



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**FACOLTÀ DI FARMACIA E MEDICINA**  
**Corso di Dottorato in Dermatologia, Anatomia e Chirurgia Plastica**  
**XXV Ciclo**

**TESI DI DOTTORATO**

**RUOLO DEI POLIMORFISMI DEL RECETTORE DELLA**  
**VITAMINA D NELLA SUSCETTIBILITÀ GENETICA**  
**ALLA PSORIASI**

**COORDINATORE DEL CORSO: Prof.ssa Stefania A. Nottola**

**RELATORE: Prof.ssa Laura Ottini**

**CO-RELATORE: Dott. Antonio G. Richetta**

**CANDIDATA: Dott.ssa Valentina Silvestri**

**Anno Accademico 2011/2012**

*A mio padre*

# **INDICE**

	<i>pagina</i>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
LA PSORIASI	2
<i>Epidemiologia</i>	2
<i>Caratteristiche clinico patologiche</i>	4
<i>Patogenesi e fattori di rischio</i>	7
Fattori di rischio genetici	11
Fattori di rischio ambientali	13
LA VITAMINA D	15
IL RECETTORE DELLA VITAMINA D (VDR)	17
<i>Struttura e Funzioni</i>	17
<i>Polimorfismi del VDR</i>	20
VITAMINA D, VDR E PSORIASI	23
<i>Polimorfismi del VDR e psoriasi</i>	26
<b>OBIETTIVI</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>31</b>
CASISTICA	32
ANALISI GENETICA	33
<i>Estrazione di DNA da sangue</i>	33
<i>Genotipizzazione</i>	34
ANALISI FUNZIONALE	36
<i>Estrazione di RNA da sangue</i>	36
<i>Gene-Expression</i>	38
ANALISI STATISTICHE	41
<b>RISULTATI</b>	<b>42</b>
CARATTERISTICHE CLINICOPATOLOGICHE DEI PAZIENTI PSORIASICI	43
<i>Associazioni con la severità della psoriasi</i>	43

ANALISI GENETICA DEI POLIMORFISMI DEL VDR	45
<i>Associazione tra i polimorfismi e il rischio complessivo di psoriasi</i>	45
<i>Associazione tra i polimorfismi le caratteristiche clinicopatologiche</i>	49
ANALISI FUNZIONALE DEI POLIMORFISMI DEL VDR	54
<i>Associazione tra A-1012G e variazioni nell'espressione genica del VDR</i>	54
<b><i>DISCUSSIONE</i></b>	<b>56</b>
<b><i>CONCLUSIONI</i></b>	<b>63</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<b>65</b>

## ***INTRODUZIONE***

## ***LA PSORIASI***

### ***Epidemiologia***

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica sistemica, a prevalente interessamento cutaneo, caratterizzata da un decorso cronico-ricidivante (Nestle FO *et al*, 2009). È una malattia diffusa in tutto il mondo con una prevalenza nella popolazione occidentale stimata intorno al 2-4% (Parisi R *et al*, 2013).

La prevalenza della psoriasi varia considerevolmente fra le diverse popolazioni e fra i vari gruppi etnici considerati, molto probabilmente in relazione ai diversi fattori geografici, ambientali e genetici (Christophers E, 2001).

La psoriasi predilige la popolazione di pelle bianca ed è meno frequente nelle popolazioni afroamericana e orientale (Gelfand JM *et al* 2005; Schafer T, 2006). In Europa la prevalenza risulta più alta nei paesi nordici rispetto a quelli mediterranei, probabilmente per effetto dei fattori climatici ed ambientali (Parisi R *et al*, 2013).

In Italia la prevalenza della psoriasi equivale al 2.9% della popolazione, con una notevole disomogeneità di distribuzione tra le varie regioni; il *range* calcolato varia infatti dallo 0.8% al 4.5% in riferimento alle diverse località considerate (Saraceno R *et al*, 2008).

Le regioni che mostrano una maggiore prevalenza sono il Lazio, l’Abruzzo, il Molise (4.5%) e l’Emilia Romagna (4%), mentre la Sardegna (0.8%) è la regione con la più bassa prevalenza, seguita da Calabria, Puglia e Basilicata (1.6%) (**Figura 1**).

La prevalenza della patologia nei due sessi è sovrapponibile, anche se è stato suggerito che la comparsa della psoriasi sia mediamente più precoce nelle donne rispetto agli uomini in alcuni paesi europei (Parisi *et al*, 2013).

In base all’età di insorgenza, la psoriasi viene generalmente distinta in due tipologie (Griffiths CEM and Barker J, 2007):

- la psoriasi di tipo I, presente in circa il 75% dei casi, è caratterizzata da un esordio precoce (prima dei 40 anni) con un picco di incidenza tra i 16 e i 20 anni, elevata familiarità e spiccata tendenza ad evolvere verso una forma clinica grave e/o generalizzata (Nevitt GJ and Hutchinson PE, 1996);
- la psoriasi di tipo II, definita “ad esordio tardivo”, caratterizzata da un picco di incidenza intorno ai 60 anni, anamnesi familiare positiva solo in un numero limitato di casi e decorso clinico meno grave (Henseler T and Christophers E, 1985).



**Figura 1.** Percentuali di distribuzione della psoriasi nelle regioni italiane (da Saraceno R *et al.* J Eur Acad Dermatol Venereol 2008; 22(3): 324-9).

### *Caratteristiche clinicopatologiche*

La principale caratteristica clinicopatologica della psoriasi è rappresentata dalle tipiche lesioni eritemato-squamose croniche, sormontate da squame bianco-argentee spesso non pruriginose, localizzate più frequentemente a livello dei gomiti, delle ginocchia e del cuoio capelluto (Nestle FO *et al*, 2009).

Dal punto di vista clinico, sulla base della forma assunta dalle lesioni e della loro localizzazione, la psoriasi può essere distinta in:

- **psoriasi volgare:** è caratterizzata da lesioni che appaiono come chiazze eritematose, desquamanti, spesse anche alcuni centimetri, localizzate tipicamente sulla regione estensoria degli arti (gomiti e ginocchia in particolare), ma che con il tempo possono estendersi ed interessare altri distretti cutanei (Griffiths CEM *et al*, 2007). Rappresenta la forma più comune e assume spesso una denominazione particolare a seconda della sede, dell'estensione e della gravità (**Figura 2A**);
- **psoriasi guttata:** è contrassegnata dalla rapida comparsa di lesioni guttate (da pochi millimetri a poco più di un centimetro), puntiformi e con piccole squame, sparse con regolarità e simmetria su tutta la superficie cutanea prediligendo la zona del tronco e del volto. Spesso si manifesta in età giovanile ed è generalmente associata ad un episodio infiammatorio del cavo orale o delle prime vie aeree soprattutto di origine streptococcica (streptococco  $\beta$ -emolitico di gruppo A) (Martin BA *et al*, 1996; Griffiths CEM and Barker J, 2007) (**Figura 2B**);
- **psoriasi pustolosa:** ne esistono tre forme principali; *Palmo-plantare di Barber* che rappresenta la forma più comune, si manifesta sulla superficie delle mani e dei piedi con pustole di 2-4 millimetri; *Acrodermatite di Hallopeau* che si manifesta sui polpastrelli, sulla regione peri-ungueale, mentre l'interessamento della matrice ungueale determina la completa perdita dell'unghia; *Generalizzata di Von Zumbush* che si osserva nei giovani adulti ed in cui le lesioni sono di tipo eritematoso e ricoperte da pustole, localizzate al tronco e agli arti (Ayala F, 2007). Si associa ad una compromissione dello stato generale con malessere, febbre e astenia (Robinson A *et al*, 2012) (**Figura 2C**);
- **psoriasi eritrodermica:** forma generalizzata con cute intensamente eritematosa, edematosa e desquamante; si associa ad una compromissione dello stato generale con



febbre, linfadenopatie, complicanze infettive, ipoalbuminemia (Griffiths CEM and Barker J, 2007) (**Figura 2D**);

- **psoriasi inversa:** le lesioni coinvolgono le regioni caldo-umide come il solco intergluteo, le pieghe ascellari, inguinali e sottomammarie, l'ombelico. I traumi continui cui sono soggette tali regioni favoriscono il fenomeno di Koebner (Griffiths CEM and Barker J, 2007). In corrispondenza delle pieghe le lesioni tendono ad assumere un colorito rosso vivo, lucido, senza molte squame (**Figura 2E**);
- **psoriasi ungueale:** le lesioni ungueali possono assumere diverse forme cliniche, ovvero il pitting (rappresentato da piccole depressioni puntiformi), la lesione a macchia d'olio (espressione di un danno alla matrice), l'onicolisi, l'ipercheratosi sub ungueale e l'emorragia a scheggia (Farber EM and Nall ML, 1974; Griffiths CEM and Barker J, 2007). Tale forma risulta strettamente associata alla psoriasi artropatica (**Figura 2F**);
- **psoriasi artropatica:** rappresenta una seria complicazione del quadro clinico della psoriasi che colpisce circa il 10-30% dei pazienti (Moll JMH and Wright V, 1973). Classificata nell'ambito delle spondiloartriti sieronegative, presenta una vasta eterogeneità per numero e tipo di articolazioni colpite. I distretti più interessati sono le articolazioni distali delle mani e dei piedi e le sincondrosi sacro-iliache (Gladman DD *et al*, 2005). Ha un picco d'incidenza tra i 20 e i 40 anni. Nel 75% dei soggetti la psoriasi precede anche di anni la comparsa dell'artrite; nel 15% dei casi le diverse manifestazioni cliniche compaiono contemporaneamente e solo nel 10% dei casi l'artrite precede la comparsa della psoriasi (Helliwell PS and Taylor WJ, 2005) (**Figura 2G**).

In base alla gravità (estensione sulla superficie corporea) la psoriasi può essere considerata lieve in presenza di un numero limitato di placche, in genere meno del 3% della superficie cutanea è interessata, moderata se dal 3 al 10% della superficie cutanea è occupato da placche, e severa quando oltre il 10% della superficie cutanea è interessata (Meier M and Sheth PB, 2009).



**Figura 2.** Tipologie di psoriasi: (A) volgare, (B) guttata, (C) pustolosa, (D) eritrodermica, (E) inversa, (F) ungueale, (G) artropatica.

### ***Patogenesi e Fattori di Rischio***

La psoriasi è considerata una genodermatosi con ereditarietà poligenica le cui manifestazioni cliniche sono determinate dalla combinazione di fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali scatenanti (Kavli *et al*, 1985; Elder JT *et al*, 2009). La sua patogenesi è dunque multifattoriale ed è condizionata da un'abnorme risposta immunitaria, probabilmente scatenata contro un antigene epidermico (Lowes MA *et al*, 2007).

Sin dal 1970 si è ritenuto che la presenza massiva in pazienti psoriasici di cellule del sistema immunitario, specialmente cellule dendritiche e linfociti T, suggerisse un possibile ruolo patogenetico per la disregolazione del sistema immunitario nella psoriasi (Braun-Falco O and Burg G, 1970; Bos JD *et al*, 1983; Nestle FO *et al*, 1994). Nonostante i dati di letteratura non forniscano sufficienti evidenze che la psoriasi sia una vera e propria patologia autoimmune, essa condivide con altre patologie immuno-mediate, come il morbo di Crohn e il diabete mellito, alcune caratteristiche manifestazioni sistemiche, tra cui uno stato di infiammazione cronica in assenza di un antigene noto (Davidson A and Diamond B, 2001).

Per questi motivi, si ritiene che le lesioni psoriasiche evolvano dall'interazione tra le cellule e i mediatori dell'immunità innata ed adattativa e i tessuti connettivo ed epiteliale cutaneo (Schon MP and Boehncke WH, 2005). Il modello patogenetico proposto include la presenza di tre fasi fondamentali: una fase di sensibilizzazione (*disease initiation*), una fase silente, ed una fase effettrice (*disease maintenance*) (**Figura 3**).

Durante la fase di sensibilizzazione, che può essere innescata da traumi fisici o infezioni batteriche, le cellule dendritiche (DC) vengono attivate dopo contatto con l'antigene, migrano nei linfonodi, e successivamente inducono il differenziamento delle cellule T naive in cellule T helper (Th) 17 e Th1 effettrici o citotossiche (Nestle FO *et al*, 1994, 2009). Questa fase non è accompagnata da alcuna alterazione cutanea. Tra la fase di sensibilizzazione e la fase effettrice può aver luogo una fase silente di durata variabile (Sabat R *et al*, 2007).

La fase effettrice è composta a sua volta da tre eventi che si ripetono ad ogni episodio di recidiva: l'infiltrazione cutanea da parte delle cellule infiammatorie, l'attivazione delle

cellule immunitarie nella cute e la risposta cheratinocitaria (Sabat R *et al*, 2007).

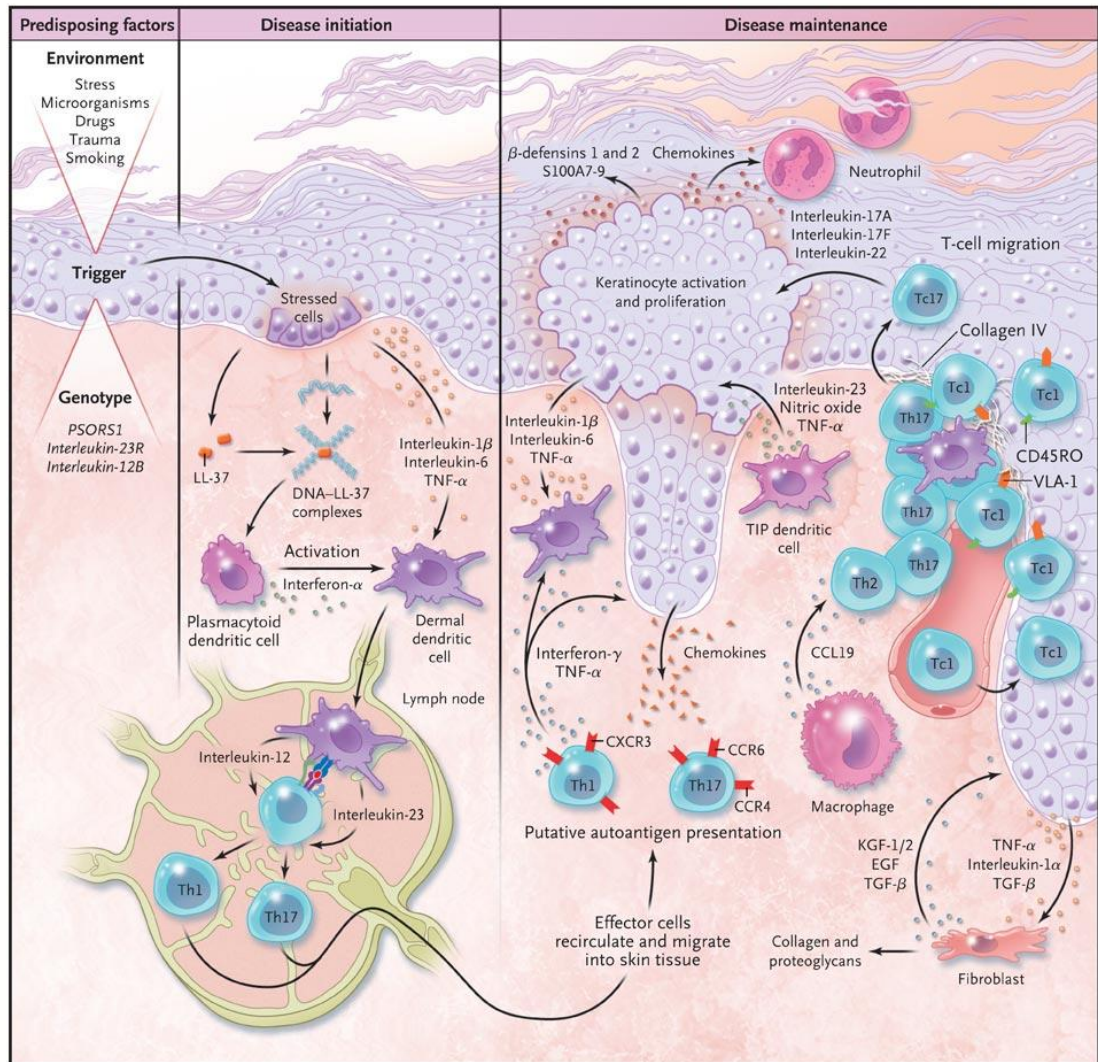
Successivamente all'infiltrazione cutanea di macrofagi, diverse sottopopolazioni di DC, cellule T e neutrofili, i processi chiave di attivazione di tali cellule prevedono il rilascio di mediatori pro-infiammatori quali principalmente l'interleuchina (IL) 23, ossido nitrico e TNF- $\alpha$  da parte delle DC, la produzione di IL-17 e IL-22 ad opera dei Th-17 e di interferone (IFN)  $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ad opera dei Th-1/Tc-1 (Boyman O *et al*, 2007).

I cheratinociti sono inizialmente attivati dai mediatori prodotti dalle cellule Th1, successivamente dai mediatori delle cellule Th17, seguite da quelli prodotti dai macrofagi e DC; infine gli stessi cheratinociti producono mediatori come TGF- $\alpha$ , NGF (nerve growth factor), IL-19, IL-20 e IL-22, che diventano progressivamente predominanti nell'attivazione cheratinocitaria (Albanesi C *et al*, 2007; Nestle FO *et al*, 2009).

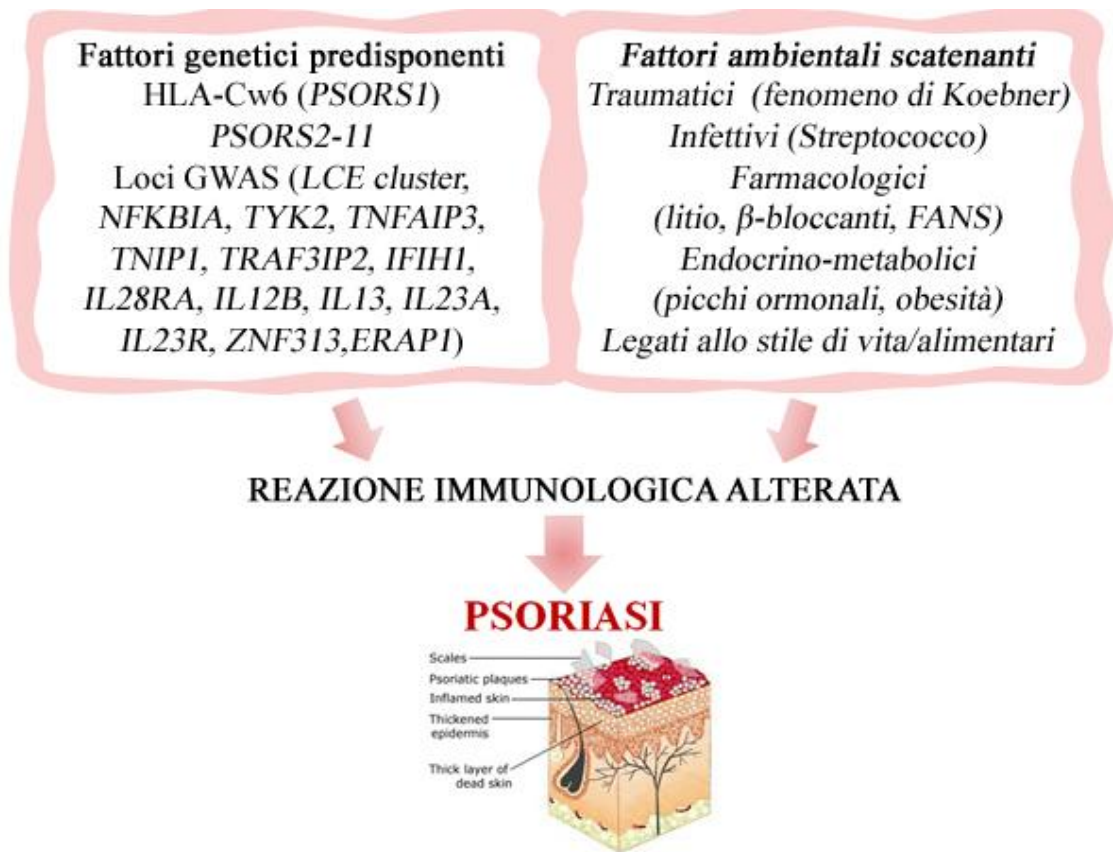
L'attivazione dei cheratinociti conduce verso un incremento della loro proliferazione e un'alterazione della loro maturazione. Inoltre i cheratinociti attivati si rendono responsabili della produzione di numerosi mediatori, peptidi antimicrobici e chemochine, in grado di mantenere il processo infiammatorio ed indurre angiogenesi (Sabat R *et al*, 2007).

