

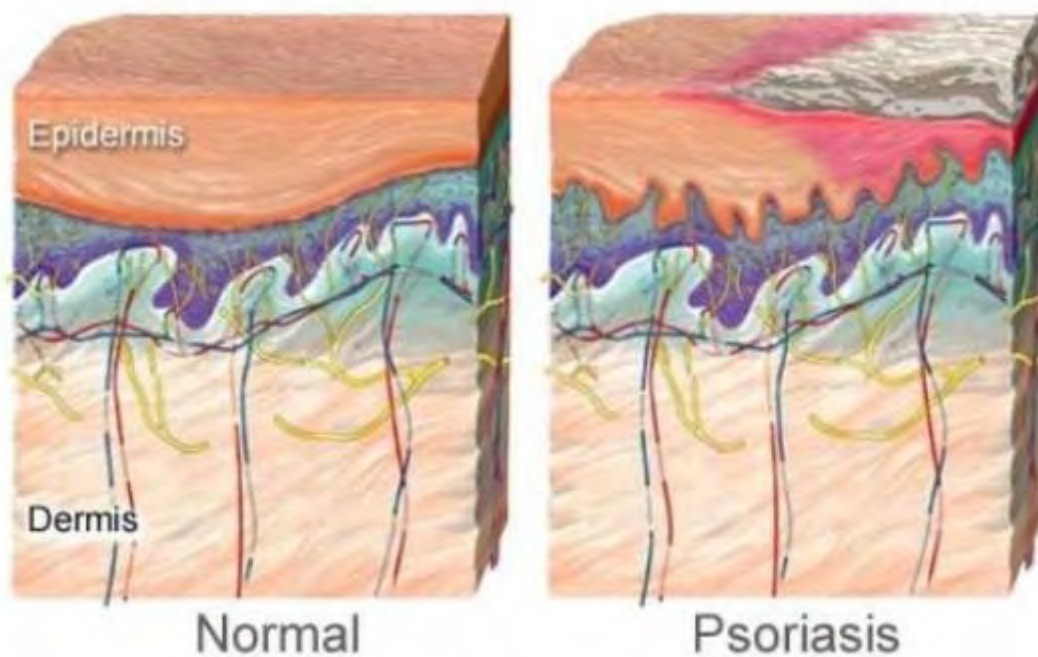


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Ανάλυση συσχέτισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *HIF-1α* με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό

Κωνσταντίνα Αντωνίου



Λάρισα 2014

Ανάλυση συσχέτισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *HIF-1α* με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό

Association analysis of polymorphisms in the *HIF-1α* gene with psoriasis in the Greek population

Μέλη τριμελούς επιτροπής

Θεολογία Σαραφίδου, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αγγελική Ρουσσάκη-Σούλτσε, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τομέας Παθολογίας, Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη κα Σαραφίδου Θεολογία, που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για το χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη για τη συνεχή βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ Μαμούρη Ζήση, για τη συνεργασία του καθώς και την κα Ρουσσάκη-Σούλτσε Αγγελική, για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή και την παραχώρηση των δειγμάτων των ασθενών. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για τη βοήθειά τους κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Σαρρή Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθειά της, τις χρήσιμες συμβουλές της και την υπομονή της.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Summary.....	7
1.Εισαγωγή.....	8
1.1Ψωρίαση.....	8
1.1.1 Επιδημιολογία της νόσου.....	8
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	9
1.1.3 Ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία.....	9
1.1.4 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης.....	13
1.1.5 Ιστολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης.....	14
1.1.6 Κληρονομησιμότητα της ψωρίασης.....	16
1.1.7 Γενετική της ψωρίασης.....	20
1.2 Ανοσοπαθοφυσιολογία της ψωρίασης.....	26
1.2.1 Αγγειογένεση.....	27
1.2.2 Ο παράγοντας VEGF.....	29
1.2.3 Ο παράγοντας HIF.....	30
1.2.4 Δομή της πρωτεΐνης HIF-1.....	31
1.2.5 Έκφραση του HIF-1α σε ασθενείς με ψωρίαση και σε μη προσβεβλημένα άτομα.....	32
1.3 Πολυμορφισμοί του HIF-1α.....	36
1.4 Σκοπός.....	37
2. Υλικά και μέθοδοι.....	38
2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα.....	38
2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	40
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	41
2.4 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	44
2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	45
2.6 Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining).....	47

2.7 Στατιστική ανάλυση	47
3. Αποτελέσματα.....	49
3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.....	49
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών....	49
3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου HIF-1α με PCR.....	50
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP.....	50
3.5 Έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg.....	52
4. Συζήτηση	53
Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. Είναι μια ασθένεια που επηρεάζει το 1-3% του πληθυσμού σε παγκόσμιο επίπεδο. Διαφοροποιείται ανάλογα με την μορφολογία και τα σημεία εμφάνισής της. Οι παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση είναι γενετικοί και περιβαλλοντικοί. Η αγγειογένεση εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου και επάγεται κυρίως από τον παράγοντα HIF-1α ο οποίος κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ασθένειας. Παλαιότερες και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση του HIF-1α σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ψωριασικούς ασθενείς.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο έλεγχος της γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμών του γονιδίου *HIF-1α* στην εμφάνιση της ψωρίασης στον ελληνικό πληθυσμό. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκαν 66 ασθενείς με ψωρίαση και 51 μη προσβεβλημένα άτομα ως προς τον πολυμορφισμό S28Y του γονιδίου *HIF-1α*. Η γονοτυπική ανάλυση των ατόμων πραγματοποιήθηκε σε DNA που απομονώθηκε από το περιφερικό τους αίμα με την μέθοδο PCR-RFLP.

Από τη γονοτυπική ανάλυση φαίνεται πως υπάρχει ανισορροπία Hardy-Weinberg στο γενικό πληθυσμό και έτσι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό S28Y. Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να αξιοποιηθεί για περαιτέρω ανάλυση.

Summary

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, characterized by excessive growth and aberrant differentiation of keratinocytes. It affects 1-3% of the population, and it causes significant morbidity. Psoriasis is classified in different types based on the location and appearance of the lesions. Psoriasis is influenced by genetic and environmental factors. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of the disease and recently, the delineation of molecular mechanisms of angiogenesis has revealed a critical role for HIF-1. Previous studies have shown an over expression of HIF-1 α at the mRNA and protein level in patients with psoriasis.

The purpose of the current thesis is to test the association of common polymorphisms of the *HIF-1 α* gene, with psoriasis in the Greek population. In this study 66 patients with psoriasis and 51 healthy volunteers have been genotyped for the polymorphism S28Y of the *HIF-1 α* gene. The genotyping analysis has been performed through the PCR-RFLP method.

The genotypic analysis shows that there is no Hardy-Weinberg Equilibrium in the general population and thus statistical analysis of polymorphism S28Y can not be performed. This result can't be used for further analysis.

1.Εισαγωγή

1.1 Ψωρίαση

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, αυτοάνοση, μη μεταδοτική φλεγμονώδης δερματοπάθεια που προκαλείται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας (κύτταρα που σχηματίζουν την κεράτινη στοιβάδα η οποία προστατεύει το δέρμα), φλεγμονή της επιδερμίδας και αγγειογένεση. Η ασθένεια μπορεί να εμφανιστεί σε συνδυασμό με άλλες φλεγμονώδεις νόσους όπως η νόσος του Crohn και σε συνδυασμό με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (**Human Immunodeficiency Virus**) (Bhalerao J. & Bowcock Anne M, 1998).

1.1.1 Επιδημιολογία της νόσου

Η ψωρίαση προσβάλλει περίπου το 1-3% του πληθυσμού παγκοσμίως. Επομένως περίπου 80-120 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως πάσχουν από ψωρίαση και περίπου 200.000 ασθενείς στην Ελλάδα. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ποικίλει σημαντικά. Στην Ευρώπη, η συχνότητα στο γενικό πληθυσμό ποικίλλει από 0,6 έως 6,5% ενώ στις ΗΠΑ φτάνει περίπου το 3,15%. Ωστόσο η συχνότητα εμφάνισης είναι χαμηλή σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες όπως οι Ιάπωνες, ενώ πολύ σπάνια εμφανίζεται στους Αυστραλούς και τους Ινδιάνους της Ν. Αμερικής (Nickoloff & Nestle, 2004, Bowcock & Bhalerao, 1998, Ferrandiz et al, 2002). Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη στις ΗΠΑ, έδειξε αυξητική τάση κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών (Vinod C. et al, 2010).

Η ψωρίαση μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία και προσβάλλει άνδρες και γυναίκες με την ίδια συχνότητα. Συνήθως εμφανίζεται μεταξύ των ηλικιών 15-30 με μέση ηλικία έναρξης τα 27. Όσο μικρότερη είναι η ηλικία έναρξης τόσο βαρύτερη είναι η πρόγνωση (Vinod C et al, 2010).

Βάσει της κλινικής εμφάνισης της ψωρίασης και την ηλικία έναρξης, η ψωρίαση διακρίνεται σε δύο τύπους, τον τύπο I και II. Ο τύπος I, που είναι ο συχνότερος (75% των περιπτώσεων) εμφανίζεται σε εφήβους και ενήλικες ηλικίας 16-22 ετών ενώ ο τύπος II εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας 50-60 ετών (Vinod C et al, 2010). Επιπλέον, υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA-Cw6 σε ασθενείς με πρώιμη έναρξη, σε σύγκριση με την μεταγενέστερη έναρξη της ψωρίασης (Marcus et al, 1993, Farber & Nall, 1992).

1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μία φλεγμονώδης δερματοπάθεια με μεταβλητή μορφολογία, κατανομή, σοβαρότητα και αιτία. Οι βλάβες της ψωρίασης είναι χαρακτηριστικές. Αρχίζουν ως ερυθρές, ερυθρηματολεπιδώδεις βλατίδες, δηλαδή φλεγμονώδεις βλάβες διαμέτρου μικρότερης των 5mm, οι οποίες αυξάνονται προοδευτικά σε μέγεθος και συρρέουν σε πλάκες διαφόρου σχήματος και μεγέθους. Οι ψωριασικές πλάκες καλύπτονται από λέπια και μερικές φορές περιβάλλονται από λευκωπό δακτύλιο, γνωστό ως δαχτυλίδι του Woronoff. Στις παρατριμματικές περιοχές, οι ψωριασικές βλάβες εμφανίζονται ως λείες, ερυθρές, υγρώσσοι πλάκες, χωρίς λέπια. Η ψωρίαση είναι δυνατό να εμφανισθεί σε θέσεις φυσικού τραυματισμού (ξεσμός, ηλιακό έγκαυμα, χειρουργική τομή) και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο Koebner ή ισομορφικό. Αν και η ψωρίαση είναι δυνατό να προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα του δέρματος, έχει εκλεκτική εντόπιση στους αγκώνες, γόνατα, τριχωτό κεφαλής, γλουτιαία πτυχή, όνυχες των χεριών και των ποδιών (Griffiths et al, 2007).

1.1.3 Ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια και ποικίλλει, από την εμφάνιση λίγων εντοπισμένων βλαβών μέχρι την εκδήλωση εκτεταμένης και γενικευμένης νόσου.

Το ευρύ κλινικό φάσμα της ψωρίασης υποταξινομείται στις παρακάτω κλινικές μορφές: κοινή ή κατά πλάκας ψωρίαση, σταγονοειδής, ερυθροδερμική, φλυκταινώδης και η ψωρίαση ειδικής εντόπισης ή ειδικών θέσεων.

- **Κοινή ή κατά πλάκας ψωρίαση**

Αυτή η μορφή ψωρίασης αποτελεί τη συνηθέστερη και αφορά περίπου το 90% των περιπτώσεων. Η βλάβη της κοινή ή κατά πλάκας ψωρίαση αναγνωρίζεται κλινικώς από τρία βασικά χαρακτηριστικά: (α) εμφανίζει έντονη ερυθρότητα, (β) η επιδερμίδα καλύπτεται από παχιά αργυρόχρα λέπια που οφείλονται στην ανώμαλη κερατινοποίηση και (γ) αποτελεί μία σαφώς επηρμένη πλάκα λόγω της υπερπλασίας της επιδερμίδας. Το μέγεθος της βλάβης ποικίλλει από λίγα χιλιοστά μέχρι μερικά εκατοστά (1mm-30 cm), ενώ το σχήμα της είναι συνήθως κυκλικό, ωοειδές ή ακανόνιστο. Μικρές πλάκες μπορούν να συνενώνονται και να σχηματίζουν μεγαλύτερες βλάβες. Αν και το εξάνθημα μπορεί να εντοπίζεται σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, η συνηθέστερη εντόπιση της ψωρίασης αφορά τις επιφάνειες των αγκώνων (Εικόνα 1), των γονάτων, το τριχωτό της κεφαλής και τον κορμό (Griffiths et al, 2007).



Εικόνα 1: Ψωρίαση κοινή ή κατά πλάκας (Roberson & Bowcock, 2010)

- Σταγονοειδής ψωρίαση

Αυτή η μορφή ψωρίασης αποτελεί τη δεύτερη συνηθέστερη μορφή και αφορά περίπου το 18% των περιπτώσεων. Εμφανίζεται αιφνίδια στα παιδιά και στα νέα άτομα, συνήθως μετά από στρεπτοκοκκική λοίμωξη. Χαρακτηρίζεται από μικρές σταγονοειδείς βλατίδες ή πλάκες 0,3-1,3 cm εντοπιζόμενες στην επιφάνεια του σώματος (Εικόνα 2). Πιο συχνά προσβάλλεται ο κορμός και σπανιότερα οι παλάμες και τα πέλματα. Οι βλάβες συνήθως υποχωρούν μέσα σε 2-3 μήνες και σπάνια μεταπίπτουν στη χρόνια κοινή ψωρίαση (Barker et al, 1991).



Εικόνα 2: Σταγονοειδής ψωρίαση (Roberson & Bowcock, 2010)

- Φλυκταινώδης ψωρίαση

Αυτή η μορφή ψωρίασης πλήττει περίπου το 10% των ασθενών. Χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φλυκταίνων (επάρματα του δέρματος με πύον) και οφείλεται στη συνάθροιση πολυμορφοπύρηνων στην επιδερμίδα. Οι φλύκταινες περιέχουν άσηπτο πυώδες υγρό το οποίο με την πάροδο του χρόνου (7-10 ημέρες) αποξηραίνεται, δημιουργώντας μία κιτρινωπή ή καφετί βλατίδα. Οι παλάμες των χεριών, τα πέλματα των ποδιών (Εικόνα 3), τα δάχτυλα και τα νύχια είναι τα σημεία που προσβάλλονται περισσότερο. Μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως επιπλοκή της κοινής ψωρίασης λόγω

ακατάλληλης θεραπευτικής αγωγής ή απότομης διακοπής κορτικοστεροειδών που χορηγήθηκαν για άλλη συνυπάρχουσα νόσο (Langley et al, 2005).



Εικόνα 3: Φλυκταινώδης ψωρίαση (Griffiths et al, 2007)

- Ερυθροδερμική ψωρίαση

Η ερυθροδερμική ψωρίαση ή ψωριασική ερυθροδερμία αποτελεί μια σοβαρή μορφή της ψωριασικής νόσου που χαρακτηρίζεται συνήθως από καθολική φλεγμονή και ερυθρότητα του δέρματος. Η προσβολή μπορεί να είναι καθολική ή μερική, αφήνοντας νησίδες μη προσβεβλημένου δέρματος (Εικόνα 4). Το εξάνθημα εμφανίζει ένα βαθύ ερυθρό χρώμα με ποικίλου βαθμού απολέπιση. Η διάχυτη δερματική φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε παροδική αλωπεκία ή σοβαρές διαταραχές ανάπτυξης των ονύχων. Μπορεί να αποτελεί την ακραία μορφή επιδείνωσης μιας προϋπάρχουσας χρόνιας κοινής ή φλυκταινώδους ψωρίασης. Εμφανίζεται συνήθως σε νέα ή μέσης ηλικίας άτομα, αλλά μπορεί να εκδηλωθεί σε κάθε ηλικία. Εκλυτικοί παράγοντες θεωρούνται η απότομη διακοπή τοπικών ή συστημικών κορτικοειδών, παρατεταμένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, αντίδραση σε φάρμακο, λοιμώξεις κλπ (Green et al, 1996).



Εικόνα 4: Ερυθροδερμική ψωρίαση (Green et al, 1996)

- Ψωρίαση ειδικής εντόπισης ή ειδικών θέσεων

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης παρουσιάζει ιδιομορφίες όταν η νόσος εντοπίζεται σε ειδικές θέσεις όπως στο τριχωτό της κεφαλής, το πρόσωπο, τις πτυχές, τους βλεννογόνους ή τους όνυχες. Η προσβολή του τριχωτού της κεφαλής είναι συχνή και εκδηλώνεται με τη μορφή ερυθματολεπιδωδών πλακών στην ινιακή χώρα και πίσω από τα αυτιά. Η ανάστροφη ψωρίαση ή ψωρίαση πτυχών προσβάλλει τις πτυχές του σώματος (όπως η μασχαλιαία περιοχή, η βουβωνική χώρα, η περιοχή κάτω από τους μαστούς, η περιοχή των γεννητικών οργάνων και η γλουτιαία περιοχή) (Εικόνα 5). Η συνεχής τριβή μεταξύ των πτυχών του δέρματος προκαλεί βλάβες έντονου ερυθρού χρώματος. Οι βλάβες αυτές μπορεί να προκαλούν κνησμό, πόνο και να είναι λεπιδώδεις ή όχι. Οι ψωριασικές βλάβες στο πρόσωπο είναι σπάνιες, πιθανώς λόγω της συνεχούς έκθεσης στην ηλιακή και ειδικότερα στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η προσβολή του στοματικού βλεννογόνου είναι απάνια και εμφανίζεται κυρίως στη φλυκταινώδη και ερυθροδερμική μορφή της νόσου. Η προσβολή του γεννητικού βλεννογόνου μπορεί να συμβεί μεμονωμένα ή στα πλαίσια μιας γενικότερης προσβολής του δέρματος. Οι μορφολογικές αλλοιώσεις των ονύχων στην ψωρίαση ποικίλουν ανάλογα με την χρονιότητα της κατάστασης και το τμήμα του όνυχος που προσβάλλεται (Εικόνα 6) (Gelfand et al, 2007).



