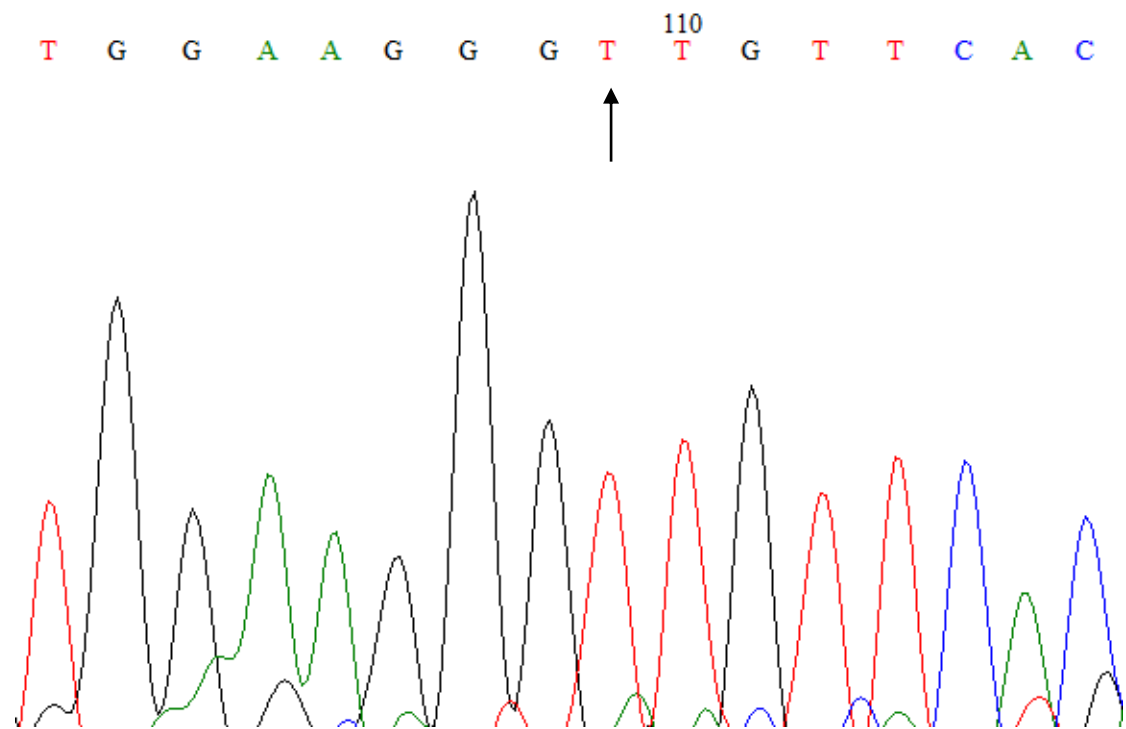
Εικόνα 32. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 49), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaagg^{tt})



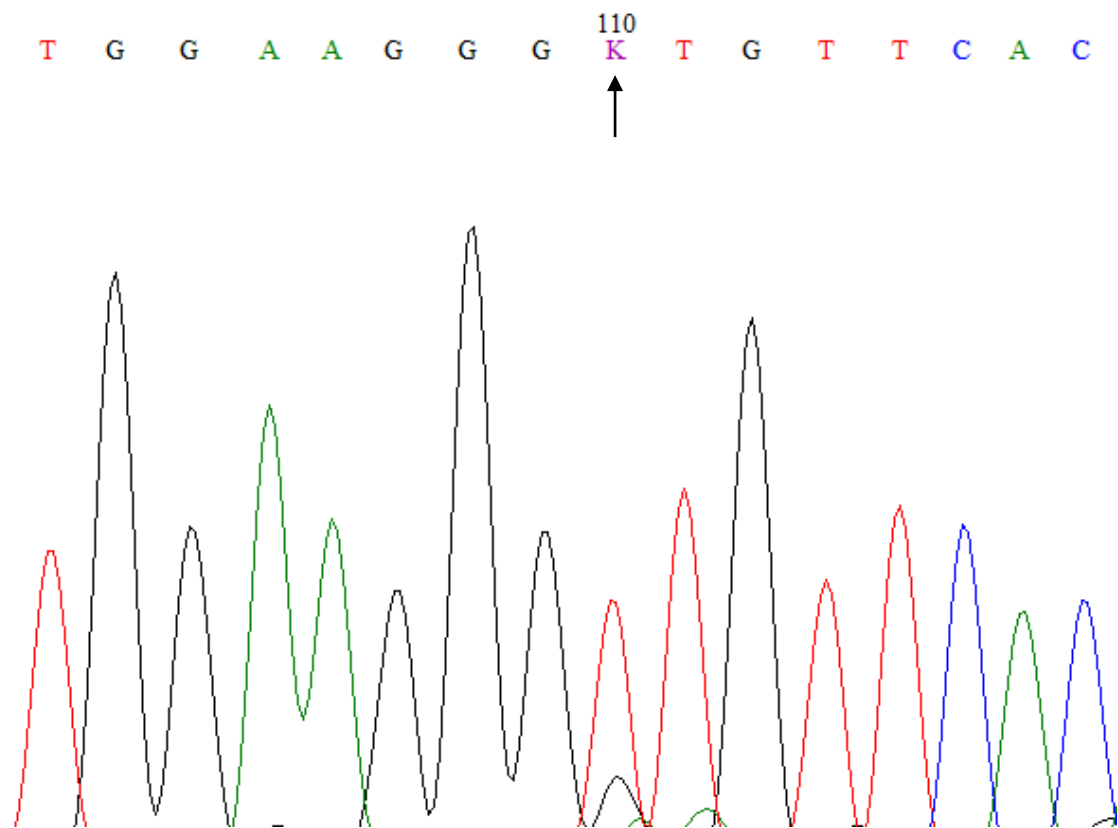
Εικόνα 33. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 50), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaagg^{tt})