Dopo un trattamento di successo, la fase effettrice converge verso quella silente, e così via in relazione al decorso cronico-ricidivante dell'affezione.

Sono numerosi i fattori in grado di scatenare la comparsa clinica della psoriasi. Essi agiscono mediante l'attivazione di una reazione immunologica linfocito-mediata in soggetti con una predisposizione genetica a sviluppare la malattia. I principali fattori di rischio per la psoriasi sono riassunti in **figura 4**.



**Figura 3.** Modello patogenetico della psoriasi (da Nestle F.O. *et al*, N Engl J Med 2009; 361:496-509).



**Figura 4.** Principali fattori di rischio per la psoriasi.

### *Fattori di rischio genetici*

Il maggior fattore di rischio per l'insorgenza della psoriasi è rappresentato dalla storia familiare positiva per la patologia (Farber EM *et al*, 1974). Si stima che circa il 30% dei pazienti psoriasici abbia almeno un membro della famiglia affetto dalla stessa patologia (Andressen C and Henseler T, 1982). Ciò evidenzia una forte componente genetica nell'eziologia della psoriasi.

Tra i fattori di rischio genetici della psoriasi, come della maggior parte delle patologie autoimmuni, riveste un ruolo fondamentale l'associazione con il locus HLA (Human Leucocyte Antigene), nota da oltre 40 anni (Russell TJ *et al*, 1972; Liu Y *et al*, 2007).

Il locus *PSORS1* è localizzato sul cromosoma 6p21.3 in una regione di 1-2 cM comprendente il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) in cui sono localizzati i geni per gli *HLA-C*. Questa regione è considerata il maggior locus di suscettibilità alla psoriasi ed è responsabile del 30-50% dei casi della malattia (Trembath *et al*, 1997, Nair RP *et al*, 2006). Studi sull'associazione tra la psoriasi e specifici antigeni del MHC hanno evidenziato come gli antigeni di classe I -B13, -B17, -Cw6, -Cw7 e gli antigeni di classe II -DR4 e -DR7 sono maggiormente espressi nei pazienti psoriasici rispetto alla popolazione di controllo (Nair RP *et al*, 2006).

In particolare l'HLA-Cw6 si riscontra soprattutto nei pazienti del Nord-Europa e degli Stati Uniti, ed alcuni studi hanno dimostrato che il 10% degli individui che possiedono l'allele HLA-Cw06 sviluppa la malattia. Inoltre, l'allele HLA-Cw06 presenta una forte associazione con la psoriasi di tipo I e la psoriasi guttata (Naldi L *et al*, 2001; Asumalahti K *et al*, 2003).

Nell'allele -Cw06 è stata osservata una sostituzione alanina>treonina in posizione 73. L'alanina svolgerebbe un ruolo importante nell'induzione della malattia in quanto situata nel dominio dell'elica  $\alpha 1$ , probabile sito di legame per i peptidi antigenici, potendo dunque modificare l'affinità di legame di questa regione, e determinando anomalie nella presentazione dell'antigene al sistema immunitario (Oka A *et al*, 1999).

Sono stati studiati e analizzati anche numerosi loci non-MHC. La localizzazione del secondo locus di suscettibilità alla psoriasi (*PSORS2*) sul cromosoma 17q25, in prossimità dei geni coinvolti nella regolazione del sistema immunitario, è stata dimostrata da numerosi gruppi di ricerca in famiglie psoriasiche appartenenti a differenti popolazioni Caucasiche (Enlund *et al*, 1999; Nair *et al*, 1997). È stato

suggerito che il gene di suscettibilità presente nella regione sia *SLC9A3R* (Helms *et al*, 2003). In particolare, un polimorfismo in questo gene rimuove un sito di legame per il fattore di trascrizione RUNX1 (runtrelated transcription factors) e mostra un'elevata associazione con la malattia (Capon *et al*, 2004).

Sono stati identificati altri loci non-MHC (PSORS 3-11) localizzati in prossimità di loci di suscettibilità per altre malattie immunologicamente mediate come il morbo di Crohn (Matthews *et al*, 1996; Capon F *et al*, 1999; Enlund F *et al*, 1999; Veal CD *et al*, 2001; Hensen P *et al*, 2003; Asumalahti K *et al*, 2003; Sagoo GS *et al*, 2004). Di particolare interesse nella psoriasi il locus PSORS4, situato all'interno del "complesso di differenziamento dell'epidermide", una regione estremamente interessante per lo studio delle patologie dermatologiche in quanto implicata nella formazione di uno strato corneo funzionale (Capon F *et al*, 2001).

Recentemente, gli studi di *Genome-wide Association* (GWAS) si sono rivelati particolarmente indicati per l'identificazione di alleli di suscettibilità per le malattie complesse. Ad oggi, attraverso studi di tipo GWAS, sono stati identificati numerosi alleli di suscettibilità alla psoriasi. GWAS effettuati su ampie casistiche di pazienti affetti da psoriasi hanno confermato l'associazione della patologia con alcuni loci di suscettibilità identificati attraverso analisi di *linkage*, come *PSORS1*, ma hanno anche identificato circa 20 nuovi alleli di suscettibilità (Chandran V, 2012). È interessante notare che questi alleli corrispondono a polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) presenti in geni coinvolti in diversi *pathway* legati all'insorgenza e alla progressione della psoriasi, come i pathway della risposta immunitaria innata (via di NFκB) e adattativa (*HLA-C*, *ERAPI*), dell'integrità della barriera epidermica (*LCE*) e la via di *signaling* delle cellule Th17 (interleuchine) (Hebert HL *et al*, 2011).



### *Fattori di rischio ambientali*

I fattori ambientali che vanno ad agire sul substrato poligenico sono di varia natura; quelli maggiormente implicati sono di tipo traumatico, infettivo, farmacologico, endocrino-metabolico, alimentare e psicologico (Barker J, 1991; Enamandram M and Kimball AB, 2013).

Qualsiasi trauma di tipo fisico, come le ustioni, le cicatrici chirurgiche o i colpi accidentali, possono provocare, in persone predisposte, la comparsa di chiazze psoriasiche nelle sedi interessate. Il fenomeno dell'isomorfismo reattivo è un esempio del ruolo esercitato dai fattori traumatici sullo sviluppo della psoriasi. Descritto per la prima volta da Heinrich Koebner, famoso dermatologo tedesco del XIX secolo, il fenomeno di Koebner o reazione isomorfa indica la comparsa di una lesione psoriasica su cute apparentemente sana in seguito ad insulti di origine traumatica (Weiss G *et al*, 2002). Generalmente si realizza entro due settimane dall'evento traumatico in corrispondenza della sede colpita ma il periodo di latenza può essere anche più breve (3 giorni) o molto più lungo (persino un anno).

Anche i raggi solari, che solitamente migliorano il quadro clinico della maggior parte dei pazienti, in alcuni soggetti (in particolare quelli con fototipo I e II, gli anziani e le donne) possono determinare un peggioramento della psoriasi agendo da fattore traumatico. Viene infatti definita psoriasi fotosensibile quella forma di dermatosi in cui si assiste al peggioramento o la comparsa di nuove lesioni in seguito ad esposizione solare (Rutter KJ *et al*, 2009). L'incidenza della psoriasi fotosensibile varia dal 14% al 24% in base ai diversi studi, mentre il fototipo ne rappresenta il più importante fattore di suscettibilità (Nalluri R *et al*, 2010).

Le infezioni non solo a carico della cute, ma anche degli organi interni rappresentano degli importanti elementi che possono scatenare una psoriasi latente. È noto il ruolo delle infezioni streptococciche nell'eziopatogenesi della psoriasi guttata che si manifesta mediamente entro 15 giorni dall'esordio della malattia (McFadden *et al*, 2009). Più raramente possono essere considerate fattori scatenanti le malattie esantematiche (morbillo e varicella) e l'HIV (Naldi L *et al*, 2005; Patel RV and Weinberg JM, 2008).

Anche l'assunzione di alcuni farmaci può rappresentare un fattore di rischio. I farmaci possono interferire con la psoriasi in vario modo: aggravando una psoriasi preesistente,

provocando la comparsa di lesioni su aree cutanee precedentemente non coinvolte, determinando la comparsa di psoriasi *ex novo*, favorendo una resistenza al trattamento (Milavec-Puretić V *et al*, 2011). Tra i farmaci più frequentemente implicati troviamo gli antimalarici, il litio, i  $\beta$ -bloccanti e i FANS (Basavaraj KH *et al*, 2010).

Per quanto riguarda i fattori endocrini, l'esistenza di picchi d'incidenza alla pubertà e in menopausa, ha da sempre fatto supporre l'interferenza di fenomeni di natura ormonale. La psoriasi può peggiorare durante l'assunzione di estrogeni e nel periodo pre-mestruale (Hall G and Phillips TJ, 2005).

Numerose sono le evidenze cliniche circa l'influenza delle patologie dismetaboliche sulla comparsa o sull'aggravamento della psoriasi. Le dislipidemie e l'obesità in particolare esercitano degli effetti notevoli sull'affezione cutanea (Naldi L *et al*, 2005).

Ansia e stress sono molto spesso elementi scatenanti di psoriasi che alterano i meccanismi immunitari dell'organismo (Raychaudhuri SP and Gross J, 2000). È ampiamente riconosciuto che lo stress rivesta un ruolo importante come fattore scatenante della psoriasi sia nella prima manifestazione, sia come aggravamento di una forma già esistente (Heller MM *et al*, 2011). Eventi stressanti possono peggiorare la severità della psoriasi e perfino allungare il periodo delle fasi di riacutizzazione. La percentuale di soggetti psoriasici che pensa che lo stress alteri la condizione della loro pelle (*stress-responders*) è particolarmente alta: dal 37% al 78% (Basavaraj KH *et al*, 2011). Se lo stress rappresenta un fattore che favorisce la psoriasi, d'altra parte molto più frequentemente esso interviene quale fattore aggravante, in relazione al disagio individuale generato dalla psoriasi (Verhoeven EWM *et al*, 2009).

Numerosi studi hanno confermato un più alto consumo di alcool nella popolazione psoriasica. L'abuso di alcool non solo agisce come fattore scatenante, ma anche come fattore aggravante la patologia, provocando una maggiore estensione delle lesioni con una più evidente componente infiammatoria (Jankovic *et al*, 2009).

Infine, si calcola che in circa il 25% dei pazienti psoriasici la patologia sia scatenata dal fumo di sigaretta, il quale è stato associato in particolar modo con la psoriasi pustolosa palmo-plantare (Naldi L *et al*, 2005; Jin Y *et al*, 2009). Esiste un'associazione dose-risposta statisticamente significativa tra il numero di sigarette fumate e il rischio di malattia, con una correlazione più consistente per il sesso femminile (Setty AR *et al*, 2007).

## **LA VITAMINA D**

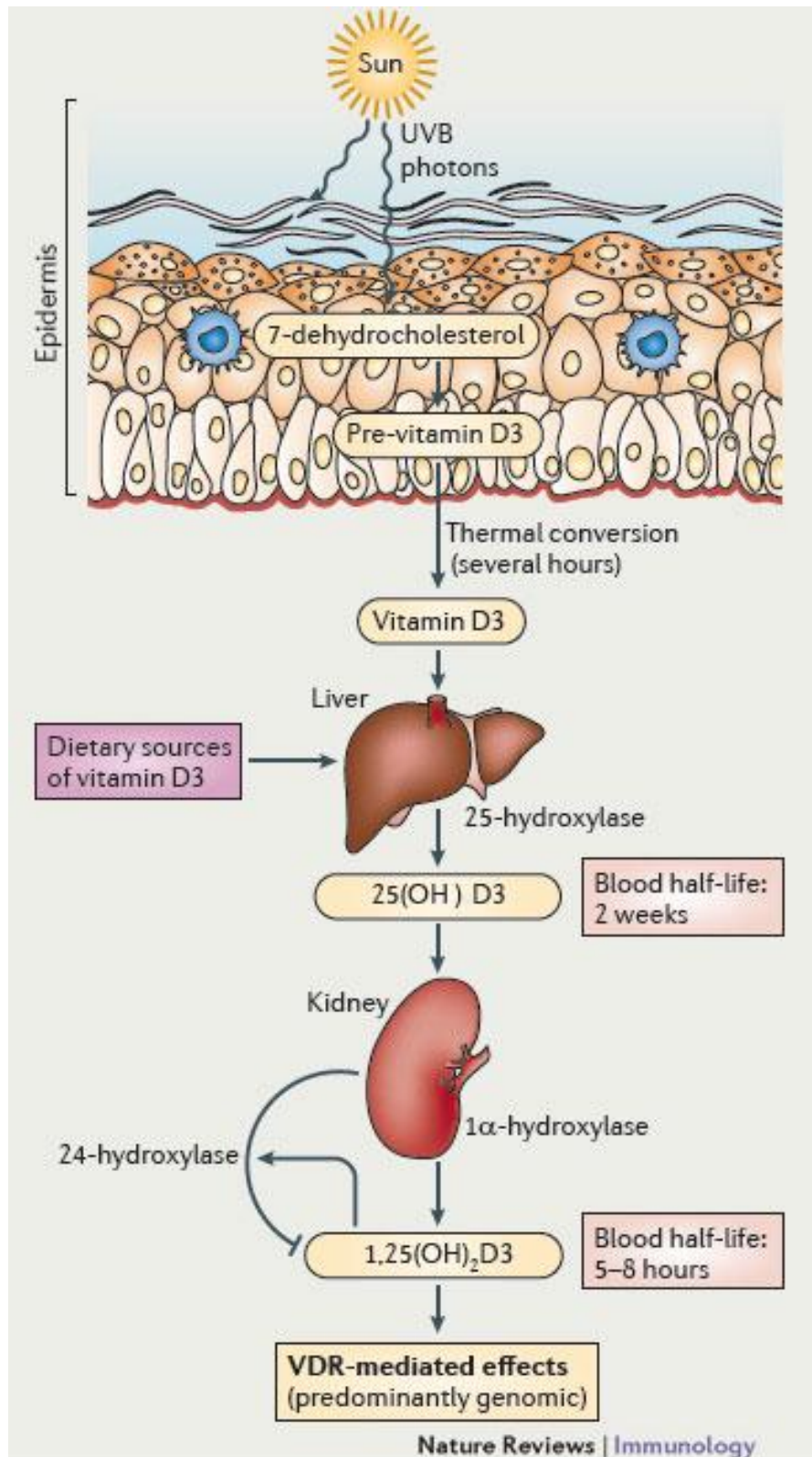
La vitamina D è un gruppo di pro-ormoni liposolubili costituito da 5 diverse vitamine: vitamina D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>. Le due più importanti forme della vitamina D sono la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferolo) e la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferolo). Il colecalfiferolo (D<sub>3</sub>), derivante dal colesterolo, è sintetizzato negli organismi animali e rappresenta quindi la forma di vitamina D più abbondante, mentre l'ergocalciferolo (D<sub>2</sub>) è di provenienza vegetale e viene generalmente assunto dalla dieta (Norman AW, 2008).

Il metabolismo della vitamina D<sub>3</sub> è schematizzato in **figura 5**. La vitamina D<sub>3</sub> ottenuta dall'esposizione solare o attraverso la dieta è presente in una forma biologicamente non attiva e deve subire due reazioni di idrossilazione per essere trasformata nella forma biologicamente attiva, il calcitriolo (Holick MF and Garabedian M, 2006).

La vitamina D<sub>3</sub> viene trasportata al fegato, dove viene metabolizzata dall'enzima 25 $\alpha$ -idrossilasi (CYP2R1) in 25(OH)D<sub>3</sub> (25-idrossivitamina D<sub>3</sub>); esso rappresenta il precursore circolante della vitamina D attiva, e viene usata per determinare i livelli di vitamina D nei pazienti (Holick MF and Garabedian M, 2006). La 25(OH)D<sub>3</sub> è veicolata in circolo dalla *vitamin D binding protein* (DBP) e la sua trasformazione nella forma attiva, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25 diidrossivitamina D<sub>3</sub> o calcitriolo) avviene a livello renale ad opera dell'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi (CYP27B1) (Dusso AS *et al*, 2005).

La vitamina D promuove l'assorbimento intestinale e renale del calcio ed è indispensabile per lo sviluppo ed il mantenimento della massa ossea (Norman AW, 2008), ma vi sono anche cellule di altri organi ed apparati che hanno recettori per la vitamina D, quali ad esempio il cervello, la prostata e la mammella, che rispondono alla forma attiva della vitamina D (Rojas-Rivera *et al*, 2010). Inoltre, alcuni di questi tessuti esprimono l'enzima 1 $\alpha$ -idrossilasi (Hewison M *et al*, 2004).

La vitamina D è anche coinvolta nei processi di controllo della proliferazione e della differenziazione cellulare, nonché nella immuno-modulazione. Direttamente o indirettamente 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> controlla più di 200 geni, responsabili della regolazione di proliferazione cellulare, differenziazione cellulare, apoptosi e angiogenesi (Deluca HF and Cantorna MT, 2001). La maggior parte degli effetti dell'1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sui tessuti bersaglio è dovuta al legame della vitamina con il suo recettore nucleare ad alta affinità (VDR), che agisce come fattore di trascrizione attivato dal ligando (Dusso AS *et al*, 2005).



**Figura 5.** Rappresentazione schematica del metabolismo della vitamina D (modificata da Hart PH et al, Nature Reviews Immunology 2011;11:584-596)

## ***IL RECETTORE DELLA VITAMINA D (VDR)***

### ***Struttura e funzioni***

Il gene del recettore della vitamina D (*VDR*) è situato sul cromosoma 12, in posizione 12q13-14 (**Figura 6**). Esso si estende per circa 75 kb ed è organizzato in 14 esoni (Taymans SE *et al*, 1999). In particolare, i 6 esoni da 1a a 1f codificano per la regione 5' non tradotta mentre gli 8 esoni dal 2 al 9 codificano per la proteina VDR (Baker AR *et al*, 1988).