Εικόνα 5: Ανάστροφη ψωρίαση
(Roberson & Bowcock, 2010)



Εικόνα 6: Ψωρίαση ονύχων
(Roberson & Bowcock, 2010)

- Ψωριασική αρθρίτιδα

Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος η οποία προσβάλλει τις αρθρώσεις των άνω και κάτω άκρων. Μπορεί να προκαλέσει οίδημα στις αρθρώσεις και να δημιουργήσει λεπιδώδεις πλάκες στο δέρμα. Διακρίνεται σε πέντε τύπους: (α) περιφερική μονοαρθρίτιδα ή ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα, (β) άπω μεσοφαλαγγική αρθρίτιδα, (γ) συμμετρική πολυαρθρίτιδα, (δ) ακρωτηριασική-παραμορφωτική αρθρίτιδα και (ε) σπονδυλίτιδα. Η προσβολή των οστών και των αρθρώσεων παρατηρείται σε ποσοστό 7-10% των ψωριασικών ασθενών (Εικόνα 7). Τυπικά κλινικά

ευρήματα της νόσου είναι οίδημα, ερυθρότητα, άλγος και περιορισμός της κινητικότητας των αρθρώσεων (Langley et al, 2005).



Εικόνα 7: Ψωριασική αρθρίτιδα (Langley et al, 2005)

1.1.4 Θεραπευτική προσέγγιση της ψωρίασης

Δεν υπάρχει ολοκληρωτική θεραπεία για την ψωρίαση. Υπάρχουν όμως αποτελεσματικές θεραπείες που στοχεύουν στο να καταπολεμήσουν ή να περιορίσουν τις βλάβες. Οι θεραπείες επιλέγονται ανάλογα με την εντόπιση, τη βαρύτητα, την διάρκεια της νόσου και την ηλικία του ασθενούς. Η θεραπεία της ψωρίασης μπορεί να είναι τοπική, συστηματική ή συνδυασμός τοπικής και συστηματικής θεραπείας. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν βιολογικοί παράγοντες ή θεραπεία με έκθεση των ασθενών σε υπεριώδη ακτινοβολία, UVB.

- **Τοπικά σκευάσματα** τα οποία μπορεί να περιέχουν: κορτιζόνη, συνθετική βιταμίνη D, παράγωγα της βιταμίνης A. Χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με το φυσικό φως του ήλιου ή την υπεριώδη ακτινοβολία, και επιβραδύνουν το γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιδερμίδας (Yeo et al, 2004, Heidenreich et al, 2009).
- **Παραδοσιακές συστηματικές θεραπείες:** κυκλοσπορίνη (ανοσοκατασταλτικός παράγοντας που δρα στα T λεμφοκύτταρα), μεθοτρεξάτη (έχει κυτταροστατικό μηχανισμό δράσης), ρετινοειδή (παράγωγο της βιταμίνης A) (Yeo et al, 2004 & Heidenreich et al, 2009)
- **Βιολογικοί παράγοντες** είναι πρωτεΐνες που διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: τα αντισώματα, τις πρωτεΐνες σύντηξης και τις ανασυνδυασμένες κυτταροκίνες. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, έχουν σαν στόχο είτε T κύτταρα, είτε κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην παθογένεση της ψωρίασης. Η δράση του TNF-α αποτελεί το

θεραπευτικό στόχο για τρεις βιολογικούς παράγοντες, το infliximad, το etanercept και το adalimumab (Yeo et al, 2004, Heidenreich et al, 2009).

- **Φωτοθεραπεία** είναι θεραπεία με λυχνίες υπεριώδους ακτινοβολίας ή ηλιακή ακτιβολία (φωτοθεραπεία UVB ή φωτοχημειοθεραπεία) Το ηλιακό φως και η υπεριώδης ακτινοβολία επιβραδύνουν το γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιδερμίδας. Αν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν ρυτίδες, οφθαλμικές βλάβες ή ακόμα και καρκίνο του δέρματος, θεωρούνται ασφαλείς θεραπείες όταν γίνονται με την επίβλεψη του ειδικού (Piskin et al, 2003, Mrowlerz et al, 2011).

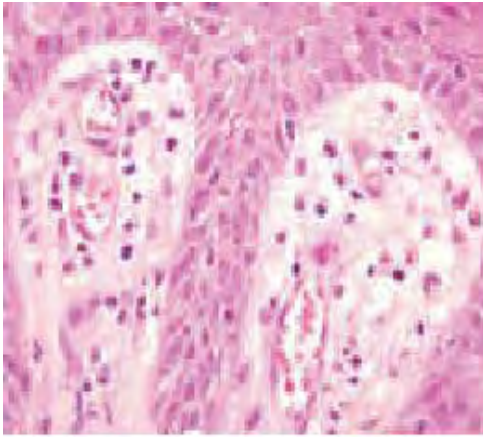
1.1.5 Ιστολογικά χαρακτηριστικά της ψωρίασης

Η ιστολογική εικόνα μιας τυπικής ψωριασικής δερματικής βλάβης χαρακτηρίζεται από αλλοιώσεις τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο.

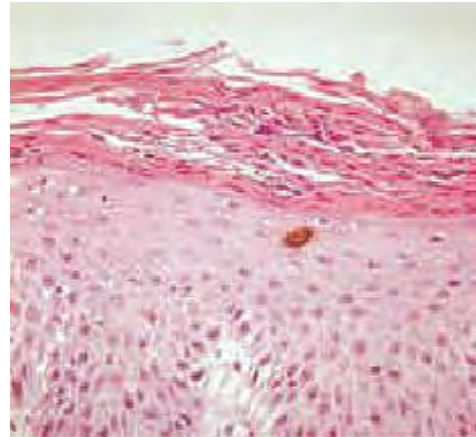
Το αρχικό στάδιο αποτελείται από την επιμήκυνση και τη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων του θηλώδους του δέρματος, σε συνδυασμό με οίδημα και λεμφοκυτταρική διήθηση. Τα αγγεία διαστέλονται με αποτέλεσμα τα λεμφοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα να εμφανίζονται στην επιδερμίδα (Εικόνα 8) (Krueger et al, 2005).

Έπειτα, παρατηρείται πάχυνση της επιδερμίδας, απώλεια της κοκκώδους κυτταρικής στοιβάδας και σχηματισμό παρακερατικών λεπιών. Τα κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν με γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα η τελική διαφοροποίηση να είναι ατελής. Έτσι οι πυρήνες των κερατινοκυττάρων διατηρούνται άθικτοι και απελευθερώνουν εξωκυττάρια λιπίδια. Η προκύπτουσα κεράτινη στοιβάδα οδηγεί στα χαρακτηριστικά λέπια της ψωρίασης. Η παρακεράτωση συμβάλλει στην απώλεια της κοκκώδους στοιβάδας. Τα φλεγμονώδη κύτταρα μεταναστεύουν μέσω της επιδερμίδας με αποτέλεσμα συσσώρευση των ουδετερόφιλων και τη δημιουργία των μικροαποστημάτων Monro (Εικόνα 9) (Krueger et al, 2005).

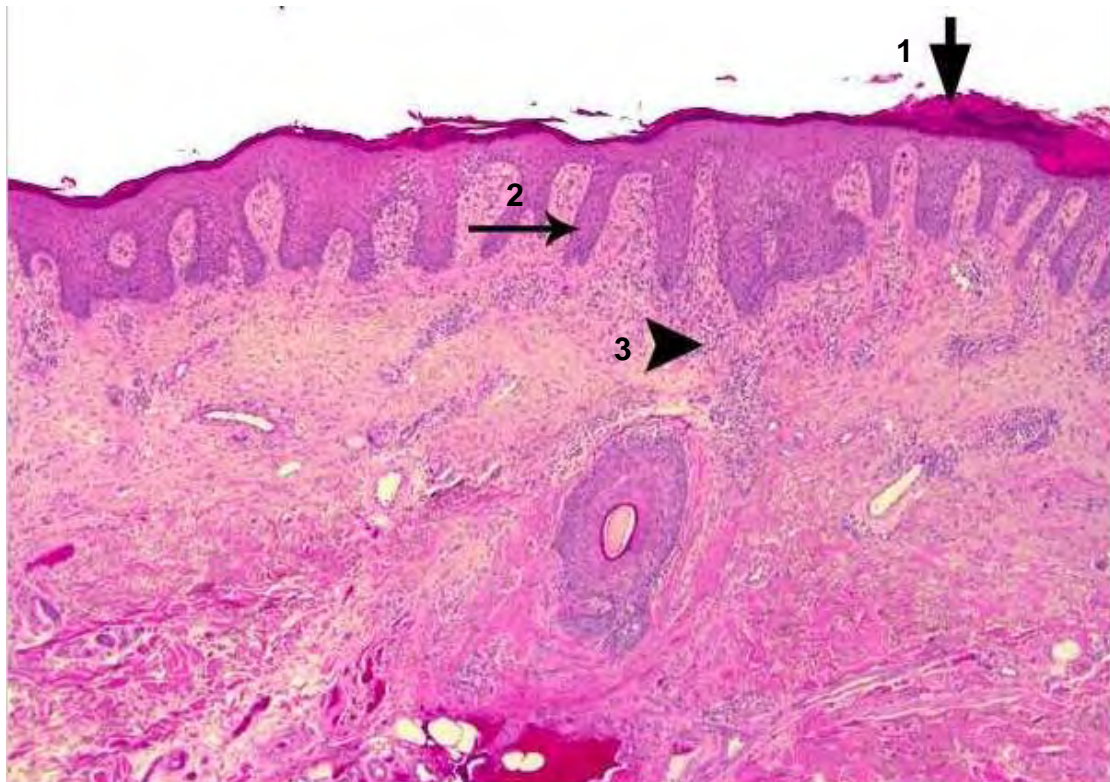
Το επόμενο στάδιο χαρακτηρίζεται από πάχυνση του ακανθώδους στρώματος και από επιδερμική ψωριασομορφική υπερπλασία με επιμήκυνση των κορυφογραμμών και λέπτυνση των υπερθηλοειδών πλακών (Εικόνα 10) (Krueger et al, 2005).



Εικόνα 8: Αγγειακή διαστολή με ελαφρύ οίδημα και λεμφοκυτταρική διήθηση (Krueger et al, 2005).



Εικόνα 9: Μικροαπόστημα Mongro (Krueger et al, 2005).



Εικόνα 10: Ιστοπαθολογική εικόνα ψωρίασης. Φαίνονται η ακάνθωση (βέλος 1), η παρακεράτωση (βέλος 2), τα διευρημένα τριχοειδή και η φλεγμονώδης διήθηση (βέλος 3)

Η δερματική φλεγμονώδης διήθηση είναι βαρύτερη σε σχέση με πρώιμες βλάβες, και αποτελείται από T λεμφοκύτταρα, κύτταρα Langherhan και ουδετερόφιλα. Κάτω από την επιδερμική βασική μεμβράνη υπάρχουν μακροφάγα CD11c+. Ουδετερόφιλα και T λεμφοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας, εμφανίζονται και σε μεγάλες ποσότητες στο χόριο (Weedon D et al, 2002).

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε ότι τα επιδερμικά λεμφοκύτταρα είναι κυρίως CD8+ T κύτταρα, ενώ τα χοριακά λεμφοκύτταρα είναι CD4+ και CD8+ T κύτταρα (Weedon D et al, 2002).

Τα μικροαποστήματα Monro και οι μικροφλύκταινες Kogoj είναι διαγνωστικές ενδείξεις ψωρίασης, αλλά δεν είναι πάντα παρόντα.

1.1.6 Κληρονομησιμότητα της ψωρίασης

Η συνήθης μέθοδος για την εκτίμηση της συνεισφοράς των περιβαλλοντικών και των γενετικών επιδράσεων στην εμφάνιση ενός νοσήματος είναι οι μελέτες διδύμων, τόσο μονοζυγωτικών (MZ) όσο και διζυγωτικών (DZ). Οι δίδυμοι αποτελούν «πειράματα της φύσης», που παρέχουν την ευκαιρία να μελετηθούν οι περιβαλλοντικές και οι γενετικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Οι διζυγωτικοί δίδυμοι που μεγαλώνουν μαζί επιτρέπουν στους γενετιστές να μετρήσουν τη συμπτωτικότητα ενός νοσήματος μεταξύ συγγενών που μεγαλώνουν σε παρόμοιο περιβάλλον, αλλά φέρουν από κοινού τα μισά γονίδιά τους, ενώ οι μονοζυγωτικοί δίδυμοι επιτρέπουν τη σύγκριση συγγενών που έχουν ακριβώς τον ίδιο γονότυπο και οι οποίοι είναι δυνατόν να έχουν μεγαλώσει ή να μην έχουν μεγαλώσει στο ίδιο περιβάλλον. Οι μελέτες διδύμων βοηθούν στον προσδιορισμό της σχετικής συνεισφοράς των γονιδίων και του περιβάλλοντος στην πρόκληση του νοσήματος (Nussbaum R.L et al, 2007).

Οι αρχικές μελέτες διδύμων για την ψωρίαση βασίστηκαν σε ένα μικρό αριθμό ζευγαριών, η μελέτη από τον Farber το 1974 (61 ζεύγη), και δύο μελέτες από τον Bradrup στη Δανία (58 ζεύγη) το 1978 και από τον Duffy στην Αυστραλία (77 ζεύγη) το 1993. Όλες αυτές οι μελέτες σε δίδυμους έδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά συμπτωτικότητας για την ψωρίαση στα MZ απ' ότι στα DZ δίδυμα. Ωστόσο, τα ποσοστά συμπτωτικότητας μεταξύ MZ διδύμων δεν φθάνουν το 100%, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι περιβαλλοντικές επιδράσεις παίζουν ρόλο στην αιτιολογία της νόσου. Τέλος, η κληρονομησιμότητα σε αυτές τις μελέτες κυμαίνεται μεταξύ 66% και 90% (Πίνακας 1) (Grijbovski et al, 2007, Lonnberg et al, 2013).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη διδύμων στο Νορβηγικό πληθυσμό ελέγχθηκαν 8045 δίδυμα από τα οποία τα 334 ανέφεραν ιστορικό με ψωρίαση. Η μελέτη αυτή έδειξε πως δεν υπάρχει διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου μεταξύ των φύλων και των ζυγωτικών ομάδων. Τα MZ δίδυμα εμφάνιζαν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκδηλώσουν ψωρίαση από τα DZ δίδυμα. Οι γενετικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις φαίνεται να είναι παρόμοιες και στα δύο φύλα. Η κληρονομησιμότητα της ψωρίασης εκτιμάται να είναι 66% και η

επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην εμφάνιση ψωρίασης 34% (Grjibovski et al, 2007).

Τέλος, η μεγαλύτερη μελέτη διδύμων πραγματοποιήθηκε το 2013 στο Δανικό πληθυσμό (10.725 ζευγάρια διδύμων, ηλικίας 20-71 χρονών) και έδειξε μεγαλύτερη συμπτωτικότητα (0,33) για την ψωρίαση στα μονοζυγωτικά (MZ) δίδυμα από ότι στα διζυγωτικά (DZ) δίδυμα (0,17). Η επίδραση των γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση της ψωρίασης υπολογίζεται στο 54% έναντι 12% των κοινών περιβαλλοντικών παραγόντων και 34% μη κοινών περιβαλλοντικών παραγόντων. Η κληρονομησιμότητα της ψωρίασης υπολογίζεται στο 68% (Lonnberg et al, 2013).

Πίνακας 1: Εκτιμήσεις της κληρονομησιμότητας για την ψωρίαση σε μελέτες διδύμων (Lonnberg et al, 2013)

Μελέτη(πρώτος συντάκτης)	Αριθμός ζευγαριών με ψωρίαση	Κληρονομησιμότητα %
Farber 1974, USA	61	
Brandrup 1978, Denmark	36	90
Duffy 1993, Australia	77	81
Grjibovski 2007, Norway	273	66
Lonnberg 2013, Denmark	804	68

- Ανάλυση γενετικής σύνδεσης (Linkage analysis)

Στις αναλύσεις γενετικής σύνδεσης, αξιοποιούνται τα γενεολογικά δένδρα για την παρακολούθηση της κληρονόμησης ενός νοσήματος για μερικές γενιές και αναζητείται η αντίστοιχη, σταθερή και κατ' επανάληψη κληρονόμηση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος, η οποία μεταβιβάζεται, από γενιά σε γενιά, παράλληλα με το νόσημα (Nussbaum R.L et al, 2007).

Ανιχνεύει την συμπτωτικότητα μεταξύ των γονοτύπων και των φαινοτύπων μιας κληρονομικής ασθένειας και παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για την ανακάλυψη των υπεύθυνων γονιδίων, ειδικά για Μενδελικά νοσήματα. Με την χρήση των αναλύσεων γενετικής σύνδεσης έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια που είναι υπεύθυνα για ασθένειες όπως η κυστική ίνωση και η μυϊκή δυστροφία

Duchenne, νόσος Huntington, Alzheimer και μερικές μορφές του καρκίνου του μαστού (Vinod C., 2010, Oka A. et al, 2012).

Οι αναλύσεις γενετικής σύνδεσης μπορούν να εφαρμοστούν σε δύο περιπτώσεις:

1. Όταν το υπεύθυνο γονίδιο, οι μεταλλάξεις του οποίου ευθύνονται για την εκδήλωση της νόσου, είναι γνωστό και έτσι όλα τα μέλη μιας οικογένειας ελέγχονται για την χρωμοσωμική θέση του γονιδίου αυτού.
2. Όταν η οικογένεια πάσχει από κάποιο κληρονομικό νόσημα χωρίς όμως να είναι γνωστό το υπεύθυνο γονίδιο, οι μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν την εμφάνιση της νόσου. Για τα περισσότερα γενετικά νοσήματα δεν είναι γνωστή η θέση του γονιδίου. Με την ανάλυση γενετικής σύνδεσης γίνεται εφικτή η χαρτογράφηση του γονιδίου.