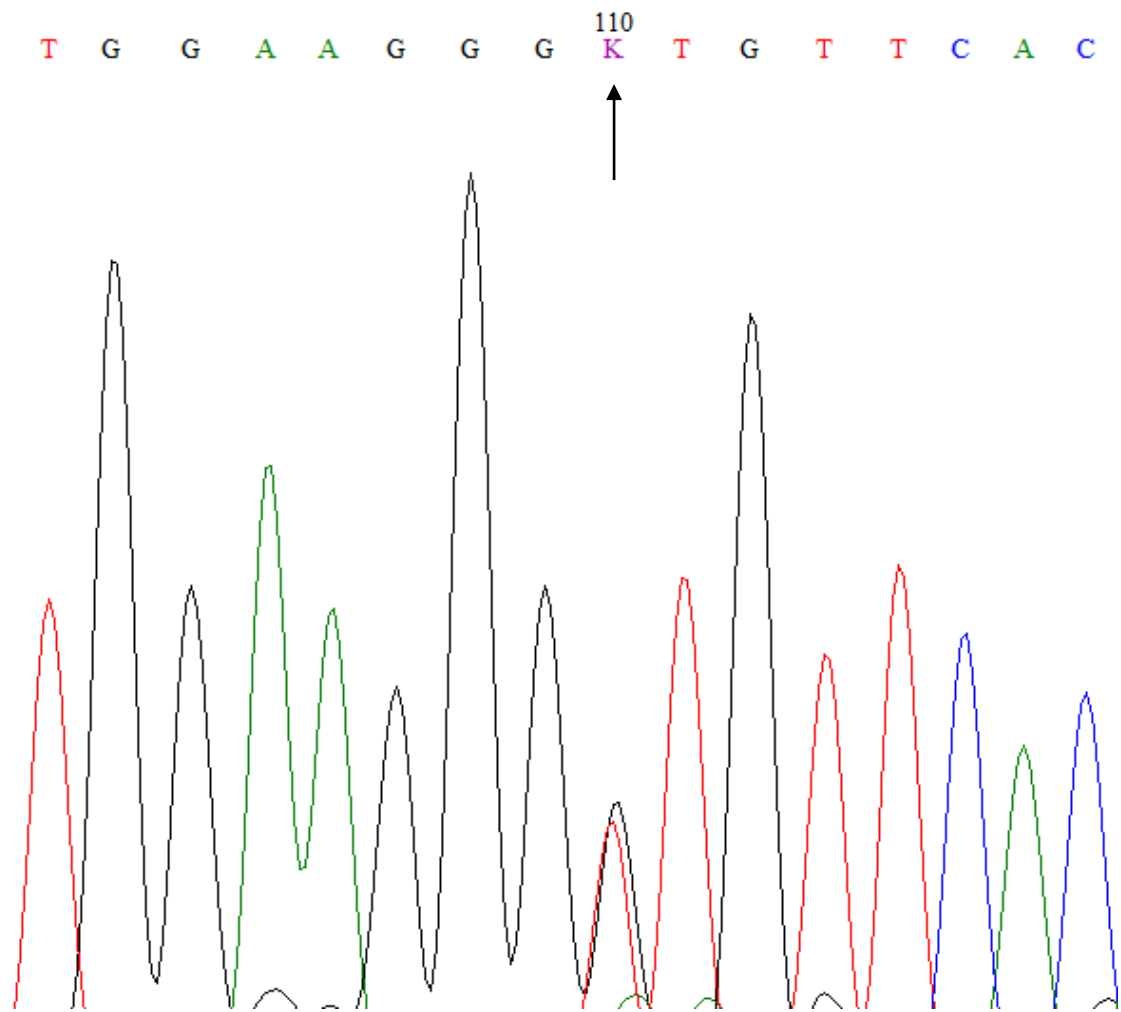
Εικόνα 34. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 51), παρατηρείται ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο T.

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



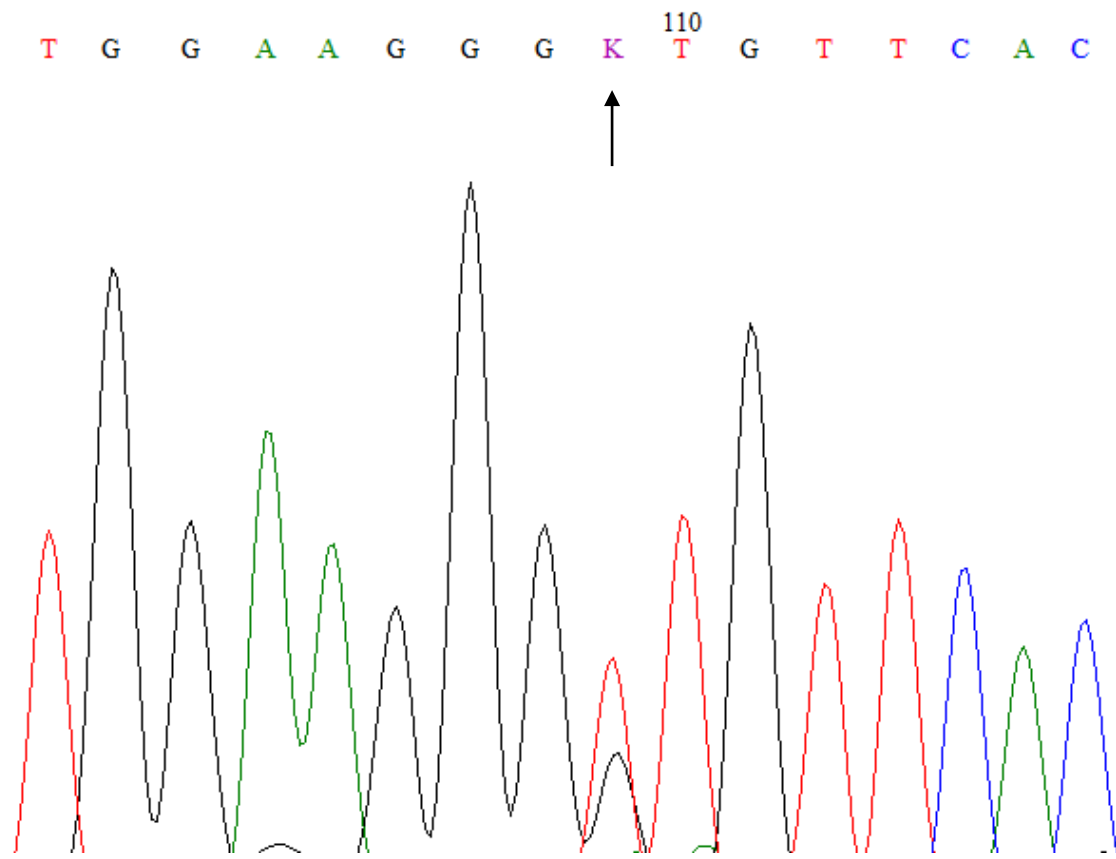
Εικόνα 35. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 53), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



