ΤΜΗΜΑ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
DEPARTMENT OF Biochemistry & Biotechnology UNIVERSITY OF THESSALY

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

# ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΖΑΓΚΑΝΙΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

**ΛΑΡΙΣΑ 2023**

# ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *IL-17A* ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΨΩΡΙΑΣΗ ΜΕ ΣΕΚΟΥΚΙΝΟΥΜΑΜΠΗ

# ANALYSIS OF *IL-17A* GENETIC POLYMORPHISMS IN PSORIATIC PATIENTS TREATED WITH SECUKINUMAB

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΛΙΑΔΑΚΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΟΛΟΓΙΑ ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΪΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ψωρίαση είναι μία πολυπαραγοντική δερματική νόσος, η οποία εκδηλώνεται σε διάφορα σημεία του δέρματος και με διαφορετική ένταση. Οι παράγοντες που οδηγούν στην ψωρίαση είναι γενετικοί, καθώς με μελέτες συσχέτισης έχουν ταυτοποιηθεί γενετικοί τόποι που σχετίζονται με ευαισθησία στην εμφάνιση της νόσου, και περιβαλλοντικοί, όπως το στρες. Για τη θεραπεία της νόσου χρησιμοποιούνται συστηματικά φάρμακα και βιολογικοί παράγοντες, ένας εκ των οποίων είναι η σεκουκινουμάμπη. Η σεκουκινουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά την ιντερλευκίνη 17A (IL-17A) και εμποδίζει τη σύνδεση στον υποδοχέα της, περιορίζοντας τα συμπτώματα της νόσου. Με βάση το γεγονός ότι ένα ποσοστό ασθενών δεν παρουσιάζουν απόκριση στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση και η ανάλυση των πολυμορφισμών του γονιδίου *IL-17A* που πιθανώς να σχετίζονται με την απόκριση στο φάρμακο αυτό. Εντοπίστηκαν οι πολυμορφισμοί *rs1974226, rs3748067, rs17884819* και *rs116457775* στο γονίδιο *IL-17A* και σχεδιάστηκαν εκκινητές με σκοπό την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδίου. Η ενίσχυση του γονιδίου έγινε με τη μέθοδο της PCR και ακολούθησε αλληλούχηση των προϊόντων, ώστε να μελετηθεί η συχνότητα των γονοτύπων. Σε 20 συνολικά ασθενείς που μελετήθηκαν οι ανωτέρω πολυμορφισμοί ταυτοποιήθηκαν άτομα ομόζυγα για τα συχνά αλληλόμορφα καθώς και άτομα ετερόζυγα, αλλά δεν ταυτοποιήθηκαν άτομα ομόζυγα για τα σπάνια αλληλόμορφα. Η μελέτη αυτή πρέπει να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και τα αποτελέσματά της να συσχετιστούν με την απόκριση στη θεραπεία, στο πλαίσιο μιας ευρύτερης φαρμακογενετικής μελέτης απόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη.

Λέξεις-Κλειδιά: Ψωρίαση, πολυμορφισμοί, IL-17A, σεκουκινουμάμπη

## ABSTRACT

Psoriasis is a multifactorial skin disease, which manifests in different parts of the skin and with different intensity. It is well established that factors leading to psoriasis are both genetic, as genetic loci associated with disease susceptibility have been identified using association studies, as well as environmental, such as stress. Regarding the treatment of psoriasis systemic drugs and recently biological agents have been developed. Secukinumab is a monoclonal antibody that specifically recognizes interleukin 17A (IL-17A) and blocks the binding to its receptor, alleviating disease symptoms. Based on the fact that there is heterogeneity in the patient's response to secukinumab treatment, the purpose of the present work is to identify polymorphisms of the *IL-17A* gene that are possibly related to the response to this drug. The following polymorphisms in the *IL-17A* gene were selected: *rs1974226*, *rs3748067*, *rs17884819* and *rs116457775*. Specific primers were designed in order to amplify the specific region of the gene involving these polymorphisms. Genetic amplification was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR), and the PCR products were sequenced, to study genotypic frequencies. In a total of 20 patients, we identified individuals homozygous for the major alleles as well as heterozygous individuals, but no individuals homozygous for the minor alleles were identified. This study should be extended to include more samples combined with the patient's response to treatment, in the context of a larger pharmacogenetic study of patient's response to secukinumab treatment.

Keywords: Psoriasis, polymorphisms, IL-17A, secukinumab

## Πίνακας περιεχομένων

## Πίνακας Περιεχόμενων για τις εικόνες (figures)

Σελίδα

## Πίνακας Περιεχόμενων για τους πίνακες (tables)

Σελίδα

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Ψωρίαση & τύποι ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια ασθένεια που προσβάλλει το 2-3% του πληθυσμού παγκοσμίως (Capon, 2017). Πρόκειται για μια κοινή δερματική διαταραχή που σχετίζεται με σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση. Η ορατή δερματική παραμόρφωση που προκαλεί η νόσος μπορεί να προκαλέσει αρνητική αντίδραση σε άλλους με αποτέλεσμα την αύξηση του ψυχολογικού φορτίου για τον ασθενή. Η υψηλή σωματική επιβάρυνση δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή από τους επιστήμονες αλλά δείχνει να σχετίζεται κυρίως με αίσθημα κνησμού ή καψίματος (Rapp et al., 1999). Η επιβάρυνση από τη νόσο αυξάνεται περαιτέρω από συννοσηρότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν το μεταβολικό σύνδρομο και καρδιαγγειακές παθήσεις (WHO, 2015).

### 1.1.1 Ψωρίαση κατά πλάκας

Η χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας (psoriasis vulgaris) είναι η πιο κοινή μορφή της νόσου και ευθύνεται για περίπου το 90% των περιπτώσεων. Οι τυπικές βλάβες είναι μονόμορφες, έντονα οριοθετημένες ερυθηματώδεις πλάκες που καλύπτονται από ασημί ελάσματα (εικόνα 1A). Οι πλάκες μπορεί να είναι λίγες (εικόνα 1B), μπορούν να επεκταθούν σε μεγαλύτερες περιοχές (εικόνα 1C), και μπορούν επίσης να εμφανιστούν ως ερυθροδερμία που επηρεάζει ολόκληρη την επιφάνεια του σώματος (εικόνα 1D). Η ψωρίαση μπορεί να επηρεάσει οποιοδήποτε σημείο του δέρματος. Ωστόσο οι τυπικές τοποθεσίες (τοποθεσίες προδιάθεσης) περιλαμβάνουν τις επιφάνειες αντιβραχίων και κνημών, περιομφαλικών, περιπρωκτικών περιοχών και το τριχωτό της κεφαλής. Ψωρίαση στο τριχωτό της κεφαλής αναπτύσσεται στο 75–90% των ασθενών με ψωρίαση (εικόνα 1E) (Ortonne et al., 2009).

### 1.1.2 Ψωριασική ονυχία

Η ψωριασική ονυχία (ψωρίαση του νυχιού του χεριού ή του νυχιού των ποδιών) εμφανίζεται στο 50% περίπου των ασθενών με ψωρίαση με επίπτωση εφ' όρου ζωής στο 80–90% (Reich, 2009). Επιπλέον, έως και το 90% των ασθενών με ψωριασική αρθρίτιδα (εικόνα 1F) δείχνουν ήπια προσβολή των νυχιών (Baran, 2010). Οι ψωριασικές αλλαγές στα νύχια περιλαμβάνουν σκασίματα και αποχρωματισμό με τη μορφή κίτρινων ή καφέ μπαλωμάτων κάτω από την πλάκα  των νυχιών (εικόνα 1G). Οι πλάκες των νυχιών πυκνώνουν και θρυμματίζονται και η ψωρίαση των νυχιών τελικού σταδίου οδηγεί σε πλήρη δυστροφία των νυχιών (εικόνα 1H). Η ανάστροφη ψωρίαση είναι μια παραλλαγή της ψωρίασης που εμφανίζεται σε κυρτές περιοχές (εικόνα 1I) λόγω της τριβής και της υγρασίας σε αυτές τις θέσεις (Reich, 2009).

### 1.1.3 Φλυκταινώδης ψωρίαση

Η φλυκταινώδης ψωρίαση χαρακτηρίζεται από λευκές συνενώσεις φλυκταινών (φλύκταινες μη μολυσματικού πύου), ενώ αναφέρονται και κλινικές παραλλαγές. Η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση είναι συχνά παρούσα σε ασθενείς με υπάρχουσα κοινή ψωρίαση, αλλά μπορεί επίσης να αναπτύσσεται και σε άτομα χωρίς ιστορικό ψωρίασης (Sugiura,2014). Η γενικευμένη φλυκταινώδης ψωρίαση χαρακτηρίζεται από διάχυτα σκούρα ερυθηματώδη «μπαλώματα» με ευδιάκριτες στείρες φλύκταινες, οι οποίες συνενώνονται για να σχηματιστούν μεγάλες ζώνες πύου (εικ. 1J, K). Οι δερματικές βλάβες μπορεί να εξελιχθεί γρήγορα και η ασθένεια είναι δυνητικά απειλητική για τη ζωή. Τοπικές μορφές φλυκταινώδους ψωρίασης περιλαμβάνουν την ψωρίαση *palmoplantaris pustulosa* (εικόνα 1L) και *acrodermatitis continua suppurativa* (εικόνα 1M). Η πρώτη επηρεάζει τις παλάμες του χεριού και τα πέλματα των ποδιών ενώ η τελευταία συνήθως επηρεάζει τις άκρες των δακτύλων των χεριών ή των ποδιών ή και τα δύο με εμπλοκή των νυχιών (Joyau et al., 2012; Shmidt et al., 2010).


Εικόνα 1. Κλινικές εκδηλώσεις της ψωρίασης. Τυπικές ερυθηματώδεις πλάκες με αργυρόχρωμα λέπια (A) μπορεί να είναι διάσπαρτες (B, psoriasis nummularis), να καλύπτουν μεγαλύτερες περιοχές του δέρματος (C, ψωρίαση geographica) ή να επηρεάσουν ολόκληρη την επιφάνεια του σώματος (Δ, ερυθροδερμική ψωρίαση). Η προσβολή του τριχωτού της κεφαλής μπορεί να συνοδεύεται από μη ουλώδη

αλωπεκία (E). Η ψωριασική αρθρίτιδα επηρεάζει έως και το 30% όλων των ασθενών (Z, αντίχειρας μεσοφαλαγγική άρθρωση). Οι αλλαγές στα νύχια είναι συχνές και κυμαίνονται από κοίλωμα και κίτρινο ή καφέ αποχρωματισμό (G) έως πλήρη δυστροφία (H). Η ανάστροφη ψωρίαση εμφανίζεται σε διάφορες περιοχές (I). Η φλυκταινώδης ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί σε γενικευμένη μορφή (J, K) ή εντοπισμένη (L, τύπου παλαμοπελματιαία και M, τύπου acrodermatitis continua suppurativa) (Boehncke & Schön, 2015).

## 1.2. Διάγνωση και αξιολόγηση της νόσου

Η διάγνωση γίνεται συνήθως με κλινικά ευρήματα. Η βιοψία δέρματος σπάνια χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της ψωρίασης. Ο δείκτης έκτασης και βαρύτητας της ψωρίασης PASI (Psoriasis Area and Severity Index) έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της σοβαρότητας του ερυθήματος, της διήθησης ή του πάχους του δέρματος και της έκτασης των βλαβών στους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο (Schmitt & Wozel, 2005). Οι περιοχές που ελέγχονται για ψωρίαση είναι τα γεννητικά όργανα και ο πρωκτός, οι περιομφαλικές περιοχές, η περιοχή πίσω από το αυτί, το τριχωτό της κεφαλής και τα νύχια.  Ο δείκτης PASI χρησιμοποιείται επίσης ως μέτρο για την αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία.