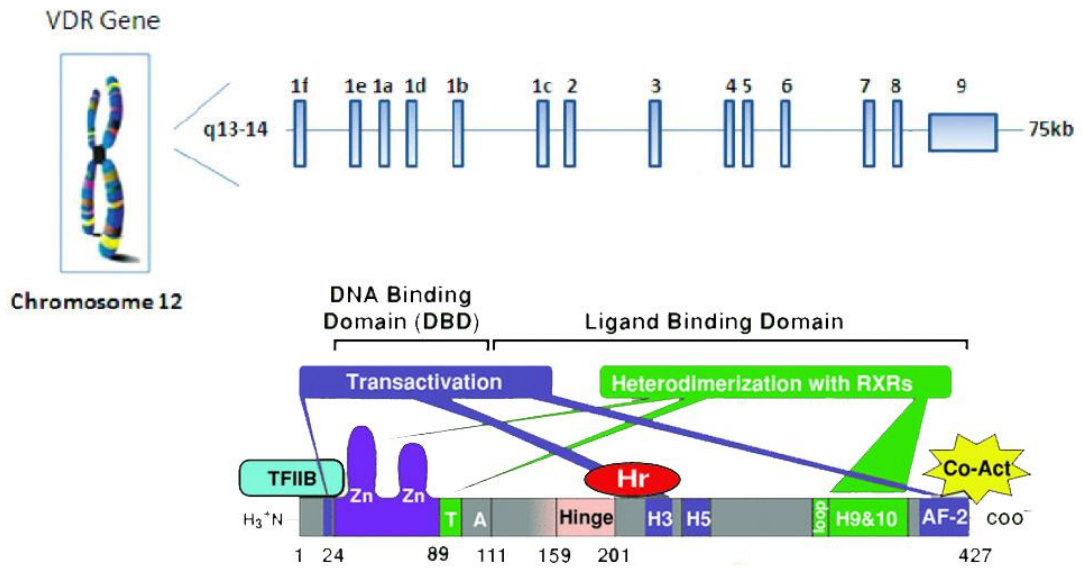
I promotori del *VDR* si trovano negli esoni 1d, 1a e 1f e danno luogo a diversi trascritti tessuto specifici (Crofts LA *et al*, 1998). In particolare, il *VDR* è espresso nelle cellule dell'epitelio intestinale, nei tubuli renali, nelle cellule della ghiandola paratiroidea, nei cheratinociti e fibroblasti dell'epidermide, nel tessuto mammario, nel pancreas, nella ghiandola pituitaria, nelle cellule del tessuto scheletrico (osteoblasti e condrociti), e nel sistema immunitario (monociti, macrofagi e linfociti T) (Wang Y *et al*, 2012). Inoltre, tre diversi RNA messaggeri (mRNA) del *VDR* possono essere sintetizzati a seconda dello splicing alternativo degli esoni 1a, 1b e 1c (Miyamoto K *et al*, 1998).

La proteina VDR (**Figura 6**) è costituita da 427 residui amminoacidici, per un peso di circa 48kDa, organizzati in a) un dominio di transattivazione all'estremità amino terminale per il legame al fattore di trascrizione TFIIB, b) un motivo molto simile in tutti i recettori di ormoni steroidei e tiroidei, rappresentato da due dita di zinco che interagiscono con sequenze specifiche del DNA nelle regioni promotrici della trascrizione dei geni regolati dall' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , e che sono inoltre responsabili della formazione di un eterodimero con il Recettore dell'acido retinoico (RXR), e infine c) una dominio di legame con la vitamina D (Ligand Binding Domain) situato a livello dell'estremità carbossiterminale che riconosce specificamente la molecola del calcitriolo (Rochel N *et al*, 2000).

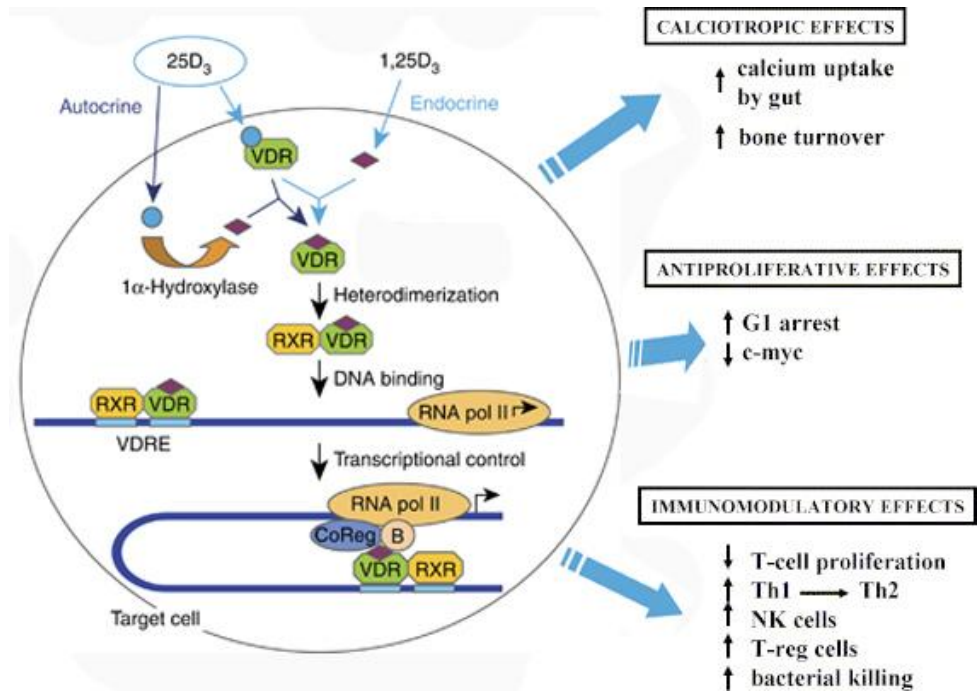
Il VDR presente nel nucleo media l'attivazione trascrizionale dopo il legame con l' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (**Figura 7**). Il VDR, legatosi alla vitamina D, si associa al RXR e subisce una modificazione allosterica che consente all'eterodimero VDR-RXR di interagire con gli elementi responsivi alla vitamina D (VDRE) che si trovano a monte dei geni target. Successivamente il VDR recluta le proteine nucleari del complesso d'inizio della trascrizione e la RNA polimerasi II che ne è parte integrante (Haussler MR *et al*, 1997; Whitfield GK *et al*, 2001). Il ruolo del VDR come mediatore dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  può

essere influenzato da numerosi fattori tra i quali la disponibilità di vitamina D, che dipende dal bilancio tra dieta, processi di sintesi e catabolici, il contenuto dei recettori nelle cellule, che è regolato dai ligandi del VDR e da altri ormoni e fattori di crescita, le modificazioni pre-trascrizionali del VDR indotte dal ligando, quali la fosforilazione di residui di serina che riduce l'attività del recettore stesso, e il livello dei componenti del complesso di trascrizione nel nucleo (Brown AJ *et al*, 1999).

Le azioni genomiche della vitamina D VDR-mediate si distinguono in classiche e non classiche. Riguardo le prime, il sistema endocrino D agisce come fattore essenziale nell'interazione tra rene, osso, paratiroide e intestino per mantenere i livelli di calcio extracellulare entro i limiti di normalità. Tra le azioni genomiche non classiche, la recente scoperta di VDR nelle cellule del sistema immune ed il fatto che numerose di queste cellule posseggono il corredo enzimatico per produrre l'ormone hanno indicato che esso svolge importanti proprietà antiproliferative ed immunoregatorie (Dusso AS *et al*, 2005; Adorini L and Penna G, 2008).



**Figura 6.** Struttura del gene e della proteina VDR.



**Figura 7.** Funzioni del VDR.

### ***Polimorfismi del VDR***

Ad oggi, sono stati individuati all'interno del gene *VDR* più di 200 polimorfismi (Nejentsev S *et al*, 2004). La maggior parte di essi è collocata in regioni non codificanti del gene, posizionate al 3'UTR, al 5'UTR e nelle regioni del promotore; a differenza dei polimorfismi delle regioni codificanti, essi non modificano la struttura aminoacidica del recettore, ma possono interferire con la trascrizione delle regioni codificanti o con la stabilità dell' mRNA (Rucevic I *et al*, 2009). In alcuni casi, è stato suggerito che potrebbero essere in *linkage disequilibrium* con altri polimorfismi funzionali all'interno del gene *VDR* o in geni vicini (Uitterlinden SG *et al*, 2004).

La maggior parte di essi sono polimorfismi della lunghezza del frammento di restrizione (*restriction fragment length polymorphisms*, RFLP), individuabili quindi con l'utilizzo di diversi enzimi di restrizione.

I polimorfismi del *VDR* sono stati associati con il rischio di diverse patologie metaboliche, autoimmuni e neoplastiche, tra cui osteoporosi, osteoartrite, diabete, melanoma, carcinoma alla mammella e alla prostata (Zmuda JM *et al*, 2000). Tuttavia la valutazione dell'importanza di questi polimorfismi si è rivelata complessa e, come risultato, solo un piccolo numero di questi polimorfismi è stato studiato su larga scala. In particolare, i quattro polimorfismi più studiati sono quelli caratterizzati dall'utilizzo degli enzimi di restrizione *FokI*, *BsmI*, *ApaI* e *TaqI* (Zmuda JM *et al*, 2000). Gli alleli sono stati rispettivamente chiamati F-f, B-b, A-a, e T-t: le lettere minuscole identificano la presenza del sito di restrizione e le lettere maiuscole indicano l'assenza di tale sito.

Il polimorfismo *FokI* (rs2228570, Thr2Met) consiste in una sostituzione nucleotidica C/T a livello del primo di due possibili codoni di inizio della traduzione della proteina *VDR* nell'esone 2 (ACG→ATG) (Zmuda JM *et al*, 2000). Il nucleotide T viene anche definito allele f, mentre il nucleotide C viene definito allele F. Tale polimorfismo determina la traslazione a monte di tre aminoacidi del sito d'inizio della traduzione del gene con conseguente alterazione della relativa proteina: infatti negli individui *wild-type*, portatori dell'allele C, la traduzione inizia al secondo sito ATG e viene sintetizzata una proteina di 424 aminoacidi, mentre negli individui portatori dell'allele T la traduzione inizia a monte, in un primo sito ATG provocato dal polimorfismo, e la proteina *VDR* risulta più lunga di tre aminoacidi (Arai H *et al*, 1997). Il genotipo CC *wild-type* (forma corta) provoca una maggiore interazione *in vitro* con il fattore di



trascrizione TFIIB e di conseguenza una più alta attività trascrizionale dei geni regolati dal *VDR* rispetto al genotipo TT (Jurutka *et al*, 2000).

I polimorfismi BsmI (rs1544410, IVS8+284G>A) e ApaI (rs7975232, IVS8-48T>G) sono entrambi localizzati nell'introne 8 del gene *VDR* e consistono rispettivamente in una variazione nucleotidica G/A e T/G (Morrison NA *et al*, 1992). Per BsmI il nucleotide A viene anche definito allele B, mentre il nucleotide G viene definito allele b, mentre per quanto riguarda ApaI, il nucleotide T viene anche definito allele A, mentre il nucleotide G viene definito allele a. La funzione di questi polimorfismi intronici non è nota. È interessante notare che questi polimorfismi non influiscono sulla struttura della proteina VDR, tuttavia è stato ipotizzato un loro ruolo nella variazione della stabilità del trascritto (Whitfield GK *et al*, 2001).

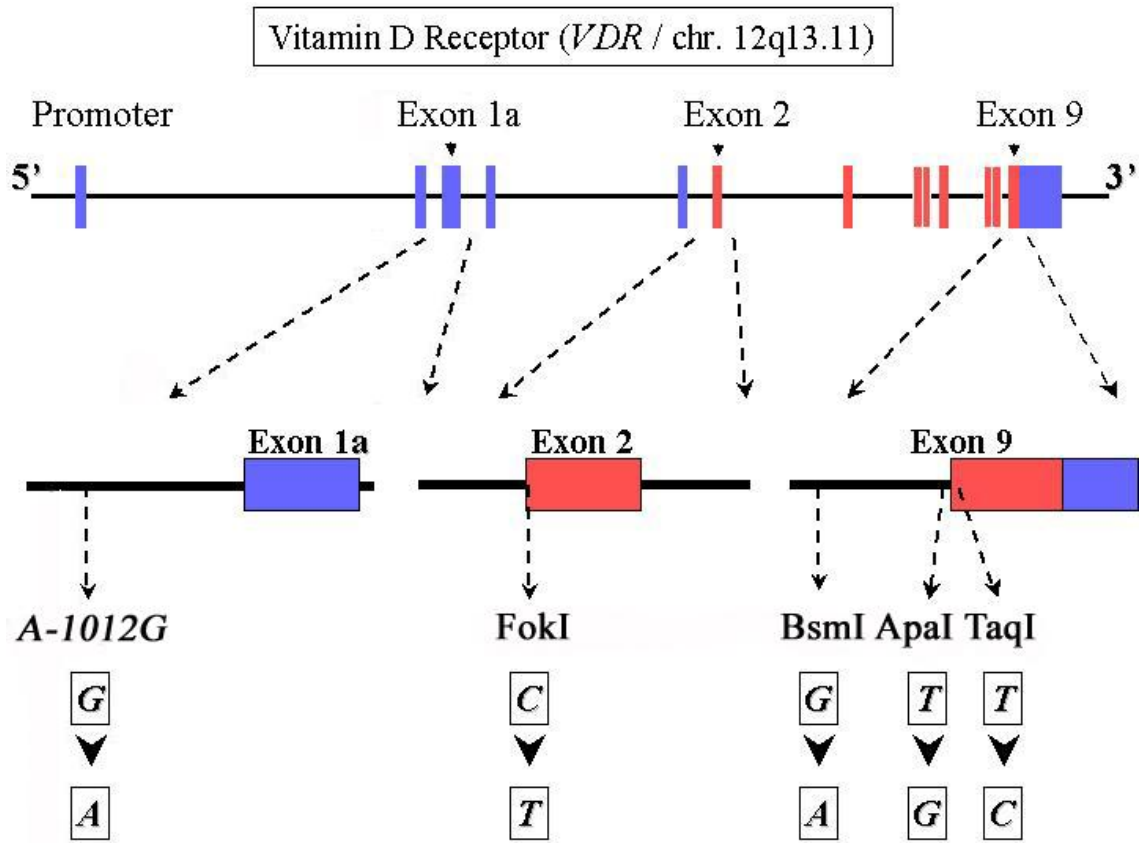
Il polimorfismo TaqI, (rs731236, Ile352Ile) localizzato nell'esone 9 del gene *VDR*, a livello del codone 352, consiste in una variazione nucleotidica T/C, che provoca una variante sinonimo al codone 352 (Rucevic I *et al*, 2009). Il nucleotide T viene anche definito allele T, mentre il nucleotide C viene definito allele t. Anche la funzione di questo polimorfismo non è nota.

Gli alleli di BsmI, ApaI e TaqI mostrano un forte linkage disequilibrium, mentre non sembra esserci nessuna concordanza con gli alleli di FokI (Morrison NA, 1994).

Recentemente, sono stati identificati mediante screening con *single-stranded conformational polymorphism* (SSCP) e sequenziamento automatico, nuovi polimorfismi del promotore del *VDR*, tra cui in particolare il polimorfismo A-1012G, localizzato a livello dell'esone non codificante 1a (Halsall JA *et al*, 2004). Il polimorfismo consiste in una variazione nucleotidica A/G, in cui l'allele A, sebbene maggiormente rappresentato anche nella popolazione normale, è stato associato al rischio di patologie neoplastiche tra cui il melanoma (Halsall JA *et al*, 2004).

Il ruolo funzionale di questa variante nel promotore è ancora largamente sconosciuto. Analisi *in silico* suggeriscono che l'allele A favorisca l'espressione di un sito di legame putativo per GATA-3, ed esperimenti condotti *in vitro* su linee cellulari hanno dimostrato un'associazione tra i polimorfismi presenti nel promotore del *VDR*, tra cui A-1012G, e i livelli di mRNA (d'Alesio *et al*, 2005; Halsall JA *et al*, 2009).

La posizione all'interno del gene *VDR* dei polimorfismi menzionati è rappresentata graficamente in **Figura 8**.



**Figura 8.** Posizione dei polimorfismi maggiormente analizzati all'interno del gene *VDR*.

## **VITAMINA D, VDR E PSORIASI**

La via del segnale della vitamina D è di grande interesse nello studio della psoriasi a causa dell'effetto antiproliferativo che la vitamina D stessa opera sui cheratinociti, e dei suoi effetti immunosoppressivi (Hosomi J *et al*, 1983; Smith EL *et al*, 1986; Deluca HF and Cantorna MT, 2001; Mathieu C and Adorini L, 2002; Mathieu C *et al*, 2004; Lehmann B *et al*, 2004).

È importante ricordare che il VDR, l'effettore cellulare della vitamina D, è espresso nei cheratinociti presenti in cute sana e psoriasica, e in cellule del sistema immunitario (monociti, macrofagi e linfociti T) (Stumpf WE *et al*, 1979; Feldman D *et al*, 1980; Milde P *et al*, 1991; Solvsten H *et al*, 1996; Wang Y *et al*, 2012).

La cute è sia un sito di produzione sia un target della vitamina D. Infatti, i cheratinociti umani rappresentano non solo la fonte primaria di vitamina D per l'organismo, ma possiedono anche la capacità di sintetizzarne i suoi metaboliti attivi (Bikle DD, 2010). Nell'epidermide, la vitamina D e il VDR giocano un ruolo importante nell'inibizione della proliferazione e nel differenziamento dei cheratinociti (Milde P, 1991). Infatti, topi *knockout* per il VDR mostrano ridotta espressione dei marker di differenziamento epidermico ed alopecia (Bikle DD *et al*, 2004).

D'altra parte, la vitamina D modula il sistema immunitario, e tale regolazione è mediata dall'azione della vitamina D su fattori di trascrizione nucleare come NF-κB o per diretta interazione con il VDRE nelle regioni promotrici dei geni delle citochine (Antico A *et al*, 2010).

La vitamina D è prodotta dagli stessi macrofagi, dalle cellule dendritiche (DC), e dai linfociti T e B, e pertanto è capace di contribuire fisiologicamente, attraverso il VDR espresso nel nucleo, alla regolazione autocrina e paracrina sia dell'immunità innata che di quella adattativa (van Etten and Mathieu C, 2005; Cutolo M, 2009) (**Figura 9**).