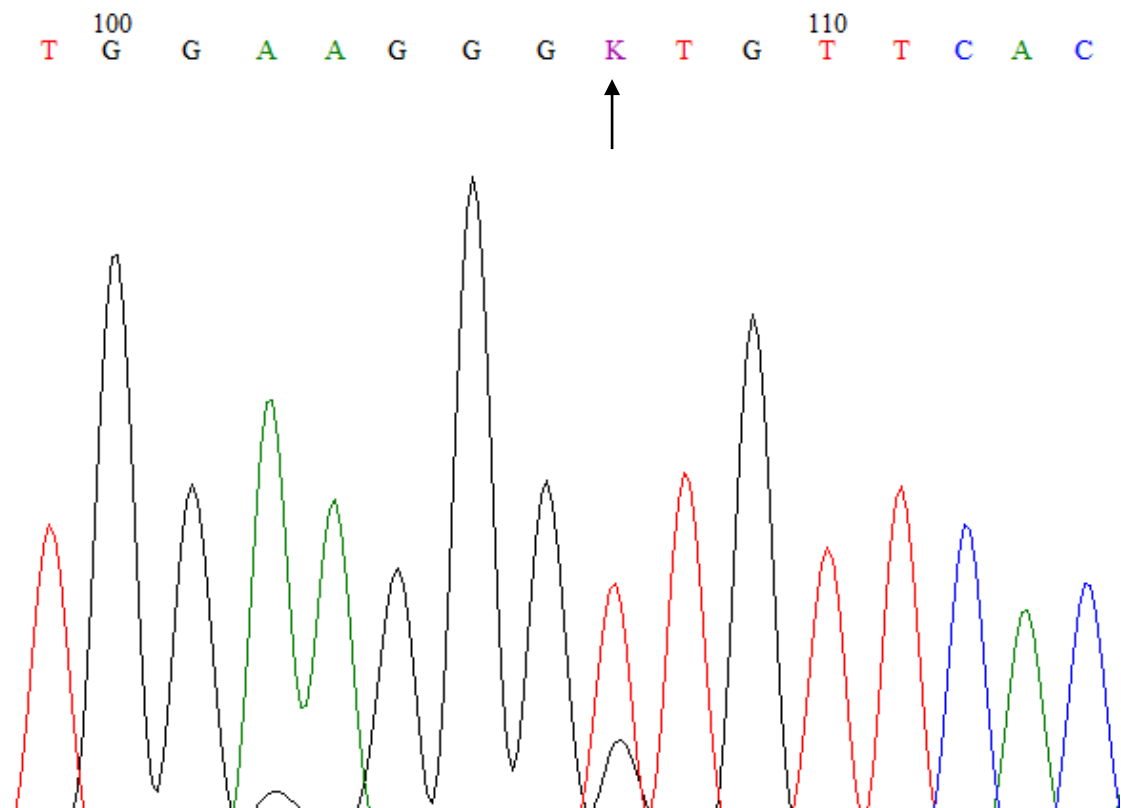
Εικόνα 36. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr 57), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



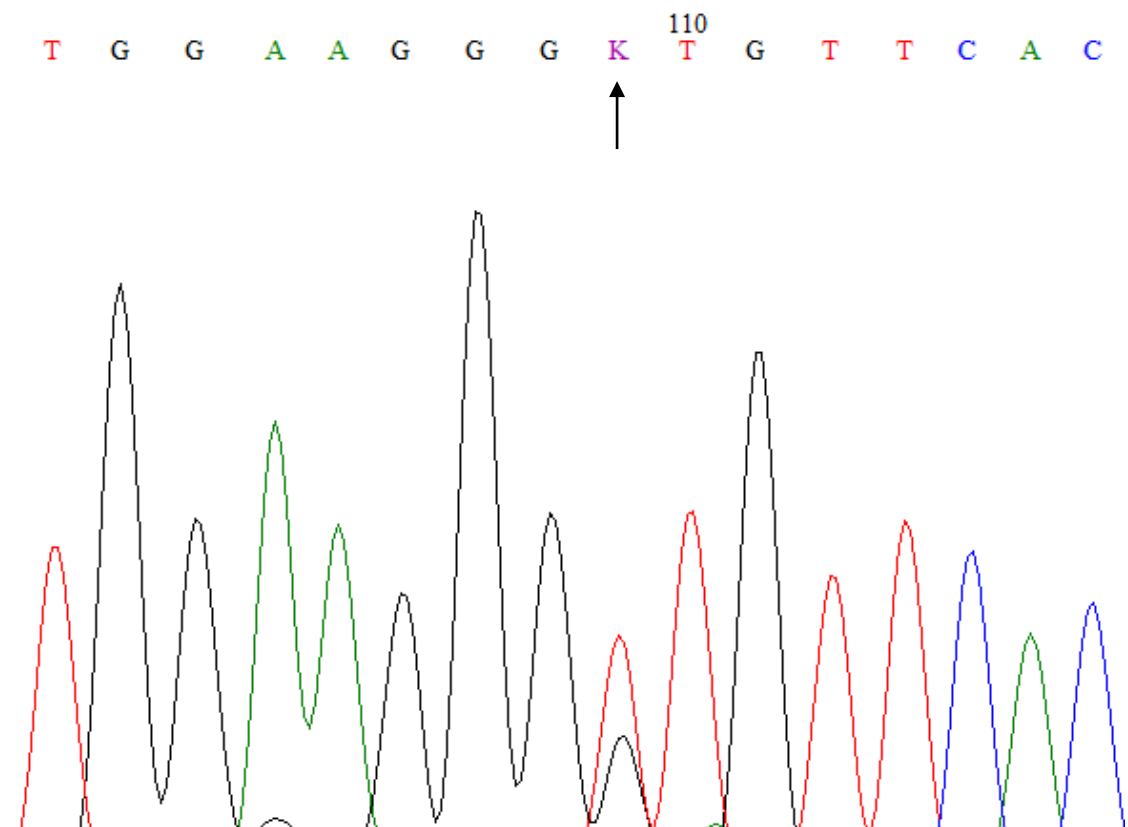
Εικόνα 37. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr6 60), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