Εκτός από τον δείκτη PASI, η έκταση της επιφάνειας σώματος BSA (Body Surface Area) και ο δερματολογικός δείκτης ποιότητας ζωής DLQI (Dermatology Life Quality Index) θεωρούνται ως οι πλέον κατάλληλοι δείκτες για την αξιολόγηση της σοβαρότητας της δερματικής νόσου και των επιπτώσεών της στην ποιότητα ζωής (Lowes et al., 2014). Ο δείκτης BSA δείχνει την ποσοστιαία επιφάνεια του δέρματος που καλύπτεται από ψωρίαση. Ο δείκτης DLQI εκτιμά κατά πόσο η ασθένεια επηρέασε τη ζωή του ασθενούς. Οι κατευθυντήριες οδηγίες ταξινομούν τη σοβαρότητα της ψωρίασης σε 2 μεγάλες ομάδες σύμφωνα με την ένταση των συμπτωμάτων: ήπια ψωρίαση και μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση. Η σωστή ταξινόμηση της σοβαρότητας είναι  κρίσιμη για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων. Ενδεικτικά, οι ασθενείς με ήπια ψωρίαση λαμβάνουν τοπική θεραπεία, ενώ οι ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση λαμβάνουν συστηματική θεραπεία.

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση της σοβαρότητας της ψωρίασης.

Classification of Psoriasis Severity

| PASI and DLQI Thresholds | PASI < 7 | PASI 7-15 | PASI > 15 |
|---|---|---|---|
| DLQI < 5 | Mild | Moderate | Severe |
| DLQI 5-15 | Moderate | Moderate[a] | Severe |
| DLQI > 15 | Moderate | Moderate[a] | Severe |

Ενδεικτικά, χρησιμοποιώντας τους παραπάνω δείκτες, έχουν προταθεί (Osmancevic et al., 2017) οι ακόλουθες τιμές αναφοράς για την διαφοροποίηση μεταξύ ήπιας, μέτριας και σοβαρής ψωρίασης:

- ήπια: PASI <3, BSA <3, DLQI ≤5
- μέτρια: PASI 4–10, BSA 3–10, DLQI 6–10
- σοβαρή: PASI >10, BSA >10, DLQI >10

## 1.3. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ψωρίασης

Η ψωρίαση οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η γενετική συνεισφορά της ψωρίασης υποστηρίζεται από πρότυπα οικογενειακής επανεμφάνισης. Οι συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού των ασθενών με ψωρίαση έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Επίσης, στα μονοζυγωτικά δίδυμα υπάρχει διπλάσια έως και τριπλάσια αύξηση κινδύνου εμφάνισης ψωρίασης σε σύγκριση με τα διζυγωτικά δίδυμα (Generali et al., 2017; Lonnberg et al., 2013). Υπάρχει μηχανιστική σύνδεση μεταξύ γενετικής και ανοσολογικής απόκρισης στην ψωρίαση. Οι ψωριασικές δερματικές βλάβες έρχονται ως αποτέλεσμα απορρυθμισμένων αλληλεπιδράσεων των φυσικών και κυτταροχυμικών αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος με δερματικά κύτταρα (Elder et al., 2010). Έτσι, οι γενετικοί πολυμορφισμοί που συσχετίζονται με την ψωρίαση εμπλέκονται σε ανοσολογικές λειτουργίες (Rendon et al., 2019).

### 1.3.1. Γενετικός τόπος PSORS1

Οι πρώτες μελέτες που προσπάθησαν να φωτίσουν τη γενετική αρχιτεκτονική της ψωρίασης βασίστηκαν στην ανάλυση σύνδεσης (association studies), μια στατιστική προσέγγιση που επιτρέπει τον εντοπισμό των γονιδίων ευαισθησίας της νόσου σε σαφώς καθορισμένες χρωμοσωμικές περιοχές. Ταυτοποιήθηκαν 15 περιοχές ευαισθησίας στην ψωρίαση που ονομάστηκαν *PSORS* 1-15. Από αυτούς ο *PSORS1* συσχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ψωρίασης καθώς ευθύνεται για το 35 έως 50% της κληρονομικότητας της νόσου (Capon, 2017). Το γονίδιο *PSORS1* χαρτογραφείται στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC class I) στο χρωμόσωμα 6p21. Στον γενετικό τόπο *PSORS1*, περιλαμβάνεται το γονίδιο *HLA-C* που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα MHC τάξης I που συμμετέχει στις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω των αντιγονοπαρουσιαστικών T λεμφοκυττάρων (Nair et al., 2009).

Το *HLA-Cw6* αποτελεί το κύριο αλληλόμορφο ευαισθησίας στην ψωρίαση (Nair et al., 2009). Ο λειτουργικός ρόλος του HLA-C στην παθογένεση της ψωρίασης είναι ασαφής. Ο κύριος ρόλος του HLA-C έχει υποτεθεί ότι σχετίζεται με την παρουσία αντιγόνου σε CD8+ T-κύτταρα. Η μετανάστευση αυτού του τύπου κυττάρων προς την επιδερμίδα φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση ψωριασικών βλαβών (Nair et al., 2009). Μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει ότι αυτός ο υποτύπος ψωρίασης μπορεί να προκληθεί από αυτοαντιγόνα που παρουσιάζονται στο πλαίσιο του HLA-C*06:02 σε CD8+ T-κύτταρα, τα οποία είναι άφθονα στην ψωριασική επιδερμίδα και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την IL23 (Ciric et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια έγινε εφικτή η εφαρμογή μελετών ευρείας γονιδιωματικής συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (Genome Wide Association Studies, GWAS), στις οποίες μεγάλος αριθμός tag μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) ελέγχεται στο γονιδίωμα υγιών και ασθενών ατόμων, ώστε να ταυτοποιηθούν SNPs που να συσχετίζονται με την ασθένεια (Capon, 2017). Επί του παρόντος στον κατάλογο

GWAS (https://www.ebi.ac.uk/gwas/) υπάρχουν 57 δημοσιεύσεις που αφορούν την ψωρίαση, από τις οποίες έχουν προκύψει 946 SNP τα οποία σχετίζονται με τη νόσο.

## 1.4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Εκτός από τη γενετική συνεισφορά η επίδραση του περιβάλλοντος στην ψωρίαση εντοπίζεται σε λοιμώξεις, διατροφή και παχυσαρκία, κάπνισμα και κατανάλωση αλκοόλ, έκθεση σε ακτινοβολία UV, φάρμακα και ψυχολογικούς παράγοντες (Roszkiewicz et al., 2020).

### 1.4.1. Μικροβίωμα και λοιμώξεις

Σε ένα υγιές άτομο, υπάρχει αμοιβαία συνύπαρξη διαφορετικών μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια και μύκητες) εντός του δέρματος και των βλεννογόνων (έντερα, ανώτεροι αεραγωγοί, ουρογεννητικός σωλήνας), που συνιστά μια ανοσολογική ισορροπία με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόσφατα, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στο ρόλο του μικροβιώματος σε διάφορες ασθένειες, ειδικά σε αυτοάνοσες καταστάσεις (Wang et al., 2017). Οι ασθενείς με νόσο Crohn διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ψωρίαση από αυτόν του γενικού πληθυσμού και υπάρχουν αναφορές ότι ένας ψωριασικός ασθενής είναι πιο πιθανό να πάσχει από νόσο Crohn (Halling et al., 2017).

### 1.4.2 Διατροφή και παχυσαρκία

Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου για την ψωρίαση, το σωματικό βάρος και οι διατροφικές συνήθειες θεωρούνται πολύ καθοριστικές για την παθογένεση της νόσου (Barrea et al., 2016). Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία, ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (BMI, Body Mass Index) και η περίμετρος της μέσης είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ψωρίασης (Carrascosa at al., 2014). Η σοβαρότητα της ψωρίασης (αξιολογούμενη από τον Δείκτη Περιοχής και Σοβαρότητας της Ψωρίασης – PASI) είναι υψηλότερη σε παχύσαρκους ή υπέρβαρους ασθενείς (Correia & Torres, 2015). Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο TNF-α μπορεί επίσης να επηρεάσει τη σοβαρότητα των ψωριασικών βλαβών σε παχύσαρκους ασθενείς (Peluso &Palmery, 2016).

### 1.4.3 Κάπνισμα και κατανάλωση αλκοόλ

Τα περισσότερα δεδομένα έχουν δείξει ότι το κάπνισμα και η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα είναι παράγοντες κινδύνου για την ψωρίαση (Cascarossa et al., 2014). Η αυξημένη έκθεση σε ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι συστατικά του καπνού του τσιγάρου, μπορεί να προκαλέσει έναν καταρράκτη συστημικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της εξελίξης της ψωρίασης (La Cava et al., 2004). Η νικοτίνη, μέσω οδών ενεργοποίησης της νικοτίνης, μπορεί να αυξήσει την έκκριση κυτοκινών, όπως η IL-12, η IL-2, τον TNF, τον INF-α (Armstrong et al., 2011).

Είναι γνωστό ότι η πρόσληψη αλκοόλ μπορεί να αυξήσει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει χρόνια συστηματική φλεγμονή.

Μελέτες έχουν δείξει ότι το αλκοόλ και η ακετόνη μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Farkas & Kenemy, 2013).

### 1.4.4 UV στην ψωρίαση

Η βελτίωση των ψωριασικών δερματικών βλαβών μετά από έκθεση στο ηλιακό φως ή σε τεχνητές πηγές υπεριώδους ακτινοβολίας έχει παρατηρηθεί εδώ και πολύ καιρό. (Weatherhead et al., 2013). Τα οφέλη της UVB περιλαμβάνουν την προ-αποπτωτική της δράση και την πρόκληση παραγωγής προ- και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Έχει παρατηρηθεί ότι η υπεριώδης ακτινοβολία καταστέλλει τη διαφοροποίηση του Th17 και ρυθμίζει την έκφραση της IL-23/IL-17 και τα σχετιζόμενα με την ψωρίαση αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs). Επιπλέον, η φωτοθεραπεία οδηγεί σε μείωση της μετανάστευσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος προς το δέρμα, με αποτέλεσμα τη μείωση των φλεγμονωδών διεργασιών στην ψωρίαση (De Gruijl., 2016).

### 1.4.5 Φάρμακα

Τα φάρμακα επιδεινώνουν προϋπάρχουσες δερματικές βλάβες. Στην ψωρίαση που προκαλείται από φάρμακα, παρατηρείται βελτίωση της νόσου μετά τη διακοπή του ύποπτου φαρμάκου. Από την άλλη πλευρά, στην επιδεινούμενη από το φάρμακο ψωρίαση, οι επαγόμενες ψωριασικές δερματικές βλάβες θα μπορούσαν να διαρκέσουν ακόμη και μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Συνεπώς, τα φάρμακα μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση νέας ψωρίασης σε ασθενείς με ή χωρίς προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό της νόσου (Balak & Hajdarbegovic, 2017).

### 1.4.6 Ψυχολογικοί Παράγοντες

Η εμφάνιση δερματικών βλαβών στην ψωρίαση μπορεί να οδηγήσει σε ψυχικές διαταραχές που περιλαμβάνουν διαταραχές ύπνου, σεξουαλική δυσλειτουργία, διαταραχές προσωπικότητας, αγχώδεις διαταραχές, διαταραχές προσαρμογής και καταθλιπτικές διαταραχές (Biljan et al., 2009). Από την άλλη πλευρά, το άγχος και η κατάθλιψη μπορεί να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη και επιδείνωση των συμπτωμάτων της ψωρίασης. Αυτό οδηγεί σε έναν φαύλο κύκλο, ο οποίος επιδεινώνει και τις δύο ασθένειες – την ψωρίαση και την κατάθλιψη (Park et al., 1998).