- Αναλύσεις γενετικής σύνδεσης σε οικογένειες με ψωρίαση

Κατά τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για τον προσδιορισμό της χρωμοσωμικής θέσης των γονιδίων που καθορίζουν την ευαισθησία στην ψωρίαση. Χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις ανάλυσης γενετικής σύνδεσης σε οικογένειες με ψωρίαση, έχουν ταυτοποιηθεί δέκα γενετικοί τόποι ως περιοχές ψωριασικής ευαισθησίας (Πίνακας 2) (Oka A et al, 2012).

Οι γενετικοί τόποι αυτοί είναι οι *PSORS1* στο χρωμόσωμα 6p21.3 (Burden 2000, Lee et al 2000), *PSORS2* στο 17q25 (Bowcock et al, 2006), *PSORS3* στο 4q32 (Bowcock et al, 2006), *PSORS4* στο 1q21 (Capon et al, 1999), *PSORS5* στο 3q21 (Enlund et al, 1999), *PSORS6* στο 19p13 (Lee et al, 2000), *PSORS7* στο 1p32 (Veal et al, 2001), *PSORS8* στο 16q (Nair et al, 2006), *PSORS9* στο 4q31 (Zhang et al, 2002) και *PSORS10* στο 18p11.23 (Asumalahti et al, 2003).

Η σύνδεση μεταξύ της χρόνιας κατά πλάκα ψωρίασης και του αντιγόνου HLA περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1972 (Russell TJ et al, 1972, White SH, et al, 1972) και από τότε πολλές περιοχές, όπως HLA-A, HLA-B, HLA-C, DQB1, -DQA1 και -DQB1 έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση. Αναλύσεις απλότυπων, τοποθετούν τον γενετικό τόπο για την ψωρίαση στο τέλος του MHC τάξης I τελομερικά του HLA-B ενώ όταν η περιοχή επανελέγχθηκε με ανάλυση συσχέτισης ο γενετικός τόπος τοποθετήθηκε τελομερικά του HLA-C (Burden AD, 2000).

Πίνακας 2: Περιοχές που σχετίζονται με ψωριασική ευαισθησία βάσει αναλύσεων γενετικής σύνδεσης

Χρωμοσωμική θέση	Γενετικός τόπος	Υπεύθυνο γονίδιο
1q21	PSORS4	LCE3B & LCE3C
1p	PSORS7	
3q21	PSORS5	SLC12A8
4q	PSORS3	
4q31-q34	PSORS9	
6p21.33	PSORS1	HLA-C
16q	PSORS8	
17q25	PSORS2	SLC9A3R1 & RAPTOR
18p11.23	PSORS10	
19p13	PSORS6	

- Αναλύσεις συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος

Στις μελέτες συσχέτισης συγκρίνεται η κατανομή συχνοτήτων ενός πολυμορφικού δείκτη σε μια ομάδα ασθενών και σε μια ομάδα ελέγχου. Αν βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές, συμπεραίνεται ότι ο δείκτης συσχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου. Αυτό συμβαίνει είτε επειδή ο δείκτης εντοπίζεται σε κάποιο γονίδιο που εμπλέκεται στον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου, είτε γιατί βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με κάποιο άλλο εμπλεκόμενο γονίδιο.

- Αναλύσεις συσχέτισης για την ταυτοποίηση περιοχών που σχετίζονται με ψωριασική ευαισθησία

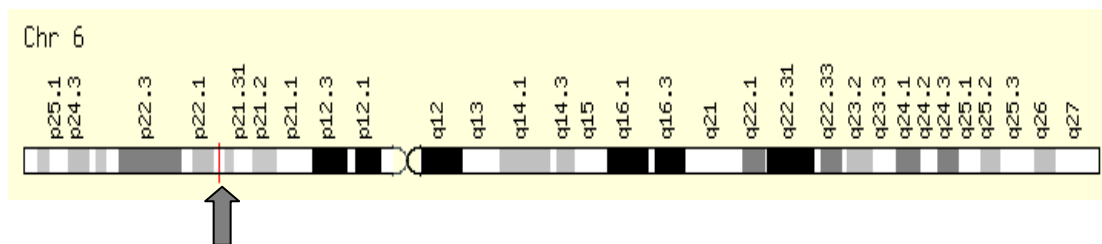
Κατά τα τελευταία πέντε χρόνια, έχουν δημοσιευθεί δέκα αναλύσεις συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) υποδεικνύοντας είκοσι τέσσερις γενετικούς τόπους. Οι GWAS έχουν προσδιορίσει πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη λειτουργία του δερματικού φραγμού (LCE3A, LCE3C και LCE3D), στην σηματοδότηση των T κυττάρων (IL2, IL21, IL12B, IL13, IL23A, IL23R, RNF114, NFKB, NFKBIA, TYK2, TNFAIP3, TNIP1 και TRAF3IP2) και στην παρουσίαση αντιγόνου (ERAP1, HLA-C) ως γονίδια ψωριασικής ευαισθησίας (Lonnberg et al, 2013). Ωστόσο, τα γονίδια αυτά εξηγούν ένα μικρό ποσοστό της ψωριασικής κληρονομησιμότητας (Oka A et al, 2012).

1.1.7 Γενετική της ψωρίασης

- Συσχέτιση με HLA

Το 1980 αποδείχθηκε η συσχέτιση της ψωρίασης με το HLA τάξης I, και συγκεκριμένα με το αλληλόμορφο HLA-Cw6. Ωστόσο, αυτή η συσχέτιση σήμερα είναι αμφιλεγόμενη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εκτεταμένη ανισσοροπία σύνδεσης που υπάρχει εντός του διαστήματος μεταξύ του HLA-B και διαφόρων γονιδίων συμπεριλαμβανομένου των *HCR* (alpha-helix coiled-coil rod homolog) και *CDSN* (corneodesmosin). Σε μία μελέτη τους οι Nair et al, τοποθέτησαν τον *PSORS1* σε μία περιοχή 60kb τελομερικά του HLA-C. Άλλοι ερευνητές πραγματοποιώντας μελέτες συσχέτισης, με τη χρήση SNPs σε όλη αυτή την περιοχή, τοποθέτησαν τον *PSORS1* σε μία περιοχή 10kb κοντά στον HLA-C (Bowcock AM & Cookson W, 2004).

Ο γενετικός τόπος *PSORS1* έχει συνδεθεί με την ψωρίαση σε διάφορους πληθυσμούς και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p21.3 (Εικόνα 11) (Sagoo et al, 2004). Ο γενετικός τόπος *PSORS1* περιέχει γονίδια *MHC*, τα οποία είναι σημαντικά για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Αρκετά αντιγόνα των *MHC* τάξης I έχουν συνδεθεί με την ψωρίαση, συμπεριλαμβανομένου των HLA-B13, B57, Cw6 και Cw7 (Elder et al, 1994). Το αλληλόμορφο HLA-Cw6 εμφανίζει ισχυρότερη σύνδεση με την πρώιμη έναρξη της χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας και με τη σταγονοειδή ψωρίαση (Nair et al, 2006). Άλλα γονίδια που σχετίζονται με την ψωρίαση και εδράζονται σε αυτό τον γενετικό τόπο είναι τα γονίδια *PSORS1C3*, *OTF3*, *HCR*, *SPR1*, *SEEK1*, *CDSN*, και *TNF-α* (Bowcock A & Krueger JG, 2005).



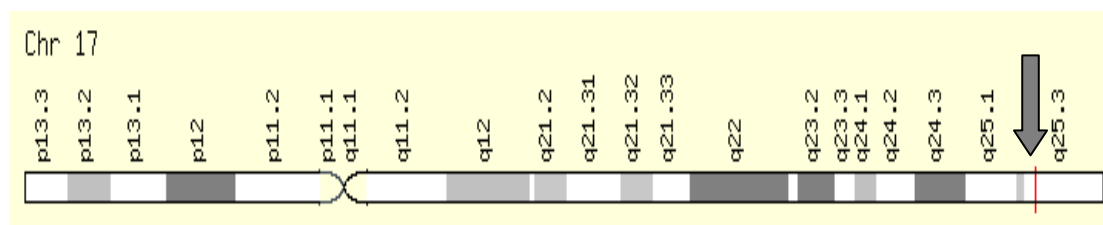
Εικόνα 11: Η θέση του γενετικού τόπου *PSORS1* στο χρωμόσωμα 6p.21 (www.ensembl.org)

Από αυτά το γονίδιο *CDSN* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κορνεοδεσμοσίνη που συμμετέχει στην προσκόλληση των κερατινοκυττάρων (Ameen M. et al, 2005). Μία παραλλαγή του *CDSN*, η οποία είναι πιο συχνή μεταξύ των

ασθενών με ψωρίαση συγκριτικά με μη προσβεβλημένα άτομα, μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση της γλυκοπρωτεΐνης CDSN, η οποία με τη σειρά της συμβάλλει στη φλεγμονώδη αντίδραση που παρατηρείται στο δέρμα των ασθενών (Bowcock A & Krueger JG, 2005)

- **17q25**

Ο γενετικός τόπος *PSORS2* που σχετίζεται με ψωριασική ευαισθησία, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q (Εικόνα 12), και είναι αποτέλεσμα της πρώτης μελέτης σύνδεσης με τη χρήση μικροδορυφόρων σε οκτώ οικογένειες με άτομα με ψωρίαση (Tomfohrde et al, 1994). Η μελέτη αυτή έδειξε ισχυρή σύνδεση με τον μικροδορυφόρο D17S784 (Tomfohrde et al, 1994).



Εικόνα 12: Η θέση του γενετικού τόπου *PSORS2* στο χρωμόσωμα 17q25 (www.ensembl.org)

Για τον λεπτομερέστερο προσδιορισμό της θέσης αυτής οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στο χρωμόσωμα 17q23-25 (φυσική απόσταση: 11.5 Mb) που περιλαμβάνει τον τόπο D17S784 και πραγματοποίησαν αναλύσεις γενετικής σύνδεσης και μελέτες συσχέτισης με τη χρήση μικροδορυφόρων και SNPs. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μικροδορυφόρου D17S1301 και δύο SNPs σε ένα τμήμα που βρίσκεται σε απόσταση 512kb από τον γενετικό τόπο D17S784 (Speckman RA et al, 2003).

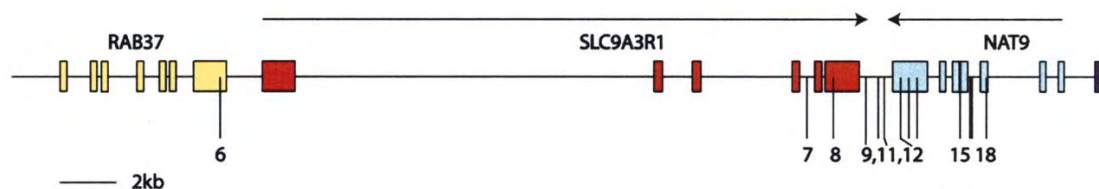
Μελέτες συσχέτισης σε οικογένειες οδήγησαν στην ταυτοποίηση δύο τόπων ψωριασικής ευαισθησίας που απέχουν μεταξύ τους 6Mb (Helms C et al, 2003, Oka A. et al, 2012). Ο ένας τόπος ήταν ο πολυμορφισμός (rs734232) που βρίσκεται σε απόσταση 84,7 kb από τον D17S1301 και περιλαμβάνει δύο γονίδια, τα *SLC9A3R1* και *NAT9* (Bowcock A & Krueger JG, 2005). Ο άλλος τόπος βρίσκεται σε απόσταση 852kb από τον D17S784 (Caron F. et al, 2004, Stuart P et al, 2006, Oka A. et al, 2012) και περιλαμβάνει το γονίδιο *RAPTOR* (mTOR, στόχος της ραπαμυκίνης) (Bowcock A & Cookson W, 2004). Η φωσφοπρωτεΐνη *SLC9A3R1* εμπλέκεται στο σχηματισμό των T κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. (Helms et al, 2003).

Έχουν παρατηρηθεί πέντε παραλλαγές στην περιοχή *SLC9A3R1/NAT9* στο χρωμόσωμα 17q25 (Εικόνα 13). Η μία βρίσκεται μεταξύ δύο γονιδίων και

καταργεί την πιθανή θέση σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 (Helms et al, 2003). Ο RUNX1 είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων (Lacaud G et al, 2002).

Αν και το γονίδιο *SLC9A3R1* έχει πιθανό βιολογικό ρόλο στην ψωρίαση, δεδομένου ότι εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα και είναι πιθανό να είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της ανοσοαπόκρισης, δεν μπορεί να αποκλειστεί ο ρόλος του *NAT9*. Η *NAT9* είναι μία N-ακετυλοτρανσφεράση της οικογένειας GNAT. Παίζει σημαντικό ρόλο στην παρουσίαση του αντιγόνου MHC τάξης I, στην ανάπτυξη των T κυττάρων και επηρεάζει την ανάπτυξη της αυτοάνοσης νόσου. Πειραματικές ενδείξεις σε φλεγμονώδεις νόσους, όπως η ψωρίαση υποδηλώνουν επίσης ότι η γλυκοζυλίωση μπορεί να παρέχει ενδοθηλιακούς κώδικες για την οργανο-ειδική κυκλοφορία λευκοκυττάρων σε φλεγμονώδεις θέσεις (Renkonen J et al, 2002).

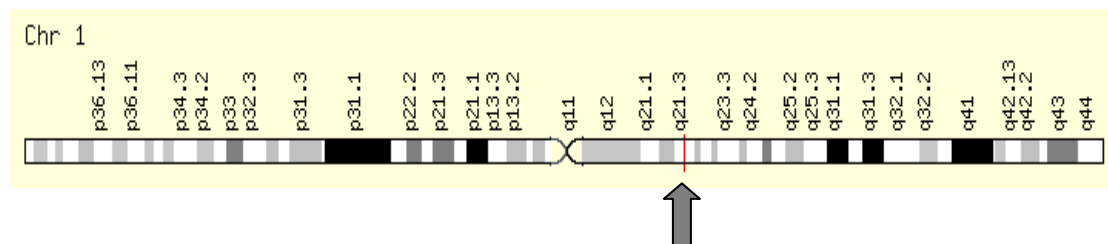
Η συχνότητα του αλληλομόρφου κινδύνου του rs734232 ήταν 48% σε άτομα με ψωρίαση σε σύγκριση με 42% στους μάρτυρες, υποδεικνύοντας έτσι ότι η πιθανή συνεισφορά αυτής της περιοχής θα ήταν πολύ χαμηλή, ακόμη και αν αυτή σχετίζεται με την προδιάθεση για ψωρίαση. Άλλες μελέτες έδειξαν έλλειψη στοιχείων για τη γενετική συσχέτιση των παραγόντων RUNX1 και RAPTOR με την ψωρίαση (Stuart P et al, 2006, Hüffmeier U et al, 2005).



Εικόνα 13: Ο εντοπισμός των SNPs στην περιοχή σύνδεσης με την ψωρίαση στο χρωμόσωμα 17q25. Η κατεύθυνση της μεταγραφής του *SLC9A3R1* και *NAT9* υποδεικνύεται πάνω από την δομή του γονιδίου. Τα SNPs που συσχετίζονται συμβολίζονται με τους αριθμούς 7, 9, 11, 12 και 15. Όλα βρίσκονται σε μη-κωδικές περιοχές του *SLC9A3R1* ή του *NAT9*. Συσχέτιση έχει παρατηρηθεί με ένα αλληλόμορφο του SNP9 που καταργεί μια θέση πρόσδεσης για τον RUNX1 (Bowcock A & Cookson W, 2004).

- **1q21**

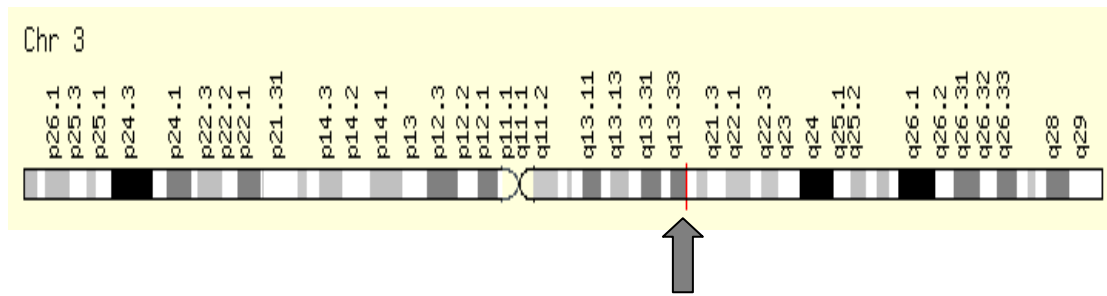
Οι παραλλαγές του αριθμού των αντιγράφων (CNVs) αποτελούν σημαντική πηγή της γενετικής ποικιλότητας, και συμβάλλουν στην ευπάθεια σε διάφορες ασθένειες. Σε μία μελέτη εντοπίστηκε υψηλότερος αριθμός αντιγράφων στο σύμπλεγμα της βήτα-αμυντίνης ο οποίος συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για ψωρίαση. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη ανάλυση του γονιδιώματος για CNV προσδιορίστηκε η συσχέτιση της ψωρίασης με εξάλλειψη των γονιδίων *LCE3B* και *LCE3C* (*LCE3C_LCE3B-del*). Αυτά τα γονίδια βρίσκονται στην περιοχή του γενετικού τόπου *PSORS4* στο χρωμόσωμα 1q21 (Εικόνα 14). Τα γονίδια *LCE3* δεν εκφράζονται σε φυσιολογικό δέρμα, αλλά η έκφρασή τους επάγεται μετά από διάσπαση του φραγμού του δέρματος και είναι ισχυρή σε ψωριασικές βλάβες. Με τον τρόπο αυτό, η βλάβη στο φραγμό του δέρματος θα μπορούσε να προκαλέσει μία επιδερμική απόκριση που περιλαμβάνει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό του φραγμού του δέρματος. Έτσι άτομα ομόζυγα για το *LCE3C_LCE3B-del* θα μπορούσαν να έχουν αυξημένο κίνδυνο για ψωρίαση (Coto E et al, 2010).