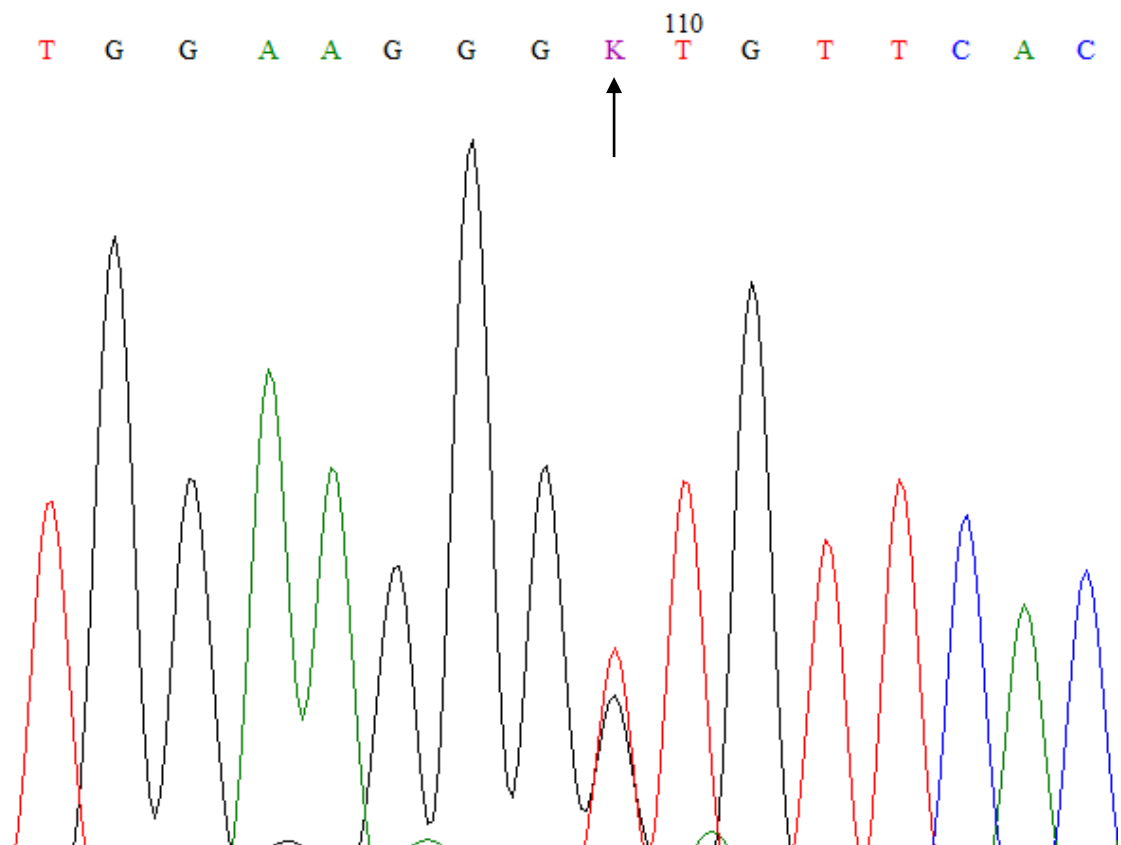
Εικόνα 38. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr61), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



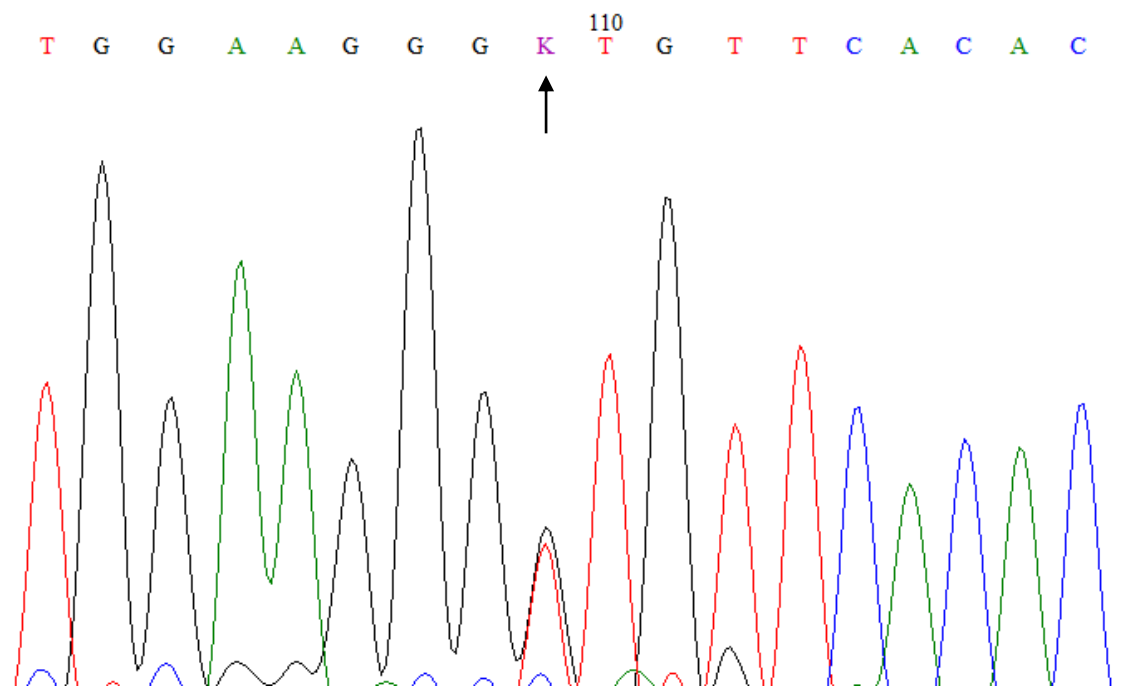
Εικόνα 39. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr6 62), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



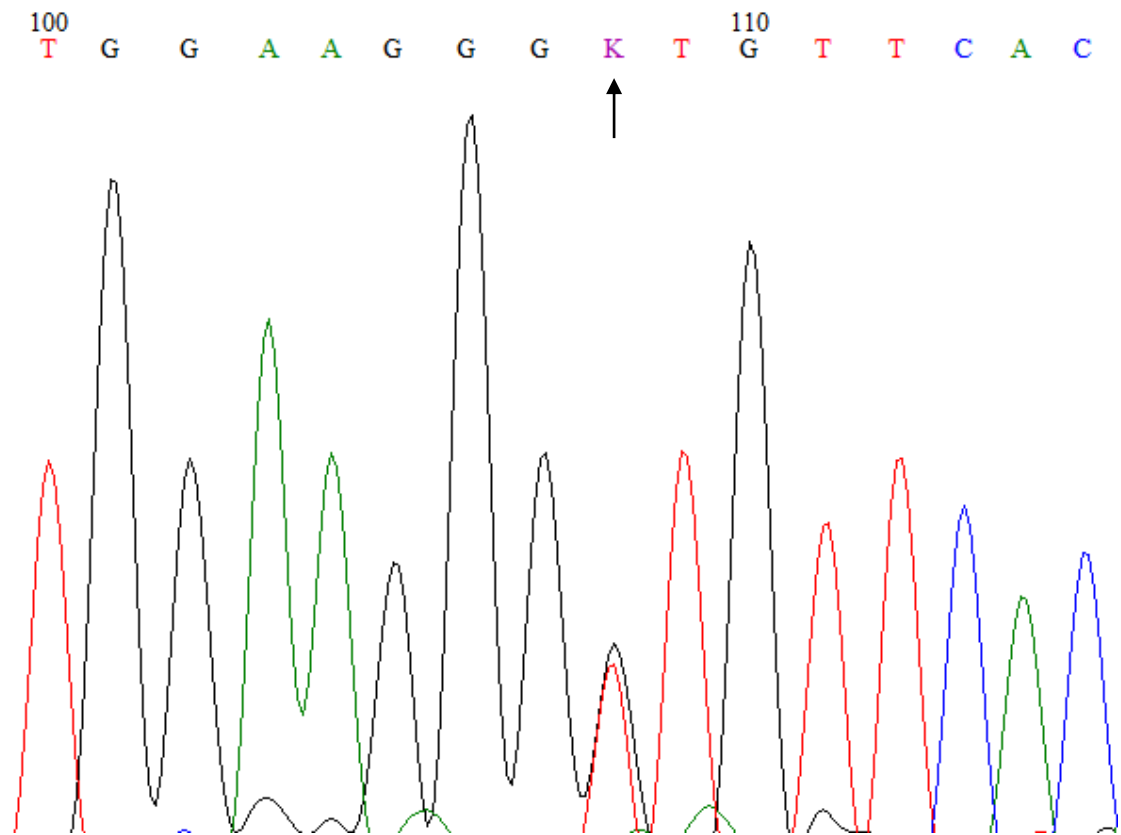
Εικόνα 40. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr63), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