## 1.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση της ψωρίασης

### 1.5.1. Συμβατικές θεραπείες ψωρίασης

Τοπικές θεραπείες όπως γλυκοκορτικοστεροειδή, παράγωγα βιταμίνης D ή συνδυασμοί και των δύο είναι συνήθως επαρκείς για τη διαχείριση της ήπιας νόσου. Ισχυρά ή πολύ ισχυρά κορτικοστεροειδή σε συνδυασμό με ανάλογα βιταμίνης D3 έχουν αποδειχθεί ιδανικά για τη θεραπεία του τριχωτού της κεφαλής, που είναι επίσης δύσκολο να αντιμετωπιστεί. Σε ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή νόσο χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός από φωτοθεραπεία και συστηματική θεραπεία. Οι καθιερωμένες φωτοθεραπείες περιλαμβάνουν τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ακτίνες UVB στενής ζώνης και —σε μικρότερο βαθμό— φωτοχημειοθεραπεία όπως η PUVA (ψωραλένιο συν UVA). Η φωτοθεραπεία και η φωτοχημειοθεραπεία είναι πολύ αποτελεσματικές θεραπείες, αλλά χρονοβόρες, και συνήθως χρησιμοποιούνται μόνο για βραχυπρόθεσμο έλεγχο της νόσου. Η  καρκινογόνα δυναμική της PUVA περιορίζει την περαιτέρω μακροχρόνια χρήση.

Τα συστηματικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ψωρίασης είναι η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη, η ασιτρετίνη, και σε ορισμένες χώρες εστέρες φουμαρικού οξέος. Ίσως με εξαίρεση τους εστέρες φουμαρικού οξέος, αυτά τα συστηματικά φάρμακα παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου και συσσώρευση τοξινών. Ωστόσο, με την κατάλληλη παρακολούθηση χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ψωρίασης (Mason et al., 2013).

### 1.5.2. Βιολογικοί παράγοντες για τη θεραπεία της ψωρίασης

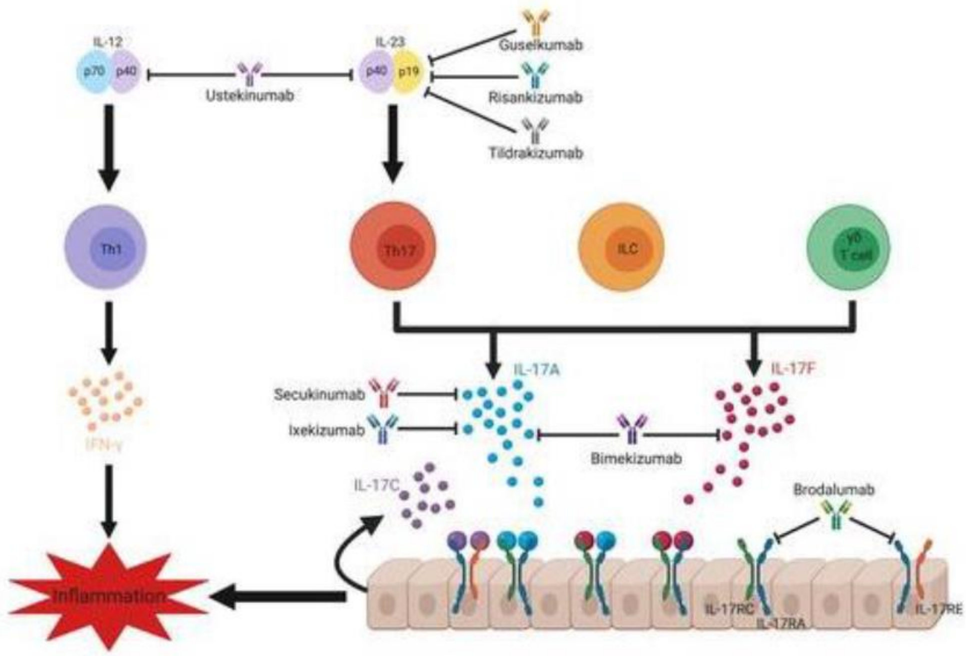
Τα βιολογικά φάρμακα χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με μέτρια ή σοβαρή ψωρίαση που δεν ανταποκρίνονται στις τοπικές θεραπείες, στη φωτοθεραπεία και στα συστηματικά φάρμακα. Τα βιολογικά φάρμακα είναι αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και συγκεκριμένα αντισώματα ή πρωτεΐνες σύντηξης που μπλοκάρουν τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ή τους υποδοχείς τους (Dauden et al., 2016). Τα βιολογικά φάρμακα χωρίζονται στις ακόλουθες ομάδες:

- έναντι του TNF-α (όπως adalimumab, etanercept, infliximab, certolizumab pegol),
- έναντι των IL-12/23 (όπως ustekinumab),
- έναντι της IL-23 (όπως guselkumab, risankizumab και tildrakizumab)
- έναντι της IL-17 (όπως secukinumab, ixekizumab),
- έναντι του υποδοχέα της IL-17 (όπως brodalumab).

Σε εμφάνιση ή έξαρση ψωρίασης, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα παράγουν TNF-α και ιντερλευκίνη 23. Ο TNF-α είναι μία προ-φλεγμονώδης κυτοκίνη που ενισχύει τη φλεγμονή μέσω πολλών διακριτών διαδρομών. Ο TNF-α παράγεται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων, των κερατινοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων και ασκεί τη δράση του σε αρκετούς τύπους κυττάρων. Ο TNF-α επάγει δευτερογενείς μεσολαβητές και μόρια προσκόλλησης που εμπλέκονται στην ψωριασική νόσο (Locksley et al., 2001). Οι αναστολείς του TNF-α που χρησιμοποιούνται για την ψωρίαση είναι οι etanercept, adalimumab, infliximab και certolizumab pegol.

Εκτός από τον TNF-α, το ενδιαφέρον των επιστημόνων επικεντρώνεται και στον άξονα ιντερλευκινών 23 / Th17 και τον ρόλο του στην παθογένεση της ψωρίασης. Τα κύτταρα Th17 αποτελούν ένα υποσύνολο των Τ-λεμφοκυττάρων που εκφράζει την ιντερλευκίνη 17  (Lowes et al., 2008). Ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των Th17 εξαρτάται από την ιντερλευκίνη 23 που παράγεται από τα μυελοειδή κύτταρα (Bettelli et al., 2007). Μόλις ενεργοποιηθούν, τα κύτταρα Th17 παράγουν αρκετούς μεσολαβητές όπως η ιντερλευκίνη 17A, 17F και 22, που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και άλλα χαρακτηριστικά της ψωρίασης

(Kryczek et al., 2008) (Keijsers et al., 2014). Τα φάρμακα που στοχεύουν στον άξονα ιντερλευκίνης 23/Th17 φαίνονται στην εικόνα 2. Το ustekinumab είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται στην υπομονάδα p40 που μοιράζονται η IL-12 και η IL-23.




Εικόνα 2. Βιολογικοί παράγοντες που στοχεύουν στον άξονα IL23/TH17 (Kuwabara et al., 2017).

Δύο κατηγορίες βιολογικών φαρμάκων στοχεύουν στην ιντερλευκίνη 17 και τον υποδοχέα της (Εικόνα 2). Η IL-17 ανήκει σε μια οικογένεια προφλεγμονωδών κυτοκινών που μεσολαβούν φυσιολογικές φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις (Kuwabara et al., 2017). Η οικογένεια περιλαμβάνει 6 δομικά συγγενείς κυτοκίνες, IL-17A έως IL-17F, οι οποίες δρουν μέσω σύνδεσης με τους υποδοχείς τους: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD και IL-17RE. Οι προερχόμενες από το μονοπάτι των TH17 IL-17A και IL- 17F προκαλούν μαζική υπερπαραγωγή φλεγμονωδών προϊόντων, όπως IL-17C, IL-36, IL-19, CCL20, CXCL, χημειοκινών που αλλοιώνουν με τη σειρά τους το δέρμα και οδηγούν σε περαιτέρω προσέλκυση υποομάδων ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων για τη διατήρηση των πλακών (Amatya et al., 2018) (Hawkes et al., 2018). Επιπλέον, η συνεργιστική δράση της IL-17A με τον NF-kB οδηγεί σε ενεργοποίηση παραγόντων, όπως ο TNF-α και η IL-1 (Chicirozzi et al., 2011) (Monin et al., 2018).

Η σεκουκινουμάμπη (Cosentyx; Novartis, Βασιλεία, Ελβετία) εγκρίθηκε το 2015 ως ο πρώτος βιολογικός αναστολέας της IL-17A. Είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G1 (IgG1) μοριακής μάζας 151 kDa (Reszke et al., 2017). Αναστέλλει επιλεκτικά τη δράση της IL-17A, καθώς εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με τον υποδοχέα της. Είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με ψωρίαση, συμπεριλαμβανομένων των νυχιών, του τριχωτού της κεφαλής, των παλάμων, των πελμάτων και αρθρώσεων (σε ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα) (Langley et al., 2014) (McInnes et al., 2015). Η βιολογική αποτελεσματικότητα της για βραχυπρόθεσμη θεραπεία φαίνεται να είναι καλύτερη από αυτή των συμβατικών συστηματικών φαρμάκων. Η σεκουκινουμάμπη διαταράσσει τα ανοσοποιητικά κυκλώματα των πλακών και των κυτταρικών αποκρίσεων όταν χρησιμοποιείται στην κλινικά προσαρμοσμένη δόση των 150-300 mg. Ήδη από την 1η εβδομάδα, η σεκουκινουμάμπη εξουδετερώνει την IL-17A και προκαλεί ουσιαστικές και προοδευτικές αλλαγές σε εκατοντάδες μετάγραφα γονιδίων που συνοδεύονται από μειωμένες φλεγμονώδεις διηθήσεις της επιδερμίδας και μιτωτική δραστηριότητα. Οι κλινικές δοκιμές επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα της σεκουκινουμάμπης. Ήδη από την 4η εβδομάδα οδηγεί σε PASI50, ενώ την 12η εβδομάδα παρατηρείται PASI75 στο 81,6% των ασθενών και PASI100 στο 28,6% των ασθενών (Langley et al., 2014).

Εκτός από τη σεκουκινουμάμπη άλλοι παράγοντες που στοχεύουν τον άξονα IL-23/IL-17 είναι τα ixekizumab και brodalimumab. Το ixekizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινης IgG4 που δεσμεύει με υψηλή συγγένεια την IL-17A και την ετεροδιμερή μορφή της IL17A/F (Muñoz-Aceituno et al., 2020). Όπως και η σεκουκινουμάμπη, το ixekizumab πετυχαίνει μια πολύ γρήγορη αρχική απόκριση που διατηρείται στο πέρασμα του χρόνου με πολύ καλό προφίλ ασφαλείας (Liu et al., 2016)(Blauvelt et al., 2017). Τέλος, το brodalimumab είναι μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινης IgG2 που συνδέεται με τους υποδοχείς IL-17RA και IL-17RC (Puig et al., 2017).

Ωστόσο, παρά την πληθώρα των βιολογικών θεραπειών έχει δειχθεί ότι ένα υψηλό ποσοστό ασθενών δεν ανταποκρίνεται σε αυτές τις θεραπείες (Sbidian et al., 2020).

