



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

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Φαρμακογενετική ανάλυση απόκρισης σε θεραπεία με  
απρεμιλάστη στην ψωρίαση»**

**“Pharmacogenetic analysis of response to apremilast for  
psoriasis”**

Λινάκη Ελευθερία του Αντωνίου

Λάρισα, 2023

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Σαραφίδου Θεολογία (επιβλέπουσα):** Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Λιαδάκη Καλλιόπη:** Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Γιαννούλης Θεμιστοκλής:** Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Ζωικών οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>Εισαγωγή</b>	<b>6</b>
1.1. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού	8
1.2. Η γενετική βάση της ψωρίασης	9
1.2.1 PSORS-1	9
1.2.2. PSORS-2	10
1.2.3. PSORS-4	10
1.2.4. Έρευνα συσχέτισης STAT4 με την ψωρίαση σε ελληνικό πληθυσμό	11
1.2.5. Genome Wide Association Study (GWAS)	11
<b>2. Θεραπευτικές προσεγγίσεις</b>	<b>13</b>
2.1 Βιολογικοί παράγοντες	14
2.2 Μικρά μόρια	14
<b>3. Φαρμακογενετική συστημικών φαρμάκων</b>	<b>15</b>
3.1. Μεθοτρεξάτη	15
3.2. Κυκλοσπορίνη	15
3.3. Ακιτρετίνη	16
<b>4. Φαρμακογενετική βιολογικών φαρμάκων</b>	<b>16</b>
4.1. Φάρμακα anti-TNF	16
4.2. Αναστολείς των IL-12 και IL-23	17
4.3. Αναστολείς IL-17	18
4.4. Αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4	18
<b>5. Απρεμιλάστη</b>	<b>19</b>
5.1. Φαρμακοκινητική απρεμιλάστης	21
5.2. Φαρμακογενετική έρευνα συσχέτισης γονιδίων για την απρεμιλάστη	21
<b>6. Σκοπός της εργασίας</b>	<b>23</b>
<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>24</b>
Δείγματα ασθενών	24
Υπολογισμός PASI και αξιολόγηση απόκρισης	24
Απομόνωση DNA	25
Ηλεκτροφόρηση	26
Γονοτύπηση	27
Ανάλυση αποτελεσμάτων γονοτύπησης	29
Call Rate	29
Εντοπισμός μονομορφικών SNPs	29
MAF (Minor Allele Frequency)	30
Ισορροπία Hardy-Weinberg	30
Pruning	30
Ανάλυση συσχέτισης	30
<b>Αποτελέσματα - Συζήτηση</b>	<b>31</b>
Απομόνωση και έλεγχος γονιδιωματικού DNA	31
Εντοπισμός μονομορφικών SNPs και SNPs με συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου (minor allele frequency, MAF) μικρότερη από 5%	36
Call rate	36
Ισορροπία Hardy-Weinberg	37
Διαδικασία Pruning	37
Αποτελέσματα συσχέτισης	37

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

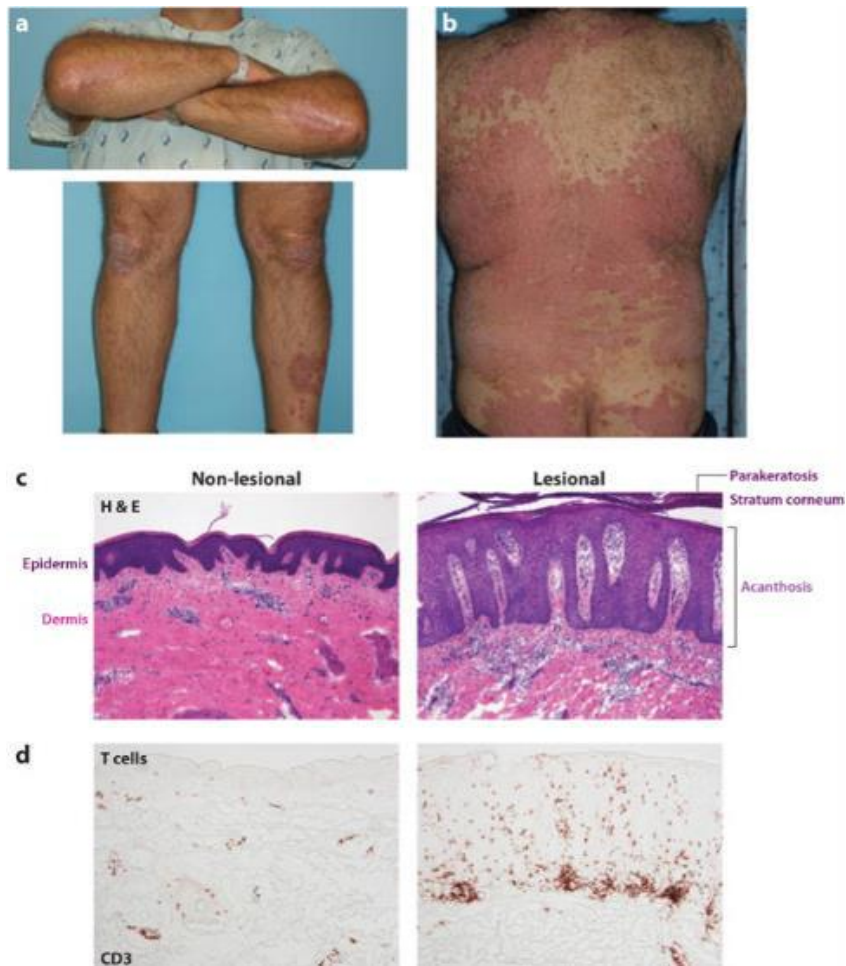
Θέμα της παρούσας εργασίας αποτελεί η φαρμακογενετική ανάλυση απόκρισης σε θεραπεία με απρεμιλάστη στην ψωρίαση. Η ψωρίαση είναι μία αυτοάνοση, φλεγμονώδης, μη μεταδοτική ασθένεια, τα ακριβή αίτια της οποίας παραμένουν αντικείμενο έρευνας, καθώς έχουν εντοπιστεί ποικίλοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ασθένειας κατέχουν διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος και, παρά την μεγάλη πρόοδο της έρευνας και τις σύγχρονες θεραπείες με συστημικά φάρμακα, βιολογικούς παράγοντες και μικρά μόρια, η ψωρίαση θεωρείται ακόμη χρόνια και μη ιάσιμη. Για την εκπόνηση της έρευνα αξιοποιήθηκαν 58 δείγματα αίματος ασθενών από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, στους οποίους χορηγήθηκε αγωγή με απρεμιλάστη. Το DNA τους απομονώθηκε και ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση και τα δείγματα με κατάλληλη συγκέντρωση αποστάλθηκαν για γονοτύπηση. Προκειμένου να αξιολογηθεί η απόκριση, εκτιμήθηκε ο δείκτης PASI πριν και μετά την αγωγή (σε διάστημα 3 έως 9 μήνες) και οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε άτομα με καλή, μέτρια και μη απόκριση στην απρεμιλάστη. Από τα δεδομένα της γονοτύπησης επιλέχθηκαν και αναλύθηκαν, ως προς τη συσχέτισή τους με την απόκριση, τα SNPs εντός του γονιδίου της φωσφοδιεστεράσης (PDE) 4D, ένα από τα τέσσερα γονίδια φωσφοδιεστερασών στον άνθρωπο που τα προϊόντα τους αποτελούν άμεσους στόχους του φαρμάκου, καθώς και τα SNPs που εντοπίζονται ανοδικά και καθοδικά του γονιδίου σε απόσταση 1 Mb μα βάση την υπόθεση ότι μπορεί να εντοπίζονται σε ρυθμιστικά στοιχεία. Το αποτέλεσμα ήταν ο εντοπισμός συσχέτισης της απόκρισης με 17 SNPs, εκ των οποίων τα 9 εντοπίζονται μέσα στο γονίδιο και τα 8 καθοδικά. Από αυτά, τα 4 αποτελούν eQTLs για το PDE4D σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων του δέρματος και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, με βάση παλαιότερες έρευνες που εντόπισαν συσχέτιση συγκεκριμένων αλληλομόρφων αυτών των SNPs με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Τα αποτελέσματα αυτής της προκαταρκτικής μελέτης θα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών ώστε να προτείνουν αξιόπιστους γενετικούς δείκτες απόκρισης στη θεραπεία με απρεμιλάστη.

The subject of this work is the pharmacogenetic analysis of response to treatment with apremilast for psoriasis. Psoriasis is an autoimmune, inflammatory, non-contagious disease. The exact causes of the disease remain under investigation, as a variety of genetic and environmental factors have been identified. The immune system plays a key role in the pathophysiology of the disease.. Despite the great progress in research and modern treatments with systemic drugs, biological agents and small molecules, psoriasis is still considered chronic and incurable. In this context, 58 blood samples from psoriatic patients treated with apremilast derived from the Dermatology Clinic of Larissa's University Hospital, were collected. Their DNA was isolated and checked by electrophoresis and spectrophotometry, and the samples with the appropriate concentration were sent for genotyping. The response of the patients to the treatment was assessed based on PASI index before and after treatment (at 3 to 9 months) and patients were categorized into good, moderate and non-responders to apremilast. From the genotyping data, SNPs within the phosphodiesterase (PDE) 4D gene, one of the four human phosphodiesterase genes whose products are the direct drug targets, were retrieved and analyzed for their association with the response. The SNPs that were located upstream and downstream of the gene at a distance of 1 Mb were also selected based on the hypothesis that they may be located in regulatory genomic regions. The result was the association of 17 SNPs with the response to apremilast. Nine of those SNPs are located within the gene and eight of them are located downstream. Four of these SNPs constitute eQTLs for *PDE4D* in various cell types, including skin and immune cells, based on previous research that identified association of specific alleles of these SNPs with gene expression levels. The results of this preliminary study should be confirmed in a larger cohort in order to confirm reliable genetic markers of response to apremilast therapy.

# Εισαγωγή

Η ψωρίαση αποτελεί μία πολυπαραγοντική, αυτοάνοση, φλεγμονώδης, μη μεταδοτική ασθένεια. Είναι ήδη γνωστό ότι η εμφάνιση της οφείλεται σε γενετικούς, επιγενετικούς, ανοσολογικούς, περιβαλλοντικούς και ψυχολογικούς παράγοντες ωστόσο τα ακριβή αίτια της παραμένουν αντικείμενο έρευνας. Επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από χρόνια εναλλασσόμενες περιόδους έξαρσης και ύφεσης των οποίων η διάρκεια διαφέρει σε κάθε ασθενή και κατά μέσο όρο εμφανίζεται στην ηλικία των 22 έως 27 χρόνων. Μπορούν να διακριθούν διαφορετικά είδη ψωρίασης όπως είναι η κατά πλάκας ψωρίαση, η οποία είναι και η πιο συχνή, η σταγονοειδής, η φλυκταινώδης, η ανάστροφη και η ερυθροδερμική που πρόκειται για την πιο σοβαρή μορφή ψωρίασης καθώς μπορεί να επιφέρει έως και θάνατο. Η ψωρίαση επίσης αποτελεί ένα νόσημα με πολλές συννοσηρότητες καθώς τα άτομα που πάσχουν έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης ψωριασικής αρθρίτιδας, μεταβολικού συνδρόμου, νόσου του Crohn, κατάθλιψης, καρκίνου και εμφράγματος του μυοκαρδίου (Lowes MA et al., 2014).

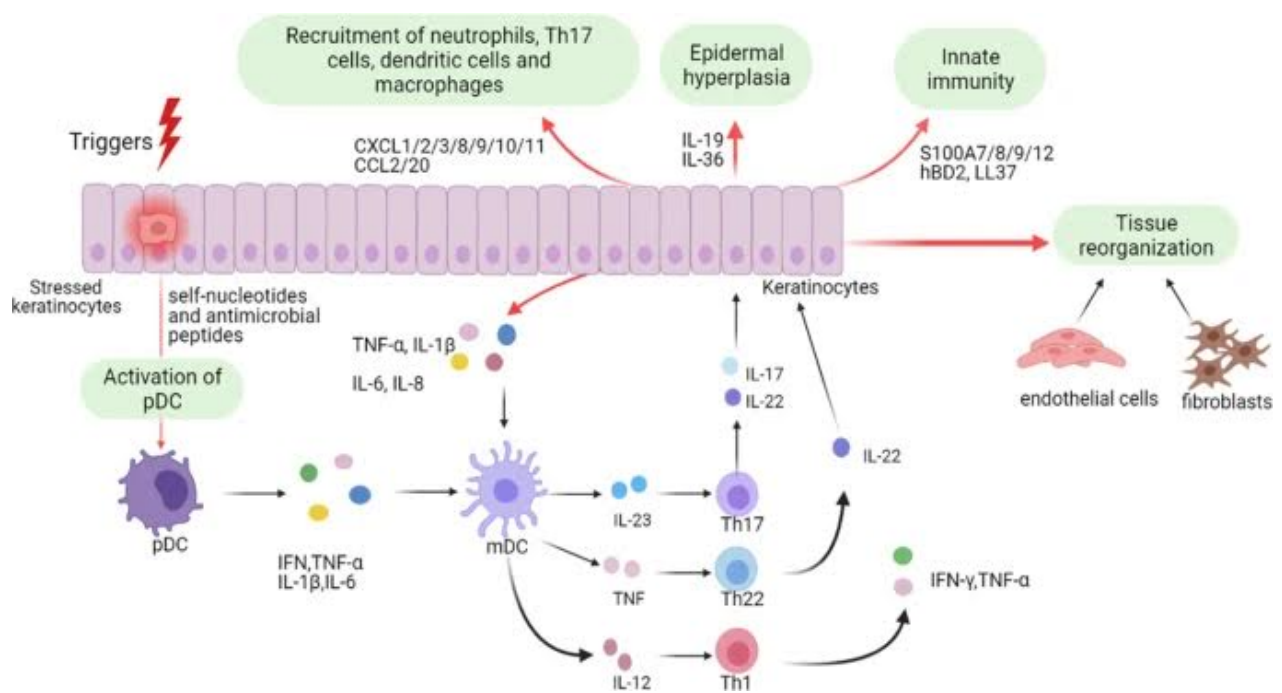
Η νόσος γενικά εμφανίζεται με έντονες δερματικές εκδηλώσεις (Εικόνα 1) με την μορφή φλεγμονωδών, ερυθρηματωδών πλακών συνήθως στις εξωτερικές επιφάνειες των αρθρώσεων, όπως είναι οι αγκώνες και τα γόνατα, στο τριχωτό της κεφαλής και λιγότερο συχνά σε ευαίσθητες, ενδοτριβικές περιοχές. Οι πλάκες ονομάζονται ψωριασικές και σχηματίζονται ως αποτέλεσμα υπερκεράτωσης, διαστολής δερματικών αιμοφόρων αγγείων και συσσώρευσης T κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων και ουδετερόφιλων λόγω φλεγμονής (Krueger JG et al., 2005).