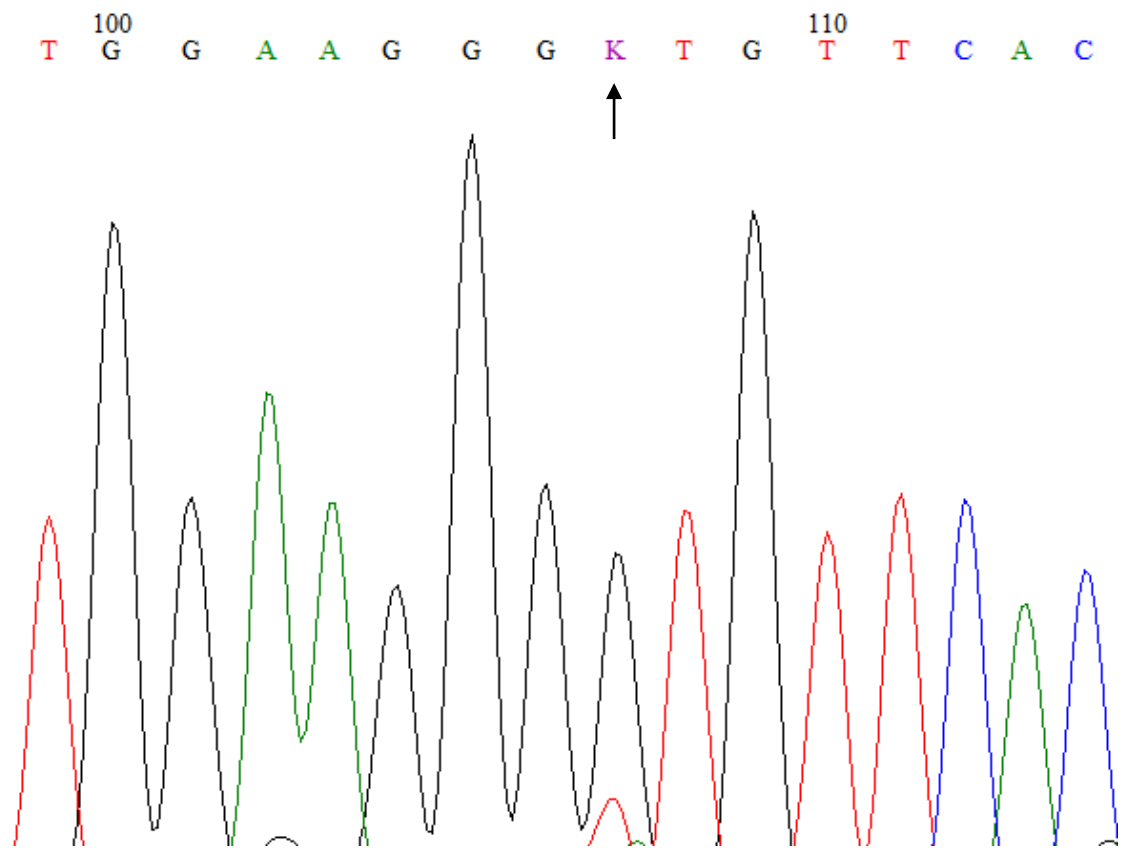
Εικόνα 41. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 65), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



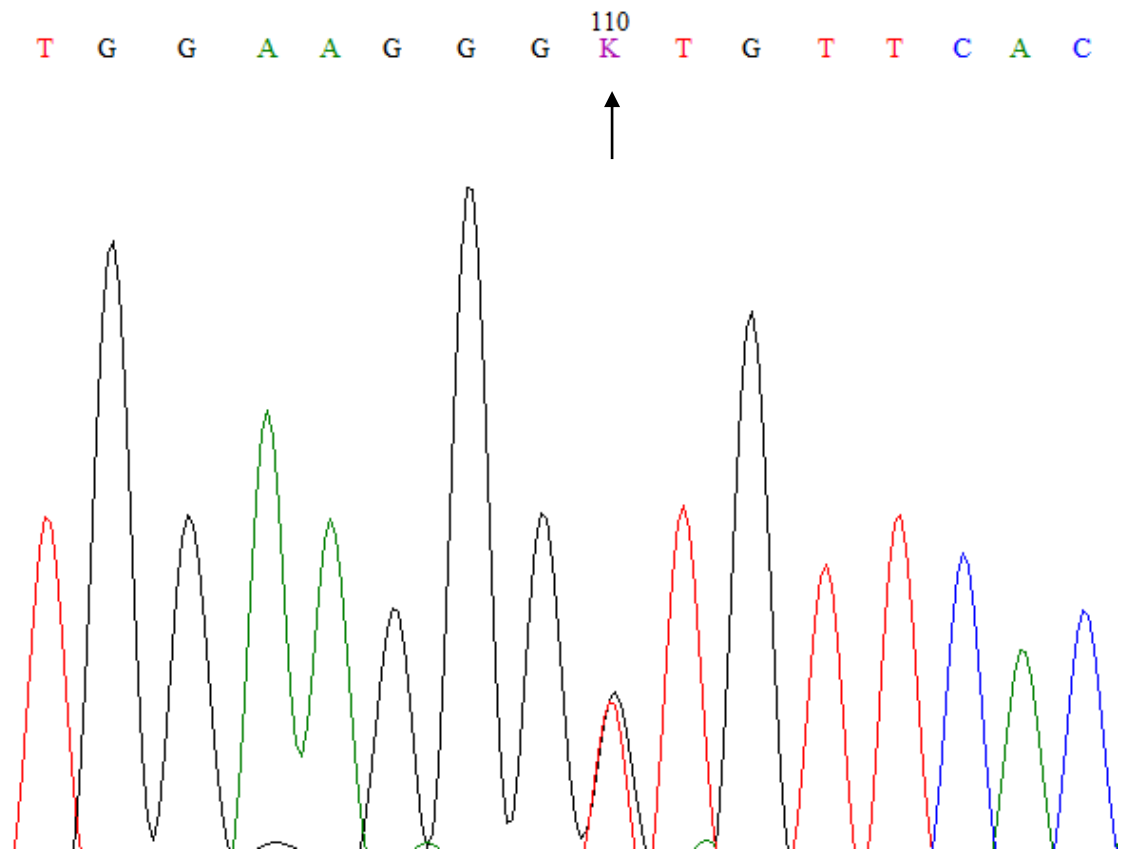
Εικόνα 42. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 66), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