## 1.6. Φαρμακογενετική

Η φαρμακογενετική έχει οριστεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ ως "η μελέτη των παραλλαγών στην αλληλουχία του DNA σε σχέση με την ανταπόκριση στα φάρμακα". Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) είναι αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου που εμφανίζονται σε τουλάχιστον 1% του πληθυσμού. Οι κύριοι πολυμορφισμοί που μελετώνται ανήκουν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες: SNPs που σχετίζονται είτε με τη φαρμακοκινητική είτε με τη φαρμακοδυναμική ενός συγκεκριμένου φαρμάκου (Lowes et al., 2014). Η φαρμακοκινητική μελετά τη φυσιολογική διαδικασία του μεταβολισμού του φαρμάκου που οδηγεί στην απέκκριση του φαρμάκου ή -στην περίπτωση των προφαρμάκων- στη δημιουργία ενός ενεργού μεταβολίτη. Η φαρμακοδυναμική μελετά την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τον στόχο του καθώς και την θεραπευτική και τοξική του δράση. Η φαρμακογονιδιωματική είναι ο κλάδος της γενετικής που ασχολείται με την ταυτοποίηση όλων των ανθρώπινων γονιδίων, καθώς και του RNA και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά, που σχετίζονται με τις δια- και ενδο-ατομικές παραλλαγές στη φαρμακευτική ανταπόκριση. Οι παραλλαγές του DNA μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών και να διαμορφώσουν την ανταπόκριση στα φάρμακα μέσω ποικίλων μηχανισμών (Lowes et al., 2014).

### 1.6.1 Φαρμακογενετική συμβατικών φαρμάκων ψωρίασης

Η μεθοτρεξάτη είναι ανάλογο φυλλικού οξέος και αποτελεί ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως σε ασθενείς με μέτρια ως σοβαρή ψωρίαση (Kaushik et al., 2019). Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν πέντε πολυμορφισμούς σε γονίδια *GNMT*, *DNMT3b*, *BHMT*, *ABCC2* και *SLCO1B1* που επηρεάζουν την απόκριση στη μεθοτρεξάτη (Grzelj et al., 2021).

Οι φαρμακογενετικές μελέτες για την κυκλοσπορίνη έδειξαν ότι δεν έχει βρεθεί σχέση μεταξύ απόκρισης και πολυμορφισμών στο ένζυμο μεταβολισμού CYP3A, αλλά έχει βρεθεί συσχέτιση της απόκρισης με το γονίδιο του μεταφορέα ABCB1. Συγκεκριμένα, ο γονότυπος 3435T στο *ABCB1* (rs1045642) εμφανίζεται πιο συχνά σε μη ανταποκριτές ασθενείς στον ελληνικό πληθυσμό (Vasilopoulos et al, 2014).

### 1.6.2 Φαρμακογενετική φαρμάκων έναντι του TNFα

Οι φαρμακογενετικές μελέτες των ανταγωνιστών του TNF εστιάζονται στα φάρμακα etanercept, adalimumab και infliximab. Τα αποτελέσματα των φαρμακογενετικών μελετών για το etanercept συνοψίζονται στα εξής: Σε 161 ασθενείς από την Ολλανδία, ο γονότυπος GA του *rs6427528* στο γονίδιο *CD84* είχε πιο ευαίσθητη απόκριση στην ετανερσέπτη από τον γονότυπο GG (van den Reek et al., 2017). Σε 100 ασθενείς με ψωρίαση στην Ελλάδα, βρέθηκε συσχέτιση του *rs396991* με την καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με ετανερσέπτη (Mendrinou et al., 2017). Ο πολυμορφισμός *rs610604* στο γονίδιο *TNFAIP3* έδειξε συσχετίσεις με καλές αποκρίσεις στην ετανερσέπτη (Masouri et al., 2016). Τα αλληλόμορφα *TNF-857C* (*rs1799724*) ή *TNFRSF1B-676T (rs1061622*) συσχετίστηκαν με θετική ανταπόκριση στη φαρμακευτική αγωγή σε ασθενείς που έλαβαν ετανερσέπτη (Vasilopoulos et al., 2012). Τα αποτελέσματα των φαρμακογενετικών μελετών για τα Adalimumab (ADA) & Infliximab (IFX/INF) είναι τα ακόλουθα: Οι παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (copy number variant, CMV) του γονιδίου *CPM* συσχετίστηκε σημαντικά με την ανταπόκριση του adalimumab σε 70 Ισπανούς ασθενείς (Sanz-Garcia et al., 2021). Το *rs9260313* στο γονίδιο *HLA-A* βρέθηκε να σχετίζεται με πιο ευνοϊκές αποκρίσεις στο adalimumab (Masouri et al., 2016). Μεταξύ 169 Ισπανών ασθενών, η θετικότητα *HLA-Cw06* είχε καλύτερη ανταπόκριση στο adalimumab (Coto-Segura et al., 2019). Σε μια μελέτη στον Ισπανικό πληθυσμό, οι φορείς του γονότυπου TC στο *rs763780* του *IL-17F* συσχετίστηκαν με έλλειψη ανταπόκρισης στο adalimumab (n = 67), αλλά με καλύτερη ανταπόκριση στο infliximab (n = 37). Μεταξύ 169 Ισπανών ασθενών, η διαγραφή του *rs3217713* του *NFKBIZ* είχε καλύτερη ανταπόκριση στο adalimumab (Coto-Segura et al., 2019). Κανένα από τα SNP των γονιδίων *TNF, TNFRSF1A* και *TNFRSF1B* δεν συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία με infliximab ή adalimumab (Vasilopoulos et al., 2012). Τέλος, το *rs13190932* του γονιδίου *TRAF3IP2* έδειξε συσχετίσεις με ευνοϊκή απόκριση στο infliximab (Masouri et al., 2016).

### 1.6.3 Φαρμακογενετική φαρμάκων έναντι της IL-23

Οι φαρμακογενετικές μελέτες για την ανταπόκριση στο ustekinumab αναλύονται στη συνέχεια. Μια μελέτη που αποτελούνταν από μια μικρή ομάδα 22 Ελλήνων ασθενών ψωρίασης που έλαβαν θεραπεία με ustekinumab γονοτύπησε 38 παραλλαγές που είχαν συσχετιστεί με ψωρίαση από προηγούμενες μελέτες και ανέδειξε ότι μόνο δύο SNPs (*rs151823* και *rs26653* έδειξαν μια συσχέτιση με καλή ανταπόκριση στο ustekinumab. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν και άλλα γονίδια όπως π.χ τα *TRAF3IP2, TNFAIP3* ή *HLA-A,* τα οποία συσχετίστηκαν με ανταπόκριση στο anti-TNF αλλά όχι στο ustekinumab (Masouri et al., 2016).

Μια μελέτη που αποτελούνταν από 234 ασθενείς ανέλυσε τις παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (CMV) στα γονίδια *LCE3B* και *LCE3C*, καθώς και οκτώ SNPs σε *HLA-C, TNFAIP3, CD84, IL23R, TRAF3IP2, ERAP1, IL12b* και *IFIH1*. Οι ετερόζυγοι ασθενείς (CT) για το *rs3213094 του IL-12b* εμφάνισαν στατιστικά σημαντική καλύτερη ανταπόκριση στο ustekinumab από την ομάδα αναφοράς (CC), ενώ οι ομόζυγοι ασθενείς (GG) για το *rs610604* του*TNFAIP3* εμφάνισαν χειρότερη ανταπόκριση στο ustekinumab από την ομάδα αναφοράς (TT) (Reek et al., 2017).

Μια άλλη φαρμακογενετική μελέτη σε έναν ισπανικό πληθυσμό (N=70) βρήκε συσχέτιση μεταξύ του *rs763780* (IL-17F) και της ανταπόκρισης στο ustekinumab μετά από 3 και 6 μήνες θεραπείας, ενώ οι *rs2275913* και *rs10484879* (IL17A) δεν συσχετίστηκαν με την απόκριση. Μια μεταγενέστερη μελέτη (N=69) βρήκε συσχέτιση μεταξύ των SNPs στα γονίδια *C17orf51, ZNF816A, C9orf72, STAT4, CHUK* και *SLC22A4* με την θετική απόκριση στο ustekinumab, ενώ τα SNPs στα γονίδια *TNFRSF1A, HTR2A, NFKBIA, ADAM33* και *IL13* συσχετίστηκαν με κακή ανταπόκριση σε αυτό το φάρμακο (Prieto-Perez et al., 2017). Ασθενείς που δεν έχουν τον γονότυπο AA για το *rs3212227 (IL12B)* SNP αλλά που φέρουν τον γονότυπο GG για το SNP *rs6887695 (IL12B)* βρέθηκε ότι ανταποκρίνονται καλύτερα στο ustekinumab. Ωστόσο, δεν βρέθηκε καμία σχέση με την απόκριση για SNPS σε *TNFAIP3, IL-12B, IL-23R* και *LCE3B/C* (Galluzzo et al., 2017). Επιπλέον, δεν βρέθηκε σχέση με ανταπόκριση στο ustekinumab για το *rs1120926 του IL-23R* και το *rs6887695* του *IL-12B* (Raposo et al., 2017).

### 1.6.4. Φαρμακογενετική φαρμάκων έναντι της IL-17

Υπάρχουν κάποιες φαρμακογενετικές μελέτες που αξιολογούν την απόκριση σε φάρμακα έναντι της IL-17 και εστιάζονται κυρίως στη σεκουκινουμάμπη, και λιγότερο στην ιξεκιζουμάμπη. Μία μελέτη ανέλυσε μια ομάδα 434 ασθενών και δεν βρήκε διαφορές στον PASI90 μετά από 16 εβδομάδες θεραπείας μεταξύ θετικών και αρνητικών ασθενών στο *HLA-C*06:02*. Εντούτοις, μετά από 24 εβδομάδες θεραπείας οι αποκρίσεις PASI100 ήταν παρόμοιες και στις δύο ομάδες. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν διαφορές είτε στο μέσο απόλυτο PASI την εβδομάδα 16, είτε στο διάμεσο χρόνο για να φτάσουν το PASI90. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το *HLA-C*06:02* δεν είναι καλός υποψήφιος δείκτης για τη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη, καθώς αυτή η θεραπεία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική ανεξάρτητα από την κατάσταση *HLA-C*06:02* (Costanzo et al., 2018). Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε και μια προηγούμενη μελέτη  που έδειξε ότι η σεκουκινουμάμπη ήταν εξίσου αποτελεσματική τόσο σε HLA-C*06:02-θετικούς όσο και HLA-C*06:02-αρνητικούς ασθενείς με συγκρίσιμα ποσοστά ανταπόκρισης PASI μεταξύ των δύο ομάδων μέχρι την εβδομάδα 72 (Papini et al., 2017).

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε μια άλλη εργασία με μια μικρή ομάδα 18 ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με σεκουκινουμάμπη, στην οποία δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ του HLA-C*06:02 και της ανταπόκρισης μετά από τρεις μήνες θεραπείας (Anzengruber et al., 2018). Τέλος, μια πολυκεντρική μελέτη στρατολόγησε 134 ασθενείς από τέσσερα διαφορετικά ευρωπαϊκά νοσοκομεία που έλαβαν θεραπεία με σεκουκινουμάμπη (118 ασθενείς) και ιξεκιζουμάμπη (16 ασθενείς) και επικεντρώθηκε σε πέντε παραλλαγές (rs3748067, rs2275913, rs3819025, rs7747909 και rs8193037) του IL-17 για τις οποίες δεν βρέθηκε συσχέτιση με την ανταπόκριση σε αυτά τα φάρμακα μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας (Van Vugt et al., 2019).