Εικόνα 14: Η θέση του γενετικού τόπου *PSORS4* στο χρωμόσωμα 1q21 (www.ensembl.org)

- **3q21**

Μία ανάλυση σύνδεσης σε οικογένειες από τη Σουηδία ταυτοποίησε την χρωμοσωματική περιοχή 3q21 ως περιοχή (*PSORS5*) ψωριασικής ευαισθησίας (Εικόνα 15) (Samuelsson L et al, 1999). Μεταγενέστερη χαρτογράφηση, περιόρισε τον τόπο σε 250kb χρησιμοποιώντας δείκτες SNPs και πρότεινε ως υποψήφιο γονίδιο το *SLC12A8* (Oka A et al, 2012).

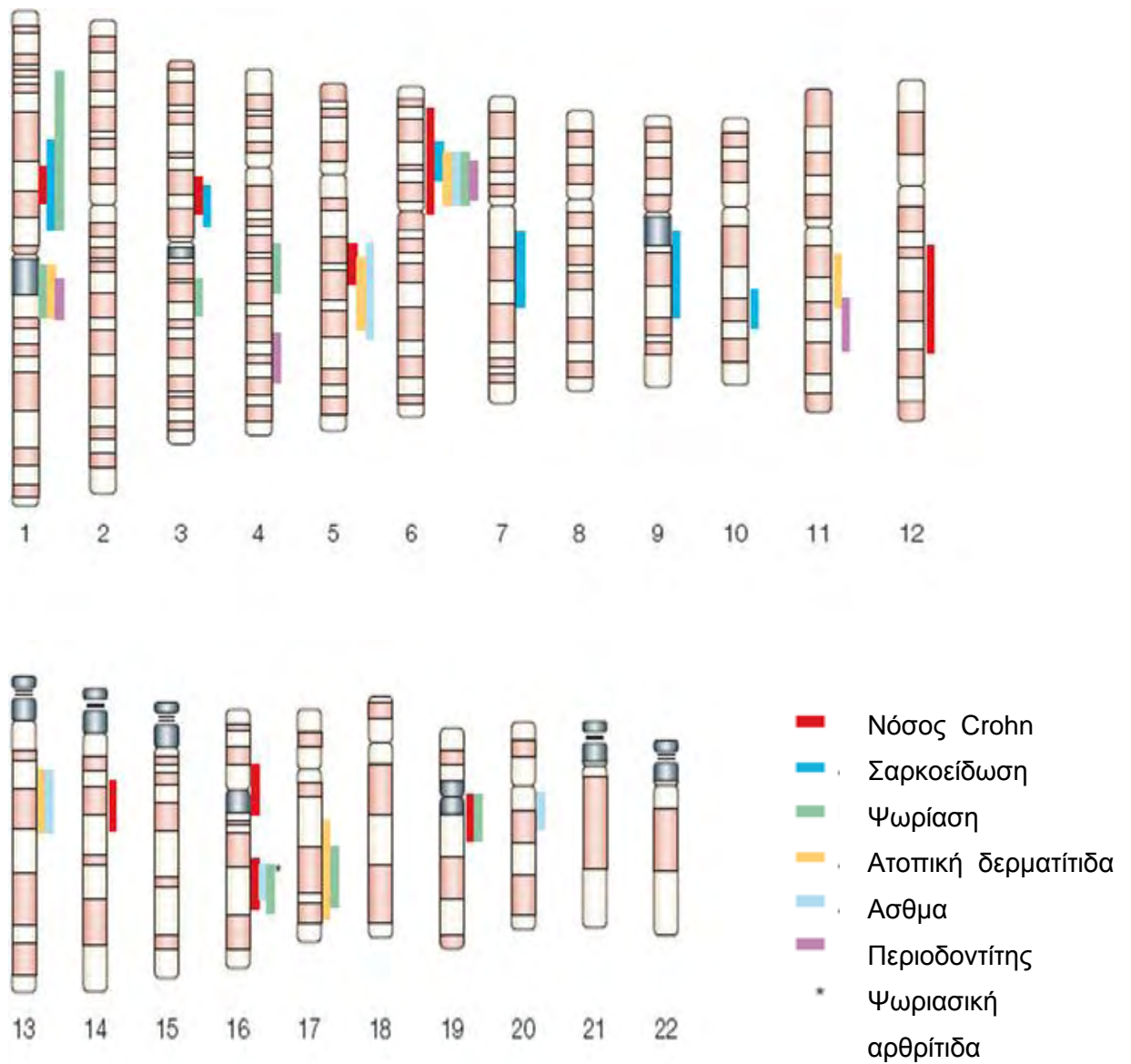


Εικόνα 15: Η θέση του γενετικού τόπου *PSORS5* στο χρωμόσωμα 3q21 (www.ensembl.org)

Αρκετοί από τους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την ψωρίαση συμπίπτουν με περιοχές του γονιδιώματος που έχουν συσχετιστεί και με άλλες αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως ο γενετικός τόπος *PSORS8* που συμπίπτει με τον γενετικό τόπο που σχετίζεται με τη νόσο Crohn. Ακόμη οι γενετικοί τόποι στις περιοχές 1q, 3q, 5q, 17q και 20q συμπίπτουν με περιοχές του γονιδιώματος που έχουν συσχετιστεί με την ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα και την ψωριασική αρθρίτιδα (Εικόνα 16), ενισχύοντας έτσι την υπόθεση αλληλοεπικάλυψης τόπων (Bowcock et al 2006, Rajan et al., 2000). Αυτό πιθανώς υποδηλώνει κοινούς μηχανισμούς δράσης και παθολογίας σε διαφορετικές φλεγμονώδεις νόσους.

- Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στους ασθενείς με γενετική προδιάθεση στην ψωρίαση, η ασθένεια μπορεί να πυροδοτηθεί από ενδογενείς και εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το σύνολο των παραγόντων αυτών μπορεί να επιταχύνει την ανανέωση του δέρματος. Στους εξωγενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνεται η αλλαγή εποχής, η τριβή που προκαλούν τα ρούχα στο δέρμα, η χαμηλή υγρασία, το κάπνισμα και η παχυσαρκία. Στους ενδογενείς παράγοντες συμπεριλαμβάνεται η συναισθηματική πίεση, ορισμένα φάρμακα και οι μολυσματικές ασθένειες, όπως η στρεπτοκοκκική φαρυγγίτιδα (στα παιδιά), τα ναρκωτικά, η λοίμωξη HIV και το τραύμα (Vinod C. et.al., 2010).



Εικόνα 16: Αλληλεπικάλυψη γενετικών τόπων για διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες (Sergey et al , 2011).

1.2 Ανοσοπαθοφυσιολογία της ψωρίασης

Εκτός από τον ταχύ ρυθμό ανανέωσης των κερατινοκυττάρων, η ψωρίαση είναι και αποτέλεσμα φλεγμονωδών αντιδράσεων του δέρματος. Η φλεγμονώδης αντίδραση οφείλεται σε δυο τύπους κυττάρων: τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και τα T λεμφοκύτταρα.

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κατευθύνονται προς την εξωτερική κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας. Αποκολλώνται από την επιφανειακή στιβάδα του δέρματος και προκαλούν ερεθισμό. Έτσι, το δέρμα ξεκινά μία συνεχή διαδικασία επούλωσης. Με αυτόν τον τρόπο, τα συγκεκριμένα κύτταρα συμβάλλουν στη διατήρηση της φλεγμονής στην επιδερμίδα. Παράλληλα, τα T κύτταρα επιτίθενται στο δέρμα και διατηρούν ενεργοποιημένη τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η ψωρίαση χαρακτηρίζεται από τη χρόνια επίμονη αντίδραση στα T κύτταρα. Τα T κύτταρα εμπλέκονται στην εκδήλωση και τη διατήρηση της φλεγμονής του δέρματος μέσω της απελευθέρωσης ορισμένων κυτταροκίνων με προφλεγμονώδη δράση (Bowcock & Krueger, 2006).

Αποτέλεσμα της απόκρισης των κερατινοκυττάρων είναι η ενεργοποίηση του κυτταρικού ανοσοποιητικού συστήματος, με τα T κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και διάφορες ανοσο-σχετιζόμενες κυτταροκίνες και χημειοκίνες να εμπλέκονται στην παθογένεση (Lowe et al, 2007).

Κατά την έναρξη της νόσου τα δένδριτικά κύτταρα (DCs) ενεργοποιούνται στην επιδερμίδα και το χόριο, παράγοντας ιντερφερόνη-α (IFN-α) και ιντερλευκίνη-23 (IL-23), οι οποίες με τη σειρά τους προωθούν την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων και συγκεκριμένα των T βοηθητικών κυττάρων Th1, Th2. Στην επιδερμίδα και στο χόριο των ψωριασικών αλλοιώσεων, τα T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών (IFN-γ, IL-2, TNF-α), οι οποίες διεγείρουν τα γειτονικά κύτταρα και εκκρίνουν και αυτά με τη σειρά τους κυτταροκίνες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας, τη μειωμένη ωρίμανση των κερατινοκυττάρων και την εμφάνιση των χαρακτηριστικών αγγειακών διαταραχών, όπως η αγγειογένεση (Lowe et al, 2007).

1.2.1 Αγγειογένεση

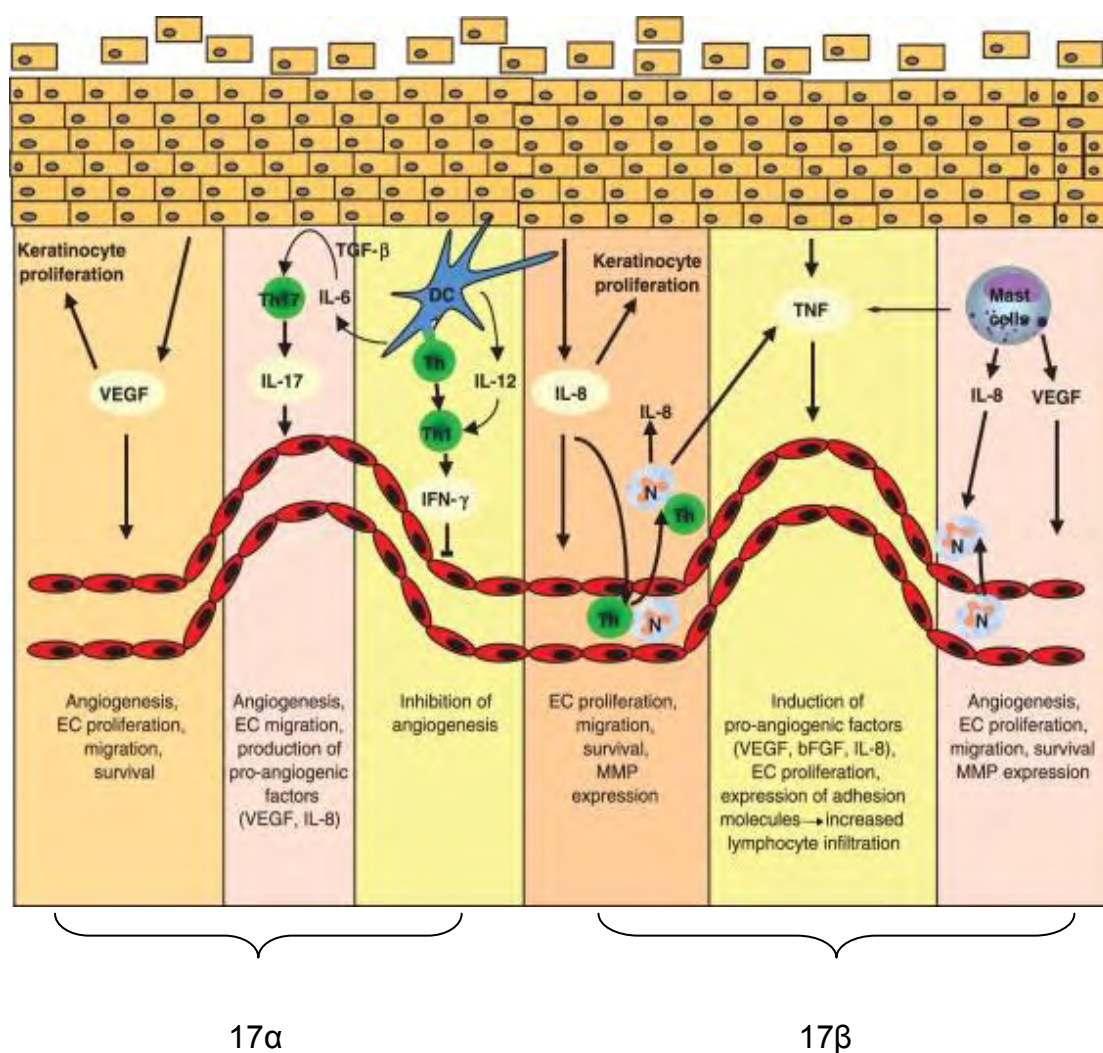
- Ορισμός, φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση

Ο όρος αγγειογένεση περιγράφει τον σχηματισμό νέων αγγείων (τριχοειδών) από προϋπάρχοντα αγγεία (τριχοειδή και μετατριχοειδικά φλεβίδια). Ρυθμίζεται αυστηρά από την ισορροπία μεταξύ των προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών μεσολαβητών (Heidenreich et al, 2009). Φυσιολογικά επάγεται μόνο παροδικά κατά την αγγειογένεση του ενδομητρίου, κατά το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού σε φλεγμονή και τραυματισμό, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και κατά την εμβρυογένεση. Παρόλα αυτά υπάρχουν πολλές ασθένειες που οφείλονται στην ανεξέλεγκτη αγγειογένεση. Η παθολογική αγγειογένεση λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες χρόνιας φλεγμονής, όπως είναι η ανάπτυξη όγκων και η μετάσταση, η ψωρίαση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Heidenreich et al, 2009).

- Μηχανισμός της αγγειογένεσης

Η αγγειογένεση αρχίζει με την ενεργοποίηση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (EC) μέσω διαφόρων παραγόντων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ή ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF-basic Fibroblast Growth Factor). Τα ακόλουθα στάδια της αγγειογένεσης περιλαμβάνουν αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, αποσταθεροποίηση των υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων, αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (EC), σχηματισμό αυλού και ωρίμανση των αγγείων με την βοήθεια περιαγγειακών κυττάρων. Η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα οδηγεί στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος οι οποίες παρέχουν μια προσωρινή μήτρα για τα μεταναστευτικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Ακολουθεί η αποικοδόμηση της ECM από πρωτεάσες όπως μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMPs) και ενεργοποιητές πλασμινογόνου. Η αποικοδόμηση της ECM οδηγεί στην απελευθέρωση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων [VEGF, bFGF, IOP-1 (ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα)] που αποθηκεύονται στην ECM, προωθώντας έτσι την αγγειογένεση (Εικόνα 17α) (Heidenreich et al, 2009).

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατευθύνεται από αγγειογενετικούς μεσολαβητές με αποτέλεσμα την έκφραση των ιντεγκρινών, μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ECM. Τέλος, με την πρόσληψη των περιαγγειακών κυττάρων επέρχεται ο σχηματισμός αυλού και η ωρίμανση των αγγείων (Heidenreich et al, 2009).



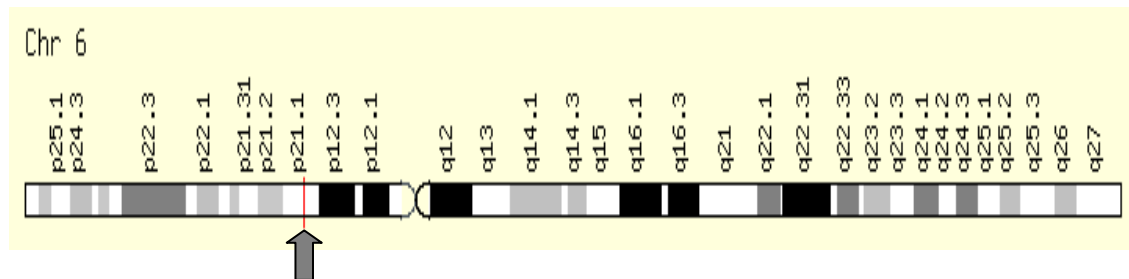
Εικόνα 17: Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην παθογένεση της ψωρίασης (β) σε σύγκριση με τη φυσιολογική αγγειογένεση (α). (α) Παρατηρείται η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF), η μετανάστευση καθώς και η αναστολή της αγγειογένεσης. (β) Παρατηρείται η αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας από πρωτεάσες (MMPs), ο πολλαπλασιασμός των ECs από την απελευθέρωση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF), την έκφραση των μορίων προσκόλλησης με αποτέλεσμα την αύξηση της διεισδυτικότητας και την προώθηση της αγγειογένεσης.

(VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, IL: ιντερλευκίνη, IFN: ιντερφερόνη, TNF: παράγοντας νέκρωσης όγκου, bFGF: βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, ECs: ενδοθηλιακά κύτταρα, N: ουδετερόφιλα) (Heidenreich et al , 2009).

1.2.2 Ο παράγοντας VEGF

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που διεγείρουν το αγγειακό σύστημα και την αγγειογένεση. Είναι ο ρυθμιστής κλειδί της φυσιολογικής αγγειογένεσης κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της σκελετικής ανάπτυξης και των αναπαραγωγικών λειτουργιών. Στην παθολογική αγγειογένεση ο VEGF έχει συσχετιστεί με όγκους, ενδοφθάλμιες νεοαγγειακές διαταραχές και άλλες παθολογικές καταστάσεις (Ferrara N et al, 2003).