**Εικόνα 1.** Κλινική και ιστολογική εικόνα της ψωρίασης. *a)* Κλινική εικόνα κοινής ψωρίασης (psoriasis vulgaris) όπου φαίνονται καλά καθορισμένες ερυθματώδεις ψωριασικές πλάκες στους αγκώνες και τα γόνατα. *b)* πλάτη ασθενή με πιο εκτεταμένες ψωριασικές πλάκες. *c)* ιστολογία υγιούς και προσβεβλημένου δερματικού ιστού με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης όπου οι πυρήνες εμφανίζονται μπλε. Στην επιδερμίδα παρατηρείται μία σκουρόχρωμη στοιβάδα λόγω των πυρήνων των κερατινοκυττάρων, που βρίσκεται πάνω από το ανοιχτόχρωμο μωβ χόριο ή αλλιώς δερμίδα. Το δέρμα από την ψωριασική πλάκα εμφανίζει πάχυνση της επιδερμίδας η οποία επεκτείνεται και στο χόριο. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί παρακεράτωση λόγω διατήρησης των πυρήνων στην κεράτινη στιβάδα. Υπάρχει μεγάλη αύξηση στο πλήθος των κυττάρων στο χόριο κυρίως λόγω της συσσώρευσης δενδριτικών και T- κυττάρων. *d)* Αυξημένη συγκέντρωση CD3+ T- κυττάρων παρατηρούνται στην ψωριασική πλάκα τα οποία σχηματίζουν λεμφοειδή συσσωματώματα με δενδριτικά κύτταρα (Lowe MA et al.,2014).

## 1.1. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού

Διαταραχές του έμφυτου και επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος κατέχουν κύριο ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης (Εικόνα 2). Αρχικά τα κερατινοκύτταρα, ως μέρος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, απελευθερώνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs) τα οποία προωθούν την ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων. Έπειτα, τα μυελοειδή και πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα του δέρματος παράγουν ιντερλευκίνες IL-12 και IL-23 καθώς και ιντερφερόνες που ενεργοποιούν Th1 και Th22 βοηθητικά κύτταρα τα οποία με την σειρά τους απελευθερώνουν IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF και IL-17 (Lowes MA et al., 2014). Τέλος, αυτές οι κυτοκίνες, με κύρια την IL-17, επιδρούν στα κερατινοκύτταρα επάγοντας την παραγωγή περαιτέρω αντιμικροβιακών πεπτιδίων AMP, χημειοκινών και κυτοκινών που συμβάλλουν στην διεύρυνση της φλεγμονώδους απόκρισης. Τα κερατινοκύτταρα επομένως συμμετέχουν τόσο στην έναρξη όσο και στην διατήρηση της φλεγμονής στην ψωρίαση (Zhou X et al., 2022).



**Εικόνα 2.** Τι συμβαίνει στα κερατινοκύτταρα στην ψωρίαση. Τα κερατινοκύτταρα διεγείρονται από διάφορα ερεθίσματα και εκκρίνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και απελευθερώνουν νουκλεοτίδια τα οποία ενεργοποιούν τα πλασματοκυτταροειδή και τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα. Αυτά με την σειρά τους παράγουν κυτοκίνες οι οποίες διεγείρουν περαιτέρω τα κερατινοκύτταρα τα οποία συμμετέχουν στην παθολογία της ψωρίασης προκαλώντας φλεγμονώδη διήθηση, επιδερμική υπερπλασία, αναδιοργάνωση του ιστού κ.λπ.



## 1.2. Η γενετική βάση της ψωρίασης

Η ψωρίαση έχει ισχυρό γενετικό υπόβαθρο που αποδεικνύεται από τις επιδημιολογικές μελέτες, την συχνότητα εμφάνισης της νόσου εντός των οικογενειών και την αυξημένη συμπτωτικότητα μεταξύ μονοζυγωτικών έναντι διζυγωτικών διδύμων (Caron F et al., 2017).

Οι πρώτες έρευνες που διεξάχθηκαν με σκοπό την διερεύνηση της γενετικής βάσης της ψωρίασης ήταν μελέτες ανάλυσης σύνδεσης. Πρόκειται για στατιστικές αναλύσεις γενετικής σύνδεσης πολυμορφισμών με τον παθολογικό φαινότυπο που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό γονιδίων και χρωμοσωμικών περιοχών . Αποτελούν πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση κυρίως μονογονιδιακών διαταραχών αλλά βρίσκουν εφαρμογή και στην ανάλυση πολυπαραγοντικών ασθενειών. Στην περίπτωση της ψωρίασης, αρχικά εντοπίστηκαν εννιά υποψήφια χρωμοσωματικές περιοχές που πιθανώς να συμβάλλουν στην προδιάθεση για εμφάνιση της ασθένειας. Αυτές ήταν οι PSORS 1-9 (Psoriasis Susceptibility), εκ των οποίων οι PSORS-1,2 και 3 βρέθηκαν ότι όντως συσχετίζονται με την ψωρίαση (Am. J. Hum. Genet et al., 2003).

### 1.2.1 PSORS-1

Η χρωμοσωματική περιοχή PSORS-1 βρίσκεται εντός του μείζονος σύμπλοκου ιστοσυμβατότητας MHC στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6. Από τα γονίδια που περιλαμβάνονται σε αυτό, τα *HLA-C*, *CCHCR1* και *CDSN* συσχετίζονται ισχυρά με την ψωρίαση (Caaron F. et al., 2002). Το γονίδιο *HLA-C* (Human leukocyte antigen c) κωδικοποιεί μεμβρανικό υποδοχέα που κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις. Λειτουργεί παρουσιάζοντας αντιγόνα στα CD8+ T λεμφοκύτταρα και η συσχέτισή του με την ψωρίαση, ως διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν αποτελεί έκπληξη. Συγκεκριμένα μάλιστα, το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* εμφανίζει την ισχυρότερη συσχέτιση με την ψωρίαση καθώς εντοπίζεται σε μεγάλη πλειονότητα των ατόμων που πάσχουν (Huang YW. et al., 2021).

Το γονίδιο *CCHCR1* (Coiled-Coil alpha-Helical Rod protein 1), κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη για την οποία υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό του mRNA αλλά η λειτουργία της δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί επακριβώς.

Τέλος, το γονίδιο *CDSN* (Corneodesmosin) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στα κερατινοκύτταρα και συμμετέχει στην απολέπιση του δέρματος, μια διαδικασία που διαταράσσεται στην ψωρίαση (Jonca N. et al., 2011). Φαίνεται λογικό επομένως κάποια αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδίου να συσχετίζονται με την ασθένεια. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *CDSN* βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με το *HLA-C*. Οπότε το γεγονός ότι έχει βρεθεί συσχέτιση μπορεί μεν να είναι όντως αληθής αλλά υπάρχει και η πιθανότητα να βρέθηκε συσχέτιση λόγω της ανισορροπίας σύνδεσης (Nair R.P. et al. 2011).

### 1.2.2. PSORS-2

Η περιοχή PSORS-2 βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 και περιλαμβάνει το γονίδιο *CARD14* (Caspase Recruitment Domain-containing protein 14). Το γονίδιο εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στα κερατινοκύτταρα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς η οποία συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, μια εκ των οποίων είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του Nf-κB. Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν συσχετισθεί με την ψωρίαση καθώς αυξάνουν την δραστικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης οδηγώντας σε ενίσχυση της NFκB σηματοδότησης με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και την επαγωγή παραγωγής κυτοκινών οι οποίες με την σειρά τους προωθούν την φλεγμονή (Berki DM et al. 2015).

### 1.2.3. PSORS-4

Η περιοχή PSORS-4 εντοπίζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 1 όπου εδράζεται το EDC (Epidermal Differentiation Cluster). Πρόκειται για ένα σύμπλεγμα γονιδίων που καταλαμβάνει 2Mb και περιλαμβάνει πάνω από πενήντα γονίδια των οποίων η λειτουργία είναι απαραίτητη για την πλήρη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων (Abhishek S et al., 2016). Έχει βρεθεί ότι η απώλεια λειτουργίας ή η ετερόζυγη έλλειψη δύο γονιδίων αυτού του συμπλέγματος, των *LCE3B* και *LCE3C* (Late Cornified Envelope 3B και 3C), συσχετίζονται ισχυρά με την ψωρίαση (De Cid R. et al., 2009).

#### **1.2.4. Έρευνα συσχέτισης STAT4 με την ψωρίαση σε ελληνικό πληθυσμό**

Το 2009 διεξάχθηκε η πρώτη μελέτη συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων για την ψωρίαση, σε πληθυσμό ελληνικής καταγωγής από την Κρήτη (Zevrou MI et al., 2009). Η έρευνα περιλάμβανε 163 ασθενείς και 341 άτομα ελέγχου. Οι ερευνητές ξεκίνησαν με δεδομένο ότι παρόλο που έχει παρατηρηθεί συσχέτιση κάποιων πολυμορφισμών του γονιδίου *STAT4* με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιων αυτοάνοσων ασθενειών μεταξύ των οποίων είναι και η ψωρίαση. Ωστόσο δεν είχε ακόμα ερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση ενός συγκεκριμένου SNP, του rs7574865, με την ψωρίαση. Οι πρωτεΐνες STAT αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται ως απόκριση σε ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη STAT4, ως απόκριση στα αυξημένα επίπεδα IFN- $\alpha$  που παρατηρούνται στην ψωρίαση, προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου IFN- $\gamma$  οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασής του και κατ' επέκταση στην προώθηση του πολλαπλασιασμού T-κυττάρων. Με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού rs7574865 του γονιδίου *STAT4* με την ψωρίαση, έγινε απομόνωση DNA από δείγμα αίματος των συμμετεχόντων και έπειτα γονοτύπηση. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι γονότυποι G/T και T/T ήταν πιο συχνοί στα άτομα που πάσχουν από ότι στους μάρτυρες ωστόσο μετά από έλεγχο των αποτελεσμάτων με την δοκιμασία  $\chi^2$  δεν βρέθηκε ότι η διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης αυτού του γονοτύπου ήταν στατιστικά σημαντική.

#### **1.2.5. Genome Wide Association Study (GWAS)**

Η ραγδαία εξέλιξη των τεχνολογιών γονοτύπησης στις αρχές του 2000 επέτρεψε την διεξαγωγή μελετών συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) και την εύρεση χιλιάδων πολυμορφισμών που συσχετίζονται με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Η πρώτη GWAS για την ψωρίαση διεξάχθηκε το 2007 (M. Cargill et al., 2007). Οι ερευνητές διεξήγαγαν μελέτες ασθενών- μαρτύρων όπου συνολικά συμμετείχαν 1.446 ενήλικες που πάσχουν από ψωρίαση και 1.432 άτομα ελέγχου, με καταγωγή από την βόρεια Αμερική. Το DNA από όλους τους συμμετέχοντες γονοτυπήθηκε για 25.215 SNPs και βρέθηκε ότι ένα συγκεκριμένο SNP, το rs3212227, στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *IL-12B*, που κωδικοποιεί μια υπομονάδα των ιντερλευκινών IL12 και IL23, συσχετίζεται ισχυρά με την εμφάνιση της νόσου. Με αυτό το δεδομένο, οι ερευνητές προχώρησαν με την γονοτύπηση 17 SNPs σε γονίδια που κωδικοποιούν τις A υπομονάδες των IL12 και IL23 καθώς και

των υποδοχέων τους. Με ανάλυση συσχέτισης απλοτύπων βρέθηκαν δύο SNPs στο γονίδιο *IL23R*, τα rs7530511 και rs11209026, που σχηματίζουν έναν απλότυπο που συσχετίστηκε με την ψωρίαση και στις τρεις μελέτες. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση των κωδικών περιοχών του γονιδίου *IL-12B* και γονοτύπηση επιπλέον 30 SNPs και βρέθηκε ότι ένα από αυτά, το rs6887695, που βρίσκεται περίπου 60kb ανοδικά της κωδικής περιοχής του γονιδίου, επίσης συσχετίζεται ισχυρά με την ψωρίαση. Επομένως, άτομα τα οποία είναι ομόζυγα για τους απλοτύπους των γονιδίων *IL-12B* και *IL-23R* έχουν προδιάθεση να εμφανίσουν την νόσο.