# ΣΚΟΠΟΣ

Στο πλαίσιο μιας ευρύτερης φαρμακογενετικής μελέτης που αποσκοπεί στη συσχέτιση της απόκρισης των ασθενών με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη, η παρούσα εργασία εστιάστηκε στη βελτιστοποίηση των συνθηκών γονοτύπησης (σχεδιασμός εκκινητών και συνθηκών ενίσχυσης) της περιοχής του γονιδίου IL-17A που περιέχει τους πολυμορφισμούς *rs1974226, rs3748067*, *rs17884819* και *rs116457775.*

# 2. Υλικά-Μέθοδοι

## 2.1. Δείγματα ασθενών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με ψωρίαση οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με το φάρμακο σεκουκινουμάμπη. Τα δείγματα προήλθαν από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, σε συνεργασία με την αναπληρώτρια καθηγήτρια Ε. Ζαφειρίου. Συνολικά μελετήθηκαν 20 δείγματα, τα οποία μετά την λήψη τους διαχωρίστηκαν σε ποσότητες των 0,5 ml και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20 $^{o}$C μέχρι να ξεκινήσει η επεξεργασία της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA.

## 2.2. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό αντιδραστήριο DNA purification της εταιρείας Macherey-Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά, σε 200 μL αίματος προστέθηκαν 25 μL πρωτεϊνάσης Κ (20 mg/mL) και μετά από προσθήκη 200 μL του διαλύματος λύσης (lysis buffer B3) έγινε ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 70$^{o}$C με περιοδική ανάδευση σε vortex. Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 210 μL αιθανόλης 100 % w/v, έγινε ανάδευση σε vortex και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε διηθητική στήλη και φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στα 11.000xg. Μετά την απομακρύνση του υγρού που διαπερνά τη στήλη προστέθηκαν στη στήλη 500 μL διαλύματος BW και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση στα 11.000xG για 1 λεπτό ή 30 δευτερόλεπτα πετώντας το υγρό που διαπερνά τη στήλη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αλλά προσθέτοντας 600 μL διαλύματος B5. Γίνεται εκ νέου φυγοκέντρηση της στήλης στα 11.000xg για 1 λεπτό ώστε να ξηρανθεί πλήρως. Για την έκλουση του DNA από τη στήλη προστέθηκαν 25 μL από το διάλυμα έκλουσης που έχει προθερμανθεί σε 70$^{o}$ C. Μετά από επώαση 1 λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11.000xg για 1 λεπτό και το γονιδιωματικό DNA συλλέχθηκε στο νέο σωληνάριο. Η διαδικασία της έκλουσης πραγματοποιήθηκε 2 φορές με τελικό όγκο 50 μL. Το γονιδιωματικό DNA αποθηκεύτηκε σε -20$^{o}$ C μέχρι τη χρήση του και ελέχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/w.

## 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

### 2.3.1. Εισαγωγή-Γενικά

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων αλλά και για τον έλεγχο καθαρότητας βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο ότι τα βιομόρια με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος θα μετακινηθούν προς μία πλευρά ανάλογα με το φορτίο τους. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μία πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (τροφοδοτικό), που παρέχει συνέχες ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA) και από μία λεκάνη χωρισμένη σε δύο δεξαμενές (λουτρό) που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Στη μία δεξαμένη είναι προσαρμοσμένο το θετικό ηλεκτρόδιο και στην άλλη το αρνητικό. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος από το αρνητικό ηλεκτρόδιο στο ρυθμιστικό διάλυμα-υλικό ηλεκτροφόρησης-ρυθμιστικό διάλυμα-θετικό ηλεκτρόδιο και έτσι έχουμε σχηματισμό των χαρακτηριστικών ζωνών ανάλογα με το μέγεθός τους (Tymoczko et al., 2011).

### 2.3.2. Αντιδραστήρια

- TAE 50X (stock): Tris-base (242 gr), οξικό οξύ (57,1 ml), EDTA (18,6 gr), ddH2O μέχρι 1 L. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8 με προσθήκη HCl.
- Βρωμιούχο αιθιδίο (EtBr): Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, 6X): 0,25 % μπλε της βρωμοφαινόλης, 30 % w/v γλυκερόλη σε διπλά απιονισμένο νερό.
- Αγαρόζη (ανάλογα με την περιεκτικότητα του πηκτώματος).
- Μάρτυρας DNA γνωστών μοριακών μεγεθών (1 Kb DNA ladder) της εταιρείας New England Biolabs.

### 2.3.3. Πειραματική διαδικασία

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης 1% w/w ή 2% w/w. Αναλυτικά ζυγίζονται 0,6 gr για πήκτωμα 1% ή 1,2 gr για πήκτωμα 2% με ειδικό ζυγό ακριβείας. Η αγαρόζη μεταφέρεται σε κωνική φιάλη στην οποία προστίθεται 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Για να διαλυθεί η αγαρόζη, γίνεται θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει το διάλυμα διαυγές χωρίς υπολείμματα αγαρόζης. Αφού το διάλυμα κρυώσει υπό τρεχούμενο νερό, προστίθενται σε αυτό 2,16 μl βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml. Μετά από καλή ανάδευση, το διάλυμα μεταφέρεται στο καλούπι αφού έχει τοποθετηθεί η βάση με τα χτενάκια (με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες). Το διάλυμα γίνεται πήκτωμα μετά από περίπου 20 λεπτά καθώς η αγαρόζη έχει πολυμεριστεί και είναι έτοιμο για χρήση. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται διάλυμα TAE (1X), ώστε να έχει βυθιστεί το πήκτωμα εντός του υγρού. Το διάλυμα TAE παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για να γίνεται μεταφορά ρεύματος και συνεπώς να κινούνται-«τρέχουν» τα δείγματα στο πήκτωμα και να διατηρείται το pH σε μία σταθερή τιμή. Στα «πηγαδάκια» (wells) που δημιουργούνται, φορτώνονται τα δείγματα αφού έχουν αναμιχθεί με διάλυμα φόρτωσης. Στο ίδιο πήκτωμα, σε ένα διπλανό πηγαδάκι φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών (1kb Plus DNA ladder), για τον προσδιορισμό του μεγέθους των δειγμάτων.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται με ρυθμιζόμενη τάση για 10’ αρχικά στα 80V και για τα επομένα 15’-25’ στα 100V. Ακολούθως το DNA οπτικοποιείται μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία σε ειδικό μηχάνημα λήψης ψηφιακών φωτογραφιών.

## 2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

### 2.4.1. Αρχή της μεθόδου

Η PCR βασίζεται στον ενζυματικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers), χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης DNA. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς την μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου.

1. Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρία στάδια:Το στάδιο της αποδιάταξης του DNA εκμαγείου (denaturation) στους 94-96$^{o}$C για 15''.
2. Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing). Το διάλυμα ψύχεται απότομα στους 54$^{o}$C για να μπορέσουν οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις αλυσίδες του DNA. Ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας και ο άλλος στο 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας στόχου. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγουμε την υβριδοποίηση του DNA στόχου με τον ευατό του. Οι εκκινητές έχουν συνήθως μήκος 20-30 νουκλεοτίδια. Η θερμοκρασία και ο χρόνος της φάσης αυτής εξαρτάται από το μήκος και την νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών.
3. Επέκταση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5'-3' (extension) στους 72$^{o}$C, που είναι η ιδανική θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Μετά από κάθε κύκλο, οι συντιθεμένοι κλώνοι του DNA χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Αποτέλεσμα της PCR είναι ένα πολλαπλασιασμένο τμήμα δίκλωνου DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τους εκκινητές. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cyclers) που εναλλάσσουν τις θερμοκρασίες βάσει προγραμματισμού.

Συμπερασματικά, η PCR παρέχει μεγάλο αριθμό αντιγράφων DNA σε μικρό χρόνο και με ελάχιστη ποσότητα γενωμικού DNA (Tymoczko et al., 2011).

### 2.4.2. Πειραματική διαδικασία

Για κάθε αντίδραση PCR παρασκευάσθηκε ένα μείγμα (mastermix), που περιείχε τα αντιδραστήρια του πίνακα 1. Επίσης κάθε αντίδραση περιλαμβάνει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου (Negative Control) στο οποίο προσθίθεται το μείγμα mastemix και η ποσότητα του DNA έχαι αντικατασταθεί από ίσο όγκο νερού. Οι ποσότητες στο mastermix του Πίνακα 2 πολλαπλασιάζονται με τον αριθμό των αντιδράσεων PCR που θα διεξαχθούν.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια και ποσότητες αντίδρασης PCR με εκκινητές F9-R9.

| Αντιδραστήρια | Αρχικές συγκεντρώσεις | Ποσότητες ανά αντίδραση |
|---|---|---|
| Buffer + $MgCl_2$ | Buffer 10X + $MgCl_2$ 15 mM | 2 μL |
| dNTPs | 10 mM | 0.8 μL |
| Εμπρόσθιος εκκινητής (F9) | 10 pmol/μL | 2 μL |
| Οπίσθιος εκκινητής (R9) | 10 pmol/μL | 2 μL |
| Taq πολυμεράση | 5 U/mL | 0.2 μL |
| DNA | - | 0,5-5 μL |
| $H_2O$ | - | 13-17.5 μL (ανάλογα με την ποσότητα του DNA) |
| | Τελικός όγκος | 20 μL |

Για την αντίδραση εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες στον θερμοκυκλοποιητή :

95$^{o}$C/5 min
$\left.\begin{array}{l}95^{o}\text{C}/30\text{ sec}\\56^{o}\text{C}/30\text{ sec}\\72^{o}\text{C}/30\text{ sec}\end{array}\right\}$ 40 κύκλοι
72$^{o}$C/10 min
παραμονή στους 4$^{o}$C

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/w για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του DNA, σε σύγκριση με μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (1 kb Plus DNA Ladder της εταιρείας New England Biolabs).

## 2.5. Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου IL-17A

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα primer designing tool του NCBI (National Center for Biotechnology Information) και τα στοιχεία τους δίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θερμοκρασίες τήξεως τους

| Εκκινητής | Αλληλουχία 5'-3' | Tm |
|---|---|---|
| IL-17A F9 | CCCCTAGACTCAGGCTTCC | 62 |
| IL-17A R9 | GCAACTGCCTCTTCCCATC | 60 |

Στην εικόνα 3 δίνεται η αλληλουχία του γονιδίου IL-17A που ενισχύεται με τους εκκινητές που επιλέχθηκαν καθώς και οι θέσεις των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR υπολογίζεται σε 778 bps.

```
   cccctag actcaggctt cctttggaga ttaaggcccc tcagagatca acagaccaac
atttttctct tcctcaagca acactcctag ggcctggctt ctgtctgatc aaggcaccac   rs1974226
acaacccaga aaggagctga tggggcagaa cgaactttaa gtatgagaaa agttcagccc   rs3748067
aagtaaaata aaaactcaat cacattcaat tccagagtag tttcaagttt cacatcgtaa
ccattttcgc ccccatggcc catgtgctgt cttgccctac ttctgaaggc ctctagatat
tctcaggcca ctctgcaggc tccctgcttc ttgaaagacc ttcctcttca ctccatcctg
ctccatccag tgtgctccag cccacccaga ggcccatggc ttttctaggc ttctttccct
attccaaatc caggggttgg cctctccagc cacctcctct cagtcatttt gtgctcacat
cttgattcct gtgaccatcc ctgtcaccat tttcctacag gaaatcccca ggcagcttcc
agggacagtt cctcacagcc tttacgcttt caagcttctc actaaaaacc tgctgctcgt   rs17884819
tttcaagctt tctctgaacg gtgatgatga aaagaaaaaa ttgtttttgt ttttgttggg
agagggagtt gtaaaggatg tatatgtcta tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtggtcc   rs116457775
tgaaccatta tttcccacta gattttgggt gggggtatg cggatgggaa gaggcagttg
ct
```

Εικόνα 3. Αλληλουχία του γονιδίου IL-17A, όπου αποτυπώνονται οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών F9-R9 (γκρι χρώμα) και οι θέσεις των SNPs που μελετήθηκαν.