Το γονίδιο *VEGF* παράγει έξι διαφορετικές ισομορφές: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και PlGF (αυξητικός παράγοντας του πλακούντα) με κύρια δράση εστιασμένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων και των λεμφαγγείων (Ferrara N et al, 2003). Οι 6 ισομορφές του *VEGF* παράγονται ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος (Neufeld et al, 1999). Αυτές οι ισομορφές διαφέρουν στην μοριακή μάζα τους και σε βιολογικές ιδιότητες, όπως η ικανότητά τους να προσδένονται στην κυτταρική επιφάνεια των ηπαρινο-θειϊκών πρωτεογλυκάνων (Neufeld et al, 1999). Στον άνθρωπο, το γονίδιο *VEGF* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.1 (Εικόνα 18) (Ferrara N., 1999).



Εικόνα 18: Η θέση του γονιδίου *VEGF* στο χρωμόσωμα 6 του ανθρώπου (www.ensembl.org)

Η έκφραση του *VEGF* ρυθμίζεται από παράγοντες όπως η υποξία, διάφορους αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και άλλα εξωκυττάρια μόρια (Neufeld G. et al, 1999). Η χαμηλή πίεση οξυγόνου επάγει την παραγωγή του VEGF μέσω αύξησης της μεταγραφής του καθώς και μέσω σταθεροποίησης του mRNA του. Η μεταγραφή του VEGF σε καταστάσεις υποξίας επιτελείται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 και HIF-2 (Neufeld G. et al, 1999 & Ferrara N et al, 1999). Ο HIF-1 έχει την ικανότητα να συνδέεται με συγκεκριμένα στοιχεία (Hypoxia Response Elements-HRE) ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή (Tammela T. et al, 2005).

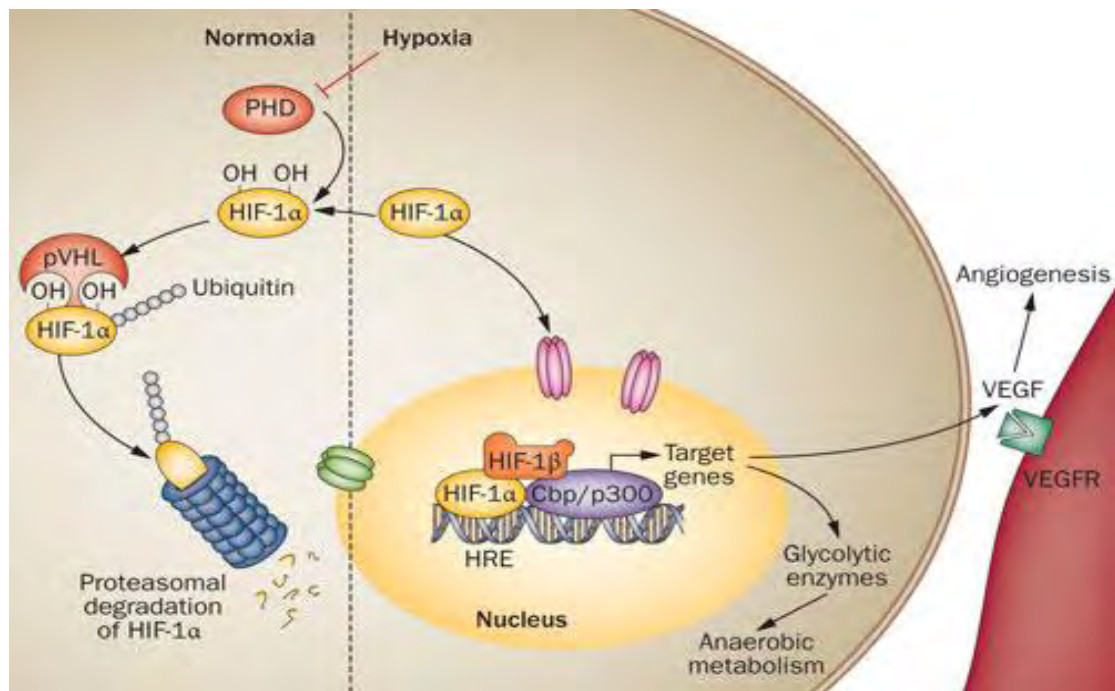
Ο VEGF αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της δημιουργίας των αγγείων σε φυσιολογικές καταστάσεις και της νεο-αγγειογένεσης σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου διαφόρων οργάνων. Εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς. Η αναστολή της δράσης του VEGF μπορεί να οδηγήσει σε μορφολογικές και λειτουργικές αλλοιώσεις στα κύτταρα των αγγείων.

Σε πρόσφατες μελέτες, παρατηρήθηκε πως ο VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς ανάπτυξης της ψωρίασης. Οι υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGFRs) εκφράζονται τόσο στην φυσιολογική όσο και στην ψωριασική επιδερμίδα και σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων. Παρατηρήθηκε υπερέκφραση των VEGFRs στην ψωριασική επιδερμίδα σε μελέτη έκφρασης των VEGFRs σε ψωριασικά κερατινοκύτταρα που ελέγχθηκε τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (Man XY et al, 2008, Crawshaw AA et al, 2012).

1.2.3 Ο παράγοντας HIF

Για να μπορέσουν τα κύτταρα ενός ιστού να προσαρμοστούν στην χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (υποξία) ενεργοποιούν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής μιας σειράς γονιδίων που συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η ερυθροποίηση, ο μεταβολισμός του σιδήρου, η αγγειογένεση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η επιβίωση και η απόπτωση. Ο πρωταρχικός παράγοντας που μεσολαβεί στην μεταγραφική απόκριση στην υποξία είναι ο Hypoxia Inducible Factor (HIF) (Qingdong Ke & Max Costa, 2006).

Ο HIF αποτελείται από μία επαγόμενη από υποξία υπομονάδα HIF-1α και μία ιδιοσυστατικά εκφραζόμενη υπομονάδα HIF-1β (Qingdong Ke & Max Costa, 2006). Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η υπομονάδα HIF-1α συντίθενται συνεχώς παρουσία Fe^{2+} και οξυγόνου και ειδικά ένζυμα υδροξυλίωσης προσθέτουν μια ομάδα υδροξυλίου (-OH) στα κατάλοιπα της υπομονάδας HIF-1α. Στη συνέχεια αυτά αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη VHL (Von Hippel Lindau) και αποικοδομούνται μέσω της οδού ουβικουΐνης - πρωτεασώματος. Σε κατάσταση υποξίας η δράση της υδροξυλάσης αναστέλεται και επέρχεται συσσώρευση των υπομονάδων HIF-1α. Στη συνέχεια μετατοπίζονται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζονται με την υπομονάδα HIF-1β και ο παράγοντας μεταγραφής δεσμεύεται από το υποξικό στοιχείο απόκρισης HRE με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί διάφορα γονίδια στόχους (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Σε φυσιολογική κατάσταση (παρουσία οξυγόνου) (αριστερά) ο HIF-1α υδροξυλιώνεται, τα κατάλοιπά του αναγνωρίζονται από την VHL και οδηγείται σε αποικοδόμηση μέσω της οδού οβουκουιτίνης-πρωτεασώματος. Σε κατάσταση υποξίας (απουσία οξυγόνου) (δεξιά) ο HIF-1α δρά ως παράγοντας μεταγραφής που συνδέεται με HREs επάγοντας πληθώρα γονιδίων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων του VEGF, προάγοντας την αγγειογένεση (Christa M et al, 2012).

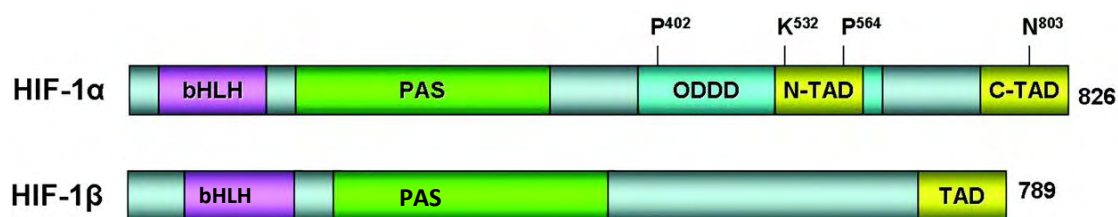
1.2.4 Δομή της πρωτεΐνης HIF-1

Ο HIF-1 ανακαλύφθηκε στο πλαίσιο μελετών του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO), μιας ορμόνης που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ερυθροκυττάρων. Αναγνωρίστηκε μια ειδική αλληλουχία DNA (5'-RCGTG-3'), η οποία ονομάστηκε στοιχείο απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Element, HRE) όπου και προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 για να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας (Qingdong Ke & Max Costa, 2006).

Ο HIF-1 εκτός από την ερυθροποιητίνη, ρυθμίζει την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων όπως π.χ. του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και όλων των γλυκολυτικών ενζύμων βοηθώντας τα κύτταρα να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν σε συνθήκες υποξίας (Qingdong Ke & Max Costa, 2006).

Ο HIF-1, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από την συνεχώς εκφραζόμενη υπομονάδα β (HIF-1β) και την

υπομονάδα α (HIF-1α), που υπόκειται συνεχώς σε αποικοδόμηση κατά την φυσιολογική οξυγόνωση, ενώ σταθεροποιείται κατά την υποξία. Οι υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών basic helix-loop-helix (bHLH) (Εικόνα 20). Η υπομονάδα α εμφανίζει τρεις ισομορφές: HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α οι οποίες όταν ετεροδιμερίζονται με την HIF-1β σχηματίζουν τους παράγοντες HIF-1, HIF-2 και HIF-3 αντίστοιχα (Qingdong Ke & Max Costa, 2006).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση των υπομονάδων HIF-1α και HIF-1β. Και οι δύο ανήκουν στην basic helix-loop-helix (bHLH). Η HIF-1α περιέχει μια περιοχή ODDD. Επίσης η HIF-1α περιλαμβάνει τις περιοχές C-καρβοξυτελικές και N-αμινοτελικές, ενώ η HIF-1β μόνο μία περιοχή TAD. Ο συνολικός αριθμός των αμινοξέων της κάθε υπομονάδας σημειώνεται στο τέλος κάθε δομής (Qingdong Ke & Max Costa, 2006).

1.2.5 Έκφραση του HIF-1α σε ασθενείς με ψωρίαση και σε μη προσβεβλημένα άτομα

Η ψωρίαση, χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ανάπτυξη και την ανώμαλη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, την αγγειογένεση στο χόριο και την λευκοκυτταρική διήθηση στο χόριο και την επιδερμίδα (Ioannou M. et al, 2009). Ο κυτταρικός υπερπολλαπλασιασμός και η πάχυνση της επιδερμίδας, έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου που παρατηρούνται στον ιστό, αποτελούν κύριο επαγωγέα της αγγειογένεσης, μέσω του HIF (Heidenreich et al. 2009).

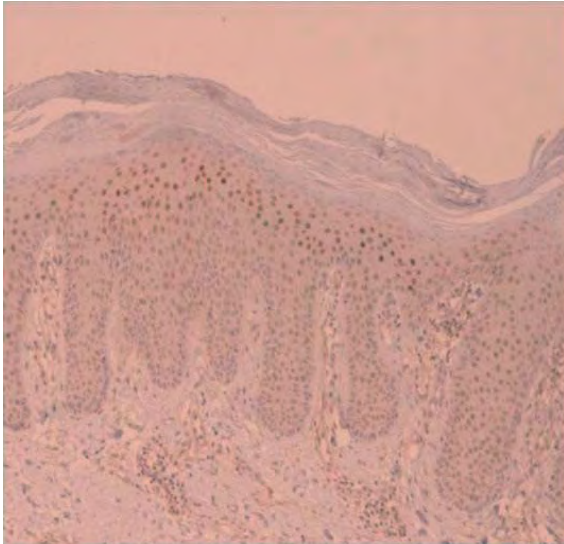
Η ψωρίαση έχει αναλυθεί με ποικίλες μεθόδους. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα κύτταρα στόχοι (επιδερμικά και ενδοθηλιακά), είναι ανοσολογικά και πολλαπλασιαστικά ενεργά. Κατά συνέπεια, οι έρευνες επικεντρώνονται στα κύτταρα τελεστές (T λεμφοκύτταρα), τα οποία είναι ενεργά και συμμετέχουν στα ολιγοκλωνική απόκριση (Ioannou M. et al, 2009).

Πρόσφατες μελέτες του HIF-1α στην ψωρίαση, έχουν δείξει σημαντική υπερέκφραση του HIF-1α σε ψωριασικό δέρμα έναντι μη ψωριασικού δέρματος και δέρματος μη προσβεβλημένων ατόμων με τη χρήση reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Tovar-Castillo et al, 2007).

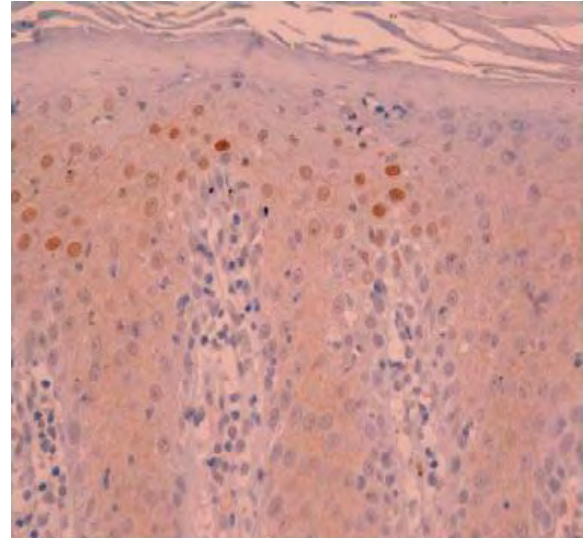
Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε ο ρόλος της υποξίας και η ενεργοποίηση του HIF στην αγγειογένεση σε ψωριασικό δέρμα. Η μελέτη αυτή έδειξε αυξημένη έκφραση HIF-1α σε ψωριασικό δέρμα σε σύγκριση με δέρμα μη προσβεβλημένων ατόμων με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας (Εικόνα 21). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας RNA *in situ* υβριδοποίηση, παρατηρήθηκε αύξηση του σήματος του HIF-1α mRNA σε ψωριασικό δέρμα (Rosenberger et al, 2009).

Μια άλλη μελέτη σύγκρινε την έκφραση του HIF-1α σε δείγματα ιστών μεταξύ ασθενών με ψωρίαση και ασθενών με δερματίτιδες που είναι ιστολογικά παρόμοιες με την ψωρίαση με ανοσοϊστοχημεία. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε αύξηση του HIF-1α σε ψωριασικό δέρμα σε αντίθεση με τις δερματίτιδες. Επίσης παρατηρήθηκε ότι στην ψωρίαση, ο HIF-1α ήταν επιλεκτικά εντοπισμένος σε κερατινοκύτταρα, στις υπερθηλεοειδής περιοχές της φλεγμονής και στις επιμήκεις δερματικές θηλές που περιέχουν τα χαρακτηριστικά ελικοειδή αιμοφόρα αγγεία (Εικόνα 22-25) (Ioannou M. et al, 2009).

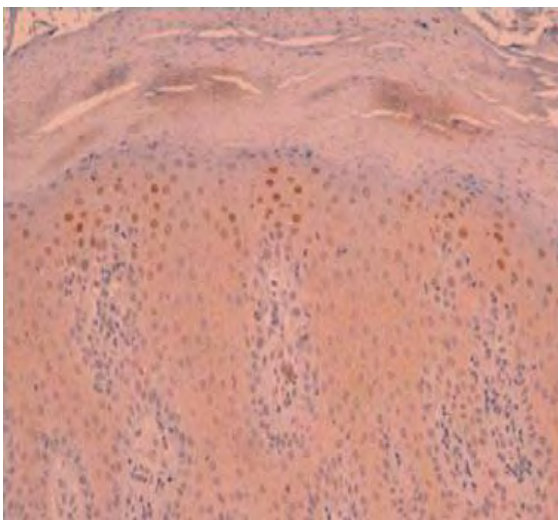
Η πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι αρκετές κυτταροκίνες, εμπλέκονται είτε στην προώθηση (IL-2, IL-12) είτε στη διατήρηση (IL-6, TNFα, IFNγ) της φλεγμονής. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α εμφανίστηκαν υψηλότερα στην ψωρίαση σε σύγκριση με μη προσβεβλημένο δέρμα. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα του HIF-1α συσχετίζονται μόνο με την IL-6, υποδηλώνοντας έτσι μια στενή σχέση μεταξύ HIF-1α και IL-6 στο ανοσο-μικροπεριβάλλον της αγγειογένεσης που εξαρτάται από την υποξία, η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης (Vasilopoulos et al, 2013).



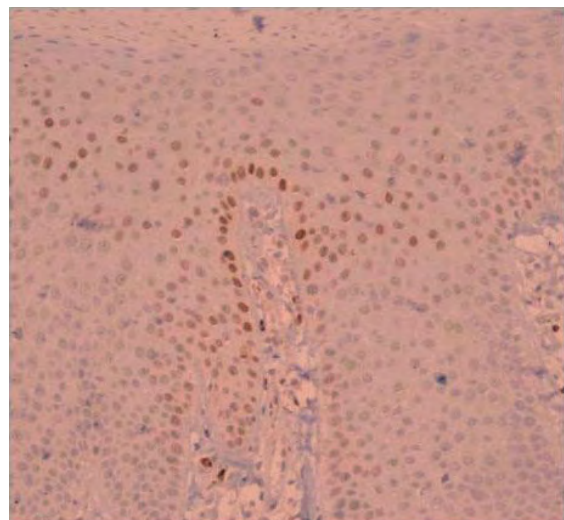
Εικόνα 22: Χρώση ιστού ψωριασικής επιδερμίδας με το αντίσωμα PAb2 που αναγνωρίζει τον HIF-1-α. Παρατηρείται εκτεταμένη και έντονη χρώση στα κερατινοκύτταρα (Ioannou et al, 2009).