Η μεγαλύτερης κλίμακας μέτα-ανάλυση GWAS για την ψωρίαση δημοσιεύτηκε το 2017 (Tsoi LC et al., 2017). Οι ερευνητές αρχικά συνέλεξαν δεδομένα από προϋπάρχουσες GWAS συγκεντρώνοντας δεδομένα από τις γονοτυπήσεις περισσότερων από 30.000 δειγμάτων. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν ελέγχθηκαν για 9.113.515 γενετικούς δείκτες. Κατ' αρχάς, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για 42 από τους 47 γενετικούς τόπους που έχουν ήδη βρεθεί ότι συσχετίζονται με την ψωρίαση και, επιπλέον, για 16 νέους γενετικούς τόπους (Πίνακας 1). Μετά από περαιτέρω έρευνα, οι ερευνητές βρήκαν ότι τα περισσότερα από αυτά τα SNPs, όπως και ήταν αναμενόμενο, βρίσκονται σε περιοχές που σχετίζονται κυρίως με λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος όπως το μονοπάτι της ιντερφερόνης τύπου I, την διαφοροποίηση και ρύθμιση της λειτουργίας των λεμφοκυττάρων και την απόκριση σε ιούς ή βακτήρια. Τέλος παρατήρησαν ότι τρία από τα νέα SNPs βρίσκονται σε περιοχές σχετιζόμενες με την ρύθμιση του μονοπατιού της κινάσης I-KKB και του παράγοντα NF-κB, και ότι άλλα δεκατρία από τα νέα SNPs εντοπίζονται μέσα ή βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με ενισχυτές που είναι ενεργοί κυρίως σε CD4+ T- βοηθητικά και CD8+ κυταροτοξικά λεμφοκύτταρα.

**Πίνακας 1.** Λίστα 16 νέων SNPs που βρέθηκαν ότι σχετίζονται με την ψωρίαση όπου αναγράφεται σε ποιο χρωμόσωμα βρίσκεται το καθένα, η ακριβή του θέση, η p-value καθώς και γονίδια που βρίσκονται σε εκείνη την περιοχή (Tsoi LC et al., 2017).

Chr	Pos	Marker	RA	NRA	RAF <sub>case</sub>	RAF <sub>cont</sub>	ORs	P value	Nearby genes
1	78450517	rs34517439	A	C	0.13	0.12	1.18	$4.43 \times 10^{-9}$	FUBP1
1	172675097	rs12118303	C	T	0.19	0.17	1.12	$3.02 \times 10^{-10}$	FASLG
1	206655331	rs41298997	T	C	0.19	0.18	1.13	$2.37 \times 10^{-8}$	IKBKE
10	64369999	rs2944542	G	C	0.62	0.60	1.08	$1.76 \times 10^{-8}$	ZNF365
10	89824771	rs76959677	G	A	0.05	0.04	1.28	$2.75 \times 10^{-8}$	PTEN, KLLN, SNORD74
10	102038641	rs61871342	G	A	0.57	0.55	1.10	$1.56 \times 10^{-9}$	CHUK
11	65593444	rs118086960	T	A	0.49	0.47	1.12	$6.89 \times 10^{-9}$	CFL1, FIBP, FOSL1
12	10597207	rs11053802	T	C	0.69	0.67	1.11	$4.17 \times 10^{-9}$	KLRK1, KLRC4
12	112059557	rs11065979	T	C	0.47	0.45	1.08	$1.67 \times 10^{-8}$	BRAP, MAPKAPK5
12	122668326	rs11059675	A	G	0.48	0.46	1.10	$1.50 \times 10^{-8}$	IL31
13	99950260	rs9513593	G	A	0.19	0.18	1.12	$3.60 \times 10^{-8}$	UBAC2, RN7SKP9
14	98668778	rs142903734	AAG	A	0.81	0.79	1.12	$7.15 \times 10^{-9}$	RP11-610I.1
15	31637666	rs28624578	T	C	0.85	0.83	1.18	$9.22 \times 10^{-10}$	KLF13
17	73890363	rs55823223	A	G	0.15	0.13	1.15	$1.06 \times 10^{-8}$	TRIM47, TRIM65
18	12857002	rs559406	G	T	0.47	0.45	1.10	$1.19 \times 10^{-10}$	PTPN2
19	49206417	rs492602	G	A	0.49	0.46	1.11	$6.57 \times 10^{-13}$	FUT2

## 2. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Παρά τις όλες ανακαλύψεις που έχουν γίνει σχετικά με την ανοσολογική και γενετική βάση που χαρακτηρίζει την ψωρίαση, η ασθένεια εξακολουθεί να θεωρείται μη ιάσιμη και χρόνια ακόμα και αν υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα συμπτώματα υποχωρούν και παραμένουν σε ύφεση για αρκετό χρονικό διάστημα. Δεν έχει βρεθεί ακόμα οριστική θεραπεία και οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται στοχεύουν συνήθως στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων οδηγώντας σε μεγάλα διαστήματα κάθαρσης της νόσου και στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Πλέον, μετά από πολύχρονη έρευνα, έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες θεραπείες με συστημικά φάρμακα, βιολογικούς παράγοντες και μικρά μόρια που συνεχώς εξελίσσονται και πετυχαίνουν εντυπωσιακή κάθαρση και σταθεροποίηση για χρόνια.

Η θεραπεία που μπορεί να ακολουθήσει κάποιος ασθενής εξαρτάται αρχικά από την βαρύτητα των συμπτωμάτων που εμφανίζει, δηλαδή ήπια συμπτώματα συνήθως μπορούν να αντιμετωπιστούν με την εφαρμογή τοπικών θεραπειών, όπως είναι τα κορτικοστεροειδή, η βιταμίνη D (Mason A et al., 2013) και η φωτοθεραπεία (Almutawa F et al., 2013), και την

χορήγηση κάποιας φαρμακευτικής αγωγής. Η αγωγή τυπικά ξεκινά με συστηματικά φάρμακα όπως είναι η μεθοτρεξάτη (ανταγωνιστής φολικού οξέως), η κυκλοσπορίνη (ανοσοκατασταλτικό), η ακιτρετίνη (ρετινοϊδές) (Overjero-Benito et al., 2018), και οι εστέρες φουμαρικού οξέως (Balak D.M. et al., 2015). Στην περίπτωση ωστόσο που δεν παρατηρηθεί υποχώρηση των συμπτωμάτων, η θεραπεία συνήθως συνεχίζεται με την χορήγηση βιολογικών παραγόντων.

## 2.1 Βιολογικοί παράγοντες

Οι βιολογικοί παράγοντες κατασκευάζονται με την χρήση βιοτεχνολογικών μεθόδων και περιλαμβάνουν την αδαλιμουμάμπη, την ετανερσέπτη και την ινφλιξιμάμπη, που δρουν έναντι του TNF- $\alpha$  (Sivamani RK et al 2010), την ουστεκινουμάμπη, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει και αναστέλλει την δράση των IL-12 και IL-23, καθώς και την σεκουκινουμάμπη και την ιξεκιζουμάμπη, που αποτελούν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της IL-17. Με δεδομένο την χρονική διάρκεια και το κόστος της θεραπείας, καθώς και την πιθανότητα μη απόκρισης του ασθενή ή ακόμα και εμφάνισης τοξικότητας, η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αποτελεί μία πρόκληση.

Εστιάζοντας στην πρόβλεψη των πιθανών αποκρίσεων των ασθενών στις εκάστοτε θεραπείες, πολλοί ερευνητές διεξήγαγαν φαρμακογενετικές μελέτες με σκοπό την εύρεση διαφόρων γονιδιακών πολυμορφισμών και την συσχέτισή τους με τις αποκρίσεις.

## 2.2 Μικρά μόρια

Προσφάτως έχουν εγκριθεί από τον FDA μικρά χημικά μόρια που λαμβάνονται από το στόμα και χαρακτηρίζονται ως αρκετά ασφαλείς θεραπευτικές προσεγγίσεις με μέτρια έως καλή αποτελεσματικότητα (Singh S, Armstrong AW, 2018). Ένα από αυτά από αυτά είναι η τοφασιτινίμπη, η οποία αναστέλλει την λειτουργία των πρωτεϊνών JAK1 και JAK3 οδηγώντας σε εξασθένηση της σηματοδότησης από τις ιντερλευκίνες τύπου I και II καταλήγοντας σε μείωση την φλεγμονώδους και ανοσολογικής απόκρισης. Η πονεσιμόδη επίσης ανήκει σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων και δρα αναστέλλοντας την ικανότητα των λεμφοκυττάρων να εξέρχονται από τους

λεμφαδένες μειώνοντας έτσι την συγκέντρωση των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Τέλος, η απρεμιλάστη είναι και αυτή ένα μικρό μόριο που λειτουργεί ως αναστολέας που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης λόγω της ικανότητας της να αναστέλλει εξειδικευμένα την δράση της φωσφοδιεστεράσης PDE4.

## 3. Φαρμακογενετική συστημικών φαρμάκων

### 3.1. Μεθοτρεξάτη

Όσον αφορά την μεθοτρεξάτη, έχουν συσχετιστεί πολλά SNPs με την απόκριση των ασθενών σε αυτή αλλά όχι σε επίπεδο που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Παρόλα αυτά η παρουσία των SNPs rs35592 και rs2238476 στο γονίδιο της πρωτεΐνης-μεταφορέα *ABCC1* (ATP-Binding Cassette, υποοικογένεια C, 1) καθώς και τα rs17731538 και rs13120400 στο γονίδιο *ABCG2* (ATP- Binding Cassette, υποοικογένεια G, 2) έχουν βρεθεί ότι συσχετίζονται με καλή απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με μεθοτρεξάτη (Warren RB et al., 2008). Επίσης, σε μία μελέτη που διεξάχθηκε σε ινδικό πληθυσμό, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι συμμετέχοντες που διέθεταν το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* (Human Leucocyte Antigen Cw6) και το SNP rs3761538 στο γονίδιο *FOXP3* (forkhead box P3) δεν εμφάνισαν ικανοποιητική απόκριση στην αγωγή (Indhumathi S et al., 2017)

Τέλος, η παρουσία μιας 28 φορές επαναλαμβανόμενης τριπλέτας, στην 5'- αμετράφραση (UTR) περιοχή του γονιδίου της θυμιδικής συνθετάσης *TYMS*, συσχετίστηκε με δυσμενείς επιδράσεις και ηπατοτοξικότητα (Campalani E et al., 2007).

### 3.2. Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη, αποτελεί έναν ανοσορρυθμιστικό παράγοντα με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες που συμβάλλει στον περιορισμό της φλεγμονής στην ψωρίαση. Από δύο έρευνες που διεξήχθησαν σε ελληνικό πληθυσμό, βρέθηκε συσχέτιση των SNPs

rs12885713 του γονιδίου *CALM1* (Calmodulin 1) και rs2874116 του γονιδίου *MALT1* (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) με καλή απόκριση των ασθενών στην θεραπεία (Antonatos C et al., 2023), και του rs1045642 του γονιδίου *ABCB1* (ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1) με ανεπαρκή απόκριση.

### 3.3. Ακιτρετίνη

Η ακιτρετίνη χορηγείται σε άτομα που πάσχουν από ψωρίαση επειδή επιβραδύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κερατινοποίηση. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Έχει βρεθεί ότι η παρουσία του SNP rs833061 του γονιδίου *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) συσχετίζεται με μη απόκριση των ασθενών στην συγκεκριμένη αγωγή.

## 4. Φαρμακογενετική βιολογικών φαρμάκων

### 4.1. Φάρμακα anti-TNF

Τα αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων (HLAs) ανήκουν στην κατηγορία MHC (Major Histocompatibility Complex) και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο *HLA-Cw6* έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται ισχυρά με την ψωρίαση. Η παρουσία του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* φαίνεται επίσης να επηρεάζει και την απόκριση των ασθενών σε αγωγή με κάποιο anti-TNF φάρμακο. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό την επιβεβαίωση της συσχέτισης του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* με την απόκριση στα anti-TNF έχουν καταλήξει σε ποικίλα συμπεράσματα. Σε μία μελέτη, οι ερευνητές δεν μπορούσαν να προβλέψουν το αποτέλεσμα της αγωγής βασιζόμενοι στην παρουσία ή μη του συγκεκριμένου αλληλομόρφου (Ryan C et al., 2014). Σε μια άλλη περίπτωση ωστόσο, βρέθηκε ότι η παρουσία του *HLA-Cw6* σε ασθενείς ισπανικής καταγωγής θα μπορούσε όντως να συσχετισθεί με την ανεπαρκή απόκριση στην αδαλιμουμάμπη, ετανερσέπτη ή ινφλιξιμάμπη (Gallo E et al., 2013). Σε μια άλλη μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι ασθενείς που διέθεταν το



αλληλόμορφο CA του SNP rs610604, εμφάνισαν καλή απόκριση στην αγωγή με αδαλιμουμάμπη (Masouri S et al., 2016).

Στην εμφάνιση και εξέλιξη της ψωρίασης, ως αυτοάνοση ασθένεια, παίζουν επίσης πολύ μεγάλο ρόλο οι ιντερλευκίνες. Το γονίδιο *IL-17F* κωδικοποιεί μια ιντερλευκίνη που εκφράζεται στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων και το SNP rs763780 συσχετίζεται με την καλή απόκριση στην αδαλιμουμάμπη και την ινφλιξιμάμπη (Prieto-Perez R et al., 2015). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα άτομα που διαθέτουν το αλληλόμορφο ..... του SNP rs1120902 του γονιδίου *IL-23R* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της αντίστοιχης ιντερλευκίνης, εμφάνισαν καλή απόκριση στην ινφλιξιμάμπη. Επιπλέον, έχουν βρεθεί ότι συγκεκριμένα SNPs του *SLCOC1*, που κωδικοποιεί διαμεμβρανικό μεταφορέα ιόντων, και του *PDE3A*, με το οποίο βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης και κωδικοποιεί μία φωσφοδιεστεράση που συμμετέχει στην σηματοδότηση, συσχετίζονται με καλή απόκριση στα anti-TNF φάρμακα.