## 2.6. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Για να γίνει αλληλούχιση των προιόντων της PCR πρέπει να γίνει πρώτα ο καθαρισμός τους για να αφαιρεθούν υπολείμματα (πχ διμερή εκκινητών) που έχουν απομείνει από τις ενζυμικές αντιδράσεις. Ο καθαρισμός γίνεται με βάση το εμπορικό αντιδραστήριο Nucleospin Gel & PCR Clean Up της εταιρείαςMACHEREY-NAGEL, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά, αναμίχθηκαν 2 όγκοι από το διάλυμα NTI προς ένα όγκο δείγματος. Η διηθητική στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο 2 mL και έγινε μεταφορά του δείγματος στη στήλη και φυγοκέντρηση για 30'' στα 11.000xG. Μετά την αλλαγή του σωληνάριου συλλογής προστέθηκαν στη στήλη 700 μL buffer NT3 και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30'' στα 11.000xG. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία επιπλέον φορά. Γίνεται αλλαγή του σωληναρίου συλλογής 2 mL και φυγοκέντρηση εκ νέου για 1' στα 11.000xG. Η στήλη επωάζεται για 2' στους 70$^{o}$C για την απομάκρυνση της αιθανόλης που τυχόν έχει απομείνει. Στη συνέχεια προστίθεται στη στήλη διάλυμα έκλουσης (προθερμασμένο στους 70$^{o}$C) σε ποσότητα που κυμαίνεται από 15 μl-25 μl και η στήλη επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό σε 11.000xG. Η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται και η ποσότητα του διαλύματος έκλουσης που χρησιμοποιείται εξαρτάται από την ποσότητα του προϊόντος της PCR.

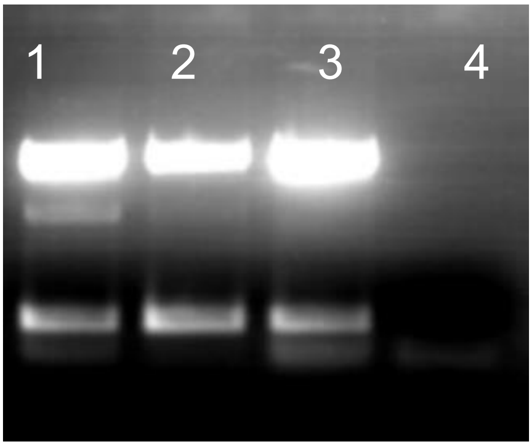
## 2.7. Αλληλούχηση

Η αλληλούχηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger σε εξειδικευμένο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F9 και R9. Τα αποτελέσματα λήφθηκαν υπό την μορφή χρωματογραφημάτων και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα BioEdit 7.2.

# 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

## 3.1 Ταυτοποίηση των βέλτιστων συνθηκών της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου IL-17A

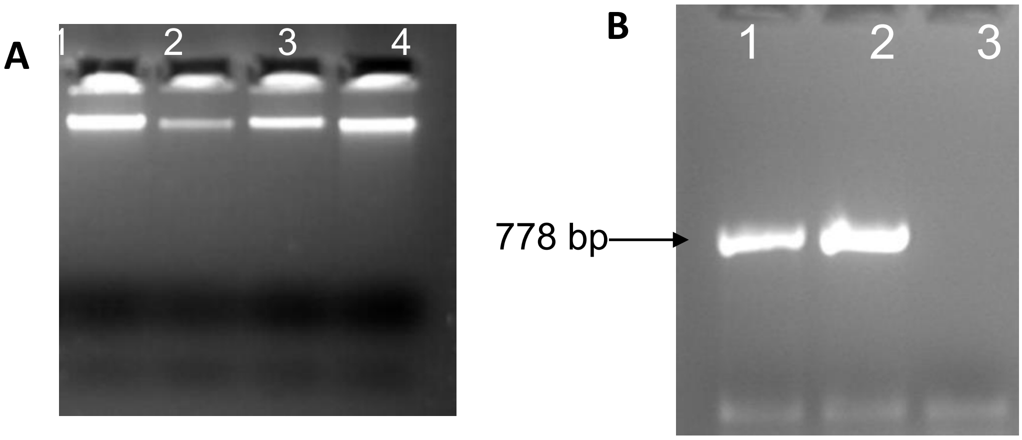
Το γενωμικό DNA που απομονώθηκε από δείγμα αίματος ασθενών με ψωρίαση χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής του γονιδίου της IL-17A με τους εκκινητές F9 και R9 με τη μέθοδο της PCR. Αρχικά, διερευνήθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία διεξαγωγής της PCR, διεξάγοντας αντιδράσεις σε εύρος θερμοκρασιών (55-60$^{o}$ C). Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών (Tm) και συνήθως ρυθμίζεται 3-5 °C χαμηλότερα από την Tm. Η Tm υπολογίζεται από την σύσταση των βάσεων του κάθε εκκινητή, με βάση τον τύπο Tm=2x(A+T)+4x(C+G) και για τους εκκινητές F9 και R9 είναι 60 και 62 °C αντίστοιχα (Πίνακας 3). Στην εικόνα 4 απεικονίζονται ενδεικτικά αποτελέσματα ενίσχυσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Είναι εμφανές ότι η επιλεκτική ενίσχυση του γονιδίου επιτυγχάνεται όταν η υβριδοποίηση των εκκινητών γίνεται στη θερμοκρασία των 57$^{o}$ C, και ως εκ τούτου οι επόμενες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη θερμοκρασία.




Εικόνα 4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων της PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση του γονιδίου IL-17A με τους εκκινητές F9-R9 σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Διαδρομή 1: 55 $^{o}$C, Διαδρομή 2: 56 $^{o}$C, Διαδρομή 3: 57 $^{o}$C. Διαδρομή 4: δείγμα αρνητικού ελέγχου (NC) στους 57 $^{o}$C.

## 3.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA και ενίσχυση του γονιδίου IL-17A με τους εκκινητές F9-R9

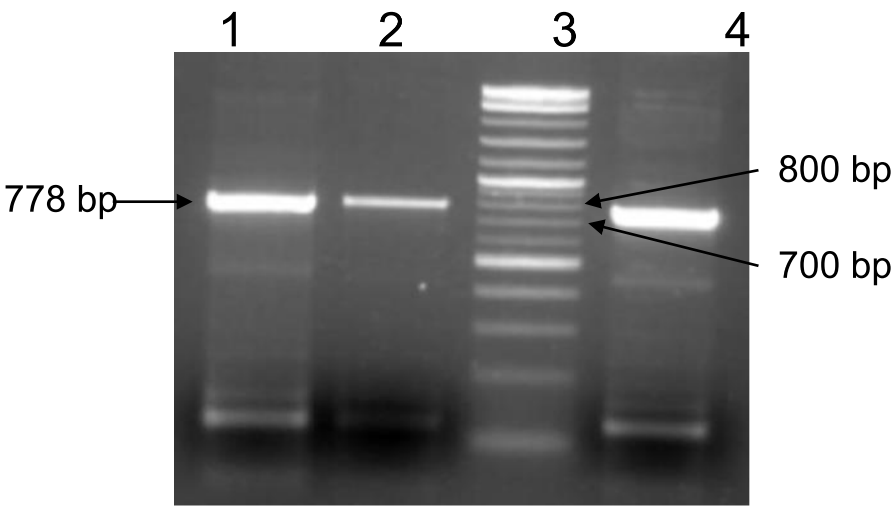
Το γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από τα δείγματα των ασθενών και ελέχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 5A). Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα από το κάθε δείγμα γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την PCR, ώστε να  ενισχυθεί η περιοχή του γονιδίου εκατέρωθεν των εκκινητών F9 και R9. Το αποτέλεσμα της επιλεκτικής ενίσχυσης του γονιδίου IL-17A έχει μέγεθος 778 bp. Στην εικόνα 5B δίνονται ενδεικτικά αποτελέσματα.




Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης γονιδιωματικού DNA και των προϊόντων της PCR. A. Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Διαδρομή 1: δείγμα 20 COS, Διαδρομή 2: δείγμα 26 COS, Διαδρομή 3: δείγμα 28 COS, Διαδρομή 4: δείγμα 29 COS. Σε κάθε διαδρομή αναλύθηκε 1 μl γονιδιωματικού DNA. B. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% ενδεικτικών προϊόντων της PCR που προέκυψαν από την ενίσχυση του γονιδίου IL-17A με τους εκκινητές F9-R9. Διαδρομή 1: δείγμα 20 COS (επιτυχημένη ενίσχυση), Διαδρομή 2: δείγμα 26 COS (επιτυχημένη ενίσχυση), Διαδρομή 3: δείγμα αρνητικού ελέγχου.

## 3.3. Αποτελέσματα καθαρισμού των προϊόντων της PCR

Πριν την αλληλούχησή τους, τα δείγματα με το επιθυμητό προϊόν καθαρίστηκαν με τη χρήση του kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρίας Macherey Nagel. Τα προϊόντα του καθαρισμού ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 6.

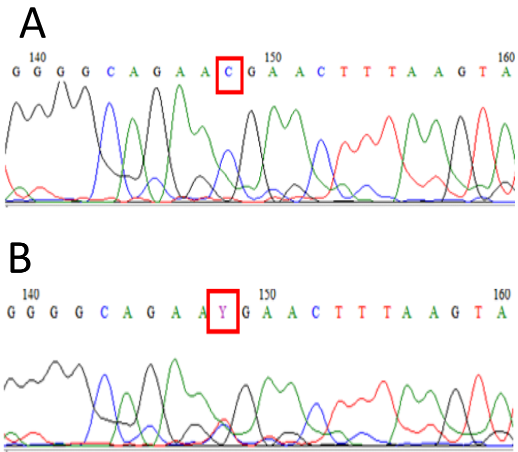



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR μετά τον καθαρισμό τους. Σε κάθε διαδρομή αναλύθηκε 1 μl από το κάθε δείγμα. Διαδρομή 1: δείγμα 20 COS, Διαδρομή 2: δείγμα 26 COS, Διαδρομή 3: 1 kB DNA ladder, Διαδρομή 4: δείγμα 29 COS.

## 3.4. Αποτελέσματα αλληλούχησης

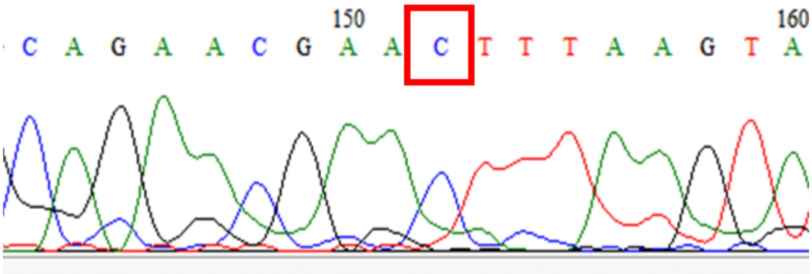
Από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR προέκυψαν τα χρωματογραφήματα που απεικονίζονται στις εικόνες 7-10, οι οποίες εστιάζονται στην περιοχή που απαντώνται οι πολυμορφισμοί *rs1974226, rs3748067, rs17884819* και *rs116457775*.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό *rs1974226*, βρέθηκαν άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο C (Εικόνα 7A), και άτομα ετερόζυγα (CT) (Εικόνα 7B), αλλά δεν ταυτοποιήθηκαν άτομα ομόζυγα για το σπάνιο αλληλόμορφο T.