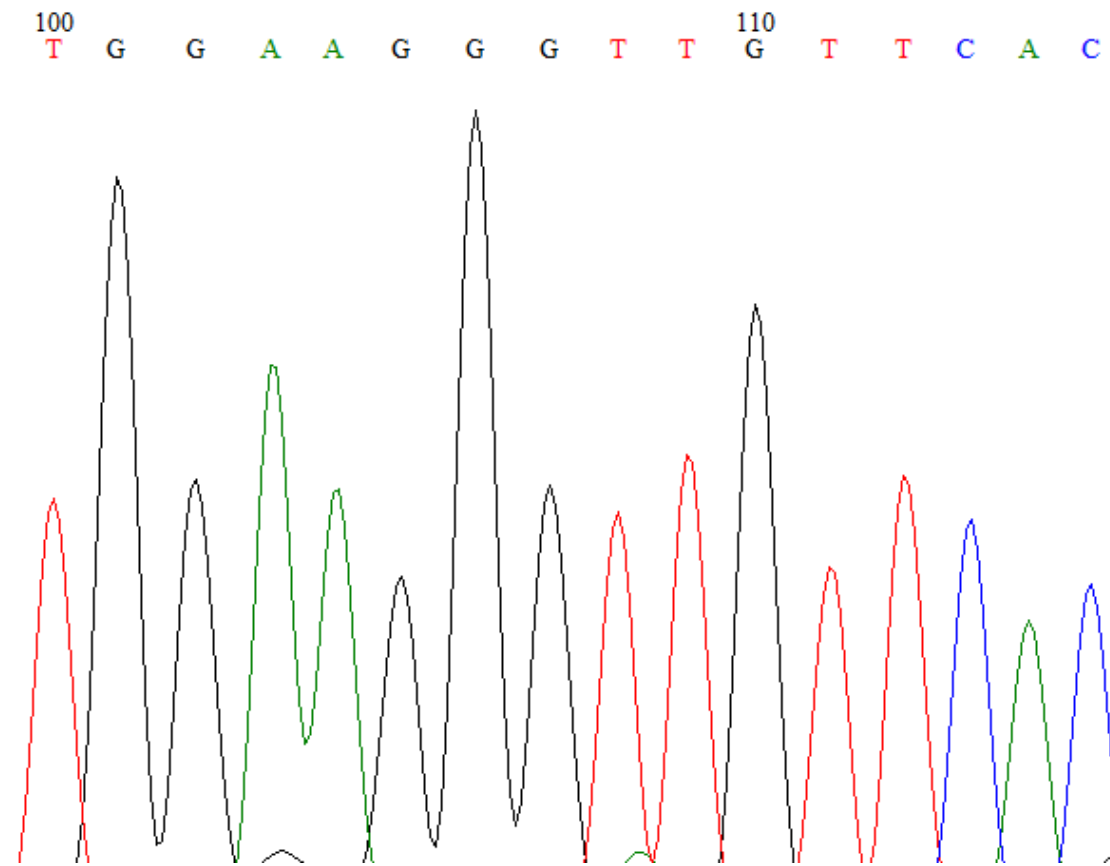
Εικόνα 43. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr67), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



Εικόνα 44. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apr68), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

Rs4804134 (tggaagggt/gt)



Εικόνα 45. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *PDE4A* που εστιάζεται στον πολυμορφισμό rs4804134. Στο συγκεκριμένο δείγμα (Apré 69), παρατηρείται ετεροζυγωτία (GT).

4.4. Έλεγχος χ^2

Από τα δεδομένα από την αλληλούχηση και την απόκριση των 29 ασθενών στη θεραπεία με απρεμιλάστη δημιουργήθηκε ο πίνακας 3:

Κωδικός ασθενούς	Γονότυπος	Απόκριση
COS11	G/T	Μερική
Apré 7	G/G	Πλήρης
Apré 9	G/T	Μερική
Apré 16	G/T	Μερική
Apré 20	G/T	Πλήρης
Apré 21	G/T	Μερική
Apré 23	G/T	Πλήρης
Apré 30	G/T	Μερική
Apré 35	G/T	Καθόλου
Apré 40	G/T	Μερική
Apré 41	T/T	Μερική
Apré 42	T/T	Πλήρης
Apré 43	T/T	Πλήρης
Apré 44	T/T	Πλήρης
Apré 45	T/T	Πλήρης
Apré 49	T/T	Μερική
Apré 50	T/T	Μερική
Apré 51	T/T	Μερική
Apré 53	G/T	Μερική
Apré 57	G/T	Πλήρης
Apré 60	G/T	Πλήρης
Apré 61	G/T	Πλήρης
Apré 62	G/T	Μερική
Apré 63	G/T	Μερική
Apré 65	G/T	Μερική
Apré 66	G/T	Μερική
Apré 67	G/T	Μερική
Apré 68	G/T	Μερική
Apré 69	G/T	Μερική

Πίνακας 3. Γονότυπος και απόκριση στη θεραπεία με απρεμιλάστη για τους 29 ασθενείς.

Από τον πίνακα 3, βγαίνει το συμπέρασμα ότι από τους 20 ετερόζυγους ασθενείς (G/T), οι 14 παρουσιάζουν μερική απόκριση στην απρεμιλάστη, οι 5 πλήρη και ο 1 καθόλου απόκριση στο φάρμακο. Από τους 8 ασθενείς που είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο T (T/T), οι 4 εμφανίζουν πλήρη και οι 4 μερική απόκριση στην απρεμιλάστη. Τέλος, ο 1 ασθενής ομόζυγος για το αλληλόμορφο G (G/G), παρουσιάζει πλήρη απόκριση στο φάρμακο.