Πολλά SNPs του γονιδίου που κωδικοποιεί τον TNF-α καθώς και αυτά των υποδοχέων του, έχουν ελεγχθεί για πιθανές αντίστοιχες συσχετίσεις ωστόσο τα αποτελέσματα ποικίλουν αναλόγως με τις διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες (Linares-Pineda et al., 2016, Murdaca G et al., 2014, Vasilopoulos V et al., 2012).

Τέλος, συγκεκριμένα SNPs των γονιδίων *ZNF816A* (Zinc Finger Protein 816) και *MAP3K1* (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1) συσχετίστηκαν με την πρόβλεψη καλής απόκρισης σε αγωγή anti-TNF γενικά, ενώ SNPs των γονιδίων *HLA-B*, *MICA* (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A), *PTTG1* (Pituitary tumor-transforming gene-1) και *GBP6* (Guanylate Binding Protein Family Member 6) με την αγωγή με ετανερσέπτη ειδικά.

## 4.2. Αναστολείς των IL-12 και IL-23

Η ουστεκινουμάμπη είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τις ιντερλευκίνες IL-12 και IL-23, οδηγώντας σε περιορισμό της φλεγμονώδους απόκρισης των Th1 και Th17 λεμφοκυττάρων.

Από φαρμακογενετικές μελέτες για το συγκεκριμένο φάρμακο έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένα SNPs στα γονίδια *ERAP1* (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1), *CHUK* (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase), *STAT4*, *ZNF816A* (Zinc Finger Protein 816A) και *SCL22A4* που σχετίζονται με καλή απόκριση των ασθενών στην αγωγή καθώς και SNPs στα γονίδια *TNFRSF1A*, *ADAM33*, (ADAM Metallopeptidase Domain 33), *IL13*, *HTR2A*

(5-Hydroxytryptamine Receptor 2A), *NFKBIA* (NF-kappa-B inhibitor alpha) που συσχετίστηκαν με κακή απόκριση Prieto- Perez R et al., 2017). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* πιθανώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μιας καλής απόκρισης στην ουστεκινουμάμπη και μάλιστα ανεξαρτήτως της καταγωγής του ασθενή, μιας και έχει επιβεβαιωθεί από έρευνες σε πληθυσμιακές ομάδες διαφορετικών εθνοτήτων (Talamonti M et al., 2013, Chiu HY et al., 2012, Li K et al., 2016).

### 4.3. Αναστολείς IL-17

Η ιντερλευκίνη 17 είναι μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη που συμμετέχει στην ρύθμιση παραγωγής φλεγμονώδων μορίων, χημειοκινών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Αυξημένη συγκέντρωση της IL-17 παρατηρείται σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους συμπεριλαμβανομένης της ψωρίασης, της ψωριασικής αθρίτιδας και της πολλαπλής σκλήρυνσης (Bernardini et al., 2020).

Η σεκουκινουμάμπη και η ιξεκιζουμάμπη είναι μονοκλωνικά αντισώματα που αναστέλλουν την δράση της IL-17 παρέχοντας ταχεία και μεγάλης διάρκειας υποχώρηση των συμπτωμάτων. Έχουν διεξαχθεί μελέτες με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του αλληλομόρφου *HLA-Cw6* με την απόκριση των ασθενών στην σεκουκινουμάμπη αλλά δεν έχει υπάρξει θετικό αποτέλεσμα (Sabry et al., 2020, Galluzzo et al., 2018). Επίσης έχει διερευνηθεί η πιθανότητα συσχέτισης 5 SNPs στις UTRs του γονιδίου *IL-17* με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας χωρίς όμως να επιβεβαιωθεί η υπόθεση (Afra et al., 2019).

### 4.4. Αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4

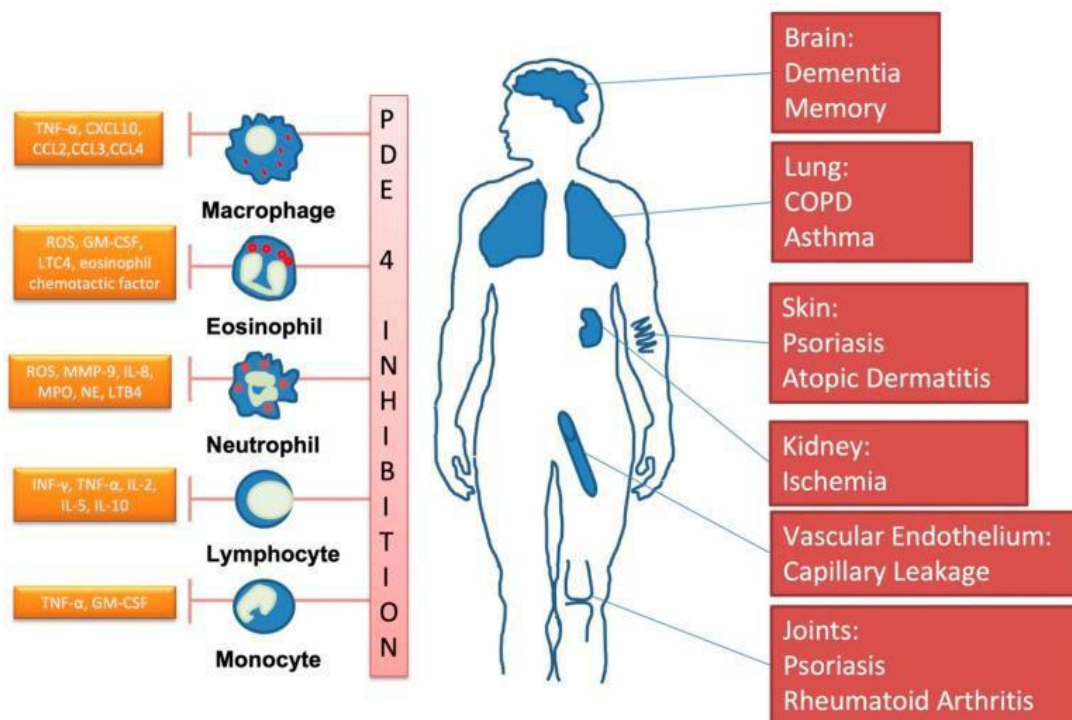
Οι φωσφοδιεστεράσες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP). Αυτά τα δύο μόρια συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν, μεταξύ άλλων, σε αναστολή και περιορισμό της φλεγμονώδους απόκρισης. Αναστολή της δράσης των φωσφοδιεστερασών οδηγεί στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των cAMP και cGMP με αποτέλεσμα τον περιορισμό της φλεγμονώδους απόκρισης και την διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος (Chiricozzi et al., 2016). Αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4, όπως η

απρεμιλάστη, ροφλουμιλάστη και κρισαβορόλη έχουν εγκριθεί και χορηγούνται για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων φλεγμονώδων νόσων και δερματοπαθειών.

## 5. Απρεμιλάστη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απρεμιλάστη ανήκει στην κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης καθώς δρα ως επιλεκτικός αναστολέας της PDE4.

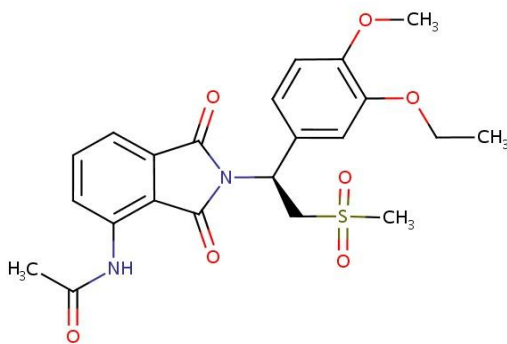
Η αναστολή της δράσης της PDE4 συσχετίστηκε με την καταστολή της υπερενεργοποίησης των ανοσολογικών αποκρίσεων, τόσο έμφυτων όσο και επίκτητων, καθώς και με την ρύθμιση της δράσης των δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων, ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων (Crilly et al., 2011). Έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Εικόνα 4) που χαρακτηρίζονται από την παρουσία φλεγμονής όπως στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD), στο άσθμα, στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, στην ατοπική δερματίτιδα και στην ψωρίαση.



Εικόνα 3. Κλινικές εφαρμογές αναστολής της φωσφοδιεστεράσης 4 (Schick et al, 2022).

Το 2014, ο Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων FDA ενέκρινε την απρεμιλάστη με το εμπορικό όνομα Otezla, για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης και της ψωριασικής αρθρίτιδας (Zerilli et al., 2015). Πρόκειται για μία ισο-ινδόλη με μοριακό τύπο  $C_{22}H_{24}N_2O_7S$  που δρα αναστέλλοντας την φωσφοδιεστεράση 4 (Εικόνα 3). Σε προκλινικές μελέτες φάνηκε να μειώνει σε σημαντικό βαθμό τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων της επιδερμίδας, την έκφραση των *TNF- $\alpha$* , *HLA-DR* και *ICAM-1* καθώς και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών (Schafer et al., 2014).

**Εικόνα 4.** Απεικόνιση μοριακής δομής της απρεμιλάστης (LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, 2017).



## 5.1. Φαρμακοκινητική απρεμιλάστης

Η απρεμιλάστη απορροφάται σε ικανοποιητικό βαθμό στο έντερο, δεν επηρεάζεται από την κατανάλωση τροφής και η βιοδιαθεσιμότητά της μετά από χορήγηση 20mg φτάνει στο 73% (Zerilli et al., 2015). Μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450, συγκεκριμένα από το ισοένζυμο CYP3A4, απομακρύνεται από τον οργανισμό με ρυθμό 10L/h και η φαρμακοκινητική της δεν επηρεάζεται από παράγοντες όπως ηλικία, φύλο, εθνικότητα και ηπατικές βλάβες.

Πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η αναστολή της PDE4 από την απρεμιλάστη επιτυγχάνεται σε όλους τους ιστούς και ίσως οδηγήσει σε ανεπιθύμητες παρενέργειες. Σε αυτές τις δυσμενείς επιδράσεις περιλαμβάνονται κυρίως ναυτία, εμετός, διάρροια και απώλεια βάρους και λιγότερο συχνά ρινοφαρυγγίτιδα και λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού (Gooderham et al., 2015). Επίσης η χορήγηση απρεμιλάστης σε εγκυμονούσες αντενδείκνυται με σκοπό την αποφυγή αποβολής ή άλλων επιπλοκών σχετικά με την εγκυμοσύνη.

Η απρεμιλάστη είναι μια πολλά υποσχόμενη ανακάλυψη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες ασθένειες που συμπεριλαμβάνουν διαταραχές των φλεγμονώδων αποκρίσεων. Το κόστος της αγωγής είναι χαμηλότερο από αυτό των βιολογικών παραγόντων, φαίνεται να επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μακροπρόθεσμα. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω έρευνα με σκοπό τον προσδιορισμό του θεραπευτικού δείκτη σε παιδιά και εφήβους με μέτρια προς σοβαρή ψωρίαση γιατί προς το παρόν έχει εγκριθεί μόνο για ενήλικες.

## 5.2. Φαρμακογενετική έρευνα συσχέτισης γονιδίων για την απρεμιλάστη

Το 2021 διεξήχθη η μοναδική μέχρι σήμερα φαρμακογενετική έρευνα συσχέτισης γενετικών πολυμορφισμών ατόμων που πάσχουν από ψωρίαση, με την απόκρισή τους σε θεραπεία με απρεμιλάστη (Verbenko et al., 2021).

Ωστόσο, λόγω της διάρκειας της θεραπείας, καθώς και την πιθανότητα της απουσίας ή μη ικανοποιητικής απόκρισης σε αυτή, υπάρχει ανάγκη για την δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης των πιθανών αποκρίσεων με στόχο την εξατομίκευση της θεραπείας.

Στην συγκεκριμένη έρευνα, συμμετείχαν 34 άτομα άνω των 18, ρωσικής καταγωγής, που πάσχουν από ήπια έως σοβαρή ψωρίαση, δηλαδή έχουν PASI > 10. Το PASI χρησιμοποιείται ως δείκτης της βαρύτητας των συμπτωμάτων της ψωρίασης και υπολογίζεται από το ποιος περιοχές στο σώμα του ασθενή παρατηρούνται ψωριασικές πλάκες, το ποσοστό κατά το οποίο καλύπτουν αυτές τις περιοχές και το πόσο έντονα είναι τα συμπτώματα (ερύθημα, διήθηση και απολέπιση). Επομένως, η σοβαρότητα της ασθένειάς τους, άρα και η δυνατότητά τους να συμμετέχουν στην έρευνα, κρίθηκε μετά από έλεγχο από δερματολόγο και υπολογισμό του PASI.

Οι συμμετέχοντες ακολούθησαν από του στόματος αγωγή με 30mg απρεμιλάστη, δύο φορές την ημέρα, για διάστημα 26 εβδομάδων και η αποτελεσματικότητα της αγωγής προσδιορίστηκε με υπολογισμό του ποσοστού delta PASI, δηλαδή την διαφορά στον δείκτη PASI πριν και μετά το τέλος της θεραπείας. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: 14 άτομα που είχαν ικανοποιητική απόκριση, με delta PASI >75%, και 20 άτομα με μέτρια έως ανεπαρκή απόκριση, με delta PASI <50%. Τα δείγματα DNA των συμμετεχόντων γονοτυπήθηκαν με το Illumina Infinium Global Screening Array-24 v2.0.