Εικόνα 24: Χρώση ιστού ψωριασικής επιδερμίδας με το αντίσωμα PAb2 που αναγνωρίζει τον HIF-1α. Παρατηρείται η χρώση των πυρήνων των κερατινοκυττάρων στην κορυφή των θηλών (Ioannou et al, 2009).



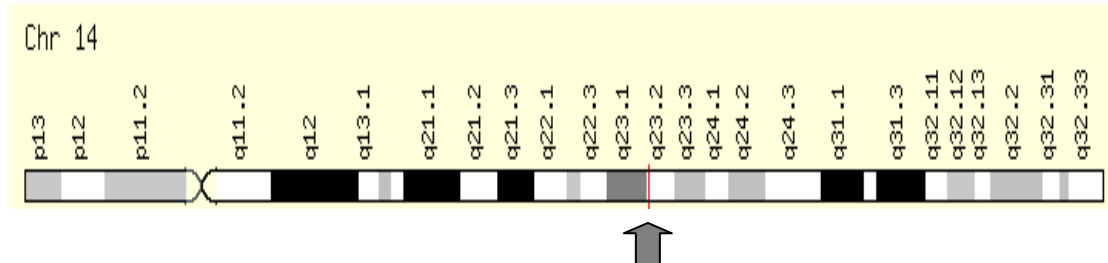
Εικόνα 23: Χρώση ιστού ψωριασικής επιδερμίδας με το αντίσωμα MAb1 που αναγνωρίζει τον HIF-1α. Παρατηρείται έντονη χρώση των κερατινοκυττάρων που επικαλύπτουν κάποιες φλεγμονώδης θηλές (Ioannou et al, 2009)



Εικόνα 25: Χρώση ιστού ψωριασικής επιδερμίδας με το αντίσωμα MAb1 που αναγνωρίζει τον HIF-1α. Παρατηρείται έντονη χρώση των κερατινοκυττάρων δίπλα σε μία θηλή (Ioannou et al, 2009).

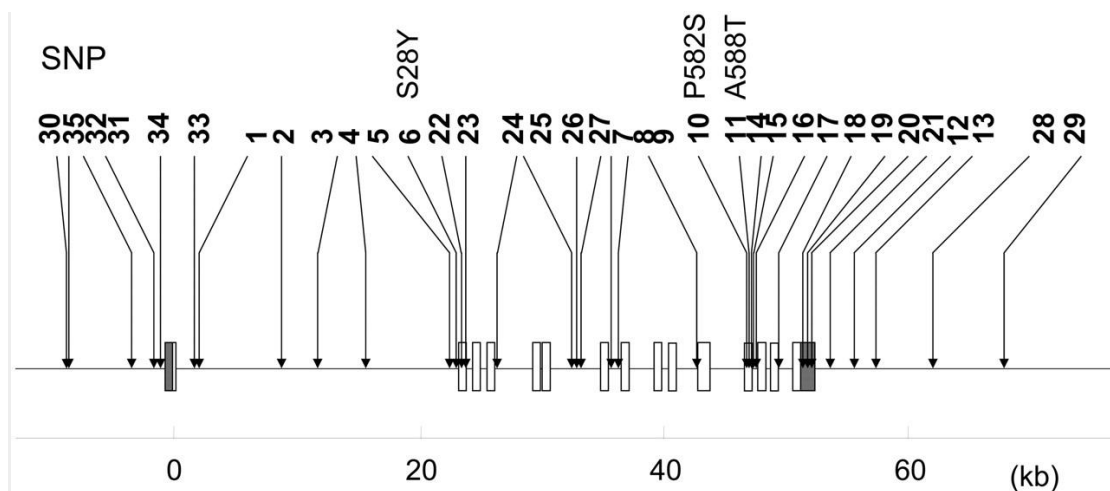
1.3 Πολυμορφισμοί του HIF-1α

Το γονίδιο *HIF-1α* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14q23.2 (Εικόνα 26) και έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 97 πολυμορφισμοί. Οι πολυμορφισμοί αυτοί εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές, μη κωδικές περιοχές, 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές.



Εικόνα 26: Θέση του γονιδίου *HIF-1α* στο χρωμόσωμα 14 (www.ensembl.org)

Από αυτούς οι 35 έχουν συσχετιστεί με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι θέσεις των οποίων εμφανίζονται στην Εικόνα 27. Τρεις από τους 35 πολυμορφισμούς βρίσκονται σε κωδικές περιοχές, ο ένας στο εξώνιο 2 (S28Y) και οι άλλοι δύο στο εξώνιο 12 (P582S, A588T). Ο P582S έχει συσχετιστεί με την παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 όχι όμως με την έναρξη της νόσου. Θα πρέπει να σημειωθεί πως όλοι οι πολυμορφισμοί ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (Yamada et al, 2005).



Εικόνα 27: Θέσεις των SNPs του γονιδίου *HIF-1α* που έχουν συσχετιστεί με το διαβήτη τύπου 2 (Yamada et al, 2005)

Στον πολυμορφισμό S28Y γίνεται αλλαγή της βάσης C→A στη θέση 28. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό P582S, γίνεται αλλαγή της βάσης C→T, στο νουκλεοτίδιο 1772 (C1772T) με αντικατάσταση του αμινοξέος προλίνη σε

σερίνη στη θέση 582. Στον πολυμορφισμό A588T γίνεται μια αλλαγή G→A, στο νουκλεοτίδιο 1790 (G1790A) με αντικατάσταση του αμινοξέος αλανίνης σε θρεονίνη στη θέση 588 (Tanimoto et al, 2003).

Το γονίδιο *HIF-1A* είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό, και η έκφραση και η δραστηριότητά του επηρεάζονται σημαντικά από τους διάφορους πολυμορφισμούς. Εκτός από την έκφρασή του, οι πολυμορφισμοί του *HIF-1A* έχουν επίσης συσχετιστεί με την καρκινογένεση αρκετών κακοηθειών (Boya L. et al, 2014).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι των πολυμορφισμών που σχετίζονται με τον καρκίνο: ορισμένοι συνδέονται με την εμφάνιση του καρκίνου, και άλλοι με την κακοήγη ανάπτυξη του καρκίνου. Οι πολυμορφισμοί P582S και A588T είναι οι πιο συχνά συσχετισμένοι με διάφορους τύπους καρκίνου καθώς και με άλλα νοσήματα. Ο P582S έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου για όλους τους τύπους καρκίνων ενώ ο A588T με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Zhao T et al, 2009). Ο A588T έχει εμπλακεί στην εξέλιξη του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Wang M., 2012). Έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση της συχνότητας τόσο του G1790A όσο και του C1772T σε ασθενείς με καρκίνο των νεφρών (Ollerenshaw M et al, 2004 & Wang M. et al, 2012). Επίσης αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *HIF-1α* έχουν αναφερθεί σε κακοήθειες του στομάχου, του προστάτη, και του οισοφάγου (Tanimoto et al, 2003).

Τέλος κάποιοι από τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *HIF-1α* μπορεί να συσχετιστούν με την προστασία του ασθενή στην έναρξη της νόσου. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε η προστατευτική επίδραση του πολυμορφισμού rs 2057482 σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σε πρώιμο στάδιο (Boya L. et al, 2014)

1.4 Σκοπός

Σε ασθενείς με ψωρίαση έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του γονιδίου HIF-1α σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης και μειωμένα επίπεδα του παράγοντα VHL ο οποίος είναι αυξημένος σε φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης η υπερέκφραση του HIF-1α συσχετίστηκε με την υπερέκφραση της IL-6, η οποία είναι ένας ισχυρός προ-αγγειογενετικός παράγοντας. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο έλεγχος της γενετικής συσχέτισης του γονιδίου *HIF-1α* στην εμφάνιση ψωρίασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης του πολυμορφισμού S28Y ανάμεσα σε ψωριασικούς ασθενείς και σε άτομα του γενικού πληθυσμού.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα

Το γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από λευκοκύτταρα ολικού ανθρώπινου αίματος.

Το πρώτο βήμα της μεθόδου είναι η διάρρηξη των μεμβρανών και η λύση των κυττάρων με τη χρήση απορρυπαντικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA. Ακολουθεί επώαση με πρωτεΐνάση K. Τα υπολείματα κυττάρων, τα θραύσματα των μεμβρανών και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με εκχύλιση.

Ως οργανικός διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μείγμα φαινόλης-χλωροφορμίου. Στην φαινόλη οφείλεται ο διαχωρισμός των φάσεων και η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται αφενός για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαινόλης από την υδατική φάση, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα σε περαιτέρω χρήση του γονιδιωματικού DNA σε ενζυμικές αντιδράσεις και αφετέρου για την εκχύλιση των λιπιδίων. Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή, μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη και προσθήκη ddH₂O.

Στην παρούσα εργασία η απομόνωση του DNA έγινε από κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση και μη προσβεβλημένων ατόμων. Τα δείγματα προέρχονται από την Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (90 δείγματα ασθενών με ψωρίαση και 66 δείγματα μη προσβεβλημένων ατόμων) και την Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης (30 δείγματα ασθενών με ψωρίαση). Απομονώθηκε γενωμικό DNA, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο επώασης με πρωτεΐνάση K και εκχυλίσεων με φαινόλη/χλωροφόρμιο με κατάλληλες τροποποιήσεις.

Διαλύματα

- **20X SSC (3M NaCl, 0.3M Sodium citrate, pH 7.0)**
- **3M CH₃COONa**
40,81gr οξικό νάτριο
σε 10ml ddH₂O τελικό όγκο
ρύθμιση του pH στο 5,2 με σταγόνες CH₃COONa
- **10%SDS (Sodium dodecyl sulfate)**
10gr SDS
σε 100ml ddH₂O
- **Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1 v/v):** 24ml χλωροφόρμιο:
1ml ισοαμυλική αλκοόλη

Αντιδραστήρια

- **SSC:** ρυθμιστικό διάλυμα για την επαναιώρηση των ερυθροκυττάρων.
- **CH₃COONa:** προκαλεί καθίζηση των μεμβρανών και των διαλυτοποιημένων πρωτεϊνών.
- **Απορρυπαντικό SDS:** ανιονικό απορρυπαντικό, που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών και επέρχεται λύση του κυττάρου.
- **Πρωτεΐνάση K:** είναι μια πρωτεάση σερίνης, η οποία μπορεί να πέψει πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες και να ελευθερώσει DNA. Επίσης προστατεύει τα νουκλεϊκά οξέα από τις νουκλεάσες (ένζυμα που διασπούν νουκλεϊκά οξέα).
- **Φαινόλη/ Χλωροφόρμιο:** χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από τη λύση των κυττάρων.
- **Ισοπροπανόλη:** χρησιμοποιείται για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων.
- **Αιθανόλη 70%:** απομακρύνει τα προηγούμενα διαλύματα που μπορεί να εμποδίζουν την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος, π.χ. πέψη με ένζυμα περιορισμού.

Διαδικασία

1. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα αίματος σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρεται 500 ml δείγματος σε erpendorfs, όπου προστίθεται 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 1X SSC. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 3 min στις 13000 rpm.
2. Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη στο ίζημα 1ml 1X SSC. Γίνεται ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 2 min στις 13000rpm.
3. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, προστίθενται 500 ml οξικού νατρίου 0,2M, 50ml SDS 5% και 10ml διαλύματος πρωτεΐνάσης K (10mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους 55°C για περίπου 1h υπό ανάδευση.
4. Προσθήκη 500ml φαινόλη και 500ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000rpm στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorfs, προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm στους 4°C.
6. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα erpendorfs, προστίθεται 1ml ισοπροπανόλης και επώαση για τουλάχιστον 20 min στους -20°C. Μετά την επώαση γίνεται φυγοκέντρηση για 20 min στις 13000 rpm στους 4°C για κατακρήμνιση του DNA.

7. Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml αιθανόλης 75%. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm στους 4°C.
8. Αφαίρεση του υπερκειμένου και επώαση στους 55°C μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη.
9. Αφού στεγνώσει το ίζημα, προστίθενται 100 μl ddH₂O στο DNA, και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

2.2 Ποιοτικός προσδιορισμός DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων σε πήκτωμα, που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Μία από τις μεθόδους ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με διάλυση κατάλληλης ποσότητας στερεής αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα. Η στερεή αγαρόζη διαλύεται με βρασμό και στη συνέχεια στερεοποιείται σε ειδική φόρμα σχηματισμού όπου στερεοποιείται και μετατρέπεται σε ένα πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε μία συσκευή η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων, στο πήκτωμα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο οπότε, καθώς το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, μεταναστεύει από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο.

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μετανάστευσης του DNA. Σε αυτούς περιλαμβάνονται, η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος, και το μέγεθος των μορίων του DNA. Μικρά μόρια DNA μεταναστεύουν ταχύτερα ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος. Η συγκέντρωση της αγαρόζης που επιλέγεται για την ανάλυση κατά την ηλεκτροφόρηση, εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων που θα αναλυθούν.

Στη παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της απομόνωσης του DNA και για τον έλεγχο των προϊόντων της PCR. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σε ζώνες ανάλογα με το μέγεθος και τη στερεοδιάταξή τους (π.χ. η υπερελικωμένη κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και η γραμμική μορφή DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα αγαρόζης). Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται άμεσα λόγω της προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας ένωσης που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων του DNA. Έτσι, φωτίζοντας το πήκτωμα σε υπεριώδες φως, παρατηρούμε αν ήταν επιτυχής ή όχι η απομόνωση του DNA.

Διαλύματα

- **TAE 50x**

Tris Base 2 M

Οξικό οξύ 7,7%

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,05 M

- **Loading buffer 6x**

Μπλε της βρωμοφαινόλης 0,1% w/v

TBE 1X (Tris Base 0,05 M, Βορικό οξύ 0,004 M, EDTA 0,002 M)

Γλυκερόλη 8,7%

Διαδικασία

- Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για την προετοιμασία του πηκτώματος η αγαρόζη διαλύθηκε με θέρμανση σε TAE 1X και προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη loading buffer ώστε να γίνεται εφικτή η παρακολούθηση της μετακίνησης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση και να αποκτήσουν τα δείγματα μεγαλύτερη πυκνότητα. Τέλος, γίνεται παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων υπό υπεριώδες φως.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε τάση 150V για περίπου 20min, μέχρι η χρωστική να διατρέξει αρκετή απόσταση στο πήκτωμα.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική που βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των μορίων DNA από μια θερμοστατική DNA πολυμεράση όπως αυτή του *Thermus aquaticus* (Taq).

Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια), καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται σε έναν κλώνο ενός δίκλωνου μορίου DNA. Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί

την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Το 3' άκρο των υβριδοποιημένων εκκινητών λειτουργεί ως υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση και έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA μέσω διαδοχικής προσθήκης δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Υλικά και αντιδραστήρια

- Μήτρα DNA που περιέχει την περιοχή DNA (στόχος) που πρόκειται να ενισχυθεί
- Ένα ζεύγος εκκινητών με αλληλουχία συμπληρωματική το καθένα για μία από τις αλυσίδες του DNA στόχου
- Taq DNA πολυμεράση
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), οι δομικές μονάδες από τις οποίες η DNA πολυμεράση συνθέτει ένα νέο κλώνο του DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα, που παρέχει ένα κατάλληλο χημικό περιβάλλον για βέλτιστη δραστηριότητα και σταθερότητα της DNA πολυμεράσης
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+})

Διαδικασία

Υπάρχουν τρία κύρια στάδια σε μία PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 έως 40 κύκλους. Αυτό γίνεται σε ένα αυτοματοποιημένο θερμοκυκλοποιητή, που θερμάνει και ψύχει τα σωληνάκια με το μίγμα της αντίδρασης σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται και ο χρόνος που εφαρμόζονται σε κάθε κύκλο εξαρτάται από μια ποικιλία παραμέτρων. Αυτά περιλαμβάνουν το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων (Mg^{2+}) και dNTPs στην αντίδραση, και η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών και το μήκος του προϊόντος που ενισχύεται.

Τα τρία στάδια είναι τα εξής:

- **Αποδιάταξη (Denaturation):** Προκαλείται αποδιάταξη του DNA με διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων παράγοντας μονόκλινα τμήματα DNA μέσω της θέρμανσής του σε υψηλή θερμοκρασία ($94^{\circ}C - 95^{\circ}C$).
- **Υβριδισμός των εκκινητών (Annealing):** Οι δύο εκκινητές υβριδοποιούνται με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία και το μήκος των εκκινητών ($50^{\circ}C-65^{\circ}C$).

- **Επέκταση των εκκινητών (Extension):** Σε αυτό το βήμα η DNA πολυμεράση συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς το εκμαγείο μονόκλωνου DNA με την προσθήκη dNTPs συμπληρωματικά με το πρότυπο στην κατεύθυνση 5' προς 3'. Ο χρόνος επέκτασης εξαρτάται τόσο από την DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται όσο και από το μέγεθος του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα εξαρτάται από τη DNA πολυμεράση.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ζεύγος εκκινητών:

Forward primer: 5' - GGA – TAA – GTT – CTG – AAC – GTC – G - 3'

Reverse primer: 5' – TAA – CTC – ACC – AGC – ATC – CAG - 3'

Οι συνθήκες της PCR, καθώς και οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων σε κάθε αντίδραση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (3, 4):

Πίνακας 3: Συστατικά και συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων

Συστατικά PCR	Ποσότητες συστατικών PCR
DNA εκμαγείο	100-200 ng
Ρυθμιστικό διάλυμα (10X + 1.5mM Mg 1X)	5 µl
MgCl ₂	-
dNTPs(10mM)	1 µl
Εκκινητής Forward (50pmol/ml)	1 µl
Εκκινητής Reverse (20pmol/ml)	1 µl
Taq DNA πολυμεράση(5U/µl)	0,25 µl
ddH ₂ O	Έως 50 µl

Πίνακας 4: Συνθήκες της PCR

Συνθήκες PCR	Θερμοκρασία/Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 4 min
Αποδιάταξη	95°C για 40 sec
Υβριδοποίηση	52° C για 40 sec
Επιμήκυνση	72 ° C για 40 sec
Τελική επιμήκυνση	72 ° C για 10 min

2.4 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού ή ανάλυση Restriction Fragment Length Polymorphism χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει μια παραλλαγή στην αλληλουχία του DNA σε μία θέση η οποία δημιουργεί θέση αναγνώρισης για κάποιο ένζυμο περιορισμού.