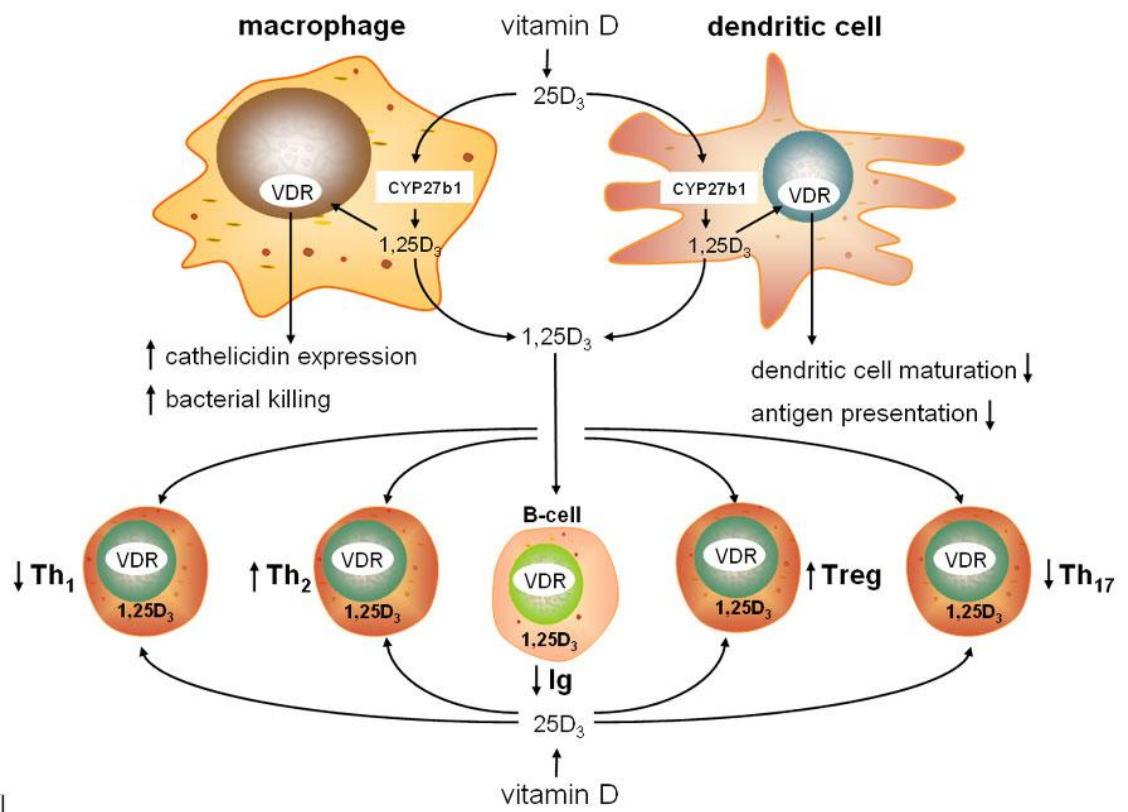
In particolare, l'azione inibitoria sul sistema immune adattativo ha effetto diretto sui linfociti T e B a) nella soppressione della proliferazione e della produzione delle immunoglobuline, ritardando la differenziazione dei precursori B in plasmacellule (Chen S *et al*, 2007); b) nell'inibizione della proliferazione dei Th17 e dei Th1, capaci di produrre IFN $\gamma$  e IL-2 e di attivare i macrofagi, a favore del fenotipo Th2 (Adorini L and Penna G, 2008); c) nell'aumento della quantità dei Treg che producono IL-10,

mediante la quale viene bloccato lo sviluppo di Th1 (Cippitelli M and Santoni A, 1998; Mattner F *et al*, 2000; Penna G *et al*, 2006; Hewison M, 2010).

Queste azioni regolano successive presentazioni di antigeni ai linfociti da parte del sistema delle cellule presentanti l'antigene (APC) e di conseguenza il reclutamento e la proliferazione dei T effettori. Inoltre gli agonisti di VDR favoriscono la proliferazione di cellule dendritiche (DC) con proprietà di tolleranza (Adorini L *et al*, 2004).

Per questi motivi, trattamenti topici con vitamina D o suoi analoghi (calcipotriolo, tacalcitolo, calcipotriene) sono efficaci nella terapia della psoriasi a placche, soprattutto nelle forme lievi e moderate (Kragballe K, 1991; Mathieu C and Adorini L, 2004; Zhang CF and Liu ZP, 2013). Inoltre, è interessante notare che una diversa risposta alla terapia è stata associata a variazioni nell'espressione del VDR nei cheratinociti (Chen ML *et al*, 1996). Anche la balneoterapia e gli effetti benefici del sole sono da tempo note modalità di trattamento per i pazienti psoriasici in virtù del loro ruolo sull'attivazione del metabolismo della vitamina D (Matz H *et al*, 2003), oltre che dell'attività immunosoppressiva dei raggi ultravioletti (Naldi L, *et al*, 1996).

Complessivamente, i molteplici effetti a livello del sistema immunitario e la vasta presenza del VDR a livello cutaneo, hanno reso il VDR un gene candidato nell'insorgenza e nella progressione, ma anche nella suscettibilità genetica, alla psoriasi.



**Figura 9.** meccanismi coinvolti nella modulazione delle risposte immuni VDR-mediate (da Hewison M. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 2010; 8:32–39).

### *Polimorfismi del VDR e psoriasi*

Negli ultimi 15 anni, oltre 10 studi hanno valutato il ruolo dei polimorfismi del *VDR* nella suscettibilità alla psoriasi (**Tabella 1**), ottenendo risultati contrastanti.

Come nelle altre patologie per cui il gene *VDR* è stato analizzato, gli studi si sono focalizzati su quattro polimorfismi più studiati, FokI, BsmI, ApaI e TaqI (Zmuda JM *et al*, 2000). Complessivamente, quattro studi hanno ottenuto risultati statisticamente significativi.

In un primo studio condotto sulla popolazione Coreana, è stata riportata una significativa differenza nella distribuzione degli alleli di ApaI tra pazienti psoriasici e controlli sani ( $p = 0.001$ ), e questa tendenza era accentuata nella psoriasi ad insorgenza precoce (Park *et al*, 1999). In un altro studio sulla popolazione giapponese, è stato osservato che le frequenze degli alleli rari di BsmI e TaqI risultavano significativamente più basse nei pazienti psoriasici rispetto ai controlli (9 vs. 19%:  $p < 0.01$ , 7 vs. 14%:  $p < 0.05$ , rispettivamente), ipotizzando un ruolo protettivo per i due polimorfismi (Saeki *et al*, 2002).

Due studi sono stati condotti nella popolazione caucasica turca (Kaya *et al*, 2002; Dayangac-Erden *et al*, 2007). Nel primo è stata dimostrata un'associazione significativa tra i genotipi di ApaI in 53 pazienti psoriasici comparati con 54 controlli sani (AA: 26.4% vs. 50%; Aa: 58.5% vs. 38.9%; and aa: 15.1% vs. 11%) (Kaya *et al*, 2002). Al contrario, il secondo studio, condotto su una differente popolazione turca composta da 51 pazienti psoriasici familiari e 100 controlli sani, non osservò alcuna differenza significativa nel polimorfismo ApaI (AA: 23.5% vs. 30%; Aa: 56.9% vs. 55%; aa: 19.6% vs. 15%;  $p \leq 1$ ). Tuttavia, nello stesso studio, la frequenza del genotipo frequente di TaqI era più alta nei pazienti (73.5% vs. 59.5%;  $P \leq 0.025$ ), e ancora più alta in pazienti con artrite psoriasica (91.7%;  $P \leq 0.05$ ). Gli autori hanno concluso che il polimorfismo TaqI è associato con psoriasi familiare nella popolazione turca, e che le discrepanze tra i due studi possono essere dovute alla composizione genetica eterogenea delle casistiche esaminate (Dayangac-Erden *et al*, 2007).

Un unico studio è stato effettuato su una popolazione caucasica italiana, in cui non sono emerse differenze significative nelle distribuzioni dei genotipi nei 60 casi e 68 controlli analizzati per il solo polimorfismo BsmI (Ruggiero *et al*, 2004).

Il polimorfismo del promotore A-1012G è stato oggetto di un unico studio, effettuato su 205 pazienti e 80 controlli (Halsall *et al*, 2005). Non è stata evidenziata una differenza significativa nella distribuzione dei genotipi o degli alleli di A-1012G nei casi e nei controlli, tuttavia, nell'analisi caso-caso considerando la storia familiare di psoriasi, la frequenza dell'allele A è risultata inferiore in pazienti senza storia familiare rispetto ai pazienti con storia familiare ( $p=0.01$ ).

Recentemente, sono stati pubblicati tre studi di metanalisi sui quattro polimorfismi del *VDR* maggiormente studiati, FokI, BsmI, ApaI e TaqI, nella psoriasi (Lee YH *et al*, 2012, Liu JL *et al*, 2012, Stefanic M *et al*, 2013). In particolare, le metanalisi hanno incluso da un minimo di 9 ad un massimo di 12 studi rilevanti sull'argomento, comprendendo dai 700 ai 1000 casi e un ugual numero di controlli sani. Tuttavia, nel complesso, nessuna delle varianti esaminate nel gene *VDR* ha mostrato una associazione robusta e riproducibile con il rischio di psoriasi.

Il ruolo dei polimorfismi del *VDR* nel predire la risposta agli analoghi della vitamina D è stato finora valutato in pochi studi (Kontula *et al*, 1997; Saeki *et al*, 2002; Lee *et al*, 2002; Halsall *et al*, 2005). È stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra i polimorfismi FokI e TaqI con la risposta al calcipotriolo (Saeki *et al*, 2002, Halsall *et al*, 2005), singolarmente e in combinazione tra loro e con gli alleli del polimorfismo A-1012G (Halsall *et al*, 2005).

È importante notare che gran parte degli studi citati sono stati condotti in popolazioni asiatiche e su campioni poco numerosi. Poiché è noto che le distribuzioni genotipiche dei polimorfismi del *VDR* variano considerevolmente a seconda della composizione etnica e della numerosità del campione preso in esame, gli studi effettuati finora si sono rivelati non conclusivi nell'evidenziare un ruolo chiaro dei polimorfismi del *VDR* nei pazienti affetti da psoriasi.

Studio	Nazionalità	Num. Casi	Num. Controlli	Polimorfismi analizzati	Risultati
<b>Mee and Cork (1998)</b>	UK	175	124	<i>BsmI</i>	NS
<b>Park et al. (1999)</b>	Corea del Sud	104	104	<i>BsmI, ApaI, TaqI</i>	<i>ApaI</i> : p <0.001
<b>Okita et al. (2002)</b>	Giappone	50	86	<i>BsmI, ApaI, TaqI</i>	NS
<b>Lee et al. (2002)</b>	Corea del Sud	55	104	<i>BsmI, ApaI</i>	NS
<b>Kaya et al. (2002)</b>	Turchia	53	54	<i>BsmI, ApaI, TaqI, FokI</i>	<i>ApaI</i> : p <0.05
<b>Saeki et al. (2002)</b>	Giappone	115	69	<i>BsmI, ApaI, TaqI, FokI</i>	<i>TaqI, BsmI</i> : p <0.05
<b>Zhu et al. (2002)</b>	Cina	112	108	<i>BsmI, ApaI</i>	NS
<b>Ruggiero et al. (2004)</b>	Italia	60	68	<i>BsmI</i>	NS
<b>Halsall et al. (2005)</b>	UK	205	80	<i>A-1012G, TaqI, FokI</i>	NS
<b>Dayangac-Erden et al. (2007)</b>	Turchia	51	100	<i>ApaI, TaqI, FokI</i>	<i>TaqI</i> : p <0.05
<b>Zuel-Fakkar et al. (2011)</b>	Egitto	50	50	<i>ApaI, TaqI</i>	NS
<b>Rucevic et al. (2012)</b>	Croazia	75	40	<i>BsmI, ApaI, TaqI</i>	NS

**Tabella 1.** Tabella riassuntiva degli studi precedentemente effettuati sui polimorfismi del *VDR* (NS= non significativo).



## ***OBIETTIVI***

Ad oggi, sono stati identificati numerosi loci di suscettibilità alla psoriasi, corrispondenti a geni coinvolti in diversi *pathway* legati all'insorgenza e alla progressione della psoriasi, che tuttavia riescono a spiegare solo in parte la componente genetica della malattia.

L'obiettivo principale del presente studio è quello di delucidare le basi della suscettibilità genetica alla psoriasi. In questo contesto, poiché la via di segnale del recettore VDR riveste un ruolo cruciale nella patogenesi della psoriasi, ma il ruolo dei polimorfismi all'interno del gene è ancora controverso in questa patologia, il nostro studio si propone di:

- Analizzare i polimorfismi del gene *VDR*, tra cui rs4516035 (A-1012G), rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI) e rs7975232 (ApaI), e rs731236 (TaqI), in pazienti affetti da psoriasi e in una popolazione sana di controllo, al fine di valutare se tali polimorfismi predispongano a questa patologia;
- Valutare una possibile associazione dei polimorfismi del *VDR* con le principali caratteristiche clinicopatologiche della psoriasi;
- Valutare la rilevanza funzionale dei polimorfismi del *VDR* risultati associati con un aumentato rischio di psoriasi, tramite analisi dell'espressione genica in cellule mononucleate del sangue periferico.

L'analisi è condotta attraverso uno studio caso-controllo effettuato su una serie di 108 pazienti affetti da psoriasi caratterizzati per le principali caratteristiche clinicopatologiche e 268 donatori di sangue utilizzati come controlli sani.

## ***MATERIALI E METODI***

## ***CASISTICA***

In collaborazione con l'Unità Operativa di Dermatologia, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, dell'Università di Roma "Sapienza", è stata reclutata una serie di 108 pazienti affetti da psoriasi. Per ogni paziente in studio sono stati ottenuti:

1. consenso informato;
2. due o più campioni di sangue fresco;
3. informazioni dettagliate relative alla storia personale di psoriasi;
4. informazioni dettagliate relative alla storia familiare di psoriasi, considerando fino al primo e secondo grado di parentela;
5. principali caratteristiche clinicopatologiche.

Inoltre, in collaborazione con il centro trasfusionale dell'ospedale F. Spaziani di Frosinone, è stato possibile selezionare una serie di 268 adulti sani tra i donatori di sangue. In particolare, sono stati reclutati 197 uomini e 71 donne. Di tutti i partecipanti, in seguito a consenso informato, è stato ottenuto un campione di sangue.

Le aliquote di sangue collezionate sono conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ , prima di procedere all'estrazione del DNA per l'analisi genetica. Per alcuni campioni, da un'aliquota di sangue, processata entro 24 ore dal prelievo, è stato estratto l'RNA per l'analisi funzionale.

## ***ANALISI GENETICA***

### ***Estrazione di DNA da sangue***

Un'aliquota di 200 µl circa di sangue eparinizzato viene scongelata a temperatura ambiente. Seguendo il protocollo fornito nel *kit* di estrazione *Qiagen*, al campione vengono addizionati 200 µl di detergente (fornito dal *kit*) e 25 µl di proteinasi K (20 ng/ul). Per facilitare la digestione delle proteine rimaste si pongono i campioni a 56°C per circa 10 minuti. A digestione avvenuta si aggiungono 200 µl di etanolo, per far precipitare il DNA rimasto in soluzione. Il contenuto delle provette si versa in apposite colonnine di separazione fornite dal kit, e si centrifuga a 8.000 rpm (6000 giri) per 1 minuto. Nella stessa colonnina, si esegue un lavaggio aggiungendo 500 µl di buffer contenente sodio azide (fornito dal kit) ed etanolo assoluto, e centrifugando per 1 minuto a 8.000 rpm (6.000 giri). Si ripete il lavaggio aggiungendo 500 µl di buffer e centrifugando a 12.000 rpm (>8.000 giri) per 3 minuti. Per l'eluizione del DNA si pone la colonnina in una provetta da 1,5 ml, e la si riempie con 200 µl del buffer di eluizione (fornito dal kit) e si centrifuga per 1 minuto a 8.000 rpm (6.000 giri). L'eluato raccolto contiene il DNA purificato in soluzione. La quantità di DNA contenuta all'interno dell'eluato è stata verificata attraverso l'uso del fluorimetro Qubit (Life Technologies).

## ***Genotipizzazione***

L'analisi dei polimorfismi è stata condotta utilizzando la tecnologia *TaqMan* con *Real Time-PCR* tramite l'uso di *assay* disponibili in commercio e forniti dalla Life Technologies (**Tabella 2**). Ogni *assay* relativo ad ogni singolo polimorfismo comprende due primer (senso e antisenso) per l'amplificazione del frammento in cui è presente il polimorfismo, e due sonde (marcate con i fluoro fori VIC e FAM) per la discriminazione allelica che viene visualizzata tramite il software SDS dello strumento (Applied Biosystems 7500 Fast). I dati di ogni singolo esperimento sono stati poi importati nel Software *TaqMan Genotyping* che permette di raggruppare e visualizzare dati provenienti da diversi esperimenti in un singolo studio.

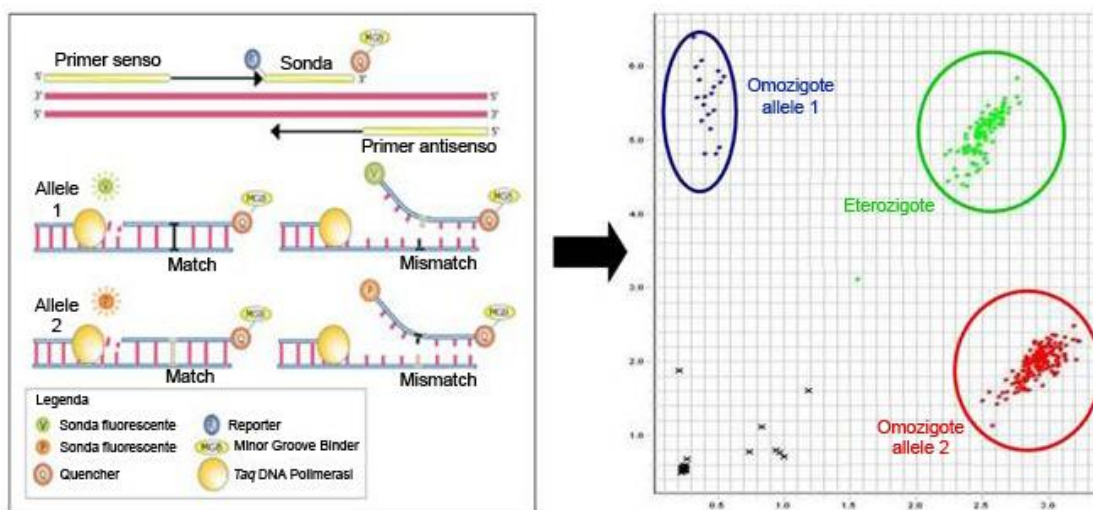
La tecnologia *TaqMan* che si utilizza per genotipizzare un campione di DNA funziona grazie alle presenza di due sonde diversamente marcate. Queste sono in grado di riconoscere alleli di un locus esattamente complementare a una delle sonde, si verifica l'ibridazione, il fluoroforo è allontanato dal *quencher* e così si ha emissione di fluorescenza che indica la presenza dello specifico allele. Se la sonda non si appaia, il fluoroforo cederà l'energia di eccitazione al *quencher* e non si avrà emissione di fluorescenza (**Figura 10**). Le condizioni utilizzate per la PCR, eseguita con ABI 7500 fast (Life Technologies), sono: 60°C per 30 secondi (lettura pre-PCR), 95°C per 10 minuti, in seguito 40 cicli di amplificazione a 92°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto e 30 secondi, infine uno step di lettura post-PCR a 60°C per 30 secondi.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 10µl (1µl di DNA alla concentrazione di 2ng/µl, 5 µl di Universal Master Mix, 3.5 µl di acqua, 0.5 µl di Assay). La fluorescenza sviluppata è stata monitorata durante tutto il processo di amplificazione. Per ogni esperimento è stato inserito almeno un controllo negativo.

Polimorfismo	Numero rs	Allele di Rischio	Sonda (VIC/FAM)
<b>A-1012G</b>	rs4516035	A	GATGACCTCCTTTAGCCAGGGAAGA[C/T]ATTGCTATTCCGCTCTTACAGAGGA*
<b>FokI</b>	rs2228570	T	GGAAGTGCTGGCCGCCATTGCCTCC[A/G]TCCCTGTAAGAACAGCAAGCAGGCC*
<b>BsmI</b>	rs1544410	A	GAGCAGAGCCTGAGTATTGGGAATG[C/T]GCAGGCCTGCTGTGGCCCCAGGAA*
<b>ApaI</b>	rs7975232	G	AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]CCTCACTGCTCAATCCCACCACCCC*
<b>TaqI</b>	rs731236	C	TGGACAGGCGGTCCTGGATGGCCTC[A/G]ATCAGCGCGGGCTCCTGCACCCCAG*

**Tabella 2.** caratteristiche degli assay utilizzati

\*sonde disegnate sulla sequenza complementare (*reverse*).