Οι ερευνητές αρχικά, χρησιμοποίησαν τα αποτελέσματα της γονοτύπησης για την εκτίμηση του πολυγονιδιακού κινδύνου (GRS), με βάση 38 πολυμορφισμών που έχουν βρεθεί ότι συσχετίζονται με την εμφάνιση ψωρίασης σε παλαιότερες έρευνες. Η στατιστική ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών που ακολούθησε μεταξύ των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα και 15.776 τυχαίων ατόμων ρωσικής καταγωγής που δεν πάσχουν, έδειξε ότι το GRS θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της προδιάθεσης των ατόμων για εμφάνιση ψωρίασης. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων SNPs μεταξύ των δύο ομάδων που χωρίστηκαν οι συμμετέχοντες, επομένως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της απόκρισης των ασθενών στην απρεμιλάστη. και ακολούθησε GWAS .. Κανένα SNP δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο γονιδιώματος αλλά εντοπίστηκαν 72 SNPs με μη διορθωμένες τιμές p values μικρότερες από  $10^{-5}$  τα οποία εντοπίζονται σε γειτονικά σημεία σε τέσσερις χρωμοσωματικές περιοχές του γονιδιώματος. Επιπλέον, οι συγγραφείς έλεγξαν τη συσχέτιση 78 προεπιλεγμένων SNPs που από προηγούμενες μελέτες είχαν βρεθεί ότι σχετίζονται με την ψωρίαση και την ψωριασική αρθρίτιδα. Τα συγκεκριμένα SNPs εντοπίζονται σε γενετικούς τόπους που περιλαμβάνουν γονίδια κυτοκινών, ενζύμων, φωσφοδιεστερασών και μορίων που συμμετέχουν στην μεταγωγή σήματος. Ταυτοποιήθηκαν τέσσερα SNPs στα γονίδια

IL-1β, IL-4, IL-23R, των TNF-α των οποίων το αλληλόμορφο με την μικρότερη συχνότητα

εμφάνισης συσχετίστηκε με καλή απόκριση στην αγωγή με απρεμιλάστη (PASI $\geq$ 75%) με στατιστική σημαντικότητα p value μεταξύ 0,03 έως 0,05.

## 6. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου *PDE4D* και της απόκρισης ασθενών σε αγωγή με απρεμιλάστη, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ψωρίασης. Η εργασία αυτή εντάσσεται σε ευρύτερη έρευνα φαρμακογενετικής μελέτης στην ψωρίαση με αναλύσεις συσχέτισης τόσο σε επίπεδο γονιδιώματος όσο και υποψήφιων γονιδίων. Ο σκοπός της ταυτοποίησης συγκεκριμένων SNPs του συγκεκριμένου γονιδίου, και σε ευρύτερο πλαίσιο του γονιδιώματος, είναι η εξατομίκευση της θεραπείας ώστε να χορηγείται η πιο κατάλληλη και αποτελεσματική αγωγή στους ασθενείς, μειώνοντας πρωτίστως την ταλαιπωρία τους αλλά και το κόστος της συνολικής θεραπείας.

# Υλικά και μέθοδοι

## Δείγματα ασθενών

Τα δείγματα αίματος προήλθαν από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας μετά από ενημέρωση και συναίνεση των ασθενών. Η έρευνα εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής & Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Έγινε λήψη φλεβικού αίματος από ασθενείς που έλαβαν αγωγή με απρεμιλάστη με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση DNA και να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου της PDE4D με την απόκριση στην συγκεκριμένη αγωγή.

## Υπολογισμός PASI και αξιολόγηση απόκρισης

Η αξιολόγηση της απόκρισης των ασθενών έγινε από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με υπολογισμό του ΔPASI, της διαφοράς στον δείκτη PASI πριν και μετά την αγωγή. Ο PASI (Psoriasis Area and Severity Index), χρησιμοποιείται ως δείκτης για εκτίμηση της βαρύτητας και σοβαρότητας των συμπτωμάτων της ασθένειας. Ο υπολογισμός του γίνεται με τον προσδιορισμό της έκτασης των ψωριασικών πλακών στο κεφάλι, στον κορμό, στα κάτω και άνω άκρα του ασθενούς. Αναλόγως την έκταση, δίνεται σε κάθε περιοχή ένας αριθμός που κυμαίνεται από το 0, που αντιστοιχεί σε πλήρη απουσία δερματικών βλαβών, έως το 6 που σημαίνει ότι το 90-100% της συγκεκριμένης περιοχής του σώματος καλύπτεται από ψωριασικές πλάκες. Έπειτα γίνεται αξιολόγηση του δέρματος στις πλάκες με βάση την απολέπιση, την διήθηση και το ερύθημα που παρουσιάζουν. Ανάλογα με το πόσο έντονα είναι αυτά τα συμπτώματα, δίνεται σε κάθε περιοχή του σώματος ακόμα ένας αριθμός από το 0 έως το 4. Το άθροισμα των αριθμών είναι ο δείκτης PASI και παίρνει τιμές από το 0 για πλήρη απουσία δερματικών βλαβών, έως το 72 για την μεγαλύτερη βαρύτητα και σοβαρότητα των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Για κάθε ασθενή έγινε υπολογισμός του δείκτη PASI, πριν και μετά την αγωγή με απρεμιλάστη, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (ιδανικά στους 3, 6, 9 και 12 μήνες) μετά την έναρξη της θεραπείας με απρεμιλάστη ώστε να προσδιοριστεί το ΔPASI. Βάσει αυτού, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: σε αυτούς με καλή απόκριση στην αγωγή με ΔPASI >75%, σε αυτούς με μέτρια απόκριση με ΔPASI 50-75% και τέλος σε αυτούς δεν παρουσίασαν απόκριση με ΔPASI <50%.



## Απομόνωση DNA

Τα δείγματα αίματος χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση DNA η οποία έγινε με την χρήση του Kit “PureLink Genomic DNA Mini Kit” της εταιρείας Invitrogen. Το Kit παρέχει τις κατάλληλες οδηγίες και υλικά για την απομόνωση.

Για την απομόνωση DNA από τα δείγματα αίματος, αρχικά τα δείγματα αφέθηκαν να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς διατηρούνταν στην κατάψυξη, και αναδεύτηκαν με χρήση vortex για να ομογενοποιηθούν. Έπειτα θερμάνθηκε υδατόλουτρο στους 55°C και μεταφέρθηκαν 200μl από τα δείγματα σε αποστειρωμένα σωληνάρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυγοκέντρηση. Στα σωληνάρια προστέθηκαν 20μl πρωτεϊνάσης K, ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται για την λύση ιστών και πρωτεϊνών που περιβάλλουν το DNA καθιστώντας το διαθέσιμο για επεξεργασία. Επίσης η πρωτεϊνάση K βρίσκεται σε ειδικό buffer υψηλής αλκαλικότητας που εξασφαλίζει την βέλτιστη ενζυμική δραστηριότητα, συμβάλλει στην αποδέσμευση του DNA και ταυτόχρονα παρεμποδίζει την δράση άλλων ενζύμων, όπως νουκλεασών, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβη ή να επηρεάσουν την ακεραιότητα των μορίων DNA.

Προστέθηκαν επίσης 20μl διαλύματος που περιείχε RNάση A. Κατά την διαδικασία εξαγωγής και απομόνωσης του DNA προκύπτουν μόρια RNA, καθώς έχει επέλθει λύση των κυττάρων και τα περιεχόμενα τους έχουν απελευθερωθεί στο διάλυμα, και μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος και την ακρίβεια μελλοντικών αναλύσεων. Η RNάση επομένως δρα διασπώντας του φωσφοδιεστερικούς δεσμούς εξειδικευμένα στα μόρια RNA εξασφαλίζοντας ότι το τελικό προϊόν θα είναι απαλλαγμένο από ριβονουκλεοτίδια και θα περιέχει αποκλειστικά DNA. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min και προσθήκη 200μl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει ένα μείγμα αλάτων και άλλων ουσιών που συμβάλλουν στην αποδέσμευση του DNA από τα κυτταρικά συστατικά που το περιβάλλουν παρέχοντας ταυτόχρονα αντιοξειδωτική προστασία που αποτρέπει την βλάβη των μορίων DNA κατά την διάρκεια επεξεργασίας του δείγματος.

Μετά λοιπόν την προσθήκη του PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, έγινε ανάδευση των διαλυμάτων με την χρήση vortex έως ότου ομογενοποιηθούν και επώαση τους στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55°C για 10 min.

Ακολούθησε προσθήκη 200μl αιθανόλης 96-100% και τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε στήλες PureLink Spin Column, οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε κατάλληλα σωληνάρια συλλογής που παρέχονται με το kit και φυγοκεντρήθηκαν για 1 min σε 10,000xg ώστε να δεσμευτεί το DNA στις στήλες. Οι συγκεκριμένες στήλες περιέχουν μια ρητίνη στην οποία δεσμεύεται το DNA, με την

βοήθεια του PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer, ώστε να γίνει δυνατή η απομάκρυνση των υπόλοιπων περιεχομένων των διαλυμάτων όπως πρωτεϊνών και μορίων RNA.

Μετά την φυγοκέντρηση τα σωληνάρια συλλογής και το περιεχόμενο διάλυμα απορρίφθηκαν και οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέα, ίδια σωληνάρια.

Εφόσον λοιπόν το DNA είχε δεσμευτεί στις στήλες ακολούθησε προσθήκη 500μL Wash Buffer στις στήλες και φυγοκέντρηση τους μέσα στα σωληνάρια συλλογής σε 10,000 × g για 1min. Το Wash Buffer περιέχει άλατα και ουσίες που συμβάλλουν στην απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων και ανεπιθύμητων ουσιών από την ρητίνη στην οποία έχει δεσμευτεί το DNA.

Τα σωληνάρια συλλογής με το περιεχόμενο διάλυμα απορρίφθηκαν και αντικαταστάθηκαν με νέα.

Έπειτα ακολούθησε προσθήκη 500μl Wash Buffer 2 το οποίο περιέχει αλκοόλες που επίσης συμβάλλουν στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών με σκοπό την μέγιστη καθαρότητα του τελικού προϊόντος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των στηλών μέσα στα νέα σωληνάρια συλλογής σε 12,000 × g για 3 min. Τα σωληνάρια συλλογής και το περιεχόμενο διάλυμα απορρίφθηκαν.

Τέλος για την έκλυση του DNA, οι στήλες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια και προστέθηκαν 100μL PureLink Genomic Elution Buffer. Το PureLink Genomic Elution Buffer είναι ένα αλκαλικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αποδέσμευση του DNA από την ρητίνη.

Μετά την προσθήκη του Elution Buffer, τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1min και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 1 min σε 12,000 × g. Μετά την φυγοκέντρηση στα σωληνάρια πλέον περιέχονταν απομονωμένο το γονιδιωματικό DNA των ασθενών. Το τελευταίο βήμα της έκλυσης DNA επαναλαμβάνονταν άλλη μια φορά με προσθήκη 25 ml PureLink Genomic Elution Buffer με σκοπό την συλλογή μεγαλύτερης ποσότητας DNA. Τα σωληνάρια αριθμήθηκαν και διατηρούταν στην κατάψυξη στους -20°C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα βήματα είχαν υποστεί κατάλληλη προετοιμασία εκ των προτέρων.

## Ηλεκτροφόρηση

Με σκοπό την αξιολόγηση της απομόνωσης του DNA από τα δείγματα αίματος και τον αδρό υπολογισμό της ποσότητας και της ποιότητας των μορίων πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης. Για την δημιουργία του πηκτώματος που χρησιμοποιήθηκε στις συγκεκριμένες ηλεκτροφορήσεις αναμείχθηκαν 0,5gr σκόνης αγαρόζης σε 50ml διαλύματος buffer TBE ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 1%. Το buffer TBE περιέχει τρία βασικά συστατικά: α) ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις (υδροξυ-μεθυλ) αμινομεθάνιο) με μοριακό τύπο  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$  το

οποίο χρησιμοποιείται για την διατήρηση του pH, β) βορικό οξύ που επίσης χρησιμοποιείται για την διατήρηση του pH αλλά και την αύξηση της αγωγιμότητας του τζελ και γ) EDTA, ένας χηλικός παράγοντας που εμπεριέχεται στο buffer με σκοπό την προστασία των μορίων DNA από αποικοδόμηση από νουκλεάσες.

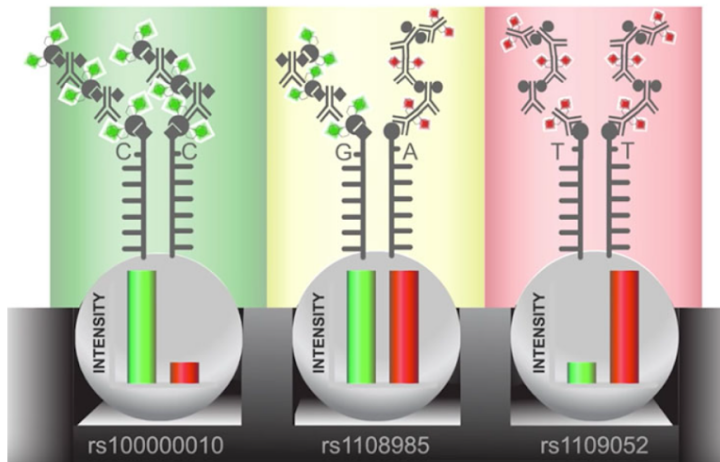
Έπειτα το διάλυμα με την αгарόζη θερμάνθηκε έως ότου γίνει διαυγές και προστέθηκαν 4μL χρωστικής Xpert Green που δεσμεύεται στα μόρια DNA παράγοντας φθορισμό. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στερεοποιηθεί. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε 1μL από το κάθε δείγμα απομονωμένου DNA στις κατάλληλες υποδοχές του στερεού πλέον πηκτώματος αгарόζης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των γονιδιωματικών DNA για περίπου 20-30 min και παρατηρήθηκαν σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

## Γονοτύπηση

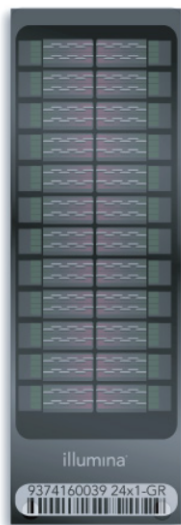
Η γονοτύπηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Human Genomics Facility (HuGe-F) που στεγάζεται στο Laboratory for Population Genomics του Τμήματος Ιατρικής του Erasmus MC στο Ρότερνταμ της Ολλανδίας.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται bead-based microarray και βασίζεται στην υβριδοποίηση μορίων DNA με ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές (probes) για εκατοντάδες χιλιάδες πολυμορφισμούς που έχουν προκύψει από πληθυσμιακές μελέτες και βάσεις δεδομένων γονιδιωμάτων.