Τα δεδομένα αυτά αναλύθηκαν περαιτέρω, ώστε να βρεθεί αν αυτές οι τιμές αποκλίνουν από τις αναμενόμενες. Αν αποκλίνουν, σημαίνει ότι ο γονότυπος επηρεάζει την απόκριση του ασθενούς στην απρεμιλάστη. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χ^2 . Η ανάλυση αυτή είχε σκοπό τον έλεγχο συσχέτισης των γονοτύπων και της απόκρισης των ασθενών στο φάρμακο. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των γονοτύπων έδειξαν ότι $p\text{-value}=0,43$ οπότε βγαίνει το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον γονότυπο και την απόκριση (αν $p\text{-value}<0,05$ τότε θα υπήρχε συσχέτιση). Η ίδια ανάλυση έγινε και για τα αλληλόμορφα των ασθενών αλλά το $p\text{-value}$ ήταν ακόμη υψηλότερο ($p\text{-value}=0,9$). Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο χ^2 ήταν το <https://www.mathsisfun.com/data//chi-square-calculator.html>.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στη μελέτη της συσχέτισης ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs4804134 (T/A/G) του γονιδίου *PDE4A* και στην απόκριση των ασθενών με ψωρίαση που λαμβάνουν θεραπεία με απρεμιλάστη. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση του συγκεκριμένου SNP σε δείγμα 29 ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση και βρίσκονται σε θεραπεία με τον αναστολέα απρεμιλάστη. Η απρεμιλάστη συνήθως δεν είναι η πρώτη επιλογή για τη θεραπεία της ψωρίασης, αλλά χρησιμοποιείται σε περίπτωση που άλλες θεραπείες (συστημικές θεραπείες, βιολογικά φάρμακα) είτε δεν βοηθήσουν τον ασθενή, είτε του προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες (κνησμός). Η απρεμιλάστη, από την άλλη μπορεί να προκαλέσει λίγες και μη σοβαρές παρενέργειες (A. Nast et al. , 2018), γεγονός που την καθιστά ικανοποιητική θεραπεία.

Η γονοτύπηση των 29 δειγμάτων ταυτοποίησε 1 ασθενή ομόζυγο για το αλληλόμορφο G (G/G), 7 ασθενείς ομόζυγους για το αλληλόμορφο T (T/T) και 20 ετερόζυγους ασθενείς (G/T). Ο προσδιορισμός του γονοτύπου στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλληλούχησης. Για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση, ήταν απαραίτητο να γίνει απομόνωση του DNA από το αίμα των ασθενών. Στη συνέχεια αυτό το DNA ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η PCR ήταν βελτιωμένη καθώς προηγουμένως είχε εντοπιστεί η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών για τον πολυμορφισμό rs4804134. Μετά την PCR, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης για να βρεθεί αν έχει γίνει ενίσχυση του τμήματος που περιέχει το συγκεκριμένο SNP. Τα 29 δείγματα που έδωσαν επιθυμητό αποτέλεσμα, στάλθηκαν σε εξειδικευμένο εργαστήριο για αλληλούχηση.

Στα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης του πολυμορφισμού με την απόκριση στη θεραπεία με έλεγχο χ^2 , ωστόσο, επειδή ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν επαρκεί έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστα συμπεράσματα, η αξιολόγηση της συσχέτισης θα επαναληφθεί όταν ολοκληρωθεί η συλλογή και γονοτύπηση περισσότερων δειγμάτων (100 δείγματα).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

F. Capon , M. Munro, R. Trembath, & J. Barker (2002). Searching for the Major Histocompatibility Complex Psoriasis Susceptibility Gene. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(5), p.745–751.

W. Chen, H. Xu, X. Wang, J. Gu, H. Xiong & Y. Shi (2015). The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 28(1), p.146–153.

A. Chiricozzi, D. Caposiena, V. Garofalo, M. V. Cannizzaro, S. Chimenti & R. Saraceno (2016). A new therapeutic for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: apremilast. *Expert Review of Clinical Immunology*, 12(3), p.237–249.

A. Chiricozzi, P. Romanelli, E. Volpe, G. Borsellino & M. Romanelli (2018). Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), p.179.

A. Rendon & K. Schakel (2019). *Psoriasis Pathogenesis and Treatment*.

E. Pezzolo & L. Naldi (2020). Epidemiology of major chronic inflammatory immune-related skin diseases in 2019.

I. M. Michaellek, B. Loring & S. M. John (2017). A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis.

J. Machado-Pinto, M. dos Santos Diniz & N. Couto Bavoso (2016). Psoriasis: new comorbidities.

J. Takeshita, S. Grewal, S. M Langan, N. N Mehta, A. Ogdie, A. S Van Voorhees, J. M Gelfand (2017). Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology.

M. Furue & T. Kadono (2017). "Inflammatory skin march" in atopic dermatitis and psoriasis.

D.A. Springate, R. Parisi, E. Kontopantelis, D. Reeves, C.E.M. Griffiths & D.M. Ashcroft (2017). Incidence, prevalence and mortality of patients with psoriasis: a U.K. population - based cohort study.

Jp. Ortonne, S. Chimenti, T. Luger, L. Puig, F. Reid & R. M. Trüeb (2009). Scalp psoriasis: European consensus on grading and treatment algorithm.

A. A. Navarini, A. D. Burden, F. Capon, U. Mrowietz, L. Puig, S. Köks, K. Kingo, C. Smith & J. N. Barker (2017). European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis.

R. Parisi, D. P.M.Symmons, C. E.M.Griffiths & D. M.Ashcroft (2013). Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence.

T. Ito, H. Takahashi, A. Kawada, H. Iizuka & H. Nakagawa (2018). Epidemiological survey from 2009 to 2012 of psoriatic patients in Japanese Society for Psoriasis Research.

- K. Kamiya, M. Kishimoto, J. Sugai, M. Komine & M. Ohtsuki (2019). Risk Factors for the Development of Psoriasis.
- M. Vičić, M. Kaštelan, I. Brajac, V. Sotošek & L. Prpić Massari (2021). Current Concepts of Psoriasis Immunopathogenesis.
- J. Kim & J. Krueger (2015). The immunopathogenesis of psoriasis.
- K. Ronholt & L. Iversen (2017). Old and New Biological Therapies for Psoriasis.
- J. C. Prinz (2017). Autoimmune aspects of psoriasis: Heritability and autoantigens.
- W. Alwan & F. O Nestle (2015). Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine.
- X. Zhang, H. Wang, H. Te-shao, S. Yang, S. Chen (2002). The genetic epidemiology of psoriasis vulgaris in Chinese Han.
- S. Sirotti, E. Generali, A. Ceribelli, N. Isailovic, M. De Santis & C. Selmi (2017). Personalized medicine in rheumatology: the paradigm of serum autoantibodies.
- A. S. Lønnberg, L. Skov, A. Skytthe, K. O. Kyvik, O. B. Pedersen, S. F. Thomsen (2013). Heritability of psoriasis in a large twin sample.
- N. Dand, S. K. Mahil, F. Capon, C. H. Smith, M. A. Simpson, J. N. Barker (2020). Psoriasis and Genetics.
- D. Ran, M. Cai & X. Zhang (2019). Genetics of psoriasis: a basis for precision medicine.
- M. Cargill, S. J. Schrodi, M. Chang, V. E. Garcia, R. Brandon, K. P. Callis, N. Matsunami, K. G. Ardlie, D. Civello, J. J. Catanese, D. U. Leong, J. M. Panko, L. B. McAllister, C. B. Hansen, J. Papenfuss, S. M. Prescott, T. J. White, M. F. Leppert, G. G. Krueger, A. B. Begovich (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes.
- O. FitzGerald, M. Haroon, J. T. Giles & R. Winchester (2015). Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype.
- E. Sbidian, A. Chaimani, S. Afach, L. Doney, C. Dressler, C. Hua, C. Mazaud, C. Phan, C. Hughes, D. Riddle, L. Naldi, I. Garcia-Doval & L. Le Cleach (2020). Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis.
- E. Daudén, L. Puig, C. Ferrándiz, J. L. Sánchez-Carazo, J. M. Hernanz-Hermosa (2016). Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis: Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology
- R. Prieto-Pérez, T. Cabaleiro, E. Daudén, D. Ochoa, M. Roman & F. Abad-Santos (2013). Genetics of Psoriasis and Pharmacogenetics of Biological Drugs.
- S. B. Kaushik & M. G. Lebwohl (2019). Psoriasis: Which therapy for which patient: Psoriasis comorbidities and preferred systemic agents.