**Figura 10.** Genotipizzazione con TaqMan *Real-Time* PCR.

## ***ANALISI FUNZIONALE***

### ***Estrazione di RNA da sangue***

Un'aliquota di circa 5 ml di sangue viene diluita in rapporto di 1:1 con PBS 1x in una provetta da 14 ml. Il sangue diluito viene poi aliquotato delicatamente in una provetta contenente un uguale volume di Histopaque e centrifugato a 5000 rpm per 25 minuti a temperatura ambiente.

L'Histopaque è una soluzione a base di polisaccarosio e diatrizzato di sodio; durante la centrifugazione il polisaccarosio favorisce l'aggregazione degli eritrociti e dei granulociti e la loro successiva sedimentazione rapida, mentre i linfociti e le altre cellule mononucleate sono trattenuti nell'interfaccia tra la soluzione e il plasma. Dopo stratificazione su Histopaque, si preleva l'anello linfomonocitario e si effettua un lavaggio in centrifuga a 1500 rpm per 10 minuti in modo da poter procedere alla lisi cellulare. A tale scopo, dopo la rimozione del surnatante, il pellet viene risospeso in 3 ml di una soluzione monofasica di fenolo acido e guanidinio isotiocianato ("*Trizol reagent*", Invitrogen Life technologies) e incubato a temperatura ambiente su ruota per 15 minuti per favorire il distacco delle nucleoproteine.

Successivamente, per favorire la separazione delle due fasi (fase acquosa e fenolo) presenti nel Trizol, si aggiungono 200 ul di cloroformio per ogni ml di Trizol. Le provette vengono agitate per 10 minuti a temperatura ambiente ed in seguito centrifugate a 5000 rpm per 15 minuti a 4°C. Al surnatante così ottenuto, si aggiungono 500 ul di Isopropanolo (che fa precipitare l'RNA) per ogni ml di Trizol. Le provette vengono nuovamente agitate su ruota per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugate a 14000 rpm per 10 minuti, per favorire la precipitazione dell'RNA come pellet. Una volta rimosso il surnatante, si procede ad un primo lavaggio con 1 ml di etanolo al 75% che permette di staccare il pellet; l'etanolo viene successivamente rimosso dopo un'ulteriore centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti. Dopo aver lasciato asciugare all'aria, il pellet viene risospeso in acqua priva di RNAsi (60-100 ul a seconda della grandezza del pellet) e conservato a -80°C.

La concentrazione e la qualità dell'RNA viene determinata mediante Bioanalyzer Agilent 2100 secondo la procedura fornita dal RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies), specifico per la valutazione dell'RNA totale eucariotico. Ogni RNA



LabChip è costituito da un set di microcapillari nei quali viene polimerizzato un gel per la separazione dei frammenti di acido nucleico. Il software del Bioanalyzer traccia per ciascun campione un profilo elettroforetico da cui ricava la concentrazione e la qualità dell'acido nucleico misurando il rapporto delle aree dei picchi corrispondenti all'RNA ribosomale 28S e 18S.

### ***Gene-Expression***

I livelli di espressione del gene *VDR* sono stati analizzati mediante one-step Taqman real time RT-PCR. Questa metodica prevede che lo step di retrotrascrizione dell'RNA a cDNA e lo step di amplificazione in real time PCR siano uniti in un'unica reazione.

È stata condotta una quantificazione relativa del gene *VDR* utilizzando come gene di controllo per normalizzare l'espressione del gene target, il gene housekeeping *fosfoglicerato chinasi 1 (PGK1)*. È stato utilizzato il sistema a sonde *TaqMan*, che consiste in una PCR nella quale viene aggiunta, oltre ai primer, una sonda fluorescente, che si appaia tra i due primer durante l'amplificazione (**Figura 11**).

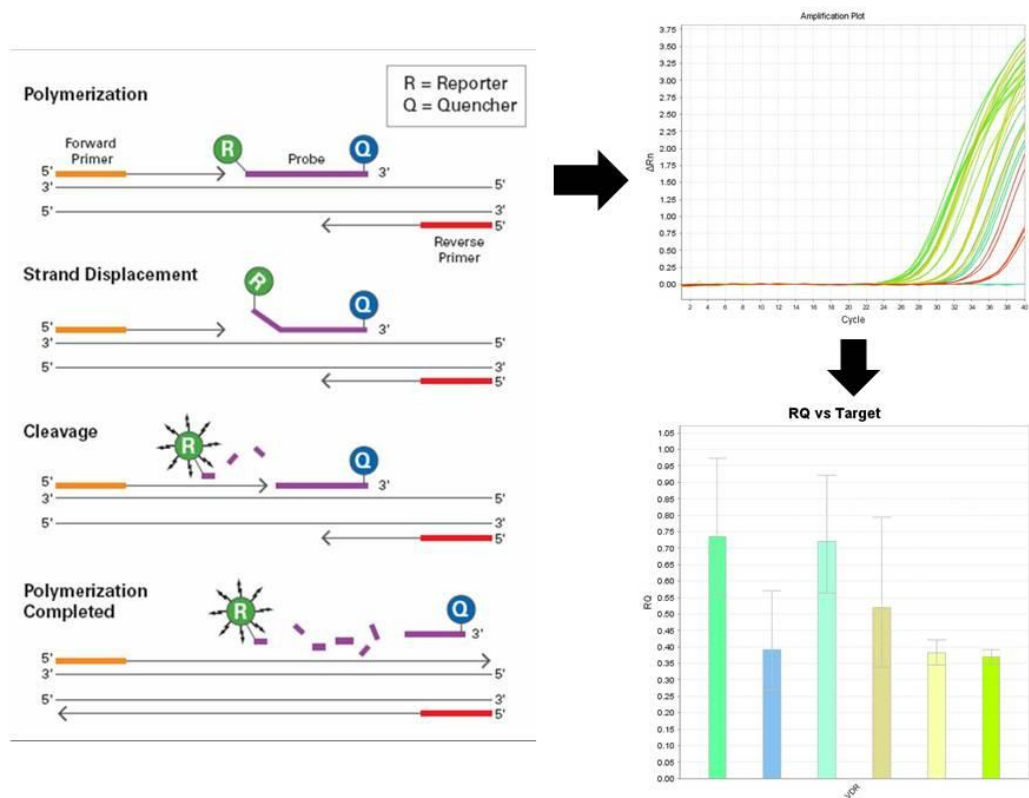
I saggi utilizzati per testare i livelli di espressione del gene housekeeping e del gene target sono assay disponibili in commercio (Roche Applied Science), e utilizzano il fluorocromo reporter FAM per il gene target e VIC per il gene housekeeping. La sonda TaqMan per il gene *VDR* è disegnata a cavallo degli esoni 5 e 6 in modo da valutare l'espressione di tutte le possibili isoforme dei trascritti del *VDR* (**Figura 12**).

Le condizioni utilizzate per la PCR, eseguita con ABI 7500 fast (Life Technologies), sono: 50°C per 15 minuti (per la sintesi del cDNA), 95°C per 20 secondi, in seguito 40 cicli di amplificazione a 95°C per 3 secondi e 60°C per 30 secondi. Ogni esperimento è stato ripetuto in duplicato ed è stato inserito almeno un controllo negativo per reazione.

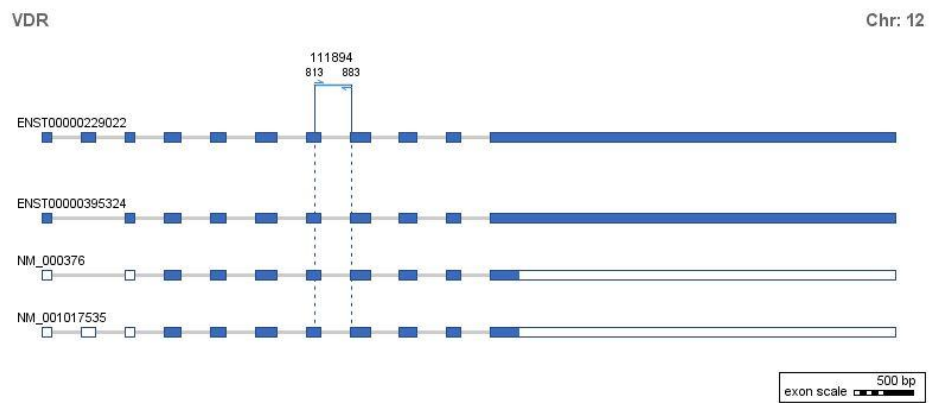
Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 20 ul: 5 ul di RNA alla concentrazione di 10 ng/ul, 10 ul di Express SuperScript qPCR SuperMix Universal (Invitrogen by Life Technologies), 2 ul di Express SuperScript Mix for One-Step qPCR, 1 ul di assay per il gene target, 1 ul di assay per il gene housekeeping, 0.04 ul di ROX Reference Dye (25 uM), 0.96 ul di dH<sub>2</sub>O.

La fluorescenza viene monitorata durante i 40 cicli di amplificazione. Il parametro Ct (ciclo soglia) è il ciclo al quale la fluorescenza supera il livello soglia. La quantità di mRNA del gene target, normalizzata al gene di riferimento *PGK1*, e ad un campione che funge da "calibratore", viene determinata dal programma di analisi del software fornito con la macchina, valutata come  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$ , per cui  $\Delta Ct$  indica la differenza tra il ciclo soglia del target e il ciclo soglia del gene housekeeping per ciascun campione, e  $\Delta\Delta Ct$  indica, la differenza tra il  $\Delta Ct$  di ogni campione e il  $\Delta Ct$  del campione calibratore. Poiché l'espressione del campione calibratore sarà uguale a 1, valori inferiori a 1 indicheranno una minore espressione del gene target, mentre valori

superiori ad 1 indicheranno una maggiore espressione. I risultati sono visualizzati tramite un istogramma.



**Figura 11.** Gene-expression con TaqMan Real-Time PCR.



**Figura 12.** Caratteristiche e posizione della sonda TaqMan per il gene *VDR*.

## ***ANALISI STATISTICHE***

Viene condotta una prima analisi statistica, tramite test del chi-quadrato, per valutare le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti psoriasici in relazione alla severità della patologia, allo scopo di verificare la conformità della serie in esame rispetto alle casistiche di psoriasi precedentemente riportate in letteratura. Successivamente vengono analizzate le differenze tra casi e controlli in relazione ad età e genere e, per uniformare la distribuzione di età e genere a quella dei casi, è quindi dato un “peso” ad ogni individuo della popolazione di controllo, calcolato come il rapporto tra le frequenze dei pazienti e dei controlli per i due generi, incrociato con le classi di età (minore di 40 anni e maggiore/uguale a 40 anni).

Le frequenze genotipiche sono determinate come numero di individui con un particolare genotipo diviso per il totale degli individui coinvolti nello studio. Le frequenze alleliche sono calcolate come numero di alleli diviso per il numero di cromosomi. Deviazioni dall’equilibrio di Hardy-Weinberg nei controlli sono valutate tramite test del chi-quadrato a un grado di libertà.

Le differenze caso-controllo nelle frequenze genotipiche e alleliche sono valutate con analisi di regressione logistica e test del chi-quadrato. La stima del rischio complessivo è valutata calcolando l’odds ratio (OR) e i relativi intervalli di confidenza (95% C.I.). Un valore di OR (95% C.I.) >1 è considerato indice di un aumento del rischio. Il rischio viene anche valutato secondo i modelli genetici dominante e recessivo.

Per valutare le associazioni tra i polimorfismi e le caratteristiche clinico-patologiche nei casi (genere, età, severità, tipo di psoriasi e storia familiare), è utilizzato il test del chi-quadrato; inoltre, viene utilizzata l’analisi di regressione logistica per verificare il rischio di psoriasi severa in pazienti stratificati secondo il loro genere, classe di età, tipo di psoriasi, obesità e storia familiare.

È stata infine condotta un’analisi della varianza a una via (ANOVA) e il test non parametrico di Kruskal-Wallis per comparare i valori di  $\Delta C_t$  del mRNA del *VDR* nei diversi genotipi considerati, allo scopo di associare specifici genotipi con cambiamenti nell’espressione genica del *VDR*.

Per tutte le analisi effettuate, un  $p \leq 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi sono state condotte con i software SAS/STAT versione 9.1 e R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## ***RISULTATI***

### ***CARATTERISTICHE CLINICOPATOLOGICHE DEI PAZIENTI PSORIASICI***

Le caratteristiche clinicopatologiche dei 108 pazienti psoriasici inclusi nello studio sono riportate in **Tabella 3**. Dei 108 pazienti, 61 (56.5%) sono uomini e 47 (43.5%) donne. L'età di insorgenza della patologia varia tra 6 e 80 anni, con una media di 37.8 anni. I pazienti presentano più spesso una forma di psoriasi moderato/severa (74%), e non artropatica (64.8%). 34 casi (31.5%) riportano una storia familiare di psoriasi in pazienti di primo grado. I pazienti psoriasici tendono ad avere un indice di massa corporea (BMI) normale (54.6%), a non essere fumatori (57.1%), e a non consumare alcool (91.5%).

#### ***Associazioni con la severità della psoriasi***

L'analisi di associazione tra caratteristiche clinicopatologiche e severità della patologia è riportata in **Tabella 3**. È emersa un'associazione statisticamente significativa tra severità della psoriasi e un alto BMI ( $p=0.02$ ), che suggerisce che i pazienti sovrappeso/obesi tendono ad avere una forma di psoriasi più severa.

Inoltre, i pazienti con una patologia di tipo moderato/severo tendono a essere più giovani e con un tipo artropatico di psoriasi rispetto ai pazienti con una forma lieve, sebbene queste associazioni non raggiungano la significatività statistica ( $p=0.07$ ).

Caratteristiche		N (%)	Lieve N (%)	Moderato/ severa N (%)	Chi- quadrato	p-value
<b>Genere</b>	Uomini	61 (56.5%)	12 (42.9)	49 (61.3)	2.85	0.09
	Donne	47 (43.5%)	16 (57.1)	31 (38.7)		
	<i>Totale</i>	<i>108</i>	<i>28</i>	<i>80</i>		
<b>Età d'insorgenza</b>	< 40 anni	58 (53.7%)	11 (39.3)	47 (58.7)	3.16	0.07
	≥ 40	50 (46.3%)	17 (60.7)	33 (41.3)		
	<i>Totale</i>	<i>108</i>	<i>28</i>	<i>80</i>		
<b>Tipo</b>	Artropatica	38 (35.2%)	6 (21.4)	32 (40)	3.13	0.07
	Non artropatica	70 (64.8%)	22 (78.6)	48 (60)		
	<i>Totale</i>	<i>108</i>	<i>28</i>	<i>80</i>		
<b>Storia familiare</b>	Positiva	34 (31.5%)	7 (25)	27 (33.6)	0.74	0.39
	Negativa	74 (68.5%)	21 (75)	53 (66.4)		
	<i>Totale</i>	<i>108</i>	<i>28</i>	<i>80</i>		
<b>BMI</b>	Normale	54 (54.6%)	18 (75)	36 (48)	5.3	<b>0.02</b>
	Sovrappeso	31 (31.3%)	4 (16.6)	27 (36)		
	Obesità	14 (14.1%)	2 (8.4)	12 (16)		
	<i>Totale</i>	<i>99</i>	<i>24</i>	<i>75</i>		
<b>Storia di fumo</b>	Positiva	35 (33.3%)	6 (22.2)	29 (37.2)	2.6	0.1
	Negativa	60 (57.1%)	17 (62.9)	43 (55.1)		
	Ex fumatori	10 (9.6%)	4 (14.9)	6 (7.7)		
	<i>Totale</i>	<i>105</i>	<i>27</i>	<i>78</i>		
<b>Consumo di alcool</b>	Sì	9 (8.5%)	2 (7.4)	7 (9.5)	0.05	0.81
	No	97 (91.5%)	25 (92.6)	72 (90.5)		
	<i>Totale</i>	<i>106</i>	<i>27</i>	<i>74</i>		

**Tabella 3.** caratteristiche clinico-patologiche dei 108 casi di psoriasi e associazioni con la severità della patologia. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ); in corsivo i *p-value* *borderline* (0.06-0.1).



## ***ANALISI GENETICA DEI POLIMORFISMI DEL VDR***

In questo studio abbiamo indagato le basi molecolari della suscettibilità alla psoriasi attraverso l'analisi di specifici polimorfismi situati all'interno del gene *VDR*.

In particolare, i polimorfismi che sono stati presi in considerazione sono: rs4516035 (A-1012G), rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI), e rs731236 (TaqI).

L'analisi è stata condotta mediante *Real-Time PCR* con metodologia *TaqMan* su una serie di 108 casi di psoriasi e 268 individui sani come popolazione di controllo. Tutti i casi sono stati genotipizzati con successo, e la distribuzione dei genotipi nei controlli è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg in ogni locus analizzato.

Per valutare l'associazione con il rischio di insorgenza di psoriasi, e tra le varianti alleliche prima citate e le caratteristiche clinico-patologiche, si è utilizzato il test del chi-quadrato ed è stato calcolato l'OR (95% C.I.) utilizzando modelli di regressione logistica.

### ***Associazione tra i polimorfismi e il rischio complessivo di psoriasi***

I dati relativi alla distribuzione genotipica dei 5 polimorfismi del *VDR* analizzati e le stime del rischio complessivo di psoriasi sono riportati in **Tabella 4**.

Le differenze tra le frequenze genotipiche di casi e controlli non sono risultate statisticamente significative per i polimorfismi FokI, BsmI, ApaI e TaqI, pertanto non si riscontra un aumento del rischio di psoriasi per i portatori di queste varianti.

Una differenza statisticamente significativa nelle frequenze genotipiche di casi e controlli è invece stata trovata per il polimorfismo A-1012G (p-value GG vs AA=0.05).

La stima del rischio complessivo ha evidenziato in questo caso un aumento del rischio sia negli individui eterozigoti GA (OR 2.14; 95% CI 1.02-4.48), sia in individui omozigoti portatori del genotipo AA (OR 2.43; 95% CI 1.15-5.13).

I dati relativi alle frequenze alleliche dei 5 polimorfismi del *VDR* analizzati sono riportati in **Tabella 5**.

Anche in questo caso, le differenze tra le frequenze alleliche di casi e controlli non sono risultate statisticamente significative per i polimorfismi FokI, BsmI, ApaI e TaqI.

Riguardo le frequenze alleliche del polimorfismo A-1012G, la differenza tra casi e controlli risulta statisticamente significativa (p=0.035).

I risultati relativi alla stima del rischio di psoriasi secondo il modello dominante e recessivo sono riportati nelle **Tabelle 6 e 7**.

È emersa un'associazione statisticamente significativa del polimorfismo A-1012G con un aumentato rischio di psoriasi secondo il modello dominante (OR per GG vs GA/AA 2.19, 95% CI 1.09-4.40; p=0.02).