Οι ανιχνευτές βρίσκονται υβριδοποιημένοι σε μικρά σφαιρίδια από διοξείδιο του πυριτίου (silica), τοποθετημένα σε ειδικούς υποδοχείς (wells) στην επιφάνεια ειδικών chip (εικόνα5). Είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να υβριδοποιούνται με το γονιδιωματικό DNA που τοποθετείται στους υποδοχείς ακριβώς μια θέση ανοδικά από την θέση που βρίσκεται ο υπό μελέτη πολυμορφισμός. Μετά την υβριδοποίηση του γονιδιωματικού DNA στους ανιχνευτές, ακολουθεί η αντίδραση πολυμερισμού κατά την οποία το μονοκλώνο τμήμα DNA μήκους ενός μόνο νουκλεοτιδίου, επιμηκύνεται με όμοια νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται σε αυτό το βήμα εκπέμπουν σήμα μετά από διεγερση με laser. Το χρώμα και η ένταση του σήματος που εκπέμπεται υποδεικνύουν το είδος του νουκλεοτιδίου που έχει υβριδοποιηθεί και την ύπαρξη ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας.



**Εικόνα 5.** Οι ανιχνευτές βρίσκονται τοποθετημένοι σε μικρά σφαιρίδια και το DNA προσδένεται σε αυτούς. Κατά το στάδιο του πολυμερισμού, προσδένονται νουκλεοτίδια και εκπέμπουν σήμα, πράσινο ή κόκκινο, που αντιστοιχεί στο κάθε αλληλόμορφο. Η ένταση του χρώματος του σήματος υποδεικνύει την ύπαρξη ομοζυγωτίας ή ετεροζυγωτίας. (Ιστοσελίδα Illumina, <https://www.illumina.com/science/technology/microarray.html>)



**Εικόνα 6.** Το chip της εταιρίας Illumina, Infinium Global Screening Array-24 Kit, (Ιστοσελίδα Illumina, <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-global-screening.html>)

Για την συγκεκριμένη γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκε το chip της Illumina, Infinium™ Global Screening Array-24 v3.0 MD BeadChip (Εικόνα 6). Περιλαμβάνει υποδοχές για 96 δείγματα και διαθέτει ανιχνευτές για 756.412 πολυμορφισμούς που βρίσκονται σε όλο το γονιδίωμα. Τα δείγματα για την συγκεκριμένη μελέτη φαρμακογενετικής για την απρεμιλάστη ήταν 58 επομένως αποστάλθηκαν στο ερευνητικό κέντρο που πραγματοποίησε την γονοτύπηση μαζί με δείγματα από μια άλλη έρευνα που διεξάγεται στο Εργαστήριο ώστε να συμπληρωθεί το chip. Για κάθε δείγμα στάλθηκαν συνολικά 200ng γονιδιωματικού DNA σε συγκέντρωση 50ng/μl.

## Ανάλυση αποτελεσμάτων γονοτύπησης

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την γονοτύπηση των δειγμάτων και την ακόλουθη ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προήλθαν από την έκδοση GRCh.p13 της γονιδιωματικής βάσης δεδομένων Ensembl.

### Call Rate

Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης, κατά το στάδιο της προκαταρκτικής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του call rate για τα άτομα από τα οποία προήλθαν τα δείγματα DNA και του call rate για τα SNPs για τα οποία γονοτυπήθηκαν.

Ο ορισμός call rate για τα άτομα χρησιμοποιείται για να περιγράψει ποιο ποσοστό από τα SNPs για τα οποία γίνεται γονοτύπηση, έχουν επιτυχές αποτέλεσμα. Στην συγκεκριμένη μελέτη, ως αποδεκτό όριο καθιερώθηκε το >99% call rate για κάθε άτομο. Δηλαδή στο γονιδίωμα κάθε ατόμου που συμμετείχε στην έρευνα θα έπρεπε να εντοπιστεί τουλάχιστον το 99% από τα συνολικά SNPs ώστε να μπορεί να ληφθεί υπόψη στις αναλύσεις που ακολούθησαν. Αντίστοιχα, ο ορισμός call rate για τα SNPs, περιγράφει σε ποιο ποσοστό των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα γονοτυπήθηκε ένα συγκεκριμένο SNP. Εδώ επίσης ορίστηκε ώστε κατώτατο όριο το 99%. Δηλαδή κάθε SNP θα έπρεπε να εντοπιστεί/γονοτυπηθεί στο 99% των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα ώστε να χρησιμοποιηθεί στις επόμενες αναλύσεις.

### Εντοπισμός μονομορφικών SNPs

Έπειτα έγινε έλεγχος για το ποια από τα SNPs που γονοτυπήθηκαν είναι μονομορφικά, δηλαδή έχει εντοπιστεί μόνο ένα αλληλόμορφο τους. Ο σκοπός ήταν να παραληφθούν από την έρευνα καθώς δεν παρέχουν κάποια πληροφορία και να χρησιμοποιηθούν μόνο τα SNPs για τα οποία έχει εντοπιστεί πάνω από ένα αλληλόμορφο, δηλαδή τα πολυμορφικά SNPs.

## MAF (Minor Allele Frequency)

Ο όρος Minor Allele Frequency αντιστοιχεί στην συχνότητα εμφάνισης του πιο σπάνιου αλληλομόρφου ενός SNP σε έναν πληθυσμό. Στην παρούσα μελέτη ορίστηκε ως όριο το MAF να είναι <5%, δηλαδή το πιο σπάνιο αλληλόμορφο του κάθε πολυμορφικού SNP δεν θα έπρεπε να γονοτυπηθεί σε πάνω από το 5% των συμμετεχόντων.

## Ισορροπία Hardy-Weinberg

Έγινε έλεγχος για το αν οι παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ώστε στην συνέχεια να χρησιμοποιηθούν οι αντίστοιχες εξισώσεις για τον υπολογισμό των αναμενόμενων γονοτυπικών συχνοτήτων στον γενικό πληθυσμό.

## Pruning

Ακολούθησε η διαδικασία Pruning. Κατά την οποία υπολογίζεται το κατά πόσο τα SNPs υπό μελέτη βρίσκονται σε LD (Linkage Disequilibrium, ανισορροπία σύνδεσης). Σε περίπτωση που παρατηρούταν ότι υπήρχε πολύ καλή ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ κάποιων SNPs, τότε αυτά αποκλείονται. Ως όριο για την συγκεκριμένη ανάλυση τέθηκε το  $r^2 > 0,7$  το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των SNPs καθώς ποσοτικοποιεί την απόκλιση από την ανεξαρτησία. Μπορεί να πάρει τιμές από 0, που αντιστοιχεί σε πλήρη ανεξαρτησία άρα την απουσία ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των SNPs, έως και 1, που αντίστοιχα σημαίνει ότι τα SNPs βρίσκονται όντως σε ανισορροπία σύνδεσης.

## Ανάλυση συσχέτισης

Ακολούθησε ανάλυση των γονιδιωμάτων με την μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία  $\chi^2$ , με βαθμό ελευθερίας 1 ώστε να βρεθεί αν η παρατηρούμενη συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων αλληλομόρφων των πολυμορφικών SNPs στις ομάδες R, PR και NR έχει στατιστική σημαντικότητα με τιμή p value <0,05.

Έπειτα ακολούθησε περαιτέρω κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση το ΔPASI, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της εξέλιξης ασθένειας με βάση την βαρύτητα των συμπτωμάτων. Τα άτομα λοιπόν που είχαν ΔPASI >75% , που σημαίνει ότι είχαν καλή απόκριση στην θεραπεία με απρεμιλάστη, αποτέλεσαν την ομάδα R (Responders). Τα άτομα που εμφάνισαν μέτρια απόκριση, με ΔPASI <75% και >50%, αποτέλεσαν την ομάδα PR (Partial Responders). Τέλος, τα άτομα που δεν εμφάνισαν καλή απόκριση και είχαν ΔPASI <75% αποτέλεσαν την ομάδα NR (Non Responders).

## Αποτελέσματα - Συζήτηση

### Απομόνωση και έλεγχος γονιδιωματικού DNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από 33 δείγματα αίματος ασθενών που πάσχουν από ψωρίαση και έλαβαν αγωγή με απρεμιλάστη. Χρησιμοποιήθηκε 1μl από το κάθε δείγμα DNA για να γίνει ηλεκτροφόρησή τους παράλληλα με άλλα δείγματα DNA, από τα οποία χρησιμοποιήθηκε επίσης 1μl, και είχαν απομονωθεί παλαιότερα στο πλαίσιο άλλων εργασιών (Εικόνα 7). Έπειτα έγινε συγκριτική αξιολόγηση της ποιότητας και της ποσότητας των μορίων DNA με βάση τις ζώνες των DNA από τις ηλεκτροφορήσεις και τα αποτελέσματα από την φωτομέτρηση των δειγμάτων. Για όσα δείγματα η εικόνα της ηλεκτροφόρησης δεν ήταν σε συμφωνία με την τιμή συγκέντρωσης του DNA βάσει της φωτομέτρησης, έγινε επαναληπτική φωτομέτρηση και/ή ηλεκτροφόρηση.

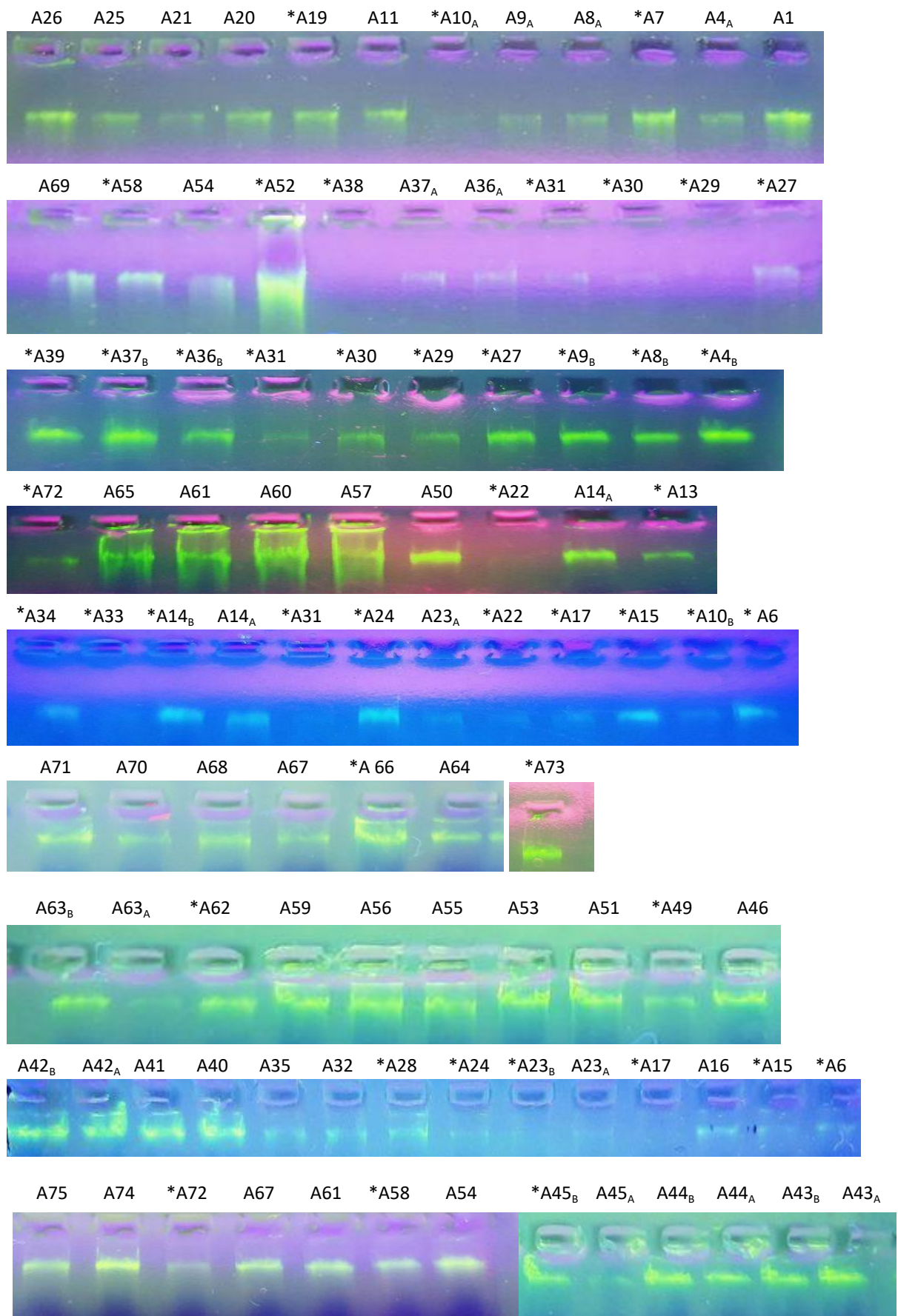
Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με το αν η ποσότητα του DNA ήταν ικανοποιητική και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την γονοτύπηση για την οποία απαιτούνταν 4μl DNA σε συγκέντρωση 50ng/μl (Πίνακας 2).