Τα ένζυμα περιορισμού είναι πρωτεΐνες που απομονώνονται από βακτήρια τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. Επομένως κάθε ένζυμο περιορισμού εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης σε ένα τμήμα DNA. Μια μετάλλαξη σε μία θέση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ή σε δημιουργία μιας νέας θέσης κοπής. Με την PCR, ενισχύονται επιλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και έτσι δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης RFLP στα ενισχυμένα τμήματα DNA.

Μετά την πέψη τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό βιολογικών μορίων κυρίως πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα.

Ο διαχωρισμός των μορίων στο πήκτωμα εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων, το μέγεθος των πόρων που σχηματίζονται και καθορίζεται από δύο παράγοντες: τη συγκέντρωση ακρυλαμίδης, που εκφράζεται ως % βάρος κατ' όγκο (w/v), και του συνδετικού μορίου Bis, που εκφράζεται ως κλάσμα του συνολικού ποσού ακρυλαμίδιου.

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού S28Y στο γονίδιο *HIF-1α*. Το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε βρέθηκε με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0. Το πρόγραμμα αυτό γνωρίζοντας την αλληλουχία που περιέχει το σημείο του πολυμορφισμού επιλέγει το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που έχει θέση αναγνώρισης το συγκεκριμένο σημείο του πολυμορφισμού. Έτσι επιλέχθηκε το MboI, που αναγνωρίζει την αλληλουχία:



Διαδικασία RFLP

1. Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν 1,5 μl από το προϊόν PCR
2. Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο περιορισμού Mbol και μοιράζεται στα δείγματα DNA
3. Γίνεται ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C ολονύχτια.

Πίνακας 5: Συστατικά και συγκεντρώσεις των συστατικών για την πέψη με το Mbol

Αντιδραστήρια	Πέψη με Mbol
Προϊόν PCR	1.5μl
Ρυθμιστικό διάλυμα	1μl
Ένζυμο Mbol	0.4μl
ddH ₂ O	7μl
Τελικός όγκος	10μl

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8,5% είναι πιο αποτελεσματικό για το διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA (5-500 bp), καθώς η αναλυτική ισχύς του είναι πολύ υψηλή. Η συγκέντρωση του πηκτώματος κυμαίνεται από 8-14% και εξαρτάται από το μήκος του μορίου που έχει ενισχυθεί. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA που προκύπτουν μετά την πέψη με το ένζυμο Mbol όλων των προϊόντων PCR ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος.

- Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 8,5%

Διαλύματα

- **Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδης 30%**
29 gr ακρυλαμίδης
1 gr δις ακρυλαμίδης (N, N-Methylene-bis-acrylamide)
Έως τα 100 ml ddH₂O

- **10X TBE (890mM Tris, 890mM βορικό οξύ, 20mM EDTA)**
121 gr Tris base
61.7 gr βορικό οξύ
80 ml EDTA 0.5M
Έως τα 2 Lt ddH₂O
- **APS 20%**
2 gr υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium persulfate)
10 ml ddH₂O

Διαδικασία

1. Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται: 5gr ουρία, 16.6 ml μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30% και 5 ml 10X TBE
 2. Γίνεται ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα να διαλυτοποιηθεί πλήρως η ουρία
 3. Το διάλυμα διηθείται, σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος ρυθμίζεται με ddH₂O μέχρι τα 62,5 ml
 4. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 64 μl TEMED (tetramethylenediamine) και 400μl APS 20%
 5. Το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή και πολυμερίζεται για περίπου 45min
 6. Τέλος αφαιρείται το χτενάκι και καθαρίζονται τα πηγαδάκια από τα υπολείμματα του πηκτώματος
- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
 1. Τοποθετείται το πήκτωμα σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
 2. Προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE στη συσκευή ηλεκτροφόρησης
 3. Τοποθετούνται τα προϊόντα της πέψης (10μl) μαζί με 5μl loading buffer στα πηγαδάκια
 4. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2h με τάση 250 V

2.6 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι μια τεχνική για την ενίσχυση των ζωνών DNA σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Η διακριτική ικανότητα είναι <1ng DNA.

Ο χρωματισμός του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης περιλαμβάνει την επώασή του σε τρία διαλύματα:

- **Διάλυμα 1 (400ml)**

10ml αιθανόλη 100%

0,5ml οξικό οξύ 99%

Έως τα 400 ml ddH₂O

- **Διάλυμα 2 (200ml)**

Διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 1gr/Lt

- **Διάλυμα 3 (200ml)**

3 gr υδροξειδίου του νατρίου (NaOH)

0,02 gr βοροϋδριδίου του νατρίου (NaBH₄)

1ml φορμαλδεϋδη

έως τα 200 ml ddH₂O

Διαδικασία

1. Τα πηκτώματα επωάζονται δύο φορές με το διάλυμα 1 για 3 min υπό ανάδευση
2. Γίνεται επώαση με το διάλυμα 2 υπό ανάδευση για 15 min. Ακολουθούν δύο πλύσεις με απεσταγμένο νερό (κάθε πλύση έχει διάρκεια 1 min)
3. Γίνεται επώαση με το διάλυμα 3 υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες του DNA
4. Τέλος γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος σε φώς και καταγραφή των αποτελεσμάτων

2.7 Στατιστική ανάλυση

Διεξήχθησαν δοκιμές χ^2 για να εξεταστεί κατά πόσον οι συχνότητες των γονοτύπων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg, μέσω του on-line προγράμματος SISA.

3. Αποτελέσματα

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 66 ασθενείς με ψωρίαση και 51 μη προσβεβλημένα άτομα. Η διάγνωση της ψωρίασης στους ασθενείς και ο έλεγχος της εξέλιξης ή μη της νόσου βασίστηκε στον δείκτη PASI. Στον πίνακα 7 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που πήραν μέρος στην μελέτη:

Πίνακας 7: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (*TA: Τυπική απόκλιση)

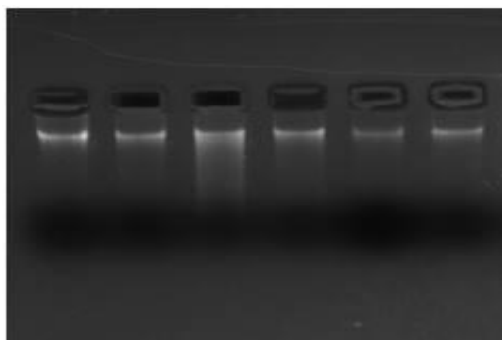
Μεταβλητή	Τιμή
Ηλικία σε έτη, μέσος \pm TA*	40.56 \pm 12.32
Φύλο Α/Θ	32/34
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέσος \pm TA*	5.4 \pm 1.6
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέσος \pm TA*	41.2 \pm 13.4
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	30/66 (46%)
Αρχικό PASI, μέσος \pm TA*	15.45 \pm 2.4

Από τον πίνακα 7 φαίνεται ότι από τους 66 ψωριασικούς ασθενείς, οι 32 είναι άντρες και οι 34 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια περίπου συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών αυτών είναι τα 40 έτη με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 31 έτη και με μέση διάρκεια της ασθένειας τα 5 έτη. Στο 46% των ασθενών με ψωρίαση παρουσιάζεται συσχέτιση και με άλλες ασθένειες, δηλαδή εμφανίζεται συν-νοσηρότητα.

3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

Από όλα τα δείγματα απομονώθηκε γενωμικό DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης

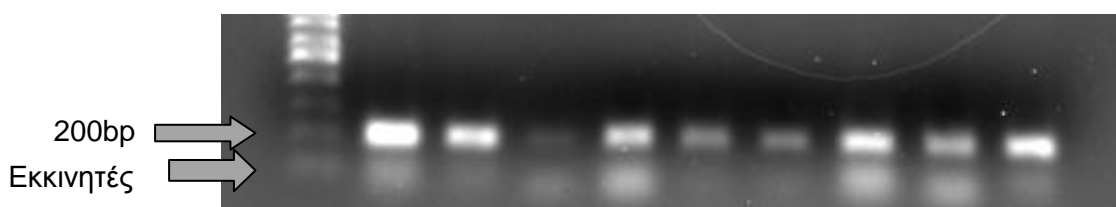
και ποιότητας. Ενδεικτικά, φαίνονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης και της ηλεκτροφόρησης DNA έξι ασθενών σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου HIF-1α με PCR

Το τμήμα του γονιδίου *HIF-1α* το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό S28Y ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Ladder) (Εικόνα 29).

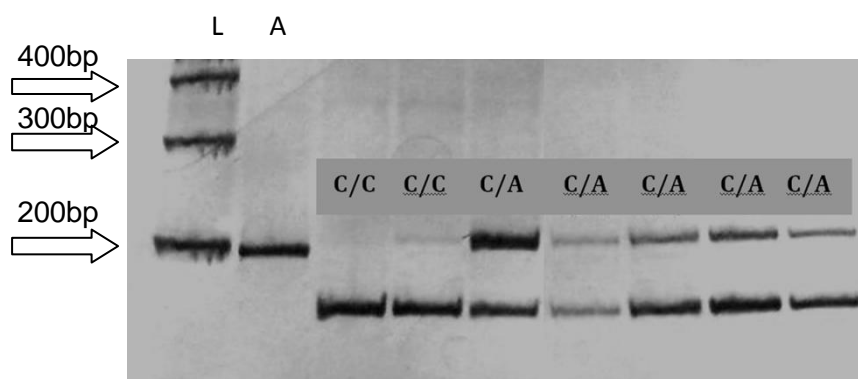


Εικόνα 29: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

3.4 Γονοτύπηση πολυμορφιών με ανάλυση RFLP

Ο προσδιορισμός των γονότυπων των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο RFLP. Στα προϊόντα PCR έγινε πέψη με το ένζυμο *Mbo I*. Από την πέψη με το ένζυμο αυτό, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτουν τμήματα 45 και 155bp, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο A το ένζυμο δεν κόβει. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (CC), ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (AA)

και ετερόζυγων απόμων (CA). Στην εικόνα 30 φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της RFLP.



Εικόνα 30: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό S28Y του *HIF-1α* (L: Ladder, A: άκοπτο προϊόν PCR)

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης των ασθενών για τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε εμφανίζονται στον πίνακα 8:

Πίνακας 8: Γονότυποι των ασθενών για τον πολυμορφισμό S28Y του γονιδίου του *HIF-1α*

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1 Α.Λ.	C/A	44 Α.Λ.	C/C
2 Α.Λ.	C/A	45Α.Λ	C/C
3 Α.Λ.	C/A	46 Α.Λ	C/C
4 Α.Λ.	C/C	47 Α.Λ.	C/C
5 Α.Λ.	C/A	48 Α.Λ.	C/A
6 Α.Λ.	C/C	50 Α.Λ.	C/C
7 Α.Λ.	C/C	51 Α.Λ.	C/A
8 Α.Λ.	C/A	60 Α.Λ.	C/A
9 Α.Λ.	C/A	61 Α.Λ.	C/C
10 Α.Λ.	C/A	69 Α.Λ.	C/C
11 Α.Λ.	C/A	72 Α.Λ.	C/C
12 Α.Λ.	C/A	74 Α.Λ	C/A
14 Α.Λ	C/A	75 Α.Λ.	C/A
15 Α.Λ	C/A	76 Α.Λ.	C/A
16 Α.Λ	C/A	80 Α.Λ.	C/A
17 Α.Λ.	C/A	85 Α.Λ.	C/C
18 Α.Λ.	C/C	1Θ	C/C
19 Α.Λ.	C/C	5Θ	C/C
20 Α.Λ.	C/C	7Θ	C/C
22 Α.Λ	C/C	8Θ	C/C
23 Α.Λ.	C/C	9Θ	C/C

24 Α.Λ.	C/C	10Θ	C/C
25 Α.Λ.	C/C	11Θ	C/C
26 Α.Λ.	C/C	15Θ	C/C
27 Α.Λ.	C/C	18Θ	C/C
28 Α.Λ.	C/C	19Θ	C/C
29 Α.Λ.	C/A	20Θ	C/C
30 Α.Λ.	C/C	25Θ	C/C
32 Α.Λ.	C/C	27Θ	C/C
37 Α.Λ.	C/C	28Θ	C/A
39 Α.Λ.	C/C	29Θ	C/C
40 Α.Λ.	C/A	30Θ	C/C
41 Α.Λ.	C/C	31Θ	C/C

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης των μη προσβεβλημένων ατόμων για τον πολυμορφισμό S28Y που μελετήθηκε εμφανίζονται στον πίνακα 9:

Πίνακας 9: Γονότυποι μη προσβεβλημένων ατόμων για τον πολυμορφισμό S28Y του *HIF-1α*

Κωδικός δείγματος	Γονότυπος	Κωδικός δείγματος	Γονότυπος
1c	C/C	30c	C/C
2c	C/C	32c	C/C
3c	C/C	33c	C/A
4c	C/C	35c	C/A
5c	C/A	37c	C/C
6c	C/A	38c	C/A
7c	C/C	40c	C/A
8c	C/A	41c	C/A
9c	C/A	42c	C/A
10c	C/A	43c	C/A
11c	C/A	44c	C/A
12c	C/A	45c	C/A
13c	C/A	46c	C/A
14c	C/A	47c	C/A
15c	C/C	48c	C/A
17c	C/C	49c	C/A
18c	C/C	50c	C/A
19c	C/C	51c	C/A
20c	C/C	52c	C/A
21c	C/C	53c	C/A
22c	C/C	54c	C/A
23c	C/C	55c	C/C
24c	C/C	64c	C/A

25c	C/C	65c	C/C
28c	C/C	66c	C/C
29c	C/C		

3.5 Έλεγχος ισορροπίας Hardy-Weinberg

Ο έλεγχος των γονοτύπων των πληθυσμών υπό μελέτη έδειξε ότι δεν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) και συνεπώς δεν δύναται να προχωρήσει περαιτέρω στατιστική ανάλυση για τις συχνότητες των πολυμορφισμών.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ανάλυσης συσχέτισης βάσει των γονοτυπικών συχνοτήτων των ασθενών και μη προσβεβλημένων ατόμων

Γονίδιο Πολυμορφισμός	Test	Ασθενείς	Γενικός πληθυσμός
HIF-1α S28Y	Genotypic [CC/CA/AA]	43/23/0	23/28/0

4. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανάλυση συσχέτισης πολυμορφισμών στο γονίδιο *HIF-1α*, και συγκεκριμένα του πολυμορφισμού S28Y, με την εμφάνιση της ψωρίασης σε άτομα του ελληνικού πληθυσμού. Ο παράγοντας HIF-1 αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1α και HIF-1β και είναι ο κύριος μεσολαβητής της αγγειογένεσης που επάγεται από την υποξία (Hamid et al, 2011). Ο HIF-1α υπερεκφράζεται σε ψωριασικούς ασθενείς τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (Vasilopoulos et al, 2013, Ioannou et al, 2009). Επίσης, ο HIF-1α παρατηρήθηκε ότι συσχετίζεται με IL-6 σχετικά με τα αυξημένα επίπεδα στην ψωρίαση, υποδηλώνοντας έτσι μια στενή σχέση μεταξύ HIF-1α και IL-6 στο ανοσομικροπεριβάλλον της υποξία βασιζόμενης αγγειογένεσης η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ψωρίασης (Vasilopoulos et al, 2013). Στο πλαίσιο της ανάλυσης αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος 66 ασθενών με ψωρίαση, και 51 μη προσβεβλημένων ατόμων. Στη συνέχεια ακολούθησε γονοτυπική ανάλυση με τη μέθοδο PCR-RFLP. Από τα άτομα που συμμετείχαν στην συγκεκριμένη μελέτη οι 32 είναι άντρες και οι 34 είναι γυναίκες, επιβεβαιώνοντας έτσι την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Από τη γονοτυπική ανάλυση φαίνεται πως υπάρχει ανισορροπία Hardy-Weinberg στον πληθυσμό υπό μελέτη και έτσι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό S28Y. Αυτό όμως δεν αποκλείει το γεγονός ότι άλλοι πολυμορφισμοί του HIF-1α μπορεί να σχετίζονται με την προδιάθεση της νόσου.

Παρόλα αυτά ο αριθμός των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν σε αυτή τη μελέτη είναι σχετικά μικρός για να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Επιπλέον, οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται μόνο από δύο γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (το 89% των ασθενών προέρχεται από τη Λάρισα και το 11% από την Θεσσαλονίκη). Συνεπώς, τα ποτελέσματα της γονοτύπησης δεν αφορούν τον ελληνικό πληθυσμό στο σύνολό του και ίσως να διαφοροποιούνται σε άλλες περιοχές της Ελλάδας. Γι'αυτό το λόγο, είναι απαραίτητος ο εμπλουτισμός των ασθενών ώστε να επιτευχθεί αύξηση του συνόλου των ασθενών αλλά και να συμπεριληφθούν ασθενείς από διάφορες περιοχές της Ελλάδας για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων που θα αφορούν πλέον την συχνότητα εμφάνισης αυτού του πολυμορφισμού στον ελλαδικό χώρο.