Polimorfismi	Genotipo	Casi N (%)	Controlli N (%)	Chi- quadrato	P-value	OR (95% CI)
<b>A-1012G rs4516035</b>	GG	11 (10.2)	52 (19.4)		Reference category	
	GA	50 (46.3)	119 (44.3)	1.52	<i>0.06</i>	<b>2.14</b> (1.02-4.48)
	AA	47 (43.5)	97 (36.3)	3.84	<b>0.05</b>	<b>2.43</b> (1.15-5.13)
<b>FokI rs2228570</b>	CC	41 (38)	117 (43.8)		Reference category	
	CT	49 (45.4)	114 (42.4)	0.85	0.36	0.86 (0.28-2.69)
	TT	18 (16.6)	37 (13.8)	1.2	0.27	1.24 (0.36-4.21)
<b>BsmI rs1544410</b>	GG	42 (38.9)	87 (32.6)		Reference category	
	GA	42 (38.9)	124 (46.3)	0.13	0.72	0.8 (0.24-2.65)
	AA	24 (22.2)	57 (21.1)	0.23	0.63	0.71 (0.18-2.77)
<b>ApaI rs7975232</b>	TT	37 (34.3)	88 (32.9)		Reference category	
	TG	50 (46.3)	136 (50.6)	0.14	0.71	0.87 (0.44-1.76)
	GG	21 (19.4)	44 (16.5)	0.01	0.90	0.94 (0.36-2.45)
<b>TaqI rs4516035</b>	TT	42 (38.9)	89 (33.2)		Reference category	
	TC	44 (40.7)	131 (49.1)	0.11	0.73	0.86 (0.28-2.69)
	CC	22 (20.4)	48 (17.7)	0.12	0.73	1.24 (0.36-4.21)

**Tabella 4.** distribuzione delle frequenze genotipiche nei 108 pazienti psoriasici e dei 268 controlli sani e stima del rischio di psoriasi per i 5 polimorfismi del VDR esaminati. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ); in corsivo i *p-value* *borderline* (0.06-0.1).

Polimorfismi	Alleli	Alleli nei casi N (%)	Alleli nei controlli N (%)	Chi- quadrato	P-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	G	72 (33.3)	223 (41.6)	4.42	<b>0.035</b>
	A	144 (66.7)	313 (58.4)		
<b>FokI rs2228570</b>	C	131 (60.6)	348 (64.9)	1.21	0.269
	T	85 (39.4)	188 (35.1)		
<b>BsmI rs1544410</b>	G	126 (58.3)	298 (55.6)	0.47	0.493
	A	90 (41.7)	238 (44.4)		
<b>ApaI rs7975232</b>	T	124 (57.4)	312 (58.2)	0.04	0.84
	G	92 (42.6)	224 (41.8)		
<b>TaqI rs4516035</b>	T	128 (59.3)	309 (57.6)	0.16	0.685
	C	88 (40.7)	227 (42.4)		

**Tabella 5.** frequenze alleliche, chi-quadrato e relativo *p-value* nei 108 pazienti psoriasici e nei 268 controlli sani. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ).

Polimorfismo	Genotipo	Chi-quadrato	p-value	OR (95% CI)
<b>A-1012G</b>	GG			Reference category
<b>rs4516035</b>	GA/AA	4.92	<b>0.02</b>	<b>2.19 (1.09-4.40)</b>
<b>FokI</b>	CC			Reference category
<b>rs2228570</b>	CT/TT	1.13	0.29	1.28 (0.81-2.04)
<b>BsmI</b>	GG			Reference category
<b>rs1544410</b>	GA/AA	0.41	0.52	0.70 (0.24-2.04)
<b>ApaI</b>	TT			Reference category
<b>rs7975232</b>	TG/GG	0.18	0.67	0.89 (0.53-1.49)
<b>TaqI</b>	TT			Reference category
<b>rs4516035</b>	TC/CC	0.00	0.96	1.03 (0.36-2.93)

**Tabella 6.** stima del rischio di psoriasi per i cinque polimorfismi del *VDR* analizzati secondo il modello dominante. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ).

Polimorfismo	Genotipo	Chi-quadrato	p-value	OR (95% CI)
<b>A-1012G</b>	GG/GA			Reference category
<b>rs4516035</b>	AA	2.6	0.10	1.46 (0.92-2.31)
<b>FokI</b>	CC/CT			Reference category
<b>rs2228570</b>	TT	0.57	0.45	1.27 (0.68-2.36)
<b>BsmI</b>	GG/GA			Reference category
<b>rs1544410</b>	AA	0.03	0.86	1.09 (0.39-3.07)
<b>ApaI</b>	TT/TG			Reference category
<b>rs7975232</b>	GG	0.38	0.54	1.21 (0.67-2.18)
<b>TaqI</b>	TT/TC			Reference category
<b>rs4516035</b>	CC	0.09	0.76	1.17 (0.41-3.36)

**Tabella 7.** stima del rischio di psoriasi per i cinque polimorfismi del *VDR* analizzati secondo il modello recessivo.

### *Associazione tra i polimorfismi e le caratteristiche clinicopatologiche*

I risultati dell'analisi di associazione caso-caso tra i genotipi dei 5 polimorfismi del *VDR* e caratteristiche cliniche e patologiche sono riportati nelle **Tabelle 8 e 9**. In particolare, sono state valutate il genere, l'età di insorgenza, la storia familiare, il tipo di psoriasi e la severità della patologia.

Non sono emerse associazioni tra i cinque polimorfismi analizzati e il genere, l'età di insorgenza, il tipo di psoriasi e la severità della patologia.

Per quanto riguarda l'analisi caso-caso considerando la storia familiare di psoriasi, è emersa una differenza statisticamente significativa nelle frequenze genotipiche di A-1012G ( $p=0.033$ ). Infatti, la frequenza del genotipo di rischio AA è risultata più alta in pazienti senza storia familiare di psoriasi (50%) rispetto ai pazienti con storia familiare di psoriasi (29.4%). È inoltre emersa un'associazione *borderline* fra la storia familiare di psoriasi e i genotipi di rischio di FokI ( $p=0.054$ ). In questo caso, la frequenza del genotipo di rischio TT è risultata essere più alta in pazienti con storia familiare di psoriasi (25.7%) rispetto ai pazienti senza storia familiare di psoriasi (12.2%).

Considerando che nella casistica analizzata, la severità della psoriasi è associata ad un alto valore di BMI, è stata approfondita l'analisi del ruolo che i polimorfismi del *VDR* potrebbero avere nel modulare il rischio di psoriasi di forma severa in pazienti che presentano differenti caratteristiche cliniche e patologiche, tra cui genere, età d'insorgenza, tipo di psoriasi, BMI e storia familiare. I dati relativi ai risultati ottenuti sono riportati nelle **Tabelle 10-14**.

Non sono emerse associazioni tra il rischio di psoriasi severa e polimorfismi del *VDR* in pazienti stratificati per età, storia familiare e BMI.

Nei pazienti stratificati per genere, è emersa un'associazione statisticamente significativa tra la severità della patologia e il genotipo TT di FokI ( $p=0.01$ ), risultato che suggerisce un incremento nel rischio di psoriasi severa in pazienti di sesso maschile portatori del genotipo di rischio (TT) di FokI.

Inoltre, nei pazienti stratificati per tipo di psoriasi, è emersa un'associazione statisticamente significativa tra la severità della patologia e il genotipo GG di ApaI ( $p=0.01$ ), risultato che suggerisce un incremento nel rischio di psoriasi severa in pazienti che presentano psoriasi artropatica portatori del genotipo di rischio (GG) di ApaI.

Polimorfismi	Genotipo	Genere		Età		Storia familiare	
		uomini	donne	<40 anni	≥40 anni	positiva	negativa
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>A-1012G rs4516035</b>	GG	8 (13.1)	3 (6.4)	4 (6.9)	7 (14)	2 (5.9)	9 (12.2)
	GA	28 (45.9)	22 (46.8)	28 (48.3)	22 (44)	22 (64.7)	28 (37.8)
	AA	25 (41)	22 (46.8)	26 (44.8)	21 (42)	10 (29.4)	37 (50)
		Chi-quadrato=1.39 p= 0.498		Chi-quadrato=1.49 p= 0.476		Chi-quadrato=6.8 <b>p= 0.033</b>	
<b>FokI rs2228570</b>	CC	21 (34.4)	20 (42.5)	21 (36.2)	20 (40)	8 (22.9)	33 (45.3)
	CT	32 (52.5)	17 (36.2)	30 (51.7)	19 (38)	18 (51.4)	31 (42.5)
	TT	8 (13.1)	10 (21.3)	7 (12.1)	11 (22)	9 (25.7)	9 (12.2)
		Chi-quadrato=3.08 p= 0.215		Chi-quadrato=2.81 p= 0.246		Chi-quadrato=5.82 p= 0.054	
<b>BsmI rs1544410</b>	GG	23 (37.7)	19 (40.4)	24 (41.4)	18 (36)	16 (45.7)	26 (35.4)
	GA	23 (37.7)	19 (40.4)	22 (38)	20 (40)	16 (45.7)	26 (35.4)
	AA	15 (24.6)	9 (19.2)	12 (20.6)	12 (24)	3 (8.6)	21 (29.2)
		Chi-quadrato=0.45 p= 0.797		Chi-quadrato=0.36 p= 0.835		Chi-quadrato=5.21 p= 0.074	
<b>ApaI rs7975232</b>	TT	21 (34.4)	16 (34)	19 (32.7)	18 (36)	8 (22.9)	29 (39.7)
	TG	30 (49.2)	20 (42.5)	28 (48.3)	22 (44)	20 (57.1)	30 (41.1)
	GG	10 (16.4)	11 (23.5)	11 (19)	10 (20)	7 (20)	14 (19.2)
		Chi-quadrato=0.92 p= 0.63		Chi-quadrato=0.20 p= 0.903		Chi-quadrato=2.69 p= 0.261	
<b>TaqI rs4516035</b>	TT	25 (41)	17 (36.2)	21 (36.2)	21 (42)	16 (45.8)	26 (35.4)
	TC	24 (39.3)	20 (42.5)	24 (41.4)	20 (40)	13 (37.1)	31 (42.5)
	CC	12 (19.7)	10 (21.3)	13 (22.2)	9 (18)	6 (17.1)	16 (22.1)
		Chi-quadrato=0.26 p= 0.879		Chi-quadrato=0.50 p= 0.778		Chi-quadrato=0.61 p= 0.739	

**Tabella 8.** distribuzione delle frequenze genotipiche per i 5 polimorfismi del VDR esaminati nei 108 pazienti psoriasici suddivisi secondo le loro caratteristiche cliniche. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ); in corsivo i *p-value* *borderline* (0.06-0.1).

Polimorfismi	Genotipo	Tipo		Severità	
		artropatica	non artropatica	lieve	moderato/severa
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<b>A-1012G rs4516035</b>	GG	3 (7.9)	8 (11.4)	5 (17.9)	6 (7.5)
	GA	20 (52.6)	30 (42.9)	12 (42.9)	38 (47.5)
	AA	15 (39.5)	32 (45.7)	11 (39.2)	36 (45)
		Chi-quadrato=1.03 p= 0.597		Chi-quadrato=2.44 p= 0.296	
<b>FokI rs2228570</b>	CC	13 (34.2)	28 (40)	12 (42.9)	29 (36.3)
	CT	19 (50)	30 (42.9)	9 (32.1)	40 (50)
	TT	6 (15.8)	12 (17.1)	7 (25)	11 (13.7)
		Chi-quadrato=0.52 p= 0.77		Chi-quadrato=3.27 p= 0.195	
<b>BsmI rs1544410</b>	GG	16 (42.1)	26 (37.1)	10 (35.7)	32 (40)
	GA	16 (42.1)	26 (37.1)	12 (42.9)	30 (37.5)
	AA	6 (15.8)	18 (25.8)	6 (21.4)	18 (22.5)
		Chi-quadrato=1.40 p= 0.496		Chi-quadrato=0.26 p= 0.877	
<b>ApaI rs7975232</b>	TT	14 (36.8)	23 (32.9)	11 (39.2)	26 (32.5)
	TG	17 (44.7)	33 (47.1)	9 (32.1)	41 (51.3)
	GG	7 (18.5)	14 (20)	8 (28.7)	13 (16.2)
		Chi-quadrato=0.18 p= 0.916		Chi-quadrato=3.53 p= 0.171	
<b>TaqI rs4516035</b>	TT	15 (39.5)	27 (38.6)	11 (39.2)	31 (38.8)
	TC	15 (39.5)	29 (41.4)	12 (42.9)	32 (40)
	CC	8 (21)	14 (20)	5 (17.9)	17 (21.2)
		Chi-quadrato=0.04 p= 0.979		Chi-quadrato=0.16 p= 0.923	

**Tabella 9.** distribuzione delle frequenze genotipiche per i 5 polimorfismi del VDR esaminati nei 108 pazienti psoriasici suddivisi secondo le loro caratteristiche patologiche.

Polimorfismo	Genere/Genotipo (valore di riferimento: donna)	Chi-quadrato	p-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	Uomo e A/A	0.10	0.75
	Uomo e G/A	1.33	0.25
<b>FokI rs2228570</b>	Uomo e C/T	0.02	0.89
	Uomo e T/T	<b>7.25</b>	<b>0.01</b>
<b>BsmI rs1544410</b>	Uomo e A/A	0.21	0.65
	Uomo e G/A	0.01	0.91
<b>ApaI rs7975232</b>	Uomo e G/G	0.33	0.57
	Uomo e T/G	0.84	0.36
<b>TaqI rs4516035</b>	Uomo e C/C	0.00	0.99
	Uomo e T/C	0.16	0.69

**Tabella 10.** valori di Chi quadrato e *p-value* per severità della psoriasi e genotipi dei polimorfismi del *VDR* incrociati con il genere dei pazienti. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ).

Polimorfismo	Età d'insorgenza/Genotipo (valore di riferimento: $\geq 40$ anni)	Chi-quadrato	p-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	<40 anni e A/A	0.02	0.90
	<40 anni e G/A	1.75	0.19
<b>FokI rs2228570</b>	<40 anni e C/T	1.70	0.19
	<40 anni e T/T	0.95	0.33
<b>BsmI rs1544410</b>	<40 anni e A/A	0.71	0.40
	<40 anni e G/A	0.07	0.79
<b>ApaI rs7975232</b>	<40 anni e G/G	0.11	0.74
	<40 anni e T/G	0.66	0.42
<b>TaqI rs4516035</b>	<40 anni e C/C	0.95	0.33
	<40 anni e T/C	0.03	0.86

**Tabella 11.** valori di Chi quadrato e *p-value* per severità della psoriasi e genotipi dei polimorfismi del *VDR* incrociati con l'età di insorgenza.

Polimorfismo	Storia Familiare/Genotipo (valore di riferimento: negativa)	Chi-quadrato	P-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	Con familiarità e A/A	0.11	0.74
	Con familiarità e G/A	0.03	0.86
<b>FokI rs2228570</b>	Con familiarità e C/T	0.07	0.78
	Con familiarità e T/T	1.86	0.17
<b>BsmI rs1544410</b>	Con familiarità e A/A	0.00	0.99
	Con familiarità e G/A	0.00	1.00
<b>ApaI rs7975232</b>	Con familiarità e G/G	0.44	0.51
	Con familiarità e T/G	1.87	0.17
<b>TaqI rs4516035</b>	Con familiarità e C/C	0.00	0.99
	Con familiarità e T/C	0.34	0.56

**Tabella 12.** valori di Chi quadrato e *p-value* per severità della psoriasi e genotipi dei polimorfismi del *VDR* incrociati con la storia familiare.



Polimorfismo	Tipologia/Genotipo (valore di riferimento: non artropatica)	Chi-quadrato	P-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	Artropatica e A/A	0.49	0.49
	Artropatica e G/A	1.33	0.25
<b>FokI rs2228570</b>	Artropatica e C/T	3.23	0.07
	Artropatica e T/T	1.02	0.31
<b>BsmI rs1544410</b>	Artropatica e A/A	1.38	0.24
	Artropatica e G/A	2.63	0.10
<b>ApaI rs7975232</b>	Artropatica e G/G	<b>7.46</b>	<b>0.01</b>
	Artropatica e T/G	0.15	0.70
<b>TaqI rs4516035</b>	Artropatica e C/C	0.62	0.43
	Artropatica e T/C	0.06	0.80

**Tabella 13.** valori di Chi quadrato e *p-value* per severità della psoriasi e genotipi dei polimorfismi del *VDR* incrociati con il tipo di psoriasi. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ).

Polimorfismo	BMI/Genotipo (valore di riferimento: normale)	Chi-quadrato	P-value
<b>A-1012G rs4516035</b>	Obesità e A/A	0.00	1.00
	Obesità e G/A	0.00	1.00
	Sovrappeso e A/A	0.00	0.97
	Sovrappeso e G/A	1.05	0.31
<b>FokI rs2228570</b>	Obesità e C/T	0.00	1.00
	Obesità e T/T	0.00	1.00
	Sovrappeso e C/T	0.96	0.33
	Sovrappeso e T/T	3.11	0.08
<b>BsmI rs1544410</b>	Obesità e A/A	0.00	1.00
	Obesità e G/A	0.00	1.00
	Sovrappeso e A/A	1.24	0.27
	Sovrappeso e G/A	0.04	0.85
<b>ApaI rs7975232</b>	Obesità e G/G	0.00	1.00
	Obesità e T/G	0.00	1.00
	Sovrappeso e G/G	0.00	1.00
	Sovrappeso e T/G	1.88	0.17
<b>TaqI rs4516035</b>	Obesità e C/C	-	-
	Obesità e T/C	0.00	1.00
	Sovrappeso e C/C	0.19	0.66
	Sovrappeso e T/C	0.00	0.99

**Tabella 14.** valori di Chi quadrato e *p-value* per severità della psoriasi e genotipi dei polimorfismi del *VDR* incrociati con il BMI. In grassetto i *p-value* statisticamente significativi ( $\leq 0.05$ ).

## ***ANALISI FUNZIONALE DEI POLIMORFISMI DEL VDR***

Nella seconda fase dello studio abbiamo valutato la rilevanza funzionale del polimorfismo A-1012G del *VDR*, risultato associato con un aumentato rischio di psoriasi nella casistica presa in esame.