Στην περίπτωση που κάποιο δείγμα ήταν πολύ αραιό αλλά ο όγκος του διαλύματος ήταν αρκετά

μεγάλος, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση με τη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA. Δηλαδή εάν υπήρχε ένα διάλυμα όγκου 100μl και συγκέντρωσης 10ng/μl, μετά την έκλουσή του προκύπτει συμπυκνωμένο διάλυμα DNA όγκου 20μl αλλά με την αρχική ποσότητα DNA, δηλαδή κατά προσέγγιση 1000ng, επομένως είχε την επιθυμητή συγκέντρωση των 50ng/μl. Ωστόσο στην περίπτωση όπου ο όγκος του αρχικού διαλύματος δεν ήταν αρκετός ώστε να γίνει έκλυση και να συμπυκνωθεί, πραγματοποιήθηκε θέρμανση του διαλύματος με σκοπό να εξατμιστεί H<sub>2</sub>O και να φτάσει το διάλυμα στην επιθυμητή συγκέντρωση.

Με αυτό τον τρόπο συλλέχθηκαν 58 δείγματα DNA ασθενών (Πίνακας 3) με την κατάλληλη συγκέντρωση τα οποία αποστάλθηκαν για γονοτύπηση στο Human Genomics Facility (HuGe-F).





**Εικόνα 7.** Φωτογραφίες από τις ηλεκτροφορήσεις των δειγμάτων DNA. Το γράμμα “Α” μπροστά από τον αριθμό που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα υποδεικνύει ότι ο ασθενής έλαβε αγωγή με απρεμιλάστη. Οι δείκτες Α και Β στα δείγματα υποδεικνύουν ότι πραγματοποιήθηκαν δύο απομονώσεις DNA από το δείγμα αίματος των ασθενών. Το σύμβολο \* σε κάποια δείγματα σημαίνει ότι έγινε απομόνωση στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η επαναληπτική απομόνωση έγινε γιατί χρειαζόταν βελτιστοποίηση της ποσότητας και ποιότητας του δείγματος.

**Πίνακας 2.** Κατηγοριοποίηση δειγμάτων σύμφωνα με την συγκέντρωση του DNA.

Πολύ μεγάλη συγκέντρωση DNA (>50ng/μl)	<b>A40, A41, A42<sub>A</sub>, A42<sub>B</sub>, A52, A57, A60, A61, A65</b>
Ικανοποιητική/ επαρκής συγκέντρωση DNA (~50ng/μl)	<b>A1, A4<sub>B</sub>, A7, A8<sub>B</sub>, A9<sub>B</sub>, A14<sub>B</sub>, A24, A26, A27, A37<sub>B</sub>, A39, A43<sub>A</sub>, A43<sub>B</sub>, A44<sub>A</sub>, A44<sub>B</sub>, A45<sub>B</sub>, A46, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A58, A59, A66, A67, A69, A73, A74, A75</b>
Μέτρια συγκέντρωση DNA (<50ng/μl)	<b>A4<sub>A</sub>, A6, A8<sub>A</sub>, A9<sub>A</sub>, A11, A13, A14<sub>A</sub>, A15, A19, A20, A25, A29, A30, A34, A36<sub>B</sub>, A42<sub>A</sub>, A62, A63<sub>B</sub>, A64, A68, A71, A72</b>
Πολύ μικρή/ανεπαρκής συγκέντρωση DNA (<<50ng/μl)	<b>A10<sub>A</sub>, A10<sub>B</sub>, A15, A16, A17, A21, A22, A23<sub>A</sub>, A23<sub>B</sub>, A24, A28, A31, A32, A33, A35, A36<sub>A</sub>, A37<sub>A</sub>, A38, A45<sub>A</sub>, A49, A63<sub>A</sub>, A70,</b>

\* Τα δείγματα που αποστάλθηκαν για γονοτύπηση φαίνονται με έντονα γράμματα.

**Πίνακας 3.** Λίστα δειγμάτων που αποστάλθηκαν για γονοτύπηση κατηγοριοποιημένα με βάση την απόκριση του κάθε ασθενούς στην αγωγή με απρεμιλάστη (R= Responders, PR= Partial Responders, NR= Non Responders). Στην 2η και την 3η στήλη αναγράφονται οι κωδικοί και οι θέσεις των δειγμάτων, αντίστοιχα, στο plate.

Εσωτερικός κωδικός	Κωδικός στο plate	Θέση στο plate	Φαινότυπος
Apr 1= 25 COS	A1	A:1	R
Apr 7	A7	D:1	R
Apr 10	A10	F:1	R
Apr 24	A24	F:2	R
Apr 28 = 11 COS	A28C11	A:3	R
Apr 29 = COS 40	A29C40	B:3	R
Apr 39	A39	A:4	R
Apr 42	A42	D:4	R
Apr 43	A43	E:4	R
Apr 45	A45	G:4	R
Apr 46	A46	H:4	R
Apr 49 = COS 12	A49	A:5	R
Apr 55	A55	G:5	R
Apr 56	A56	H:5	R
Apr 58	A58	B:6	R
Apr 60	A60	D:6	R
Apr 61	A61	E:6	R

Apr 64	A64	H:6	R
Apr 66	A66C73	B:7	R
Apr 70	A70	F:7	R
Apr 73	A73	H:7	R
Apr 74	A74	A:8	R
Apr 9	A9	E:1	PR
Apr 14	A14	A:2	PR
Apr 15	A15	B:2	PR
Apr 19= 23 COS	A19C23	C:2	PR
Apr 20	A20	D:2	PR
Apr 21 = COS 47	A21C47	E:2	PR
Apr 25 = 43 COS	A25C43	G:2	PR
Apr 30	A30	C:3	PR
3 COS=Apr 38	A38C3	H:3	PR
Apr 44	A44	F:4	PR
Apr 51=COS 18	A51C18	C:5	PR
Apr 53=COS 35	A53C35	E:5	PR
Apr 54	A54	F:5	PR
Apr 57	A57	A:6	PR
Apr 62	A62C55	F:6	PR
Apr 67	A67	C:7	PR
Apr 68	A68	D:7	PR
Apr 69	A69	E:7	PR
Apr 41	A41	C:4	NR
Apr 50=COS 51	A50C51	B:5	NR
Apr 4	A4	B:1	NR
Apr 6	A6C76	C:1	NR
Apr 11 = COS 42	A11C42	G:1	NR
Apr 13	A13C77	H:1	NR
Apr 27	A27	H:2	NR
Apr 32 = 2 COS	A32C2	D:3	NR
Apr 35 = 21 COS	A35C21	E:3	NR
Apr 36	A36	F:3	NR
Apr 37	A37C75	G:3	NR
Apr 40	A40	B:4	NR
Apr 52	A52C56	D:5	NR
Apr 59	A59	C:6	NR
Apr 63	A63C65	G:6	NR
Apr 71	A71	G:7	NR
Apr 75	A75C78	B:8	NR

Ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων και το φιλτράρισμα τους με βάση συγκεκριμένα κριτήρια. Επειδή πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης κατηγοριοποιώντας τους ασθενείς με δύο τρόπους, δηλαδή i) αποκριθέντες με  $\Delta\text{PASI}>75\%$  ως προς μη αποκριθέντες με  $\Delta\text{PASI}<75\%$  και ii) αποκριθέντες με  $\Delta\text{PASI}>75\%$  ως προς μη αποκριθέντες με  $\Delta\text{PASI}<50\%$ , το φιλτράρισμα έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τον αριθμό των SNPs που απομακρύνθηκαν. Τα βήματα φιλτράρισματος και τα αντίστοιχα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα: (Πίνακας4)

## **Εντοπισμός μονομορφικών SNPs και SNPs με συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου (minor allele frequency, MAF) μικρότερη από 5%**

Παρατηρήθηκε ότι 91.737 από τα 756.412 SNPs ήταν μονομορφικά ενώ τα υπόλοιπα ήταν πολυμορφικά, έχουν δηλαδή εντοπιστεί διαφορετικά αλληλόμορφα.

Έπειτα ελέγχθηκε το MAF των πολυμορφικών SNPs και βρέθηκε ότι το πιο σπάνιο αλληλόμορφο από 324.478 SNPs έχει γονοτυπηθεί σε λιγότερο από το 5% των χρωμοσωμάτων όταν αυτοί είναι χωρισμένοι σε τρεις φαινοτυπικές κατηγορίες (responders, partial responders, non-responders).

Αντίστοιχα, με το σύστημα κατηγοριοποίησης των συμμετεχόντων σε δύο κατηγορίες βρέθηκε ότι το πιο σπάνιο αλληλόμορφο από 345.8731 SNPs έχει εντοπιστεί σε λιγότερο από 5% των χρωμοσωμάτων.

## **Call rate**

Με όριο call rate  $>99\%$  για τα άτομα βρέθηκε ότι σε 57 από τα 58 άτομα που συμμετείχαν στην έρευνα έχει γονοτυπηθεί το 99% από τα συνολικά SNPs και γι αυτό απομακρύνθηκε το ένα δείγμα.

Όσον αφορά το call rate για τα SNPs, με όριο  $>99\%$ , και αντιμετωπίζοντας τους συμμετέχοντες ως τρεις ομάδες: R (Responders), PR (Partial Responders) και NR (Non Responders), βρέθηκε ότι 311.624 SNPs γονοτυπηθηκαν και στους 57 πλέον συμμετέχοντες. Αντίστοιχα, κατηγοριοποιώντας τους συμμετέχοντες σε δύο ομάδες, R και NR, βρέθηκε ότι 327.325 SNPs έχουν call rate  $>99\%$ .

## Ισορροπία Hardy-Weinberg

Ο έλεγχος για το ποια SNPs υπακούουν στο νόμο Hardy-Weinberg ως προς τις γονοτυπικές συχνότητες ώστε να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση συσχέτισης έδειξε ότι 305.368 SNPs πληρούν αυτό το κριτήριο, εφαρμόζοντας την κατηγοριοποίηση των συμμετεχόντων με τις τρεις ομάδες. Αντίστοιχα, κατηγοριοποιώντας τους συμμετέχοντες σε δύο ομάδες, βρέθηκαν 317.138 SNPs να υπακούν στο νόμο Hardy-Weinberg.

## Διαδικασία Pruning

Κατά αυτή την διαδικασία, αποκλείστηκαν SNPs στα οποία παρατηρήθηκε ανισορροπία σύνδεσης με τιμή  $r^2 > 0,7$ . Από αυτή την ανάλυση βρέθηκε ότι 227.068 SNPs δεν βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης όταν γίνεται η σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων των R (Responders), PR (Partial Responders) και NR (Non Responders). Επίσης, όταν οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (Responders και Non Responders) τότε παρατηρήθηκε ότι 234.499 SNPs δεν βρίσκονταν σε ανισορροπία σύνδεσης άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις επόμενες αναλύσεις.

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα φιλτραρίσματος των SNPs και των ατόμων. Αναγράφονται πόσα SNPs βρέθηκαν να πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις μετά από κάθε ανάλυση δεδομένων.

	SNPs που παραμένουν μετά το φιλτράρισμα	
	R vs PR+NR	R vs NR
MAF < 5%	324.478	345.871
Call rate > 99%	311.624	327.225
HWE p value < 0.05	305.368	317.138
Pruning	227.068	234.499

## Αποτελέσματα συσχέτισης

Μετά από τον αποκλεισμό των SNPs που δεν πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις, έγινε ανάλυση συσχέτισης ώστε να βρεθούν ποια από τα εναπομείναντα υποψήφια SNPs πιθανώς σχετίζονται με την απόκριση των ασθενών στην απρεμιλάστη.

Η συγκεκριμένη μελέτη εστιάζει στο γονίδιο *PDE4D* και πώς διαφορετικά αλληλόμορφα των SNPs συσχετίζονται με την απόκριση των ασθενών στην απρεμιλάστη. Επομένως επιλέχθηκαν SNPs τα οποία εντοπίζονται εντός του γονιδίου καθώς και SNPs που βρίσκονται 1Mb ανοδικά και 1Mb καθοδικά του γονιδίου με την λογική ότι μπορεί να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης

του *PDE4D*. Σύμφωνα με την έκδοση GRCh37.p13 της γονιδιωματικής βάσης δεδομένων Ensembl, το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5, στην θέση 58,264,865-59,817,947 bp και μεταγράφεται από το Reverse Strand. Στην επιλεγμένη περιοχή (57,264,865-60,817,947) βρέθηκαν 17 SNPs τα οποία συσχετίστηκαν με την απόκριση στην απρεμιλάστη με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p$  value <0,05 (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Τα SNPs με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόκριση στην απρεμιλάστη

Αλληλομορφικές συχνότητες								
SNP	A1	A2	TEST	R (>75%)	PR+NR (<75%)	P	Εντοπισμός	Χαρακτηρισμός
rs11960699	C	A	ALLELIC	34/36	13/31	0.04453	Chr. 5:57309750	intergenic variant
rs11741819	C	T	ALLELIC	22/48	5/39	0.01416	Chr. 5:57309999	regulatory_region_variant (enhancer)
rs72753331	A	G	ALLELIC	13/57	2/42	0.03103	Chr. 5:57340652	intergenic variant
rs11742503	G	A	ALLELIC	10/60	13/31	0.0481	Chr. 5:57530181	intergenic variant
rs1562242	T	C	ALLELIC	28/42	26/18	0.04688	Chr. 5:57566494	intergenic variant
rs1995166	T	C	ALLELIC	39/31	14/30	0.01276	Chr. 5:58333097	intron variant, NMD_transcript_variant
rs2279737	G	A	ALLELIC	17/53	20/24	0.01877	Chr. 5:58334645	intron variant, NMD_transcript_variant
GSA-rs12153416	T	C	ALLELIC	6/64	0/44	0.04602	Chr. 5:58443848	intron variant, NMD_transcript_variant

				R (>75%)	NR (<50%)			
rs11741819	C	T	ALLELIC	11/23	5/39	0.02282	Chr. 5:57309999	regulatory_region_variant (enhancer)
rs72753331	A	G	ALLELIC	7/27	2/42	0.02787	Chr. 5:57340652	intergenic variant
rs11742503	G	A	ALLELIC	3/31	13/31	0.02461	Chr. 5:57530181	intergenic variant
rs10044159	G	T	ALLELIC	8/26	3/41	0.03549		intergenic variant
rs27188	G	A	ALLELIC	13/21	8/36	0.04771	Chr. 5:58525425	intron variant, NMD_transcript_variant
GSA-rs78103527	C	T	ALLELIC	4/30	0/44	0.0195	Chr. 5:58676988	eQTL & στο PDE4D
rs697076	A	G	ALLELIC	12/22	7/37	0.04795	Chr. 5:58851811	eQTL & στο PDE4D
rs295943	T	C	ALLELIC	6/28	1/43	0.01848	Chr. 5:58886873	eQTL & στο PDE4D
GSA-rs16890078	C	T	ALLELIC	0/34	6/38	0.02502	Chr. 5:58957322	eQTL & στο PDE4D

Στον Πίνακα 5, στο πάνω μέρος παρέχονται πληροφορίες κατηγοριοποιώντας τους συμμετέχοντες ανάλογα με το αν έχουν ΔPASI μεγαλύτερο ή μικρότερο του 75% ενώ στο κάτω μέρος οι ασθενείς διακρίνονται σε αυτούς με ΔPASI>75% και ΔPASI<50%.