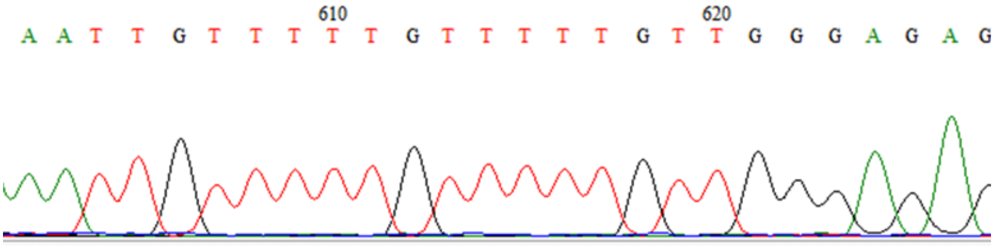

Εικόνα 7. Χρωματογραφήματα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζουν στον πολυμορφισμό *rs1974226*. Α. Το δείγμα #28 είναι ομόζυγο (CC) για τον *rs1974226*. B. Το δείγμα #26 είναι ετερόζυγο (CT) για τον *rs1974226*.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό *rs3748067*, βρέθηκαν μόνο άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο C (Εικόνα 8).



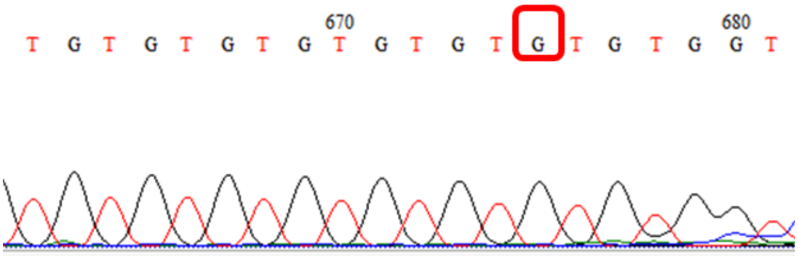

Εικόνα 8. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζει στον πολυμορφισμό *rs3748067*. Το δείγμα #28 είναι ομόζυγο (CC) για τον *rs3748067*.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό *rs17884819*, βρέθηκαν άτομα τα οποία δεν έχουν ένθεμα στο γονιδίωμά τους (no insertion). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός χωρίς ένθεμα διαβάζεται ως TTGTTTTTGTTTTTGTT (εικόνα 9), ενώ αν υπήρχε ένθεμα θα διαβαζόταν TTGTTTTTGTTTTTGTT<u>TTTGTT</u> (η αλληλουχία του ενθέματος έχει υπογραμμιστεί).




Εικόνα 9. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζει στον πολυμορφισμό *rs17884819*. Το δείγμα #28 δεν φέρει ένθεμα στη συγκεκριμένη περιοχή.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό *rs116457775* βρέθηκαν μόνο άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο G (Εικόνα 10).




Εικόνα 10. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *IL-17A* που εστιάζει στον *rs116457775*. Το δείγμα #29 είναι ομόζυγο (GG) για τον *rs116457775*.

Χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων ensembl (https://www.ensembl.org/) βρέθηκαν στοιχεία για τη συχνότητα του σπάνιου αλληλόμορφου (Minor Allele Frequency, MAF) του κάθε πολυμορφισμού.

Ο πολυμορφισμός *rs1974226* έχει MAF 0.26 σε όλο τον πληθυσμό (global Minor Allele Frequency, global MAF) και MAF 0.21 για τον Ιταλικό πληθυσμό (Toscani in Italy, TSI). Ενδεικτικά για τον *rs1974226* στον Ιταλικό πληθυσμό οι συχνότητες των γονοτύπων είναι οι ακόλουθες: CC: 62,5%, CT: 32,5% και TT: 5%. Στα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν άτομα με τους συχνούς γονότυπους, CC και CT, αλλά δεν βρέθηκαν άτομα με τον ομόζυγο γονότυπο του σπάνιου αλληλομόρφου.

Ο πολυμορφισμός *rs3748067* έχει global MAF 0.08 και MAF 0.10 για τον Ιταλικό πληθυσμό (TSI). Ενδεικτικά για τον *rs3748067* στον Ιταλικό πληθυσμό οι συχνότητες των γονοτύπων είναι οι ακόλουθες: CC: 85%, CT: 10% και TT: 5%. Στα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν μόνο άτομα με τον συχνό γονότυπο CC, γεγονός αναμενόμενο βάση της συχνότητας του κάθε γονοτύπου, όπως προαναφέρθηκε.

Ο πολυμορφισμός *rs17884819* έχει global MAF 0.28, με το συχνότερο αλληλόμορφο να μην έχει ένθεμα (TTGTTTTTGTTTTTGTT). Για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν έχει διερευνηθεί η MAF στον ευρωπαϊκό και συγκεκριμένα στον Ιταλικό πληθυσμό (TSI), ενώ η υψηλότερη MAF ανέρχεται σε 0,46 και έχει καταγραφεί σε Ασιατικό (East Asian) πληθυσμό. Σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν μόνο άτομα ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο.

Ο πολυμορφισμός *rs116457775* έχει global MAF 0.34 και MAF 0.24 για τον Ιταλικό πληθυσμό (TSI). Ενδεικτικά για τον *rs116457775 στον* Ιταλικό πληθυσμό οι συχνότητες των γονοτύπων είναι οι ακόλουθες: GG: 56% και GC:51%. Στα 20 δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν μόνο άτομα με τον γονότυπο GG, αλλά δεν βρέθηκαν άτομα ετερόζυγα, παρά την υψηλή συχνότητα του ετερόζυγου γονοτύπου.

Μια προηγούμενη φαρμακογενετική μελέτη έχει εστιαστεί στον πολυμορφισμό *rs2275913* και δεν έδειξε συσχέτιση με απόκριση στη θεραπεία με σεκουκινουμάμπη και ιξεκινουμάμπη (Van Vugt et al., 2019). Ο πολυμορφισμός *rs2275913* βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τους πολυμορφισμούς *rs1974226* και *rs116457775* που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τους άλλους πολυμορφισμούς αυτής της εργασίας *(rs3748067* και *rs17884819)* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα και δεδομένα ανισορροπίας σύνδεσης. Ειδικότερα, για τον πολυμορφισμό *rs17884819* όπως προαναφέρθηκε δεν υπάρχουν δεδομένα για την MAF στον ευρωπαϊκό και ειδικότερα στον Ιταλικό πληθυσμό (TSI).

## 3.5 Συζήτηση

Με βάση τα παραπάνω είναι σημαντική η μελέτη των γονοτύπων αυτών των πολυμορφισμών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων στον Ελληνικό πληθυσμό. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν δεν είναι δυνατή η συσχέτιση των πολυμορφισμών με την απόκριση στη σεκουκινουμάμπη, ωστόσο η επέκταση της μελέτης αυτής σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων είναι πιθανό να αναδείξει μοριακούς δείκτες που να μπορούν να προβλέψουν την απόκριση των ασθενών στη σεκουκινουμάμπη.

## Βιβλιογραφία

- Capon, F. (2017). The genetic basis of psoriasis. International journal of molecular sciences, 18(12), 2526.

- Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer AB Jr, Reboussin DM (1999) Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. J Am Acad Dermatol; 41: 401–07.

- WHO. World psoriasis day—document EB133.R2, agenda item 6.2. May 30, 2013.

- Ortonne J, Chimenti S, Luger T, Puig L, Reid F, Trueb RM (2009) Scalp psoriasis: European consensus on grading and treatment algorithm. J Eur Acad Dermatol Venereol; 23: 1435–44.

- Reich K. (2009) Approach to managing patients with nail psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol; 23 (suppl 1): 15–21.

- Baran R (2010) The burden of nail psoriasis: an introduction. Dermatology; 221 (suppl 1): 1 5.

- Sugiura K. (2014) The genetic background of generalized pustular psoriasis: IL36RN mutations and CARD14 gain-of-function variants. J Dermatol Sci; 74: 187–92.

- Joyau C, Veyrac G, Dixneuf V, Jolliet P. (2012) Anti-tumour necrosis factor alpha therapy and increased risk of de novo psoriasis: is it really a paradoxical side eff ect? Clin Exp Rheumatol;30: 700–06.

-Shmidt E, Wetter DA, Ferguson SB, Pittelkow MR. (2012) Psoriasis and palmoplantar pustulosis associated with tumor necrosis factor-αinhibitors: the Mayo Clinic experience, 1998 to 2010. J Am Acad Dermatol; 67: e179–85.

- Schmitt J, Wozel G. (2005) The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to defi ne severity in chronic plaque-type psoriasis. Dermatology; 210: 194–99.

- Lowes, M. A., Suarez-Farinas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. Annual review of immunology, 32, 227.

- Osmancevic A, Ståhle M (2017). Treatment of psoriasis: Before & now. Lakartidningen Nov;114.

- Elena Generali, Angela Ceribelli, Maria Antonietta Stazi, Carlo Selmi (2013) Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases, Journal of Autoimmunity, Volume 83, Pages 51-61

- A.S. Lønnberg, L. Skov, A. Skytthe, K.O. Kyvik, O.B. Pedersen, S.F. Thomsen (2013) British Journal of Dermatology, Volume 169, Issue 2, Pages 412–416.

- Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE (2010) Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. J Invest Dermatol; 130: 1213–26

-Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis pathogenesis and treatment. International journal of molecular sciences, 20(6), 1475.

- Lowes, M. A., Suarez-Farinas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. Annual review of immunology, 32, 227.

- Nair, R., Duffin, K., Helms, C (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-κB pathways. Nat Genet 41, 199–204.

- Nair, R.P.; Ding, J.; Du n, K.C.; Helms, C.; Voorhees, J.J.; Krueger, G.G.; Bowcock, A.M.; Abecasis, G.R.; Elder, J.T. (2009) Psoriasis Bench to Bedside. Arch. Dermatol., 145, 462–464.

- Talamonti, M.; Botti, E.; Galluzzo, M.; Teoli, M.; Spallone, G.; Bavetta, M.; Chimenti, S.; Costanzo, A. (2013) Pharmacogenetics of psoriasis: HLA-Cw6 but not LCE3B/3Cdeletion nor TNFAIP3 polymorphismpredisposes to clinical response to interleukin 12/23 blocker ustekinumab. Br. J. Dermatol., 169, 458–463.

- Ciric, B.; El-Behi, M.; Cabrera, R.; Zhang, G.-X.; Rostami, A. (2009) IL-23 Drives Pathogenic IL-17-Producing CD8+ T Cells. J. Immunol., 182, 5296–5305.

- Roszkiewicz M, Dopytalska K, Szymańska E, Jakimiuk A, Walecka I. (2020) Environmental risk factors and epigenetic alternations in psoriasis. Ann Agric Environ Med.; 27(3): 335–342. doi: 10.26444/aaem/112107.

- Wang Y, Gao X, Ghozlane A, Hu H, Li X, Xiao Y (2017) Characteristics of Fecal Microbiota in Pediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. J Crohns Colitis. Nov 29.

- Halling ML, Kjeldsen J, Knudsen T, Nielsen J, Hansen LK. (2017) Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. World J Gastroenterol.; 23(33): 6137–6146.