Στο γονίδιο *HIF-1α* έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 97 πολυμορφισμοί. Οι πολυμορφισμοί αυτοί εντοπίζονται σε κωδικές περιοχές, μη κωδικές περιοχές, 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές. Από αυτούς οι 35 έχουν συσχετιστεί με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οι θέσεις των οποίων εμφανίζονται στην Τρεις από τους 35 πολυμορφισμούς βρίσκονται σε κωδικές περιοχές, ο ένας στο εξώνιο 2 (S28Y) και οι άλλοι δύο στο εξώνιο 12 (P582S, A588T) (Yamada et al, 2005).

Ο πολυμορφισμός P582S προκαλεί αλλαγή στη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Yamada et al, 2005). Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε μεγαλύτερη συχνότητα του αλληλομόρφου C σε σχέση με το αλληλόμορφο T (5%). Επίσης και ο πολυμορφισμός A588T προκαλεί αλλαγή στη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α (Tamimoto et al, 2003). Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, και μεγαλύτερη συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου A σε ψωριασικά άτομα σε σχέση με μη προσβεβλημένα άτομα (Wang X et al, 2011). Το γεγονός ότι ο πολυμορφισμός S28Y δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση της ψωρίασης, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο μιας πιθανής συσχέτισης ενός άλλου πολυμορφισμού του γονιδίου *HIF-1α* με την εμφάνιση της νόσου.

Σε μια πρόσφατη μελέτη προσδιορίστηκε το microRNA-210 (miR-210) ως σημαντικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης των T κυττάρων στην υποξία. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε αύξηση του miR-210 (> 100 φορές) σε ενεργοποιημένα T κύτταρα και ειδικά στα Th17 κύτταρα. Η υποξία μέσω του υποδοχέα αντιγόνου T κυττάρου (TCR) και συνυποδοχέα CD28 επιταχύνει και αυξάνει την έκφραση του miR-210. Το miR-210 ρυθμίζεται από τον HIF-1α, ένα βασικό ρυθμιστή της μεταγραφής των Th17. Οι ερευνητές εντόπισαν τον HIF-1α ως στόχο του miR-210, με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασής του. Η διαγραφή του miR-210 προωθεί τη διαφοροποίηση Th17 υπό συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου (Wang et al, 2014).

Στο ψωριασικό δέρμα εκτός από τον παράγοντα HIF-1α, είδαμε ότι και άλλοι προαγγειογενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ψωρίαση είναι αυξημένοι. Αρκετοί πολυμορφισμοί αυτών των παραγόντων έχουν συσχετιστεί με την ασθένεια της ψωρίασης. Με μελέτες σε δείγματα ασθενών με ψωρίαση και μη προσβεβλημένων ατόμων, διαπιστώθηκε ότι οι πολυμορφισμοί στις κυτταροκίνες IL-6 και IL-10 στις θέσεις -174 και -1082 αντίστοιχα, καθώς και ο πολυμορφισμός στη θέση -308 του παράγοντα TNF-α, σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση εκδήλωσης της νόσου (Ahmad et al, 2011). Τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα στους ασθενείς με ψωρίαση και ήδη η θεραπεία με ανταγωνιστές του παράγοντα TNF-α έχει δείξει θετικά αποτελέσματα (Balding et al, 2003).

Βιβλιογραφία

1. Ahmad A Settin, Hanaa A Hassan and Tahia A Hassan. (2011) Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile delta of Egypt, *Indian J Dermatol.* 56(3):272-277
2. Ameen M., MH Allen, SA Fisher, CM Lewis, A. Cuthbert, E. Kondeatis, RW Vaughan, H. Murakami, H. Nakagawa and JNWN Barker. (2005). Corneodesmosin (CDSN) gene association with psoriasis vulgaris in Caucasian but not in Japanese populations. *Clinical and Experimental Dermatology*
3. Asumalathi K, Laitinen T, Lahermo P, Suomela S, Itkonen-Vatjus R, Jansen C (2003). Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in Finnish families not associated with PSORS1. *J. Invest. Dermatol.* 121:735-740.
4. Balding J, Kane D, Wendy L, Lesley MJ, Barry B, Owen S, Oliver F (2003). Cytokine gene polymorphisms: Association with psoriatic arthritis susceptibility and severity.
5. Barker J.N., Jones M.L., Swenson C.L, Sarma V., Mitra R.S., Ward P.A., Johnson K.J., Fantone J.C., Dixit V.M., Nickoloff B.J., (1991). Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. *Journal of immunology* 15,146(4):1192-7.
6. Bhalerao J. & Bowcock Anne M, (1998). The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum. Mol. Genet.* 7:1537-1545
7. Bowcock A.M, Krueger J.G, (2006) Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat. Rev. Immunol.* 5:699-711.
8. Bowcock AM, Cookson WOCM. (2004) The genetics of psoriasis, psoriasis arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 13:R43–55.
9. Boya L, Qingchun L, Yang S, Xiaofei L, Wang Y, Wan S, Zhang Z and Haichuan S (2014) Polymorphisms of HIF1A gene are associated with prognosis of early stage non-small-cell lung cancer patients after surgery *Medical oncology* 10.1007/s12032-014-0877-7
10. Bruskin S, Ishkin A, Nikolsky Y, Nikolskaya T. and Piruzian E. (2011). Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data in Immune-Mediated Diseases
11. Burden A.D. (2000). Identifying a gene for psoriasis on chromosome 6 (Psors1). *Br. J. Dermatol.* 143:238-241
12. Capon F, Helms C, Veal CD et al. (2004) Genetic analysis of PSORS2 markers in a UK dataset supports the association between RAPTOR SNPs and familial psoriasis. *J Med Genet* 41: 459–460.

13. Capon F, Novelli G, Semprini S, Clementi M, Nudo M, Vultaggio P (1999). Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J. Invest. Dermatol.* 112:32-35
14. Capon F, Semprini S, Chimenti S et al. (2001) Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 116: 728–730.
15. Cargill M, Schrodi S.J, Chang M, Garcia V. E, Brandon R, Callis K.P (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet* 80:273-290.
16. Carpon F, Burden AD, Trembath RC et al. (2012) Psoriasis and other complex trait dermatoses: from loci to functional pathways. *J Invest Dermatol* 132:915–22.
17. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. (2006) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis: complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 63: 601-615.
18. Charnockjones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, et al. (1994) Vascular endothelial growth Factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51:524-530.
19. Christa Maes, Geert Carmeliet and Ernestina Schipani, (2012). Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 8:358-366
20. Crawshaw AA, Griffiths CEM & Young HS (2012). Investigational VEGF antagonists for psoriasis. *21;1:33-43*
21. Creamer D., Sullivan D., Bicknell R., Barker J. (2002) Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis* 5, 231–236.
22. Detmar M., Brown L.F., Claffey K.P.(1994) Overexpression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.* 180, 1141-1146
23. Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ (1994).The genetics of psoriasis. *Arch. Dermatol* 130:216-224
24. Eliecer Coto, Jorge Santos-Juanes, Pablo Coto-Segura, Marta Díaz, Javier Soto, Rubén Queiro and Victoria Alvarez (2010) Mutation analysis of the LCE3B/LCE3C genes in Psoriasis *BMC Medical Genetics* 11:45
25. Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M (1999). Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* 7:783-790.
26. Ferrandiz C., Pujol RM., Garcia-Patos V., Bordas X., Smandia JA., (2002). Psoriasis of early and late onset: a clinical and epidemiologic study from Spain. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46:867-73

27. Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. Review article of Nature medicine 9:669-676
28. Ferrara N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. Journal of Molecular Medicine 77(7):527-43
29. Gelfand J.M., Troxel A.B., Lewis J.D., Kurd S.K., Shin D.B., Wang X., Margolis D.J., Strom B.L., (2007). The risk of mortality in the patients with psoriasis: results from a population-based study. Archives of Dermatological 143(12):1493-9.
30. Green M.S., Prystowsky J.H., Cohen S.R., Cohen J.I., Lebwohl M.G., (1996). Infectious complications of erythrodermic psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 34(5 Pt 2):911- 4.
31. Griffiths C.E., Christophers E., Barker J.N., Chalmers R.J., Chimenti S., Krueger G., Leonardi C., Menter A., Ortonne J. P. and Fry L., (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. British Journal of Dermatology 156, 258-262.
32. Haopeng Wang, Henrik Flach, Michio Onizawa, Lai Wei, Michael T McManus & Arthur Weiss (2014) Negative regulation of *Hif1a* expression and T_H17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210 Nature Immunology 15,393–40
33. He´bert H.L, Ali F.R., Bowes J., Griffiths C.E.M., Barton A. and Warren R.B. (2011) Genetic susceptibility to psoriasis and psoriatic arthritis: implications for therapy BJD 166:474-482
34. Heidenreich R, Rocken M and Ghoreschi K, (2009), Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. Review article from International Journal of Experimental Pathology 90:232-248
35. Heidenreich R., Rocken M., Ghoreschi K. et al. (2008) Angiogenesis: the new potential target for the therapy of psoriasis? Drug News Perspect. 21, 97–105.
36. Helms, C., Cao, L., Krueger, J.G., Wijsman, E.M., Chamian, F., Gordon, D., Heffernan, M., Daw, J.A., Robarge, J., Ott, J. *et al.* (2003) A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. Nat. Genet., 35, 349–356
37. Hunter CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nat. Rev. Immunol 5:521-531
38. Hffmeier U, Traupe H, Burkhardt H et al. (2005) Lack of evidence for genetic association to RUNX1 binding site at PSORS2 in different German psoriasis cohorts. J Invest Dermatol 124: 107–110.
39. Ioannou M, Sourli F, Mylonis I, Barbanis S, Papamichali R, Kouvaras E, Zafiriou E, Siomou P, Klimi E, Simos G, Roussaki-Schulze A.-V. and Koukoulis G. (2009). Increased HIF-1 alpha immunostaining in psoriasis compared to psoriasiform dermatitides. Journal of Cutaneous Pathology 36(12):1255-61
40. Jussila L, Valtola L, Partanen TA, Salven P, Heikkilä P, Matikainen MT, et al. (1998) Lymphatic endothelium and Kaposi's sarcoma spindle

- cells detected by antibodies against vascular endothelial growth factor receptor 3. *Cancer Res.* 58:1599-1604.
41. Krueger JG, Bowcock A. (2006). Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 64:30-36.
 42. Lacaud, G., Gore, L., Kennedy, M., Kouskoff, V., Kingsley, P., Hogan, C., Carlsson, L., Speck, N., Palis, J. and Keller, G. (2002) Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro *Blood* 100:458-466
 43. Langley R.G., Krueger G.G., Griffiths C. E., (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann. Rheum. Dis.* 64 Suppl. 2:ii18-23
 44. Lee YA, Ruschendorf F, Windermuth C, Schmitt-Egenolf M, Stadelmann A, Nurnberg G (2000). Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am. J. Hum. Genet* 67:1020-1024
 45. Lonnberg A.S., L. Skov, A. Skytthe, K.O. Kyvik, O.B. Pedersen and S.F. Thomsen. (2013). Heritability of psoriasis in a large twin sample. *British Journal of Dermatology* 2:412-416
 46. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG, (2007), Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866-73
 47. Man XY, Yang XH, Cai SQ, Bu ZY, Zheng M, (2008). Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF. *J Cell Mol Med* 12(2):649-60
 48. Mrowierz U., Kragballe K., Reich K., Spuls P., Griffiths C.E., Nast A., Franke J., Antoniou C., Arenberger P., Balieva F., (2011). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Archives of dermatological Research* 303:1-10.
 49. Mura M, Stewart D, Liu M. (2004) Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol*, 97(5):1605-17
 50. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenish S (2006). Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis susceptibility I gene. *Am J Hum Genet* 78:827-851
 51. Nair, R.P., Stuart, P., Henseler, T., Jenisch, S., Chia, N.V., Westphal, E., Schork, N.J., Kim, J., Lim, H.W., Christophers, E. *et al.* (2000) Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS 1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am. J. Hum. Genet.*, 66, 1833–1844.
 52. Neufeld G. Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors. *13(1):1-22*
 53. Nickoloff BJ & Nestle FO, (2004). Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J. Clin. Invest.* 113(12):1664-75

54. Numasaki M., Fukushi J., Ono M. *et al.* (2003) Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620–2627
55. Nussbaum R.L, McInnes RR, Willard H.F (2007) *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* 10: 257-284
56. Oka Akira, Tomotaka Mabuchi, Akira Ozawa and Hidetoshi Inoko, (2012), Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis, Japanese Dermatological Association
57. Ollerenshaw M., Page T., Hammonds J., Demaine A (2004) Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1 alpha gene are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogene* 153:122-126
58. Piskin G., Koomen C.W., Picavet D., Bos J.D., Teunissen M.B., (2003). Ultraviolet-B irradiation decreases IFN- γ and increases IL-4 expression in psoriatic, lesional skin and in cultured dermal T cells derived from these and lesions. *Exp. Dermatol.* 2003;12:172-180.
59. Qingdong Ke and Max Costa, (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1). *Molecular Pharmacology* 5:1469-1480
60. Rajan P. Nair, Philip Stuart, Tilo Henseler, Stefan Jenisch, Nicholas V. Chia, Eckhard Westphal, Nicholas J.Schork, Jane Kim, Henry W. Lim, Enno Christophers, John J. Voorhees, James T. Elder, (2000), Localization of Psoriasis-Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric to HLA-C. *ScienceDirect.Journal of American Science* 66:374-380.
61. Renkonen, J., Tynnenen, O., Hayry, P., Paavonen, T. and Renkonen, R. (2002) Glycosylation might provide endothelial zip codes for organ-specific Leukocyte traffic into inflammatory sites. *Am. J. Pathol.*, 161, 543–550.
62. Rezvani HR, Nsrein A, LJ Nissen, Ghidafouche, (2011). Hif-1a in epidermis: Oxygen Sensing, Cutaneous Angiogenesis, Cancer and Non-Cancer Disorders. *Eur J Radiol.* 27(1):S18-24
63. Rosenberger C, Solovan C, Rosenberger AD, Jinping L, Treudler R, Ulrich Frei, Kai-Uwe Eckardt and Brown LF. (2007). Upregulation of Hypoxia-Inducible Factors in Normal and Psoriatic Skin. *J Autoimmun.* 28(2-3):122-8.
64. Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L (2004). Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J. Invest Dermatol.* 122:1401-1405
65. Sergey Bruskin, Alex Ishkin, Yuri Nikolsky, Tatiana Nikolskaya and Eleonora Piruzian (2011) Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data in Immune-Mediated Diseases 21:397-416
66. Shibuya M. (2001) Structure and function of VEGf/VEGF receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26: 25-35

67. Speckman RA, Wright Daw JA, Helms C et al. (2003) Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility. *Hum Genet* 112: 34–41.
68. Starnes T., Robertson M.J., Sledge G. *et al.* (2001) Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J. Immunol.* 167, 4137–4140.
69. Stuart P, Nair RP, Abecasis GR et al. (2006) Analysis of RUNX1 binding site and RAPTOR polymorphisms in psoriasis: no evidence for association despite adequate power and evidence for linkage. *J Med Genet* 43: 12–17.
70. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. (2009) Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life* 61: 915-922.
71. Tammela T, Enholm B, Alitalo K and Paavonen K, (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. Review article of *Oxford Journals* 65:550-563
72. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H., Kaneyasu M, Ukon K., Kumazaki T., Oue N., Yasui W., Nakachi K, Poellinger L. and Nishiyama M. (2003) Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Integrative Cancer Research*, 24(11):1779-1783
73. Tiilikainen, A., Lassus, A., Karvonen, J., Vartiainen, P. and Julin, M. (1980) Psoriasis and HLA-Cw6. *Br. J. Dermatol.*, 102, 179–184
74. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R et al. (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264: 1141–1145.
75. Tovar-Castillo L, Cancino-Diaz J, Garzia-Vazquez F, et al, (2007). Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1a, LL-37 and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis. *International Journal of Dermatology* 46(3):239
76. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL et al. (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6: 813-20.
77. Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B (2001). Identification of novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* 38:7-13
78. Vinod Chandran (2010), Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Indian Journal Dermatology*
79. Wang M, Qin C, Cao Q, Ju X, Meng X, Zhu J, Yan F, Li P, Ding Q, Chen J, Gu M, Zhang W, Yui C and Zhang Z (2011) The polymorphisms in the VHL and HIF1A genes are associated with the

- prognosis but not the development of renal cell carcinoma *Annals of oncology* 23:981-989
80. Weedon D, Strutton J. The psoriasiform reaction pattern *Pathology* 2th ed Churchill Livingstone London 75-83.
 81. Westra J, Brouwer E, van Roosmalen Ingrid AM., Doornbos-van der Meer Berder, van Leeuwen M A, Posthumus MD., Kallenberg Cees GM.. (2010). Expression and regulation of Hif-1 α in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC Musculoskelet Disord.* 11:61
 82. White SH, Newcomer VD, Mickey MR, Terasaki PI. (1972) Disturbance of HL-A antigen frequency in psoriasis. *N Engl J Med* 287:740-3.
 83. Y Liu, J G Krueger and A M Bowcock, (2006), Psoriasis: genetic associations and immune system changes *Genes & Immunity*
 84. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. (2005) Genetic variation in the hypoxia-inducible factor-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(10):5841-5847
 85. Yeo E.J., Chun Y.S., Park J.W., (2004). New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem. Pharmacol.* 2004;68:1061
 86. Yiannis Vasilopoulos, Fani Sourli, Efterpi Zafiriou, Eleni Klimi, Maria Ioannou, Zissis Mamuris, George Simos, Giorgos Koukoulis, Angeliki Roussaki-Schulze.(2013). High serum levels of HIF-1 α in psoriatic patients correlate with an over-expression of IL-6.
 87. Zachary IC, Frankel P, Evans M, Pellet-Many C. (2009) The role of neuropilins in cell signalling. *Biochem Soc Trans* 37:1171-8.
 88. Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY (2002). Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21 (PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans. *J Invest Dermatol* 119:1361-1366.
 89. Zhao T, Lv J, Zhao J, Nzekebaloudou M. (2009) Hypoxia inducible factor-1 α gene polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *J Exp Clin Cancer Res* 28:159