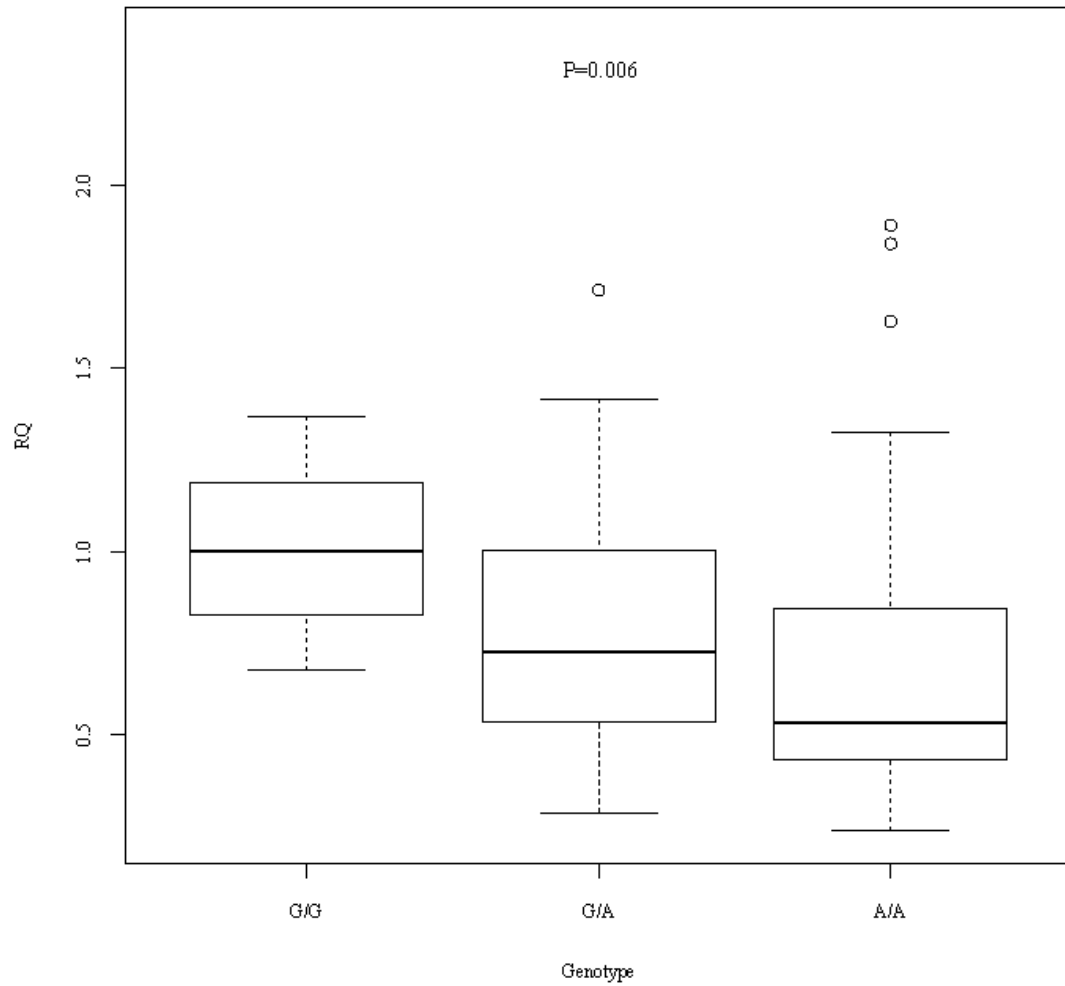
In particolare è stata effettuata un'analisi dell'espressione genica del *VDR* mediante *Real-Time* PCR quantitativa con metodologia *TaqMan*, in un totale di 80 campioni per cui è stato possibile estrarre un'aliquota di RNA da sangue. Tra gli 80 campioni selezionati erano presenti 11 casi (13.8%) portatori del genotipo GG, 36 (45%) portatori del genotipo GA, e 33 (41.2%) portatori del genotipo AA. L'espressione del *VDR* viene determinata come la differenza tra il parametro Ct (ciclo soglia) del gene target (*VDR*) e il Ct del gene *housekeeping* *PGKI* per ciascun campione ( $\Delta$ Ct).

Allo scopo di verificare se i genotipi di rischio del polimorfismo A-1012G fossero associati con cambiamenti nell'espressione genica del *VDR*, è stata condotta un'analisi della varianza per comparare la media dei valori di  $\Delta$ Ct nei tre genotipi. Considerando l'espressione del genotipo di riferimento (GG) come *Relative Quantity* (RQ) =1, valori inferiori a 1 indicheranno una minore espressione del *VDR*, mentre valori superiori ad 1 ne indicheranno una maggiore espressione.

### ***Associazione tra A-1012G e variazioni nell'espressione genica del VDR***

La media dei valori di  $\Delta$ Ct ( $\pm$  Errore Standard, ES) è risultata  $5.08 \pm 0.38$  per i casi portatori del genotipo GG,  $5.72 \pm 0.21$  per i casi portatori del genotipo GA, e  $5.99 \pm 0.22$  per i casi portatori del genotipo AA. La differenza tra i valori medi di  $\Delta$ Ct nei tre genotipi considerati è risultata statisticamente significativa ( $p=0.0028$ ).

Comparando i livelli di espressione del mRNA del *VDR* nei tre gruppi, con il genotipo GG come riferimento, il valore RQ per il genotipo GA è 0.749 ( $p=0.098$ ), mentre il valore RQ per il genotipo AA è 0.601 ( $p=0.013$ ). Complessivamente, la differenza dei valori di RQ per i tre genotipi considerati, con GG come riferimento, è risultata statisticamente significativa ( $p=0.006$ ). È stato quindi osservato che l'espressione del *VDR*, considerata secondo i genotipi di rischio del polimorfismo A-1012G, diminuisce significativamente e in modo dose-dipendente con il numero degli alleli A di cui un individuo è portatore. La rappresentazione grafica dell'analisi è illustrata in **Figura 13**.



**Figura 13.** livelli di mRNA del gene *VDR* (valutati come RQ) di 80 campioni, suddivisi nei tre genotipi del polimorfismo A-1012G , con G/G come riferimento (RQ=1).

## ***DISCUSSIONE***

La psoriasi è una malattia infiammatoria sistemica, a principale interessamento cutaneo, diffusa in tutto il mondo con una prevalenza nella popolazione generale stimata intorno al 2-4% (Nestle FO *et al*, 2009). In Italia la prevalenza della psoriasi equivale al 2.9% della popolazione, con una notevole disomogeneità di distribuzione tra le varie regioni (Saraceno R *et al*, 2008).

La sua patogenesi è multifattoriale, in quanto le manifestazioni cliniche della psoriasi sono determinate dalla combinazione di fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali scatenanti che, in associazione alla presenza di una disregolazione di base del sistema immunitario, determina un'abnorme risposta immunitaria (Elder JT *et al*, 2009). Le lesioni cutanee tipiche di tale patologia sono causate dall'iperproliferazione e dalla differenziazione anomala dei cheratinociti e dall'infiltrazione nell'epidermide di cellule infiammatorie, comprese le cellule T e i neutrofili.

La forte componente genetica nella predisposizione alla psoriasi è messa in evidenza dal maggior fattore di rischio per l'insorgenza della psoriasi, che è rappresentato dalla storia familiare positiva per la patologia. Ad oggi, attraverso studi analisi di *linkage* o più recentemente attraverso studi di *Genome-wide Association* (GWAS), sono stati identificati numerosi loci di suscettibilità alla psoriasi. È interessante notare che i fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla psoriasi corrispondono a varianti presenti in geni coinvolti in diversi *pathway* legati all'insorgenza e alla progressione della patologia, come i *pathway* della risposta immunitaria innata e adattativa, dell'integrità della barriera epidermica e la via di *signaling* delle cellule Th17 (Hebert HL *et al*, 2011). Tuttavia, le alterazioni genetiche identificate riescono a spiegare solo in parte la suscettibilità alla psoriasi, suggerendo che altri fattori genetici potrebbero essere coinvolti nella sua patogenesi.

In questo contesto, la via del segnale della vitamina D è di grande interesse nello studio della psoriasi a causa dell'effetto antiproliferativo che la vitamina D stessa opera sui cheratinociti, e dei suoi effetti immunosoppressivi (Mathieu C *et al*, 2004). La vitamina D esplica un ampio spettro di azioni mediante l'interazione con il suo effettore, il recettore della vitamina D (VDR), che agisce come fattore di trascrizione attivato dal ligando. Il VDR è espresso nei cheratinociti presenti in cute sana e psoriasica, e in cellule del sistema immunitario (monociti, macrofagi e linfociti T) (Wang Y *et al*, 2012). Trattamenti topici con vitamina D o suoi analoghi si sono rivelati efficaci nella

terapia della psoriasi e, inoltre, una diversa risposta alla terapia è stata associata a variazioni nell'espressione del VDR nei cheratinociti (Chen ML *et al*, 1996; Zhang CF and Liu ZP, 2013).

Complessivamente, i molteplici effetti a livello del sistema immunitario e a livello cutaneo, hanno reso il VDR un gene candidato nell'insorgenza e nella progressione, ma anche nella suscettibilità genetica, alla psoriasi.

E' stato dimostrato che alcuni polimorfismi nel gene VDR sono associati con diverse patologie neoplastiche e autoimmuni (Zmuda JM *et al*, 2000). Tuttavia, ad oggi pochi studi hanno valutato il ruolo dei polimorfismi del gene VDR nella suscettibilità genetica alla psoriasi, ottenendo risultati contrastanti e non conclusivi. Inoltre, i meccanismi molecolari mediante i quali i polimorfismi presenti in regioni non codificanti possano influenzare l'attività di VDR sono in gran parte ancora sconosciuti.

Nel nostro studio abbiamo indagato le basi della suscettibilità genetica alla psoriasi valutando, attraverso uno studio caso-controllo, il ruolo dei polimorfismi del gene VDR, in particolare di rs4516035 (A-1012G), rs2228570 (FokI), rs1544410 (BsmI) rs7975232 (ApaI), e rs731236 (TaqI). Abbiamo successivamente valutato l'associazione tra i polimorfismi risultati associati al rischio e le più importanti caratteristiche cliniche della psoriasi. Inoltre, ne abbiamo esaminato la rilevanza funzionale, tramite analisi dell'espressione dell'RNA messaggero del VDR in cellule mononucleate del sangue periferico. I polimorfismi sono stati analizzati in una serie di 108 pazienti affetti da psoriasi e 268 donatori di sangue utilizzati come controlli sani.

Per valutare se la serie considerata fosse rappresentativa della patologia, si è proceduto all'analisi delle caratteristiche clinicopatologiche riscontrate, in associazione alla severità della psoriasi.

È emersa un'associazione statisticamente significativa tra severità della psoriasi e un alto BMI ( $p=0.02$ ), che suggerisce che i pazienti sovrappeso/obesi tendono ad avere una forma di psoriasi più severa. Inoltre, i pazienti con una patologia di tipo moderato/severo tendono a essere più giovani e con un tipo artropatico di psoriasi rispetto ai pazienti con una forma lieve ( $p=0.07$ ). Queste osservazioni sono in accordo con quanto recentemente osservato in letteratura (Armstrong AW *et al*, 2012), e suggeriscono che la serie collezionata sia rappresentativa della patologia.

Nella serie analizzata, il polimorfismo del gene *VDR* A-1012G ha mostrato associazioni statisticamente significative con rischio complessivo di psoriasi. I nostri risultati hanno dimostrato che, come già osservato nel melanoma maligno, l'allele A è significativamente sovrarappresentato nei pazienti psoriasici rispetto ai controlli sani ( $p=0.035$ ). Inoltre, è risultato che i pazienti portatori del genotipo AA o del genotipo GA hanno un aumentato rischio di psoriasi rispetto ai pazienti portatori del genotipo GG ( $OR>1$ ). I nostri risultati hanno dimostrato per la prima volta che il polimorfismo A-1012G incrementa il rischio complessivo di psoriasi. Infatti, solo un precedente studio ha testato questo polimorfismo in una serie di 205 pazienti psoriasici e 80 controlli sani, senza evidenziare alcuna associazione statisticamente significativa con il rischio complessivo di psoriasi (Halsall JA *et al*, 2005).

Poiché il rischio associato ai polimorfismi del *VDR* potrebbe anche essere collegato a specifiche caratteristiche cliniche della psoriasi, è stata effettuata una dettagliata analisi caso-caso per valutare tali possibili associazioni.

La nostra serie ben caratterizzata ci ha permesso di osservare una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi della variante A-1012G tra i pazienti stratificati in base alla storia familiare. In particolare, i genotipi di rischio di A-1012G sono risultati significativamente più frequenti nei pazienti senza storia familiare di psoriasi rispetto ai pazienti con storia familiare. Ciò suggerisce che l'impatto del polimorfismo A-1012G sulla suscettibilità genetica alla psoriasi sia troppo basso per essere considerato un fattore di rischio genetico familiare, tuttavia nei casi sporadici tale polimorfismo potrebbe modulare il rischio di insorgenza della patologia, probabilmente in interazione con fattori di rischio ambientali. Questi risultati sono in contrasto con quanto osservato nel precedente studio sul polimorfismo A-1012G in pazienti psoriasici, in cui sebbene non emergesse un'associazione con il rischio complessivo di psoriasi, la frequenza dell'allele A risultava significativamente più bassa nei casi non familiari rispetto ai casi con familiarità (Halsall JA *et al*, 2005). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta a differenze nella numerosità e nel *background* genetico delle due casistiche analizzate, o anche alla differente frequenza di casi con storia familiare di psoriasi nei due studi (43% *vs* 32%), e merita di essere valutata in studi più approfonditi e su casistiche più numerose.

È interessante notare che non sono emerse associazioni statisticamente significative tra i polimorfismi analizzati e il genere dei pazienti, l'età di insorgenza, il tipo di psoriasi e la severità della patologia. Tuttavia, poiché nel nostro studio è emersa un'associazione significativa tra severità della psoriasi e BMI, abbiamo approfondito lo studio di questa associazione al fine di verificare se il rischio di psoriasi di tipo severo può essere modulato da polimorfismi del *VDR* in pazienti stratificati in base alle caratteristiche clinico-patologiche. Non sono emerse associazioni tra la severità della psoriasi e i polimorfismi del *VDR* in pazienti in sovrappeso /obesi. Ciò suggerisce che il BMI alto predisponga ad una forma più severa di psoriasi come fattore di rischio ambientale, indipendentemente dai polimorfismi del *VDR*.

Come precedentemente evidenziato, pochi studi hanno riportato un aumento di rischio per i polimorfismi FokI, BsmI, ApaI e TaqI in popolazioni caucasiche (Kaya TI *et al*, 2002; Dayangac-Erden *et al*, 2007).

Una metanalisi recentemente pubblicata, che ha incluso 11 studi per un totale di 1106 casi e 1209 controlli, ha escluso un ruolo di rilievo per questi quattro polimorfismi del *VDR* nella suscettibilità alla psoriasi, sottolineando tuttavia che essi potrebbero aumentare il rischio di psoriasi in popolazioni o sottogruppi specifici (Stefanic *et al*, 2013).

I risultati del presente studio, sebbene basati su una popolazione meno numerosa ma più omogenea, sono in accordo con i dati di metanalisi nell'escludere un aumento di rischio in pazienti portatori dei polimorfismi FokI, BsmI, ApaI e TaqI. Sono tuttavia emerse associazioni molto interessanti, che suggeriscono uno specifico incremento nel rischio di psoriasi di grado severo in pazienti di sesso maschile portatori del genotipo di rischio (TT) di FokI e in pazienti che presentano psoriasi artropatica portatori del genotipo di rischio (GG) di ApaI. Sebbene questi risultati potrebbero essere influenzati dal piccolo numero di casi presenti in ogni categoria considerata nell'analisi, essi forniscono le prime evidenze di un effetto genere-specifico o tipo-specifico per alcuni polimorfismi del *VDR* nella suscettibilità alla psoriasi di tipo severo. In particolare, per quanto riguarda la psoriasi artropatica, che colpisce circa il 30% dei pazienti psoriasici (Gladman DD *et al*, 2005), i nostri risultati possono essere di grande utilità nell'approfondire la conoscenza di questo particolare tipo di psoriasi, in quanto suggeriscono che la sua severità potrebbe essere modulata da fattori genetici.



Un altro importante risultato di questo studio è di aver dimostrato la rilevanza funzionale di A-1012G in pazienti affetti da psoriasi. È stato precedentemente ipotizzato che i polimorfismi all'interno della regione del promotore possano avere un ruolo funzionale sull'espressione o sull'attività del *VDR*, e quindi essere più strettamente associati con la predisposizione a diverse patologie. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dell'associazione di A-1012G con rischio di psoriasi non sono ancora noti. È stato osservato tramite analisi *in silico* che l'allele A contiene un sito di legame per GATA-3, che rappresenta un fattore di segnalazione per le cellule T-helper 2 (Th2) (Halsall JA *et al*, 2005). Poiché la risposta infiammatoria nella psoriasi è Th1-mediata, l'effetto di *switch* da cellule Th1 a cellule Th2 operato da GATA-3 ha in passato suggerito un ruolo protettivo per l'allele A (Fang Y, 2005; Halsall JA *et al*, 2005; Halsall JA *et al*, 2009). Inoltre, studi condotti su linee cellulari *in vitro* tramite *reporter assay* hanno mostrato un aumento dell'attività del promotore contenente l'allele A di A-1012G (d'Alesio A *et al*, 2005). Tuttavia, queste osservazioni sono in disaccordo con l'aumento del rischio di psoriasi associato all'allele A di A-1012G osservato nel presente studio.

Per valutare il ruolo funzionale di A-1012G in pazienti psoriasici, è stata effettuata un'analisi di espressione genica in Real-Time q-PCR del gene *VDR* in cellule mononucleate del sangue periferico. I nostri risultati hanno dimostrato che i genotipi GA e AA del polimorfismo A-1012G sono significativamente correlati con una minore espressione del *VDR*, in termini di livelli di mRNA rilevati nelle cellule mononucleate del sangue periferico, rispetto al genotipo GG, e che questa associazione è dose-dipendente, cioè che i livelli di espressione diminuiscono a seconda del numero degli alleli A presenti nel genotipo. I risultati dell'analisi funzionale sono pienamente compatibili con le associazioni epidemiologiche osservate e riescono a spiegare il ruolo del polimorfismo nella suscettibilità e nella progressione della psoriasi. Infatti, sebbene l'allele A rappresenti un sito putativo per GATA-3, una diminuita espressione di *VDR* in pazienti affetti da psoriasi portatori di almeno un allele A può ridurre l'ipotetico ruolo benefico di GATA-3 nel sopprimere gli effetti delle cellule Th1. I livelli meno abbondanti di *VDR* nei linfociti possono anche influenzare l'attività immunosoppressiva della vitamina D (Boonstra A *et al*, 2001). In particolare, l'azione inibitoria del

complesso vitamina D/VDR sul sistema immunitario (**Figura 9**), risulterebbe diminuita, con conseguente aumento del rischio di insorgenza di psoriasi.

Inoltre, mentre i precedenti studi funzionali sono stati condotti *in vitro* con linee cellulari, nel presente studio i livelli di mRNA sono stati valutati nelle cellule mononucleate del sangue periferico dei pazienti psoriasici stessi. È noto che queste cellule esprimono il VDR e sembra che siano un buon modello per gli altri tessuti bersaglio della vitamina D, come la cute, poiché in esse sono state osservate tutte le anomalie qualitative e quantitative del VDR (Zerwekh JE *et al*, 1993). In un recente studio di espressione genica su cellule del sistema immunitario di controlli sani, l'espressione di VDR risultava analoga in monociti, cellule Th e natural killer (NK) (Morán-Auth Y *et al*, 2013), ad ulteriore prova che le differenze osservate nell'espressione del VDR siano associate al polimorfismo A-1012G e non ad alterazioni della formula leucocitaria dei pazienti analizzati.

È infine importante ricordare che l'allele A, associato con il rischio di psoriasi, rappresenta l'allele più frequente anche nella popolazione normale, quindi la riduzione nell'espressione del VDR provocata dalla presenza tale allele può rappresentare una spiegazione funzionale dell'associazione con l'aumentato rischio di psoriasi, tuttavia evidentemente non rappresenta un *background* genetico sufficiente a provocare la patologia, in accordo anche con l'osservazione che tale polimorfismo risulta associato specificamente con casi sporadici in cui i fattori ambientali giocano un ruolo predominante.

## ***CONCLUSIONI***

In conclusione, da questo studio caso-controllo è emerso che il polimorfismo A-1012G nella regione del promotore del gene *VDR* è associato ad un aumento del rischio complessivo di psoriasi. Inoltre, nell'analisi caso-caso, tale polimorfismo ha mostrato una specifica associazione con la suscettibilità alla psoriasi non familiare.

Di notevole rilievo, i genotipi di rischio del polimorfismo A-1012G sono risultati significativamente associati con una minore espressione del *VDR* nelle cellule mononucleate del sangue periferico, suggerendo che il polimorfismo A-1012G può avere un effetto funzionale diretto sul rischio di psoriasi riducendo i livelli cellulari del recettore *VDR* e quindi la sua azione immunomodulatoria.

D'altra parte, i nostri risultati portano ad escludere un ruolo rilevante nella suscettibilità genetica alla psoriasi per i polimorfismi *FokI*, *BsmI*, *ApaI* e *TaqI*, in accordo con i dati di metanalisi recentemente pubblicati. Tuttavia, i polimorfismi *FokI* e *ApaI* potrebbero avere un ruolo nella suscettibilità alla psoriasi di grado severo in specifici sottogruppi di pazienti.