- Barrea, Luigi, Francesca Nappi, Carolina Di Somma, Maria Cristina Savanelli, Andrea Falco, Anna Balato, Nicola Balato, and Silvia Savastano. (2016) "Environmental Risk Factors in Psoriasis: The Point of View of the Nutritionist" International Journal of Environmental Research and Public Health 13, no. 7: 743.

- Carrascosa JM, Vilavella M, Garcia-Doval I, Carretero G, Vanaclocha F, Daudén E (2014) Body mass index in patients with moderate-to-severe psoriasis in Spain and its impact as an independent risk factor for therapy withdrawal: results of the Biobadaderm Registry. J Eur Acad Dermatol Venereol. Jul; 28(7): 907–14.

- Correia B, Torres T. (2015) Obesity: a key component of psoriasis. Acta Biomed. 86(2): 121–9.

- Peluso I, Palmery M. (2016) The relationship between body weight and inflammation: Lesson from anti-TNF- antibody therapy. Hum Immunol.; 77(1): 47–53.

- La Cava A, Alviggi C, Matarese G. (2014) Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. J Mol Med.; 82: 4–11.

- Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV. (2011) Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms. Br J Dermatol.; 165: 1162–8.

- Farkas A, Kemeny L. (2013) Alcohol, liver, systemic inflammation and skin: a focus on patients with psoriasis. Skin Pharmacol Physiol.; 26(3): 119–26.

- Weatherhead SC, Farr PM, Reynolds NJ. (2013) Spectral effects of UV on psoriasis. Photochem Photobiol Sci.; 12: 47–53.

- De Gruijl FR. (2013) For better or for worse, UV in psoriasis. Exp Dermatol.; 25: 945–946.

- Balak DM, Hajdarbegovic E (2017) Drug-induced psoriasis: clinical perspectives. Psoriasis (Auckl).; 7: 87–94.

- Biljan D, Laufer D, Filaković P, Situm M, Brataljenović T. (2009) Psoriasis, mental disorders and stress. Coll Antropol.; 33: 889–92.

- Park BS, Youn JI. (1998) Factors influencing psoriasis: an analysis based upon the extent of involvement and clinical type. J Dermatol.; 25: 97–102.

- Mason AR, Mason JM, Cork MJ, Hancock H, Dooley G. (2013) Topical treatments for chronic plaque psoriasis of the scalp: a systematic review. Br J Dermatol; 169: 519–27.

- E. Daudén, L. Puig, C. Ferrándiz, J.L. Sánchez-Carazo, J.M. Hernanz-Hermosa (2016) on behalf of the Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology, Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis: Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology.

- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell; 104: 487–501.

- Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J (2008) Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. J Invest Dermatol; 128: 1207–11.

- Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VKT. (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol; 8: 345–50.

- Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE (2008) Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. J Immunol; 181: 4733–41.

- Keijsers RR, Hendriks AG, van Erp PE (2014) In vivo induction of cutaneous infl ammation results in the accumulation of extracellular trap-forming neutrophils expressing RORγt and IL-17. J Invest Dermatol; 134: 1276–84.

- Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M (2017) The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. Mediators Inflamm.

- Amatya N, Childs EE, Cruz JA, Aggor FEY, Garg AV, Berman AJ (2018) IL-17 integrates multiple self-reinforcing, feed-forward mechanisms through the RNA binding protein Arid5a. Sci Signal;11.

- Ciricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I (2011) Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. J Invest Dermatol.;131:677-87.

- Monin L, Gaffen SL (2018) Interleukin 17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities, and therapeutic implications. Cold Spring Harb Perspect Biol;10.

- Radomir Reszke & Jacek C Szepietowski (2017) Secukinumab in the treatment of psoriasis: an update, IMMUNOTHERAPY VOL. 9, NO. 3 DRUG EVALUATION.

- Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, (2014) Secukinumab in plaque psoriasis—results of two phase 3 trials. N Engl J Med;371: 326-38.

- McInnes IB, Mease PJ, Kirkham B, Kavanaugh A, Ritchlin CT, Rahman P. (2015) Secukinumab, a human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis (FUTURE 2): a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 3 trial. Lancet; 386:1137-46.

- Muñoz-Aceituno, Ester, Luisa Martos-Cabrera, María Carmen Ovejero-Benito, Alejandra Reolid, Francisco Abad-Santos, and Esteban Daudén (2020) "Pharmacogenetics Update on Biologic Therapy in Psoriasis" *Medicina* 56, no. 12: 719.

- Puig, Lluís. (2018) "Cardiometabolic Comorbidities in Psoriasis and Psoriatic Arthritis" International Journal of Molecular Sciences 19, no. 1: 58.

- Jasna Grželj, Irena Mlinarič-Raščan, Pij B. Marko, Maruška Marovt, Tanja Gmeiner, Alenka Šmid (2021) Polymorphisms in GNMT and DNMT3b are associated with methotrexate treatment outcome in plaque psoriasis, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 138.

- Vasilopoulos, Y., Sarri, C., Zafiriou, E. (2014) A pharmacogenetic study of ABCB1 polymorphisms and cyclosporine treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. Pharmacogenomics J 14, 523–525.

- Masouri, S.; Stefanaki, I.; Ntritsos, G.; Kypreou, K.P.; Drakaki, E.; Evangelou, E.; Nicolaidou, E.; Stratigos, A.J.; Antoniou, C. (2016) A Pharmacogenetic Study of Psoriasis Risk Variants in a Greek Population and Prediction of Responses to Anti-TNF- and Anti-IL-12/23 Agents. Mol. Diagn. Ther., 20, 221–225.

- Mendrinou, E.; Patsatsi, A.; Zafiriou, E.; Papadopoulou, D.; Aggelou, L.; Sarri, C.; Mamuris, Z.; Kyriakou, A.; Sotiriadis, D.; Roussaki-Schulze, A.; et al. FCGR3A-V158F polymorphism is a dis-ease-specific pharmacogenetic marker for the treatment of psoriasis with Fc-containing TNF_ inhibitors. Pharm. J. 2017, 17, 237–241.

- Van den Reek, J.; Coenen, M.J.H.; van de L'Isle Arias, M.; Zweegers, J.; Rodijk-Olthuis, D.; Schalkwijk, J.; Vermeulen, S.H.; Joosten, I.; van de Kerkhof, P.C.M.; Seyger, M.M.B.; et al. Polymorphisms in CD84, IL12B and TNFAIP3 are associated with response to biologics in patients with psoriasis. Br. J. Dermatol. 2017, 176, 1288–1296.

- Vasilopoulos, Y.; Manolika, M.; Zafiriou, E.; Sarafidou, T.; Bagiatis, V.; Krüger-Krasagaki, S.; Tosca, A.; Patsatsi, A.; Sotiriadis, D.;Mamuris, Z.; et al. Pharmacogenetic Analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B Gene Polymorphisms and Prediction ofvResponse to Anti-TNF Therapy in Psoriasis Patients in the Greek Population. Mol. Diagn. Ther. 2012, 16, 29–34.

- Sanz-Garcia, A.; Reolid, A.; Fisas, L.; Muñoz-Aceituno, E.; Llamas-Velasco, M.; Sahuquillo-Torralba, A.; Botella-Estrada, R.; García-Martínez, J.; Navarro, R.; Daudén, E.; et al. DNA Copy Number Variation Associated with Anti-tumour Necrosis Factor Drug Response and Paradoxical Psoriasiform Reactions in Patients with Moderate-to-severe Psoriasis. Acta Dermato-Venereol. 2021, 101, adv00448.

- Coto-Segura, P.; González-Lara, L.; Batalla, A.; Eiris, N.; Queiro, R.; Coto, E. NFKBIZ and CW6 in Adalimumab Response Among Psoriasis Patients: Genetic Association and Alternative Transcript Analysis. Mol. Diagn. Ther. 2019, 23, 627–633.

- Reek, J.V.D.; Coenen, M.; Arias, M.V.D.L.; Zweegers, J.; Rodijk-Olthuis, D.; Schalkwijk, J.; Vermeulen, S.; Joosten, I.; Van De Kerkhof, P.; Seyger, M.; (2017) Polymorphisms inCD84,IL12BandTNFAIP3are associated with response to biologics in patients with psoriasis. Br. J. Dermatol., 176, 1288–1296.

- Prieto-Pérez, R.; Llamas-Velasco, M.; Cabaleiro, T.; Solano-López, G.; Márquez, B.; Román, M.; Ochoa, D.; Talegón, M.; Daudén, E.; Abad-Santos, F (2017) Pharmacogenetics of ustekinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. Pharmacogenomics, 18, 157–164.

- Galluzzo, M.; Boca, A.N.; Botti, E.; Potenza, C.; Malara, G.; Malagoli, P.; Vesa, S.; Chimenti, S.; Buzoianu, A.D.; Talamonti, M.; (2015) IL12B (p40) Gene Polymorphisms Contribute to Ustekinumab Response Prediction in Psoriasis. Dermatology, 232, 230–236.

- Raposo, I.; Carvalho, C.; Bettencourt, A.; Martins-Silva, B.; Leite, L.; Selores, M.; Torres, T. (2017) Psoriasis pharmacogenetics: HLA-Cw*0602 as a marker of therapeutic response to ustekinumab. Eur. J. Dermatol. EJD, 27, 528–530.

- Liu, L.; Kikly, K.; Lu, J.; Allan, B.W.; Tang, Y.; Tetreault, J.; Chow, C.-K.; Barmettler, B.; Nelson, J.; Bina, H.; (2016) Generation and characterization of ixekizumab, a humanized monoclonal antibody that neutralizes interleukin-17A. J. Inflamm. Res., 9, 39–50.

- Blauvelt, A.; Reich, K.; Tsai, T.-F.; Tyring, S.; Vanaclocha, F.; Kingo, K.; Ziv, M.; Pinter, A.; Vender, R.; Hugot, S.; (2017) Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate-to-severe plaque psoriasis up to 1 year: Results from the CLEAR study. J. Am. Acad. Dermatol., 76, 60–69.e9.

- Costanzo, A.; Bianchi, L.; Flori, M.L.; Malara, G.; Stingeni, L.; Bartezaghi, M.; Carraro, L.; Castellino, G. (2018) The SUPREME study group Secukinumab shows high efficacy irrespective of HLA-Cw6 status in patients with moderate-to-severe plaque-type psoriasis: SUPREME study. Br. J. Dermatol., 179, 1072–1080.

- Papini, M.; Cusano, F.; Romanelli, M.; Burlando, M.; Stinco, G.; Girolomoni, G.; Peris, K.; Potenza, C.; Odani, A.; Bartezaghi, M.; (2019) Secukinumab shows high efficacy irrespective of HLA-Cw6 status in patients with moderate-to-severe plaque-type psoriasis: Results from extension phase of the SUPREME study. Br. J. Dermatol, 181, 413–414.

- Anzengruber, F.; Drach, M.; Meier, B.; Navarini, A.A.; Maul, J.-T.; Kolios, A. (2018) Therapy response was not altered by HLA-Cw6 status in psoriasis patients treated with secukinumab: A retrospective case series. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 32, e274–e276.

- Van Vugt, L.; Reek, J.V.D.; Meulewaeter, E.; Hakobjan, M.; Heddes, N.; Traks, T.; Kingo, K.; Galluzzo, M.; Talamonti, M.; Lambert, J.; (2019) Response to IL -17A inhibitors secukinumab and ixekizumab cannot be explained by genetic variation in the protein-coding and untranslated regions of the IL -17A gene: Results from a multicentre study of four European psoriasis cohorts. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 34, 112–118.

- John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg & Lupert Stryer (2011) Βασικές Αρχές Βιοχημείας Τόμος Ι, Broken Hill.