Στην 1η στήλη του πίνακα βρίσκονται τα ονόματα των SNPs που συσχετίζονται με την απόκριση των ασθενών στην αγωγή με απρεμιλάστη. Στις στήλες 2 και 3 αναγράφονται τα δύο αλληλόμορφα του κάθε SNP, στην τέταρτη ότι πραγματοποιήθηκε έλεγχος αλληλομορφικών συχνοτήτων, στην 5η και 6η ο λόγος του αριθμού των δύο αλληλομόρφων στα άτομα που ανήκουν στην ομάδα R και ο λόγος του του αριθμού των δύο αλληλομόρφων στους Partial Responders και Non Responders.

Ακολούθως, στις δύο επόμενες στήλες φαίνονται οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας  $p$ -value του κάθε SNP, για τα αλληλόμορφα και η θέση του κάθε SNP στο χρωμόσωμα 5. Τέλος, στην τελευταία στήλη φαίνεται ο χαρακτηρισμός των SNPs, δηλαδή αν εντοπίζονται εντός ή εκτός του γονιδίου *PDE4D*, ποια αλληλόμορφα υπόκεινται σε NMD (Nonsense Mediated Decay) βάσει πληροφορίες από την βάση δεδομένων the Sequence Ontology (όλες οι περιπτώσεις αφορούν το μετάγραφο ENST00000309641.10 ) και ποια αλληλόμορφα έχουν χαρακτηρησθεί ως eQTL(expression quantitative trait locus) , δηλαδή ποια αλληλόμορφα SNP έχουν συσχετιστεί με τον βαθμό έκφρασης του γονιδίου *PDE4D*.

Επίσης τα SNPs που είναι χρωματισμένα με γκρι συσχετίστηκαν με  $p\text{-value} < 0,05$  ανεξαρτήτως το σύστημα κατηγοριοποίησης των ασθενών.

## **Βιβλιογραφία**

1. Abhishek S, Palamadai Krishnan S. Epidermal Differentiation Complex: A Review on Its Epigenetic Regulation and Potential Drug Targets. *Cell J.* 2016;18(1):1-6. doi:10.22074/cellj.2016.3980
2. Afra, T.P.; Razmi, T.M.; Dogra, S. Apremilast in Psoriasis and Beyond: Big Hopes on a Small Molecule. *Indian Dermatol. Online J.* 2019, 10, 1–12.
3. Almutawa F, Alnomair N, Wang Y, Hamzavi I, Lim HW. Systematic review of UV-based therapy for psoriasis. *Am J Clin Dermatol.* 2013;14(2):87-109. doi:10.1007/s40257-013-0015-y.
4. Antonatos C, Patsatsi A, Zafiriou E, et al. Protein network and pathway analysis in a pharmacogenetic study of cyclosporine treatment response in Greek patients with psoriasis. *Pharmacogenomics J.* 2023;23(1):8-13. doi:10.1038/s41397-022-00291-7
5. Balak D. M. (2015). Fumaric acid esters in the management of psoriasis. *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*, 5, 9–23. <https://doi.org/10.2147/PTT.S51490>
6. Berki DM, Liu L, Choon SE, et al. Activating CARD14 Mutations Are Associated with Generalized Pustular Psoriasis but Rarely Account for Familial Recurrence in Psoriasis Vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2015;135(12):2964-2970. doi:10.1038/jid.2015.288
7. Bernardini, N.; Skroza, N.; Tolino, E.; Mambrin, A.; Anzalone, A.; Balduzzi, V.; Colapietra, D.; Marchesiello, A.; Michelini, S.; Proietti, I.; et al. IL-17 and its role in inflammatory, autoimmune, and oncological skin diseases: State of art. *Int. J. Dermatol.* 2020, 59, 406–411.
8. Campalani E, Arenas M, Marinaki AM, Lewis CM, Barker JNWN, Smith CH. Polymorphisms in folate, pyrimidine, and purine metabolism are associated with efficacy and toxicity of methotrexate in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1860–7
9. Capon F. The Genetic Basis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2526. Published 2017 Nov 25. doi:10.3390/ijms18122526
10. Capon F, Munro M., Barker J., Trembath R. Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J. Investig. Dermatol.* 2002;118:745–751. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01749.
11. Chiricozzi, A.; Caposiena, D.; Garofalo, V.; Cannizzaro, M.V.; Chimenti, S.; Saraceno, R. A new therapeutic for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: Apremilast. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2016, 12, 237–249
12. Chiu HY, Huang P-Y, Jee S-H, Hu C-Y, Chou C-T, Chang Y-T, et al. HLA polymorphism among Chinese patients with chronic plaque psoriasis: subgroup analysis: HLA polymorphism among Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166:288–97
13. Crilly A., Robertson S. E., Reilly J. H., Gracie J. A., Lai W. Q., Leung B. P., et al.. (2011). Phosphodiesterase 4 (PDE4) regulation of proinflammatory cytokine and chemokine release from rheumatoid synovial membrane. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1130–1137.
14. De Cid R., Riveira-Munoz E., Zeeuwen P.L., Robarge J., Liao W., Dannhauser E.N., Giardina E., Stuart P.E., Nair R., Helms C., et al. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet.* 2009;41:211–215. doi:10.1038/ng.313
15. Gallo E, Cabaleiro T, Roma n M, Solano-Lo pez G, Abad-Santos F, Garcı a-Dı ez A, et al. The relationship between tumour necrosis factor (TNF)-a promoter and IL12B / IL-23R genes polymorphisms and the efficacy of anti-TNF-a therapy in psoriasis: a case-control study. *Br J Dermatol.* 2013;169:819–29
16. Galluzzo, M.; D'Adamio, S.; Campione, E.; Bianchi, L.; Talamonti, M. Treating a Multidrug-Resistant Psoriatic HLA-C\*18:01 Allele Carrier with Combination Ustekinumab Apremilast Therapy. *Mol. Diagn. Ther.* 2018, 22, 717–721
17. Gooderham M., Papp K. (2015). Selective phosphodiesterase inhibitors for psoriasis: focus on apremilast. *BioDrugs* 29, 327–339. doi:10.1007/s40259-015-0144-3
18. Huang, YW., Tsai, TF. HLA-Cw1 and Psoriasis. *Am J Clin Dermatol* 22, 339–347 (2021).
19. Indhumathi S, Rajappa M, Chandrashekar L, Ananthanarayanan PH, Thappa DM, Negi VS. Pharmacogenetic markers to predict the clinical response to methotrexate in south Indian Tamil patients with psoriasis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017;73(8):965-971. doi:10.1007/s00228-017-2255-x



20. International Psoriasis Genetics Consortium The International Psoriasis Genetics Study: Assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;73:430–437.
21. Jonca N., Leclerc E.A., Caubet C., Simon M., Guerrin M., Serre G. Corneodesmosomes and corneodesmosin: From the stratum corneum cohesion to the pathophysiology of genodermatoses. *Eur. J. Dermatol.* 2011;21(Suppl. S2):35–42
22. Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64 Suppl 2(Suppl 2):ii30-ii36. doi:10.1136/ard.2004.031120
23. Linares-Pineda TM, Canadaš-Garre M, Sanchez-Pozo A, Calleja-Hernández MA. Gene polymorphisms as predictors of response to biological therapies in psoriasis patients. *Pharmacol Res.* 2016;113:71–80
24. Li K, Huang CC, Randazzo B, Li S, Szapary P, Curran M, et al. HLA-C\*06:02 allele and response to IL-12/23 Inhibition: results from the ustekinumab phase 3 psoriasis program. *J Invest Dermatol.* 2016;136:2364–71
25. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Apremilast. [Updated 2017 Jul 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547974/>
26. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-255. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120225
27. 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 A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes *Am. J. Hum. Genet.*, 80 (2) (2007), pp. 273-290
28. Mason A, Mason J, Cork M, Hancock H, Dooley G. Topical treatments for chronic plaque psoriasis: an abridged Cochrane systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(5):799-807 doi:10.1016/j.jaad.2013.06.027
29. Masouri S, Stefanaki I, Ntritsos G, Kypreou KP, Drakaki E, Evangelou E, et al. A pharmacogenetic study of psoriasis risk variants in a greek population and prediction of responses to anti-TNF-a and anti-IL-12/23 agents. *Mol Diagn Ther.* 2016;20:221–5
30. Maurice D. H., Ke H., Ahmad F., Wang Y., Chung J., Manganiello V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 290–314. 10.1038/nrd4228
31. Murdaca G, Gulli R, Spano` F, Lantieri F, Burlando M, Parodi A, et al. TNF-a gene polymorphisms: association with disease susceptibility and response to anti-TNF-a treatment in psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2503–9
32. Nair R.P., Stuart P.E., Nistor I., Hiremagalore R., Chia N.V., Jenisch S., Weichenthal M., Abecasis G.R., Lim H.W., Christophers E., et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;78:827–851. doi: 10.1086/503821.
33. Ovejero-Benito, M.C., Muñoz-Aceituno, E., Reolid, A. et al. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis. *Am J Clin Dermatol* 19, 209–222 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0322-9>
34. Prieto-Pe rez R, Llamas-Velasco M, Cabaleiro T, Solano-Lo pez G, Ma rquez B, Roma n M, et al. Pharmacogenetics of ustekinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis. *Pharmacogenomics.* 2017;18:157–64
35. Prieto-Pe rez R, Solano-Lo pez G, Cabaleiro T, Roma n M, Ochoa D, Talego n M, et al. The polymorphism rs763780 in the IL-17F gene is associated with response to biological drugs in patients with psoriasis. *Pharmacogenomics.* 2015;16:1723–31
36. Ryan C, Kelleher J, Fagan MF, Rogers S, Collins P, Barker JNWN, et al. Genetic markers of treatment response to tumour necrosis factor-a inhibitors in the treatment of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39:519–24

37. Sabry, D.; Aboraia, N.; Samir, M. A potential association between psoriasis to rs4819554 of IL-17RA gene polymorphism in psoriasis Egyptian patients. *Arch. Dermatol. Res.* 2020, 312, 273–281
38. Singh S, Armstrong AW. Oral small molecules for psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2018;37(3):163-166. doi:10.12788/j.sder.2018.046
39. Schafer PH, Parton A, Gandhi AK, et al. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis. *Br J Pharmacol.* 2010;159(4):842-855. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00559.x Schafer PH, Parton A, Capone L, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal.* 2014;26(9):2016-2029. doi:10.1016/j.cellsig.2014.05.014
40. Schick MA, Schlegel N. Clinical Implication of Phosphodiesterase-4-Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1209. Published 2022 Jan 21. doi:10.3390/ijms23031209
41. Sivamani RK, Correa G, Ono Y, Bowen MP, Raychaudhuri SP, Maverakis E. Biological therapy of psoriasis. *Indian J Dermatol.* 2010;55(2):161-170. doi:10.4103/0019-5154.62754
42. Talamonti M, Botti E, Galluzzo M, Teoli M, Spallone G, Bavetta M, et al. Pharmacogenetics of psoriasis: HLA-Cw6 but not LCE3B/3C deletion nor TNFAIP3 polymorphism predisposes to clinical response to interleukin 12/23 blocker ustekinumab. *Br J Dermatol.* 2013;169:458–63
43. Tsoi LC, Stuart PE, Tian C, et al. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nat Commun.* 2017;8:15382. Published 2017 May 24 doi:10.1038/ncomms15382
44. Vasilopoulos V, Manolika M, Zafiriou E, Sarafidou T, Sotiriadis D, Bagiatis V, et al. Pharmacogenetic analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B gene polymorphisms and prediction of response to anti-TNF therapy in psoriasis patients in the Greek population. *Mol Diagn Ther.* 2012;16:29–34.
45. Verbenko DA, Karamova AE, Artamonova OG, et al. Apremilast Pharmacogenomics in Russian Patients with Moderate-to-Severe and Severe Psoriasis. *J Pers Med.* 2020;11(1):20. Published 2020 Dec 29. doi:10.3390/jpm11010020
46. Warren RB, Smith RL, Campalani E, Eyre S, Smith CH, Barker JNWN, et al. Genetic variation in efflux transporters influences outcome to methotrexate therapy in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2008;128:1925–9.
47. Zerilli T, Ocheretyaner E. Apremilast (Otezla): A New Oral Treatment for Adults With Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *P T.* 2015;40(8):495-500
48. Zervou MI, Goulielmos GN, Castro-Giner F, Tosca AD, Krueger-Krasagakis S. STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol.* 2009;70(9):738-741. doi:10.1016/j.humimm.2009.05.008
49. Zhou, X., Chen, Y., Cui, L. et al. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis* 13, 81 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04523-3>