O. Yélamos, S. Ros, L. Puig (2015). Improving patient outcomes in psoriasis: strategies to ensure treatment adherence.

J. Grželj, M. Marovt, P. B. Marko, I. Mlinarič-Raščan, T. Gmeiner & A. Šmid (2021). Polymorphism in Gene for ABCC2 Transporter Predicts Methotrexate Drug Survival in Patients with Psoriasis.

K. Kubota, Y. Kamijima, T. Sato, N. Ooba, D. Koide, H. Iizuka & H. Nakagawa (2015). Epidemiology of psoriasis and palmoplantar pustulosis: a nationwide study using the Japanese national claims database.

R. Rozen (1996). Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.

M. Izmirli, B. Bulbul Sen, E. Rifaioglu, B. Gogebakan, O. Aldemir, T. Sen, O. Ekiz & D. Alptekin (2016). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in psoriasis in southern Turkey.

R.B. Warren, R.L. Smith, E. Campalani, S. Eyre, C.H. Smith, J.N.W.N. Barker, J. Worthington, C.E.M. Griffiths (2009). Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms.

E. Campalani, M. Arenas, A. M. Marinaki, C. M. Lewis, J. N.W.N. Barker & C. H. Smith (2007). Polymorphisms in Folate, Pyrimidine, and Purine Metabolism Are Associated with Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Psoriasis.

J. K. Gittler, J. G. Krueger & E. Guttman-Yassky (2013). Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: implications for contact dermatitis.

P. Schafer (2012). Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis.

T. Höhler, A. Krueger, P. M. Schneider, R. E. Schopf, J. Knop, C. Rittner, K. H. Meyer zum Büschenfelde & E. Märker-Hermann (1997). A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis.

E. Louis, D. Franchimont, A. Piron, Y. Gevaert, N. Schaaf-Lafontaine, S. Roland, P. Mahieu, M. Malaise, D. De Groote, R. Louis & J. Belaiche (1998). Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans.

W. Kaluza, E. Reuss, S. Grossmann, R. Hug, R. E. Schopf, P. R. Galle, E. Märker-Hermann & T. Höhler (2000). Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism.

K. Reich, K.M. Hummel, I. Beckmann, R. Mössner & C. Neumann (2002). Treatment of severe psoriasis and psoriatic arthritis with leflunomide.

A. Settin, H. Hassan, R. El-Baz, T. Hassan (2009). Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt.

- C. Li, G. Wang, Y. Gao, L. Liu & T. Gao (2007). TNF- α Gene Promoter -238G>A and -308G>A Polymorphisms Alter Risk of Psoriasis Vulgaris: A Meta-Analysis.
- K. Reich, G. Westphal, T. Schulz, M. Müller, S. Zipprich, T. Fuchs, E. Hallier & C. Neumann (1999). Combined analysis of polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis.
- B. Nedoszytko, A. Szczerkowska-Dobosz, M. Zabłotna, J. Gleń, K. Rębała & J. Roszkiewicz (2007). Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor- α gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population.
- E. Toussiroot, E. Houvenagel, V. Goëb, D. Fouache, A. Martin, P. Le Dantec, E. Dernis, D. Wendling, T. Ansemant, J. M. Berthelot, B. Bader-Meunier & B. Kantelip (2012). Development of inflammatory bowel disease during anti-TNF- α therapy for inflammatory rheumatic disease: a nationwide series.
- Y. Tsunemi, H. Saeki, K. Nakamura, T. Sekiya, K. Hirai, H. Fujita, N. Asano, M. Kishimoto, Y. Tanida, T. Kakinuma, H. Mitsui, Y. Tada, M. Wakugawa, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, K. Tamaki (2002). Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris.
- M. D. Houslay, G. S. Baillie & D. H. Maurice (2007). cAMP-Specific Phosphodiesterase-4 Enzymes in the Cardiovascular System.
- G. B. Bolger, I. McPhee & M. D. Houslay (1996). Alternative splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterization of a novel tissue-specific isoform, RNPDE4A8.
- D. J. Najarian & A. B. Gottlieb (2003). Connections between psoriasis and Crohn's disease.
- M. Milakovic & M. J. Gooderham (2021). Phosphodiesterase-4 Inhibition in Psoriasis.
- M. Wittmann & P. S. Helliwell (2013). Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases.
- E. D. Deeks (2017). GP2015: An Etanercept Biosimilar.
- W. Bäumer, J. Hoppmann, C. Rundfeldt, M. Kietzmann (2007). Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis.
- P. Gisondi & G. Girolomoni (2016). Apremilast in the therapy of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis.
- K. Papp, K. Reich, C. L. Leonardi, L. Kircik, S. Chimenti, R. G. B. Langley, C. Hu, R. M. Stevens, R. M. Day, K. B. Gordon, N. J. Korman, C. E. M. Griffiths (2015). Apremilast, an oral phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, in patients with moderate to severe plaque psoriasis: Results of a phase III, randomized, controlled trial (Efficacy and Safety Trial Evaluating the Effects of Apremilast in Psoriasis [ESTEEM] 1).

C. Paul, J. Cather, M. Gooderham, Y. Poulin, U. Mrowietz, C. Ferrandiz, J. Crowley, C. Hu, R. M. Stevens, K. Shah, R. M. Day, G. Girolomoni & A. B. Gottlieb (2015). Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis over 52 weeks: a phase III, randomized controlled trial (ESTEEM 2).

S. R. Feldman, Y. Zhao, L. Shi & M. H. Tran (2015). Economic and Comorbidity Burden Among Patients with Moderate-to-Severe Psoriasis.