Un punto di forza del nostro studio è rappresentato dalla serie di pazienti psoriasici, superiore a 100 casi e ben caratterizzata per le principali caratteristiche clinicopatologiche, e il numero di controlli analizzati che ha permesso di impostare il studio caso-controllo con un rapporto di circa 1:2.5 (108 casi e 268 controlli). Ad oggi, non sono presenti in letteratura altri studi con queste caratteristiche per valutare l'impatto di questi cinque polimorfismi del *VDR* nella psoriasi.

Nel complesso, i risultati di questo studio sono di particolare interesse clinico, in primo luogo poichè potrebbero essere d'aiuto nella stima del rischio genetico nella suscettibilità alla psoriasi nella popolazione. Inoltre, considerando il ruolo funzionale dei polimorfismi del *VDR*, in particolare del polimorfismo nel promotore A-1012G, si potrebbe spiegare variabilità nella risposta alla terapia con gli analoghi della vitamina D nei pazienti psoriasici.

## ***BIBLIOGRAFIA***

1. Adorini L. Immunomodulatory effects of vitamin D receptor ligands in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2002 Jun;2(7):1017-28.
2. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004;16:127-34.
3. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:404-12.
4. Albanesi C, De Pità O, Girolomoni G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. *Clin Dermatol* 2007; 25: 581-588.
5. Andressen C, Henseler T. Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories. *Hautarzt.* 1982 Apr;33(4):214-7.
6. Antico A Tampoia M Tozzoli R. Il ruolo della vitamina D nelle malattie autoimmuni. *Ligand assay* 2010;15(4): 346-356.
7. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1997 Jun;12(6):915-21.
8. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutr Diabetes.* 2012 Dec 3;2:e54. doi: 10.1038/nutd.2012.26.
9. Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaëlsson G, Evans J, Munro M, Veal C, Allen M, Leman J, David Burden A, Kirby B, Connolly M, Griffiths CE, Trembath RC, Kere J, Saarialho-Kere U, Barker JN. Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol.* 2003 Apr;120(4):627-32<sup>1</sup>.
10. Asumalahti K, Laitinen T, Lahermo P, Suomela S, Itkonen-Vatjus R, Jansen C, Karvonen J, Karvonen SL, Reunala T, Snellman E, Uurasmaa T, Saarialho-Kere

- U, Kere J. Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in Finnish families not associated with PSORS1. *J Invest Dermatol.* 2003 Oct;121(4):735-40<sup>2</sup>.
11. Ayala F. Clinical presentation of psoriasis. *Reumatismo.* 2007;59 Suppl 1:40-5.
  12. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(10):3294-8.
  13. Barker JN. The pathophysiology of psoriasis. *Lancet.* 1991 Jul 27; 338(8761):227-30.
  14. Basavaraj KH et al – Stress and quality of life in psoriasis: an update. *International Journal of Dermatology* 2011, 50: 783-92.
  15. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol.* 2010 Dec;49(12):1351-61.
  16. Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem.* 2004 Jun 1;92(3):436-44.
  17. Bikle DD. Vitamin D and the skin. *J Bone Miner Metab.* 2010 Mar;28(2):117-30.
  18. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):4974-80.
  19. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res.* 1983;275(3):181-9.

20. Boyman O, Conrad C, Tonel G et al. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol* 2007; 28:51-57.
21. Braun-Falco O, Burg G. Inflammatory infiltrate in psoriasis vulgaris. A cytochemical study. *Arch Klin Exp Dermatol*. 1970;236(3):297-314.
22. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):F157-75.
23. Capon F, Novelli G, Semprini S et al. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol* 1999;112.
24. Capon F, Semprini S, Chimenti S, Fabrizi G, Zambruno G, Murgia S, Carcassi C, Fazio M, Mingarelli R, Dallapiccola B, Novelli G. Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*. 2001 May;116(5):728-30.
25. Capon F, Trembath RC, Barker JN. An update on the genetics of psoriasis. *Dermatol Clin*. 2004 Oct;22(4):339-47, vii.
26. Chandran V. The genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Apr;44(2):149-56. doi: 10.1007/s12016-012-8303-5.
27. Chen ML, Perez A, Sanan DK, Heinrich G, Chen TC, Holick MF. Induction of vitamin D receptor mRNA expression in psoriatic plaques correlates with clinical response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Invest Dermatol* 1996; 106:637-641.
28. Chen S, Sims GP, Chen XX, et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007;179:1634-47.
29. Christophers E. Psoriasis-Epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* :314-20,2001.



30. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol* 1998;28:3017-30.
31. Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10529-34.
32. Cutolo M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology* 2009;48:210-2.
33. d'Alésio A, Garabédian M, Sabatier JP, Guaydier-Souquières G, Marcelli C, Lemaçon A, Walrant-Debray O, Jehan F. Two single-nucleotide polymorphisms in the human vitamin D receptor promoter change protein-DNA complex formation and are associated with height and vitamin D status in adolescent girls. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 15;14(22):3539-48.
34. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001 Aug 2;345(5):340-50.
35. Dayangac-Erden D, Karaduman A, Erdem-Yurter H. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Turkish familial psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*. 2007 Dec;299(10):487-91.
36. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579–2585.
37. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol* 2005; 289: F8-F28.
38. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, Voorhees JJ, Abecasis GR, Nair RP. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1213-26.

39. Enamandram M, Kimball AB. Psoriasis epidemiology: the interplay of genes and the environment. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):287-9. doi: 10.1038/jid.2012.434.
40. Enlund F, Samuelsson L, Enerbäck C, Inerot A, Wahlström J, Yhr M, Torinsson A, Riley J, Swanbeck G, Martinsson T. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet.* 1999 Oct-Nov;7(7):783-90.
41. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet.* 2005 Nov;77(5):807-23.
42. Farber EM, Nail L. The natural history of psoriasis in 5600 patients. *Dermatologica* 1974;148:1-18.
43. Feldman D, Chen T, Hirst M, Colston K, Karasek M, Cone C. Demonstration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in human skin biopsies. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51:1463–1465.
44. Gelfand JM, Stern RS, Nijsten T. et al. The prevalence of psoriasis in African Americans: results from a population based study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53(1) 23-26, 2005.
45. Gladman DD, Antoni C, Mease P et al. Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:ii14–17.
46. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007 Jul 21;370(9583):263-71.
47. Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Fry L. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol.* 2007 Feb;156(2):258-62.

48. Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Oct;53(4):555-68; quiz 569-72.
49. Halsall JA, Osborne JE, Potter L, Pringle JH, Hutchinson PE. A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2004 Aug 16;91(4):765-70.
50. Halsall JA, Osborne JE, Pringle JH, Hutchinson PE. Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism, are associated with vitamin D3 responsiveness and non-familial susceptibility in psoriasis. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 May;15(5):349-55.
51. Halsall JA, Osborne JE, Epstein MP, Pringle JH, Hutchinson PE. The unfavorable effect of the A allele of the vitamin D receptor promoter polymorphism A-1012G has different mechanisms related to susceptibility and outcome of malignant melanoma. *Dermatoendocrinol*. 2009 Jan;1(1):54-7.
52. Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat Rev Immunol*. 2011 Aug 19;11(9):584-96.
53. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol*. 1997 Sep;154 Suppl:S57-73.
54. Hébert HL, Ali FR, Bowes J, Griffiths CE, Barton A, Warren RB. Genetic susceptibility to psoriasis and psoriatic arthritis: implications for therapy. *Br J Dermatol*. 2012 Mar;166(3):474-82. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10712.x.
55. Heller MM et al – Stress as an influencing factor in psoriasis. *Skin Therapy Lett*. 2011 May;16(5):1-4;
56. Helliwell PS, Taylor WJ. Classification and diagnostic criteria for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Mar;64 Suppl 2:ii3-8.

57. Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, Chamian F, Gordon D, Heffernan M, Daw JA, Robarge J, Ott J, Kwok PY, Menter A, Bowcock AM. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet.* 2003 Dec;35(4):349-56.
58. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985.13,340-6.
59. Hensen P, Windemuth C, Hüffmeier U, Rüschenhoff F, Stadelmann A, Hoppe V, Fenneker D, Ständer M, Schmitt-Egenolf M, Wienker TF, Traupe H, Reis A. Association scan of the novel psoriasis susceptibility region on chromosome 19: evidence for both susceptible and protective loci. *Exp Dermatol.* 2003 Aug;12(4):490-6.
60. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extrarenal 1 $\alpha$ -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 31-8.
61. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Jun;39(2):365-79.
62. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 6th ed. American Society for Bone and Mineral Research, Washington 2006; 129-137.
63. Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1  $\alpha$ , 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* 1983; 113:1950–1957.
64. Jin Y, Yang S, Zhang F, Kong Y, Xiao F, Hou Y, Fan X, Zhang X. Combined effects of HLA-Cw6 and cigarette smoking in psoriasis vulgaris: a hospital-based case-control study in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 Feb;23(2):132-7.

65. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000 Mar;14(3):401-20.
66. Kavli et al. Psoriasis: familial predisposition and environmental factors. *Br. Med. J*. 291(6501), 999-1000, 1985.
67. Kaya TI, Erdal ME, Tursen U, Camdeviren H, Gunduz O, Soylemez F, Ikizoglu G. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and psoriasis among the Turkish population. *Arch Dermatol Res*. 2002 Aug;294(6):286-9.
68. Kontula K, Välimäki S, Kainulainen K, Viitanen AM, Keski-Oja J. Vitamin D receptor polymorphism and treatment of psoriasis with calcipotriol. *Br J Dermatol*. 1997 Jun;136(6):977-8.
69. Kragballe K, Gjertsen B, DeHoop D, Karlsmark T, vanDe Kerkhof P, Larko O. Double-blind, right/left comparison of calcipotriol and betamethasone valerate in treatment of psoriasis vulgaris. *Lancet* 1991; 337:193–196.
70. Lee DY, Park BS, Choi KH, Jeon JH, Cho KH, Song KY, Kim IG, Youn JI. Vitamin D receptor genotypes are not associated with clinical response to calcipotriol in Korean psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*. 2002 Mar;294(1-2):1-5.
71. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Vitamin D receptor ApaI, TaqI, BsmI, and FokI polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Jun;39(6):6471-8.
72. Lehmann B, Querings K, Reichrath J. Vitamin D and skin: new aspects for dermatology. *Exp Dermatol* 2004;1: 11–15.
73. Liu JL, Zhang SQ, Zeng HM. ApaI, BsmI, FokI and TaqI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of psoriasis: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 Apr 28. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04553.x.

74. Liu Y, Krueger JG, Bowcock AM. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. *Genes Immun*. 2007 Jan;8(1):1-12.
75. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445: 886-873.
76. Martin BA, Chalmers RJ, Telfer NR. How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis? *Arch Dermatol*. 1996 Jun;132(6):717-8.
77. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002; 8:174–179.
78. Mathieu C, van Etten E, Decallonne B, Guilietti A, Gysemans C, Bouillon R, Overbergh L. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89–90:449–452.
79. Matthews D, Fry L, Powles A, Weber J, McCarthy M, Fisher E, Davies K, Williamson R. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):231-3.
80. Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol* 2000;30:498-508.
81. Matz H, Orion E, Wolf R. Balneotherapy in dermatology. *Dermatol Ther* 2003;16: 132–134.
82. McFadden JP, Baker BS, Powles AV, Fry L. Psoriasis and streptococci: the natural selection of psoriasis revisited. *Br J Dermatol*. 2009 May;160(5):929-37.
83. Mee JB, Cork MJ. Vitamin D receptor polymorphism and calcipotriol response in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1998 Mar;110(3):301-2.

84. Meier M, Sheth PB. Clinical spectrum and severity of psoriasis. *Curr Probl Dermatol*. 2009;38:1-20.
85. Milavec-Puretić V, Mance M, Ceović R, Lipozenčić J. Drug induced psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2011;19(1):39-42.
86. Milde P, Hauser U, Simon T, Mall G, Ernst V, Haussler MR, et al. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97:230–239.
87. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997 Jul;11(8):1165-79.
88. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1973;3(1):55-78.
89. Morán-Auth Y, Penna-Martinez M, Shoghi F, Ramos-Lopez E, Badenhop K. Vitamin D status and gene transcription in immune cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 Feb 13. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.005. [Epub ahead of print]
90. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6665–6669
91. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994 Jan 20;367(6460):284-7.
92. Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet*. 1997 Aug;6(8):1349-56.

93. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, Weichenthal M, Abecasis GR, Lim HW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet.* 2006 May;78(5):827-51.
94. Naldi L, Parazzini F, Peli L, Chatenoud L, Cainelli T. Dietary factors and the risk of psoriasis. Results of an Italian casecontrolStudy. *Br J Dermatol* 1996;134: 101–106.
95. Naldi L, Peli L, Parazzini F, Carrel CF. Psoriasis Study Group of the Italian group for Epidemiological Research in Dermatology. Family history of psoriasis, stressful life events and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis: result of a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 433–438.
96. Naldi L, Chatenoud L, Linder D et al. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: result from an Italian case-control study. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 61–67.
97. Nalluri R, Arun B, Rhodes LE. Photoaggravated hand and foot psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010 Oct;26(5):261-2. doi: 10.1111/j.1600-0781.2010.00527.x.
98. Nejentsev S, Godfrey L, Snook H, Rance H, Nutland S, Walker NM, Lam AC, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Undlien DE, Rønningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Newport MJ, Clayton DG, Todd JA: Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum Mol Genet* 2004, 13:1633–1639.
99. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009 Jul 30;361(5):496-509.



100. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994 Jul;94(1):202-9.
101. Nevitt GJ, Hutchinson PE. Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol.* 1996 Oct;135(4):533-7.
102. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):491S-499S.
103. Oka A, Tamiya G, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Makino S, Shiina T, Yoshitome M, Iizuka M, Sasao Y, Iwashita K, Kawakubo Y, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H. Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet.* 1999 Nov;8(12):2165-70.
104. Okita H, Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. Polymorphism of the vitamin D(3) receptor in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2002 Jul;294(4):159-62.
105. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM; Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):377-85.
106. Park BS, Park JS, Lee DY, Youn JI, Kim IG. Vitamin D receptor polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol.* 1999 Jan;112(1):113-6.
107. Patel RV, Weinberg JM. Psoriasis in the patient with human immunodeficiency virus, part 1: review of pathogenesis. *Cutis.* 2008 Aug;82(2):117-22.

108. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood* 2005;106:3490-7.
109. Puig-Sanz L. Psoriasis, a systemic disease? *Actas Dermosifiliogr.* 2007; 98:396-402.
110. Raychaudhuri SP, Gross J. Psoriasis risk factors: role of lifestyle practices. *Cutis* 2000; 66: 348–352.
111. Robinson A, Van Voorhees AS, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Bebo BF Jr, Kalb RE. Treatment of pustular psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol.* 2012 Aug;67(2):279-88.
112. Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell.* 2000;5(1):173–179.
113. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, et al. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:2850-65.
114. Rucević I, Barisić-Drusko V, Glavas-Obrovac L, Stefanić M. Vitamin D endocrine system and psoriasis vulgaris--review of the literature. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2009;17(3):187-92.
115. Rucevic I, Stefanic M, Tokic S, Vuksic M, Glavas-Obrovac L, Barisic-Drusko V. Lack of association of vitamin D receptor gene 3'-haplotypes with psoriasis in Croatian patients. *J Dermatol.* 2012 Jan;39(1):58-62.
116. Ruggiero M, Gulisano M, Peruzzi B, Giomi B, Caproni M, Fabbri P, Pacini S. Vitamin D receptor gene polymorphism is not associated with psoriasis in the Italian Caucasian population. *J Dermatol Sci* 2004;35:68-70.
117. Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med.* 1972 Oct 12;287(15):738-40.

118. Rutter KJ, Watson RE, Cotterell LF, Brenn T, Griffiths CE, Rhodes LE. Severely photosensitive psoriasis: a phenotypically defined patient subset. *J Invest Dermatol.* 2009 Dec;129(12):2861-7.
119. Sabat R, Sandra Philipp, Conny Hoflich, Stefanie Kreutzer, Elizabeth Wallace, Khusru Asadullah, Hans-Dieter Volk, Wolfram Sterry and Kerstin Wolke. Immunopathogenesis of psoriasis. *Experimental Dermatology* 2007;16:779-798.
120. Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Tada Y, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2002 Nov;30(2):167-71.
121. Sago GS, Cork MJ, Patel R, Tazi-Ahnini R. Genome-wide studies of psoriasis susceptibility loci: a review. *J Dermatol Sci.* 2004 Sep;35(3):171-9.
122. Saraceno R, Mannheimer R, Chimenti S. Regional distribution of psoriasis in Italy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008 Mar;22(3):324-9.
123. Schäfer T. Epidemiology of psoriasis. Review and the German perspective. *Dermatology.* 2006;212(4):327-37.
124. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2005 May 5;352(18):1899-912. Review.
125. Setty AR, Curhan G, Choi HK. Obesity, waist circumference, weight change, and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 2007 Aug 13-27;167(15):1670-5.
126. Smith EL, Walworth NC, Holick MF. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the morphological and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J Invest Dermatol* 1986; 86:709-714.

127. Solvsten H, Fogh K, Svendsen M, Kristensen P, Astrom A, Kumar R, Kragballe K. Normal levels of the vitamin D receptor and its message in psoriatic skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1:28–32.
128. Stefanic M, Rucevic I, Barisic-Drusko V. Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and psoriasis risk. *Int J Dermatol*. 2013 Jun;52(6):705-10.
129. Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979; 206:1188–1190.
130. Taymans SE, Pack S, Pak E, Orban Z, Barsony J, Zhuang Z, Stratakis CA. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res*. 1999 Jul;14(7):1163-6.
131. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwilliger J, Lathrop GM, Barker JN. 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*. 1997 May;6(5):813-20.
132. Uitterlinden SG, Fang Y, van Meurs JB, Pols HA, van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338: 143-156, 2004.
133. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;97:93-101.
134. Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B, et al. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet*. 2001 Jan;38(1):7-13.
135. Verhoeven EWM et al. Effect of daily stressors on psoriasis: a prospective study. *Journal of Investigative* 2009, 129: 2075-2077.

136. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? Arch Biochem Biophys. 2012 Jul 1;523(1):123-33.
137. Weiss G, Shemer A, Trau H. The Koebner phenomenon: review of the literature. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2002 May;16(3):241-8.
138. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, Haussler CA, Galligan MA, Thatcher ML, Encinas Dominguez C, Haussler MR. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. Mol Cell Endocrinol. 2001 May 25;177(1-2):145-59.
139. Zerwekh JE, Yu XP, Breslau NA, Manolagas S, Pak CY. Vitamin D receptor quantitation in human blood mononuclear cells in health and disease. Mol Cell Endocrinol. 1993 Oct;96(1-2):1-6.
140. Zhang CF, Liu ZP. Recent Developments of 2-Substituted Analogs of 1,25(OH)2D3. Curr Med Chem. 2013 May 1;20(16):2080-95.
141. Zhu H, Xie K, Chen L, *et al.* The association between vitamin D receptor polymorphism and psoriasis. Chin J Dermatol 2002; 35: 386–388.
142. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. Epidemiol Rev. 2000;22(2):203-17.
143. Zuel-Fakkar NM, Kamel MM, Asaad MK, *et al.* A study of *ApaI* and *TaqI* genotypes of the vitamin D receptor in Egyptian patients with psoriasis. Clin Exp Dermatol 2011; 36: 355–359.